



HAL
open science

Dérivation des électrons photosynthétiques par des quinones sur organisme entier : le cas de *Chlamydomonas reinhardtii*

Adnan Sayegh

► **To cite this version:**

Adnan Sayegh. Dérivation des électrons photosynthétiques par des quinones sur organisme entier : le cas de *Chlamydomonas reinhardtii*. Autre. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS098 . tel-02555169

HAL Id: tel-02555169

<https://theses.hal.science/tel-02555169>

Submitted on 27 Apr 2020

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.

Sorbonne Université

Ecole Doctorale de Chimie Physique et de Chimie Analytique de Paris-Centre –
ED 388

UMR 8640 « PASTEUR » / Groupe « Electrochimie »

Dérivation des électrons photosynthétiques par des quinones sur organisme entier : le cas de *Chlamydomonas reinhardtii*

Par Adnan Sayegh

Thèse de doctorat de Physico-Chimie Analytique

Dirigée par Frédéric Lemaître

Présentée et soutenue publiquement le 20 septembre 2018

Devant un jury composé de :

Hellwig Petra, Professeur des Universités, Rapporteur

Mano Nicolas, Directeur de Recherches CNRS, Rapporteur

Erard Marie, Professeur des Universités, Examineur

Devilliers Didier, Professeur Emérite, Examineur

Joliot Pierre, Professeur Emérite, Examineur

Lemaître Frédéric, Maître de conférences, Encadrant

Delacotte Jérôme, Maître de conférences, Co-Encadrant (Invité)

Guille-Collignon Manon, Maître de conférences, Co-Encadrant (Invité)



A toutes les personnes qui aiment la chimie

et qui aiment passer du temps

derrière leur paillasse...

Remerciements

Mes remerciements vont d'abord à mon directeur de thèse Frédéric Lemaitre dont j'ai suivi les cours en master, qui m'a recruté, fait confiance et aidé grandement dans la préparation des cours que j'ai donné durant ma thèse et à mes encadrants Jérôme Delacotte pour sa disponibilité et apport au projet et Manon Guille-Collignon.

Mes remerciements vont également aux membres du Jury. Tout d'abord à Pierre Joliot qui a accepté de présider le jury et puis aux deux rapporteurs Nicolas Mano et Petra Hellwig pour leur retour élaboré et riche, leur lecture méticuleuse et leur bienveillance. Ça a été pour moi une joie d'avoir Didier Devilliers dans le jury en tant qu'examineur puisque je suis un de ces anciens étudiants. Merci également à Marie Erard d'avoir fait partie du jury.

J'aimerais également remercier Guillaume Longatte, ancien thésard qui m'a initié au travail de recherche pendant mon stage de master et à Léna Beauzamy, post-doctorante avec laquelle j'ai collaboré sur certains points.

A l'ENS je remercie aussi Laurence Grimaud et Luca Perego pour tout le zèle qu'ils ont montré à mon égard et pour leur précieux apport en synthèse organique. Leurs différentes méthodes de travail et leur dynamisme me resteront pour plus tard. Je remercie également Eric Labbé pour son expertise et culture élargie en électrochimie qu'il a toujours su communiquer, Eric Ait pour son aide technique et Olivier Burriez.

A l'IBPC mes remerciements vont d'abord à Francis André Wollman porteur du projet dont les conseils éclairants et la vision large ont su m'aider dans les étapes déterminantes du projet. Je le remercie de m'avoir admis aux réunions du jeudi et à tous les événements organisés par l'institut. J'ai pu profiter à l'IBPC d'un environnement de travail stimulant et sain, d'un certain esprit de cohésion et d'un arbitrage des conflits efficace.

J'aimerais également remercier à l'IBPC Pierre Joliot pour s'être autant investi dans le projet que ça soit dans le traitement des données ou la conduction des expériences. Pierre porte une vision de la science qui ne peut être sujette à compromission et qui est de fait noble et inspirante.

A l'IBPC je remercie également Yves Choquet qui m'a appris beaucoup de choses sur la physiologie de *Chlamydomonas* avec une grande pédagogie et qui m'a proposé et accompagné dans certaines expériences.

Je remercie également Benjamin Bailleul avec qui c'était toujours un régal de travailler. Benjamin communique facilement aux autres sa passion pour la science et leur apprend à toujours pousser plus loin leurs limites. Je lui souhaite une très belle carrière de scientifique et de joie dans sa vie.

La thèse a été marquée par le décès de Fabrice Rappaport qui était directement impliqué dans le projet. Des mois que j'ai passé avec Fabrice je retiens sa gentillesse, son zèle et son courage.

Merci à Sandrine Bujaldon qui m'a toujours accueilli avec le sourire et aidé et à Sophie Landier qui a préparé tous les milieux d'expériences et de culture.

J'aimerais remercier les anciens thésards et post-doc qui ont soutenu avant moi et m'ont montré le chemin.

Merci à Ana, Xiaoqing et Luca avec lesquelles j'ai noué de grandes amitiés qui vont au-delà du laboratoire.

Merci à Thomas Abadie, Damien, Raquel, Indira et Baptiste.

Merci à Li-Hui pour sa très bonne compagnie durant les trois années et demi.

Merci à Pierre-Adrien avec qui j'ai évolué durant tout ce temps. De Pierre-Adrien je retiendrai son exigence et sa grande capacité à évoluer. A lui également je souhaite une très belle carrière scientifique.

Merci à Justine qui a ramené à son arrivée avec elle du vent et ouvert une fenêtre. Je lui souhaite beaucoup de courage pour la suite de sa thèse et dans sa vie personnelle.

Merci à Marina pour tout ce qu'elle m'a appris, tout ce qu'elle m'a montré et pour les belles soirées parisiennes qu'elle organise.

Merci à Vincent Wieczny qui en dépit de son jeune âge arrive à porter de larges responsabilités sur son dos et à toujours aider les autres.

Merci à Caroline, Raja, Wei-an, Thomas le Saux, Aude, Stéphanie, Anne Hallopé, Marie, Richard Kuras, Woljeich I et II, Han-Yi, Suzanne, Alexandra, Domitille, Félix, Lander, Stéfania, Marc et tous les autres.

Je remercie Christian Amatore pour les discussions qu'on a eu.

Je remercie également ma famille. En particulier mes parents pour leur support matériel et affectif, mes frères, beaux frères et mes soeurs, mes cousins, mes oncles et tantes ainsi que mes neveux. La famille est un réseau inépuisable, une infrastructure qui pour moi conditionne le reste.

Je remercie également mes amis. Merci pour Li-Zhi et Manglan, Magdalena et Mathias, Amal et Florent, Théo et Mathilde, Dorothee et Cyrille, Moise, Annie, Jean Francois et Hind, Satya, Arifa et Béatrice et tous les autres.

Enfin mes remerciements vont à toutes les personnes qui œuvrent contre la dimension archaïque de la thèse. A la réalité qui s'impose peu à peu et qui veut que la thèse ne soit plus qu'un contrat à durée déterminée où l'on dispose d'une main d'œuvre qualifiée et peu chère et à laquelle on délivre en récompense un diplôme qui a peu de valeur sur le marché du travail, certain(e)s refusent de prendre part et militent pour une activité scientifique épanouie, pour un partenariat entre le public et le privé et pour l'inclusion du thésard dans un projet professionnel plus large.

Table des matières

Table des abréviations	7
Liste des notations	8
Introduction	11
1 Présentation de la thématique et état de l'Art	15
1.1 Qu'est ce que la photosynthèse ?	17
1.1.1 Localisation de la Photosynthèse	17
1.1.2 Les réactions de la photosynthèse dépendantes de la lumière	18
La photophosphorylation non cyclique	18
La photophosphorylation cyclique	20
1.1.3 Les réactions indépendantes de la lumière	21
1.2 Comment dériver et collecter les électrons photosynthétiques ?	22
1.2.1 Les unités isolées de la photosynthèse	25
Le Photosystème II	25
Le Photosystème I	27
1.2.2 Les sous-fragments cellulaires de la photosynthèse	31
1.2.3 Les systèmes entiers	33
1.2.4 La question des médiateurs	35
Les médiateurs diffusifs	35
Les polymères d'osmium	37
Les systèmes exoélectrogènes	39
Les systèmes microfluidiques	40

1.2.5	Les biocapteurs	41
1.2.6	Bilan	42
1.3	La question de la photoinhibition	43
1.3.1	La structure fonctionnelle du Photosystème II	43
	L'inhibition par le site accepteur	46
	L' inhibition par le site donneur	46
1.3.2	La photoinactivation in vivo	48
1.4	La stratégie définie au laboratoire	49
1.4.1	L'algue <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	49
1.4.2	La dérivation des électrons de la photosynthèse par les quinones . .	52
1.5	Les travaux précédents sur le système biologique <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> au laboratoire	53
1.5.1	L'évaluation de la capacité des quinones exogènes à dériver les électrons de la photosynthèse par fluorescence	54
	La nécessité d'une « correction » du quenching	56
1.5.2	«Criblage» de quinones et photosynthèse : mise en regard avec la littérature	59
	Les interactions quinones-poche Q_B et plastoquinones de type Michaelis-Menten	59
1.5.3	Criblage des quinones par le biais des photocourants	61
1.5.4	Mise en place de diagrammes de zone	63
1.5.5	Le montage à l'échelle préparative	65
1.6	Conclusion du chapitre	69
2	Evaluation de la capacité des quinones à dériver les électrons par suivi électrochimique	71
2.1	Retour sur le contexte	73
2.2	Le dispositif expérimental	74
	Choix de l'électrolyte	75
	Concentration en cellules	76
	La lumière incidente	76

2.2.1	Propriétés du système d'étude – Calculs préliminaires – Ordres de grandeur	76
	Calcul du nombre de quinones par photosystème	76
	Calcul de la proportion de quinones internalisées	77
2.3	Etudes préliminaires en voltamétrie cyclique	78
	Le cas de la 2,6-dichlorobenzoquinone	79
	Le cas de la 2,6-diméthylbenzoquinone	81
	Bilan	81
2.4	Chronoampérométrie - mesure de photocourants	82
2.4.1	Obtention de photocourants	82
	Régime transitoire	84
	Intensités de lumière différentes	88
	Comparaison WT et $\Delta f1$	89
2.4.2	Régime stationnaire	89
	Influence de la concentration en algues sur le courant	89
	Effet de la concentration et de la nature de la quinone	91
	Comparaison entre souches « WT » et « $\Delta f1$ » - études d'autres quinones	92
2.4.3	Essais de modélisation du système – retour à la voltamétrie cyclique	94
	Description générale	94
	Application au système algues-quinone	97
	Les limites du modèle	101
2.4.4	Stabilité du système dans le temps	102
	Etude de la photoinhibition à travers des cycles jour/nuit	103
	Cas de la 2,6-dichlorobenzoquinone	103
	Cas de la 2,6-diméthylbenzoquinone	105
2.4.5	Mise en évidence de la toxicité lors de l'incubation des algues par les quinones sous obscurité	106
2.4.6	Autres facteurs de baisse du courant	108
2.4.7	Courants sous obscurité	109
2.4.8	Valorisations du dispositif	110

La question du soulagement de la chaîne photosynthétique	110
Le reroutage des électrons de la photosynthèse	111
2.5 Conclusion	113
3 Etude des interactions quinones-algues par spectroscopies de fluorescence et d'absorption	115
3.1 Généralités	117
3.2 Les paramètres de fluorescence et les séquences de mesure	118
3.2.1 Les grandeurs de fluorescence	118
3.2.2 Rendement quantique maximal du PSII	119
3.2.3 Proportion de centres ouverts	121
3.2.4 Rendement quantique du PSII	121
3.3 Le JTS ou Joliot Type spectrometer	122
3.3.1 Les séquences utilisées et le principe de détection du JTS	122
3.3.2 L'induction de fluorescence chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	123
3.4 Le suivi du Φ_{PSII} des algues incubées avec les quinones sous obscurité	124
3.4.1 Suivi de la proportion de centres ouverts en fonction du quenching	129
Expression du Φ_{PSII} en présence de quinones	129
3.4.2 Le suivi de $[Q_A]$	129
3.4.3 Correction du quenching dans l'expression du rendement quantique du PSII	131
3.5 Réversibilité de l'effet des quinones	135
3.6 Le suivi de l'état de l'ATP synthase en présence de quinones	136
3.7 Etude aux temps courts : capacité des quinones à oxyder Q_A^-	138
3.8 Circulation fluidique	143
3.9 Conclusion	144
4 Etude de l'influence de la structure chimique de la quinone sur son degré de performance	145
4.1 Définition	147
4.2 Histoire des quinones et utilisation par les Hommes	147
4.3 Réactivité	149

4.3.1	Densité électronique	149
	Les additions nucléophiles sur les quinones	149
4.3.2	Les substitutions nucléophiles des quinones	150
4.3.3	Stabilité de la 2,6-DCBQ en milieu de l'expérience	151
	L'analyse du changement de couleur de la solution de 2,6- DCBQ	151
	Le suivi cinétique de la dégradation de la 2,6-DCBQ	152
4.4	Empoisonnement par les quinones	155
4.4.1	La toxicité des quinones dans la chimie médicinale	155
4.4.2	Les origines de la toxicité des quinones-la «protein binding theory»	157
4.4.3	Les quinones agents de «cross-linking»	158
4.4.4	L'hypothèse du stress-oxydant : cycle redox et activation du dioxygène	159
4.4.5	Les hépatocytes : des cellules modèles pour l'étude des mécanismes de cytotoxicité des quinones	161
4.5	La toxicité des benzoquinones sur les algues <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . .	163
4.5.1	Détermination de la période de duplication des algues	165
4.5.2	Les expériences de toxicité	166
4.6	Synthèse de nouvelles quinones	168
4.6.1	La 2,5-dichloro-3,6-dimorpholine-1,4-benzoquinone	168
	Cytotoxicité	169
	Voltamétrie cyclique	169
	Chronoampérométrie	169
	Interaction avec la chaîne photosynthétique	169
4.6.2	La 2,5-dichloro-3,6-di- <i>tert</i> -butylthio-1,4-benzoquinone	172
	Détermination des potentiels d'oxydation et de réduction . .	172
	Cytotoxicité	172
4.6.3	La 2,3-diméthyl-5-phényl-1,4-benzoquinone (DMPPBQ)	173
	Détermination des potentiels d'oxydation et de réduction . .	174
	Cytotoxicité	174
	Capacité de dérivation	175
	Chronoampérométrie	175

4.7	Choix de la meilleure quinone	179
4.8	Conclusion	180
	Conclusion générale	182
	Partie expérimentale	187
	Bibliographie	195
	Liste des figures	210
	Liste des Tableaux	221

Table des abréviations

2,6-DCBQ	2,6-Dichlorobenzoquinone
2,5-DCBQ	2,5-Dichlorobenzoquinone
2,6-DMBQ	2,6-Diméthylbenzoquinone
2,5-DMBQ	2,5-Diméthylbenzoquinone
ATP	Adénosine TriPhosphate
BQ	Benzoquinone
LHC	Light Harvesting Complex
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
PPBQ	Phényl-para-Benzoquinone
PQ	Plastoquinone
PQH₂	Plastoquinol
PSI/PSII	Photosystème I/ Photosystème II
WOEC	Water Oxidizing Evolving Complex
DCMU	Diuron (3-(3,4-DiChlorophenyl)-1,1-diMethylUrea)
ITO	Oxyde d'indium dopé à l'oxyde d'étain
NBQ	Naphtobenzoquinone
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
IBPC	Institut de Biologie-Physico-Chimique
JTS	Joliot Type Spectrometer
WT	Wild Type

Liste des notations

b	Ratio des cinétiques d'arrivée de la quinone exogène au site réactionnel sur la cinétique de transfert d'électrons.
D_∞	Proportion de sites ouverts pour une concentration infinie en quinones
$F(I)$	Constante de vitesse de la photoréduction de Q_A^-
F_0	Fluorescence mesurée en absence d'irradiation.
F_M	Fluorescence mesurée au niveau d'un pulse de lumière saturante.
F_{stat}	Fluorescence mesurée sous lumière actinique.
k	Rapport de l'efficacité de la régénération électrochimique et de la dérivation électronique limitée par l'arrivée de la quinone au site réactionnel
k_F	Constante de vitesse de désexcitation de la chlorophylle par fluorescence
k_P	Constante de vitesse de désexcitation de la chlorophylle par la photosynthèse
k_H	Constante de vitesse de désexcitation de la chlorophylle par transfert de chaleur .
k_Q	Constante de vitesse de désexcitation de la chlorophylle par quenching de la quinone exogène.
k_{dQ}	Constante de vitesse de libération du site réactionnel par la quinone réduite
α	Concentration en quinone normalisée par la concentration pour laquelle les rendements des flux exogènes et endogènes sont égaux.
β	Paramètre rendant compte de la limitation du flux exogène par l'arrivée de la quinone ou par la cinétique de transfert d'électrons.
ρ_0	Pente initiale du flux exogène en fonction de la concentration en quinones
ν	vitesse de balayage

Introduction

Dans le contexte actuel des énergies renouvelables, l'énergie solaire constitue une piste de travail séduisante. En effet, le flux solaire est le plus important des flux d'énergie subis par notre planète. En une heure, un mètre carré moyen reçoit 50 milliards de milliards de photons soit une puissance d'environ 900 Watt ce qui, intégré sur une année et sur toute la surface de la Terre, représente plus de 1000 fois la consommation énergétique de l'humanité. Cependant, si la source d'énergie est largement présente, il reste à trouver le bon convertisseur pour pouvoir la substituer aux énergies fossiles remises en cause par le réchauffement climatique.

Dans ce cadre, on peut s'intéresser aux processus mis en jeu dans la Nature qui tirent profit de l'énergie solaire. C'est le cas de la photosynthèse qui occupe une place particulière dans notre biosphère et fait ainsi écho à l'importance du flux énergétique solaire. Il s'agit d'un processus biologique qui a notamment permis aux plantes de coloniser toute la planète. En effet, lors de la première étape de la photosynthèse, l'absorption d'un photon par un pigment chlorophylle permet d'exciter un électron qui, transmis à un accepteur primaire, entraîne formellement la création d'un dipôle électrique $+/-$. Cette première étape fait partie d'un processus de grande échelle qui permet la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique stockée essentiellement sous forme de glucides.

Durant l'évolution, les plantes ont ainsi su s'adapter pour tirer profit de la photosynthèse et absorber la lumière en déployant des stratégies de multiplication des membranes, d'empilement... La flore apparaît donc à juste titre comme un parc naturel potentiel pour la production d'énergie à usage humain. Mais ce convertisseur a ses propres limites. Il est établi aujourd'hui que la capacité des plantes à convertir l'énergie lumineuse en sucres ne

croît pas linéairement avec l'intensité de l'énergie lumineuse à laquelle elles sont soumises. Au contraire, l'excès de lumière qui prévaut sous certaines conditions peut causer des dommages à l'appareil photosynthétique de la plante par formation d'espèces réactives de l'oxygène. Ce phénomène est connu sous le nom de photoinhibition. En effet, la limitation à forte lumière incidente est intrinsèque au mode de transfert électronique qui ne peut excéder une certaine vitesse dans la chaîne photosynthétique couplée aux réactions biochimiques.

La stratégie mise en oeuvre au sein de ce projet est donc de produire un photocourant en dérivant les électrons de la photosynthèse par voie électrochimique. Il s'agit plus particulièrement de tirer bénéfice de conditions de forte illumination pour générer une bioélectricité sans compromettre la capacité de l'organisme photosynthétique à assurer ses besoins en réalisant la photosynthèse. Pour cela, on cherche à mettre en place une dérivation ciblée en amont de l'étape cinétiquement limitante du transfert électronique. A ce titre, la dérivation électronique doit permettre aussi de soulager la chaîne photosynthétique « malmenée » par une irradiation trop forte.

Un point clé de ce travail est de s'intéresser non pas à des unités ou sous-unités photosynthétiques mais de considérer un système cultivable, à savoir un organisme entier de physiologie aussi complexe que l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*. Cette algue possède un appareil photosynthétique semblable à celui des plantes supérieures et croît en même temps dans des milieux aqueux relativement dilués et compatibles avec des expériences d'électrochimie classiques. Elle est par ailleurs activement étudiée à l'Institut de Biologie-Physico-Chimique (IBPC) UMR 7141 avec lequel une étroite collaboration a débuté fin 2012, laquelle permet de disposer d'une expertise sur la photosynthèse en termes d'études (notamment les techniques spectroscopiques développées historiquement au sein de ce laboratoire pour suivre la photosynthèse en temps réel sur cette algue) et de banque de mutants.

La question de la dérivation des électrons photosynthétiques sur un microorganisme pose néanmoins la question de l'accès à la chaîne pour le collecteur d'électrons, en l'occu-

rence l'électrode. Ceci suppose l'utilisation d'un médiateur redox, à savoir des molécules de type quinone dans le cas présent. Cette thèse s'insère donc dans la continuité de travaux antérieurs réalisés par le Dr Guillaume Longatte qui s'est intéressé d'une manière assez fondamentale aux interactions entre les quinones et la chaîne de transfert d'électrons puis à la mise en place d'un dispositif de dérivation à l'échelle préparative sur suspension d'algues. Ces études nous ont fourni une première vision de la stratégie mise en jeu et ont posé les bases d'un formalisme important, notamment à travers des diagrammes de zone dont la connaissance nous a permis de nous positionner dans des conditions de travail optimales et de comprendre l'origine de certaines limitations qui entrent en jeu.

Le travail présenté ici consiste donc à poursuivre et étendre l'étude des interactions entre quinones et chaîne photosynthétique de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*, en particulier la dualité « dérivation/empoisonnement » des quinones. Par ailleurs, une nouvelle cellule électrochimique a été élaborée, dont le confinement permet non seulement de multiplier les conditions d'études mais aussi de se positionner dans une logique d'ingénierie. Ces deux aspects rejoignent la question fondamentale de la stabilité de notre système de dérivation dans le temps et sa possible extension à de futures applications.

Chapitre 1

Présentation de la thématique et état de l'Art

1.1 Qu'est ce que la photosynthèse ?

La photosynthèse¹ est un processus en plusieurs étapes, utilisé à grande échelle par les plantes ainsi que d'autres organismes vivants dans la Nature pour convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique. L'énergie est stockée sous forme de glucides synthétisés à partir de dioxyde de carbone et d'eau. L'organisme peut alors ultérieurement métaboliser ces molécules.

1.1.1 Localisation de la Photosynthèse

Chez les plantes et les algues, la photosynthèse a lieu dans des organelles appelées « chloroplastes » (**Fig 1.1**). Une cellule végétale contient en moyenne 10 à 100 chloroplastes. Le chloroplaste est délimité par deux membranes phospholipidiques interne et externe séparées par un espace intermembranaire. La membrane interne délimite un espace occupé par un fluide aqueux nommé « stroma ».

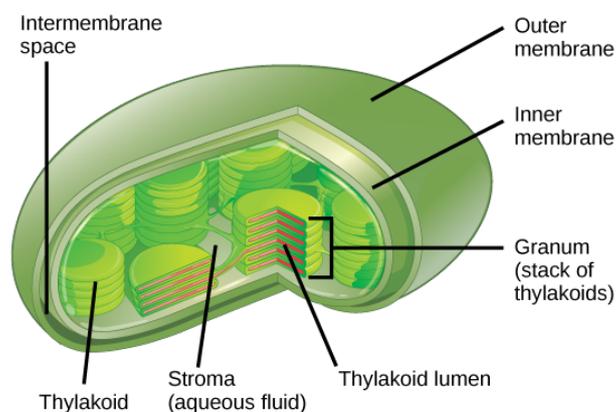


Figure 1.1: Schéma de la structure du chloroplaste [1].

Au sein du stroma, on retrouve des compartiments en forme de disques aplatis : les thylakoïdes empilés en grana au sein desquels a lieu la photosynthèse. Les thylakoïdes constituent ainsi un ensemble de membranes. On parle aussi de membranes thylakoïdes qui sont des structures en double couche lipidique et dont la membrane intérieure délimite un espace (dit thylakoïdal) aqueux appelé le lumen. C'est bien au sein de la membrane

1. Le terme photosynthèse dérive en effet du grec phos, "lumière" et synthesis, "assemblément".

thylakoïde que se retrouvent les complexes membranaires protéiques du système photosynthétique ainsi que les pigments qui absorbent l'énergie lumineuse et qui constituent les photosystèmes.

1.1.2 Les réactions de la photosynthèse dépendantes de la lumière

Le processus photosynthétique regroupe deux grandes phases nommées phase claire (qui dépend de la lumière) et phase sombre (indépendante de la lumière). Les réactions impliquées dans le cadre de la phase claire se déroulent au sein de la membrane thylakoïde alors que les réactions de la phase sombre ont lieu dans le stroma du chloroplaste. La membrane thylakoïde contient 4 complexes protéiques majeurs : le photosystème II, le cytochrome b_6f , le photosystème I et l'ATP synthase. Ces 4 complexes collaborent ensemble dans le but de générer de l'ATP et du NADPH.

La photophosphorylation non cyclique

La photophosphorylation dite « non cyclique » (**Fig 1.2**) consiste en un flux d'électrons qui, suite à l'illumination, va de l'oxydation d'une molécule d'eau à la réduction d'une molécule de $NADP^+$ à travers une série d'enzymes membranaires et de protéines transporteuses. Lors de ce transfert, un gradient de concentration en protons est induit à travers la membrane des thylakoïdes au niveau du complexe cytochrome b_6f et des deux photosystèmes. Ce gradient électrochimique est utilisé par l'ATP synthase pour réaliser la phosphorylation de l'ADP en ATP.

Ainsi, au cours de la photophosphorylation non cyclique, l'eau H_2O est oxydée en dioxygène O_2 au niveau du complexe d'oxydation de l'eau (COE) du photosystème II alors que le $NADP^+$ est réduit en NADPH par la ferrédoxine- $NADP^+$ réductase. L'ATP constitue la monnaie usuelle d'échange d'énergie dans la cellule. Le NADPH, lui, est un agent réducteur important et courant.

De manière plus détaillée, lors de la phosphorylation non cyclique, les photons sont capturés par les antennes collectrices de lumière du photosystème II (PSII), généralement des pigments de type chlorophylle mais aussi par d'autres pigments accessoires comme les caroténoïdes. Cette absorption libère des électrons par un phénomène de séparation de charge photoinduite. Les électrons passent ensuite à l'accepteur primaire d'électrons : la phéophytine, une molécule de chlorophylle dépourvue d'atome de magnésium central. L'électron poursuit son transit le long de la chaîne photosynthétique selon le schéma en Z (**Fig 1.2**) à travers la quinone Q_A puis une plastoquinone mobile PQ qui vient s'insérer dans le site Q_B adjacent à Q_A et se réduire. La plastoquinone doublement réduite rejoint ensuite un pool de plastoquinones et transmet ses électrons au cytochrome b_6f qui à son tour les transmet à une plastocyanine pour conduire à la réduction d'une molécule de chlorophylle oxydée du PSI. A ce stade, l'électron nécessite d'être à nouveau excité pour permettre *in fine* la réduction du $NADP^+$ en NADPH.

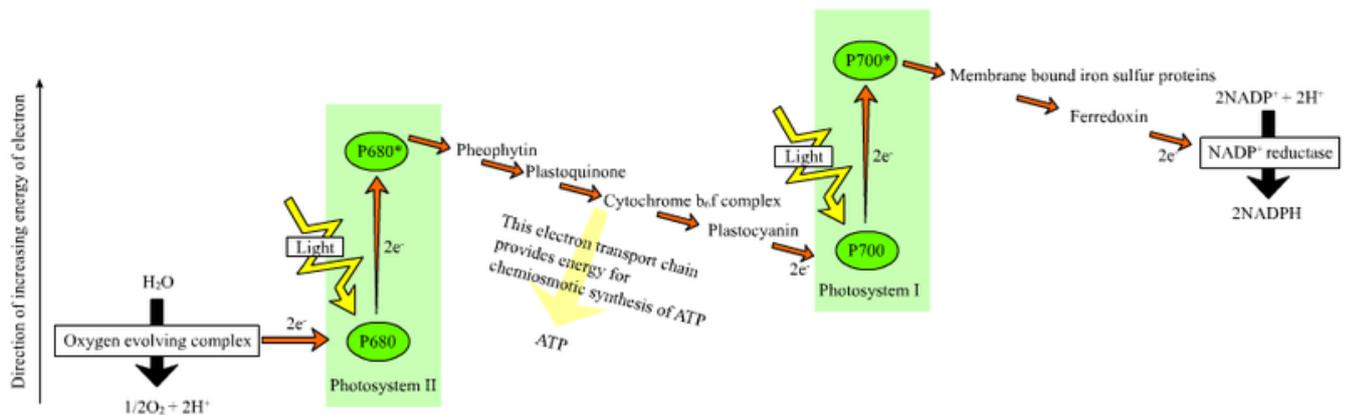


Figure 1.2: Schéma dit en « Z » de la chaîne de transfert d'électrons de la photosynthèse. L'appellation « Z » vient du chemin suivi par les potentiels des différents couples mis en jeu au sein de la chaîne [2].

Notons que dans le schéma en Z, l'étape cinétiquement limitante est celle de l'oxydation monoélectronique du plastoquinol PQH_2 doublement réduite au niveau du cytochrome b_6f (**Fig 1.3**) [3].

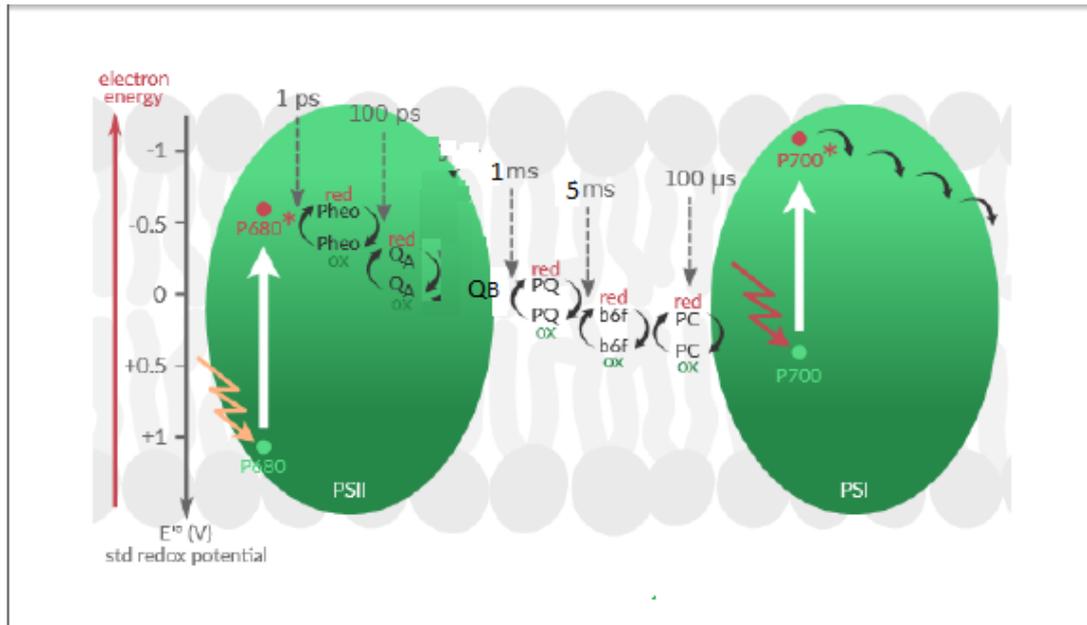


Figure 1.3: Schéma montrant les temps caractéristiques des différentes étapes du transfert électronique entre le PSII et le PSI.

La photophosphorylation cyclique

La photophosphorylation linéaire n'est pas le seul processus de la phase claire. Il existe également une photophosphorylation dite cyclique (**Fig 1.4**) similaire à la non cyclique mais qui diffère par le fait qu'elle génère uniquement de l'ATP et pas de NADPH réduit. A ce titre, elle est déclenchée dans des conditions physiologiques bien particulières [4]. En l'occurrence, elle ne concerne que le photosystème I et ne crée pas d'oxygène O₂.

Ainsi, une fois l'électron excité par la lumière au sein du PSI, il passe à la ferrédoxine, à la plastoquinone puis au complexe cytochrome décrivant son chemin de retour vers le PSI d'où le nom de photophosphorylation cyclique donné à ce mode de photosynthèse. Ce cycle contribue cependant à la différence de potentiel du proton transmembranaire qui constitue la force motrice de la synthèse de l'ATP (**Fig 1.4**).

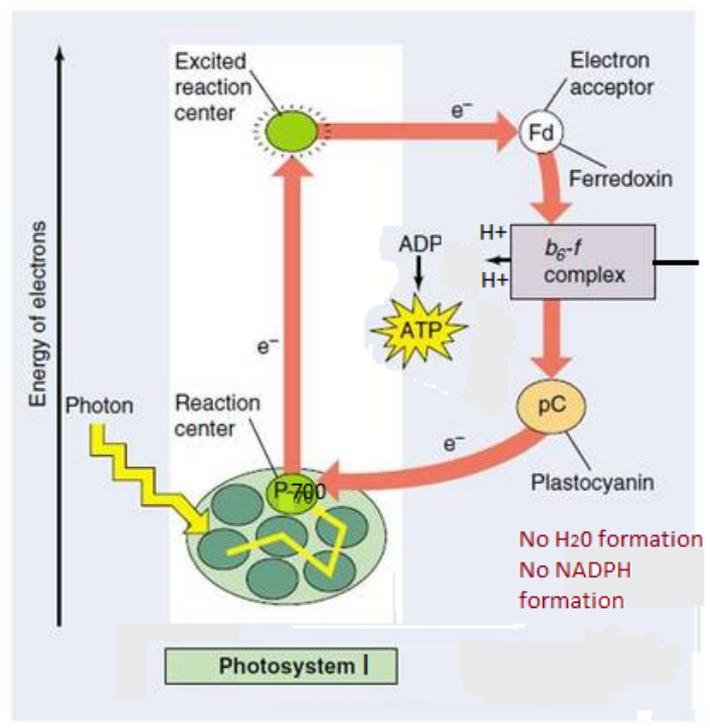


Figure 1.4: Schéma de la phosphorylation cyclique [5].

1.1.3 Les réactions indépendantes de la lumière

La phase sombre correspond en partie au cycle dit « de Calvin » (Fig 1.5), durant lequel le carbone provenant du dioxyde de carbone gazeux CO₂ est fixé et utilisé pour la synthèse de trioses dans le stroma du chloroplaste. L'énergie nécessaire à ce processus provient de l'ATP et du NADPH réduits, produits au cours des réactions dépendantes de la lumière décrites précédemment. L'assimilation du CO₂ se fait en 4 étapes dont les 3 premières constituent le cycle de Calvin. Lors de la première étape a lieu la fixation du carbone sur le ribulose diphosphate sous l'action de l'enzyme RubisCO. Ceci conduit à la formation de molécules de 3-phosphoglycérate à 3 carbonnes. Ce produit sera ensuite réduit en trioses. Pour cela le phosphoglycérate sera tout d'abord phosphorylé par de l'ATP pour donner l'acide biphospho-glycérique, qui sera lui-même réduit par le NADPH pour former le 3-phosphoglyceraldéhyde (G3P) qui est un sucre. Ensuite a lieu la régénération de l'accepteur Ribulose 1-5-diphosphate (RuBP) qui sera réutilisé pour fixer le CO₂. Elle se fera en plusieurs étapes et nécessitera l'utilisation d'ATP. Ceci ferme le cycle de Calvin. La synthèse des glucides proprement dite constitue la quatrième étape.

Le 3-phosphoglyceraldéhyde (G3P) va entrer dans les voies métaboliques de la plante et

sera transformé principalement en saccharose et amidon.

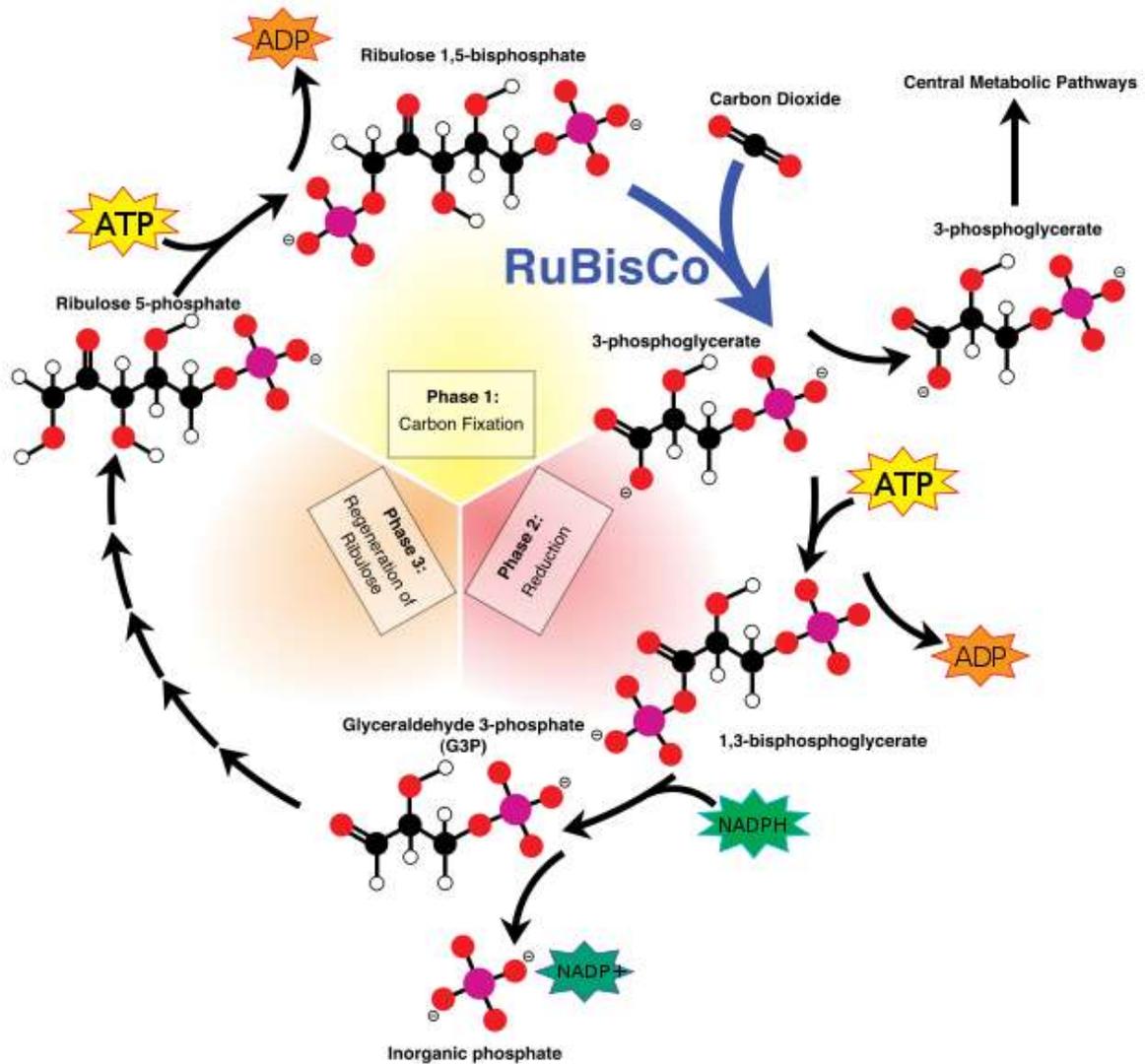


Figure 1.5: Schéma du cycle de Calvin [6].

1.2 Comment dériver et collecter les électrons photosynthétiques ?

Vue sous l'angle du transfert électronique, la photosynthèse n'est pas sans s'apparenter à un système électrochimique classique avec deux sites connectés et localisés, l'un d'oxydation et l'autre de réduction. D'un côté de la chaîne, au niveau du complexe d'oxydation de l'eau, l'oxydation de l'eau en dioxygène libère des électrons permettant la réduction de

NADP⁺ en NADPH de l'autre côté. Le transfert électronique entre les deux extrémités se fait à travers la chaîne photosynthétique via une succession de transferts électroniques.

C'est un tel constat qui, depuis une dizaine d'années, incite de nombreux groupes de recherche à envisager la photosynthèse sous l'angle énergétique. Le principe consiste à utiliser une électrode collectrice qui va, d'une manière ou d'une autre, interférer avec la chaîne photosynthétique et ainsi ponctionner tout ou partie du flux électronique s'écoulant du PSII à la ferrédoxine. Au-delà de la compréhension de la nature des phénomènes mis en jeu, ces travaux exploitent différentes pistes de dérivation pour obtenir des (densités de) photocourants significatifs et stables. Différentes stratégies employées par les différents groupes seront exposées dans les paragraphes qui suivent. Leurs caractéristiques seront globalement décrites afin de les mettre en regard avec les orientations prises dans le cadre de ce manuscrit et expliciter la stratégie que nous avons choisie de mettre en oeuvre pour dériver les électrons de la photosynthèse.²

Il n'est toutefois pas aisé de dresser un bilan des différents travaux qui se font dans le domaine des cellules photobioélectrochimiques³.

Certains travaux considèrent une demi-pile de type photobioanode isolée ou connectée à une cathode. Cette photobioanode associe le système photosynthétique sous illumination à une électrode de potentiel suffisamment positif pour «oxyder» la chaîne photosynthétique et recueillir ainsi un photocourant. D'autres systèmes, notamment en présence de Photosystèmes I isolés, font intervenir une photoréduction mais conduisent aussi à l'obtention d'un photocourant.

La comparaison des différentes stratégies et dispositifs du point de vue des performances soulève de nombreuses difficultés. La première, et non des moindres, est liée à la

2. Seront uniquement présentés ici les travaux liés à l'exploitation de la photosynthèse dite naturelle, c'est-à-dire les études impliquant une chaîne photosynthétique issue d'un organisme vivant. Les travaux qui visent à mimer ou reconstruire une chaîne à partir d'éléments chimiques (photosynthèse dite artificielle) ne seront pas discutés.

3. Il n'est pas simple de trouver un terme générique englobant tous les systèmes mis en jeu. Le terme « biophotovoltaïque » est fréquemment utilisé mais ce terme bien qu'éthymologiquement générique a été attribué au domaine des systèmes qui génèrent du courant à partir d'organismes phototrophes, l'eau étant la source d'électrons [7]. Si par extension on choisit d'inclure, les photosystèmes isolés ou les fractions sous-cellulaires dans cette définition, les électrons doivent provenir systématiquement de l'oxydation de l'eau, ce qui implique une récupération à l'anode. Cette classification exclut de fait les photosystèmes I isolés car la plupart concerne une réaction de réduction (v. plus loin dans ce chapitre).

technique mise en jeu pour évaluer la capacité de la photobio-pile à extraire les électrons photosynthétiques. En effet, comme précisé plus haut, certains groupes de recherche ne considèrent leur système que sous l'angle de la demi-pile. En conséquence, la caractérisation s'effectue pour l'essentiel par le biais de la chronoampérométrie, c'est-à-dire en imposant un potentiel constant à l'électrode collectrice et mesurant le photocourant (ou la densité de photocourant) produit durant le temps de l'illumination. Par contre, d'autres groupes privilégient la pile dans son ensemble (anode + cathode). Dans ce cas, l'analyse est réalisée au moyen de courbes de polarisation, à savoir la mesure de la tension et de la densité de courant produites sous illumination en circuit fermé avec différentes valeurs de résistance. Des puissances (surfaiques ou non) peuvent être alors calculées pour refléter la performance du système. Des photocourants peuvent également être extraits mais ne peuvent en aucun cas être directement comparés à ceux issus de la demi-pile. S'il est donc délicat de confronter les données quantitatives d'une pile et d'une demi-pile, on peut toutefois arguer que le système électrochimique entier, c'est-à-dire la pile, est par nature plus avancé en termes de développement. C'est probablement pourquoi de nombreuses revues ne reportent que ce type de configuration⁴ [8] [9] [10] [11]. La question de la comparaison ne se limite malheureusement pas à la question du « design » de la cellule électrochimique. D'autres critères sont essentiels, comme la lumière (intensité, longueurs d'onde...), les données quantitatives « biologiques » (nombres de PSII, chlorophylles, concentration en organismes dans le système ou sur l'électrode), la stabilité du système dans le temps ou son efficacité quantique (% de photons incidents convertis en électrons) [12].

Quoi qu'il en soit, la question centrale dans ce type de configuration reste la connexion entre la chaîne de transport d'électrons et l'électrode collectrice proprement dite. A cet égard, la nature du transfert depuis la chaîne photosynthétique, à savoir direct ou indirect, est l'un des points clés à considérer. Plusieurs orientations émergent pour faciliter un tel transfert [13] :

- Mettre en jeu un système « simple », c'est-à-dire privilégier des fragments de l'organisme ou des unités photosynthétiques isolées comme la membrane thylakoïde

4. Notons cependant que dans le domaine de la photobioélectrochimie, les demi-piles présentent des avantages sur les piles entières lorsqu'il est question d'élucider les mécanismes d'interactions entre le système biologique en présence et les électrodes ou d'optimiser la durée de vie de ce système biologique dans les conditions expérimentales de dérivation.

ou les photosystèmes (I ou II).

- Travailler avec un système photosynthétique adsorbé à la surface de l'électrode au lieu d'un système en suspension.
- Utiliser un médiateur rédox dont la forme oxydée interagit avec la chaîne quand la forme réduite est oxydée à la surface de l'électrode.

Comme nous allons le voir dans la suite de ce paragraphe, il est rare qu'une seule orientation soit privilégiée. En pratique, les stratégies mises en jeu représentent souvent une combinaison de deux ou des trois orientations décrites plus haut. Il existe certains travaux où une nanoélectrode est directement insérée au sein d'une algue unicellulaire unique mais le site d'extraction des électrons ainsi que le caractère invasif de la méthode posent question [14] [15].

1.2.1 Les unités isolées de la photosynthèse

Une première stratégie consiste à mettre à profit des unités élémentaires isolées de la photosynthèse comme le photosystème II (PSII) en tant que source d'électrons ou le photosystème I (PSI). Ne seront abordés ici que quelques exemples récents et illustratifs, l'ensemble étant bien documenté dans de nombreuses revues [16] [17] [18].

Le Photosystème II

Un exemple illustratif est l'isolement des cyanobactéries thermophiles *Thermosynechococcus elongatus* qui peuvent ainsi être fixées à une électrode d'ITO (oxyde d'indium dopé à l'étain) mésoporeuse (constituée d'une couche d'ITO et de nanoparticules d'ITO) par dépôt d'une goutte de solution de PSII isolés [19]. La récupération par chronoampérométrie a lieu principalement au niveau des sites Q_A et Q_B et ne nécessite pas forcément de médiateur. Toutefois, l'utilisation de quinones (1 mmol.L⁻¹ de 2,6-dichlorobenzoquinone 2,6-DCBQ ou 4-naphtoquinone-2-sulfonate NQS) permet d'augmenter la densité de photocourant obtenue qui passe alors de 2 à 22 et 12 μ A respectivement. Le fait que la 2,6-DCBQ améliore la récupération est lié à son potentiel standard apparent plus élevé (21 mV vs NHE contre -60 mV vers NHE pour la NQS) qui la rend plus oxydante. Il est à noter que des courants quasi-stationnaires sont obtenus en absence de médiateur sur 30 secondes alors que le photocourant, bien que plus intense en présence de quinones,

décroît rapidement. On remarquera également que l'épaisseur de la couche mésoporeuse d'ITO est un facteur clé dans ce type de système puisque passer d'une couche de 3 à 40 μm conduit à des densités de courant de $750 \mu\text{A.cm}^{-2}$ (sans médiateur) et $930 \mu\text{A.cm}^{-2}$ (avec DCBQ) en accord avec un chargement accru des PSII à la surface de l'électrode. La déclinaison de cette configuration sous forme d'une pile entière a été mise en oeuvre avec une biocathode à base d'hydrogénase.

La stratégie d'immobilisation des PSII dépend de la nature de l'électrode et du contact électrique faisant intervenir le photosystème. Ainsi, Tel-Vered et al proposent d'immobiliser les PSII isolés sur une électrode d'Or au sein d'un polymère comme le poly(mercapto-p-benzoquinone). Ce dernier joue alors un rôle de relais électronique qui facilite l'extraction des électrons lors de l'oxydation de l'eau au niveau du PSII [20]. Si les photocourants en chronoampérométrie restent relativement modestes ($3 \mu\text{A.cm}^{-2}$ dans les conditions de l'étude), cette photobioanode peut être insérée dans une cellule électrochimique entière (cathode de Pt ou de carbone vitreux recouvert de nanotubes de carbone (CNTs) et de Bilirubine oxidase), générant alors une densité de courant de $60 \mu\text{A.cm}^{-2}$ pour une puissance maximale de $17 \mu\text{W.cm}^{-2}$.

Le groupe de W. Schuhmann s'est particulièrement investi dans la stratégie des PSII immobilisés. Une orientation notable est l'encapsulation des PSII au sein d'un hydrogel et fixés sur électrode (carbone vitreux ou or) recouvert d'un polymère conducteur électronique à base d'osmium (**Fig 1.6**). Ce dernier, à travers le couple Os(III)/Os(II) joue le rôle de relais électronique entre le PSII et l'électrode de travail [21]. Le polymère d'osmium n'est d'ailleurs pas la seule possibilité et un autre polymère à base de phénothiazine peut être utilisé [22]. Des courants de 15 à $45 \mu\text{A.cm}^{-2}$ sont obtenus par chronoampérométrie et l'extension en pile entière (cathode = hydrogel contenant des PSI sur polymère d'Os – carbone vitreux) donne des performances de $10 \mu\text{A.cm}^{-2}$ et $2 \mu\text{W.cm}^{-2}$. En modifiant la structure du polymère d'osmium ou la nature de l'électrode, notamment l'IO-ITO (opale inverse d'ITO mésoporeux), ce groupe de recherche obtient, dans des conditions d'illumination comparables avec ses autres études (lumière rouge, $\lambda = 685 \text{ nm}$ à 10 mW.cm^{-2}), l'une des meilleures performances rapportées dans la littérature en chronoampérométrie : $300 \mu\text{A.cm}^{-2}$ sans médiateur et $500 \mu\text{A.cm}^{-2}$ en présence de 2,6-DCBQ (1 mmol.L^{-1}) [23].

On notera que l'immobilisation des PSII à la surface de l'électrode n'est pas seulement réalisée par simple dépôt d'une solution ou d'un hydrogel, comme dans les cas décrits plus hauts mais peut aussi être effectuée par greffage covalent [24].

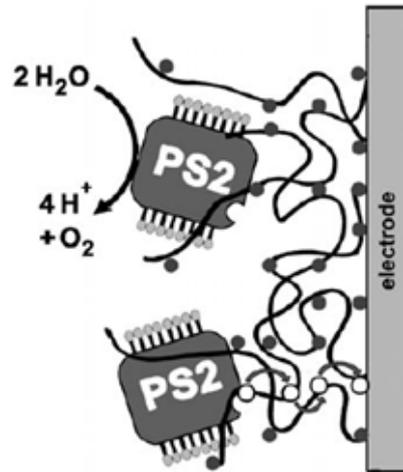


Figure 1.6: Représentation schématique de PSII immobilisés au sein d'un polymère d'osmium d'après les travaux de Badura et coll [21].

De manière générale, au-delà de la simple performance, la stabilité de ces systèmes est peu étudiée. En particulier, les durées d'illumination sont pour la plupart de quelques dizaines de secondes. Il est donc difficile de donner une rationalisation même si globalement les densités de photocourant semblent plus stables pour des valeurs modérées (10 à 50 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) et en absence de médiateur exogène.

Le Photosystème I

Les cellules photobioélectrochimiques mettant en jeu des Photosystèmes I isolés s'inscrivent également dans une configuration où les entités photosynthétiques sont immobilisées à la surface de l'électrode collectrice. Mais contrairement au cas des PSII, l'électrode de travail joue cette fois le rôle de cathode, en accord avec le fait qu'au sein de la chaîne photosynthétique, le PSI est un accepteur d'électrons. En effet, le centre réactionnel du PSI contient un dimère de chlorophylle noté P700 ainsi que différents accepteurs d'électrons (chlorophylle, phylloquinone, clusters Fe-S) notés A_0 , A_1 , F_X , F_A et F_B . L'excitation du PSI induit une séparation de charge suivie de la réduction de P700^+ par une plasto-

cyanine réduite venant en amont. Ont lieu en parallèle différents transferts électroniques aboutissant à la formation de FB^- qui cède son électron à l'accepteur final du PSI, la ferrédoxine. La stratégie globale est donc différente de celle du PSII et nécessite la présence d'un donneur d'électrons, en l'occurrence l'électrode (éventuellement assistée d'un médiateur ou d'un relais) et d'un accepteur exogène d'électrons (éventuellement régénéré à l'électrode) (**Fig 1.7**).

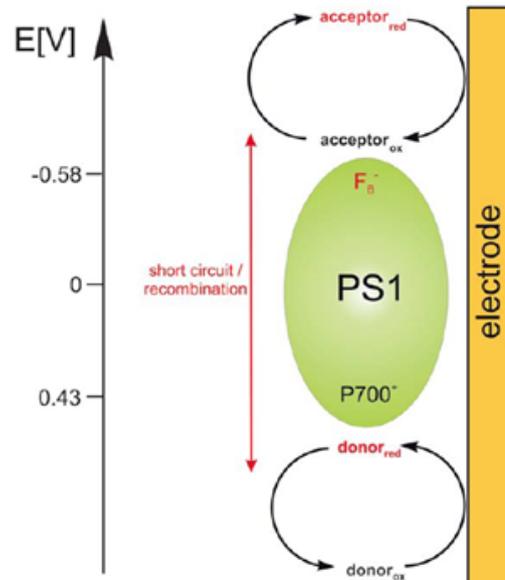


Figure 1.7: Stratégie générale d'utilisation de PSI isolé dans une cellule photobioélectrochimique d'après les travaux de Badura et coll [16].

C'est dans ce contexte que le groupe de W. Schuhmann cherche à tirer profit à nouveau du greffage de PSI isolés par le biais d'un polymère d'osmium recouvrant la surface de l'électrode de travail (**Fig 1.8**).

L'accepteur exogène d'électrons choisi est le méthylviologène (1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridinium aussi nommé paraquat) noté MV_2^+ . L'oxygène permet de travailler en conditions catalytiques avec MV_2^+ , le polymère d'osmium jouant le rôle de relais électronique « donneur d'électrons » sous sa forme Os(II). Il n'est pas de notre propos de détailler ici toutes les structures possibles pour ce type de polymère. Celles-ci ont été abondamment étudiées et montrent que le potentiel standard, le degré de gonflement du polymère et son caractère hydrophobe sont des paramètres déterminants [25]. Quoi qu'il en soit, à titre d'exemple, cette stratégie donne des performances globalement satisfaisantes sur électrode d'or avec une densité de photocourant de $29 \mu A \cdot cm^{-2}$ dans les

conditions de l'étude (lumière rouge à $1,8 \text{ mW.cm}^{-2}$) [16]. On remarquera que les atomes d'osmium sont initialement au degré d'oxydation +III. La première étape du processus est donc leur réduction électrochimique pour se transformer en donneurs d'électrons du PSI. Globalement, cette configuration permet d'obtenir en chronoampérométrie des valeurs élevées pour la littérature à savoir aux alentours de $300 \mu\text{A.cm}^{-2}$, notamment dans le cas où l'électrode est en carbone vitreux avec un ensemble PSI – polymère d'osmium – MV^{2+} sous forme d'hydrogel. La valeur de photocourant peut être contrôlée avec le pourcentage de dioxygène et/ou l'état de l'hydrogel (gonflé ou écrasé) [26].

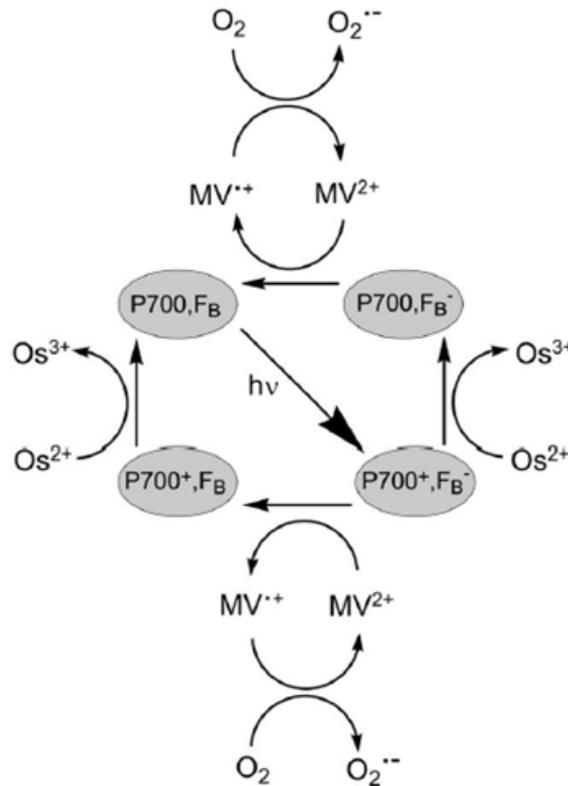


Figure 1.8: Production d'un courant de réduction à partir de PSI isolé au sein d'un polymère conducteur en présence d'oxygène et de méthylviologène d'après les travaux de Badura et coll [16].

Cette étude est par ailleurs une illustration de la difficulté à comparer les travaux dans le domaine de la mise à profit énergétique de la photosynthèse. En effet, si la densité de courant de $300 \mu\text{A.cm}^{-2}$ est élevée pour le domaine, elle correspond à des conditions d'illumination différentes (lumière rouge mais à 40 mW.cm^{-2}) par rapport aux résultats mentionnés plus haut. Fort heureusement dans ce cas, les auteurs

ont analysé l'effet de la puissance d'illumination, ce qui permet une comparaison dans le cas présent et montrent que les performances sont globalement similaires aux études antérieures pour des systèmes voisins. Cependant, d'un groupe à l'autre, d'une stratégie à l'autre, d'une illumination à l'autre (monochromatique vs lumière blanche, concentration surfacique en PSI, concentration en médiateurs...), cette mise en regard est difficilement possible et réduit la comparaison à des densités de courant ou de puissance qui en l'état sont des indicateurs finalement très limités et difficiles à normaliser.

Notons que l'utilisation de paraquat n'est pas systématique et la photobiocathode décrite plus haut peut être utilisée en milieu anaérobie et en absence de méthylviologène [27]. Dans ce cas, en présence de nanoparticules de Platine, F_B^- peut être oxydé par H^+ et provoquer la formation de dihydrogène mais avec des courants plus faibles que le même système dans les conditions « classiques » (5 vs 50 $\mu A.cm^{-2}$).

Le polymère d'osmium n'est par ailleurs pas la seule façon d'opérer un relais électronique « donneur d'électrons ». Ainsi, F. Lisdat et al ont mis au point des cathodes où les PSI sont immobilisés sur graphène en présence de différents systèmes π dérivés de l'anthracène [28], ou fixés sur des monocouches autoassemblées (SAMs) en présence de cytochrome c [29]. Ces études confirment que l'on peut accéder à une large gamme de photocourants (de 0,3 à 135 $\mu A.cm^{-2}$) en jouant sur le potentiel appliqué en chronoampérométrie, l'illumination (lumière blanche de 2 à 100 $mW.cm^{-2}$) ou la présence de méthylviologène (en son absence, le dioxygène joue directement le rôle d'accepteur d'électrons, ce qui conduit à des courants plus faibles en raison d'une cinétique plus faible du transfert d'électrons avec F_B^-). Notons enfin que la structure polymérique recouvrant l'électrode peut être de plus en plus complexe en fonction de l'objectif. C'est le cas d'études récentes où l'idée est de recouvrir une électrode d'or par un ensemble polymère d'osmium – PSI – hydrogénase afin que les électrons du PSI soient cédés à l'hydrogénase et facilitent la réduction de H^+ en H_2 . Dans un tel contexte, de nouveaux polymères (à base de cobaltocène ou de méthylviologène) sont ajoutés pour protéger l'hydrogénase de l'inhibition par O_2 [30]. A l'instar des configurations impliquant des PSII isolés, la stabilité énergétique du système reste peu étudiée, à nouveau en raison de durées d'illumination de quelques dizaines de secondes.

1.2.2 Les sous-fragments cellulaires de la photosynthèse

Une autre stratégie consiste à extraire des membranes thylakoïdes à partir de tissus vivants (typiquement de feuilles d'épinards). Le courant est généré via un transfert d'électrons médié (dit aussi indirect). Il est à noter que le processus de purification de la membrane élimine les transporteurs d'électrons endogènes (ferrédoxine et NADP⁺), ce qui pose la question de la nécessité de médiateurs exogènes, ne serait-ce que pour augmenter l'efficacité du transfert électronique du PSI à l'anode [7].

La question se pose d'autant plus que contrairement aux photosystèmes isolés, les membranes thylakoïdes peuvent être utilisées par immobilisation sur l'électrode mais aussi sous forme de suspension. Le travail avec une suspension de thylakoïdes nécessite toutefois un médiateur redox pour assurer le transfert électronique entre la chaîne et l'anode. Ce point sera commenté plus tard dans le chapitre mais les quinones constituent des couples redox de choix. Ainsi, L. Gorton et coll ont mis en œuvre une demi-pile sous la forme d'une électrode d'or modifiée par des nanoparticules d'or et immergée dans une suspension de thylakoïdes [31]. En fonction de la nature de la quinone choisie, des photocourants allant jusqu'à 130 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ peuvent être obtenus (avec la 2,6-DCBQ et la BQ notamment). Une configuration avec une électrode en carbone vitreux et en présence de 2,5-dichlorobenzoquinone conduit à des performances de 100 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ [32]. Une autre application avec une suspension consiste en la réalisation d'une cellule électrochimique entière sous forme de canaux où l'anode en ITO est au sommet du canal quand la cathode en platine est localisée sur la base du canal. Un médiateur de type $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (5 mmol.L⁻¹) est nécessaire pour le bon fonctionnement du dispositif [33]. Des études de stabilité ont été réalisées et montrent que les performances diminuent d'environ 40 % sur 4 heures d'illumination.

L'analyse de la littérature montre cependant que les travaux sur suspension de thylakoïdes restent minoritaires, la grande majorité faisant état de systèmes immobilisés. A titre de premier exemple, les membranes thylakoïdes peuvent être immobilisées sur électrode d'or en présence de nanotubes de carbone multifeuillets. En chronoampérométrie et en présence de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ comme médiateur (1,5 mmol.L⁻¹), des densités de courant de 38 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ sont atteintes. En configuration de pile entière (cathode = or recouvert de nanotubes de carbone et de laccase), des performances de 70 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ et de 5,3 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ sont recensées [34].

Cette stratégie d’immobilisation est aussi illustrée par les nombreux travaux du groupe de S. Minter qui privilégie des membranes thylakoïdes immobilisées sur du papier carbone après évaporation d’une suspension déposée préalablement à la surface. En absence de médiateur, les performances chronoampérométriques paraissent modestes (quelques $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) mais peuvent être améliorées en insérant un oligoélectrolyte [35], et surtout en travaillant en présence de catalase qui limite la durée de vie des espèces réactives de l’oxygène susceptibles de se former au cours de la dérivation des électrons photosynthétiques [36]. Ce type de système peut être par ailleurs étendu en pile entière avec une biocathode à base de laccase [37] [38]. Au-delà des travaux cités plus haut qui privilégient un transfert direct, d’autres études mettent en jeu à nouveau des relais électroniques à base de polymère d’osmium et/ou la présence de médiateurs redox. En guise d’exemple, L. Gorton et coll ont récemment proposé un « benchmarking » de plusieurs paramètres afin de comparer sur le même système l’impact de différentes structures de polymère d’Osmium par rapport à la seule utilisation de médiateurs en solution ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, phényl-p-benzoquinone) [39]. Les courants obtenus sont de quelques dizaines de $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ mais avec des conditions d’illumination fortes (lumière blanche jusqu’à $6800\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). Il est à noter que ce type d’anode impliquant membranes thylakoïdes immobilisées avec un polymère d’osmium a pu être étendu à une cellule électrochimique entière sous la forme d’un supercondensateur biosolaire à même de stocker l’énergie produite par l’extraction des électrons photosynthétiques [40].

L’utilisation des sous-fragments cellulaires n’est pas limitée aux membranes thylakoïdes et peut concerner les chloroplastes isolés. Cependant, après isolation, les chloroplastes peuvent perdre leur activité photosynthétique en quelques heures. Même si les durées de vie de certains chloroplastes dans la littérature vont jusqu’à plusieurs mois, les travaux impliquant une dérivation de la chaîne photosynthétique dans ce type de système restent rares. Un exemple récent est l’immobilisation de chloroplastes sur papier carbone dans un hydrogel avec un polymère conducteur contenant des motifs naphthoquinone (NQ-LPEI = naphthoquinone-functionalized linear poly(ethylenimine)) en présence de 2,6-DCBQ ($50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) en solution [41]. Les densités de courant vont de 5 à 30 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ (avec 2,6-DCBQ) sous illumination avec une lampe à halogène ($76\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$).

1.2.3 Les systèmes entiers

Les performances obtenues à partir d'unités photosynthétiques ou de sous-fragments cellulaires sont globalement du même ordre de grandeur. Même si la question de la stabilité du système n'est pas souvent l'objet direct des travaux, la stabilité du système sur des temps longs, à savoir bien supérieurs à une centaine de secondes, est le point-clé de cette orientation pour de potentielles applications. Or les complexes collecteurs de lumière *ex vivo*, et particulièrement le PSII, peuvent être relativement instables. En effet, le centre réactionnel PSII est la principale cible des dommages photooxydants qui pourraient être réparés *in vivo* (voir paragraphe 1.3 sur la photoinhibition). Ceci conduit à des considérations ambivalentes : l'utilisation d'unités photosynthétiques ou de fragments d'organismes photosynthétiques facilite le transfert électronique avec l'électrode en limitant les barrières physiques mais implique des systèmes incapables de s'auto-réparer ou de se diviser. C'est pourquoi d'autres études s'intéressent aux organismes entiers, susceptibles d'être cultivés et de se réparer pendant ou après la période de dérivation⁵.

Comme pour les membranes thylakoïdes, la mise à profit des organismes photosynthétiques entiers peut être réalisée par le biais d'une immobilisation à l'électrode ou d'une suspension, avec en toile de fond la nécessité d'un compromis : favoriser le transfert électronique vs travailler en conditions de culture.

Mais c'est en premier lieu au niveau de la nature de l'organisme que la question se pose. En pratique, les cyanobactéries sont largement préférées aux organismes plus complexes comme les algues vertes. En tant que procaryotes, elles présentent en effet, une physiologie simple comparés aux eukaryotes, ce qui sous-tend moins d'étapes de transferts électroniques transmembranaires et un métabolisme moins coûteux énergétiquement, les rendant a priori plus efficaces pour la transduction de la lumière [7].

Ainsi, Sekar et al proposent une immobilisation de cyanobactéries *Nostoc sp.* sur électrode de carbone modifiée par des nanotubes de carbone. En chronoampérométrie, les densités de courant sont de l'ordre de 3 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. En pile entière (cathode à base de laccase), elles atteignent 25 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ et vont jusqu'à 230 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ en présence de benzoquinone

5. Un autre argument pour utiliser des organismes photosynthétiques est qu'ils sont en général capables de générer du courant dans le noir via le métabolisme respiratoire de réserves de carbone internes accumulées sous lumière. Ils sont donc en mesure de produire du courant durant des périodes alternées jour/nuit.

(1 mmol.L⁻¹) [42]. Le courant en chronoampérométrie n'est pas stable sur 400 secondes d'illumination mais se stabilise globalement à une valeur de 0,45 $\mu\text{A.cm}^{-2}$ à partir d'un jour. Après six jours, sa valeur est de 0,3 $\mu\text{A.cm}^{-2}$ mais remonte à 0,6 $\mu\text{A.cm}^{-2}$ en présence de nutriments. A nouveau, le groupe de L. Gorton propose une stratégie basée sur l'utilisation d'un polymère d'osmium [43] recouvrant une électrode graphite et emprisonnant des cyanobactéries *Leptolyngbia sp.* En fonction de la nature du polymère d'osmium et la présence de médiateurs comme $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (1 mmol.L⁻¹), les densités de courant mesurées en chronoampérométrie vont jusqu'à 50 $\mu\text{A.cm}^{-2}$. Des études similaires ont été réalisées sur plusieurs cyanobactéries : deux espèces de *Leptolyngbya sp.* (CAWBG62 et CAWBG100) et une espèce de *Chroococcales* (CAWBG64) [30]. Impliquant toujours des polymères d'osmium et en présence de p-benzoquinone (0,3 mmol.L⁻¹) comme médiateur, les performances de cette photobioanode vont de 2 à 50 $\mu\text{A.cm}^{-2}$. Cette étude met surtout en évidence l'influence de la « simplicité » de la cyanobactérie puisque les performances dans les mêmes conditions pour l'algue eucaryote *Paulschulzia pseudovolvox* sont globalement 5 à 10 fois plus faibles. Ceci est en accord avec un accès facilité à l'appareil photosynthétique et à la membrane thylakoïde au sein des cyanobactéries. Au sein des algues, la membrane thylakoïde est en effet localisée dans une organelle sous-cellulaire supplémentaire, le chloroplaste. D'autres organismes ont été considérés ces dernières années comme la bactérie *Rhodobacter capsulatus* (immobilisation sur électrode de graphite avec un polymère d'osmium et de la p-benzoquinone comme médiateur à 0,6 mmol.L⁻¹) [44], la microalgue *Tetraselmis subcordiformis* (immobilisation sur papier carbone Toray par procédé sol-gel avec de la p-benzoquinone comme médiateur à 0,3 mmol.L⁻¹), ainsi que *Chlamydomonas reinhardtii* (immobilisation sur papier carbone poreux par sol-gel en présence de médiateurs comme $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, p-benzoquinone, diméthylbenzoquinone à 0,2 mmol.L⁻¹) [45]. Toutes ces études donnent lieu à des densités de courant en chronoampérométrie similaires, de l'ordre de quelques dizaines de $\mu\text{A.cm}^{-2}$.

Il est à noter que les systèmes en suspension restent finalement assez minoritaires et nécessitent de travailler sous agitation. Toutefois, ces rares configurations (suspensions d'algues vertes *Chlorella vulgaris* ou *Chlamydomonas reinhardtii*) ont été réalisées en configuration de pile entière et étudiées sur des cycles longs (4 ou 12h illumination/nuit) et conduisent, en absence de médiateurs, à des performances modérées (15 $\mu\text{A.cm}^{-2}$)

mais relativement stables [46] [47]. A l'instar des stratégies mettant en jeu photosystèmes isolés ou fragments sous-cellulaires, les configurations impliquant des organismes entiers sont majoritairement basées sur l'immobilisation à l'électrode. Tout en étant conscient que la comparaison reste difficile d'une étude à l'autre, les photocourants restent de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Hormis quelques exceptions, la stabilité des systèmes reste peu étudiée, toujours en raison de durées d'illumination assez courtes.

1.2.4 La question des médiateurs

L'utilisation d'organismes entiers soulève la question de l'accès de l'électrode collectrice à la chaîne photosynthétique. Nous avons mentionné précédemment certains travaux qui mettent en jeu une collection directe impliquant une nanoélectrode (unique ou sous forme de réseau) insérée dans l'organisme [15] [14]. La difficulté technique et/ou le caractère invasif de cette méthode rendent cette dernière marginale et peu efficace (les courants collectés sont faibles, de l'ordre de quelques pA). Il semble donc difficile de s'affranchir d'un médiateur redox dont la forme oxydée va alors diffuser au sein de l'organisme puis interférer avec la chaîne photosynthétique alors que l'espèce générée diffuse alors dans puis hors de l'organisme pour être oxydée à la surface de l'électrode collectrice. A ce jour, deux types de médiateur sont principalement considérés, comme le montre l'étude bibliographique de ce chapitre.

Les médiateurs diffusifs

Le choix d'un médiateur adapté à l'extraction des électrons photosynthétiques est lié, au-delà de la stabilité des formes oxydée et réduite, à la capacité de la forme oxydée à accepter les électrons de la photosynthèse. Les accepteurs de la chaîne photosynthétique sont solidement référencés [48], et il apparaît notamment que les quinones sont des médiateurs de choix pour interagir et être réduites par le photosystème II. Dans ce contexte, de nombreuses quinones sont utilisées avec différents degrés de substitution et natures de substituants (**Fig 1.9**).

Le potentiel redox du couple quinone/hydroquinone et la faculté des deux formes à traverser les membranes sont des critères déterminants pour évaluer la capacité du médiateur à extraire les électrons de la photosynthèse. Dans ce contexte, l'analyse comparée

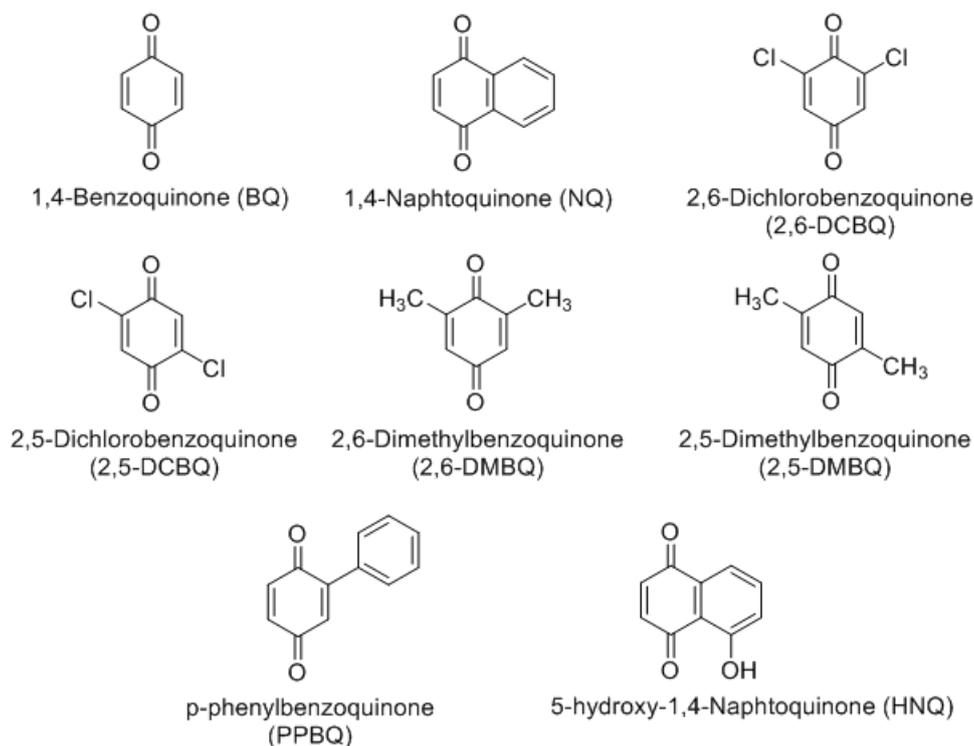


Figure 1.9: Nomenclature et formule chimique de plusieurs quinones couramment employées dans les systèmes biophotoélectrochimiques.

de plusieurs quinones peut être très complexe car elles peuvent interagir de façon différente avec le PSII (poche Q_B ou pool de plastoquinones, v. plus loin). Ainsi, la même quinone peut conduire à des performances différentes selon la configuration expérimentale (suspension vs immobilisation, organisme entier vs sous-unités photosynthétiques). De manière générale, la dichlorobenzoquinone et la benzoquinone sont les plus utilisées dans la littérature.

Cependant, les quinones peuvent être liées à des processus de signallement complexes et leur ajout peut diminuer la viabilité du microorganisme, notamment en interagissant avec la chaîne respiratoire. C'est pourquoi l'anion ferricyanure $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ est une alternative souvent utilisée. A la fois accepteur du PSII et accepteur du PSI, il a été établi que $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ est un moins bon accepteur du PSII que la 2,6-dichlorobenzoquinone [49]. Toutefois, la principale limitation de l'anion ferricyanure vient de son incapacité à traverser les membranes lipidiques. Ceci restreint son utilisation aux sous-fragments cellulaires ou aux cyanobactéries.

Dans ce dernier cas, et contrairement aux quinones exogènes qui peuvent accéder au

PSII en traversant la paroi cellulaire puis la membrane cytoplasmique, le ferricyanure peut seulement passer la paroi cellulaire mais peut être réduit ensuite par les protéines transmembranaires de la membrane cytoplasmique (**Fig 1.10**).

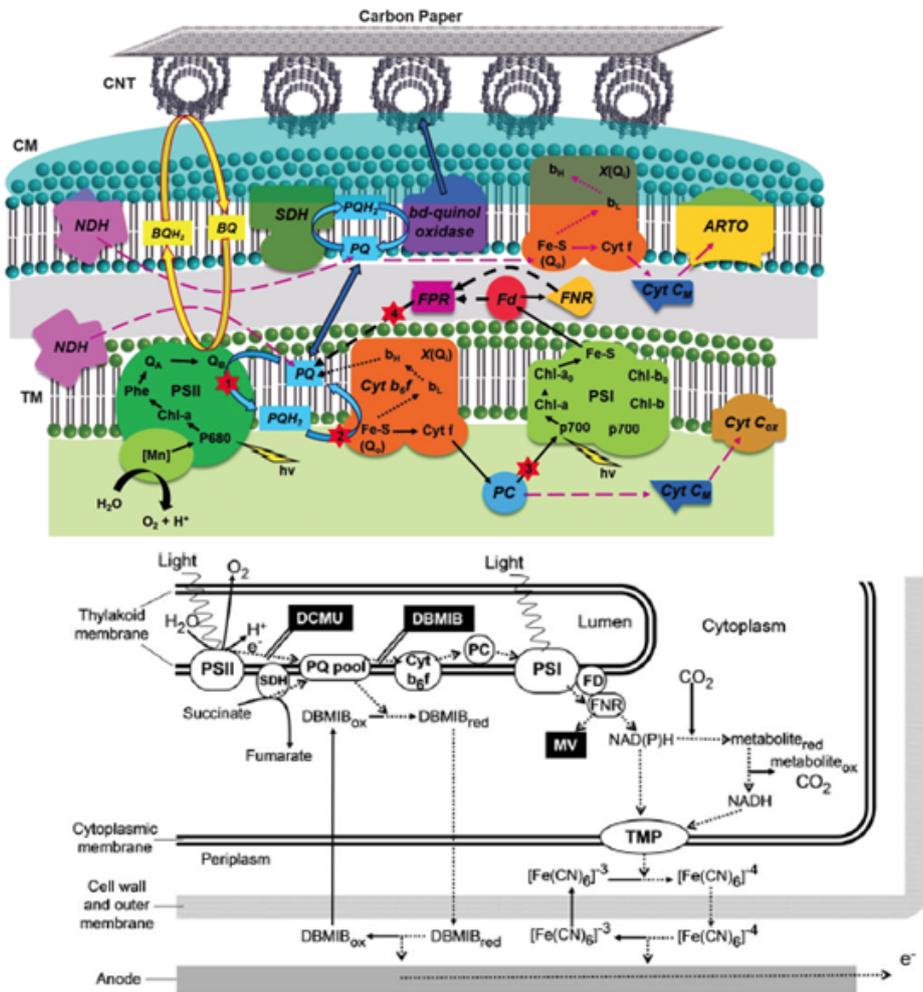


Figure 1.10: Haut : interaction de quinones exogènes avec une cyanobactérie à travers un transfert électronique au niveau du PSII. Bas : interaction de l’anion ferricyanure avec une cyanobactérie à travers un transfert électronique au niveau de la membrane cytoplasmique. D’après Sekar et coll [42] et Bombelli et coll [33].

Les polymères d’osmium

L’effet potentiellement toxique des médiateurs exogènes diffusifs utilisés limite les concentrations de travail et de fait la performance des systèmes. C’est pourquoi la connexion de la chaîne photosynthétique avec l’électrode par le biais de polymères cationiques solubles dans l’eau et flexibles est une approche séduisante (**Fig 1.11**). C’est le cas des

polymères à ions osmium mentionnés au cours de ce chapitre. Chargés positivement et déposés sous forme d'hydrogel sur l'électrode, ces polymères ont été historiquement utilisés pour améliorer la connexion électrique entre l'électrode et l'enzyme glucose oxydase chargée négativement dans le cadre de la détection électrochimique du glucose. [50]

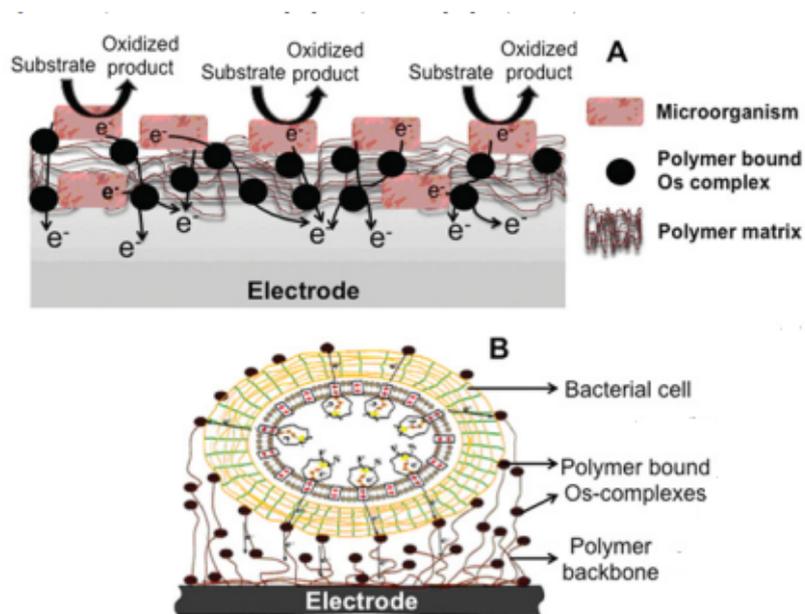


Figure 1.11: Schéma montrant le principe de l'utilisation des polymères d'osmium extrait des travaux de Hasan et coll [51].

La combinaison de polymères redox, d'enzymes et d'agents réticulants conduit à la formation d'hydrogels redox qui peuvent connecter les centres redox enzymatiques indépendamment de leur orientation spatiale et ainsi permettre la formation de multi-couches qui amplifient le courant par rapport à une monocouche. Dans ce cas, le transfert électronique entre les centres oxydés et réduits se fait par des collisions de type Marcus (aussi appelée effet tunnel assisté par les phonons) et non par hopping [52].

Les mécanismes de transfert électronique opérés par les polymères d'osmium entre les cellules des microorganismes et les électrodes restent toutefois mal compris. En effet, la bonne connexion électrique est attribuée à la forte interaction électrostatique entre les cellules bactériennes chargées négativement et les polymères d'osmium chargés positivement. L'immobilisation des cellules vivantes dans la matrice polymérique et le contact entre les polymères et la membrane ou paroi cellulaire sont aussi des facteurs déterminants pour le transfert électronique. La question de la stabilité des films de polymères d'osmium pose

toujours problème pour les applications, et le contrôle de la quantité d'osmium sur les électrodes modifiées est crucial car un excès d'osmium peut paradoxalement entraver le transfert des électrons depuis les microorganismes [51]. Enfin, si l'emploi de polymères d'osmium sur des microorganismes simples et accessibles semble adapté, la présence de parois cellulaires et de membranes épaisses ou multiples rend leur efficacité très limitée ou, à défaut, nécessite l'utilisation d'un médiateur diffusif.

Les systèmes exoélectrogènes

La possible toxicité des médiateurs exogènes et/ou leur absence de sélectivité vis-à-vis de la chaîne photosynthétique ont relancé l'intérêt pour les systèmes opérant en absence de médiateurs artificiels afin d'améliorer la durabilité des systèmes. L'idée de ces systèmes dit « exoélectrogènes⁶ » est donc d'avoir des performances peut-être plus faibles qu'en présence de médiateur mais plus stables dans le temps. Ceci passe par l'élaboration d'un biofilm à la surface de l'électrode. La connexion électrique entre les organismes et l'électrode se fait via des complexes cytochromes produits par les membranes extérieures des cellules ou des pilis conducteurs, sortes d'appendices se situant à la surface de la paroi de nombreuses bactéries [51].

Ainsi Y. Zou et al ont élaboré un système biophotovoltaïque sans médiateur avec *Synechocystis* sp PCC6803, après avoir cultivé un biofilm sur électrode de carbone. Des travaux similaires ont été rapportés avec la microalgue eucaryote *Chattonella Marina* sous forme de biofilm développé sur électrode à peinture de carbone modifiée par du polypyrrole [53] ou de cyanobactéries *Synechocystis* sp. PCC 6803 sur électrode à encre de carbone [54]. L. Gorton et al ont aussi proposé une stratégie similaire avec un biofilm marin (52 % de cyanobactéries et 48 % d'hétérotrophes nourris en continu) sur électrode de graphite recouverte d'un polymère d'osmium [55]. Dans ces cas, que ce soit sous forme de demi-pile ou de pile, les performances restent modestes, moins de $1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ sous illumination et relativement stables sur quelques heures voire même un jour avec alternance de cycle jour/nuit toutes les 2h. Toutefois, la faible intensité de ces courants permet de

6. Ce terme renvoie à un microorganisme capable de transférer des électrons avec son environnement extracellulaire

révéler des courants indépendants de l'illumination qui laissent à penser que d'autres voies d'extraction autres que la photosynthèse ont lieu.

Cependant, d'autres études montrent que de meilleures performances peuvent être atteintes ($10 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) en fonction de l'adhésion des organismes (algues ou cyanobactéries) sur la surface de l'électrode et de la densité du biofilm [33] [56].

Les systèmes microfluidiques

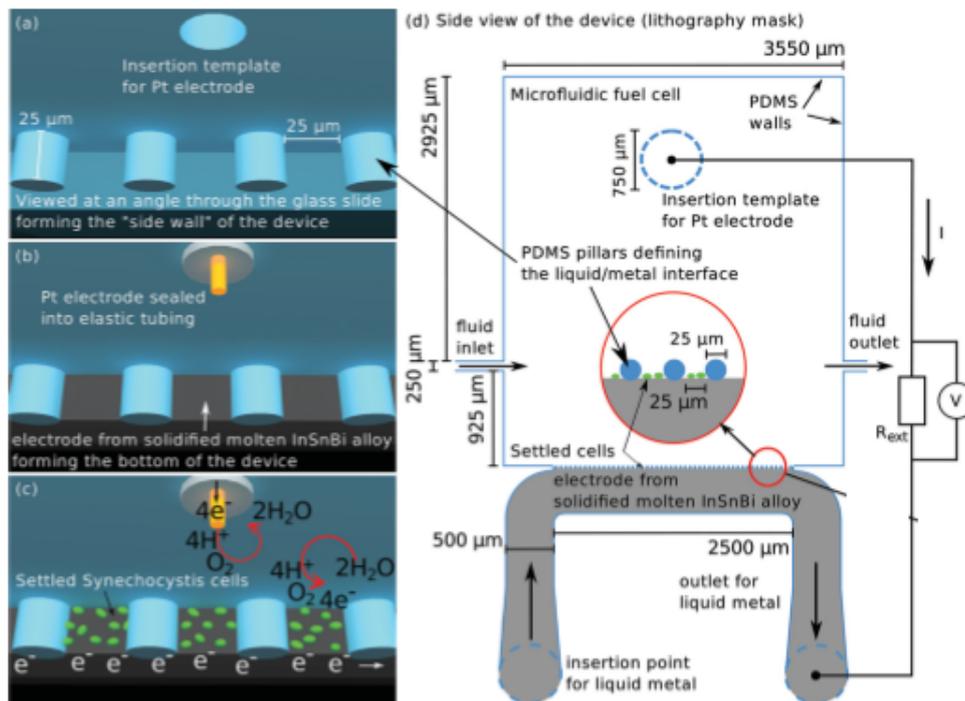


Figure 1.12: Schéma du dispositif biophotovoltaïque microfluidique extrait des travaux de Bombelli et coll [57].

Au-delà des trois orientations décrites dans les paragraphes précédents, des approches complémentaires ont également vu le jour, notamment en ce qui concerne le «design» de la cellule électrochimique. A ce titre, des dispositifs basés sur et tirant profit de la microfluidique ont été rapportés. Les dispositifs de Knowles et coll [57] sont réalisés par lithographie pour former des canaux microscopiques (**Fig 1.12**), équipés (au moyen de la technique microsolide) d'électrodes de travail en alliage de InSnBi disposées au fond du dispositif et d'une cathode en platine scellée. Les volumes de travail sont d'environ 400 nL. Les cellules exoélectrogènes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 sont injectées et laissées sédimenter sur l'anode pour permettre une proximité physique importante avec les

électrodes, indispensable au transfert électronique qui se fait sans médiateur. La puissance délivrée par ce dispositif atteint des pics de 100 mW.m^{-2} . Dans le cadre d'une stratégie d'évolution dirigée⁷, des possibilités de miniaturisation supplémentaires ouvrent la voie à l'étude de plus petites populations de cellules dans le but de réaliser un dépistage rapide des microorganismes électrochimiquement actifs.

1.2.5 Les biocapteurs

Si l'essentiel de la recherche sur les cellules photobioélectrochimiques s'inscrit dans le contexte des énergies renouvelables, d'autres applications dans le domaine de la détection et l'analyse voient aussi le jour [58]. Cette approche a été historiquement mise en place en 1990 par M. Purcell et coll à travers l'utilisation de membranes thylakoïdes en suspension ou immobilisées au sein d'une matrice d'albumine [59]. L'analyse en chronoampérométrie d'un photocourant d'oxydation (attribué à l'oxydation de H_2O_2 provenant de la réduction de O_2 par le PSI) sur électrode de platine permet de doser différents herbicides (atrazine, diuron) dont la présence coupe le transfert électronique le long de la chaîne.

S.Minteer et coll font également intervenir des membranes thylakoïdes dans la mise en place d'un biocapteur autoalimenté pour la détection des herbicides dans l'eau. Dans une configuration de pile entière, le papier carbone joue le rôle de l'anode, la cathode étant une électrode de platine « respirante à l'air ». Le système s'active en présence de lumière mais l'inhibition des centres réactionnels par des herbicides cause une diminution du courant. Le capteur est ainsi à même de détecter des herbicides commerciaux comme l'atrazine, le bromanil et le diuron avec une limite de détection d'environ $0,5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ inférieure aux limites imposées [60].

On notera la présence de catalase au sein du dépôt sur papier de carbone afin de limiter la dégradation du système biologique par des ROS et la possibilité de travailler avec une biocathode à base de laccase [38].

Ce type d'études n'est pas uniquement porté sur l'utilisation de membranes thylakoïdes. Ainsi, on notera une application basée sur l'adsorption de PSII isolés à la surface d'une électrode d'or recouverte d'un polymère électrodéposé de type

7. C'est le procédé mimant l'évolution naturelle de façon accélérée et visant à améliorer, ou modifier, les propriétés (phénotype) d'une macromolécule (acide nucléique ou protéine) par altération de la séquence de son gène et la sélection des meilleurs variants.

poly-mercapto-p-benzoquinone [61]. A nouveau, l'analyse chronoampérométrique du photocourant d'oxydation (résultant d'un transfert entre Q_A , le polymère et l'électrode) est sensible à la présence d'herbicides comme le diuron. Une ingénieuse application de l'électroanalyse sur disque tournant a été décrite par les groupes de M. Torimura et coll [62] [63]. Le principe consiste à suivre le courant d'oxydation en chronoampérométrie d'une solution de quinone (par exemple la DCBQ) en conditions analytiques (faible dimension de l'électrode de carbone vitreux par rapport au volume de solution). En présence d'une suspension de *Rhodobacter sphaeroides* (ou de chromatophores extraits) et sous illumination, la réduction de la 2,6-DCBQ par les organismes photosynthétiques génère la forme réduite de la quinone qui est oxydée à l'électrode. Le courant d'oxydation correspondant est alors sensible à la présence d'herbicides comme le diuron ou la terbutryne. Enfin, les mêmes auteurs proposent un système de détection basé sur l'immobilisation de vésicules chromatophores issues de *Rhodobacter sphaeroides* sur électrode à pâte de carbone préalablement dopée en 2,6-DCBQ [64]. La baisse du courant d'oxydation responsable de l'extraction des électrons photosynthétiques suite à la présence de composés toxiques (CN^- , phénol) ou d'herbicides (terbutryne, atrazine) fait de ce système un capteur même si des problèmes de sensibilité semblent persister.

1.2.6 Bilan

A ce jour, et même si les comparaisons sont difficiles en raison des nombreux paramètres, aucune orientation ne semble se démarquer parmi les grandes stratégies de dérivation des électrons de la photosynthèse même si, en dépit d'un accès moins aisé à la chaîne photosynthétique et une plus grande difficulté à contrôler le système, travailler sur organismes entiers pourrait être l'option à privilégier dans le cadre d'applications à plus long terme. Or, hormis quelques rares exemples, les analyses de stabilité restent limitées à des illuminations de quelques centaines de secondes. La question de la photoinhibition, qui touche les sous-unités incapables de faire la photoréparation ou le potentiel effet toxique des médiateurs à moyen et long termes dans le contexte de la dérivation, nécessitent donc une étude ciblée.

L'orientation choisie au laboratoire en 2012 dans le cadre du LABEX DYNAMO porté

par l'IBPC et dont l'UMR 8640 de l'ENS est partenaire, est basée sur deux objectifs distincts et ambitieux. Le premier est, compte tenu de la littérature, de produire de la bioélectricité à partir de la photosynthèse en travaillant sur un système biologique apte à être cultivé et renouvelé dans le temps. Ceci impose de considérer des organismes entiers en conditions de culture cellulaire, c'est-à-dire en suspension. Le second objectif est que la dérivation des électrons photosynthétiques soit la plus ciblée possible et serve l'organisme considéré. A ce titre, l'instabilité des systèmes photosynthétiques sous forte illumination est une limitation principale pour la pérennité des systèmes biophotovoltaïques mis en place, en particulier, la question de la photoinhibition sur un organisme entier. L'idée est donc que la dérivation soulage la chaîne sous forte illumination. Avant d'explicitier notre stratégie plus en détails, il est nécessaire de décrire le phénomène de photoinhibition.

1.3 La question de la photoinhibition

Comme précisé précédemment, la lumière est l'élément moteur de la photosynthèse. Toutefois, au niveau moléculaire, la lumière n'est pas toujours bien acheminée et peut paradoxalement être nuisible à l'appareil photosynthétique. Il y a aujourd'hui consensus sur le fait que la cible principale du stress lumineux en photosynthèse oxygénique est le Photosystème II [65]. Cela conduit à la détérioration du transfert électronique et à des dommages irréversibles infligés aux différentes sous-unités photosynthétiques.

En pratique, les plantes survivent à ces dommages à travers un processus de réparation complexe et coûteux en énergie qui implique une dégradation de la protéine D1 du PSII et sa biosynthèse *de novo* (**Fig 1.13**). Le stress lumineux devient seulement problématique lorsque le taux de photodommage excède celui de réparation. Cette situation correspond à la photoinhibition.

1.3.1 La structure fonctionnelle du Photosystème II

Le PSII est le premier complexe enzymatique à intervenir dans les réactions de la photosynthèse dépendantes de la lumière. Il s'agit d'une oxydoréductase qui catalyse la réaction :



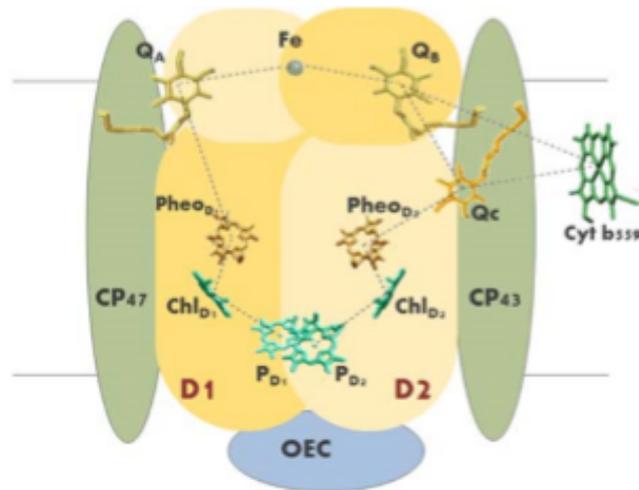


Figure 1.13: Représentation schématique du PSII dans les plantes supérieures montrant les polypeptides majeurs et les cofacteurs impliqués dans la photochimie du PSII. La partie centrale montre l'hétérodimère D1/D2 avec les composants redox liés. ; CP : Chlorophyll protein ; OEC : Oxygen Evolving Complex [66].

Le complexe PSII est composé de 20 chaînes polypeptidiques différentes, la majeure partie de structures trans-membranaires et alpha hélicoïdales. Parmi ces chaînes, les sous-unités PsbA (D1) et PsbD (D2) chacune avec 5 hélices transmembranaires forment un hétérodimère qui accueille l'architecture du centre réactionnel ainsi que la majeure partie des cofacteurs redox actifs organisés dans les deux branches presque symétriques. On y retrouve les deux chlorophylles principales a (Chl a), PD1 et PD2, les deux chlorophylles accessoires Chl a, ChlD1 et ChlD2 et les deux chlorophylles périphériques Chl a, ChlZD1 et ChlZD2, mais aussi deux phéophytines a, PheoD1 et PheoD2 et deux plastoquinones, Q_A et Q_B (**Fig 1.13**). La plastoquinone Q_A n'est ni protonable ni échangeable et fonctionne comme un récepteur monoélectronique. La plastoquinone, une fois doublement réduite et protonnée dans la poche Q_B (dont elle prend parfois, par abus de langage, le nom), quitte alors la poche et est remplacée par une nouvelle plastoquinone (oxydée) du pool ou un accepteur d'électrons exogène (herbicide, quinone exogène...). La vitesse de ce remplacement est fonction de l'état rédox du pool (donc de l'efficacité à écouler les électrons de l'aval de la chaîne par rapport à l'amont de celle-ci) et de la concentration en éventuels accepteurs exogènes, ainsi que de leurs propriétés physico-chimiques concernées.

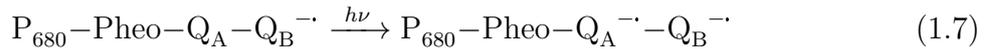
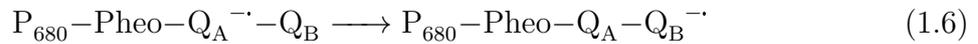
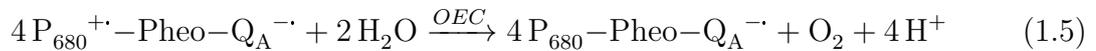
L'évènement premier qui intervient au sein du PSII est la capture de la lumière par les antennes collectrices (Light Harvesting complex ou LHC) du photosystème. Cette énergie

est acheminée à un complexe chlorophylle-protéique appelé centre réactionnel ou chlorophylle spécialisée P680 par transfert d'énergie de résonance de type Forster.

L'énergie transmise au donneur primaire P680, permet à un électron excité de passer à l'accepteur primaire d'électrons, la phéophytine (Pheo). Cette séparation de charge primaire est stabilisée par un transfert électronique rapide à une plastoquinone Q_A donnant lieu à la formation d'une paire $P680^+ - Q_A^-$ selon la séquence réactionnelle décrite ci-dessous.



Lors d'une deuxième réaction, l'électron est transféré à la seconde plastoquinone acceptrice PQ venue s'insérer dans la poche Q_B . Le centre réactionnel oxydé $P680^+$ est un oxydant exceptionnellement fort capable d'extraire les électrons de l'eau. Cela a lieu via un résidu Tyr_z et un cluster de 4 atomes de manganèse. En effet, durant l'oxydation de l'eau, le cluster de manganèse cycle entre 5 différents états redox [67]. Après une nouvelle séparation de charge photoinduite, $PQ^{\bullet-}$ reçoit un nouvel électron suivi par une protonation conduisant à la formation du plastoquinol PQH_2 . La plastoquinone réduite est déplacée depuis le centre réactionnel au pool de plastoquinones de la membrane thylakoïde impliqué dans la suite des réactions redox avec le cytochrome b_6f et le reste de la chaîne photosynthétique.



Au moins deux mécanismes différents rendent compte du phénomène de photoinhibition en milieu anaérobie et à froid où il est possible d'isoler les intermédiaires réactionnels : le premier à travers l'inhibition du site accepteur du PSII et le deuxième à travers l'ini-

bition du site donneur.

L'inhibition par le site accepteur

Initialement la forte illumination conduit à une surréduction du pool de plastoquinones dans la membrane du PSII ce qui laisse probablement le site Q_B non opératif dû au manque de plastoquinones oxydées disponibles. Cela conduit à la stabilisation de la quinone primaire une fois réduite Q_A^- dont le temps de vie augmente jusqu'à 30 s comparé à quelques centaines de ms en présence d'un pool de plastoquinone oxydées, capables d'accepter les électrons dans les conditions expérimentales. Cet intermédiaire instable se transforme en semi-stable suite à la protonation de Q_A^- en Q_AH . La troisième phase correspond à un état stable atteint lors de la deuxième réduction de Q_A^- en Q_A^{2-} . Enfin les centres réactionnels relarguent la quinone doublement réduite Q_A^{2-} et la photoinactivation prend place d'une manière irréversible. Ce mécanisme a été postulé grâce à l'observation sur des échantillons d'une décroissance de la fluorescence et aux données de la résonance paramagnétique nucléaire sensible à l'état d'oxydation de la quinone Q_A [67].

En milieu aérobie, l'état triplet de la chlorophylle excitée, plus fréquent lors d'une inactivation de la chaîne de transport du côté accepteur, peut réagir avec les molécules d'oxygène pour former des espèces réactives de l'oxygène impliquées dans les dommages infligés à la protéine D1. Une fois la protéine D1 endommagée, la photoréparation est déclenchée et la protéine remplacée avec une certaine cinétique.

L' inhibition par le site donneur

L'inhibition par le site donneur se produit lorsque la cinétique de photooxydation du P680 excède la cinétique maximale de fonctionnement du site donneur. Il s'ensuit l'accumulation de radicaux $P680^+$ et Tyr_z^+ très oxydants et aux temps de vie anormalement élevés, capables d'oxyder les pigments et composants redox environnants [68]. Une détérioration du transport électronique entre le cluster de manganèse et le P680 est observée avec la décroissance du taux de transfert électronique entre la tyrosine et le P680 suivie de la perte de l'unité Tyr_z^+ . Cependant, l'inactivation du site donneur peut aussi avoir

lieu sous faible lumière.

Même si ces deux mécanismes de photoinhibition sont différents (et résumés dans la Fig 1.14), ils induisent finalement tous les deux des dommages ciblés dans l'environnement immédiat du P680.

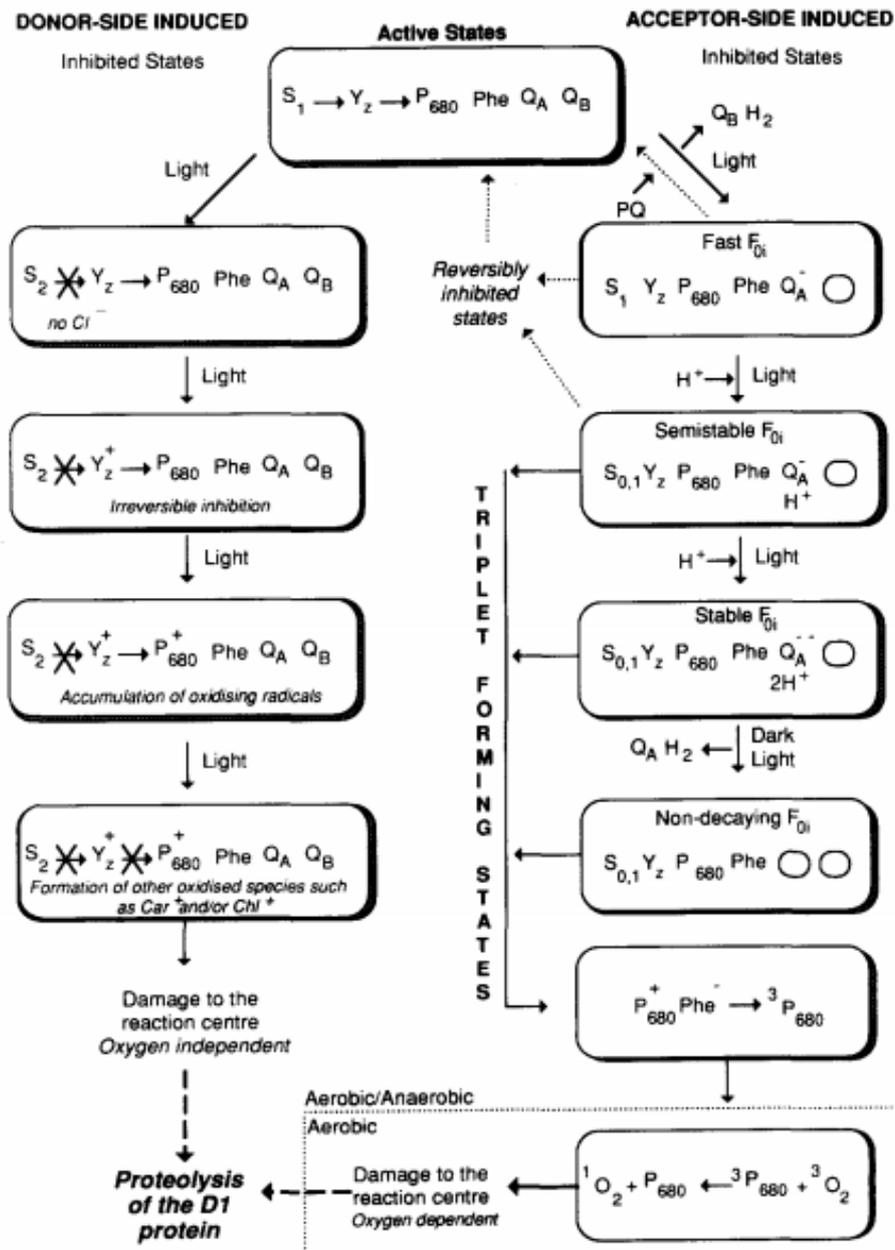


Figure 1.14: Schéma des mécanismes postulés pour la photoinhibition lors des inactivations par site accepteur ou donneur [67].

1.3.2 La photoinactivation *in vivo*

Les deux mécanismes précédents ont été mis en évidence *ex vivo* et il est pertinent de se demander lequel des deux mécanismes prévaut *in vivo*.

Il était admis depuis longtemps que l'inhibition du site accepteur est prédominante. A ce jour, la situation apparaît comme plus nuancée. En effet, il est peu probable qu'*in vivo*, une réduction complète des plastoquinones laisse les sites Q_B inopérants [67]. L'accumulation des sites Q_A^- n'est pas non plus considérée comme un phénomène fréquent [69]. Plus encore, la photoinhibition a été observée même lorsque les centres Q_A étaient sous forme oxydée [70]. Néanmoins seules des preuves en faveur d'un mécanisme par site accepteur sont disponibles *in vivo* à ce jour laissant le mécanisme de photoinhibition par site donneur inconnu dans ces conditions [67].

1.4 La stratégie définie au laboratoire

En dépit des incertitudes sur le mécanisme de photoinactivation *in vivo*, le soulagement de la chaîne photosynthétique sur organisme entier par dérivation des électrons photosynthétiques doit opérer en aval du PSII pour des raisons dont la moins évidente n'est pas la nécessité de tirer profit de l'énergie lumineuse (voir le schéma en Z de la photosynthèse **Fig 1.2**). Mais ce transfert doit se faire en amont de l'étape cinétiquement limitante au niveau du complexe b_6f . En effet, au sein de ce complexe, l'un des transferts est mono-électronique (passage du pool de plastoquinones qui transportent deux électrons, au cluster Fer-Soufre qui est monoélectronique). C'est pourquoi cette étape est nettement plus longue (de l'ordre de 5 ms) [3], comme le montre le schéma de la littérature (**Fig 1.15**).

A cet égard, il est souhaitable que l'extraction ait lieu au niveau des étapes de transfert entre Q_A et Q_B voire au niveau du pool de plastoquinones. Ceci revient à considérer une photoinactivation qui a lieu par le site accepteur. La pertinence de la stratégie ainsi que la nature du mécanisme de photoinhibition pourront être discutés plus tard à la lumière des résultats expérimentaux.

Dans un tel contexte, l'organisme photosynthétique choisi pour nos études sera l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, qui constitue le modèle et l'expertise (culture, banque de mutants, approche mécanistique, suivi spectroscopique) de l'UMR 7141 à l'Institut de Biologie-Physico-Chimique (IBPC) impliquée dans ce projet.

1.4.1 L'algue *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii est une algue unicellulaire verte présente dans les sols humides et les eaux douces. Elle sert en tant qu'organisme modèle dans le domaine de la photosynthèse, de la biogenèse d'organelle et de plusieurs autres aspects de la biologie cellulaire.

Le rôle de *Chlamydomonas reinhardtii* en tant qu'organisme modèle est principalement dû à sa capacité à survivre d'une manière hétérotrophe avec l'acétate comme unique source de carbone : les mutants incapables de réaliser la photosynthèse sont viables. Cette algue possède un appareil photosynthétique semblable à celui des plantes supérieures et les

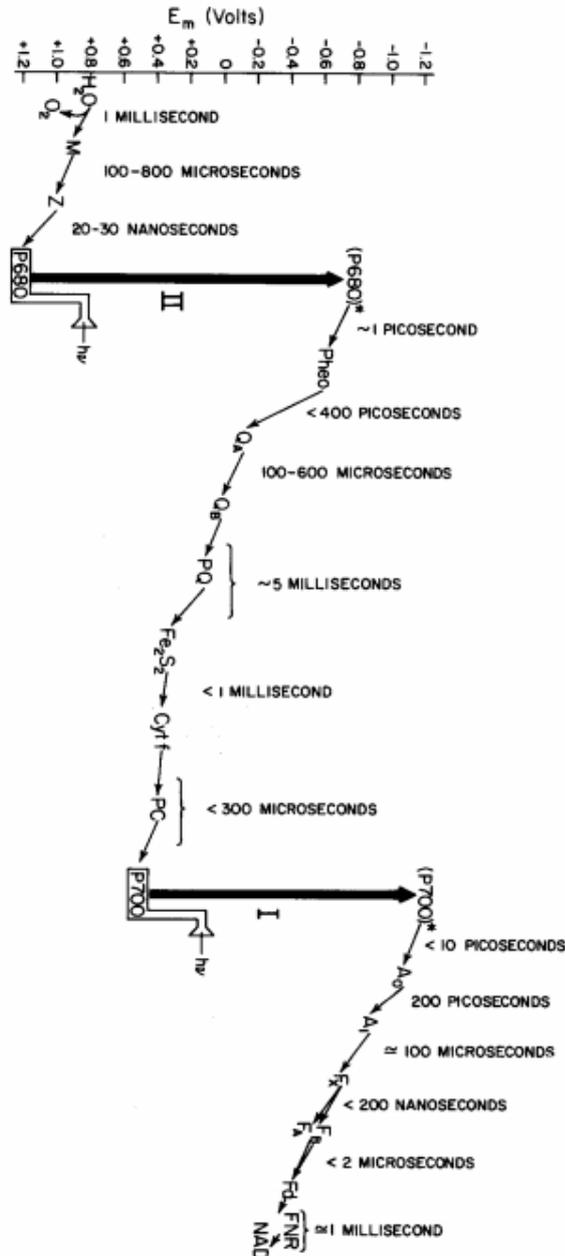


Figure 1.15: Schéma récapitulant les différentes étapes de transferts électroniques le long de la chaîne photosynthétique, avec le temps caractéristique de chaque étape et le potentiel de demi-vague des couples rédox mis en jeu par rapport à l'ENH [71].

cycles végétatifs et sexuels simples de l'algue sont facilement manipulés au laboratoire avec un temps de génération court. Aujourd'hui cet organisme est entièrement caractérisé génétiquement et partage un héritage génétique commun avec les animaux et les végétaux [72].

Architecturalement, les cellules ont une forme ovale et font environ 10 μm en longueur et 3 μm en largeur et sont équipées de deux flagelles, en arrière, de tailles égales qui

leur confèrent une mobilité (**Fig 1.16**). Ces flagelles permettent aux algues de réaliser la phototaxie, se déplaçant vers la source lumineuse pour maximiser leur exposition ou la fuyant pour limiter la photoinhibition. L'intensité lumineuse ainsi que la direction de la source étant détectés grâce au stigma situé directement sous l'enveloppe chloroplastique.

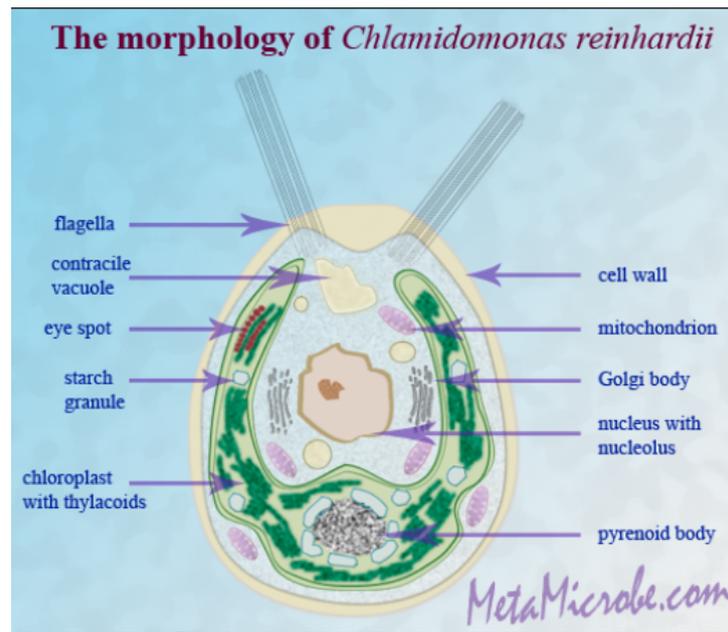


Figure 1.16: Morphologie de *Chlamydomonas reinhardtii* [73].

Chaque cellule possède une paroi cellulaire complexe composée essentiellement de glycoprotéines et d'hydroxyproline, ainsi qu'un seul chloroplaste en forme de tasse qui occupe 40% du volume cellulaire et entoure le noyau et plusieurs mitochondries. Un ou plusieurs pyrénoides se trouvent dans le chloroplaste et sont entourés de réserves d'amidon.

En raison de ses propriétés génétiques d'intérêt, *Chlamydomonas reinhardtii* a été la cible de recherches dans le domaine des biotechnologies en tant qu'organisme producteur d'hydrogène, l'algue pouvant le produire grâce à son enzyme hydrogénase. Mais cette production ne dure pas suffisamment longtemps pour permettre à des applications de voir le jour [74].

1.4.2 La dérivation des électrons de la photosynthèse par les quinones

Comme explicité plus haut, les quinones sont des transporteurs d'électrons endogènes au sein de la chaîne photosynthétique à travers Q_A et le pool de plastoquinones. C'est d'ailleurs également le cas dans la chaîne respiratoire à travers les ubiquinones.

La plastoquinone consiste en une molécule de 2,3-diméthyl-1,4-benzoquinone avec une chaîne latérale de 9 unités isoprényl (**Fig 1.17**).

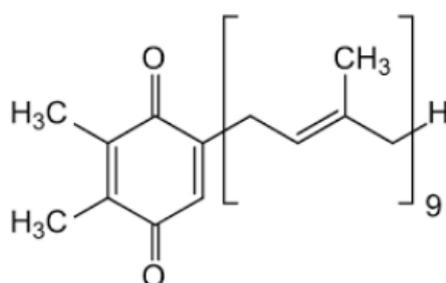


Figure 1.17: Formule semi-développée de la plastoquinone

Par ailleurs, le produit de la réduction d'une quinone Q, à savoir l'hydroquinone QH₂ est à même d'être oxydé sur différents matériaux d'électrode [75] [76] [77]. Dans ce contexte, il apparaît comme assez naturel d'envisager l'utilisation de quinones exogènes comme structures pour médier le transfert d'électrons.

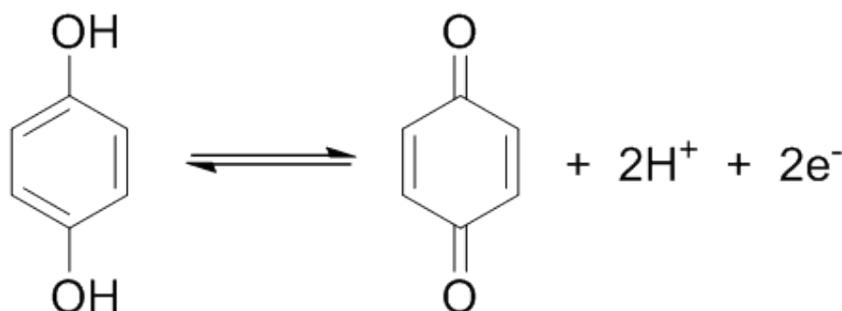


Figure 1.18: Schéma montrant le couple oxydant réducteur 1,4-benzoquinone/1,4-hydroquinone et la demi-réaction correspondante

La capacité de la para-benzoquinone à passer les membranes biologiques a été mise en évidence dès les années trente par Warburg et coll [78]. Des dizaines d'années plus tard, d'autres dérivés des quinones ont été identifiés en tant qu'accepteurs du PSII suivant des critères de solubilité, de dérivation électronique et d'aptitude à pénétrer les

membranes. Les quinones acceptrices du PSII dans le cadre du transport électronique chloroplastique (ainsi que d'autres structures à même d'interagir avec différents sites de la chaîne photosynthétique) ont été recensées par S.Izawa en 1980. Figurent notamment la 2,5-dimethylbenzoquinone et la 2,5-dichlorobenzoquinone [48].

La capacité des quinones à pénétrer les membranes biologiques et à interagir ou se substituer aux plastoquinones [79] [80] [81], leurs propriétés électrochimiques intéressantes en tant que systèmes quasi-réversibles en font des molécules de choix comme médiateurs dans le domaine biophotovoltaïque. Comme vu précédemment, elles sont souvent utilisées comme médiateurs sur des systèmes biologiques exoélectrogènes pour améliorer la communication entre les chaînes de transport d'électrons et les électrodes.

Travailler avec un système entier en suspension comme *Chlamydomonas reinhardtii* où la chaîne photosynthétique est difficile d'accès (car enfouie dans le chloroplaste et séparée de l'extérieur par la paroi cellulaire et plusieurs membranes biologiques : membrane cellulaire, enveloppe chloroplastique et membrane thylakoïde) nous oblige à passer par un médiateur. La famille des quinones étant capable de pénétrer la cellule, elle permet d'envisager des études électrochimiques sur notre système. Dès lors que les objectifs de la dérivation qui imposent une extraction en sortie du PSII limitent la liste des candidats potentiels, les quinones exogènes apparaissent comme un choix logique et ont fait l'objet d'une première série de travaux au laboratoire dans le cadre de la thèse de Guillaume Longatte (2012-15). Notons que si l'efficacité de la dérivation électronique peut être mesurée directement par le photocourant faradique, d'autres techniques spectroscopiques plus élaborées existent et permettent de donner plus d'informations sur l'interaction entre les quinones et la chaîne photosynthétiques et d'établir des analyses comparatives entre les quinones. Elles seront explicitées plus tard dans le cadre de ces travaux.

1.5 Les travaux précédents sur le système biologique *Chlamydomonas reinhardtii* au laboratoire

Dans le cadre de la précédente thèse, la mise en place d'un système électrochimique mettant en jeu une suspension d'algues *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de qui-

nonnes s'est faite en deux étapes : l'analyse des interactions entre différentes quinones et les algues puis la mise en oeuvre de la cellule électrochimique *ad hoc* et la détection de photocourants.

1.5.1 L'évaluation de la capacité des quinones exogènes à dériver les électrons de la photosynthèse par fluorescence

. La fluorescence est un indicateur de choix de l'état de la chaîne photosynthétique puisque la lumière absorbée n'est pas en totalité convertie et utilisée une fois le PSII excité. En effet, si une voie possible de désexcitation est la photosynthèse proprement dite (séparation de charge qui conduit à l'oxydation de l'eau et aux transferts électroniques le long de la chaîne, voir paragraphes précédents), une autre voie est la relaxation par fluorescence. Dans ce contexte, la mesure de fluorescence chlorophyllienne est une technique adaptée pour étudier les interactions quinones-algues. En effet, le caractère accepteur du PSII des quinones augmente l'efficacité de la séparation de charges et doit, en conséquence, induire une baisse de l'émission de fluorescence. La technique de mesure de fluorescence sur un Joliot Type spectroscopie (JTS) utilisée dans ces travaux et le mode opératoire, seront présentés en détail dans le chapitre consacré aux techniques spectroscopiques. Dans cette partie nous nous contentons d'énoncer la ligne générale suivie et de commenter les principaux résultats obtenus.

Les expériences d'évaluation de la capacité de dérivation électronique ont été menées par le biais d'une illumination de suspensions de cellules *Chlamydomonas reinhardtii* mutées de type Δ PetA. Dans ces cellules, la chaîne photosynthétique est dépourvue de complexe b_6f [82] ce qui limite grandement l'efficacité de la séparation de charges en absence de quinone exogène puisque la chaîne de transfert d'électrons est alors interrompue, limitant drastiquement la réoxydation des plastoquinones photoréduites. L'intérêt de ce mutant est donc de pouvoir étudier uniquement les interactions entre des quinones exogènes et le PSII. En effet, l'illumination provoque une accumulation de charges négatives en sortie du PSII dès lors que les plastoquinones ne peuvent plus transférer d'électrons au complexe b_6f . Ainsi, l'ajout des quinones exogènes à ces cellules mutées provoque comme attendu une diminution de la fluorescence de la chlorophylle, en accord avec un

désengorgement de la chaîne [83] à travers l'oxydation des sites réduits du PSII. Les quinones exogènes interagissent avec la chaîne photosynthétique et dérivent les électrons en oxydant soit $Q_A^{\bullet-}$ soit le pool de plastoquinones réduites.

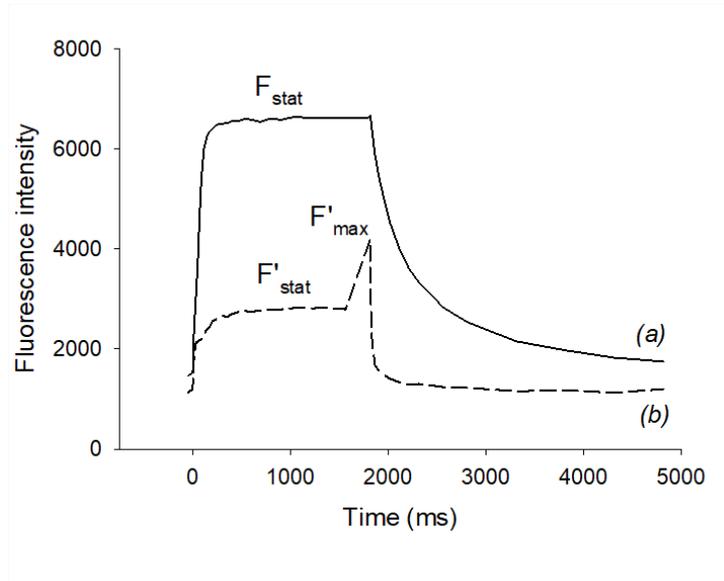


Figure 1.19: Variation de la fluorescence mesurée sur une suspension d'algues *Chlamydomonas reinhardtii*; a-sans quinones exogènes ; b- en présence de quinones exogènes [83].

Cette baisse de fluorescence reflète donc la capacité de la quinone exogène à accepter les électrons du PSII. En pratique, la situation est plus nuancée car les quinones sont aussi capables de provoquer une extinction de fluorescence au niveau de la chlorophylle [84]. La baisse de fluorescence observée peut donc provenir de l'extraction des électrons en sortie du PSII par la quinone mais aussi de sa capacité à « quencher ». C'est pourquoi l'illumination et la mesure de fluorescence classique sont suivies de l'application d'un flash sursaturant permettant alors de discriminer la baisse de fluorescence liée à la dérivation par les quinones de celle due au « quenching ».

Ces mesures ont permis alors de définir un paramètre pertinent pour quantifier la capacité des quinones exogènes à extraire les électrons photosynthétiques du PSII : le pourcentage de **centres ouverts** défini comme la proportion D de sites Q_A (et donc oxydés) sur l'ensemble des centres Q_A des chaînes (qui seront dits ouverts sous forme oxydée et fermés sous forme réduite $Q_A^{\bullet-}$). Un centre ouvert est donc à même, après excitation, de conduire à une séparation de charge, ce qui est impossible pour un centre fermé. En d'autres termes, ce paramètre renseigne sur l'état du désengorgement de la

chaîne et donc l'efficacité de la dérivation opérée par les quinones exogènes. La chaîne sera d'autant plus prompte à réaliser la photosynthèse (ou à défaut, les premiers transferts électroniques pour ce qui est du mutant ΔPetA) que le pourcentage de centres ouverts sera élevé dans des conditions d'illumination définies. L'étude de ce paramètre en fonction de la concentration en quinones exogènes pour plusieurs quinones est reporté en figure 1.20.

On constate alors que, comme attendu, le caractère donneur du PSII diffère en fonction des quinones. En particulier, la 2,6-dichlorobenzoquinone (2,6-DCBQ), la 2,5-dichlorobenzoquinone (2,5-DCBQ), et la phenylparabenzoquinone (pPBQ), apparaissent comme les plus efficaces puisqu'elles provoquent une augmentation significative du pourcentage de centres ouverts bien plus importante que les autres quinones, à concentration égale.

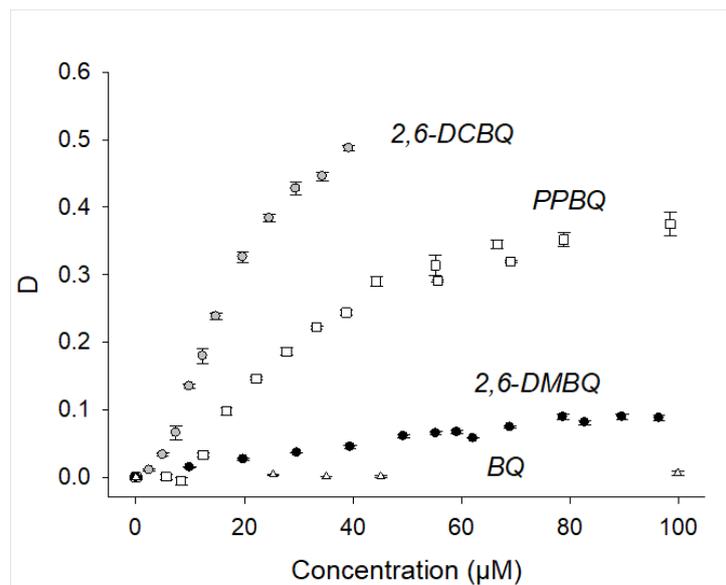


Figure 1.20: Evolution de la proportion de centres ouverts (ou oxydés) en fonction de la concentration en quinones exogènes. $I=340 \mu\text{E}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ [83].

La nécessité d'une « correction » du quenching

Formellement, le PSII catalyse sous illumination la réduction des quinones exogènes ajoutées. Toutefois, pour les faibles concentrations en quinones, D semble bien plus faible qu'attendu au vu de l'allure globale de la courbe de dérivation. L'effet de dérivation n'est observé qu'aux plus fortes concentrations, donnant l'impression d'un « retard » ou qu'une

partie des premières quinones ajoutées ne sont pas disponibles pour extraire les électrons photosynthétiques.

Cette observation est confirmée par l'analyse du quenching issue des mesures de fluorescence et qui montre que la loi de Stern-Volmer (quenching de la fluorescence proportionnel à la concentration en quencher) n'est pas suivie. La loi de Stern-Volmer n'est valide qu'en corrigeant la concentration ajoutée de quinones en une concentration effective. Ceci suggère donc qu'une partie des quinones ajoutées est perdue (membranes lipidiques, autres compartiments) avant son arrivée à la membrane thylakoïde pour dériver les électrons et n'est donc pas disponible pour la photosynthèse.

La correction mise en place permet ainsi de présenter de nouveaux graphiques du pourcentage de centres ouverts en fonction de la concentration en quinones exogènes (**Fig 1.21**).

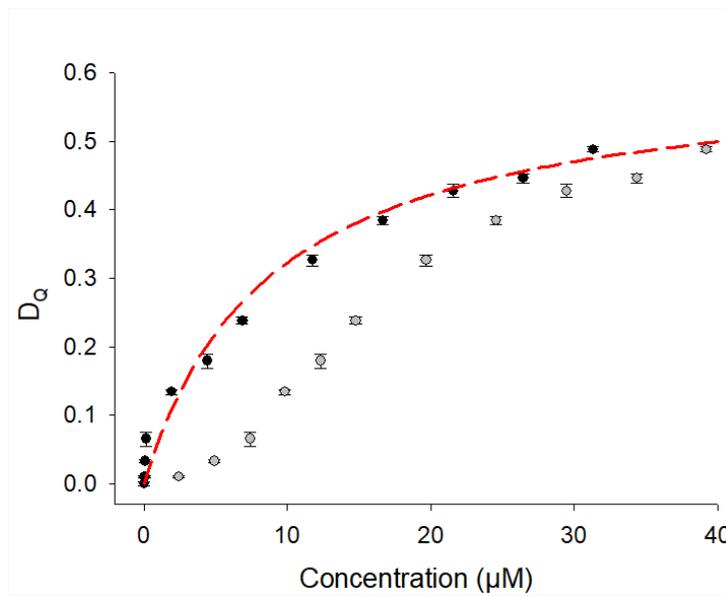


Figure 1.21: Dérivation électronique (paramètre D) en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ en $\mu \text{ mol.L}^{-1}$ introduite (C_{tot} , en rouge) et accessible au quenching (C_Q , en noir) sur une suspension de mutant $\Delta \text{ PetA}$ de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (10^7 cellules par mL environ); $I=340 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$ [83].

La dérivation se modélise selon l'équation suivante :

$$D_Q = \frac{\rho_0 D_\infty C_Q}{\rho_0 C_Q + D_\infty} \quad (1.9)$$

Avec ρ_0 qui correspond à la pente de la courbe à une concentration nulle (en L.mol^{-1}),

D_∞ la limite de la courbe pour les concentrations infinies et C_Q la concentration corrigée en quinones (en mol.L⁻¹).

Le classement des quinones selon leur capacité à dériver les électrons de la photosynthèse depuis notre système biologique est réalisé selon deux critères : la proportion de centres ouverts à concentration infinie (D_∞) dont la mesure implique l'emploi de concentrations suffisantes pour mettre en évidence au moins un début de saturation de la courbe et qui renseigne sur la vitesse de réduction des quinones lorsque l'étape de leur arrivée n'est plus limitante, et la pente à concentration nulle (ρ_0) qui donne une idée de la dérivation à faibles concentrations [83] et de la capacité d'accès des quinones aux sites de dérivation à la fois. Les deux paramètres s'obtiennent aisément de manière graphique et sont présentés dans le tableau de la figure 1.22.

	$E_{1/2}$ (mV vs SCE)	C_{sat} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	D_∞	r_0 ($\mu\text{mol}^{-1} \text{L}$)
2,6-DCBQ	+42	19.5 ± 6.6	0.58 ± 0.06	$(4.1 \pm 1.4) \times 10^{-2}$
2,5-DCBQ	+55	12.0 ± 0.2	0.60 ± 0.08	$(5.9 \pm 0.5) \times 10^{-2}$
2,6-DMBQ	-60	11.9 ± 6.8	nd	$(9.5 \pm 1.2) \times 10^{-4}$
2,5-DMBQ	+8	4.1 ± 0.8	nd	$(7.4 \pm 1.9) \times 10^{-4}$
PPBQ	+4	14.3 ± 4.9	0.48 ± 0.01	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
BQ	-130	36.6 ± 11.0	nd	$(8.1 \pm 1.6) \times 10^{-4}$
NBQ	-330	5.0 ± 1.5	0.10 ± 0.03	$(4.0 \pm 1.4) \times 10^{-3}$

Figure 1.22: Tableau récapitulatif des différents résultats obtenus : $E_{1/2}$ potentiel de demi vague ; C_{sat} concentration des quinones perdues dans les membranes à saturation ; D_∞ dérivation lorsque la concentration en quinones est infinie ; r_0 pente de la dérivation à concentration nulle ; Résultats obtenus dans les conditions suivantes : 10^7 cellules par mL ; $I = 340 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ [83].

Le traitement des données montre que pour 3 des 7 quinones étudiées, la saturation n'est pas atteinte pour les concentrations sondées.

On constate que la capacité des quinones à dériver est globalement en accord avec le potentiel. En l'occurrence, les quinones dichlorées dérivent mieux que les quinones diméthylées. La benzoquinone semble très faiblement opérante quand la para-phénylbenzoquinone affiche une dérivation un peu plus faible que les dérivés chlorés. Toutefois la connaissance du potentiel redox ne suffit pas à présager de l'efficacité du médiateur électrochimique car il existe des étapes qui n'impliquent pas de transfert d'électrons, ce qui nécessite que l'on tienne compte de critères comme la capacité de la quinone à traverser les membranes lipidiques ou le site exact de dérivation : Q_A ou Q_B .

1.5.2 «Criblage» de quinones et photosynthèse : mise en regard avec la littérature

Les interactions quinones-poche Q_B et plastoquinones de type Michaelis-Menten

Les travaux de G. Longatte mettent en évidence que l'effet des quinones (PPBQ et les DCBQs) pour lesquelles la dérivation sature à fortes concentrations peut être modélisé à travers une expression mathématique de type Michaelis-Menten (éq 1.9). Dans ce contexte, la quinone exogène se placerait au sein de la poche Q_B (où viennent habituellement s'insérer les plastoquinones endogènes) pour oxyder Q_A^- . Ce modèle est le modèle le plus simple pour décrire la cinétique d'une réaction catalysée par une enzyme agissant sur un substrat pour donner un produit. L'étape clé est la formation d'un complexe substrat/enzyme. Or on sait que l'interaction entre la plastoquinone endogène PQ et la poche Q_B est hautement spécifique et favorisée par la queue lipophile de la plastoquinone et des liaisons hydrogène avec les résidus environnants [66]. Ce principe d'une interaction entre les benzoquinones et la chaîne de transfert d'électrons, selon des cinétiques de type Michaelis-Menten est corroboré par la littérature, en particulier les travaux de Koike et coll publiés en 1995 sur particules de PSII isolés de cyanobactéries *Synechococcus vulcanus* mais ayant conservé leur pool de plastoquinones [79]. Ainsi, la mesure des variations de l'absorbance induites par flash laser sur des PSII traités au diuron (DCMU inhibiteur spécifique du site Q_B) en absence ou présence des benzoquinones exogènes permet de remonter à l'affinité chimique de la quinone pour le site Q_B .

En effet, la variation de l'absorbance à 415 nm après l'induction d'un flash renseigne sur l'état de la chaîne photosynthétique et la décroissance de l'absorbance se fait selon trois composantes [85]. En particulier, la composante de décroissance la plus rapide (avec le temps de demi-vie le plus faible) correspond au transfert électronique qui s'effectue entre Q_A^- et Q_B . En présence de DCMU, inhibiteur du transfert électronique entre ces deux derniers en se fixant sur la poche Q_B , cette composante est supprimée. Or l'ajout de benzoquinones exogènes en compétition sur le site Q_B retarde cette inhibition par le DCMU et permet de définir une nouvelle concentration en DCMU, I_{50} nécessaire pour supprimer 50% de la composante de décroissance. Cette valeur de concentration permet de remonter à l'affinité chimique [86]. D'un autre côté, le suivi du taux d'évolution de

l'oxygène, en présence de quinones permet aussi de remonter à la vitesse de réduction des quinones.

Cette étude montre que les quinones exogènes peuvent interagir avec deux sites : accepter les électrons en se fixant sur la poche Q_B ou accepter les électrons des plastoquinones endogènes réduites. L'affinité chimique de la quinone pour le site Q_B et le taux d'évolution de l'oxygène permettent toutefois de savoir quel site d'interaction est privilégié pour chaque benzoquinone.

Dans ces études, l'observation des affinités chimiques en fonction des degrés de substitution permet de remonter aux facteurs qui permettent à la quinone de se fixer à la poche Q_B . Ainsi l'halogénéation augmente l'affinité chimique pour le site et inversement la substitution par des groupements alkyles la diminue : la duroquinone (tétraméthylbenzoquinone) n'a aucune affinité pour la poche Q_B . Ces résultats sont confirmés par les allures des courbes d'évolution d'oxygène en présence d'inhibiteur du site Q_B et permettent de voir s'il y a compétition ou non pour le site.

Acceptor	Concentration (mM)	I_{50} (μ M)	K_b (mM)	K_b^a (mM)
Ferricyanide	1.0	0.063	—	—
Benzoquinone (BQ)	2.0	0.071	17	0.40
MBQ	2.0	0.126	2.0	0.60
2,3-DMBQ	2.0	0.089	4.8	0.83
2,5-DMBQ	2.0	0.126	2.0	0.47
2,6-DMBQ	2.0	0.079	7.9	1.20
TriMBQ	1.0	0.119	1.1	1.70
DQ	0.5	0.064	—	—
MCBQ	0.5	0.250	0.17	nd
2,5-DCBQ	0.5	0.130	0.45	nd
2,6-DCBQ	0.5	0.840	0.040	0.13
TriCBQ	0.2	0.345	0.045	nd
Chloranil	0.05	0.500	0.0072	0.0014 ^b

Figure 1.23: Les concentrations inhibitrices médianes (I_{50}) par la DCMU du flux électronique de Q_A^- à Q_B en présence de différents accepteurs électroniques et les affinités chimiques (K_b) pour le site Q_B de différentes benzoquinones méthyl et chloro-substituées déduites du décalage des valeurs de I_{50} . K_b^a affinités chimiques déterminées sur des particules PSII de *S. elongatus* [87].

Il est intéressant de noter que, dans le cas de dérivés halogénés, l'évolution de la vitesse de photoréduction des quinones en fonction de la concentration en quinones exogènes ne croît pas forcément comme attendu. Les auteurs attribuent ce résultat à une diminution de la dérivation sur le site des plastoquinones due à une compétition entre les plastoqui-

nonnes endogènes et benzoquinones exogènes pour la poche Q_B ce qui fait que le pool de plastoquinones est d'emblée bien oxydé : les benzoquinones exogènes sont incapables de prélever des électrons sur ce site à fortes concentrations. La limitation observée provient dans ce cas-là de la vitesse limitée à laquelle la benzoquinone exogène se réduit sur le site Q_B .

Ces études et d'autres [80] [81] montrent donc que les DCBQs et p-PBQ interagissent préférentiellement avec la poche Q_B alors que les quinones méthylées interagissent plus nettement avec le pool de plastoquinones réduites⁸.

1.5.3 Criblage des quinones par le biais des photocourants

Une étude (mentionnée brièvement plus haut dans les méthodes de dérivation électrochimique des réactions photosynthétiques) récemment effectuée par Gorton et coll [31] présente une analyse comparative entre différentes quinones sur la base de photocourants mesurés dans un système biophotovoltaïque impliquant une électrode d'or modifiée par des nanoparticules en or et des membranes thylakoïdes d'épinards en suspension. Différentes quinones différant par leurs potentiels et structures chimiques ont ainsi été testées. Les résultats trouvés sont consignés dans la figure 1.24.

Les auteurs retiennent trois critères pour expliquer les performances différentes des quinones : le potentiel redox élevé qui rend la réduction de la quinone plus facile, la structure de la quinone, terme assez général mais qui rend compte de la spécificité de l'interaction entre la quinone et la poche Q_B qui est favorisée par les groupements halogénés et défavorisée par les substituants alkyles donneurs selon la littérature [79] et enfin de la solubilité de la quinone. Ils concluent que la para-benzoquinone avec la structure la plus simple est la quinone qui dérive le mieux.

A l'instar des résultats du groupe de L. Gorton, la 2,6-DCBQ et la PBQ exhibent la meilleure capacité de dérivation sur suspension d'algues *Chlamydomonas reinhardtii*. La principale différence réside dans la performance de la benzoquinone BQ qui figure en tête de liste des travaux de L. Gorton alors qu'elle est l'une des plus mauvaises dans les travaux

8. Les quinones méthylées ont une affinité pour le site Q_B qui est beaucoup plus faible que les quinones chlorées et interagissent avec le pool de plastoquinones ce qui nécessite de fortes concentrations pour entrer en compétition effective avec les plastoquinones endogènes de manière à limiter la dérivation et de la rendre indépendante de la concentration introduite.

Quinone	Structure	$E_{1/2}$ [mV]	J [$\mu\text{A cm}^{-2}$]
duroquinone		-145.0	7.0 ± 0.1
2,3-DMO-5-M-PBQ		-20	31 ± 2.16
2,5-DM-PBQ		-15.0	13.27 ± 0.2
DCIP		+23.0	4.47 ± 0.40
naphthoquinone		+24.0	20.21 ± 0.71
PBQ		+100	127 ± 4.43
tetrachloro-PBQ		+131	30 ± 0.88
tetrabromo-PBQ		+135	23.18 ± 0.34
DCBQ		+150	122 ± 9.13

Figure 1.24: Structure chimique des quinones, leurs $E_{1/2}$ et les densités de courant obtenues dans les expériences conduites par Hasan et coll [88].

de G. Longatte. Ce résultat surprenant s'explique par une différence de cible biologique (membrane thylakoïde vs organisme entier) et de conditions (greffage ou suspension).

La benzoquinone ne semble pas accéder à la membrane thylakoïde des cellules *Chlamydomonas reinhardtii* d'une manière efficace puisque la concentration totale est égale à la concentration perdue dans les membranes d'après les résultats de Longatte [83]. Des conclusions similaires ont été tirées par Koike et coll [79] (Fig 1.23), pour la benzoquinone lors d'une étude comparative entre deux préparations de PSII de bactéries différentes,

l'une retenant une plus grande quantité de lipides que l'autre. Alors que l'affinité chimique de toutes les autres quinones est divisée par un facteur compris entre 3 et 6 entre les deux préparations, celle de la benzoquinone non substituée est divisée par quarante. La littérature nous donne en réalité un coefficient de partition de la benzoquinone entre les phases lipidiques et aqueuses d'un ordre de grandeur inférieur à celui des autres quinones [89].

Il semble donc résulter de ces travaux que la comparaison de l'effet des quinones sur la chaîne photosynthétique, même si elle dégage des tendances générales, dépend très fortement du système et de ses conditions d'études. Dans un tel contexte, les résultats de la littérature doivent donc être utilisés avec prudence et sans généralisation abusive.

L'influence des différents paramètres comme l'intensité de la lumière et la concentration en membranes thylakoïdes a pu aussi être étudiée et sera comparée à nos résultats. Les auteurs font observer néanmoins à la fin de l'article que leur système est très peu stable et proposent de l'améliorer en réalisant une bonne immobilisation des membranes thylakoïdes sur l'électrode pour les garder dans leur état natif. Mais ils omettent de prendre en compte la photoinhibition qui touche ces sous unités incapables de faire la photoréparation, ainsi que le potentiel effet toxique des quinones.

1.5.4 Mise en place de diagrammes de zone

Au-delà de la simple comparaison de la capacité de plusieurs quinones à dériver les électrons photosynthétiques au niveau du PSII, les travaux de G.Longatte ont visé à exploiter les résultats expérimentaux pour en faire un instrument de prédiction en fonction de deux paramètres expérimentaux d'importance : la concentration en quinone et l'intensité de l'illumination. Ainsi, la loi mathématique modélisant la courbe de pourcentage de centres ouverts en fonction de la concentration corrigée peut être retrouvée sur la base d'un mécanisme en plusieurs étapes axé sur une interaction entre les quinones et la poche Q_B . Comme explicité dans le schéma de la figure 1.25, le mécanisme postule que la quinone se lie à la poche Q_B , se réduit deux fois puis se dissocie⁹.

9. Il est à noter que ce mécanisme est monoélectronique, ce qui peut paraître surprenant pour un système biélectronique comme les quinones. Ceci a été discuté par G.Longatte [90] et provient du fait que dans les conditions testées des étapes supplémentaires ne sont pas cinétiquement significatives. Un mécanisme simplifié a donc été proposé, qui permet toutefois de distinguer les étapes d'arrivée de la quinone des étapes de transfert d'électrons.

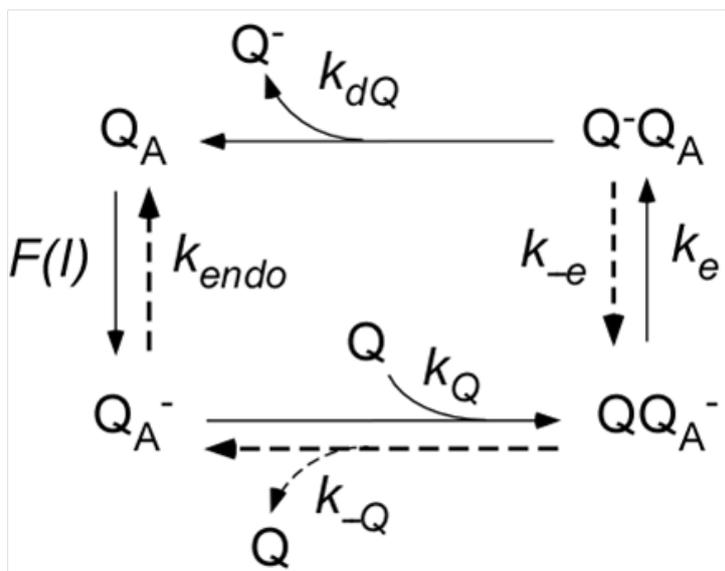


Figure 1.25: Schéma du mécanisme postulé et validé par les mesures de fluorescence dans le cas de l'interaction entre la 2,6-DCBQ et la poche Q_B , tiré de [90].

Dans ce mécanisme, la compétition entre vitesse du transfert électronique et vitesse d'arrivée de la quinone à la poche Q_B explique l'allure de la courbe expérimentale (**Fig 1.20**) qui sature quand le transfert de charge devient limitant aux fortes concentrations en quinones. Ce mécanisme est parfaitement cohérent pour la 2,6-DCBQ où les effets de la concentration et de l'illumination sont particulièrement bien modélisés par le mécanisme [90]. A partir des résultats expérimentaux et compte tenu des lois mathématiques déduites du mécanisme, des diagrammes de zone ont été établis et donnent la proportion de centres ouverts en fonction de l'intensité lumineuse incidente et la concentration en quinone (**Fig 1.26**).

Ces diagrammes permettent de voir quelles sont les conditions d'intérêt pour dériver les électrons de la photosynthèse, en fonction de l'objectif souhaité.

Ainsi, la dérivation est maximale (% de centres ouverts le plus grand) et indépendante de la concentration en quinone pour de fortes concentrations et une faible illumination. Inversement, la dérivation est modérée mais contrôlable par la concentration en quinone à plus forte illumination. Ces diagrammes montrent sans ambiguïté que les objectifs de production de courant doivent être découplés de ceux du soulagement de la chaîne ou tout au moins adaptés à l'organisme :

- Un photocourant élevé peut induire le court-circuit de la chaîne et «couper» la

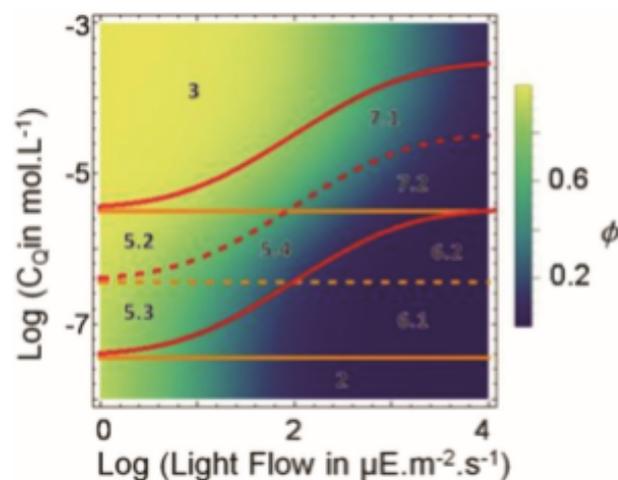


Figure 1.26: Diagramme de zone exprimant la proportion de centres ouverts en fonction du log de la lumière incidente et du log de la concentration en quinones, tiré de [90].

photosynthèse : toute application à temps longs imposera de travailler dans des conditions où l'organisme n'a pas besoin de la photosynthèse (milieu riche en carbone réduit, ce qui peut par ailleurs permettre l'utilisation de mutants dont la chaîne photosynthétique est interrompue, augmentant la dérivation).

- Le soulagement de la chaîne passe par le contrôle de la dérivation qui, à long terme en milieu pauvre en carbone réduit, ne pourra être que partielle et sur des algues dont la chaîne photosynthétique n'est pas interrompue pour ne pas nuire à la survie de l'organisme.

1.5.5 Le montage à l'échelle préparative

Dans un second temps, les travaux de G.Longatte ont mis en jeu l'élaboration d'un montage électrochimique à une échelle préparative pour dériver les électrons de la photosynthèse sur les algues et tenant compte de la contrainte de travailler en suspension cellulaire. La collection des électrons de la photosynthèse se fait sur une électrode de grande surface (mousse ou toile de carbone) polarisée à un potentiel nettement supérieur au potentiel d'oxydation de la quinone réduite. La génération d'un courant sous irradiation est observée et correspond à la réoxydation des quinones photoréduites dans la chaîne photosynthétique.

Plus en détail, le montage électrochimique est un montage classique à 3 électrodes

avec une électrode de travail en toile de carbone, une contre-électrode en platine et une électrode de référence Ag/AgCl.

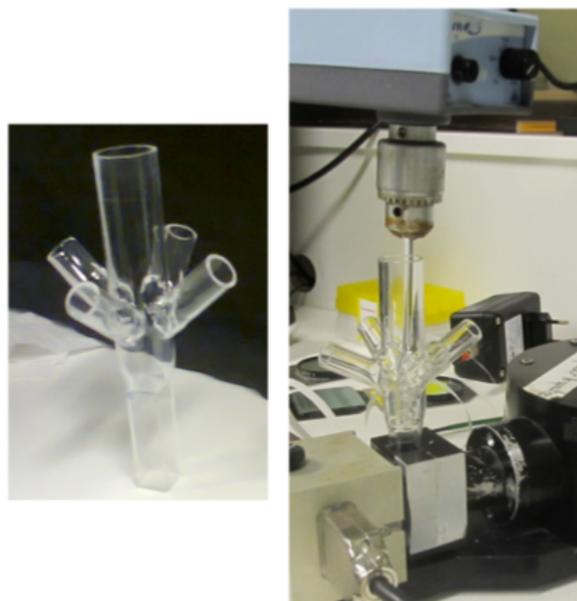


Figure 1.27: Photo du montage mis en place par Longatte au sein du laboratoire. A gauche la cellule spectroélectrochimique. La zone d'illumination est située au fond de la cellule. A droite le montage entier.

La cellule spectroélectrochimique utilisée consiste en une cellule électrochimique classique qui surmonte une cuve spectroscopique en pyrex et a été spécialement conçue dans un atelier de soufflage de verre (**Fig 1.27**). De par sa forme classique, l'électrochimie est aisément réalisable et la cellule s'insère par sa partie inférieure en forme de cuve dans le spectromètre de type Joliot ce qui permet de procéder à l'illumination en continu. Comme le volume de la cellule est conséquent (environ 16 mL) une double agitation est nécessaire (par le haut via une barre tournante et par le bas via un barreau aimanté). Cela permet d'homogénéiser la solution et d'éviter la sédimentation des algues. Cette agitation est rendue d'autant plus indispensable que la lumière incidente n'atteint que la partie inférieure de la cellule spectroélectrochimique et que l'électrochimie ne concernerait, en absence de convection, que la partie adjacente à l'électrode de carbone. L'homogénéisation par convection permet de se soustraire des conditions d'hétérogénéité complexes.

En présence de 2,6-DCBQ, des photocourants de l'ordre de quelques dizaines de $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ont été obtenus (quasi-) stationnaires sur environ une heure, ce qui est significatif

si on compare à la plupart des autres systèmes de dérivation [91].

A nouveau les tentatives de modélisation du photocourant ont été réalisées dans le but de mieux comprendre l'influence des paramètres expérimentaux sur la dérivation des électrons de la photosynthèse en conditions électrochimiques. L'homogénéisation de la solution soumise à la convection simplifie considérablement le système et permet de le traiter sous la forme d'une compétition entre la cinétique d'oxydation de la forme réduite de la quinone à l'électrode et la réduction de la forme oxydée de la quinone par l'algue illuminée en prenant le formalisme de la dérivation extrait des études spectroscopiques. L'équation suivante est établie :

$$\frac{dC_Q}{dt} = k_{el}C_{QH_2} - \frac{\nu_{max}}{V} \frac{D_\infty C_Q}{\rho_0 + C_Q} \quad (1.10)$$

avec k_{el} la constante de vitesse de la réaction électrochimique

$$k_{el} = \frac{AD}{\delta V} \quad (1.11)$$

Avec A l'aire de la surface de l'électrode, D le coefficient de diffusion du médiateur en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, δ l'épaisseur de la couche de diffusion en régime stationnaire, V le volume du mélange en m^3 .

C_Q est la concentration en quinones exogènes corrigée, D_∞ le rendement d'extraction pour une quinone donnée selon la proportion de sites ouverts à saturation comme vu précédemment, ρ_0 la pente initiale en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (**voir éq 1.9**) et ν_{max} la vitesse de réduction maximale des quinones (pour laquelle on a un rendement de 100%).

En définissant les paramètres

$$k = \frac{k_{el} \cdot V}{V_{max} \cdot \rho_0} = \frac{A \cdot D}{\delta \cdot V_{max} \cdot \rho_0} \quad (1.12)$$

et

$$b = \frac{\rho_0 \cdot C}{D_\infty} \quad (1.13)$$

En régime stationnaire, on peut donc représenter le courant normalisé en fonction de k et b et établir la formule :

$$\psi = \frac{i \cdot \delta}{nFACD} = 1 - \alpha = 1 - \frac{k(b-1) - 1 + \sqrt{(k(1-b) + 1)^2 + 4k^2b}}{2kb} \quad (1.14)$$

k représente le rapport entre régénération électrochimique du médiateur et dérivation, b est lié au rapport entre transfert de masse et transfert de charge pour l'étape de dérivation et α est le pourcentage de quinones oxydées. Ces modélisations permettent d'une part de modéliser le photocourant. D'autres part, elles permettent de prédire les conditions (valeurs de b et k) pour lesquelles on obtiendra un courant stationnaire-de valeur donnée-contrôlé par telle ou telle étape (électrochimie ou photosynthèse) ou modéré (mais indépendant des conditions électrochimiques). La connaissance des ordres de grandeurs adaptés de b et k à partir des modélisations permettra de définir les valeurs pertinentes des paramètres expérimentaux (volume de solution, choix de la quinone...).

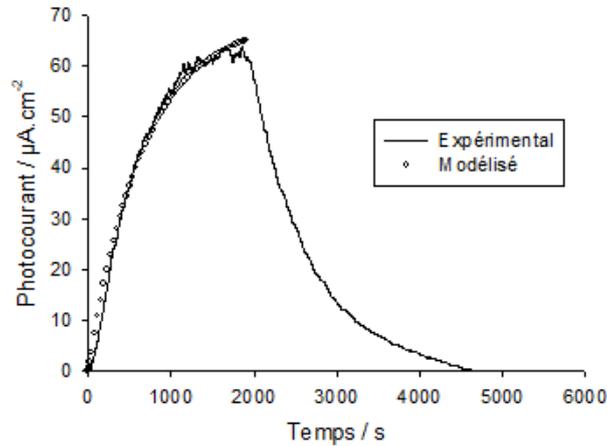


Figure 1.28: Courant réel obtenu vs le courant modélisé [92].

Enfin, la modélisation du courant en régime transitoire, en tenant compte des cinétiques de Michaelis-Menten donne un bon accord entre le modèle et la réalité (**Fig 1.28**). Cependant, le modèle ici présenté ne tient pas compte d'une instabilité du système, qui a été attribuée à la photoinhibition ainsi qu'à un effet poison des quinones.

1.6 Conclusion du chapitre

Les travaux réalisés au laboratoire au départ de cette thèse, constituaient la mise en place d'une stratégie visant à extraire les électrons photosynthétiques d'une suspension d'algues *Chlamydomonas reinhardtii* par voie électrochimique sur la base d'un système associant électrode collectrice de grande surface et médiateur de type quinone. Si cette stratégie n'a pas à rougir des performances d'autres systèmes rapportés dans la littérature, de nombreuses questions se posent. En effet, le photocourant obtenu, bien que stable sur 1h, diminue progressivement jusqu'à s'annuler au bout de 8h. Cet épuisement du système ne peut se comprendre qu'en multipliant les résultats expérimentaux en conditions électrochimiques. Or le montage préparatif souffre d'une certaine lourdeur. La nécessité d'un grand volume d'algues (16 mL), la mise en place de deux agitations et la grande surface spécifique de la toile de carbone conduisent à des courants capacitifs élevés qui ne s'annulent qu'au bout de plusieurs heures. Ceci limite considérablement la possibilité de conduire des études plus exhaustives sur les différents paramètres qui entrent en jeu. A cet égard, les algues mutées ΔpetA et un seul médiateur (2,6-DCBQ) ont été principalement considérés lors des dérivations. Par ailleurs, l'illumination ne concerne qu'une partie de la solution mise sous convection. Enfin si l'agitation permet de se soustraire des conditions d'hétérogénéité, elle représente un coût énergétique qui pose problème dans une optique d'application.

C'est pourquoi le travail de thèse présenté dans ce manuscrit cherchera à mettre en oeuvre une cellule électrochimique dans des conditions plus confinées, non soumises à une convection et avec des temps de réponse plus rapides. Cette cellule sera ensuite mise à profit pour poursuivre les études de compréhension de l'effet des quinones au cours de la dérivation et notamment envisager la question d'autres interactions avec les algues que l'aspect accepteur du PSII.

Chapitre 2

Evaluation de la capacité des
quinones à dériver les électrons par
suivi électrochimique

2.1 Retour sur le contexte

Comme cela a été précisé dans le chapitre précédent, les quinones sont des médiateurs de choix pour la dérivation des électrons photosynthétiques. A ce titre, plusieurs demi-piles et piles mettant en jeu cette catégorie de médiateurs redox ont déjà été mises en place. Néanmoins, au-delà de la simple preuve de concept, ou du design d'un dispositif plus sophistiqué, peu de travaux s'intéressent véritablement à l'évolution du courant dans le temps. En effet, les travaux menés précédemment au laboratoire ont montré que le photocourant résultant d'une suspension d'algues unicellulaires *Chlamydomonas reinhardtii*, bien qu'atteignant un état quasi-stationnaire, n'était stable que sur environ 1 heure. Par ailleurs, la valeur du courant quasi-stationnaire diminuait également après succession de plusieurs pulses lumineux. Ces premiers résultats suggèrent une instabilité du système biologique en présence de quinones dans les conditions de dérivation qu'il convient donc d'étudier en détail.

Cependant, le précédent montage, comportait une électrode de travail de grande surface spécifique (toile de carbone) afin de se placer à une échelle préparative. Ceci présentait l'inconvénient de générer de forts courants capacitifs ce qui, couplé au volume de l'échantillon relativement important, augmentait considérablement la durée de l'expérience (plusieurs heures pour une condition expérimentale) et limitait son utilisation en termes d'analyse. Une étude systématique de l'effet des quinones (concentration, lumière, pulses...) dans ce contexte est alors impensable. Notons par ailleurs la nécessité dans ce précédent montage d'un régime de convection forcée afin d'éviter la sédimentation des algues sur cette longue gamme de temps. Cette convection forcée présentait également l'avantage d'homogénéiser la solution.

C'est dans cette logique que la miniaturisation de l'ancien dispositif entreprise dans le cadre de cette thèse sera tout d'abord présentée au sein de ce chapitre. Il s'agit de conserver la structure de type « demi-pile » mais en réduisant la surface de l'électrode et le volume de la solution pour aboutir à des temps d'étude acceptables. A ce titre, ce nouveau dispositif nous permettra ensuite de réaliser une analyse plus exhaustive du système et d'étudier l'influence des différents paramètres qui entrent en jeu. Enfin, le principe de dérivation électronique de la demi-pile reste le même, à savoir un mode chro-

noampérométrie. La forme oxydée de la quinone (Q) est réduite par les électrons de la chaîne photosynthétique. L'électrode de travail sera polarisée au potentiel d'oxydation de la forme réduite de la quinone (QH₂) et provoquera de ce fait son oxydation, mesurée sous la forme d'un photocourant (**Fig 2.1**). Enfin dans le dispositif actuel, le transport des espèces quinoniques se fait uniquement par diffusion et convection naturelle.

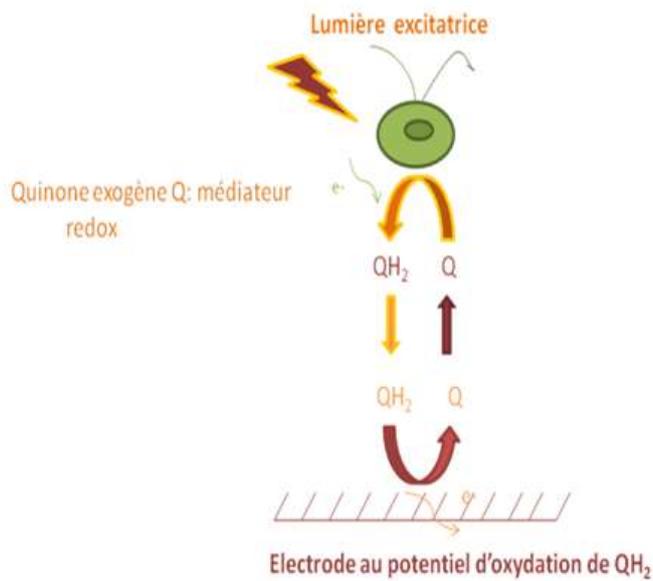


Figure 2.1: Principe de la dérivation des électrons de la photosynthèse dans la demi-pile sur algue

2.2 Le dispositif expérimental

Le principe du nouveau dispositif repose sur une miniaturisation de l'ensemble cuve-électrode. Toutefois, la nécessité de réaliser une dérivation électronique efficace au sein de l'algue et d'obtenir des photocourants significatifs d'un côté et la baisse du courant capacitif de l'autre nécessite la mise en place d'un compromis. C'est pourquoi nous avons choisi une cellule électrochimique sous la forme d'un puits de PDMS de 0,6 cm de hauteur collé sur une électrode de travail de 0,9 cm de diamètre défini par le diamètre du puits. La nature de l'électrode de travail est un point d'importance. Dans un premier temps, une surface d'ITO (Indium Tin Oxide; Oxyde d'indium dopé à l'étain; In₂O₃/SnO₂ 90%/10

%) de 150 nm d'épaisseur peut être considérée, en particulier pour sa transparence qui ne limite pas la zone d'illumination. Dans un second temps, une électrode d'or de 50 nm d'épaisseur a été utilisée. Si dans nos conditions, l'électrode perd en transparence (dans l'optique du développement d'un dispositif couplé fluorescence/électrochimie), ceci améliore fondamentalement la conductivité de cette dernière. Cette configuration conduit à des volumes de solutions d'algues lors des expériences de dérivation des électrons d'environ 500 μL . Le montage employé (**Fig 2.2**) est à trois électrodes et comporte une contre-électrode en platine et une électrode de référence Ag/AgCl immergées dans la solution et fixées à des statifs. La fabrication de ce dispositif et les conditions d'étude sont décrites en détail au sein de la partie expérimentale.

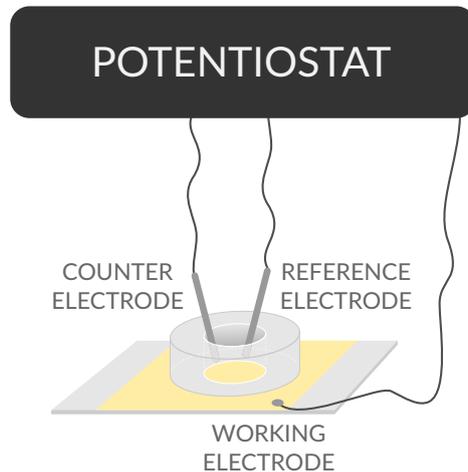


Figure 2.2: Schéma du dispositif mis en place au laboratoire utilisé pour dériver les électrons de la photosynthèse sur une suspension d'algues.

Choix de l'électrolyte

Le milieu minimum contient tous les composants minimaux nécessaires¹ à la croissance sous lumière de l'organisme biologique autotrophe *Chlamydomonas reinhardtii*. La présence de sels minéraux tient lieu d'électrolyte pour le système électrochimique. Le milieu minimum contient du K_2HPO_4 ($4,1 \text{ mmol.L}^{-1}$), du KH_2PO_4 ($2,1 \text{ mmol.L}^{-1}$), du

1. Ce milieu ne contient pas de source de carbone réduit de sorte que la plante doit réaliser la photosynthèse pour subvenir à ses besoins.

CaCl₂ (0,45 mmol.L⁻¹), du NH₄Cl (7,5 mmol.L⁻¹), du MgSO₄ (0,85 mmol.L⁻¹) ainsi que des ions minéraux à l'état de traces.

Concentration en cellules

Le système biologique mis en jeu est une suspension d'algues *Chlamydomonas reinhardtii*. Deux formes seront considérées : une souche sauvage (dite « Wild-Type » ou « WT ») utilisée le plus souvent et une souche mutée (dite « Δf1 ») où l'absence de complexe b₆f coupe la chaîne photosynthétique et permet l'étude du PSII, et qui est utilisée plus occasionnellement. Une concentration de 20 millions de cellules par millilitre a été choisie pour notre étude électrochimique. Cette concentration reste proche de celle mise en jeu en culture et correspond à des photocourants d'intensité suffisante pour l'analyse (environ 10 μA.cm⁻²).

La lumière incidente

Les cellules sont irradiées par une lampe à halogène qui émet un spectre équivalent à celui d'un corps noir porté à 3000K, donnant lieu à des puissances d'illumination notées P_I de 5 mW.cm⁻² et jusqu'à 100 mW.cm⁻². Deux fibres optiques permettent d'acheminer le faisceau jusqu'au dispositif.

2.2.1 Propriétés du système d'étude – Calculs préliminaires – Ordres de grandeur

Calcul du nombre de quinones par photosystème

Les quinones oxydées sont réduites dans notre système par les algues sous l'action de la lumière. Il est donc pertinent d'avoir une estimation de la proportion de quinones par photosystème II avant le début de la catalyse. Les concentrations de cellules sont connues au départ de chaque expérience et égales à environ 2.10⁷ cellules.mL⁻¹. Par ailleurs, le nombre de photosystèmes est estimé à près de 4.10⁶ PSII/cellule [93]. Nous pouvons ainsi remonter au nombre de PSII par mL. En considérant une concentration usuelle en

quinones de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, on en déduit la proportion d'environ 1000 quinones par PSII dans les concentrations de l'expérience ce qui constitue un large excès en quinones.

Calcul de la proportion de quinones internalisées

On peut également déterminer un ordre de grandeur de la quantité de quinones internalisées dans les algues au cours du processus. Pour cela il faut commencer par estimer les volumes aqueux et lipidiques qui entrent en jeu, ainsi que le coefficient de partition de la quinone biphasique. La littérature (pour un mélange octanol/eau) nous donne un coefficient de partition P des quinones aux alentours de 100 pour les plus lipophiles [89]. Le volume de *Chlamydomonas reinhardtii* a été estimé d'après la littérature à environ $125 \mu\text{m}^3 = 125 \cdot 10^{-9} \mu\text{L}$ [94] [95]. Le volume de l'échantillon étant de $500 \mu\text{L}$ et le nombre de cellules étudiées de $2 \cdot 10^7$ ceci donne un volume total d'algues de $2,5 \mu\text{L}$. Les compartiments lipidiques constituent au plus 10% de la cellule ce qui donne un ratio volumique de 1/2000. En considérant les coefficients de partition, nous avons en conséquence environ 5% de quinones internalisées dans les cellules et 95% qui restent dans le volume aqueux (**Fig 2.3**). Tout se déroule de ce fait comme si la concentration en quinones dans la solution n'était que peu changée en présence d'algues. Ainsi, il semble très difficile de suivre la cinétique d'internalisation des quinones avec une méthode de détection des quinones dans le milieu extracellulaire.

On remarquera que, dans ce cas où les quinones sont en large excès d'après les calculs précédents, cet excès est 20 fois moins important lorsqu'on considère les quinones effectivement internalisées, la concentration intracellulaire en quinones exogènes devient comparable à celle des plastoquinones endogènes (environ 10 plastoquinones/PSII contre 100 quinones exogènes par PSII). Dans ce contexte, un point clé dans le comportement du système sera lié à la vitesse d'arrivée/de sortie des quinones au niveau du site de dérivation.

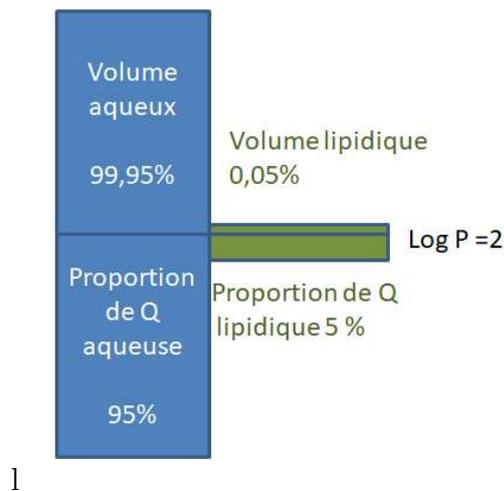


Figure 2.3: Schéma explicatif de la répartition des quinones entre les différentes phases.

2.3 Etudes préliminaires en voltamétrie cyclique

Avant toute expérience de chronoampérométrie, il est nécessaire de procéder à des expériences préliminaires de voltamétrie cyclique sur des solutions aqueuses de quinones au sein du dispositif expérimental décrit précédemment. Sur la base des travaux précédents, nous nous intéresserons à deux quinones « type ». La première, la 2,6-DCBQ, a été identifiée comme un excellent accepteur du PSII quand la seconde, la 2,6-DMBQ, a une faible capacité dérivante au niveau de ce site [96] (**Fig 2.4**).

Ces études préliminaires ont deux objectifs principaux. Le premier consiste à déterminer le potentiel d'oxydation de la forme QH_2 , grandeur indispensable pour les expériences de chronoampérométrie sur suspension d'algues. Le second consiste, en présence d'algues, à suivre en temps réel l'évolution de la concentration en quinones oxydées et réduites en solution. Ainsi, le système algues-quinone sera irradié pendant une certaine durée de temps (typiquement une minute) et le suivi de l'évolution de la quantité en quinones oxydées et réduites sera réalisé pour détecter la réduction des quinones. La stabilité des quinones quant à elle en milieu réactionnel sera étudiée plus tard dans la mansucrit.

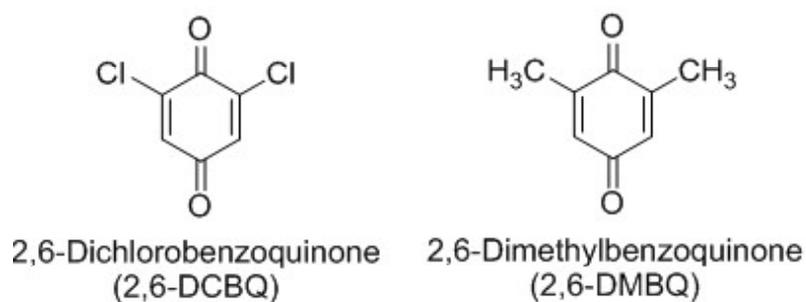


Figure 2.4: Formules chimiques des quinones utilisées

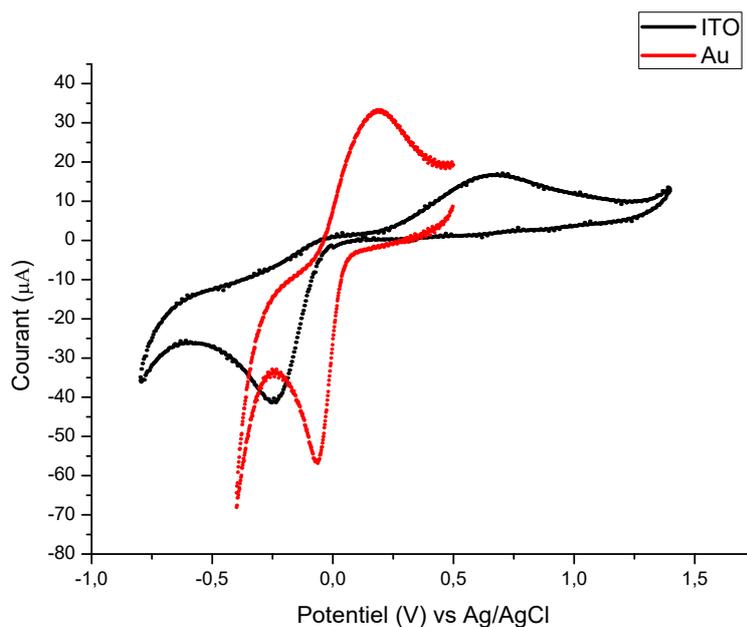


Figure 2.5: Comparaison des voltamétries cycliques de la 2,6-DCBQ sur électrode d'ITO et d'or. $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; 2,6-DCBQ : $300 \mu\text{M}$; WT : $2\cdot 10^7 \text{ cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Le cas de la 2,6-dichlorobenzoquinone

Le voltamogramme cyclique de la 2,6-DCBQ en milieu minimum sur dispositif avec une électrode d'or conduit au système attendu avec un pic de réduction aux alentours de $-0,1 \text{ V vs Ag/AgCl}$ (réduction de la forme Q) et un pic retour aux alentours de $0,1 \text{ V vs}$

Ag/AgCl (oxydation de la forme QH_2). Sur ITO seul, on obtient un système similaire mais à des potentiels plus cathodiques pour la réduction (-0,2 vs Ag/AgCl) et plus anodiques pour la réoxydation (+0,5 V vs Ag/AgCl) (**Fig 2.5**). Ceci est en accord avec un transfert électronique plus lent sur ITO que sur Au² [97].

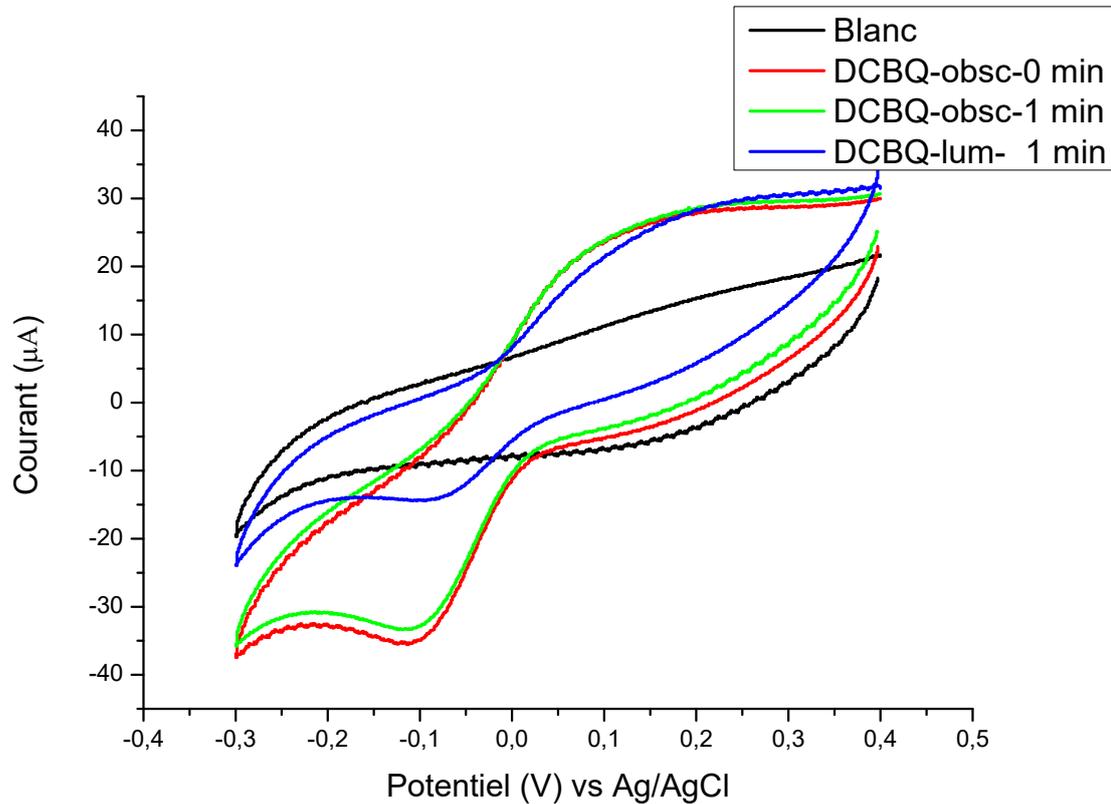


Figure 2.6: Voltamétrie cyclique de la 2,6-DCBQ en présence d'algues sous lumière et sous obscurité sur or. 100 mV.s^{-1} ; $P_I=60 \text{ mW.cm}^{-2}$; 2,6-DCBQ : $100 \text{ }\mu\text{M}$; WT : $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$.

Par ailleurs, en présence d'algues sous illumination (1 minute), on constate que le pic de réduction de Q diminue (**Fig 2.6**). Ceci montre que d'une part, les algues consomment bel et bien la forme oxydée de la quinone et régénèrent la forme QH_2 en solution. La présence d'un contrôle sous obscurité dans les mêmes conditions montre que la réduction des quinones par les algues est beaucoup plus importante sous lumière que sous obscurité ce qui montre que la dérivation est sélective et ne concerne pas les réactions de la phase obscure de la photosynthèse.

2. Une autre explication possible pourrait être reliée à une différence de porosité de matériaux d'électrodes.

D'autre part, en dépit d'un large excès et d'une partition des quinones en faveur de la solution aqueuse (cf. calculs précédents), la présence d'une disparition significative de la forme Q suggère que les cinétiques d'entrée/sortie des quinones dans la cellule ou d'accès aux chaînes semblent être extrêmement rapides dans nos conditions. L'effet de la vitesse de balayage sur les voltammogrammes cycliques du mélange algues-quinones pour essayer d'accéder à des informations quantitatives sera décrit plus tard dans le chapitre.

Le cas de la 2,6-diméthylbenzoquinone

Pour ce qui est de la 2,6-DMBQ, l'étude a été réalisée avec une concentration plus élevée que pour la 2,6-DCBQ (5 fois supérieure soit 500 μM) (**Fig 2.7**). En effet, même sur électrode d'or, la réduction de la forme Q de la 2,6-DMBQ (vers -0,5 V vs Ag/AgCl) est mal définie et difficile à discerner du mur de réduction. En accord avec des études précédentes sur carbone vitreux qui montrent que la réversibilité est moins marquée pour la 2,6-DMBQ que pour la 2,6-DCBQ, il apparaît que le transfert électronique pour cette quinone est beaucoup plus lent sur électrode d'or que pour la 2,6-DCBQ. Toutefois, on distingue deux pics liés à l'oxydation de la forme QH_2 vers 0 V et 0,28 V vs Ag/AgCl respectivement.

Toutefois, en présence d'algues et avec une illumination de 60 s, on retrouve des tendances similaires à la 2,6-DCBQ, c'est-à-dire une consommation quantitative de la forme Q et une production de la forme QH_2 . Ceci indique que, à l'instar de 2,6-DCBQ, la cinétique de réduction, d'entrée/sortie de la quinone semble rapide et sélective dans nos conditions.

Bilan

Ces expériences confirment que les benzoquinones sont des médiateurs adaptés pour interagir avec la chaîne photosynthétique dans les conditions de notre dispositif. Par ailleurs, les potentiels à appliquer en chronoampérométrie peuvent être déduits de ces études et doivent être supérieurs d'au moins 100 mV au potentiel d'oxydation de QH_2 . A ce titre, le potentiel appliqué sera de +0,38 V vs Ag/AgCl sur électrode d'Au et +0,72 V vs Ag/AgCl sur électrode ITO.

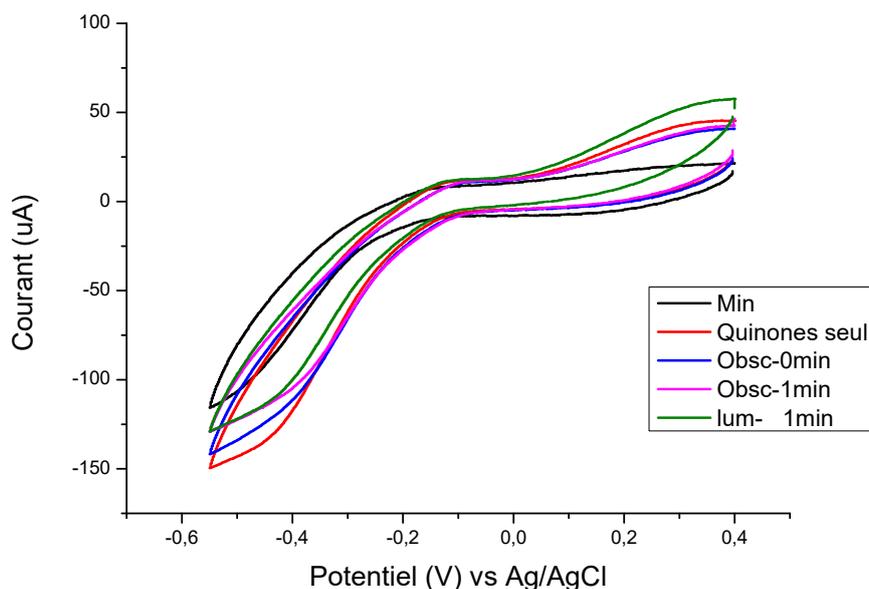


Figure 2.7: Voltamétrie cyclique de la 2,6-DMBQ en présence d’algues sous lumière et sous obscurité sur or. $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $P_I=60 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$; 2,6-DMBQ : $100 \text{ }\mu\text{M}$; WT : $2\cdot 10^7 \text{ cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$.

	Au		ITO	
Quinone	Ea (V)	Ec (V)	Ea (V)	Ec (V)
2,6-DCBQ	0,1	-0,1	0,5	-0,2
2,6-DMBQ	0,28	-0,5	0,56	-0,5

Table 2.1: Tableau récapitulatif des différents potentiels de réduction et d’oxydation vs Ag/AgCl obtenus par voltamétrie cycliques sur électrode d’or et d’ITO dans les conditions d’études similaires.

2.4 Chronoampérométrie - mesure de photocourants

2.4.1 Obtention de photocourants

Un des principaux buts de la miniaturisation est de réduire le temps d’étude. A cet égard les électrodes sont polarisées à un potentiel de $0,38 \text{ V}$ vs Ag/AgCl ce qui correspond à un potentiel supérieur au potentiel d’oxydation de toutes les quinones sur électrode d’or. Le courant capacitif met une soixantaine de secondes à disparaître ce qui constitue une

nette amélioration par rapport à la période d'environ une heure sur le dispositif avec toile de carbone³. A 90 secondes du début de la polarisation, la lumière est déclenchée et le photocourant observé. On observe ainsi une augmentation rapide du courant après irradiation. Toutefois le courant met une centaine de secondes pour atteindre un régime stationnaire. Consécutivement à cette augmentation, le régime quasi-stationnaire (**Fig 2.8**) ne perdure pas et conduit à un épuisement progressif du courant aux temps très longs. En premier lieu, et même si cela dépend évidemment des conditions expérimentales (illumination, concentration en quinones, nature de l'algue...) et si cette grandeur ne peut à elle seule refléter la performance du système, les photocourants obtenus sont de 20 μA , ce qui correspond à des densités de photocourants d'environ $30 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour notre dispositif. C'est un résultat comparable avec les différentes stratégies de la littérature et en particulier sur suspension cellulaire.

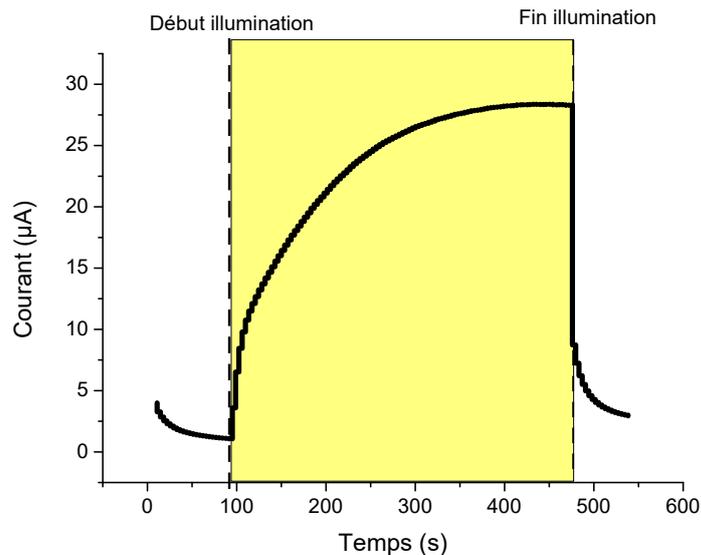


Figure 2.8: Chronoampérogramme obtenu sur électrode d'or. $0,38\text{V}$ vs Ag/AgCl ; $P_I=60 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$; 2,6-DCBQ : $100 \mu\text{M}$; WT : $2\cdot 10^7 \text{ cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Les différents effets des conditions expérimentales (illumination, concentration en quinone) seront décrits plus loin dans le chapitre. A ce stade, on peut toutefois noter que

3. Par ailleurs, le dispositif décrit ici permet de mélanger au préalable quinones et algues avant la polarisation, ce qui permet d'éviter un courant parasite à l'obscurité comme dans le cas du montage précédent qui exigeait un temps de stabilisation du courant de base supplémentaire suivant l'addition de quinones.

l'intensité des photocourants obtenus dépend du matériau de l'électrode. De manière générale, les photocourants quasi-stationnaires sont plus élevés sur Au que sur ITO seul. A titre d'exemple, pour une concentration en 2,6-DCBQ de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, une illumination de 60 mW.cm^{-2} et des algues *Chlamydomonas reinhardtii* Δf1 ($2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$), les photocourants mesurés sur ITO et Au sont respectivement de 6 et 22 μA . Au-delà du fait que le dispositif avec électrode d'or donne de meilleures performances en terme de valeur de photocourants obtenus que par rapport à l'électrode d'ITO, il présente aussi une plus grande répétabilité et tenue dans le temps. C'est pour cela que le dispositif à électrode d'or sera privilégié ici.

Au-delà de la question de la simple performance en termes de courant stationnaire extrait, nous allons nous intéresser aux différentes zones du chronoampérogramme : zone transitoire – zone quasi-stationnaire – stabilité du photocourant.

Régime transitoire

Dans tous les cas, le courant nécessite une période, de l'ordre de plusieurs centaines de secondes pour atteindre le régime stationnaire. Nous allons donc, dans un premier temps, nous intéresser à ce temps de montée. Puisque nous travaillons dans des conditions où aucune convection forcée n'est appliquée, il est nécessaire de mettre en évidence les paramètres qui jouent sur le temps mis en place pour atteindre le régime quasi-stationnaire en chronoampérométrie. En particulier, il est possible qu'un phénomène de sédimentation des algues augmentant de fait leur concentration au voisinage de l'électrode, joue un rôle sur cet état transitoire.

L'étude de la question de la sédimentation peut se faire au travers de deux types d'expériences. La première consiste à effectuer des cycles d'illumination et d'obscurité (**Fig 2.9**). En effet, l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* présente un certain phototactisme⁴. Si les évolutions en lumière continue et jour/nuit semblent similaires, un écart est observé au niveau du temps de montée ($t_{1/2}$ d'environ 150 s et 50 s respectivement). S'il reste difficile de découpler les effets des cycles jour/nuit vis-à-vis des processus de sédimentation et de photoinhibition (cf. plus loin) voire en termes de variabilité cellulaire, ces expériences

4. faculté d'un organisme à diriger ses mouvements en fonction de la lumière présente dans l'environnement.

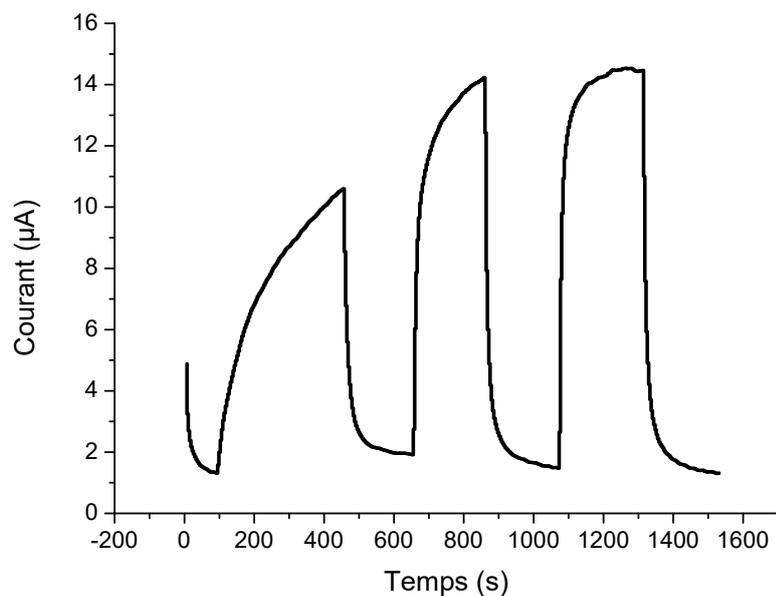


Figure 2.9: Cycles d'illumination-obscurité ; 0,38 V vs Ag/AgCl ; 2,6-DCBQ :100 μM ; $P_I=60 \text{ mW.cm}^{-2}$; WT : $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$.

montrent que le régime quasi-stationnaire est obtenu bien plus lentement sur les premiers cycles.

Une seconde expérience consiste à jouer sur la densité du milieu en réalisant une chronampérométrie en présence de Ficoll. Le Ficoll est un polysaccharide qui permet de maintenir les cellules en suspension, les empêchant de sédimenter. Les différents résultats obtenus, en absence et présence de Ficoll sont résumés **figure 2.10**.

On constate que le photocourant stationnaire, que ce soit pour 2,6-DCBQ ou 2,6-DMBQ est plus élevé en absence de Ficoll. La normalisation des courants par rapport au courant maximal montre sans ambiguïté que le temps de montée n'est pas affecté. Cela montre que la sédimentation, même si elle a lieu, n'affecte pas le régime transitoire d'augmentation du courant qui serait alors plutôt lié à la diffusion des quinones. Pour voir la part qu'a le changement du coefficient de diffusion en milieu Ficoll dans la variation du photocourant collecté, deux expériences de voltamétrie ont été réalisées avec et sans Ficoll (**Fig 2.11**). Sur le balayage aller, le rapport des intensités de pic sans/avec Ficoll est de 1,1. Pour le balayage retour, il est de 1,2. Ces rapports dépendent de la racine du coefficient de diffusion D quand le photocourant dépend de D . En mettant les rapports de la voltamétrie

cyclique au carré, on obtient 1,21 et 1,44 pour les rapports de coefficients de diffusion des formes Q et QH₂ dans le minimum et le Ficoll respectivement, ce qui est en accord avec une diffusion des quinones (de l'algue vers l'électrode ou de l'électrode vers l'algue) plus importante qu'une potentielle sédimentation dans les conditions de l'expérience.

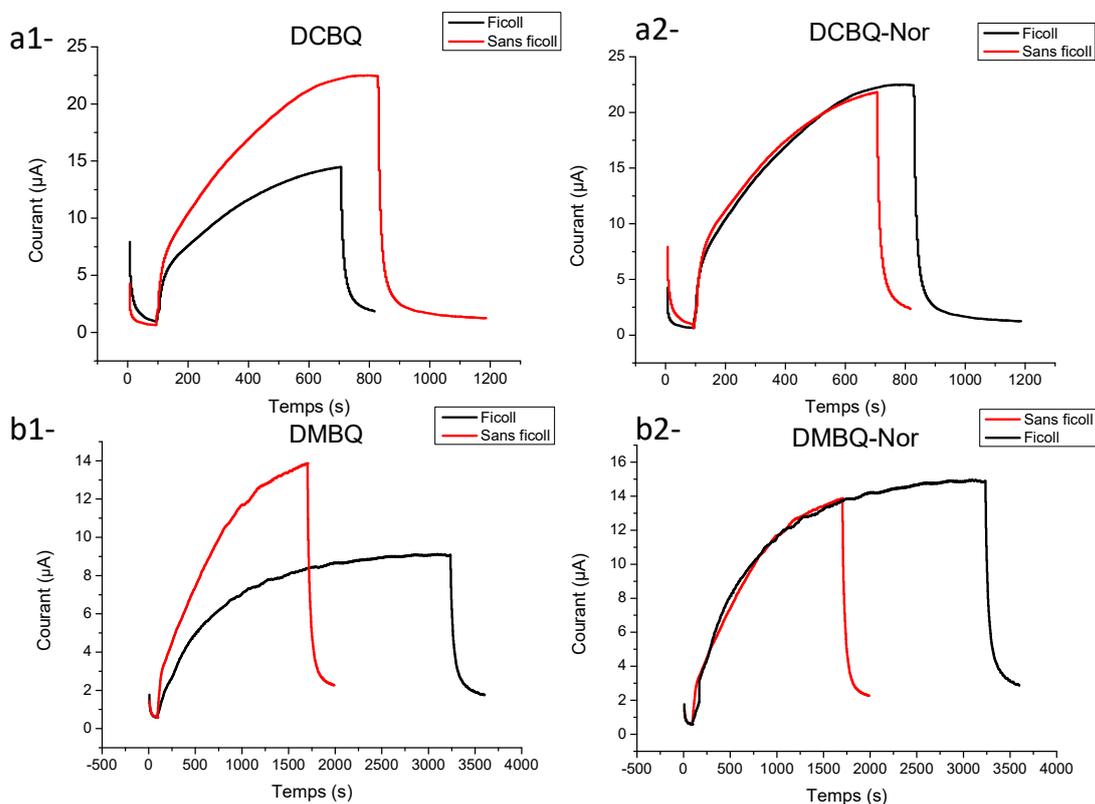


Figure 2.10: Chronoampérométries obtenues et normalisées en présence ou absence de Ficoll par rapport à la valeur maximale de courant atteinte. 0,38 V vs Ag/AgCl; $P_I=60 \text{ mW.cm}^{-2}$; 2,6-DCBQ :100 μM ; WT : $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$.

Ce résultat est par ailleurs confirmé par une autre expérience où l'on utilise la forme réduite de la quinone (la forme 2,6-DCHQ n'existant pas commercialement, c'est la 2,5-DCHQ qui a été utilisée). On utilise cette forme réduite pour éviter les problèmes d'empoisonnement liés à la forme Q (cf. plus loin). On laisse alors les cellules sédimenter en présence de la forme QH₂ et en absence de potentiel appliqué ou de lumière pendant 10 min au sein du dispositif, soit l'ordre de grandeur du régime transitoire. Deux chronoampérométries ont été réalisées ensuite, en absence ou en présence d'agitation pendant l'incubation (**Fig 2.12**). Les chronoampérométries obtenues sont identiques, ce qui laisse à penser que le régime transitoire est intrinsèque à la dérivation électronique et qu'il s'agit

d'un temps de « mise en marche » du système indépendant de la sédimentation.

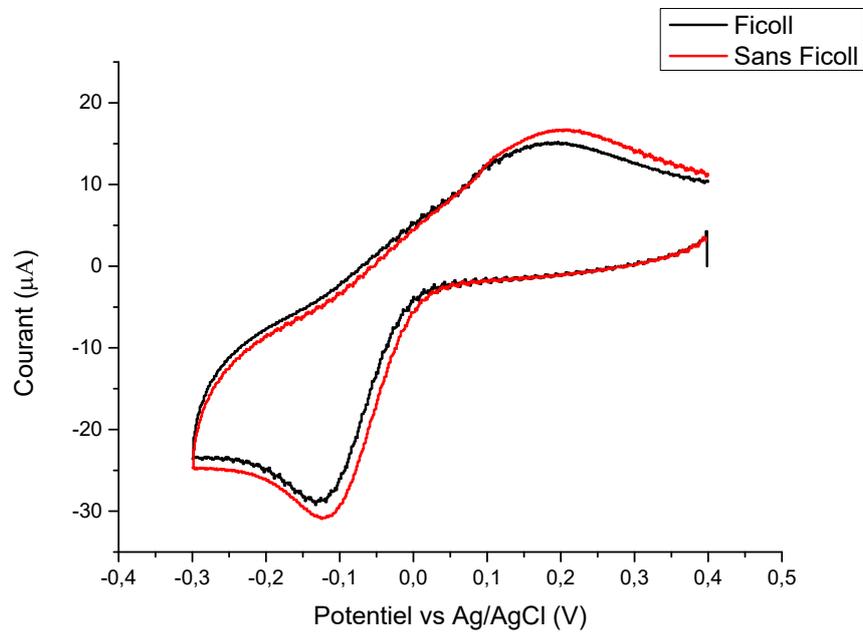


Figure 2.11: Voltamogrammes obtenus en présence ou absence de Ficoll dans du milieu minimum. $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; 2,6-DCBQ : $100 \text{ }\mu\text{M}$.

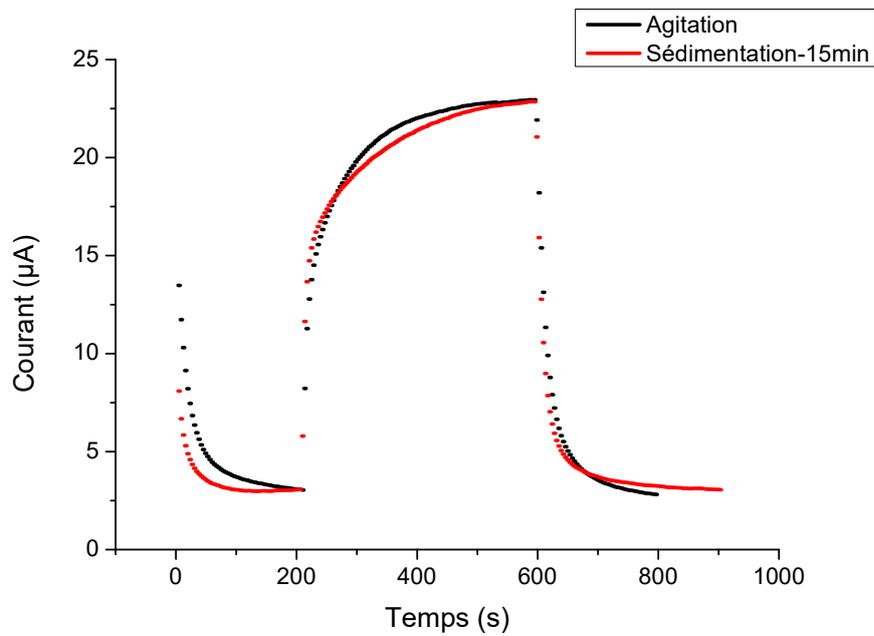


Figure 2.12: Chronoampérogrammes obtenus après une sédimentation supposée. $0,38 \text{ V}$ vs Ag/AgCl; $P_I=60 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$; 2,5-DCHQ : $100 \text{ }\mu\text{M}$; WT : $2\cdot 10^7 \text{ cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Dans ce contexte, le régime transitoire est donc lié aux phénomènes de partition successifs entre les phases lipophiles et hydrophiles, c'est-à-dire aux saturations des différentes membranes menant à l'intérieur et à l'extérieur de l'algue puis à la dérivation électronique au niveau PSII.

Intensités de lumière différentes

L'effet de l'intensité d'illumination donne des informations complémentaires sur le régime transitoire. Nous avons ainsi pu comparer la mise en place du courant à deux intensités de lumière différentes. Nous voyons que sous une intensité lumineuse plus forte, la mise en place du régime a lieu plus rapidement (**Fig 2.13**).

Ce résultat suggère donc que l'étape de dérivation contribue fortement au régime transitoire puisque qu'en augmentant l'intensité lumineuse, on augmente la vitesse de réduction de la quinone exogène.

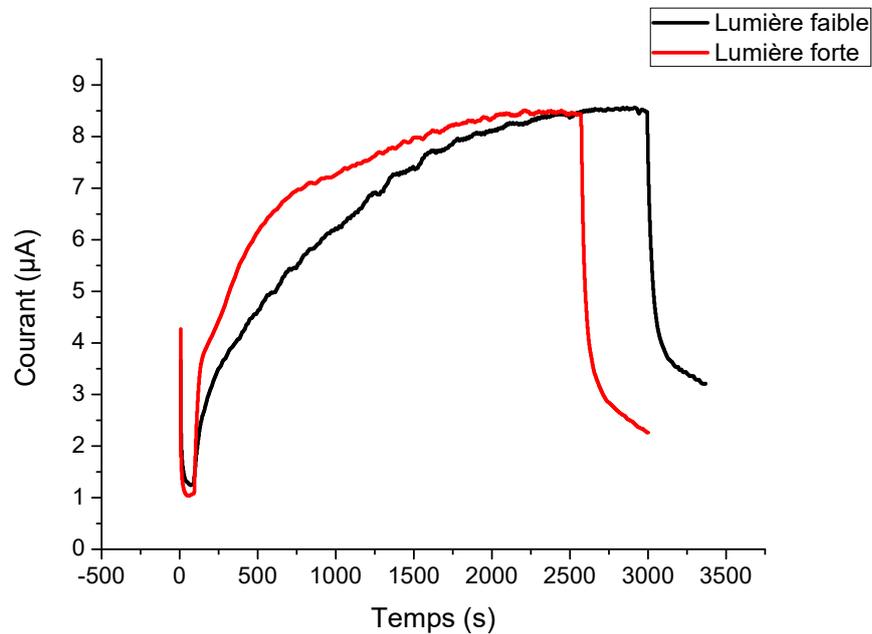


Figure 2.13: Chronoampérogrammes obtenus pour deux intensités différentes. 0,38 V vs Ag/AgCl; Lumière faible : $P_I=20 \text{ mWcm}^{-2}$ et Lumière forte : $P_I=60 \text{ mW.cm}^{-2}$; 2,6-DMBQ : $100 \text{ }\mu\text{M}$; $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$.

Comparaison WT et $\Delta f1$

La comparaison entre les deux souches d'algues « sauvages » WT (chaîne photosynthétique intacte) et « $\Delta f1$ » (chaîne photosynthétique coupée) va dans le même sens que les observations précédentes. Toutes choses égales par ailleurs, le temps de montée du courant reste plus court pour les souches mutées de type $\Delta f1$ que sur souche « sauvage » (**Fig 2.14**). Dans ce cas, seul le flux électronique le long de la chaîne et la proportion de sites ouverts au niveau PSII diffèrent entre les deux souches. La proportion de « charges » disponibles sur le PSII est alors plus élevée pour les $\Delta f1$, ce qui facilite l'étape de dérivation par la quinone et la montée en courant.

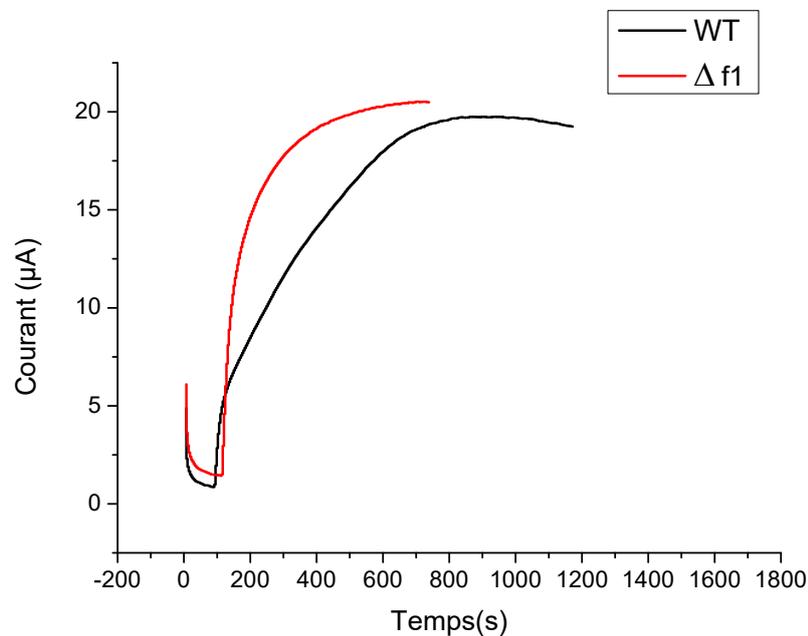


Figure 2.14: Chronoampérogrammes obtenus pour deux souches différentes WT et $\Delta f1$. Pour la souche mutée la chronoampérométrie a été arrêtée dès la stabilisation du courant. 0,38 V vs Ag/AgCl; $P_I=60 \text{ mW.cm}^{-2}$; 2,6-DCBQ : 100 μM ; $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$.

2.4.2 Régime stationnaire

Influence de la concentration en algues sur le courant

L'influence de la concentration en algues sur les performances du système bioélectrochimique a été étudiée (**Fig 2.15**). Il apparaît que l'intensité du courant stationnaire dépend de la concentration en cellules. Le courant stationnaire est d'autant plus élevé que

la concentration en algues est grande, en accord avec une augmentation de la quantité de PSII disponibles dans le système et donc d'électrons à extraire. Toutefois, à partir d'un seuil (concentration en algues de $4 \cdot 10^7$ cellules.mL⁻¹), le courant diminue en dépit d'une concentration en algues plus élevée. Dans ce cas, les algues ont de plus en plus de difficulté à consommer le dioxygène et basculent en anaérobiose⁵, ce qui peut, de fait, induire une transition d'état⁶ et diminuer leur capacité à réaliser la photosynthèse. Enfin, la proportion de quinones par PSII se trouve diminuée à ces fortes concentrations, ce qui modifie de fait l'intensité de dérivation puisque cette dernière dépend aussi des phénomènes de partition.

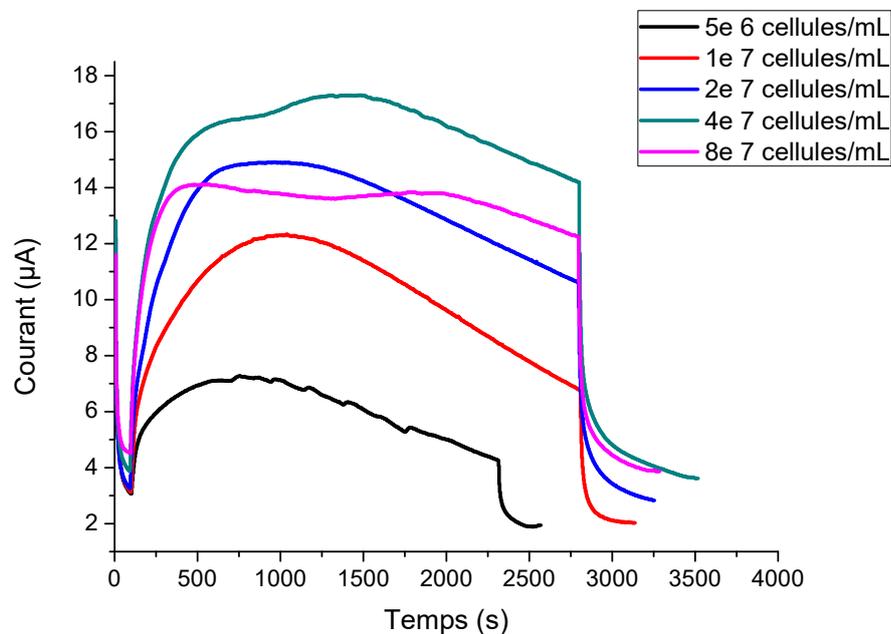


Figure 2.15: Chronoampérogrammes obtenus à des concentrations en cellules différentes (en cellules.mL⁻¹); 0,38 V vs Ag/AgCl; $P_I=60$ mW.cm⁻²; 2,6-DCBQ :100 µM.

La concentration en algues est donc un levier peu pertinent pour jouer sur les performances du système et nécessite de se limiter à des concentrations voisines de celles utilisées lors de la culture des algues.

5. Conditions caractérisant la vie sans oxygène libre.

6. Mécanisme de régulation de l'absorption de l'énergie lumineuse par l'organisme photosynthétique impliquant le déplacement d'une proportion d'antennes collectrices d'un photosystème à un autre. Cela permet de favoriser la phosphorylation cyclique ou non cyclique selon les cas.

Effet de la concentration et de la nature de la quinone

Un autre paramètre important pour contrôler et augmenter le courant en régime stationnaire est la concentration introduite en médiateur redox, c'est-à-dire en quinone oxydée.

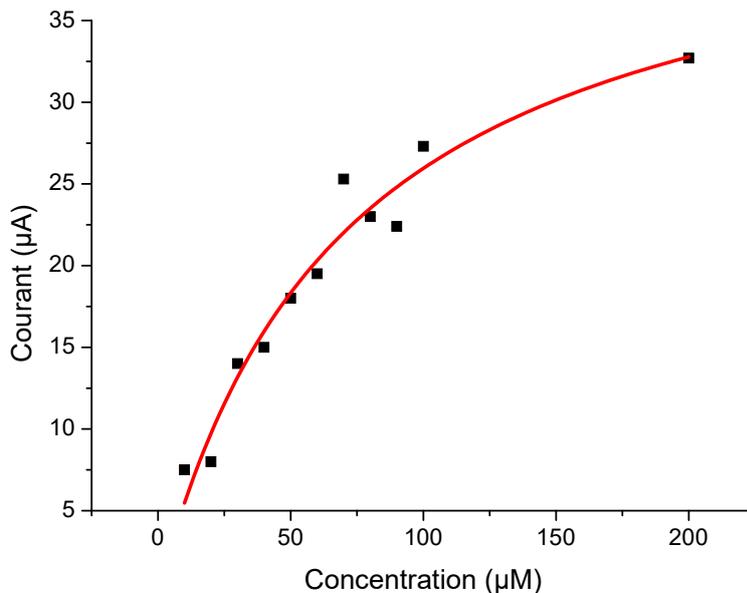


Figure 2.16: Courants stationnaires en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ introduite ; 0,38 V vs Ag/AgCl ; $P_I=60 \text{ mW.cm}^{-2}$; WT : $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$. Modélisation par une courbe de type $\frac{a.C_Q}{C_Q+b}$ avec $a=71,3$ et $b=44,5$.

Que ce soit pour la 2,6-DCBQ ou la 2,6-DMBQ, l'évolution du photocourant stationnaire en fonction de la concentration en quinone ajoutée est similaire (**Fig 2.16** et **Fig 2.17**). Aux faibles concentrations en quinones, l'évolution du courant est quasi-linéaire puis tend vers une constante à plus forte concentration. Dans les deux cas, la courbe photocourant = $f(C_Q)$ peut être modélisée par une équation de type $aC_Q/b+C_Q$, c'est-à-dire par un modèle de Michaelis-Menten. L'adéquation entre une catalyse de Michaelis-Menten et la dérivation des électrons photosynthétiques a déjà été proposée et identifiée expérimentalement dans certains cas (suspension d'algues en présence d'une électrode tournante, PSII immobilisés) [62] [63] [98]. Ces résultats sont cohérents avec le fait que le PSII catalyse la réduction des quinones et que le processus de dérivation contribue à la limitation. Pour ce qui concerne nos études, on obtient des deux modélisations respectivement des valeurs

de courant maximum de 44,5 et 14,8 μA pour la 2,6-DCBQ et la 2,6-DMBQ pour des souches de *Chlamydomonas reinhardtii* « sauvage ». Les constantes de Michaelis apparentes sont de 71,3 et 61,3 mol.L^{-1} pour respectivement la 2,6-DCBQ et la 2,6-DMBQ dans les mêmes conditions. A haute concentration en quinone, le processus de dérivation, limitant intrinsèquement, est lui-même contrôlé par le transfert électronique entre la quinone exogène et Q_A^- . Cette tendance, bien établie précédemment par des études en fluorescence (mais uniquement pour des mélanges algues-quinone sans régénération électrochimique) est donc confirmée dans des conditions de dérivation et de régénération de la forme active de l'accepteur exogène du PSII.

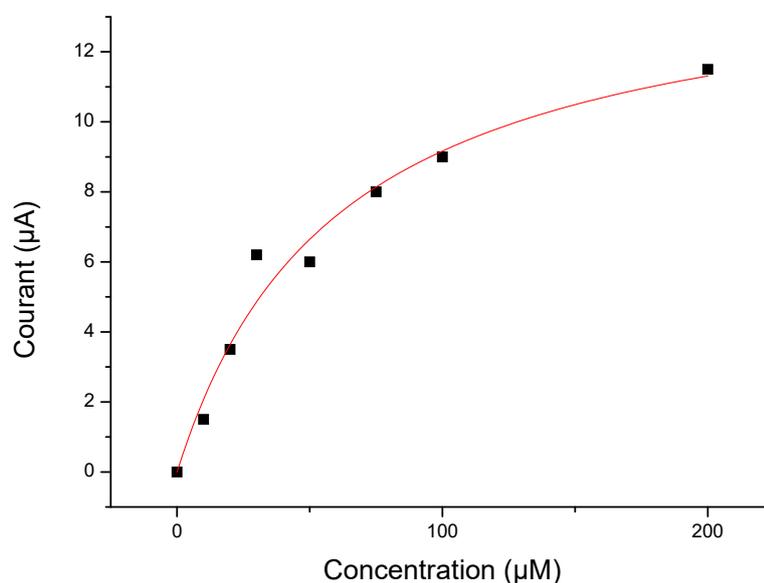


Figure 2.17: Courants stationnaires en fonction de la concentration en 2,6-DMBQ introduite. ; 0,38 V vs Ag/AgCl; $P_I=60 \text{ mW.cm}^{-2}$; WT : $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$. Modélisation par une courbe de type $\frac{a.C_Q}{C_Q+b}$ avec $a=61$ et $b=14,8$.

Comparaison entre souches « WT » et « Δf1 » - études d'autres quinones

Afin de réaliser une comparaison plus exhaustive, des chronoampérométries ont été réalisées en utilisant des quinones autres que la 2,6-DCBQ et la 2,6-DMBQ sur des souches mutées Δf1 et sauvages pour une concentration de quinone ajoutée de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Les courants obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessus et ont été normalisés par rapport au courant le plus élevé de la quinone qui donne les meilleures performances à savoir la

Quinone	$\Delta f1$ I normalisé	WT I normalisé	% de centres ouverts maximal
2,6-DCBQ	1	1	0.6
2,5-DCBQ	0.47	0.5	0,58
PPBQ	0.73	0.9	0.48
2,5-DMBQ	0.14	0.7	N.d
2,6-DMBQ	0.12	0.7	N.d
Naphto	0.02	0,02	0.1

Table 2.2: Courants obtenus sur Souche sauvage (WT) et mutée ($\Delta f1$) avec différentes quinones normalisés par rapport à la valeur du courant obtenu avec la 2,6-DCBQ.

2,6-DCBQ dans les deux cas. Notons que globalement la 2,6-DCBQ donne des résultats de même ordre de grandeur sur les deux souches avec de légèrement meilleurs résultats pour la souche sauvage (15 μA contre 20 μA). Ces performances similaires pour la meilleure quinone peuvent s'expliquer par le fait que l'on travaille dans des conditions d'illumination qui saturent la chaîne photosynthétique, rendant de ce point de vue les deux souches équivalentes en termes de performances (accumulation de charges négatives sur les sites de dérivation). Il est à noter cependant que l'on observe pour les autres quinones un effet de « nivellement » si on passe de la souche « $\Delta f1$ » à la souche « sauvage ». Autrement dit, si on considère la souche « WT », c'est-à-dire sans chaîne photosynthétique coupée, plusieurs quinones donnent l'impression «de mieux dériver».

Comparés aux résultats précédemment obtenus au laboratoire par fluorescence (estimation du pourcentage maximum de sites ouverts par interaction quinone-PSII sur mutant $\Delta f1$ (cf colonne droite du tableau 2.2), on constate que la capacité intrinsèque d'une quinone à interagir avec le PSII est globalement suivie par les photocourants mesurés sur la souche « $\Delta f1$ ». En d'autres termes, les « mauvaises » quinones produisent des photocourants assez faibles et les meilleurs accepteurs du PSII des courants plus élevés. Les écarts peuvent résulter d'une différence dans la diffusion ou la partition ⁷. Mais cela n'est pas le cas sur souche sauvage. Si un tel nivellement entre les deux souches avait déjà été observé sur le montage préparatif à toile de carbone utilisé précédemment [96], son explication ne peut donner lieu qu'à des hypothèses en absence d'études complémentaires. Cela peut

7. Ces résultats suggèrent que le courant stationnaire, même s'il est limité par la dérivation, est aussi modulé dans certains cas par la capacité des quinones à entrer/ sortir de la cellule biologique. De manière schématique, la membrane thylakoïde est à une distance moyenne de l'électrode. En régime stationnaire, le courant serait proportionnel à la concentration en quinones réduites au sein de la membrane thylakoïde et à un coefficient de diffusion apparent tenant compte de ceux au sein de l'algue et la solution.

être dû à une dérivation moins spécifique qui a lieu sur un site non prévu opératif sur la souche sauvage comme le PSI ce qui est suggéré par certaines mesures de spectroscopies aec DMBQ [96]. Par ailleurs, ce nivellement sur « WT » peut suggérer que le processus limitant est peu dépendant de la nature de la quinone, c'est-à-dire que la dérivation serait moins sensible aux propriétés électroniques des quinones. Une troisième hypothèse serait que la dérivation reste spécifique au site du PSII mais serait alors contrôlée majoritairement par le transfert de masse, c'est-à-dire l'arrivée de la quinone au PSII. Néanmoins cette hypothèse est moins accréditée car les expériences sont réalisés à lumière saturante où l'algue sauvage se comporte comme la souche mutée $\Delta f1$.

2.4.3 Essais de modélisation du système – retour à la voltamétrie cyclique

Description générale

Le système mis en jeu est extrêmement complexe, à la fois à cause de son hétérogénéité mais aussi à cause des différentes réactions (électrochimique, photochimique, chimique) qui le constituent. Toutefois, le régime électrocatalytique impliqué dans notre système peut être rapproché d'un système homogène décrit par Savéant et coll [99].

Dans ce système, la réduction d'une espèce A en C est catalysée par un médiateur de forme oxydée P et de forme réduite Q (et caractérisé par son potentiel $E_{(P/Q)}^0$). L'ensemble est décrit sous la forme d'une couche de réaction-diffusion et d'une couche de diffusion-convection. La réaction qui a lieu à l'électrode est une réduction, alors que la réaction catalytique qui a lieu au cœur de la solution consiste en une réduction biélectronique de A en C faisant intervenir deux équivalents de Q chacun donnant un seul électron (voir schéma **Fig 2.18**). Cette réaction peut avoir lieu en plusieurs étapes et faire intervenir d'autres réactifs mais s'apparente à une réaction globale avec une constante de vitesse apparente k. Ce cas de figure peut être transposé à une électrocatalyse d'oxydation.

Globalement, la forme active du catalyseur Q, produite à l'électrode, est utilisée pour transformer A et retrouve alors sa forme initiale P qui va ensuite se réduire à l'électrode polarisée à un potentiel plus haut que celui prévu pour le substrat A. Il est à noter que l'étape de réaction entre A et 2 molécules de Q peut être très complexe et se faire sous la

restreint à une fine couche de réaction-diffusion au contact de la surface de l'électrode. En utilisant la formule de Nernst au voisinage de l'électrode pour le catalyseur, on aboutit à l'expression du courant catalytique :

$$\frac{I}{F.S} = \sqrt{2kC_A^0 D_p} \cdot \frac{C_p^0}{1 + \exp\left[\frac{F}{RT}(E - E_{PQ}^0)\right]} \quad (2.3)$$

avec E le potentiel appliqué, C_p^0 la concentration totale en catalyseur, S la surface de l'électrode, F la constante de Faraday, R la constante des gaz parfaits et T la température ambiante et E_{PQ}^0 le potentiel standard du couple P/Q. Or en voltamétrie cyclique, et en régime diffusif, le courant de pic dépend directement de la vitesse de balayage ν , selon l'équation de Randles-Sevcik, en accord avec une couche de diffusion de plus en plus petite quand « ν » augmente. Cela donne pour l'expression du courant sans substrat :

$$\frac{I_p^0}{F.S} = 0.446 \cdot C_p^0 \cdot \sqrt{D_p} \cdot \sqrt{\frac{F\nu}{RT}} \quad (2.4)$$

La combinaison des équations 2.3 et 2.4 conduit à :

$$\frac{I}{I_p^0} = \frac{2,24 \sqrt{\frac{RT}{F\nu}} \cdot 2kC_A^0}{1 + \exp\left[\frac{F}{RT}(E - E_{PQ}^0)\right]} \quad (2.5)$$

Lors du régime électrocatalytique, le phénomène inverse au cas usuel se produit, à savoir une couche de diffusion qui diminue lorsque « ν » diminue en accord avec un régime catalytique qui s'établit. Ainsi le courant de pic augmente jusqu'à ne plus en dépendre et atteindre l'équivalent du régime stationnaire (**Fig 2.19**).

Dans ce cas de figure, le tracé de $\frac{i}{i_p^0}$ en fonction de $\frac{1}{\sqrt{\nu}}$ permet de remonter à la valeur de la constante cinétique k de la réaction (voir équation 2.5). Notons que ce comportement est observé sous certaines conditions (substrat en excès, cinétique de transfert d'électrons assez rapide) pour lesquelles la catalyse est assez efficace pour être observée et modélisée.

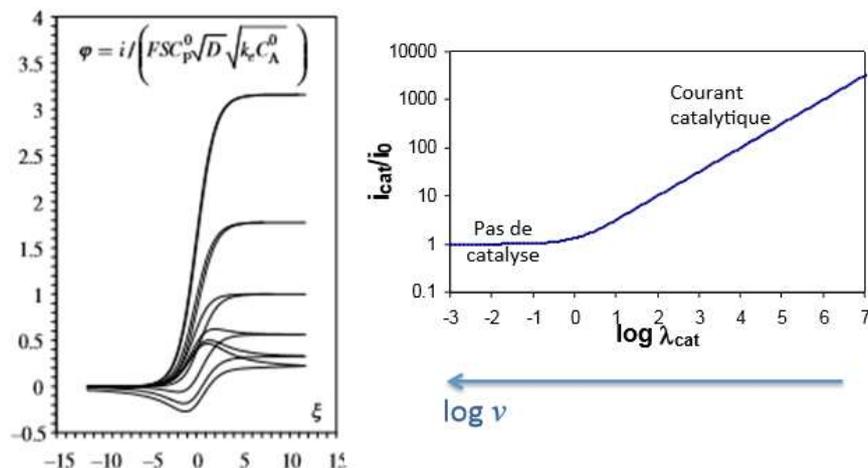


Figure 2.19: Figures montrant le principe d'extraction des grandeurs cinétiques. A gauche le courant augmente quand la vitesse de balayage diminue. A droite $\frac{i_{cat}}{i_0}$ varie linéairement avec $\log \nu$ [100].

Application au système algues-quinone

Si les deux systèmes ne présentent pas les mêmes caractéristiques en tous points, notre travail se rapproche de ce cas par le fait qu'il met en jeu un système électrocatalytique comparable (les quinones sont réduites par les algues en solution puis sont régénérées au niveau de l'électrode, décrivant des cycles de réduction/ oxydation. Cette catalyse met en jeu des couches de diffusion plus petites qu'attendues du fait de la présence d'algues au voisinage de l'électrode qui permettent de catalyser la réduction des quinones. Le tracé des voltamogrammes en fonction de la vitesse de balayage (pour des vitesses allant de 1 à 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) pour un système algues – forme réduite de la quinone (QH_2) confirme cette hypothèse, ne serait-ce que d'un point de vue qualitatif (**Fig 2.20**). L'application du formalisme défini plus haut nécessite évidemment certaines hypothèses.

Si l'on part du fait que *Chlamydomonas reinhardtii* est une sphère de rayon de 3 μm (rayon déduit du volume $125 \mu\text{m}^3$) car, et en considérant un coefficient de diffusion de la quinone de $2.10^{-9} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ dans l'eau et dans les lipides de $5.10^{-12} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [101], on peut estimer un ordre de grandeur du temps de diffusion de la quinone à travers la membrane avec la relation $t = d^2/D$ et en considérant une traversée lipidique de 100 nm, le reste

de la distance se faisant dans les compartiments aqueux. Avec ces hypothèses, on obtient un temps de traversée d'environ 6 ms dans les cellules comparé à environ 5 s dans une couche de 100 μm qui correspond à l'épaisseur de la couche de convection hydrodynamique en électrochimie. Avec ce rapport d'environ 1000, on peut donc considérer dans un premier temps que la diffusion au sein de la cellule est négligeable devant la diffusion en solution. Ces ordres de grandeur sont compatibles avec les premiers résultats obtenus en voltamétrie cyclique et qui laissaient penser que la cinétique d'entrée dans les cellules est très rapide. De ce fait, les algues peuvent être assimilées à des particules/molécules au contact desquelles a lieu la dérivation électronique. En écrivant la réaction de dérivation comme une réaction chimique du deuxième ordre avec une constante de vitesse « k », la vitesse de réduction des quinones s'écrit : $v = k[\text{PSII}][\text{Q}]$ avec $[\text{PSII}]$ la concentration en photosystème II et $[\text{Q}]$ la concentration en quinones oxydées.

Une deuxième hypothèse nécessaire pour se ramener au cas étudié précédemment consiste

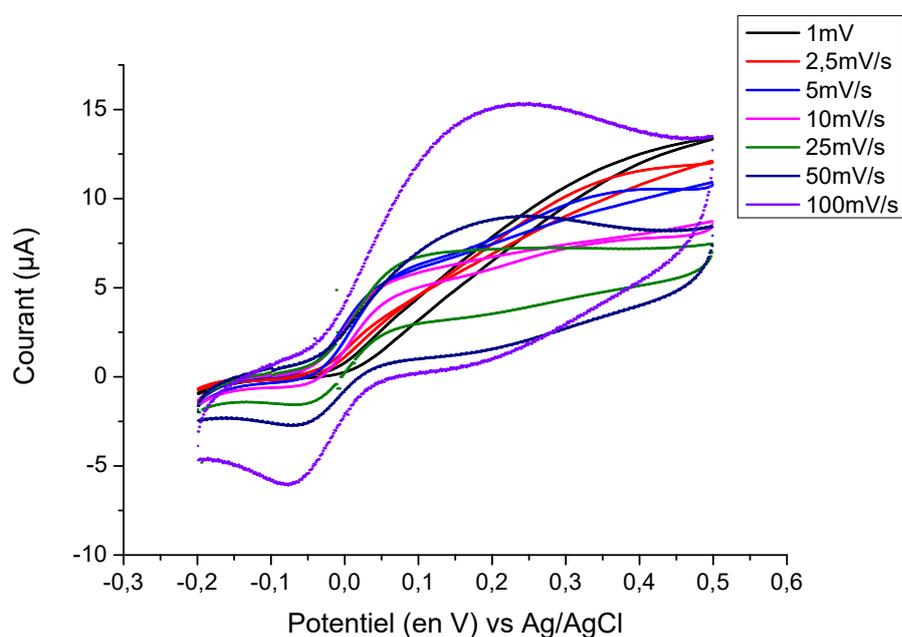


Figure 2.20: Voltamétries du système sous irradiation à différentes vitesses de balayage ; $P_I=60 \text{ mW.cm}^{-2}$; 2,5-DCHQ : $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$; WT : $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$.

à considérer un excès de substrat par rapport au catalyseur redox, ce qui revient à supposer que les photosystèmes II sont en excès par rapport aux quinones. Ceci n'est évidemment pas le cas d'un simple point de vue comptable. Toutefois, du fait de la grande vitesse

des réactions photochimiques mises en jeu, les photosystèmes « oxydés » (avec Q_A) sont rapidement régénérés pour conduire à des photosystèmes réduits (avec Q_A^-), rendant le stock des photosystèmes inépuisable. Ceci permet de supposer la concentration en PSII constante puisque PSII est formellement un catalyseur de la réduction des quinones et de poser $k' = k[\text{PSII}]$, on en déduit la vitesse $v = k'[Q]$.

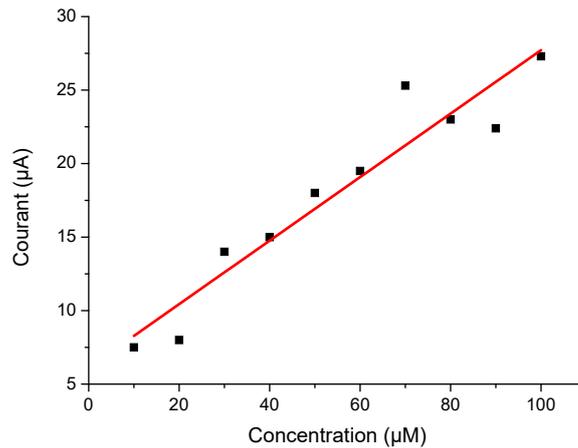


Figure 2.21: Graphes rendant compte de la linéarité du courant stationnaire en fonction de la concentration en quinones exogènes sur la gamme 0-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Modélisation de la courbe par une droite « $a.C_Q+b$ » ; $a=0,2$; $b=0,6$.

La mise en regard du modèle et de notre système peut se faire à travers différents traitements de données. En premier lieu, le courant stationnaire semble dépendre linéairement de la concentration en quinones comme montré par la (Fig 2.21) et prédit par l'équation 2.3. Partant de là, deux graphes sont tracés : le premier permet de rendre compte du début de la catalyse. Le second permet d'extraire les grandeurs cinétiques comme réalisé dans les travaux de J.M. Savéant et coll (Fig 2.22). Le courant considéré est celui obtenu à 0,5 V pour chaque vitesse de balayage quand la valeur du courant stationnaire correspond à celle obtenue en chronoampérométrie.

La valeur de k obtenue est de $0,24 \text{ s}^{-1}$ ce qui donne un temps de demi-vie pour une réaction du pseudo-premier ordre égale à $\ln(2)/k$ soit donc environ 3 s. Ainsi au bout de 10 s, 90% des quinones seraient réduites ce qui est à nouveau en accord avec les estimations précédentes issues de la voltamétrie cyclique. On peut aussi remonter à l'épaisseur de la couche de diffusion-réaction ce qui donne une valeur de 91 μm . L'essentiel du processus mis en jeu dans notre système aurait donc lieu dans un volume équivalent de solution

d'environ 23 μL soit à peu près 5% du volume total.

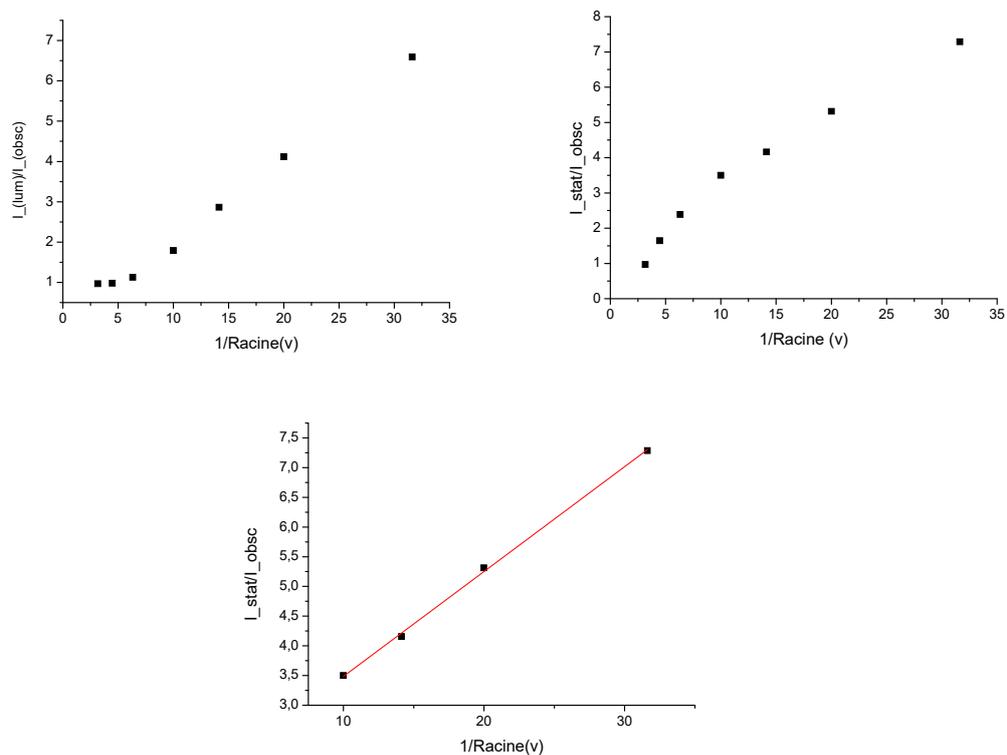


Figure 2.22: Graphes montrant l'extraction des grandeurs cinétiques. En haut à gauche tracé du rapport de I sous lumière et de I sous obscurité à différentes vitesses de balayage en fonction de $1/\sqrt{\nu}$. En haut à droite tracé du rapport de I stationnaire (valeur de I tirée de la chronoampérométrie) et de I obscurité à différentes vitesses de balayage en fonction de $1/\sqrt{\nu}$. En bas même graphe qu'en haut à droite mais zoomé sur la droite affine

Il est intéressant de calculer le courant théorique attendu dans la couche de réaction dans le cadre du dispositif actuel et de le comparer aux résultats expérimentaux. Si l'on estime à la vitesse de la réaction au point caractéristique μ (épaisseur de la couche de réaction) l'intensité de courant que l'on peut obtenir on a $I = 2.vitesse*V*F$, avec V le volume au sein du dispositif concerné par la dérivation. De plus, connaissant la concentration d'algues en solution de 2.10^7 algues/mL avec 4.10^6 PSII/algue, on a alors 8.10^{13} PSII/mL. En considérant alors un volume effectivement sondé de $23 \mu\text{L}$ et une vitesse d'électrons de $150 e^-/s$, on obtient un courant d'environ $35 \mu\text{A}$ ce qui est du même ordre de grandeur des $25 \mu\text{A}$ obtenus au cours des expériences. Ceci conforte l'adéquation de ce modèle et confirme que le volume restant au-delà de $23 \mu\text{L}$ sert de réservoir d'algues.

Enfin, on peut s'intéresser au nombre d'électrons prélevés de la chaîne photosynthétique lors de la dérivation dans la couche de réaction. Les calculs donnent en appliquant la relation $I=2.vitesse*V*F$ et en considérant un courant expérimental de $25 \mu\text{A}$, $110 e^-/s$ prélevés par PSII. Comparé à la vitesse d'électrons dans la chaîne de l'ordre de $150 e^-/PSII$ ⁸ on montre que la dérivation opérée par la 2,6-DCBQ (73%) est efficace. Ceci est également en accord avec la capacité de la 2,6-DCBQ à court-circuiter la chaîne photosynthétique relatée dans la littérature⁹

Les limites du modèle

Il est bien évident que les traitements de données évoqués plus haut n'ont pas prétention à décrire le système avec une parfaite exactitude mais donnent quelques grandeurs quantitatives approchées. La constance de la concentration en PSII n'est pas due à leur large excès par rapport aux quinones mais à leur rôle de catalyseur de la réduction des quinones, c'est-à-dire que la régénération des PSII oxydés est extrêmement rapide alors qu'il s'agit d'un processus probablement limitant. Ainsi, à un moment quelconque, il y a

8. On a supposé que l'interaction de la 2,6-DCBQ avec la chaîne photosynthétique n'induit ni augmentation ni diminution de la vitesse de la photosynthèse.

9. On peut chercher par ailleurs à estimer la valeur de courant maximal que l'on pourrait obtenir dans nos conditions. On considère alors le volume total du dispositif et non le volume concerné par la récupération électronique et on obtient alors environ $700 \mu\text{A}$. Ceci correspond au courant maximal théorique obtenu au cas où la récupération électronique était maximale sur le dispositif de $500 \mu\text{L}$ que nous utilisons en laboratoire (soit $1,4 \text{ mA/mL}$ d'algue). Ce résultat théorique est limité par la vitesse de dérivation qui reste de fait le processus limitant. Rappelons que la valeur obtenue n'est pas réaliste car la dérivation dans le cadre du dispositif actuel est limitée à une fine couche de réaction au voisinage de l'électrode.

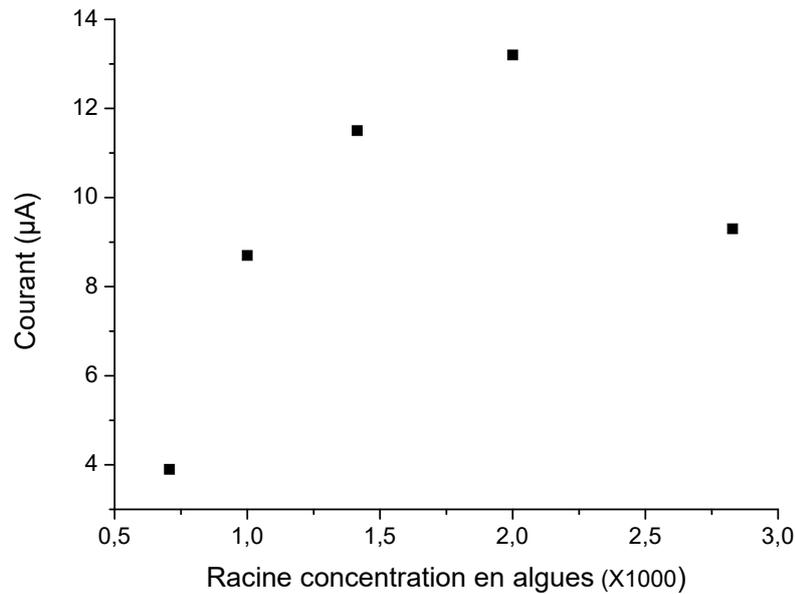


Figure 2.23: Tracé du courant stationnaire en fonction de la racine carrée de la concentration en PSII

une probabilité non négligeable pour que le site de dérivation soit occupé par une quinone. Ce cas de figure est donc différent du cas où les quinones verraient une infinité de PSII. D'autre part, aucun phénomène de partition entre la solution aqueuse et les différents compartiments cellulaires ou de mobilité des algues dotées de flagelles en solution ne sont pris en compte.

Enfin le tracé de la courbe du courant en régime stationnaire en fonction de la racine carrée de la concentration en algues ne croît pas linéairement comme prévu (**Fig 2.23**). Cela illustre la complexité de ce système vivant qui peut être affecté par les phénomènes de partition des quinones qui dépendent fortement des rapports PSII/quinone comme déjà dit et sur les temps longs par des phénomènes supplémentaires comme l'agrégation et l'anaérobiose.

2.4.4 Stabilité du système dans le temps

Comme cela a été mentionné lors de la description d'un chronoampérogramme représentatif, le régime stationnaire ne perdure pas et est suivi d'une chute progressive du

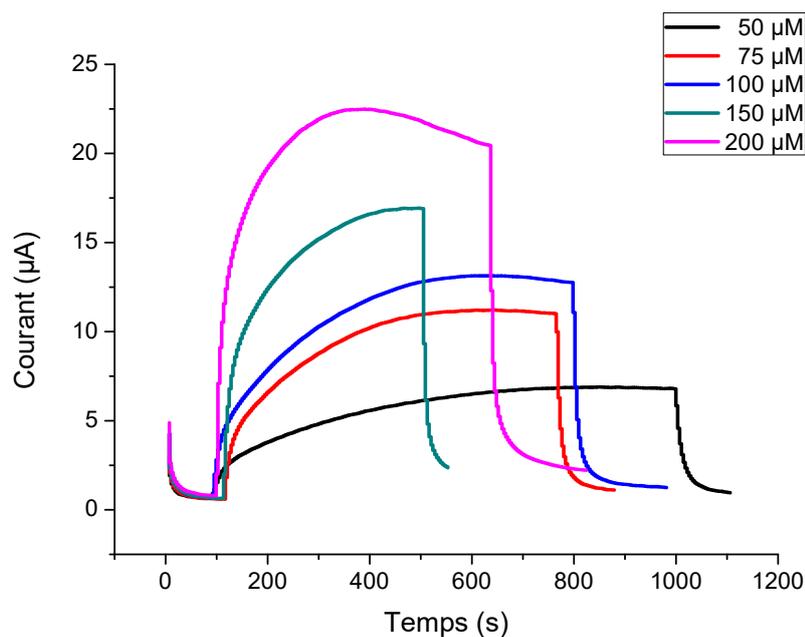


Figure 2.24: Epuisement du système en fonction des valeurs de photocourants stationnaires atteints pour la 2,6-DCBQ; 0,38 V vs Ag/AgCl; $\Delta f1 : 2.10^7$ cellules.mL⁻¹; $P_I = 20$ mW.cm⁻².

courant. C'est à cet épuisement que nous allons maintenant nous intéresser. La stabilité du système a été ainsi étudiée pour des concentrations en quinones exogènes différentes (**Fig 2.24**). La dérivation est d'autant plus stable que la valeur de photocourant atteinte est petite, c'est-à-dire que la concentration en quinones ajoutées est faible. Ceci laisse à penser que le système subit un empoisonnement progressif au cours de la dérivation. A priori, deux sources d'empoisonnement peuvent être privilégiées : un phénomène de photoinhibition ou une toxicité due à la quinone elle-même. Si la dépendance de la chute du courant avec la concentration en quinones suggère la seconde explication, la question de la photoinhibition sera d'abord étudiée au moyen de cycles jour/nuit.

Etude de la photoinhibition à travers des cycles jour/nuit

L'effet d'une lumière continue saturante va être comparé à des cycles jour/nuit alternés de quelques centaines de seconde chacun sous la même lumière.

Cas de la 2,6-dichlorobenzoquinone

Sur souches mutées, en présence de 2,6-DCBQ, lumière continue et cycles alternés donnent

des résultats très similaires même si de meilleures performances sont maintenues lors des cycles alternés (**Fig 2.25**). En réalité, sous cette lumière relativement faible, le soulagement de la chaîne a lieu d'une manière globalement efficace.

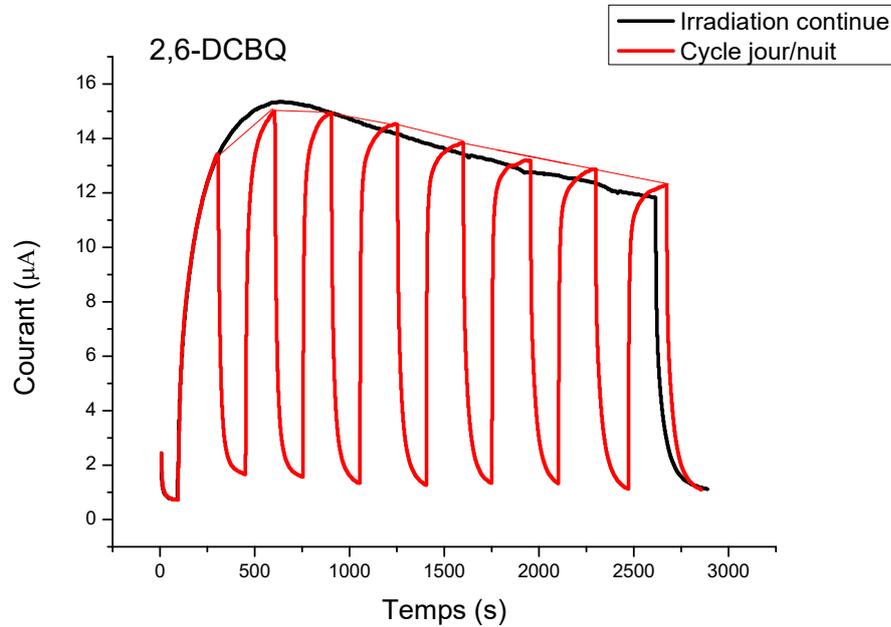


Figure 2.25: Cycles alternés jour/nuit; 0,38 V vs Ag/AgCl; 2,6-DCBQ :100 µM; $P_I=20\text{mW.cm}^{-2}$; $\Delta f1 :2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$. Courbe orange qui relie les maximums de courant lors de la période jour des cycles afin de comparer avec la courbe sous lumière continue.

Toutefois, sur souches sauvages, la décroissance du courant est nettement plus marquée sous lumière continue (**Fig 2.26**). Cela peut provenir de la photoinhibition et impliquerait que, sur souches sauvages, les quinones ne soulagent pas la chaîne photosynthétique du système comme prévu du fait de la présence de plusieurs sites de dérivation (voir l'étude sur le nivellement des performances des quinones ; paragraphe 2.4.2).

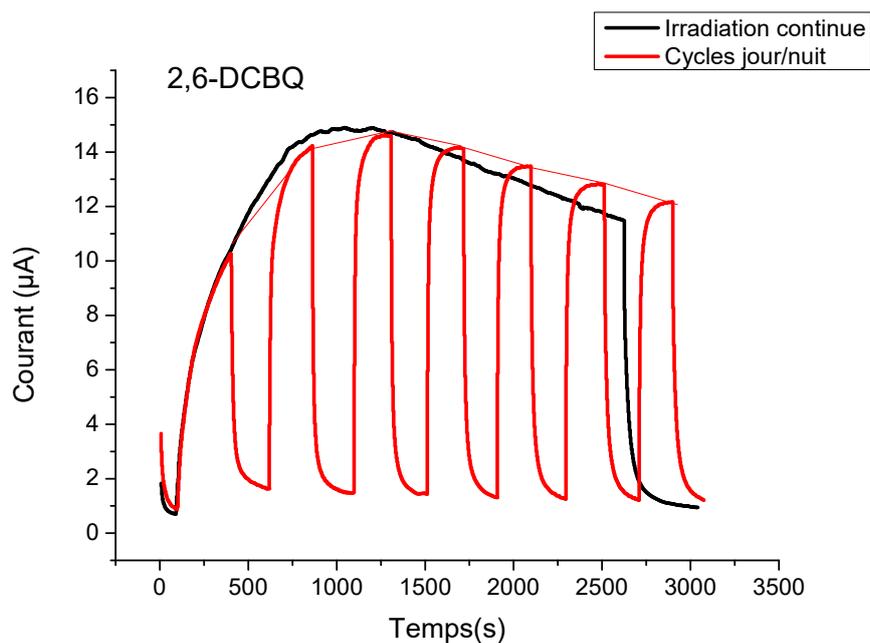


Figure 2.26: Cycles alternés jour/nuit ; 0,38 V vs Ag/AgCl ; 2,6-DCBQ :100 μM ; $P_I=20$ $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$; WT : $2\cdot 10^7$ cellules. mL^{-1} . La courbe orange relie les maximums de courant atteints lors de la période jour des cycles afin de comparer avec la courbe sous lumière continue.

Cas de la 2,6-diméthylbenzoquinone

Sur souches sauvages et en présence de 2,6-DMBQ (**Fig 2.27**), on constate qu'en lumière continue, le photocourant reste stationnaire dans les conditions de l'étude. Si on opère des cycles jour/nuit alternés, après le premier cycle, les courants diffèrent sensiblement et sont plus élevés sous cycles de lumière. En réalité, la dérivation opérée par la 2,6-DMBQ n'est pas spécifique du site de soulagement (voir l'étude sur le nivellement des performances des quinones paragraphe ; 2.4.2). Ces études suggèrent donc également la présence de photoinhibition lors de la dérivation. Au bilan, dans les différents cas de figure (2,6-DCBQ et 2,6-DMBQ), les courants obtenus sur des cycles sont plus stables dans le temps, ce qui est cohérent avec de la présence de photoinhibition en rapport avec une dérivation plus ou moins efficace. Ceci n'exclut toutefois pas la question de la toxicité des quinones. En effet, lorsque le régime stationnaire s'établit, seul le voisinage de l'électrode est concerné. Dans ce contexte, les algues localisées dans cette zone sont alors soumises à des concentrations locales en quinones très élevées et ce d'autant plus que le système n'est pas sous convection forcée. Inversement, en période de nuit, les quinones régénérées

à l'électrode ont le temps de diffuser au sein de la solution, diminuant les concentrations en quinone au voisinage de l'électrode. Notons toutefois qu'aux plus longues périodes de temps les comportements cycles et irradiation continue semblent se rejoindre, ce qui montre que si la photoinhibition existe, elle laisse alors la place à un autre phénomène indépendant des conditions de dérivation. Il est donc nécessaire, pour mieux appréhender d'autres explications à cette chute de courant aux temps longs, d'étudier la stabilité du système biologique en présence de quinones en dehors des conditions de dérivation, autrement dit sous obscurité.

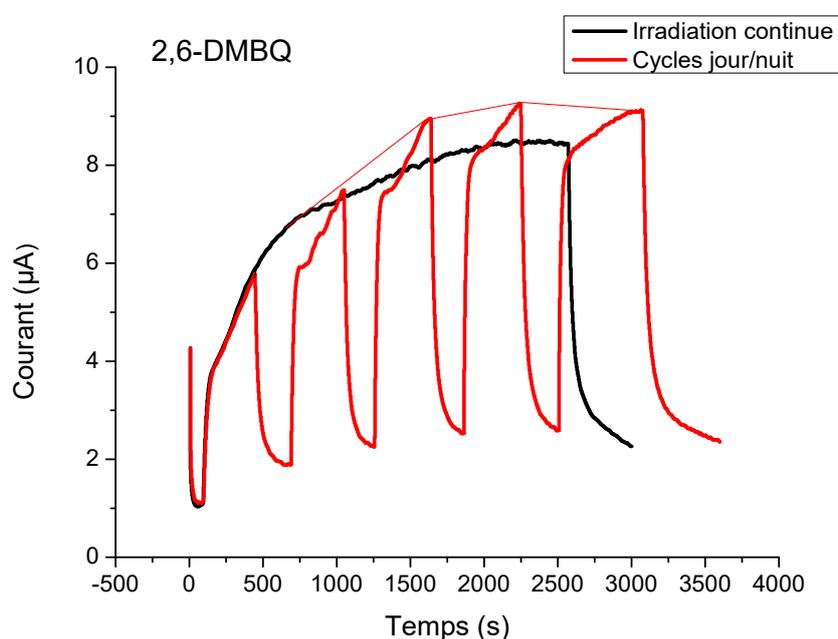


Figure 2.27: Cycles alternés jour/nuit ; 0,38 V vs Ag/AgCl ; 2,6-DMBQ :100 µM ; $P_I=60$ mW.cm⁻² ; WT : 2.10^7 cellules.mL⁻¹. Courbe orange qui relie les maximums de courant lors de la période jour des cycles afin de comparer avec la courbe sous lumière continue.

2.4.5 Mise en évidence de la toxicité lors de l'incubation des algues par les quinones sous obscurité

Dans ce contexte, les algues ont été incubées avec des quinones sous obscurité et les chronoampérométries déclenchées après différentes durées d'incubation (**Fig 2.28**). Les courbes de courant montrent, que hormis dans les conditions habituelles -aucune incubation- où le courant augmente progressivement en 800 secondes, la pré-incubation

conduit à des courants qui peuvent être plus élevés au début mais chutent très rapidement. Ces résultats sont en accord avec une préconcentration des quinones et une production de QH₂ disponibles pour être immédiatement oxydées à la surface de l'électrode mais surtout une dégradation des performances liée à un empoisonnement opéré par la toxicité des quinones.

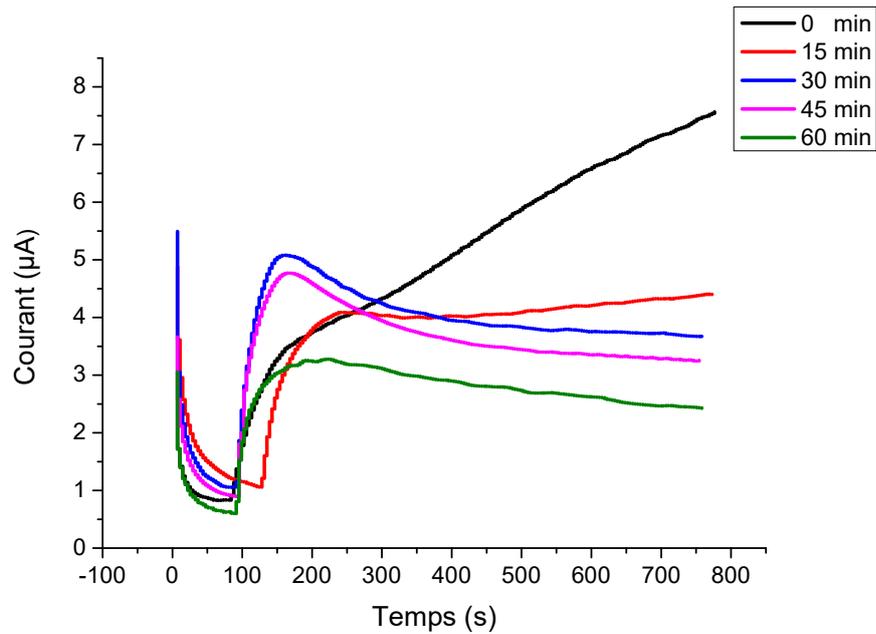


Figure 2.28: Chronoampérogrammes obtenus après des périodes d'incubation différentes; 0,38V vs Ag/AgCl; 2,6-DCBQ :100 µM; $P_I = 60 \text{ mW.cm}^{-2}$; WT : $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$. Irradiation à partir de 90 s pour toutes les quinones sauf pour celle après 15 min d'incubation qui est irradiée à 130 s pour donner le temps au courant capacitif de s'estomper.

2.4.6 Autres facteurs de baisse du courant

Au-delà de la question de la toxicité des quinones, la baisse de la dérivation pourrait être également attribuée à la dégradation progressive des quinones au cours du temps. Pour le vérifier, une dernière expérience a été réalisée, à savoir ajouter aux cellules maintenues sous agitation pendant une heure avec la 2,6-DCBQ (à 100 μM) un volume de 2,6-DCBQ supplémentaire de sorte que la concentration finale soit de 200 μM (**Fig 2.29**). On constate alors que la valeur du photocourant obtenu, non seulement n'est pas celle qui est observée si on travaille initialement à 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de quinone mais reste inférieure à celle obtenue avant ajout. Ce résultat milite à nouveau en faveur d'une toxicité induite par les quinones car l'hypothèse d'une baisse du courant uniquement due à une dégradation de la quinone impliquerait l'obtention d'un courant égal à celui obtenu pour une concentration de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ sans incubation. L'essentiel de la chute de courant semble donc être dû à une toxicité induite par les quinones a priori indépendante de la lumière. A ce stade de l'étude, d'autres expériences vont être nécessaires (niveau de la chaîne photosynthétique auquel a lieu cet empoisonnement, mécanismes mis en jeu) et seront décrites dans le chapitre suivant puisqu'elles vont déterminer le choix de la quinone la plus adaptée.

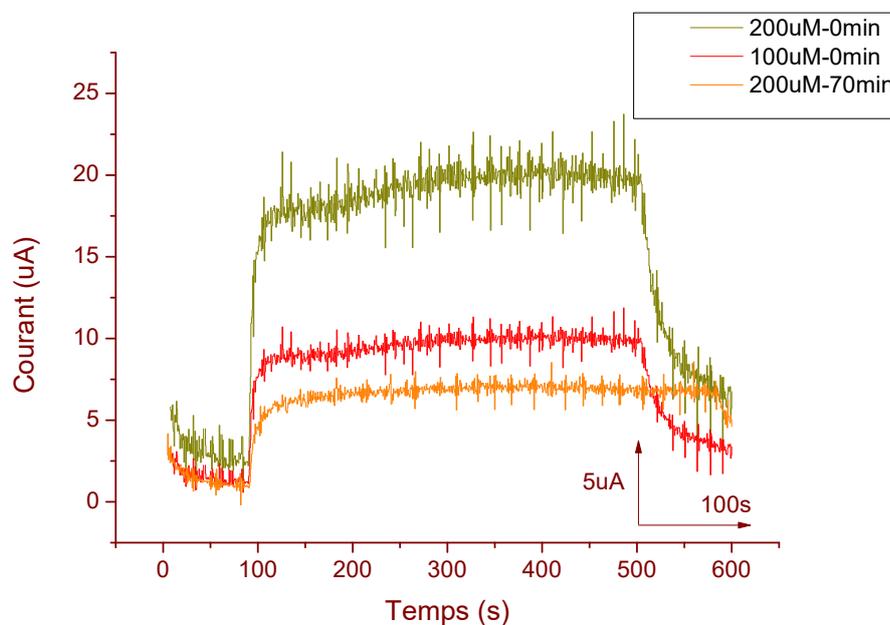


Figure 2.29: Mise en évidence de la dégradation des performances des algues sur ITO. 0,72 V vs Ag/AgCl; Δf_1 : $2 \cdot 10^7$ cellules/mL ; 400 μL ; 2,6-DCBQ : 100 μM ou 200 μM ; $P_I = 226 \text{ mW.cm}^{-2}$.

2.4.7 Courants sous obscurité

Dans le cadre de ces études, nous avons travaillé en milieu minimum, ce qui impose à l'organisme photosynthétique de synthétiser son propre carbone réduit. Néanmoins, en présence de carbone réduit sous forme tris-acétate, *Chlamydomonas reinhardtii*, est susceptible de métaboliser ce dernier.

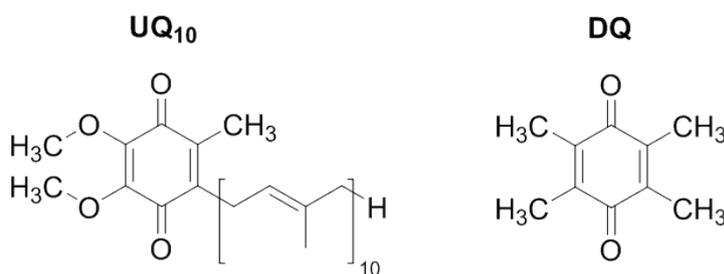
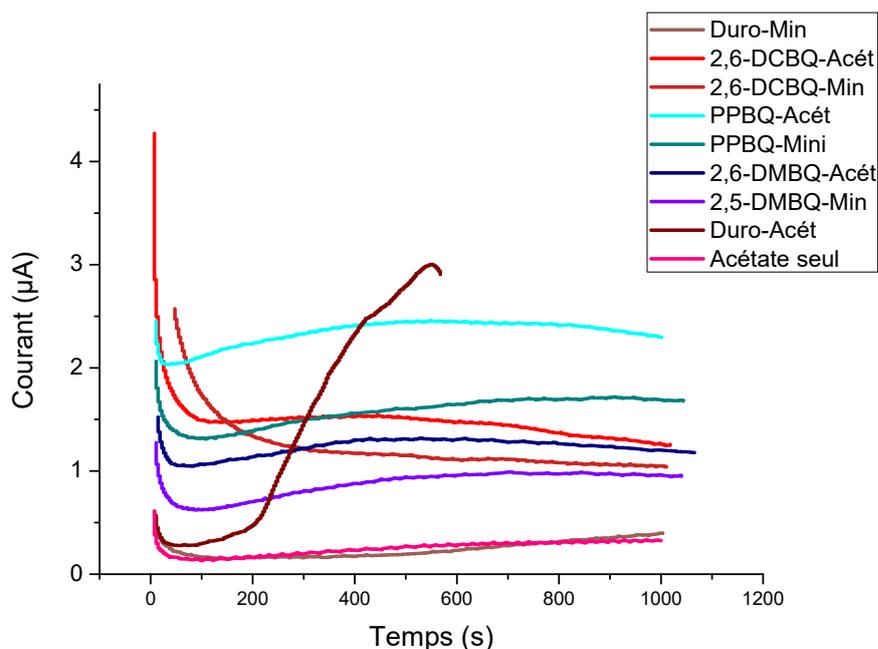


Figure 2.31: Structures chimiques de l'ubiquinone et de la duroquinone.

Nous avons donc réalisé différentes chronoampérométries sous obscurité et en milieu riche en acétate (**Fig 2.30**). Par comparaison entre milieux sans et avec acétate, on voit que des courants notables sous obscurité sont obtenus pour différentes quinones en

présence d'acétate. Néanmoins, c'est pour la duroquinone que le courant paraît le plus important. En effet la duroquinone (ou la tétraméthylbenzoquinone) a une structure qui se rapproche le plus de l'ubiquinone et pourrait à ce titre interagir préférentiellement avec la chaîne respiratoire (**Fig 2.31**).

2.4.8 Valorisations du dispositif

La question du soulagement de la chaîne photosynthétique

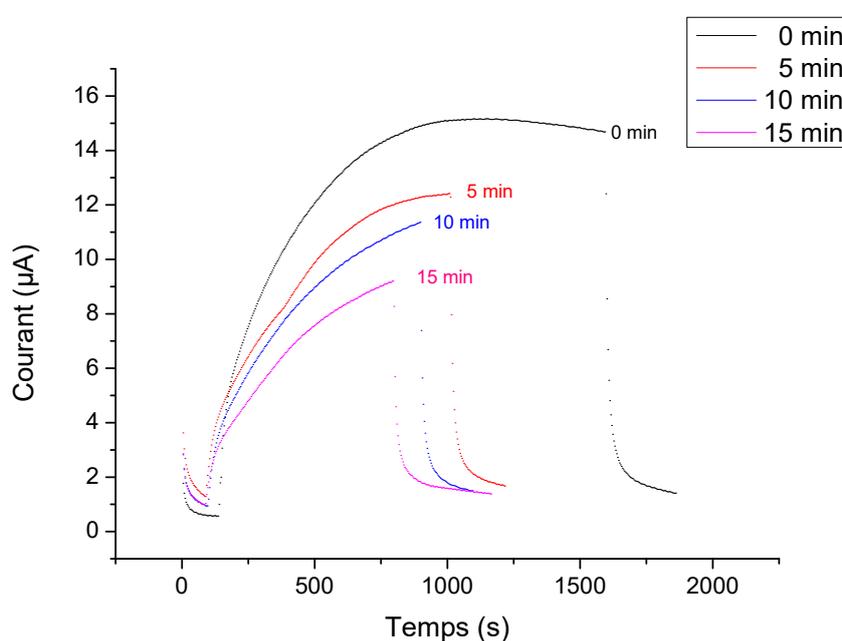


Figure 2.32: Soulagement de la chaîne photosynthétique 0,38 V vs Ag/AgCl; 2,6-DCBQ :100 μM ; $P_I=90 \text{ mW.cm}^{-2}$; $\Delta f1 : 2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$.

Un des principaux objectifs de ce travail est de dériver les électrons en soulageant la chaîne photosynthétique, autrement dit, de dériver les électrons dans des conditions de forte lumière en évitant/retardant la photoinhibition autant que possible. Nous pouvons nous demander, au-delà de l'étude présentée plus haut et de la problématique de l'empoisonnement, si cet objectif peut être atteint, ne serait-ce que partiellement, en conditions de dérivation. Pour cela, nous chercherons tout d'abord à mettre en évidence le phénomène de la photoinhibition, puis, nous verrons ce qu'il en est en présence de benzoquinones exogènes lors d'expériences de chronoampérométrie. D'une part, dans le but d'atteindre les conditions de photoinhibition sur des temps courts, des expériences ont été réalisées

sur des souches mutées de type $\Delta f1$ qui se photoinhibent rapidement car elles sont incapables de réaliser la photosynthèse. D'autre part, la 2,6-DCBQ a été utilisée comme médiateur, ayant été identifiée comme la plus efficace dans nos conditions et qui dérive les électrons en amont de l'étape cinétiquement déterminante du transfert électronique. Les expériences de chronoampérométrie réalisées après des périodes d'exposition croissantes à la lumière révèlent que les performances du système baissent avec le temps d'exposition ce qui suggère que la photoinhibition a bien pris place (**Fig 2.32**). Toutefois, si le système est mis en présence de quinones dès le début de l'illumination, on observe un comportement dans le temps stable avec des performances bien supérieures à celles présentées par les algues non incubées après des périodes d'exposition à la lumière égales, ce qui montre que le traitement en quinones a un effet préventif sur la photoinhibition.

Le reroutage des électrons de la photosynthèse

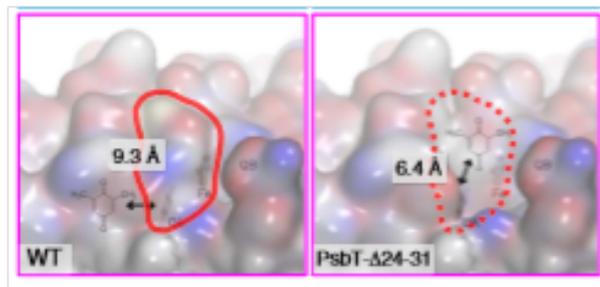


Figure 2.33: Schéma montrant la modification de l'environnement du site Q_A réalisée par mutagenèse pour permettre un accès plus aisé de la quinone exogène au site de dérivation. [96].

Au-delà de sa capacité à permettre une analyse poussée de la dérivation sur suspension d'algues, le dispositif élaboré lors de ce travail a pu montrer son intérêt dans le cadre d'une autre stratégie complémentaire à celle décrite au laboratoire. En effet, l'idée de réaliser la dérivation électronique en amont de l'étape cinétiquement limitante de la chaîne, au niveau du site Q_A a conduit le groupe de Francis-André Wollman à l'IBPC à mettre en place une stratégie de mutagenèse sur l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* [96]. Ces mutations visent à rendre l'accès au site de dérivation Q_A plus aisé en ouvrant un accès supplémentaire, sans toutefois compromettre l'activité photosynthétique de l'algue, d'autant plus qu'il s'agit à l'état sauvage d'un site impropre pour la dérivation des quinones exogènes.

L'idée est donc d'utiliser une « mauvaise » quinone, c'est-à-dire dérivant peu les électrons au niveau de Q_B , en l'occurrence la 2,6-DMBQ. Si des mesures de fluorescence sur le mélange algues-2,6-DMBQ sous illumination ont mis en évidence un taux de photoréduction de la 2,6-DMBQ plus élevé au sein de certains de ces mutants et permis de sélectionner le meilleur candidat, il reste toutefois nécessaire de montrer que dans les conditions de chronoampérométrie, cette dérivation supplémentaire est effective. A ce titre, le dispositif préparatif à toile de carbone ne permet pas d'effectuer un nombre suffisant d'expériences de contrôle indispensables, tout en s'affranchissant de la variabilité cellulaire.

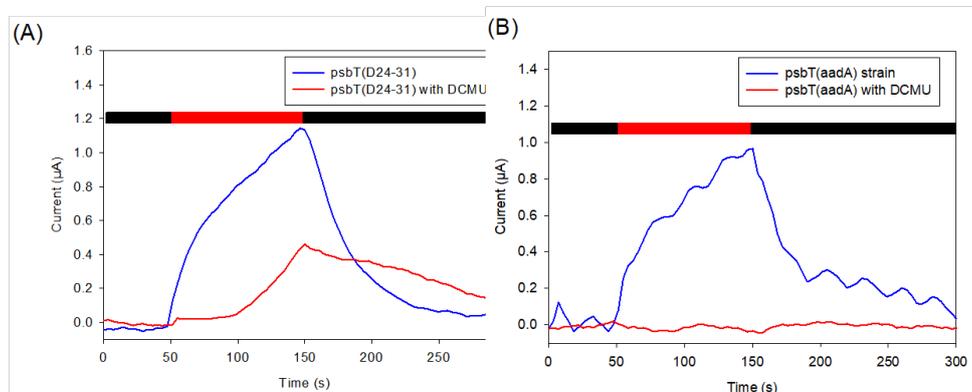


Figure 2.34: Mise en évidence du reroutage des électrons [96]. A gauche courant en absence et présence de DCMU sur souche mutée. A droite courant en absence et présence de DCMU sur souche sauvage.

Pour cela, le dispositif décrit dans le cadre de ce travail a été utilisé. Les photocourants ont été mesurés sur les souches sauvages et mutées en présence et absence de DCMU, un inhibiteur spécifique du site Q_B et empêchant de ce fait l'accès de tout médiateur exogène au site Q_B , ce qui permet de montrer une éventuelle voie alternative de dérivation. Comme le montre la figure 2.34, la présence de DCMU annule complètement le photocourant sur souche sauvage, en accord avec un accès bloqué du médiateur au site de dérivation. Inversement, dans le cas du mutant où un accès secondaire à Q_A a été ouvert, la présence de DCMU n'annule pas totalement l'intensité du photocourant, ce qui prouve l'existence et la fonctionnalité de ce reroutage. Des travaux complémentaires de mutagenèse sont en cours et visent à augmenter la durée de vie de l'électron au sein du site Q_A pour permettre un reroutage des électrons encore plus efficace.

2.5 Conclusion

Nous avons pu élaborer, dans cette première partie, un dispositif permettant de réaliser la dérivation électronique sur des cultures d'algues en réduisant considérablement le temps de réponse et la durée de l'expérience. L'utilisation de ce dernier a permis de mettre en place une série d'études systématiques afin d'évaluer la stratégie de dérivation par les quinones développée au laboratoire. Le soulagement de la chaîne photosynthétique opéré par les quinones a pu en particulier être mis en évidence sous forte lumière sur souches mutées. Toutefois, les séries d'études menées ont permis de mettre en évidence une dérivation fortement dépendante de la nature de la quinone. A ce titre, de nombreux paramètres expérimentaux ont été étudiés et leur exploitation suggère que l'étape clé du processus électrocatalytique est l'interaction entre la quinone et le PSII. Ce processus est modulé par la capacité de partition de la quinone et par la spécificité de la dérivation opérée. Si l'étape de dérivation peut conditionner le choix de la quinone en termes de valeur de photocourant, la question de la stabilité du système dans le temps est au moins aussi importante. Ainsi, l'incidence de l'incubation en quinones sous obscurité suggère un effet toxique des quinones. Enfin, des approximations supposées dans le cadre de modèles, ont permis de remonter à des grandeurs caractéristiques de la dérivation dont la vitesse atteinte lors des expériences conduites pour permettre *in fine* d'estimer le courant théorique attendu.

Si l'électrochimie permet de sonder le flux de quinones réduites qui sort de la chaîne photosynthétique et arrivent à la surface de l'électrode polarisée, d'autres techniques vont être nécessaires pour appréhender le phénomène d'empoisonnement. Ce sera l'objet du prochain chapitre où la technique de fluorescence sera mise à profit pour étudier les interactions entre la chaîne photosynthétique et les quinones dans la membrane thylakoïde. Cela permettra de mieux comprendre l'origine de leur toxicité et les limitations qu'induisent les quinones.

Chapitre 3

Etude des interactions
quinones-algues par spectroscopies
de fluorescence et d'absorption

3.1 Généralités

Les mesures de fluorescence constituent une méthode d'analyse de choix pour suivre l'état de la photosynthèse et le niveau de stress dans les algues et les plantes et est aujourd'hui largement répandue dans les études physiologiques et écophysiological conduites dans le monde de la photosynthèse [102].

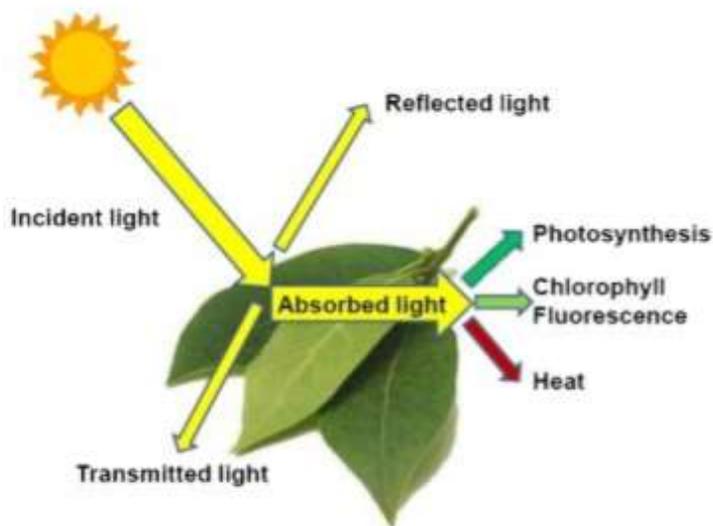


Figure 3.1: Schéma illustrant les différentes voies de désexcitation de la chlorophylle excitée [103].

En effet, une fois la lumière absorbée par les antennes collectrices et l'énergie d'excitation transférée aux centres réactionnels, la fluorescence constitue une voie de désexcitation alternative de la chlorophylle excitée qui entre en compétition avec la photosynthèse. Toutefois si à température ambiante la plus grande partie de la fluorescence est émise par la chlorophylle a du photosystème II, le rendement de fluorescence maximal lorsque tous les centres sont fermés (lorsque les réactions de séparation de charge sont momentanément bloquées) ne dépasse pas les 3% [104]. En effet, une troisième voie possible de désexcitation de la chlorophylle plus importante est l'émission de chaleur. Cependant, il est généralement admis que la variation de l'émission de la chaleur sur la durée de l'expérience est nulle ce qui fait de la fluorescence un observable particulièrement adapté pour

suivre l'état de la photosynthèse [105].

La fluorescence émise F dépend de nombreux facteurs. Elle est notamment proportionnelle au flux de lumière absorbée (I_a), à la fraction de lumière absorbée par le PSII (D_{PSII}) et enfin au rendement de fluorescence (Φ_F). Ce dernier représente la compétition entre toutes les voies de désexcitation par rapport à la fluorescence et s'écrit comme le quotient de la constante de vitesse de fluorescence, k_F , sur la somme des constantes de vitesse de toutes les réactions entrant en compétition et qui induisent un retour de la chlorophylle excitée à l'état fondamental. Il est à noter que la vitesse de la désexcitation par la photosynthèse dépend de la proportion de centres ouverts $[Q_A]$ en mesure d'accepter les électrons puisque la réaction photochimique est très rapidement limitée par la capacité des sites Q_A à recevoir des électrons. Dans ce contexte, la vitesse de cette voie s'écrit $k_P \cdot [Q_A]$ avec k_P la constante de vitesse correspondante. Cela donne lieu à l'expression du rendement de fluorescence (équ 3.1)

$$\phi_F = \frac{F}{I_a \cdot D_{PSII}} = \frac{k_F}{k_F + k_H + k_P [Q_A]} \quad (3.1)$$

avec F l'intensité de fluorescence émise, I_a , l'intensité de lumière absorbée, D_{PSII} la fraction de la lumière absorbée qui atteint le PSII et k_H la constante de vitesse de désexcitation par voie thermique .

Dans le cadre de nos études, on définit donc par analogie le rendement quantique de la photochimie du PSII noté ϕ_{PSII} :

$$\phi_{PSII} = \frac{k_P \cdot [Q_A]}{k_F + k_H + k_P [Q_A]} \quad (3.2)$$

3.2 Les paramètres de fluorescence et les séquences de mesure

3.2.1 Les grandeurs de fluorescence

Le contrôle des conditions d'illuminations de l'organisme ou de l'unité photosynthétique (feuille, algues...) permet d'avoir accès à des informations ciblées sur l'état de la

photosynthèse. Nous allons donc définir progressivement différentes grandeurs liées à la voie de désexcitation par fluorescence pour aboutir au paramètre qui sera privilégié dans nos études : **le rendement quantique du PSII**.

Quand le système photosynthétique d'étude est maintenu à l'obscurité pendant un certain temps, tous les Q_A sont oxydés et les centres réactionnels PSII sont dits ouverts, autrement dit à leur capacité maximale de réaliser la photosynthèse. La fluorescence sous obscurité est notée F_0 et correspond à la probabilité minimale de désexcitation par fluorescence. Dans ce cas de figure $[Q_A]=1$ et le rendement de fluorescence s'écrit d'après l'équation 3.1 selon :

$$\phi_{F_0} = \frac{k_F}{k_F + k_H + k_P} \quad (3.3)$$

L'échantillon peut être à l'opposé exposé pendant une courte période de temps à un pulse saturant de plusieurs milliers de $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ capable d'entraver momentanément sa capacité à réaliser la photosynthèse et tous les Q_A se trouvent alors entièrement réduits et les centres PSII dits fermés. C'est dans ce cas de figure que la photosynthèse est impossible et la fluorescence maximale F_M observée. Avec $[Q_A]=0$ (ici $[Q_A]$ désigne la proportion de molécules Q_A qui sont oxydées), le rendement de fluorescence s'écrit d'après l'équation 3.1 selon :

$$\phi_{F_M} = \frac{k_F}{k_F + k_H} \quad (3.4)$$

Dans les cas où l'illumination est conduite dans des conditions non saturantes dites actiniques, le rendement de fluorescence est compris entre Φ_{F_0} et Φ_{F_M} . Ces différents cas de figure sont illustrés figure 3.2

3.2.2 Rendement quantique maximal du PSII

La dépendance des mesures de fluorescence de la lumière incidente et absorbée conduit à définir des grandeurs normalisées. L'un des paramètres les plus informatifs est le rendement quantique de la photochimie du PSII. D'après l'équation 3.2, le rendement quantique maximal du PSII (c'est-à-dire quand tous les centres Q_A sont oxydés soit ($[Q_A]=1$) est

donné par la relation

$$\phi_{PSII_{max}} = \frac{k_P}{k_F + k_H + k_P} \quad (3.5)$$

$\Phi_{PSII_{max}}$ se définit également à partir des rendements de fluorescence minimal et maximal selon :

$$\frac{\phi_{F_M} - \phi_{F_0}}{\phi_{F_M}}$$

Or en supposant que l'intensité de lumière absorbée I_a et la fraction de lumière absorbée atteignant le PSII restent constantes, on déduit que :

$$\frac{\phi_{F_M} - \phi_{F_0}}{\phi_{F_M}} = \frac{F_M - F_0}{F_M} = \phi_{PSII_{max}} = \frac{F_v}{F_M}$$

En conséquence, le suivi de l'émission de la fluorescence constitue un moyen relativement simple pour calculer le rendement quantique maximal du système photosynthétique étudié. Néanmoins dans ce modèle, la fluorescence à F_0 et F_M est supposée implicitement être émise par des systèmes homogènes pour lesquels les états excités de la chlorophylle sont exactement les mêmes ce qui n'est généralement pas le cas [106]. Il s'ensuit que $\frac{F_v}{F_M}$ ne doit en aucun cas être considéré comme une valeur quantitative rigoureuse pour estimer le rendement quantique de la photochimie. En revanche, il s'agit d'un paramètre clé pour regarder l'historique de l'échantillon et établir s'il a subi un niveau de stress important [104].

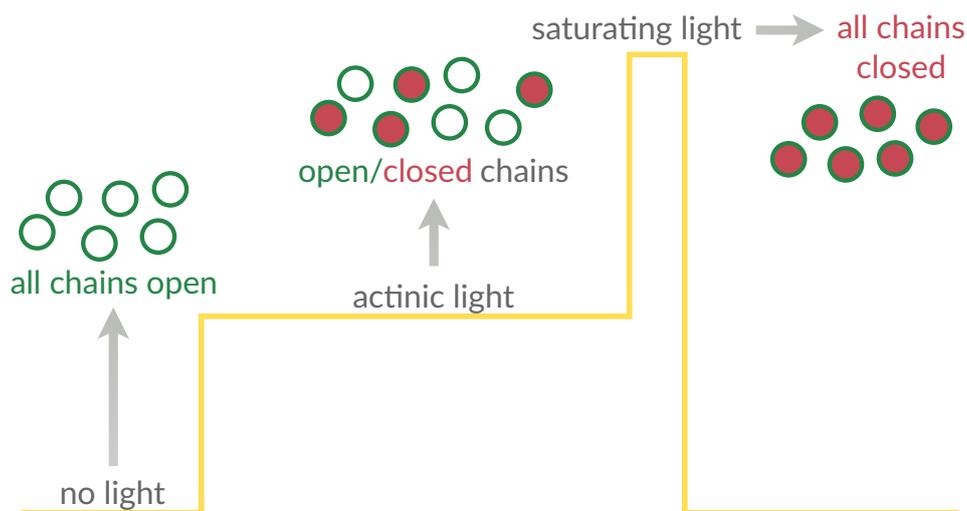


Figure 3.2: Schéma illustrant les différents cas de figure pour les centres [Q_A] dits ouverts/fermés.

3.2.3 Proportion de centres ouverts

Il s'agit d'un autre paramètre couramment employé et complémentaire du précédent décrit plus haut. Pour remonter au rendement quantique du PSII sous illumination non saturante, il est nécessaire de connaître l'état redox de Q_A autrement dit la proportion de centres réactionnels PSII ouverts et capables de réaliser la photosynthèse. Ce terme, nommé aussi quenching photochimique, est donné par la relation suivante : [107]

$$q_p = \frac{F_M - F_{stat}}{F_M - F_0} \quad (3.6)$$

Où F_{stat} est le niveau de fluorescence correspondant à une illumination non saturante ($F_0 < F_{stat} < F_M$). On remarque bien que q_p tend vers 1 sous obscurité et vers 0 si l'illumination est saturante. Le produit de ce terme par le rendement photosynthétique maximal F_v/F_M permet donc de remonter au rendement photosynthétique Φ_{PSII} (équ 3.7). Néanmoins ce paramètre a été défini dans le cadre d'un modèle simple dit « puddle » lors duquel les antennes collectrices sont supposées ne pas communiquer entre elles ce qui est loin de la réalité et nécessite donc d'être manié avec précaution.

$$\phi_{PSII} = q_p \cdot \frac{F_v}{F_M} = \frac{F_M - F_{stat}}{F_M - F_0} \cdot \frac{F_M - F_0}{F_M} = \frac{F_M - F_{stat}}{F_M} \quad (3.7)$$

3.2.4 Rendement quantique du PSII

Le produit du quenching non photochimique par le rendement photosynthétique maximal F_v / F_M permet de remonter au rendement quantique du PSII Φ_{PSII} (équ 3.7). Il s'agit sans doute du paramètre le plus utilisé et qui donne une idée précise de l'état de la photosynthèse au cours de l'étude car il a été établi indépendamment du modèle de communication entre les antennes collectrices choisi. Ce terme mesure au bilan la proportion de lumière absorbée par la chlorophylle associée au PSII qui est utilisée pour la photochimie dans des conditions d'illumination actinique continue. Il peut ainsi donner une idée directe de la vitesse de transfert d'électrons le long de la chaîne photosynthétique et de la photosynthèse en général. Une corrélation directe entre le taux de fixation de CO_2 et ce paramètre a en effet été mise en évidence dans la littérature [108]. Toutefois sous certaines conditions de stress, cette linéarité peut ne plus s'appliquer notamment avec le

changement de vitesse de photorespiration ou la mise en place d'un transport d'électrons cyclique [109].

L'accès aux valeurs de Φ_{PSII} nécessite la mesure des intensités de fluorescence émises sous illumination actinique et sous illumination saturante par l'organisme photosynthétique excité. C'est dans cet objectif que le Joliot Type Spectrometer (JTS) mis à disposition par l'Institut de Biologie-Physico-Chimique a été utilisé dans le cadre de ces travaux de thèse pour tenter de mieux comprendre l'interaction entre les quinones et la chaîne photosynthétique.

3.3 Le JTS ou Joliot Type spectrometer

Le JTS mis à disposition permet de réaliser des mesures de fluorescence sur des suspensions liquides ou des feuilles entières. Deux sources de lumière peuvent être utilisées dans ce but : une source de lumière continue choisie de sorte à être répartie d'une manière homogène sur tout l'échantillon et une source de lumière destinée à la saturation. Le suivi de la fluorescence se fait avec des pulses de détection courts. Ces pulses de durée de 4 μ s sont émis par des diodes lumineuses polychromatiques filtrées par des filtres interférentiels afin de sélectionner les longueurs d'onde d'intérêt (546 nm). L'appareil permet au bilan de réaliser les mesures de rendements de fluorescence photoinduits, de quenching non photochimique, de cinétiques de relaxation de fluorescence induites par flash. Ce même appareil permet également le suivi des variations d'absorbance. Les diodes lumineuses mises à disposition couvrent des densités spectrales des changements spectraux des caroténoïdes des bandes α des cytochromes et des régions Q_x des chlorophylles.

3.3.1 Les séquences utilisées et le principe de détection du JTS

Les mesures des intensités de fluorescence émises par un échantillon au sortir de l'obscurité, sous lumière continue et sous pulses saturants sont réalisées selon des séquences programmables sur ordinateur relié au JTS. Dans la plupart des cas, l'échantillon est maintenu sous obscurité pendant un temps court (environ 2 minutes) puis une lumière actinique d'intensité moyenne (de 25 à 700 μ E.m⁻².s⁻¹), permettant à la photosynthèse de se mettre en route est appliquée pendant 1 à 2 secondes, suivie de l'application d'un pulse

saturant court (200 ms), le tout pour une durée totale de séquence de quelques secondes. Pour permettre une détection efficace de la fluorescence et non biaisée, les lumières actiniques saturantes sont ponctuellement arrêtées et des pulses de détections courts d'une dizaine de μs et d'intensités assez faibles pour ne pas perturber l'état de la chaîne photosynthétique sont émis dans le but de sonder l'état de la chaîne photosynthétique mise en route par la lumière actinique.

3.3.2 L'induction de fluorescence chez *Chlamydomonas reinhardtii*

Les courbes d'induction de fluorescence réalisées sur souche sauvage de l'algue donnent l'allure générale de la **Figure 3.3**. Au départ une fluorescence minimale (F_0) sous obscurité est émise (tous les centres PSII sont disponibles pour la photosynthèse, v.paragraphe précédents) puis au fur et à mesure que la lumière actinique est déclenchée et maintenue, la fluorescence augmente et se stabilise donnant lieu à une fluorescence stationnaire F_{stat} où la proportion de centres ouverts est inférieure à 1. Enfin, le flash saturant est déclenché et la proportion de centres ouverts devient nulle, la fluorescence est alors maximale et notée F_M . Un retour à l'obscurité permet enfin à la fluorescence de retrouver la ligne de base de départ (**Fig 3.3**).

Il est à noter qu'avant d'atteindre la fluorescence stationnaire, deux phénomènes en rapport avec la physiologie de l'algue se mettent en place. Le premier est observé vers 100 ms et est cohérent avec la réduction du pool de plastoquinones et une augmentation de la fluorescence. Le deuxième processus est observé vers 500 ms. La diminution de fluorescence observée dans ce cas de figure est souvent attribuée à la mise en route de la chaîne de transfert vers le PSI et à la mise en place du cycle de Calvin. Toutefois, le démarrage de ce cycle nécessite plusieurs minutes. Aujourd'hui, cette hypothèse a fait place à une autre selon laquelle les protéines Flavodiiron sont capables de capter une partie importante du flux électronique en se réduisant. Mais cette hypothèse reste encore à confirmer. A partir de l'exemple donné en **Figure 3.3**, les mesures de F_0 , F_{stat} et F_M permettent de déduire une valeur de $\Phi_{PSII_{max}}$ de 0,79, une proportion de centres ouverts qP de 0,73 et

un rendement quantique Φ_{PSII} d'environ 0,58 à l'intensité considéré de lumière incidente.

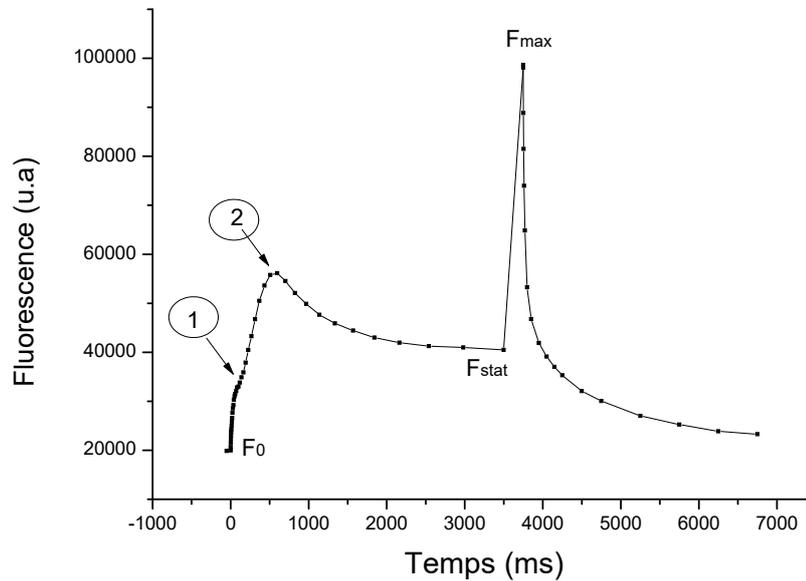


Figure 3.3: Courbe d'induction de fluorescence obtenue pour les souches Wild Type; $I=135 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; $2\cdot 10^7$ cellules/mL.

3.4 Le suivi du Φ_{PSII} des algues incubées avec les quinones sous obscurité

Pour comprendre la diminution de la performance des algues incubées avec les quinones lors des chronoampérométries (cf. chapitre précédent) et plus particulièrement sous obscurité, un suivi spectroscopique de l'état de la chaîne photosynthétique en présence de quinones a été réalisé. Pour ce faire, des algues sont incubées avec des quinones à une concentration de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sous obscurité, pendant une période d'une centaine de secondes. Différentes structures ont été considérées (**Fig 3.4**).

En appliquant la séquence présentée plus haut (lumière continue – pulse saturant) à différents temps d'incubation, on peut suivre le rendement Φ_{PSII} en fonction du temps (**Fig 3.5**). Ce dernier diminue sensiblement au cours du temps, ce qui révèle une diminution de la capacité des algues à réaliser efficacement une séparation de charge. Seule la

duroquinone, entièrement substituée, ne manifeste pas ce comportement et présente un Φ_{PSII} constant.

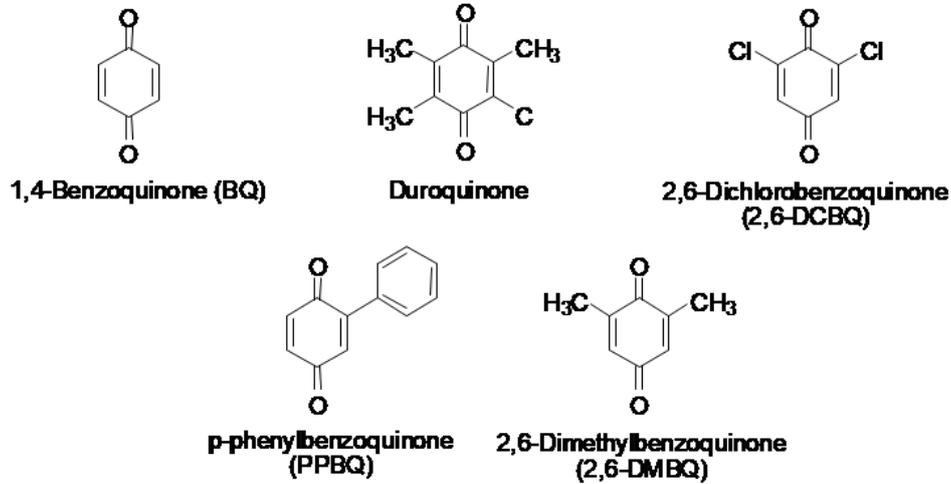


Figure 3.4: Formules des quinones utilisées

Une autre information intéressante qui peut être extraite des courbes de fluorescence est ce qu'on appelle le quenching non photochimique (NPQ pour Non Photochemical Quenching). En effet, l'ajout de quinones diminue le niveau de fluorescence maximale, les quinones étant des quenchers naturels de la fluorescence. Le NPQ se calcule d'après la formule

$$NPQ = \frac{F_M - F'_M}{F'_M} \quad (3.8)$$

avec F_M la fluorescence maximale pour l'échantillon non incubé et F'_M celle pour l'échantillon incubé avec les quinones. Ce paramètre donne une mesure de l'extinction de fluorescence due à l'interaction directe avec les quinones sans passer par la chaîne photosynthétique¹. En effet, en présence de quinones, le rendement de fluorescence Φ_F devient

$$\phi_F = \frac{k_F}{K_F + k_H + k_P[Q_A] + k_Q[Q]_{exo}} \quad (3.9)$$

avec k_F la constante de vitesse de désexcitation par fluorescence, k_H par voie thermique, k_P par la photosynthèse et k_Q par le quenching et $[Q_A]$ et $[Q]_{exo}$ sont respectivement la proportion de centres ouverts et la concentration en quinones exogènes.

1. Lors de ce quenching l'énergie est récupérée par les quinones directement depuis les antennes collectrices via des pièges d'énergie et n'a pas le temps d'atteindre le Photosystème II.

L'expression du NPQ en fonction des constantes cinétiques donne :

$$NPQ = \frac{k_Q \cdot [Q_{ex}]}{k_F + k_H} \quad (3.10)$$

ce qui montre que ce paramètre est bien proportionnel à la concentration en quinones exogènes en accord avec la loi de Stern-Volmer.

La **figure 3.6** nous montre l'évolution du NPQ au cours de l'incubation par différentes quinones. On remarque que le NPQ a tendance à augmenter avec le temps d'incubation encore une fois à l'exception de la duroquinone et la 2,6-DCBQ (qui exhibe très rapidement un quenching important).

Une corrélation semble apparaître entre la diminution du rendement photosynthétique du PSII Φ_{PSII} et le quenching non photochimique : en quenchant de plus en plus les excitons des antennes collectrices et donc formellement les états excités de la chlorophylle, les quinones diminuent la quantité de séparations de charges qui peuvent avoir lieu. La proportion de photons absorbés qui mène à un évènement chimique diminue en conséquence.

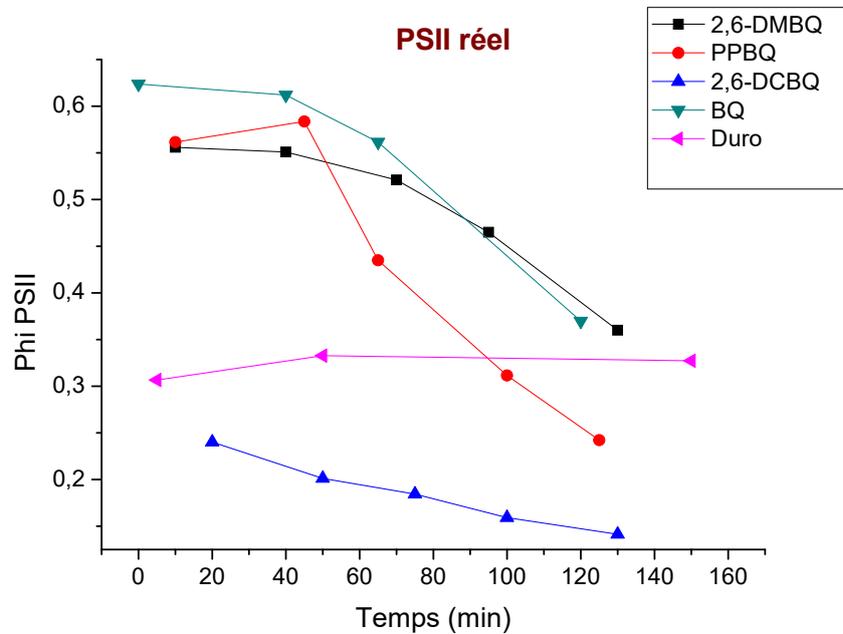


Figure 3.5: Evolution en fonction du temps d'incubation du Φ_{PSII} d'échantillons d'algues incubés à l'obscurité avec des quinones sous forme oxydée. $[Q]=100 \mu\text{M}$; $[\text{WT}] : 2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$; $I=150 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

La figure 3.6 établit que la fluorescence maximale suite au pulse saturant diminue globalement avec le temps. Il convient de préciser que deux types de quenching semblent présents : un quenching instantané qu'exhibe chaque quinone (sa capacité à quencher la fluorescence de la chlorophylle) et qui devrait être indépendant du temps et un quenching dit cinétique qui peut contribuer à un empoisonnement (dû à une accessibilité accrue de la quinone au site de dérivation ou à la dénaturation d'une protéine et la production d'autres quenchers). A ce stade, il apparaît que seule la duroquinone n'a pas d'effet cinétique sur le Φ_{PSII} aux concentrations sondées.

Enfin, les formes réduites des quinones (QH_2) ont ensuite été testées. Φ_{PSII} reste globalement constant (**Fig 3.7**), ce qui implique que les formes réduites ne sont pas toxiques aux concentrations testées. Si ce résultat rend compte de la dégradation des performances des algues dans le dispositif électrochimique (cf. chapitre précédent), sa rationalisation reste délicate car le rendement quantique du PSII en présence de quinones dépend notamment de la fluorescence maximale atteinte au pulse saturant, laquelle est liée à plusieurs phénomènes : capacité de la quinone à réduire les accepteurs du PSII, capacité de la quinone à quencher la fluorescence chlorophyllienne et mise en évidence d'un quenching cinétique. Dans ce contexte, nous avons cherché à mettre en évidence une autre corrélation entre la proportion de centres ouverts exacte et le quenching non photochimique.

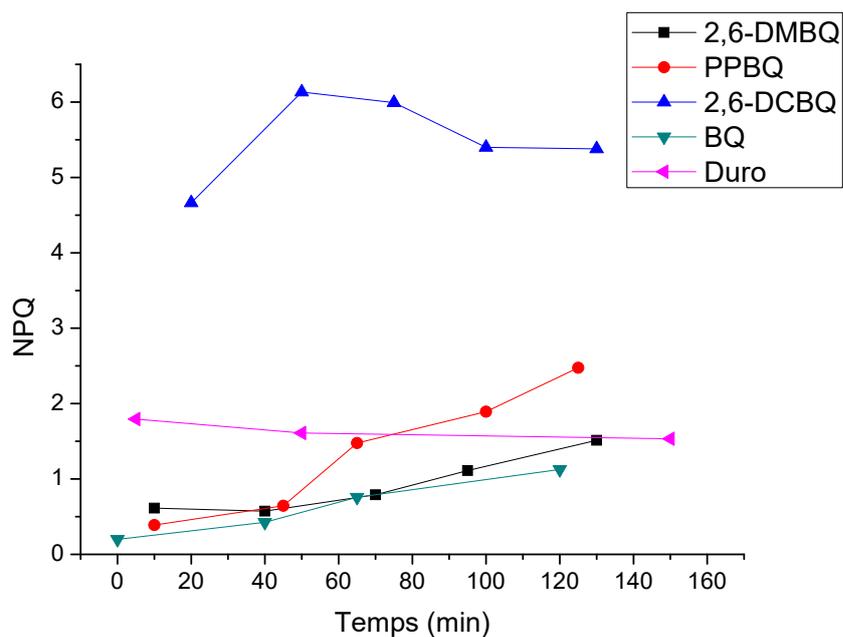


Figure 3.6: Evolution en fonction du temps du NPQ d'échantillons d'algues incubés à l'obscurité avec des quinones de forme oxydée. Mêmes conditions expérimentales que figure 3.5

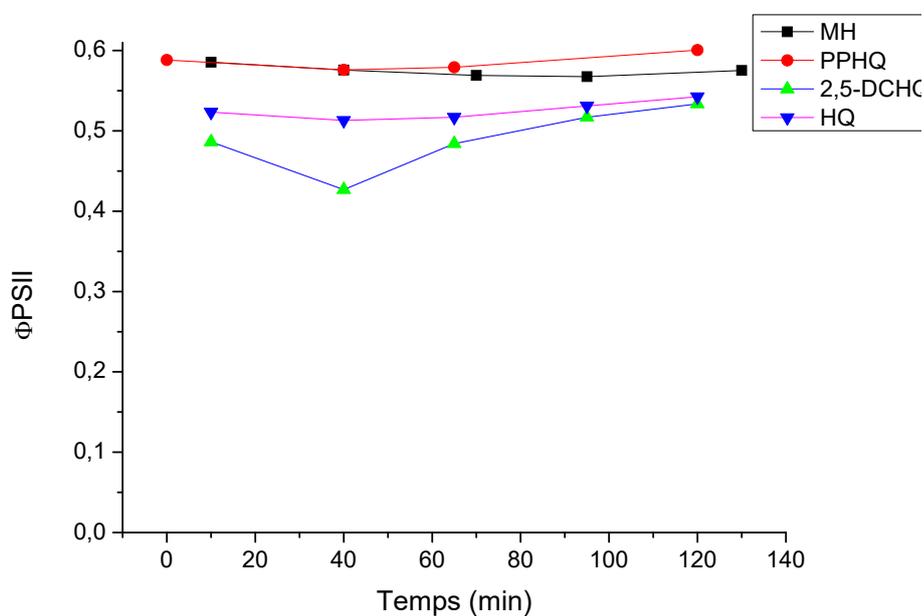


Figure 3.7: Evolution en fonction du temps d'incubation du Φ_{PSII} des quinones de forme réduite. Mêmes conditions que figures 3.5 et 3.6. MH : Methylhydroquinone.

3.4.1 Suivi de la proportion de centres ouverts en fonction du quenching

Afin d'étudier l'évolution de la proportion de centres ouverts en fonction du quenching, nous allons procéder en plusieurs étapes en exprimant les différents rendements de fluorescence en présence de quinones.

Pour cela nous définissons une constante de quenching notée k_3 et $[Q]_{exo}$ la concentration en quinones exogènes.

Expression du Φ_{PSII} en présence de quinones

En absence de quinones le rendement de la fluorescence s'écrit :

$$\phi'_F = \frac{k_F}{k_F + k_H + k_P[Q_A]}$$

$$\phi'_{Fstat} = \frac{k_F}{k_F + k_H + k_P[Q_A]_{stat}}$$

$$\phi'_{FM} = \frac{k_F}{k_F + k_H}$$

En présence de quinones les différents rendements de fluorescence deviennent :

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_H + k_P[Q_A] + k_3[Q]_{exo}}$$

$$\phi_{Fstat} = \frac{k_F}{k_f + k_H + k_P[Q_A]_{stat} + k_3[Q]_{exo}}$$

$$\phi_{FM} = \frac{k_F}{k_F + k_H + k_3[Q]_{exo}}$$

3.4.2 Le suivi de $[Q_A]$

L'application de la loi de Stern-Volmer au quenching non photochimique donne :

$$NPQ = \frac{F_{M_{[Q]=0}} - F_{M_Q}}{F_{M_Q}} = \frac{F_{F_M} - \phi_{F_M}}{\phi_{F_M}} = \frac{k_3[Q]_{exo}}{k_F + k_H}$$

Or

$$\frac{F_{M_{Q=0}} - F_{stat_Q}}{F_{stat_Q}} = \frac{k_3[Q]_{exo} + k_P[Q_A]}{k_f + k_H} = NPQ + \frac{k_P[Q_A]}{k_F + k_H}$$

$$\frac{F_{M_{Q=0}} - F_{stat_Q}}{F_{stat_Q}} - NPQ = \frac{k_P[Q_A]}{k_F + k_H}$$

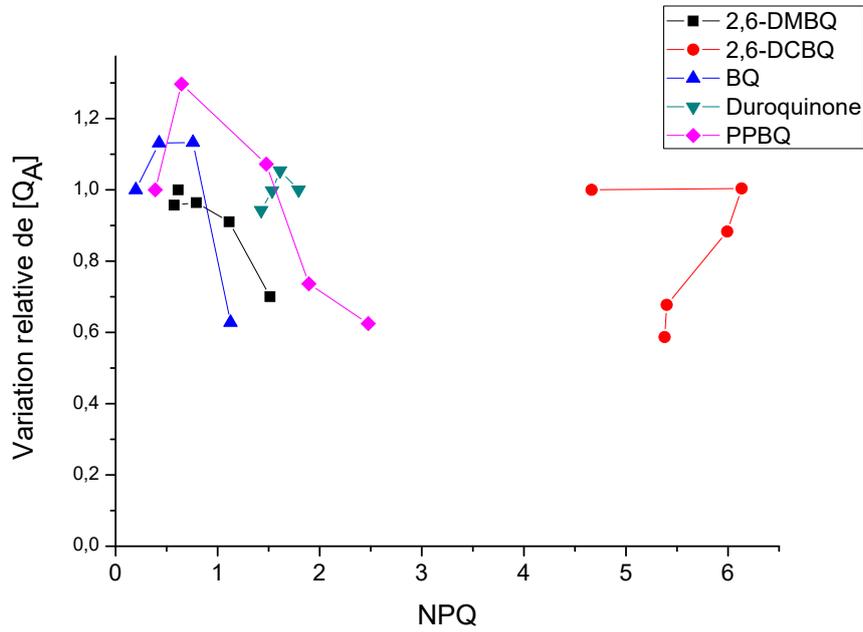


Figure 3.8: Variation du $[Q_A]$ relatif en fonction du quenching NPQ. La valeur de Q_A a été normalisée à 1 pour la première mesure ; 100 μM de quinones ; 2.10^7 cellules/mL.

Les mesures de fluorescence à différents temps d'incubation permettent donc d'établir un paramètre proportionnel au pourcentage de centres ouverts². On peut donc mesurer les changements relatifs des centres ouverts oxydés $[Q_A]$ en fonction de NPQ. Pour cela il suffit de tracer

$$\frac{F_{M_{Q=0}} - F_{stat_Q}}{F_{stat_Q}} - NPQ$$

2. Le paramètre qP défini au début de ce chapitre et calculable à partir des grandeurs caractéristiques de fluorescence rend compte de la proportion de centres ouverts. Néanmoins son utilisation n'est pas toujours pertinente car son expression est déduite du modèle simplifié «puddle» de la répartition des antennes collectrices qui ne transfèrent pas les excitons entre elles et s'écarte de la réalité, ce qui justifie le recours à cette méthode.

en fonction de NPQ (ou du temps) (**Fig 3.8**). Aux temps courts (faible NPQ) les variations sont en accord avec les résultats attendus puisque la proportion de centres ouverts augmente avec le quenching. En effet le quenching contribue à rendre les centres Q_A plus oxydés en diminuant le nombre d'électrons qui traversent la chaîne photosynthétique. Néanmoins cette tendance s'inverse aux plus fortes valeurs de NPQ correspondant à des temps d'incubation plus longs, ce qui montre qu'une toxicité est bien entrée en jeu. Là encore, la quinone la moins toxique apparaîtrait être la duroquinone pour laquelle les changements relatifs de centres oxydés restent faibles. Notons que l'évolution dans le cas de la 2,6-DCBQ semble compromise par un quenching d'emblée très fort, néanmoins en comparant avec la **Figure 3.6**, on voit bien qu'avec le temps d'incubation, le $[Q_A]$ relatif diminue fortement, ce qui est cohérent avec la toxicité observée avec les autres quinones.

3.4.3 Correction du quenching dans l'expression du rendement quantique du PSII

Comme cela a été noté plus haut, la baisse du rendement quantique du PSII, si elle caractérise bien un effet d'empoisonnement des quinones appuyé par la présence d'un quenching cinétique, ne permet pas de savoir si ce quenching est seul en cause. C'est pour cela que nous proposons de corriger le Φ_{PSII} pour soustraire l'effet du quenching, autrement dit de calculer le Φ_{PSII} obtenu en présence de quinones si le quenching n'avait pas lieu. Ce paramètre pourrait nous renseigner sur l'état intrinsèque du PSII et de la chaîne photosynthétique.

Nous avons vu plus haut que le Φ_{PSII} peut s'exprimer ainsi :

$$\phi_{PSII} = \frac{F_M - F_{stat}}{F_M} = \frac{\phi_{F_M} - \phi_{F_{stat}}}{\phi_{F_M}}$$

$$\phi_{PSII} = 1 - \frac{F_{stat}}{F_M} = 1 - \frac{\phi_{stat}}{\phi_M}$$

En présence de quinones, le rendement quantique du PSII s'écrit :

$$\Phi_{PSII_{reel}} = \frac{k_P[Q_A]}{k_f + k_H + k_P[Q_A] + k_3[Q]_{exo}}$$

Dans un cas théorique idéal où les quinones auraient perdu leur effet de quenching on aurait de même (avec $[Q_A]'$ la proportion de centres ouverts correspondante) :

$$\phi_{PSII_{corrige}} = \frac{k_0[Q_A]'}{k_f + k_H + k_0[Q_A]'}$$

D'où le rapport :

$$\frac{\phi_{PSII_{corrige}}}{\phi_{PSII_{reel}}} = \frac{[Q_A]'}{[Q_A]} \frac{k_f + k_H + k_0[Q_A] + k_3[Q]_{exo}}{k_f + k_H + k_0[Q_A]'} = f(F_M, F_{stat}, NPQ, etc....)$$

En régime stationnaire il advient pour le cas réel :

$$k_2[1 - Q_A] = \frac{k_0[Q_A]}{k_F + k_H + k_0[Q_A] + k_3[Q]_{exo}}$$

et pour le cas théorique idéal (corrigé)

$$k_2[1 - Q'_A] = \frac{k_0[Q'_A]}{k_F + k_H + k_0[Q'_A]}$$

Avec k_2 la constante de réoxydation de $[Q_A^-]$ par recombinaison de charge ou par transfert électronique à Q_B .

Ces deux égalités impliquent que

$$\frac{1 - [Q'_A]}{1 - [Q_A]} = \frac{\phi_{PSII}^C}{\phi_{PSII}^R}$$

Il s'agit du rapport du rendement du Φ_{PSII} corrigé sur le réel.

Nous avons vu également que :

$$\phi_{PSII}^R = \frac{k_0[Q_A]}{k_f + k_H + k_0[Q_A] + k_3[Q]_{exo}}$$

s'écrit aussi :

$$[Q_A] = \frac{\phi_{PSII}^R}{k_0(1 - \phi_{PSII}^R)}(k_F + k_H)(1 + NPQ)$$

$$\phi_{PSII_{corrigé}} = \frac{k_0[Q_A]'}{k_f + k_H + k_0[Q_A]'}$$

On en déduit :

$$[Q_A] = \frac{\phi_{PSII}^C}{k_0(1 - \phi_{PSII}^C)}(k_F + k_H)$$

$$\frac{1 - [Q_A]'}{1 - [Q_A]} = \frac{\phi_{PSII_{corrigé}}}{\phi_{PSII_{reel}}} = \frac{(1 - \phi_{PSII}^R)[k_0 - k_0\phi_{PSII}^C - \phi_{PSII}^C(k_F + k_H)]}{(1 - \phi_{PSII}^C)[(k_0 - k_0\phi_{PSII}^R - \phi_{PSII}^R(k_F + k_H))(1 + NPQ)]}$$

avec

$$g = \frac{k_F + k_H}{k_0}$$

$$\frac{1 - \phi_{PSII}^C - g\phi_{PSII}^C}{(1 - \phi_{PSII}^C)\phi_{PSII}^C} = \frac{1 - \phi_{PSII}^R - g\phi_{PSII}^R(1 + NPQ)}{(1 - \phi_{PSII}^R)\phi_{PSII}^R}$$

Par ailleurs, en faisant l'hypothèse que $[Q_A]=1$ sous obscurité, on identifie :

$$g = \frac{F_0}{F_m - F_0}$$

Au bilan, on obtient une équation du second degré :

$$A\phi_{PSII}^C{}^2 + \phi_{PSII}^C[-A - g - 1] + 1 = 0$$

Avec :

$$A = \frac{1 - \phi_{PSII}^R - g\phi_{PSII}^R(1 + NPQ)}{(1 - \phi_{PSII}^R)\phi_{PSII}^R}$$

et :

$$g = \frac{k_F + k_H}{k_0}$$

La résolution donne :

$$\Delta = -4A + (-A - g - 1)^2$$

$$x_1 = \frac{\sqrt{\Delta} + A + g + 1}{2A}$$

$$x_2 = \frac{-\sqrt{\Delta} + A + g + 1}{2A}$$

On retient la seule des deux racines qui ait un sens physique (comprise entre 0 et 1).

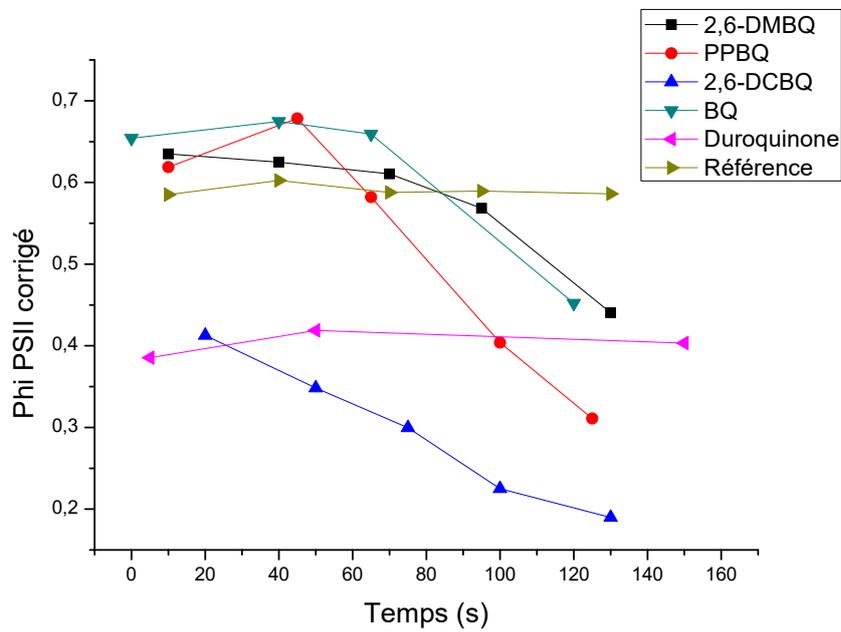


Figure 3.9: Evolution en fonction du temps du Φ_{PSII} corrigé d'échantillons d'algues incubés sous obscurité avec des quinones de forme oxydée. 100 μM de quinones ; WT : $2 \cdot 10^7$ cellules. mL^{-1} ; $I=150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Le tracé du Φ_{PSII} corrigé en fonction du temps pour les différentes quinones étudiées est représenté en **figure 3.9**. Ces résultats permettent de confirmer l'hypothèse d'un empoisonnement en altérant la chaîne photosynthétique car même en corrigeant par le quenching cinétique, la performance du PSII persiste à diminuer avec le temps d'incubation. La benzoquinone, la 2,6-diméthylbenzoquinone et la phénylbenzoquinone présentent des propriétés de dérivation intéressantes aux temps courts avant qu'un empoisonnement ne devienne prédominant (Φ_{PSII} corrigé supérieur à celui de référence sur les temps courts puis inférieur sur les temps plus longs). La 2,6-DCBQ semble empoisonner très rapidement

quand la duroquinone ne semble pas toxique, mais diminue le rendement photosynthétique obtenu³. Notons que ces résultats ont été obtenus dans des conditions de faible illumination, c'est-à-dire où l'arrivée des quinones n'est pas limitante. A lumière plus forte, le classement des quinones peut être sensiblement différent.

3.5 Réversibilité de l'effet des quinones

La diminution des performances de la dérivation semble liée au quenching cinétique et à un autre empoisonnement qui affecte le PSII d'après les calculs de correction de quenching (cf. paragraphe précédent). On peut se poser la question de savoir jusqu'à quel point les performances des PSII des algues peuvent être régénérées une fois les quinones éliminées. Pour cela, les cellules ont été incubées avec les quinones pendant 30 minutes, les courbes d'induction de fluorescence réalisées puis les cellules ont été centrifugées puis resuspendues dans du milieu minimum. Des courbes d'induction de fluorescence ont été ensuite réalisées. Les valeurs de Φ_{PSII} et NPQ avant et après sont résumées dans le **tableau 3.1**.

Plusieurs cas de figure se présentent. Pour la 2,6-DCBQ, la PPBQ, et la 2,6-DMBQ, le lavage ne permet pas de retrouver les performances avant ajout de quinones (baisse de Φ_{PSII} et augmentation du NPQ). Leur effet paraît irréversible et lié à un empoisonnement/toxicité de la quinone qui continue à prendre place même durant et après le lavage. Toutefois pour la benzoquinone le quenching semble s'être en partie renversé (NPQ qui diminue) et les performances stabilisées (Φ_{PSII} constant). Ceci est en accord avec l'utilisation de la benzoquinone dans la littérature comme agent chélatant capable de réaliser des réactions de cross-linking et dont l'excès est facilement éliminé par lavage étant donné la grande hydrophilie de cette molécule [110]. En effet, le NPQ est proportionnel à la concentration en quinones exogènes au niveau des antennes collectrices, une diminution du NPQ ne peut provenir que d'une diminution de la concentration en quinones suite au lavage. Enfin, l'échantillon traité avec la duroquinone semble retrouver une partie de ses performances après lavage (déquenching et Φ_{PSII} qui passe de 0,31 à 0,46) ce qui suggère que dans ce cas de figure le quenching est bien réversible et ne découle pas d'un empoi-

3. L'interaction de la quinone avec la chaîne photosynthétique peut aussi être défavorable si la cinétique de réduction de la quinone exogène est lente comparée à celle de la plastoquinone endogène.

sonnement irréversible. Ces résultats suggèrent aussi que le type de liaison que réalisent les quinones à l'intérieur de la membrane thylakoïde dépend de la quinone ce qui de fait rend le procédé de lavage efficace ou pas.

Quinone	Φ_{PSII}		NPQ	
	Avant lavage	Après lavage	Avant lavage	Après lavage
2,6-DCBQ	0,38	0,31	0	0,6
PPBQ	0,20	0,18	1,2	1,5
2,6-DMBQ	0,43	0,11	0,45	0,91
BQ	0,22	0,21	0,42	0,28
Duroquinone	0,31	0,46	1,6	0,16
Référence	0,52	0,52	0	0

Table 3.1: Valeurs de Φ_{PSII} et de NPQ calculées pour les algues incubées avec des quinones différentes avant et après lavage. Le NPQ a été calculé en prenant comme valeur de référence l'échantillon non incubé avec des quinones avant ou après lavage selon le cas. Les formules utilisées sont celles définies équations 3.6 et 3.10.

3.6 Le suivi de l'état de l'ATP synthase en présence de quinones

Lors de la photosynthèse, le transfert électronique le long de la chaîne photosynthétique et de protons du stroma à l'espace luménal des thylakoïdes. induit la création d'un gradient électrochimique qui comprend deux composantes : un champ électrique et un gradient de concentration en protons. Cette force proton motrice a un rôle central dans la photosynthèse en assurant l'énergie nécessaire pour la synthèse de l'ATP par l'ATP synthase [111]. Par ailleurs, la présence du champ électrique induit un léger décalage des niveaux d'énergie de certains pigments présents dans la membrane, ce qui modifie le spectre d'absorption (on parle d'effet Stark ou encore d'électrochromisme). On peut donc à partir de la variation du spectre d'absorption à une longueur d'onde donnée (en général le maximum d'absorption), tirer une information sur le gradient de protons à travers la membrane et donc le fonctionnement de l'ATP synthase.

L'analyse cinétique du signal de déplacement électrochromatique permet de mettre en évidence 3 phases différentes. La première phase (<100 μ s après le début du flash) corres-

pond à une augmentation rapide du champ électrique créé par la séparation de charge au sein des photosystèmes PSII et PSI. Cette phase est suivie par une phase d'augmentation plus lente (nommée «b» et de l'ordre de la ms) corrélée à la mise en marche du complexe b_6f [112]. Après la fin de cette phase, intervient la diminution du champ électrique ou phase «c» due à la consommation du gradient de protons par l'ATP synthase qui a pour effet de faire diminuer le champ électrique. Dans les chloroplastes natifs, cette phase découle du flux ionique de H^+ à travers le complexe de l'ATP synthase. Par conséquent, la variation du temps de relaxation renseigne sur le niveau d'activité de l'enzyme.

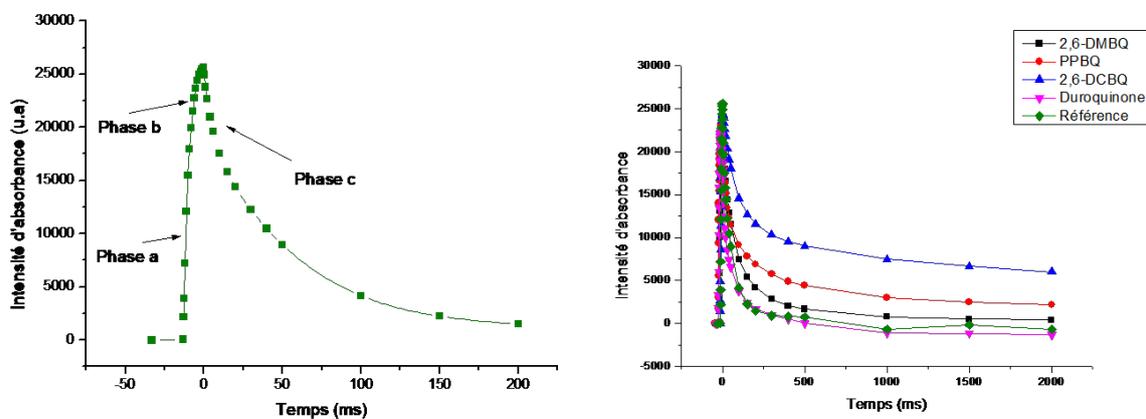


Figure 3.10: Suivi de l'état de l'ATP synthase ; A gauche sans quinones. A droite avec plusieurs quinones. Pulse appliqué ; $[Q] : 100 \mu M$; $2 \cdot 10^7$ cellules/mL.

Afin de regarder l'effet des quinones sur l'état de l'ATP synthase, des expériences d'électrochromisme ont été réalisées en utilisant un flash ou un pulse pour atteindre des seuils d'activation de l'ATP synthase différents. Un ordre de toxicité a ensuite pu être établi selon les cinétiques de relaxation (**Fig 3.10 et 3.11**). La 2,6-DCBQ semble la plus toxique de ce point de vue. La phase b semble avoir disparu complètement ce qui montre que le b_6f est découplé du reste de la chaîne et va dans le sens que cette quinone court-circuite complètement la chaîne photosynthétique. La PPBQ semble avoir perdu un peu de phase b. La 2,6-DMBQ n'agit pas sur le b_6f mais pourrait avoir eu un effet inhibiteur ailleurs comme sur la respiration à cause de la durée de vie de champ observé anormalement longue. Enfin la duroquinone n'induit aucune perturbation. Les résultats obtenus vont globalement dans le sens des études précédentes, à savoir que la duroquinone n'a quasiment pas d'effet toxique contrairement à des quinones comme la 2,6-DCBQ et

dans une moindre mesure la 2,6-DMBQ.

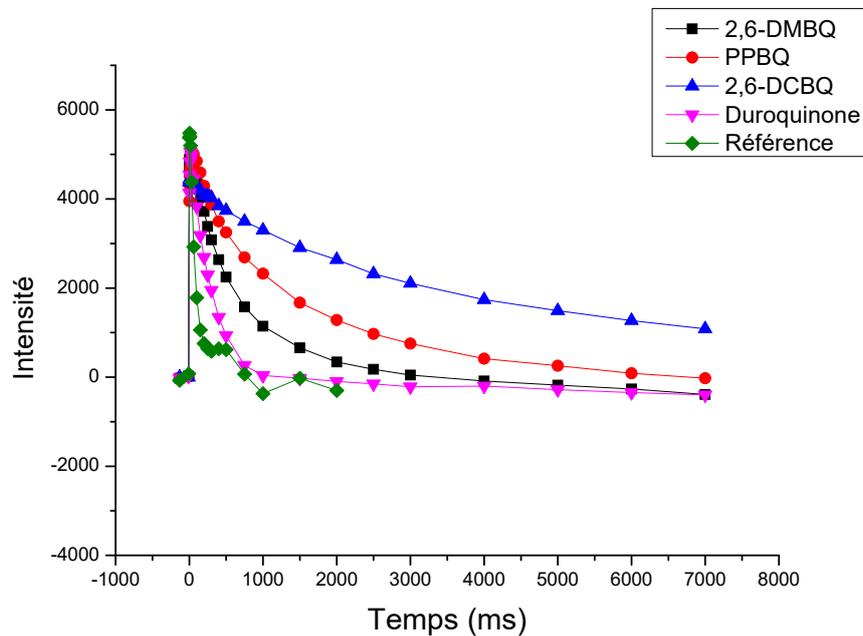


Figure 3.11: Suivi de l'état de l'ATP synthase ; 100 μM de quinones ; Flash appliqué ; 2.10^7 cellules/mL ; $[\text{Q}] : 100 \mu\text{M}$;

3.7 Etude aux temps courts : capacité des quinones à oxyder Q_A^-

Les seules études permettant de jauger directement le caractère accepteur des quinones sur *Chlamydomonas reinhardtii* en spectroscopie ont été réalisées sur des souches mutées type $\Delta f1$ (cf. chapitre 1). Cela laisse à désirer quant à leur capacité dérivatrice sur des souches sauvages au regard de l'effet de nivellement mis en évidence dans le chapitre précédent entre les deux souches.

Une manière de mettre en évidence la capacité des quinones à interagir avec la chaîne photosynthétique de souches sauvages d'algues *Chlamydomonas reinhardtii* est de s'intéresser à la capacité des quinones à réoxyder les sites Q_A^- réduits. Pour cela, les algues ont été mises en présence de quinones sous obscurité et leur F_0 mesuré puis un pulse saturant appliqué donnant lieu à une fluorescence maximale F_M . La vitesse à laquelle cette fluorescence maximale retombe à son niveau minimal est liée à la vitesse de réoxydation de

Q_A^- . Or on s'attend à ce qu'elle soit plus rapide en présence de quinones efficaces aptes à dériver des électrons depuis Q_B ou le pool de plastoquinones.

Les **figures 3.12 et 3.13** résument les résultats obtenus pour différentes quinones testées. Un quenching dû aux quinones est responsable de la diminution de la valeur de F_M . Les quinones qui dérivent le mieux sont dans l'ordre : la 2,6-DCBQ, la PPBQ et puis la duroquinone quand la 2,6-DMBQ exhibe une capacité de dérivation intermédiaire⁴. Seule la BQ ne semble pas interagir de manière efficace avec la chaîne photosynthétique comme le montre la vitesse de diminution de F_M qui reste constante. Ainsi parmi ces différentes quinones, la 2,6-DMBQ a été sélectionnée pour une série d'expériences supplémentaires, étant la seule dont l'utilisation aux concentrations actuelles ne perturbe pas considérablement l'action de l'ATP synthase mais oxyde efficacement Q_A^- .

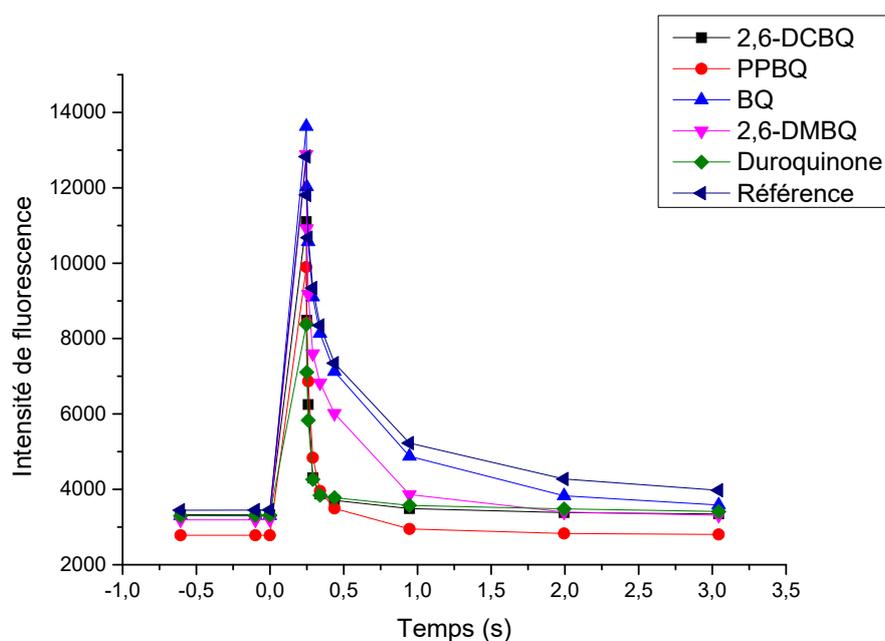


Figure 3.12: Vitesse d'oxydation de Q_A^- en présence de quinones ; 50 μM de quinones ; 10^7 cellules/mL.

4. Cet ordre est compatible avec le criblage électrochimique des quinones à la duroquinone près qui en chronoampérométrie donne de très petits photocourants. Pour expliquer ce résultat, on peut invoquer l'argument de la partition de la duroquinone entre les deux phases aqueuses et organiques puisqu'elle se partitionne mieux dans la phase lipidique et n' a donc pas envie de sortir.

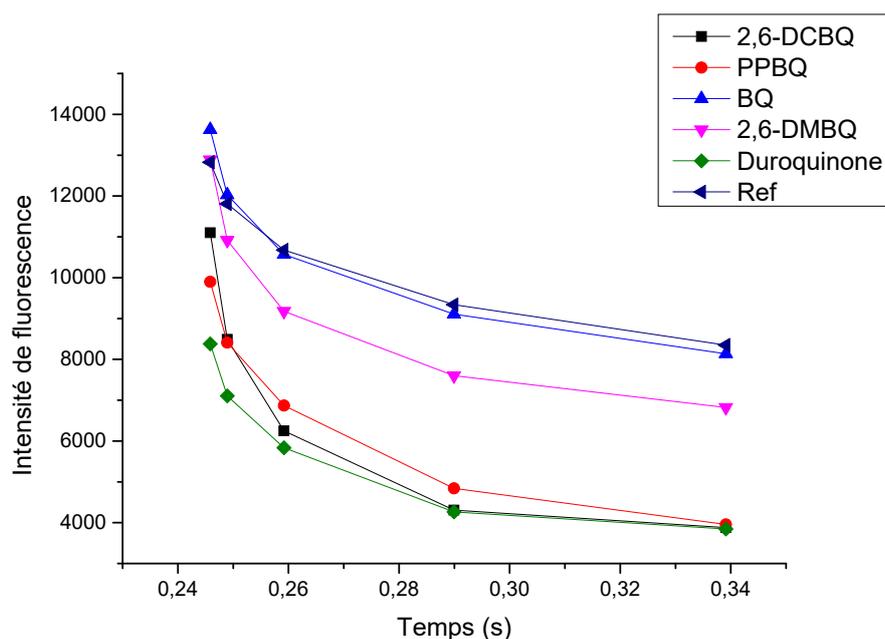


Figure 3.13: Diminution de la fluorescence. 50 μM de quinones ; 10^7 cellules/mL. Zoom sur la descente. Lorsque la diminution de la fluorescence est plus rapide, la réoxydation de Q_A^- l'est aussi. Pour cela il suffit de comparer les pentes aux temps courts.

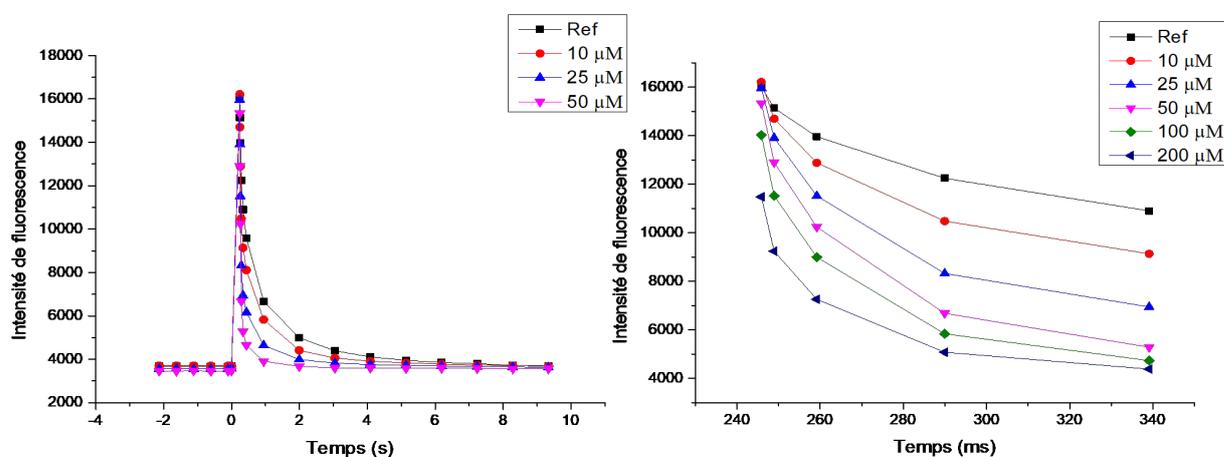


Figure 3.14: Diminution de la fluorescence en présence de quinones à différentes concentrations. 10^7 cellules/mL. A droite zoom sur la descente sur une plus grande plage de concentrations.

A cet égard, une étude en fonction de la concentration a été menée pour cette quinone et met une évidence une capacité à oxyder Q_A^- croissante en fonction de la concentration employée avec un optimum atteint à environ 50 μM puisque la vitesse d'oxydation n'augmente que peu après alors qu'un quenching semble s'installer (**Fig 3.14**) (il suffit de regarder la pente de diminution sur les premiers points pour avoir la vitesse d'oxydation

et la diminution de F_M pour voir l'effet du quenching).

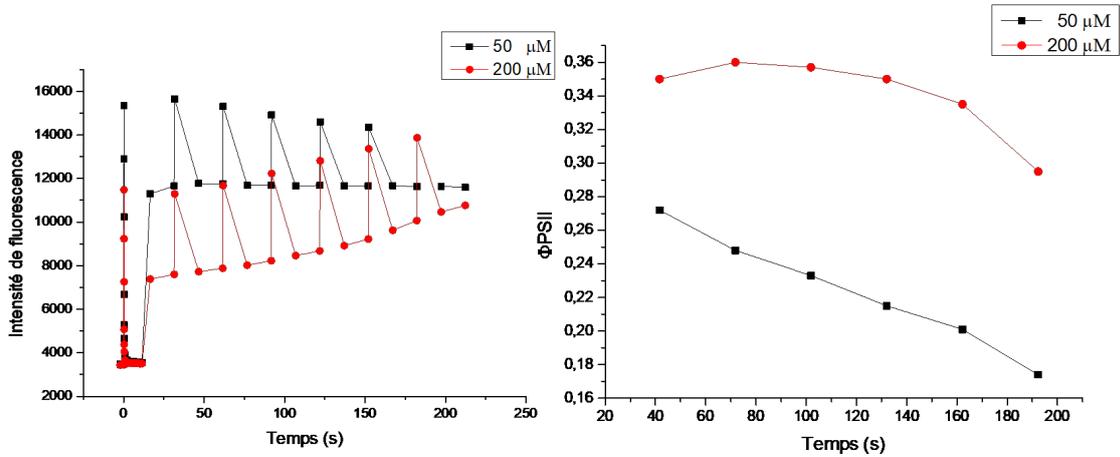


Figure 3.15: A gauche fluorescence sous lumière actinique et sous une série de pulses saturants permettant d'obtenir l'évolution de F_{stat} et F_M au cours du temps ; A droite Evolution du Φ_{PSII} déduit de la courbe à gauche.

Dans le but de faire une étude plus poussée de l'effet de la 2,6-DMBQ à cette concentration, une expérience consistant à une exposition à lumière actinique entrecoupée de pulses saturants a été effectuée. Cela permet d'accéder à la valeur du Φ_{PSII} des algues en présence de quinones dans les conditions de dérivation. Néanmoins la consommation des quinones est très rapide comme le montre la **figure 3.15** et on se retrouve très rapidement dans le cas d'un système sans quinones à l'état oxydé. En effet seule la concentration de 200 μM maintient ses performances parallèlement avec un déquenching révélant le début de l'épuisement des quinones (puisque le quenching est proportionnel à la concentration en quinones oxydées qui n'ont pas encore été réduites et qui quenchent). En effet, il faudrait se ramener à des concentrations plus fortes pour avoir un suivi plus long de la réduction des quinones. Néanmoins travailler dans de telles conditions peut altérer l'état du système et l'exposer à une grande toxicité des quinones.

On peut toutefois faire le choix de rester à 50 μM afin de voir si le Φ_{PSII} retrouve sa valeur normale une fois les quinones consommées. Or on voit bien que le Φ_{PSII} ne retrouve pas sa valeur usuelle (**Fig 3.16**) mais semble avoir bien chuté pendant la dérivation. Cela montre que la dérivation opérée par la quinone a causé une toxicité sur la photosynthèse et que le gain de vitesse qui peut avoir lieu ne se maintient que sur quelques secondes et se fait très probablement au détriment de la photosynthèse et non pas en parallèle.

La réalisation de la même expérience à plus faibles concentrations en 2,6-DMBQ montre une meilleure régénération de la capacité de l'organisme à réaliser la photosynthèse, une fois la dérivation épuisée ce qui suggère que la concentration en quinone est un facteur clé pour le maintien de la photosynthèse. Il aurait été intéressant de mener ces expériences sur de plus grandes périodes de temps, néanmoins, la consommation des quinones sous forte lumière ne permet pas dans le cadre du montage actuel de réaliser de telles manipulations et nécessite le recours à un montage fluïdique où on alimenterait constamment le système en quinones oxydées et fraîches. Ainsi un autre type d'empoisonnement consistant à perturber durablement l'activité de la photosynthèse est mis en évidence au contact de quinones sur une échelle de temps bien plus courte que celle du quenching cinétique (observé sous obscurité) et ce en conditions de dérivation⁵. Ce type d'empoisonnement mériterait d'être étudié d'une manière plus exhaustive sur plusieurs concentrations et quinones mais ne sera pas traité dans le cadre de ces travaux de thèse.

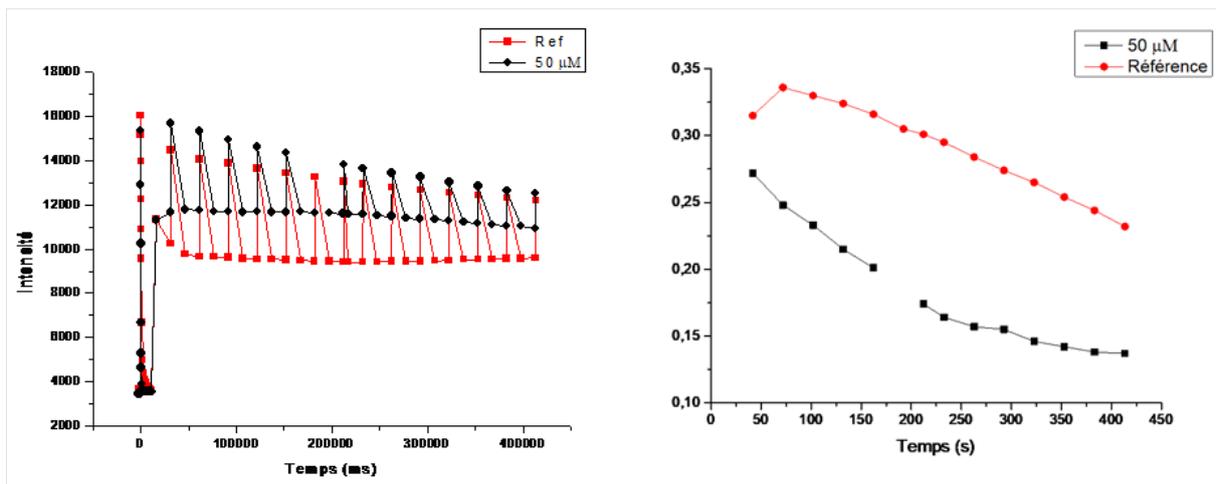


Figure 3.16: Illumination continue et suivi de F_{max} et de F_{stat} ; 50 μM de quinones et référence; 10^7 cellules/mL. A droite variation du Φ_{PSII} calculée pour 50 μM et la référence.

5. Nous rappelons que la stratégie de ce projet est de dériver les électrons de la photosynthèse sans compromettre le processus photosynthétique

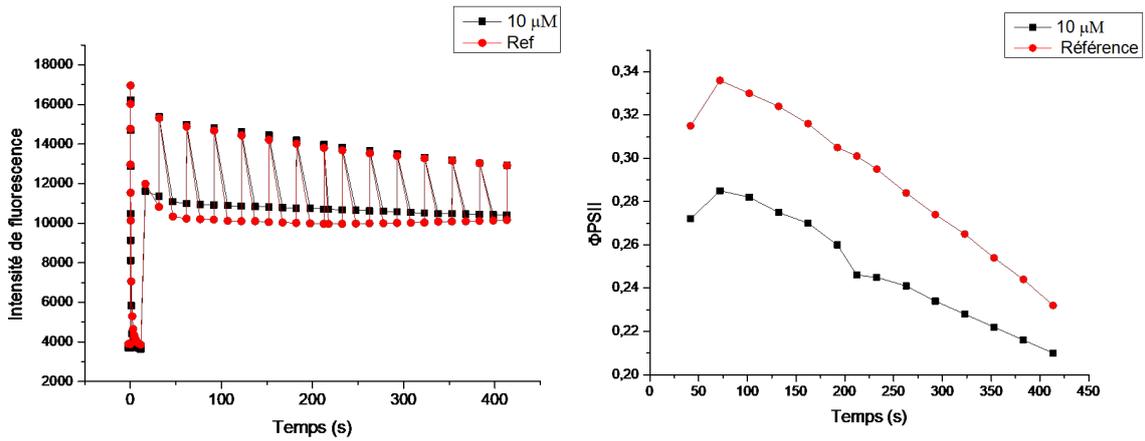


Figure 3.17: Illumination continue et suivi de F_{max} et de F_{stat} ; 10 μM de quinones et référence; 10^7 cellules/mL. A droite variation du Φ_{PSII} calculée pour 10 μM et la référence.

3.8 Circulation fluïdique

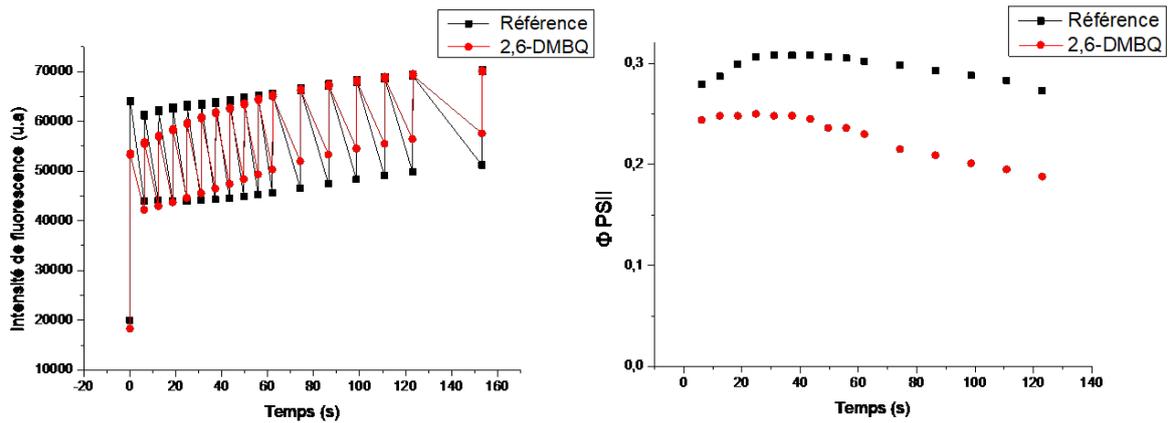


Figure 3.18: A gauche illumination continue et suivi de F_{max} et de F_{stat} ; 100 μM de quinones et milieu minimum; $I=700 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; $4\cdot 10^7$ cellules/mL. A droite évolution du Φ_{PSII} pour les deux échantillons.

Partant des résultats précédents, la cuve spectroscopique précédemment employée et contenant les algues a été mise au contact d’une circulation fluïdique de quinones à 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Une membrane semi-perméable a été intercalée entre les algues et le milieu extérieur de manière à permettre aux quinones de part et d’autre de la cuve de s’échanger et a résulté en le maintien d’une concentration continue de quinones au contact des algues. Ensuite des mesures de Φ_{PSII} ont été réalisées sur des périodes d’illumination plus longues. Les résultats montrent une persistance de l’activité photosynthétique sur

plusieurs minutes qui même en étant inférieure à l'activité photosynthétique des algues non incubées avec des quinones, paraît néanmoins stable.

Cette expérience constitue une première étape vers la mise en place du couplage électrochimique/spectroscopique capable de rendre compte de l'état de la chaîne photosynthétique dans des conditions de dérivation. En effet, dans ces conditions, le médiateur est régénéré à l'électrode et en résulte un flux continu de quinones semblable au montage à circulation actuel (cf. chapitre précédent).

3.9 Conclusion

Les quinones semblent avoir un effet toxique sur la physiologie de l'algue lorsqu'elles sont introduites sous leur forme oxydée. En revanche, la forme réduite ne semble pas toxique. Cette toxicité a pu être mise en évidence par le suivi du quenching cinétique, par l'étude de sa réversibilité et par l'effet des quinones sur l'activité de l'ATP synthase. La correction du quenching a permis de mettre en évidence des propriétés de dérivation intéressantes des quinones à faible lumière sur des temps courts et de montrer que l'intégrité de la chaîne photosynthétique était compromise par les quinones sur les temps plus longs. Enfin on a cherché à s'approcher le plus des conditions de dérivation lors du suivi de l'état de la chaîne photosynthétique à travers le montage à circulation pour évaluer la faisabilité d'une telle dérivation et vu que cela dépendait grandement des concentrations de quinones mises en jeu. Une analyse plus poussée de la toxicité des quinones selon leur concentration est donc nécessaire et sera conduite dans le chapitre qui suit.

Chapitre 4

Etude de l'influence de la structure chimique de la quinone sur son degré de performance

Dans les chapitres précédents, nous avons mis au point un dispositif facilitant l'analyse de l'extraction des électrons photosynthétiques par des quinones exogènes puis mis en évidence leur effet d'empoisonnement. Nous allons désormais nous intéresser au choix de la meilleure quinone, c'est-à-dire celle qui présente le meilleur compromis dérivation/empoisonnement. Avant toute chose, il est donc nécessaire de présenter plus en détail la structure d'une quinone.

4.1 Définition

Les quinones sont des dérivés oxydés de composés aromatiques obtenus formellement par la conversion d'un nombre pair de groupes C - H en groupes C = O , des réarrangements nécessaires des doubles liaisons pouvant avoir lieu (IUPAC) [113]. Il en résulte une structure cyclique totalement conjuguée.

Les représentants les plus connus et simples de cette classe de composés sont les cyclohexa-3,5-diène-1,2-dione et la cyclohexa-2,5-diène-1,4-dione, plus connues sous le nom de la 1,2-benzoquinone et 1,4-benzoquinone. C'est ce dernier type de structure qui sera concerné dans notre étude (**Fig 4.1**).

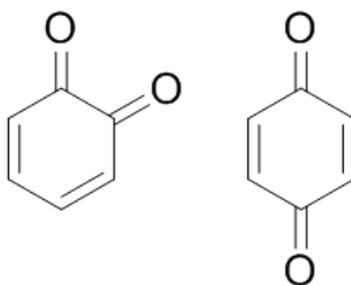


Figure 4.1: Structures de la 1,2-benzoquinone (gauche) et de la 1,4-benzoquinone (droite)

4.2 Histoire des quinones et utilisation par les Hommes

Les quinones sont des molécules qui présentent de nombreuses applications. Par exemple,

l'alizarine (1,2-dihydroxyanthraquinone) est un composé actif tiré des racines de la plante *Rubia tinctorum* (garance des teinturiers). Elle est utilisée comme colorant rouge pour les tissus en combinaison avec la purpurine et a une grande affinité pour le calcium. Elle a été retrouvée notamment dans les os et les habits de momies égyptiennes [114].

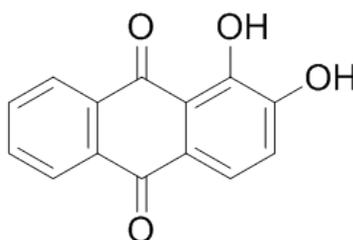


Figure 4.2: Structure de l'alizarine

La Henna, une pâte fabriquée à partir des extraits des feuilles de la plante *Lawsonia inermis* et à base de naphthoquinones, a été utilisée comme cosmétique rouge-orangée et comme teinte pour les cheveux depuis l'Antiquité. Aujourd'hui encore, la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone est utilisée comme teinte naturelle pour les cheveux et disponible dans les supermarchés. [114].

Plus récemment les hydroquinones ont été utilisées dans les processus de développement photographique en tant qu'agents réducteurs. Le couple benzoquinone/hydroquinone permet de réduire les ions Ag^+ en Ag ce qui enclenche la multiplication du nombre de cristaux d'argent autour des grains déjà formés sous l'action de la lumière et permet d'augmenter le contraste [115].

Enfin à la fin du XX^{ème} siècle, les quinones formaient la deuxième plus grande classe de cytotoxines, utilisées dans les traitements anticancéreux après les agents chloroéthyles alkylants et approuvées pour l'usage clinique auprès des patients [116]. Les quinones sont aussi couramment employées en tant qu'herbicides, fongicides, et régulateurs de la croissance des plantes [114].

4.3 Réactivité

4.3.1 Densité électronique

Les calculs LCAO-MO (Linear Combination of Atomic Orbitals) pour la 1,4-benzoquinone montrent que la distribution de la densité des électrons π n'est pas uniforme [117] (**Fig ??**).

Les additions nucléophiles sur les quinones

La **figure 4.3** donne la répartition électronique des électrons π au sein de la 1,4-benzoquinone. A ce titre, deux atomes de carbone sont électrophiles. Une quinone est donc susceptible de subir une addition nucléophile dite « 1,2 » : le nucléophile attaque le carbone n°2 (de charge 0,668). Toutefois, le fait que le carbone n°4 soit aussi électrodéficientaire (0,916) favorise une addition dite « 1,4 » ou « de Michael » (**Fig 4.3**). Le nucléophile attaque le carbone n°4, provoquant alors le déplacement formel de la liaison π entre les carbones 2 et 3 au niveau des carbones 1 et 2 (**Fig 4.4**). Ce déplacement est facilité par la forte électrophilie du carbone n°2 et le fait que l'on forme un anion énolate.

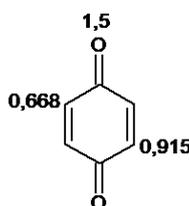


Figure 4.3: Répartition des électrons π sur la 1,4-benzoquinone.

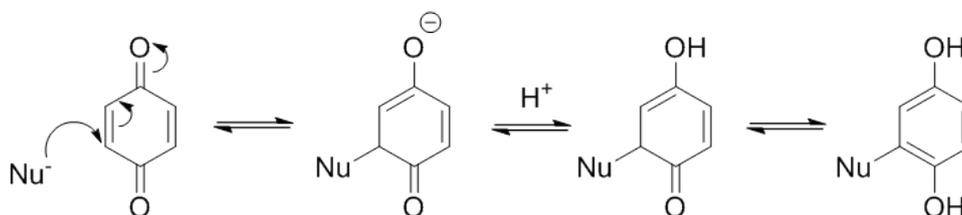


Figure 4.4: Schéma de l'addition nucléophile 1-4 sur la benzoquinone.

Le schéma de la **figure 4.4** fait apparaître un proton en tant que contre-ion mais le schéma reste vrai avec d'autres électrophiles. La dernière étape du schéma est montrée comme un processus réversible. Cependant, en règle générale, elle est irréversible car elle

conduit à la formation d'un système aromatique stable par le biais d'une tautomérie céto-énolique. Cette considération d'ordre thermodynamique explique la grande réactivité des quinones vis à vis de l'addition nucléophile.

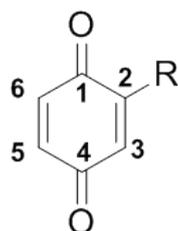


Figure 4.5: Structure de la 1,4-benzoquinone, 2-substituée.

Pour la quinone 2-substituée, l'ordre de réactivité des positions du cycle d'après les calculs HOMO-LUMO (méthode Hartree-Fock) se classe selon : $5 > 3 > 6$ pour un substituant donneur et $3 > 6 > 5$ pour un substituant accepteur (où $>$ traduit une réactivité plus grande) [117].

4.3.2 Les substitutions nucléophiles des quinones

La réactivité des quinones avec les nucléophiles ne se limite pas à des additions nucléophiles et est principalement dépendante de leur caractère électrophile. Ainsi les quinones halogénées et pseudohalogénées (cyano, isocyanate, etc..) sont les plus réactives vis à vis des nucléophiles et peuvent subir une substitution nucléophile conduisant au remplacement de l'halogène par le nucléophile. Inversement, l'alkylation des quinones diminue leur réactivité [117].

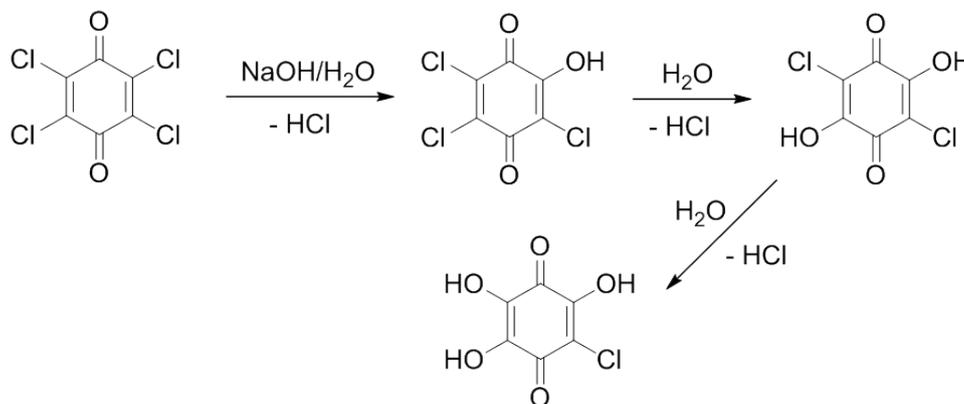


Figure 4.6: Réaction d'hydrolyse de la chloranil [117]

Une exemple classique de substitution nucléophile est l'hydrolyse des quinones halogénées résultant en la formation d'hydroquinones. L'hydrolyse de la chloranil (tetrachloro-1,4-benzoquinone) se fait en présence de soude en solution sans autre catalyseur. Les hydroxyquinones mono- et di-substituées peuvent ainsi être obtenues. La bromanile et la fluoranile sont hydrolysées de la même manière (**Fig 4.6**) [117].

4.3.3 Stabilité de la 2,6-DCBQ en milieu de l'expérience

La 2,6-DCBQ, quinone di-chlorée, est l'une des quinones les plus utilisées comme médiateur pour l'extraction des électrons photosynthétiques. La présence d'atomes de chlore suggère donc une grande réactivité et il est intéressant d'évaluer la stabilité de la 2,6-DCBQ dans notre milieu de travail sur la durée de l'expérience.

L'analyse du changement de couleur de la solution de 2,6-DCBQ

En effet, en quelques heures, la solution aqueuse de 2,6-DCBQ, initialement de teinte jaunâtre, prend une coloration rougeâtre, que ce soit à la lumière ou à l'obscurité, ce qui suggère une dégradation chimique de la 2,6-DCBQ. D'après la littérature [117], les quinones appauvries en électrons, à l'image de la 2,6-DCBQ du fait des effets inductifs attracteurs des atomes de chlore, sont susceptibles de subir des additions nucléophiles de la part des ions hydroxyde $\text{HO}^-_{(\text{aq})}$ selon un mécanisme supposé de nature catalytique (**Fig. 4.7**). Nous postulons un mécanisme dans lequel le recours catalytique aux ions hydroxyde $\text{HO}^-_{(\text{aq})}$ rend la dégradation efficace dans un large domaine de pH, notamment à $\text{pH} = 7$, du fait de l'autoprotolyse de l'eau.

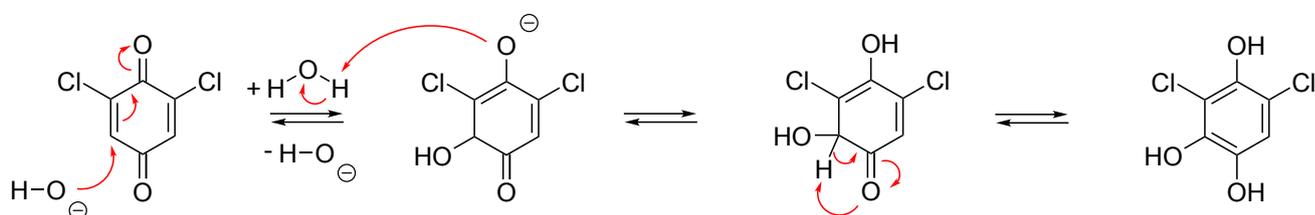


Figure 4.7: Mécanisme catalytique supposé d'hydroxylation de la 2,6-dichlorobenzoquinone

Pour appréhender le changement de teinte de la solution associée à la dégradation de la 2,6-DCBQ, l'énergie des transitions $\pi^* \leftarrow \pi$ a été estimée pour la 2,6-dichlorobenzoquinone

et la 2,6-dichloro-3-hydroxyhydroquinone, à partir d'une approche de HÜCKEL simple des niveaux d'énergie des orbitales π (Tab. 4.1).

	E_{HO}	E_{BV}	ΔE	λ_{abs} (nm)
2,6-dichlorobenzoquinone	$\alpha + 0,77 \beta$	$\alpha + 0,15 \beta$	$-0,62 \beta$	~ 1300
2,6-dichloro-3-hydroxyhydroquinone	$\alpha + 0,62 \beta$	$\alpha - 1,09 \beta$	$-1,71 \beta$	~ 300

Table 4.1: Énergie des orbitales frontalières π (E_{HO} et E_{BV}) et de la transition $\pi^* \leftarrow \pi$ (ΔE) de la 2,6-dichlorobenzoquinone et de la 2,6-dichloro-3-hydroxyhydroquinone selon la méthode de HÜCKEL simple. $\alpha > 0$ et $\beta < 0$ correspondent respectivement aux intégrales coulombienne et de résonance de HÜCKEL. Modélisation sur le logiciel HULIS®. Les longueurs d'onde de maxima d'absorption λ_{abs} ont été estimées en prenant $\beta = -250 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Le déplacement de la bande d'absorption des grandes vers les courtes longueurs d'onde entre la 2,6-dichloro-benzoquinone et la 2,6-dichloro-3-hydroxyhydroquinone se traduit par une transmission décalée vers le rouge, ce qui justifie le changement de couleur de solution.

Le suivi cinétique de la dégradation de la 2,6-DCBQ

Pour réaliser le suivi cinétique de la dégradation de la 2,6-DCBQ, nous réalisons des voltamétries cycliques à 0 et 50 min d'une solution de $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,6-DCBQ en milieu minimum. Les voltamétries cycliques dans le sens de la réduction puis de l'oxydation (**Fig 4.8**) révèlent une diminution de la concentration en benzoquinone sur la durée de l'expérience d'environ 25%. Le rapport des intensités de pic aller et retour diminue légèrement (1,8 vs 1,6).

Une autre expérience a alors été conduite mais avec des voltamétries en sens inverse : de l'oxydation vers la réduction. Nous observons alors l'augmentation de la concentration en quinones réduites tandis que la concentration en quinones oxydées diminue (**Fig 4.9**). La 2,6-DCBQ semble donc subir une addition nucléophile qui donne naissance à la forme réduite correspondante de type hydroquinone en accord avec la réactivité spontanée des quinones avec l'eau [118] ou une hydroquinone par le biais d'une ou plusieurs substitutions nucléophiles [117]. Ces expériences ont été reprises dans du PBS puis dans une solution électrolytique de chlorure de potassium KCl et donnent lieu à des résultats similaires, ce

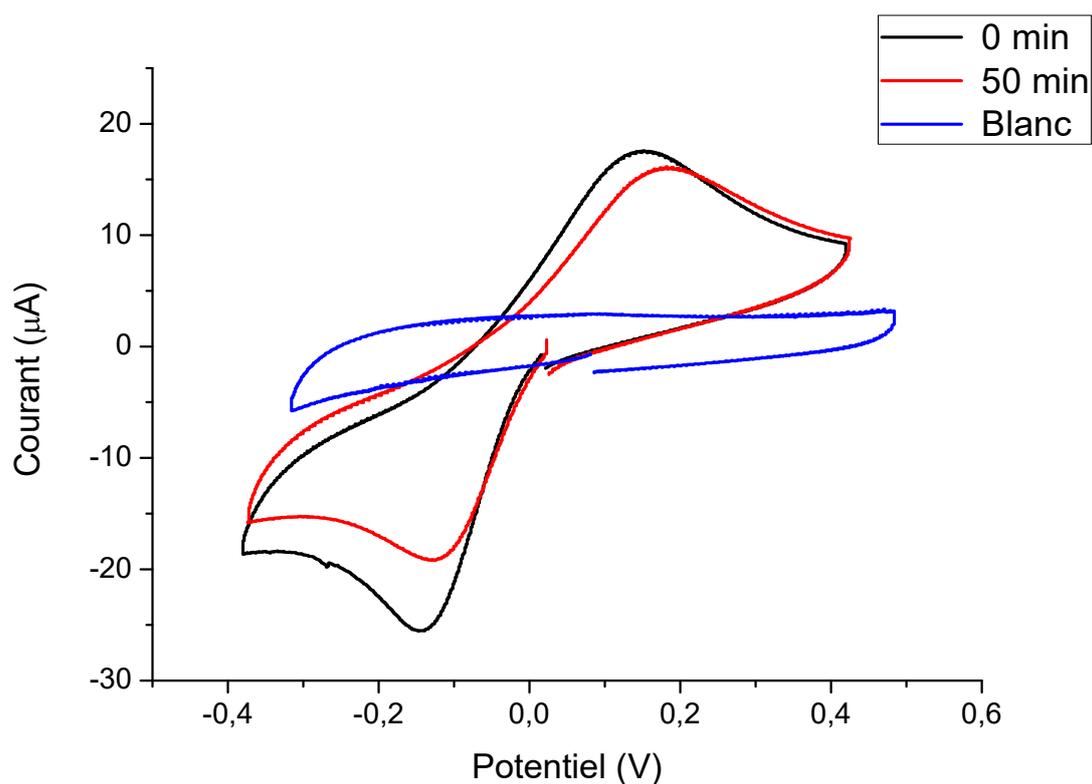


Figure 4.8: Voltammogramme de la 2,6-DCBQ à $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans du milieu minimum sur le dispositif expérimental usuel, vitesse de balayage 50 mV.s^{-1} , sens de balayage vers la réduction.

qui confirme qu'une hydroxylation¹ ou l'addition d'éthanol (dans lequel la quinone est dissoute lors de la préparation) sont cause de cette instabilité.

1. On est à un pH de 7,4

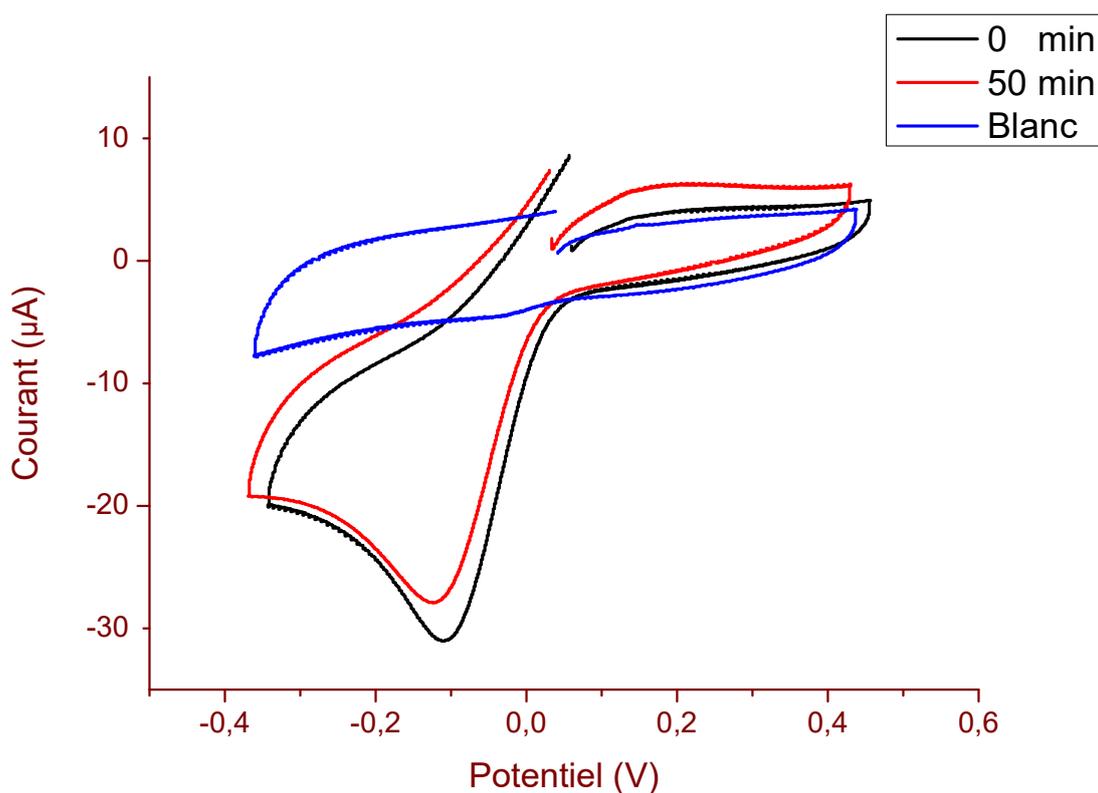


Figure 4.9: Voltammogramme de la 2,6-DCBQ à $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans du milieu minimum sur le dispositif expérimental usuel, vitesse de balayage 50 mV/s , sens de balayage vers l'oxydation.

Sur la durée de l'expérience (60 min) et la concentration mise en jeu ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) la quinone reste donc relativement stable. Pour toute application correspondant à des durées plus longues, des phénomènes plus complexes d'hydroxylation, d'additions nucléophiles ou de dimérisation peuvent prendre place. Notons néanmoins que la cinétique de ces phénomènes reste faible comparée à la grande vitesse de réduction des benzoquinones par la photosynthèse (temps de demi-réaction de quelques secondes voire chapitre 1 contre un temps de demi-réaction de plus d'une heure pour ces réactions).

4.4 Empoisonnement par les quinones

Les quinones constituent une classe de composés récurrents dans la Nature. On les trouve chez les plantes, les champignons et les bactéries. Elles jouent principalement le rôle de transporteurs d'électrons dans les chaînes de transfert d'électrons propres à la respiration cellulaire et à la photosynthèse. Les classes de quinones actives dans le corps humain comprennent les plastoquinones, les ubiquinones, les menaquinones (vitamine K).

Toutefois, si les quinones peuvent avoir un effet d'empoisonnement c'est parce qu'elles possèdent une multitude de propriétés physico-chimiques : oxydantes, électrophiles accepteurs de Michael, et enfin colorées puisqu'elles absorbent dans l'ultraviolet et le visible. Dans la photobiologie des quinones, on a en effet montré que les quinones photoexcitées peuvent être réactives vis à vis l'abstraction d'atomes d'hydrogène ou d'électrons et le transfert d'énergie à d'autres molécules. Ces réactions peuvent notamment conduire à une destruction directe des composants biochimiques essentiels à la vie de la cellule [114]. Si la finalité de nos travaux est l'étude de la toxicité des quinones sous lumière intense dans nos conditions expérimentales de la dérivation des électrons de la photosynthèse, il est toutefois nécessaire de considérer d'abord leur toxicité en l'absence de source lumineuse. C'est pour cela que le travail qui suivra envisagera seulement les deux premiers aspects de la toxicité à savoir l'effet oxydant et accepteur de Michael.

4.4.1 La toxicité des quinones dans la chimie médicinale

C'est dans le domaine de la chimie médicinale que l'on trouve les premières descriptions de la toxicité des quinones et de leurs mécanismes d'action dans le corps humain. En effet, l'Homme peut être exposé aux quinones présentes dans l'environnement, ou provenant du métabolisme oxydatif de médicaments ou des toxines ingérées. L'exemple de l'acétaminophène (ou le paracétamol) est révélateur (**Fig 4.10**).

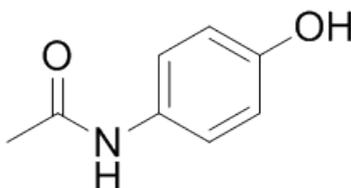


Figure 4.10: Structure de l'acétaminophène

Cet antalgique (anti-douleur) et antipyrétique (anti-fièvre) figure parmi les médicaments les plus communs, utilisés et prescrits au monde. Une surdose d'acétaminophène peut toutefois causer une jaunisse différée et entraîner la mort du patient du fait d'une hépatotoxicité (foie) sévère et d'une nécrose centrolobulaire (du foie) éventuellement associée à une nécrose tubulaire du cortex du rein. La toxicité induite a été attribuée à un métabolite mineur, la N-acétyl-p-benzoquinonéimine formée par une oxydase à fonction mixte du cytochrome P-450, hémoprotéine impliquée dans la fonction de détoxification de xénobiotiques. Ce métabolite est lui même ensuite hydrolysé en benzoquinone, autre métabolite considéré comme toxique (**Fig 4.11**) [119].

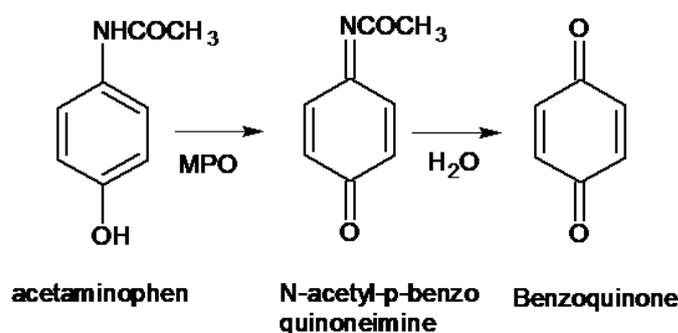


Figure 4.11: Métabolisme oxydatif de l'acétaminophène [119] ; MPO : Myeloperoxydase

Pour autant, les quinones peuvent aussi être formées par une auto-oxydation in vivo. Les catécholamines (dopamine, adrénaline et noradrénaline) sont des neurotransmetteurs qui opèrent dans le système nerveux central dans la médullosurrénale, et dans le système nerveux sympathique. La synthèse des catécholamines comprend une première conversion de la DOPA en dopamine puis en noradrénaline et finalement en adrénaline. L'auto-oxydation² de ces catécholamines en présence d'ions d'éléments de transition est lente et produit des quinones (structure dite « adénochrome »), de la mélanine, des radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène. La neuromélanine, pigment noir polymérique contenant les fonctions quinones des catéchols et les radicaux semi-quinones formés lors de l'auto-oxydation, se dépose avec le vieillissement dans le corps cellulaire neuronal du cerveau, particulièrement au niveau de la *substantia nigra*. La maladie de Parkinson a pu

2. Ce terme désigne l'oxydation spontanée d'une substance à température ambiante en présence de l'oxygène.

être reliée chez beaucoup de patients à une *substantia nigra* riche en fer et en neuromélanine. L'ingestion de manganèse peut aussi causer la maladie de Parkinson possiblement par catalyse de l'auto-oxydation de catécholamines (**Fig 4.12**) [120].

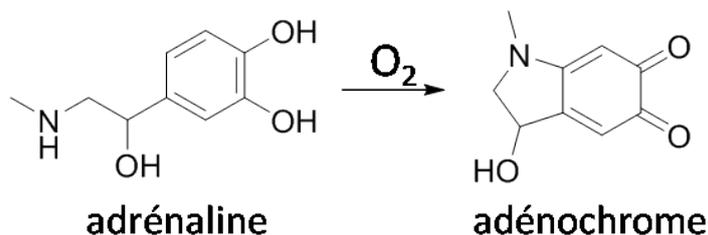


Figure 4.12: Auto-oxydation de l'adrénaline [119]

4.4.2 Les origines de la toxicité des quinones-la «protein binding theory»

Plusieurs hypothèses proposent une explication moléculaire à la cytotoxicité des quinones. La « Protein Binding Theory » est apparue en premier. Elle se base sur des travaux préalables réalisés dans le but d'établir les fondements moléculaires de la carcinogénèse chimique et a été utilisée à tort pour expliquer la toxicité de l'acétaminophène [121]. La séquence des événements moléculaires postulés est la suivante. La quinone électrophile³ est activée métaboliquement et subit ensuite une addition avec le GSH intracellulaire (« alkylation ») ce qui conduit à un « adduit » contenant le groupement GS. Ces adduits sont transportés hors de la cellule et métabolisés par le rein en acide mercapturique urinaire, ce qui provoque la déplétion du GSH. Une fois le GSH éliminé, des macromolécules issues de la membrane cellulaire ou d'autres protéines réagissent à leur tour avec l'électrophile ce qui cause des dommages irréversibles et induit la mort des cellules [122].

Par ailleurs, la quinone peut, en tant qu'accepteur de Michael, réagir directement avec des nucléophiles, notamment le GSH. Ainsi, l'addition d'une quantité équimolaire de GSH à des benzoquinones conduit à un changement de leur spectre d'absorption UV avec l'apparition d'un pic à 303 nm révélant la formation de dérivés thioethers. Cela s'explique par des additions de type Michael produisant des adduits hydroquinones-GSH. L'ajout

3. Il existe de nombreux électrophiles potentiels issus des quinones et qui génèrent l'alkylation du GSH ou de protéines. Par réduction, certains motifs permettent de former des quinones méthides (« bioreductive alkylation »). Par oxydation, certains motifs peuvent conduire à des époxydes

de GSH en excès entraîne la formation d'adduits hydroquinones avec 2 ou 3 GSH [123] comme dans la séquence des évènements explicitée ci-dessous :



4.4.3 Les quinones agents de «cross-linking»

Une autre voie réactive est liée au fait que les quinones sont des agents réticulants (« cross-linking »). En effet, le potentiel standard du couple quinone/hydroquinone est fortement influencé par le degré et la nature du ou des substituants. Ainsi la présence d'un substituant donneur sur la quinone donne lieu à une hydroquinone qui s'oxyde plus facilement que l'hydroquinone correspondant à la quinone de départ (Le potentiel standard est déplacé vers les potentiels le plus bas du fait du groupement donneur). Au sein d'un mélange, une hydroquinone substituée pourra donc être réoxydée par une quinone de départ non substituée. De cette façon, une seule molécule de quinone peut donner lieu à de multiples additions nucléophiles [124] ou générer des « crosslinks » entre des sites nucléophiles sur des macromolécules [125] conduisant éventuellement à une inactivation enzymatique (**Fig 4.13**).

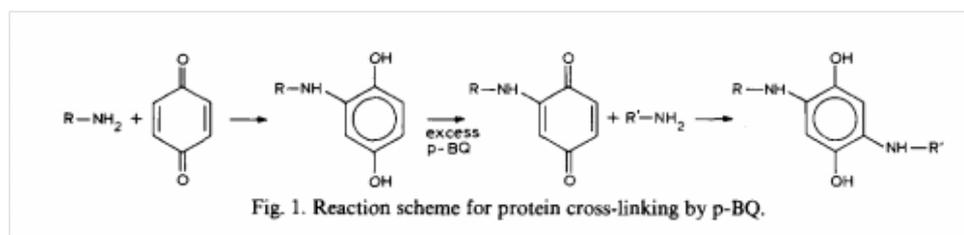


Figure 4.13: «Cross-linking» de la protéine par la quinone [126]

4.4.4 L'hypothèse du stress-oxydant : cycle redox et activation du dioxygène

Si la « protein binding theory » permet de rendre compte de la toxicité dans certains cas, elle se révèle insuffisante dans d'autres. Ainsi, la cytotoxicité induite par l'acétaminophène sur les hépatocytes peut être supprimée par l'ajout d'antioxydants, d'agents anti-radicalaires, de ligands de fer ou de réducteurs de thiols qui restent sans action sur l'alkylation. De plus la 3,5-(CH₃)₂-acétaminophène se lie peu (aux potentiels nucléophiles) et se révèle très hépatotoxique alors que la 2,6-(CH₃)₂-acétaminophène se lie fortement tout en étant peu hépatotoxique [127]. Ceci suggère donc la présence d'un mécanisme alternatif qui met en jeu un stress oxydant.

Cette situation de « stress oxydant » a été identifiée à la fin du XIX^{ème} où des travaux ont mis en évidence que l'ajout d'un réducteur (phénylhydrazine) aux érythrocytes (globules rouges ou hématies) provoquait une dénaturation oxydante de l'hémoglobine en pigments verts qui précipitaient. Aujourd'hui il est bien connu que l'hémoglobine catalyse l'oxydation de la phénylhydrazine par l'oxygène ce qui donne naissance à des agents oxydants et radicalaires qui oxydent l'hémoglobine et les constituants des membranes. Le stress oxydant est aujourd'hui bien identifié et défini comme une situation liée à une production excessive et non contrôlée d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Quand les mécanismes de défense anti-oxydants (permanents ou mis en place suite à un stress) sont débordés par cette production (défaut des défenses anti-oxydantes, inflammation, stress extérieur lié à des sources exogènes -soleil, tabac, alcool etc. . .), un état de stress oxydant s'installe et conduit par la suite à des pathologies graves (certains cancers, dégénérescences neuronales, diabète, maladies cardio-vasculaires. . .).

Dans ce contexte, les quinones peuvent être impliquées à travers leur réduction mono-électronique en semiquinones radicalaires. Cela peut se faire sous l'action de la NADPH réductase du cytochrome P-450 par exemple. La plus grande part des semiquinones formées sont réoxydées dans les conditions aérobies et peuvent ainsi entreprendre des cycles redox inutiles pour l'organisme en réduisant le dioxygène en présence et former des radicaux superoxydes (**Fig 4.14**).

Les hydroquinones, produits de réduction biélectroniques des quinones peuvent également être le processus de formation de l'anion superoxyde. Ce dernier et ses dérivés constituent les ROS (Reactive Oxygen Species). Ainsi, l'anion superoxyde, radical anionique peut ensuite générer du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 par dismutation enzymatique ou spontanée. Les radicaux superoxydes peuvent conduire soit en présence de traces de fer soit par réaction avec H_2O_2 à des radicaux hydroxyles, agents oxydants puissants qui seraient responsable de la grande partie des dommages encourus par des macromolécules essentielles lorsque la cytotoxicité oxydante est observée [128]. La séquence des événements possibles est représentée ci-dessous, des étapes pouvant se produire sans faire appel au reste de la séquence. BQ désigne la benzoquinone, BQH₂ la benzoquinone réduite.

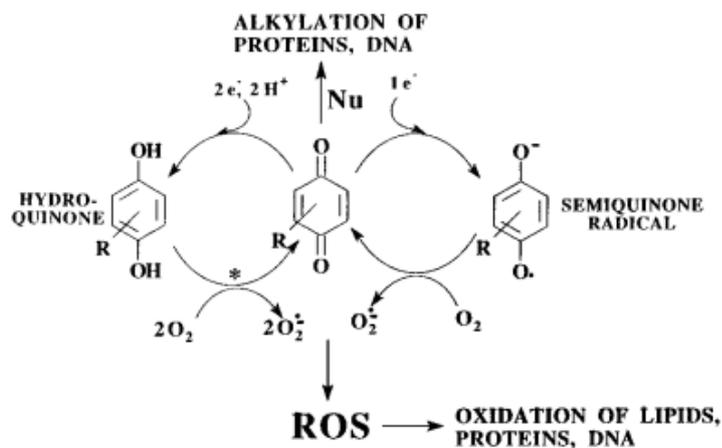
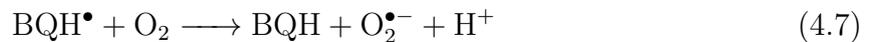
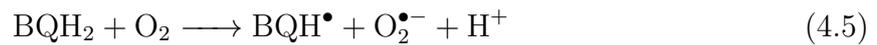


Figure 4.14: Schémas de cycles redox catalysés par la quinone. L'astérisque indique une possibilité de réalisation uniquement pour les quinones qui s'autooxydent [129]

4.4.5 Les hépatocytes : des cellules modèles pour l'étude des mécanismes de cytotoxicité des quinones

Les travaux de S. Orrenius et coll menés sur des hépatocytes de rats isolés illustrent l'effet du stress oxydant induit par les quinones. Il a été ainsi montré que la ménadione (2-méthyl-1,4-naphtoquinone) causait une respiration résistante au cyanure⁴, l'oxydation du GSH et la perte de la viabilité cellulaire. La toxicité est par ailleurs exacerbée par l'inactivation de la GSH reductase [130]. D'autres chercheurs ont montré que l'adriamycine, un anticancéreux anthracyclique n'était pas toxique pour les hépatocytes de rats sauf si le GSH était préalablement éliminé et la glutathione réductase inactivée [131]. Ces travaux mettant en jeu des études sur les effets de la déplétion du glutathion et de l'inactivation de la glutathione réductase ont donné de fortes preuves sur le rôle vital protecteur de la glutathione lors du stress oxydant. Ainsi les hépatocytes de rats isolés constituent des cellules modèles pour étudier la part qu'a le stress oxydant dans la toxicité induite.

C'est dans cette logique que la cytotoxicité d'une série de benzoquinones substituées (sur des hépatocytes de rats) a été étudiée (**Fig 4.15**). Les expériences ont été conduites à des concentrations cellulaires de 10^6 cellules/mL. Pour cela, les cellules ont été suspendues dans un tampon de Krebs-Henseleit contenant 12,5 mM d'Hepes à pH 7,4 dans une atmosphère à 5% de CO_2 . La cytotoxicité a alors été définie comme le pourcentage de cellules laissant entrer le bleu de trypan (solution à 0,16 %) après incubation avec les quinones. La concentration ED_{50} représente la concentration de quinones nécessaires pour causer 50 % de cytotoxicité en 2h. La concentration en quinones lors des mesures d' O_2 a été fixée à 100 μM . La prise d'oxygène a été mesurée avec électrode de Clark en présence de KCN pour inhiber la respiration mitochondriale.

L'ordre de la cytotoxicité trouvé en partant du plus toxique est le suivant : chloranil, 2-Br, 2- CH_3 , 2,6-(CH_3)₂, 2,5-(CH_3)₂ et 2,3,5-(CH_3)₃. Plus le potentiel redox de la quinone est élevé, plus elle apparaît globalement cytotoxique. La cytotoxicité est aussi corrélée

4. La respiration résistante au cyanure est non mitochondriale puisque chez les animaux l'injection de cyanure bloque le transfert électronique dans la chaîne mitochondriale en inhibant l'activité de la cytochrome oxydase. Néanmoins, des voies alternatives peuvent se mettre en place en mettant en jeu notamment des flavoprotéines oxydases qui réduisent le dioxygène.

Substituted benzoquinone	Redox potential ^a $E(Q/Q)_7$ (mV)	$E_{1/2}$ (mV)	Cytotoxicity ^b ED ₅₀ in 2 h nmol per 10 ⁶ cells		CN ⁻ resist. O ₂ uptake ^c nmol · 10 ⁶ cells min ⁻¹
			-azide	+azide	
Chloranil		+140	75 ± 5	75 ± 5	0
2-Br-1,4-Benzoquinone		-85	100 ± 15	100 ± 12	0.7
1,4-Benzoquinone	+99	-400	150 ± 15	150 ± 15	0.8
2-CH ₃ -1,4-Benzoquinone	+23	-478	120 ± 10	145 ± 15	1.3
2,5-(CH ₃) ₂ -1,4-Benzoquinone	-66	-557	250 ± 25	200 ± 20	3.6
AZQ (Diaziquone)	-70		500 ± 50	50 ± 5	32.4
2,6(CH ₃) ₂ -1,4-Benzoquinone	-80	-557	200 ± 25	150 ± 20	4.4
2,6(OCH ₃) ₂ -1,4-Benzoquinone	-150	-630	100 ± 15	38 ± 7	53.9
Trimethyl-1,4-Benzoquinone	-165	-636	300 ± 25	250 ± 25	12.7
Trihydroxybenzene	-165		150 ± 20	150 ± 20	1.6
Duroquinone	-240	-738	600 ± 75	100 ± 10	8.6

Figure 4.15: Bilan comparatif de la cytotoxicité des benzoquinones [128].

au degré de déplétion du GSH due à la formation d'adduits soufre-quinones plutôt qu'à son oxydation [132] [133] [134]. Ainsi, l'inactivation de la catalase ou de la glutathione reductase (qui aident à décomposer H₂O₂ en H₂O et O₂) n'a pas augmenté la respiration résistante au cyanure ni la cytotoxicité de la benzoquinone. D'une manière cohérente, la duroquinone 2,3,5,6-(CH₃)₄ qui ne forme pas de produits conjugués avec le GSH en raison d'une faible électrophilie liée à la présence de quatre groupements méthyles, se montre peu cytotoxique même en causant une respiration résistante au cyanure et en oxydant le GSH. La duroquinone est néanmoins 6 fois plus cytotoxique quand la catalase ou la glutathione réductase sont inactivées. Ces résultats suggèrent que le stress oxydant induit par la quinone est l'origine de cytotoxicité si le système de défense cellulaire contre le peroxyde d'hydrogène est rendu dysfonctionnel. La cytotoxicité effective semble liée à l'électrophilie de la quinone (et donc indirectement à son potentiel redox) et à sa capacité à former des adduits avec le GSH ou ses dérivés et à alkyler les groupements thiols protéiques de macromolécules essentielles.

Il est intéressant de comparer ces résultats à ceux obtenus sur des naphthoquinones dans des conditions similaires (**Fig 4.17**). Les naphthoquinones sont beaucoup plus cytotoxiques que les benzoquinones alors même que leur potentiel redox est inférieur. Leur comportement reste toutefois similaire avec la cytotoxicité qui augmente avec leur potentiel redox. La cytotoxicité est probablement liée dans ce cas à la fois à la réactivité de la

quinone et ses dérivés et au stress oxydant, en raison de la capacité des naphtoquinones à entreprendre des cycles redox avec le dioxygène.

Parent quinone	Quinone substituent	Redox potential ^a (mV) $E(Q/Q)_7$	Cytotoxicity ^b ED ₅₀ in 2 h nmol · 10 ⁶ cells		O ₂ uptake ^c nmol · 10 ⁶ cells in 5 min
			- azide	+ azide	
Dichlone	2,3(Cl) ₂ -	-36	30 ± 5	30 ± 2	9.8 ± 2 (100 μM)
1,2-Naphthoquinone	None	-89	40 ± 4	15 ± 2	30.3 ± 0.3 (10 μM)
Juglone	5 OH-	-93	20 ± 5	10 ± 5	145 ± 15 (10 μM)
Naphthazarin	5,8(OH) ₂ -	-110	15 ± 5	7 ± 3	214 ± 30 (10 μM)
2-Amino-1,4-Naphthoquinoneimine	2NH ₂ -		22 ± 4	9 ± 3	219 ± 30 (10 μM)
9,10-Phenanthrenequinone	None	-124	80 ± 10	17 ± 5	192 ± 20 (10 μM)
1,4-Naphthoquinone	None	140	65 ± 5	30 ± 5	24.3 ± 6 (10 μM)
Plumbagin	5OH2CH ₃ -	-156	25 ± 5	n.d.	135 ± 15 (10 μM)
Menadione	2CH ₃ -	-203	150 ± 15	85 ± 5	185 ± 20 (10 μM)
1,4-Naphthoquinone	2,3-(OCH ₃) ₂ -	-240	600 ± 50	35 ± 5	143 ± 15 (10 μM)
1,4-Naphthoquinone	2,3-(CH ₃) ₂ -	-240	400 ± 50	85 ± 5	82 ± 10 (10 μM)
Mitomycin C		-310	1000 ± 100	500 ± 50	3.5 ± 0.3 (100 μM)
Adriamycin		-328	1000 ± 100	>1000 ± 100	1.0 ± 0.3 (100 μM)
Lawson	2OH-	-415	400 ± 50		1.5 ± 0.3 (100 μM)

Figure 4.16: Bilan comparatif de la cytotoxicité des naphtoquinones [128].

4.5 La toxicité des benzoquinones sur les algues *Chlamydomonas reinhardtii*

La question se pose donc de savoir si la cytotoxicité induite par les quinones sur notre système d'algues suit un comportement similaire à celui décrit dans la littérature pour des hépatocytes de rats, attribué majoritairement à la réactivité de la quinone ou de ses dérivés par alkylation. Pour cela, nous avons fait le choix d'étudier la toxicité des quinones précédemment utilisées : à savoir les BQ, 2,6-(CH₃)₂BQ, phenyl-BQ, 2,6-DCBQ en y ajoutant la 2,3,5,6-(CH₃)₄BQ (duroquinone). En effet, l'addition de Michael est basée sur

l'électrophilie de la quinone que l'on peut relier au potentiel redox du couple Q/QH₂ [135]. Dans ce contexte, la présence de substituants donneurs comme le groupement méthyle doit limiter cette réactivité. Au contraire, des groupements attracteurs comme le chlore doivent l'exacerber. Inversement si la toxicité est due à un stress oxydant, l'ordre de toxicité serait inversé. En effet, comme nous l'avons vu, l'implication du stress oxydant et de la production de ROS est liée à la facilité avec laquelle le radical semi-quinone ou l'hydroquinone peuvent réagir avec le dioxygène pour conduire à l'anion superoxyde. Sachant que le couple O₂/O₂^{•-} a un potentiel standard apparent de -0,16 V / ESH à pH 7, les semi-quinones ou hydroquinones les plus réactives doivent donc posséder un potentiel standard apparent le plus négatif possible.

Si l'empoisonnement par addition de Michael prévaut, l'ordre de toxicité doit être comme suit : 2,6-DCBQ, BQ, phényl-BQ, 2,6-(CH₃)₂ BQ et la duroquinone. Inversement si la toxicité était due à un stress oxydant, l'ordre de toxicité serait inversé et la duroquinone, entièrement substituée, présenterait la plus grande toxicité en accord avec sa capacité à entreprendre des cycles redox parasites, alors même que la 2,6-DCBQ serait la moins toxique. Les quinones chlorées (DCBQ ou TCBQ) possèdent des potentiels élevés ($E^{\circ'}(Q/Q^{\bullet-}) = 0,470 - 0,650$ V / ESH), ce qui rend la production d'anion superoxyde thermodynamiquement peu favorisée [118]. Inversement, pour la duroquinone (quatre groupements méthyles), la valeur de $E^{\circ'}(Q/Q^{\bullet-})$ est très négative (-0,264 V / ESH), ce qui favorise la formation d'anion superoxyde. Au bilan, la duroquinone, entièrement substituée avec des groupements donneurs, présenterait la plus grande toxicité alors que la 2,6-DCBQ serait la moins toxique.

Toutefois, le terme « thermodynamiquement peu favorisé » ne signifie pas que l'anion superoxyde ne se forme pas. Il est nécessaire de tenir compte des constantes de vitesse aller et retour. Leur calcul dans le cadre de la théorie de Marcus montre que pour les valeurs de potentiels intermédiaires comme les quinones diméthylées ($\simeq -0,080$ V / ESH), la constante de vitesse aller ($\simeq 10^7$ M⁻¹.s⁻¹) reste suffisamment élevée même si la constante d'équilibre reste modérée ($K \simeq 5.10^{-2}$) [118]. On notera que pour les quinones à potentiel très positif, la constante de vitesse aller est négligeable, ce qui défavorise cinétiquement et thermodynamiquement la formation de O₂^{•-}.

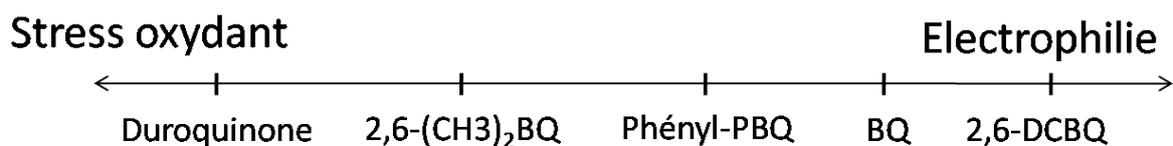


Figure 4.17: Ordre de réactivité attendu selon la nature du mécanisme de réaction prédominant.

4.5.1 Détermination de la période de duplication des algues

Le critère retenu pour estimer la viabilité des algues après incubation avec les quinones a été leur capacité à se reproduire. Pour cela, les algues seront incubées avec les quinones dans les conditions d'expérience usuelles de chronoampérométrie et diluées, puis leur capacité à se reproduire sera évaluée. Avant toute chose, une étude préalable de type « contrôle » est nécessaire pour estimer la vitesse de croissance et la période de duplication des algues sans incubation avec les quinones.

Des populations d'algues ont ainsi été cultivées en milieu TrisAcétatePhosphate sous faible lumière dans les conditions de culture similaires à celles utilisées pour faire pousser les algues pour les expériences. Les concentrations initiales étaient de 500, 10^3 , $5 \cdot 10^3$, 10^4 , $5 \cdot 10^4$, 10^5 cellules/mL et se situent toutes dans le domaine de croissance exponentielle. Les concentrations ont ensuite été mesurées sur deux échantillons différents toutes les 24 heures et ce jusqu'à la limite de la phase exponentielle (environ $2 \cdot 10^6$ cellules/mL). Le facteur de croissance (le nombre par lequel la concentration cellulaire a été multipliée entre deux mesures successives en l'occurrence toutes les 24 h) ainsi que son logarithme ont été tracés en fonction du temps ce qui correspond aux graphes **Fig 4.18** et **Fig 4.19**. L'allure du facteur de croissance en fonction du temps correspond à la phase exponentielle de la croissance des cellules reportée dans la littérature [136]. Le logarithme népérien du facteur de croissance donne ainsi une droite dont la valeur de la pente peut être déterminée et est égale à $0,134 \text{ h}^{-1}$. Il est ensuite possible de remonter à la période de duplication des cellules qui est d'environ 7,5 heures en regardant l'inverse de la pente.

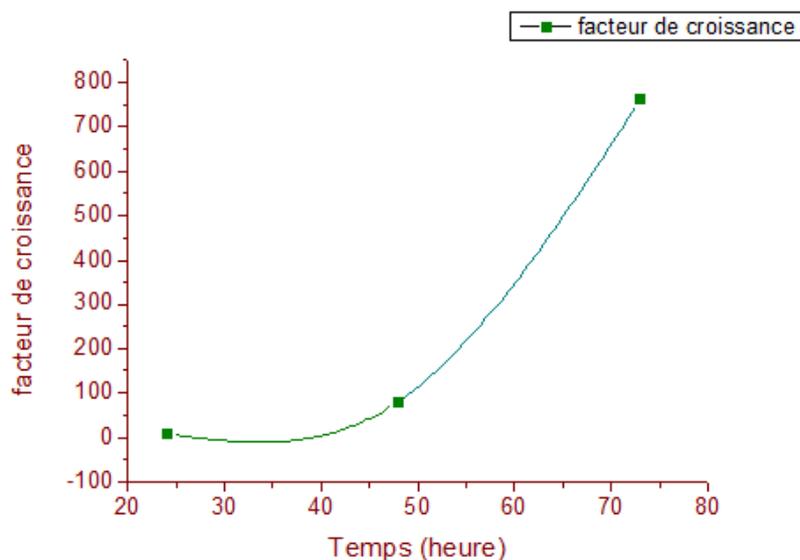


Figure 4.18: Facteur de croissance cellulaire moyen en fonction du temps.

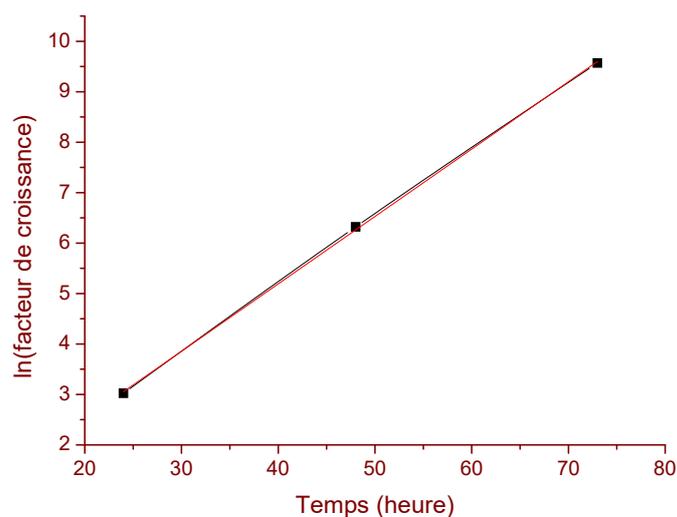


Figure 4.19: Logarithme du facteur de croissance cellulaire moyen en fonction du temps.

4.5.2 Les expériences de toxicité

Les expériences d’empoisonnement sont ensuite menées sur des populations d’algues considérées en phase mi-exponentielle à des concentrations variant de 1 à 2 millions de cellules/mL et concentrée à $2 \cdot 10^7$ cellules/mL. Ces populations sont incubées en quinones pendant une heure puis diluées à 500, 5000 et $5 \cdot 10^5$ cellules/mL. Toutes les 24 heures, leurs concentrations sont alors mesurées et il est ainsi possible de remonter à la proportion de

cellules initiales capables de se reproduire après incubation avec les quinones, connaissant la vitesse de duplication des algues. Nous définissons alors une concentration seuil en quinones incubées C_{M80} à partir de laquelle plus de 80% des cellules sont incapables de se reproduire et une concentration seuil C_{V80} en dessous de laquelle 80 % des cellules sont capables de se reproduire.

Quinone	C_{M80} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	C_{V80} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	I nor	E red(Q/QH ₂) (V)
Benzoquinone	80	70	0	-0,1
2,5-DCBQ	20	10	0,5	-0,1
2,6-DCBQ	20	10	1	-0,1
Phenyl-PBQ	20	10	0,9	-0,3
2,6-(CH ₃) ₂ BQ	50	40	0,7	-0,5
2,5-tertbutyl-PBQ	>100	>100	0,02	<-0,5
2,6-tertbutyl-PBQ	>100	>100	0,02	<-0,5
Duroquinone	>100	>100	0,1	<-0,5

Table 4.2: Tableau récapitulatif des différentes concentrations seuil de toxicité C_{M80} et C_{V80} pour différentes quinones. Photocourants enregistrés sur WT normalisés par rapport à la 2,6-DCBQ. Potentiels de pic de réduction indicatifs extraits de la voltamétrie cyclique de la forme benzoquinone vs Ag/AgCl.

Nous constatons que les quinones les plus cytotoxiques sont celles qui ont les potentiels de réduction les plus positifs et qui sont donc réduites assez facilement. La duroquinone entièrement substituée se réduit difficilement et n'est pas cytotoxique dans les conditions sondées. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés sur les hépatocytes et laissent à penser que dans nos conditions de culture, les quinones sont des agents réactifs vis-à-vis des macromolécules essentielles, le stress oxydant potentiellement causé par les quinones, étant lui inhibé par les défenses cellulaires. La benzoquinone, quant à elle, exhibe une cytotoxicité modérée ce qui est sans doute dû à sa grande hydrophilie et de fait, se trouve à des concentrations effectives beaucoup plus faibles dans les compartiments lipidiques des cellules.

La 2,6 di-tertiobutyl-benzoquinone n'est pas cytotoxique dans les conditions sondées. Elle l'est cependant sur des périodes d'incubation plus longues de l'ordre de 24 h, la couleur des algues devient alors vert pâle puis jaune et les expériences confirment sa cy-

tototoxicité même à des concentrations inférieures à 50 μM . Son isomère de position, la 2,5-di-tertiobutyl-benzoquinone n'exhibe pas le même comportement et se montre cyto-compatible sur de longues périodes de temps. Ce résultat montre que l'encombrement stérique joue probablement un rôle dans la prévention de la cytotoxicité et est cohérent avec une action de la quinone ou de ses dérivés sous la forme de réactions d'alkylation. Enfin la 2,6-DMBQ exhibe une toxicité située entre celle de la 2,6-DCBQ et celle de la tétraméthylbenzoquinone en accord avec un degré de substitution/effet électroniques intermédiaires.

Il devient possible à présent de définir des critères de choix des quinones qui englobent les différents résultats précédemment obtenus. Il semble que la capacité à dériver des quinones est plus élevée quand leur potentiel de réduction est plus élevé. Inversement, la toxicité des quinones est favorisée par ce potentiel de réduction élevé en raison de substituants à effet attracteur. Dans ce contexte, il est possible de jouer sur l'encombrement stérique et le degré de substitution des quinones pour les rendre moins toxiques tout en conservant leurs propriétés dérivatrices. Nous nous sommes ainsi lancés dans une logique de synthèse organique de quelques quinones présentant les propriétés physicochimiques requises. Dans la partie qui suit, nous présenterons les principaux résultats obtenus sur trois quinones synthétisées⁵.

4.6 Synthèse de nouvelles quinones

4.6.1 La 2,5-dichloro-3,6-dimorpholine-1,4-benzoquinone

La 2,5-dichloro-3,6-dimorpholine-1,4-benzoquinone (**Fig 4.20**) a été obtenue à partir du chloranil (tétrachloro-1,4-benzoquinone en nomenclature systématique). Le composé a été caractérisé par RMN ^1H (v. Partie expérimentale). L'ajout du motif morpholine doit encombrer considérablement la structure et diminuer, du fait de son caractère donneur, son caractère électrophile et de fait sa réactivité et sa cytotoxicité. La présence d'atomes de chlore doit permettre à la quinone de maintenir des propriétés de dérivation

5. En collaboration avec l'équipe du Dr. Laurence Grimaud (Sous-groupe « Mécanismes de réactions catalysées par des organométalliques », Groupe « Electrochimie » UMR 8640)

significatives comme c'était le cas de la dichlorobenzoquinone en maintenant un potentiel de réduction suffisamment élevé ainsi qu'une grande lipophilie. Par ailleurs, la solubilité de la dichlorobenzoquinone dans l'eau devrait être considérablement améliorée grâce aux groupements morpholine.

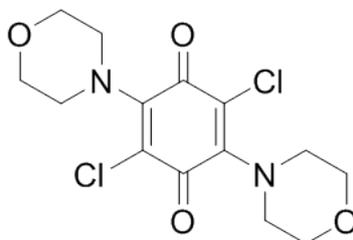


Figure 4.20: Structure de la 2,5-dichloro-3,6-dimorpholine-1,4-benzoquinone synthétisée au laboratoire.

Cytotoxicité La cytotoxicité de ce composé a été évaluée selon le même protocole que celui mis en place pour les quinones précédemment. A $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ le composé n'a pas d'influence sur la capacité de l'algue à se reproduire et n'est donc pas cytotoxique.

Voltamétrie cyclique Les potentiels de réduction et d'oxydation de cette molécule ont été déterminés par voltamétrie cyclique sur électrode d'or et comparés à ceux de la 2,6-DCBQ⁶ (**Fig 4.21**). L'ajout des groupements morpholine décale sensiblement les potentiels de réduction vers des valeurs plus cathodiques ($-0,1 \text{ V}$ vs $-0,45 \text{ V}$ / Ag/AgCl).

Chronoampérométrie Le photocourant a ensuite été mesuré dans les conditions expérimentales usuelles en présence de cette quinone et comparé à celui donné par la 2,6-DCBQ (**Fig 4.22**). Les photocourants obtenus sont très faibles dans le cas de cette quinone (inférieur à $1 \mu\text{A}$) ce qui montre que la DCBQ a perdu de sa capacité de dérivation après addition des deux groupements morpholines.

Interaction avec la chaîne photosynthétique Pour essayer de comprendre l'origine de cette perte des performances, des courbes d'induction de fluorescence sur des algues *Chlamydomonas reinhardtii* en présence de la 2,5-dichloro-3,6-dimorpholine-1,4-benzoquinone ont été réalisées (**Fig 4.23**). La quinone paraît inhiber complètement le

6. il se peut qu'en milieu biologique ces potentiels soit différents du fait d'une interaction avec les résidus qui rendent la réduction de la quinone plus facile. Ces potentiels sont donc donnés à titre indicatif.

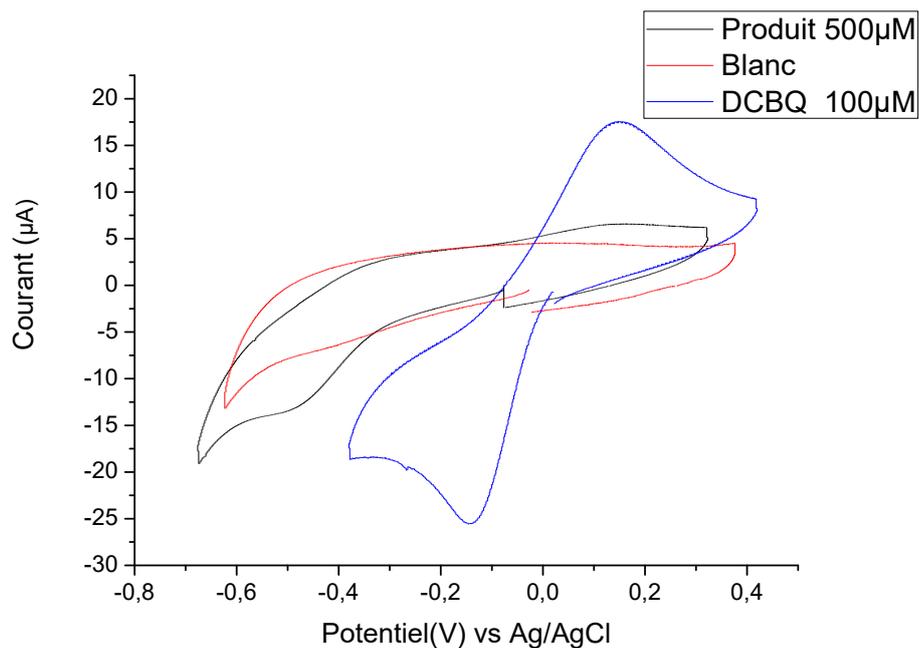


Figure 4.21: Voltamétrie cyclique de la 2,5-dichloro-3,6-dimorpholine-1,4-benzoquinone dans du milieu minimum. Vitesse de balayage : 100 mV.s^{-1} ; $500 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$.

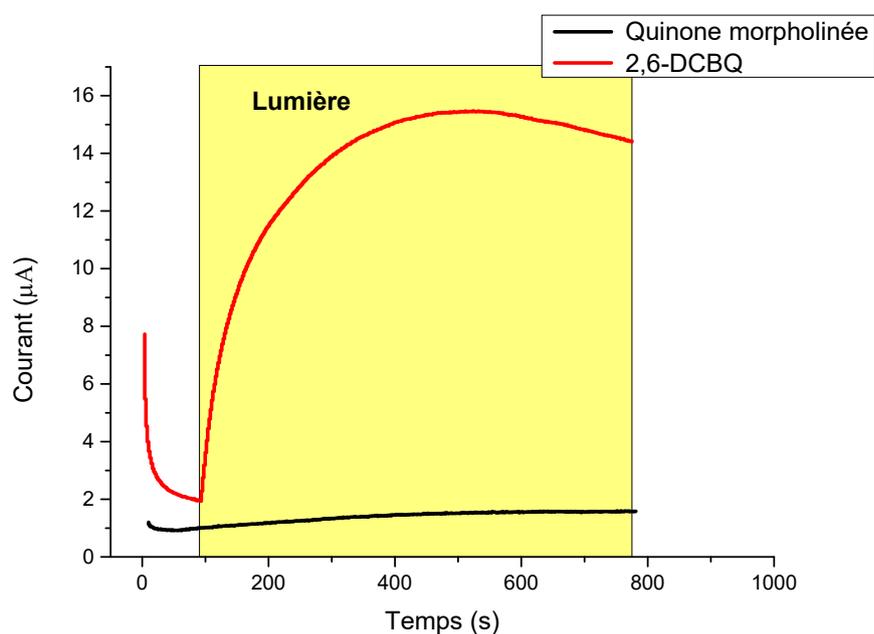


Figure 4.22: Courants obtenus. $0,38\text{V}$ vs Ag/AgCl; Quinones : $100 \text{ } \mu\text{M}$; $I=60\text{mW}$; WT : $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$.

transfert électronique dans la chaîne photosynthétique puisque la fluorescence atteint rapidement sa valeur maximale. La voie de désexcitation de la chlorophylle par la photo-

synthèse est inhibée. Ceci suggère que cette quinone se lie à la poche Q_B d'une manière irréversible similaire à celle de l'inhibiteur DCMU. Son faible potentiel de réduction limite son efficacité, tandis que ses groupements azote favorisent la fixation de cette quinone dans la poche via des interactions avec les résidus environnants.

Au bilan, cette molécule attendue comme un bon candidat, se trouve être malheureusement un très bon inhibiteur de la chaîne photosynthétique aux concentrations utilisées.

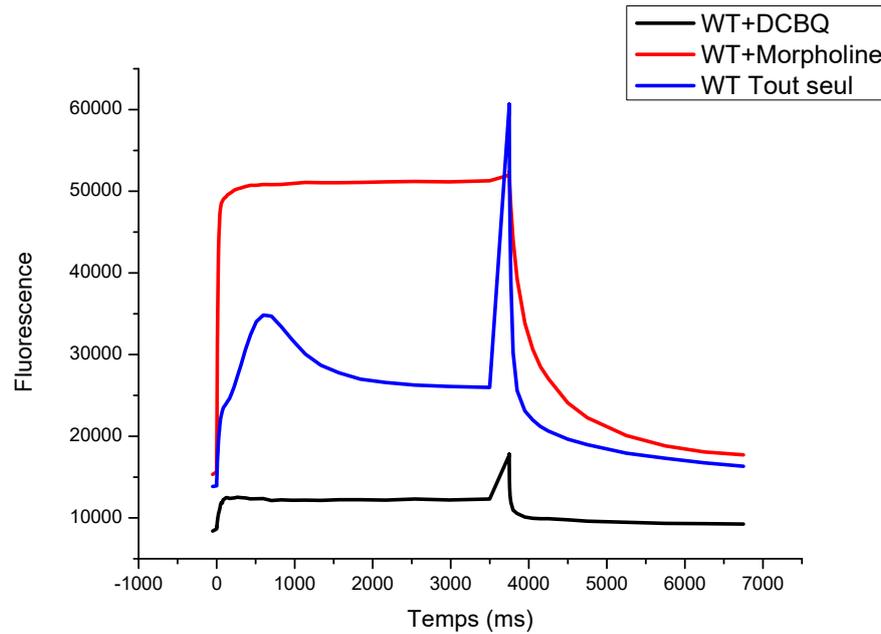


Figure 4.23: Graphe d'induction de fluorescence. $I=135 \mu\text{E}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; Quinones :100 μM ; WT : 2.10^7 cellules.mL $^{-1}$.

4.6.2 La 2,5-dichloro-3,6-di-*tert*-butylthio-1,4-benzoquinone

L'insertion d'un groupement contenant de l'azote ayant induit des variations du potentiel de réduction de la quinone via un effet donneur, le recours à un atome dont les effets électroniques et de recouvrement orbitaux sont moins marqués semble pertinent. A ce titre, l'atome de soufre avec une électronégativité comparable à celle de l'atome de carbone mais une polarisabilité différente (dans le contexte de la théorie HSAB, le soufre est « mou » alors que le carbone est « dur ») doit conduire à orbitales π suffisamment éloignées pour ne pas se recouvrir avec celles du carbone auquel il est lié.

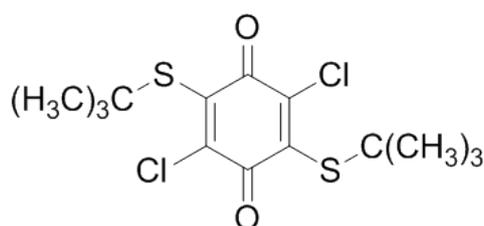


Figure 4.24: Formule de la 2,5-Dichloro-3,6-di-*tert*-butylthio-1,4-benzoquinone synthétisée au laboratoire.

C'est dans cette logique que l'ajout formel de deux groupements 2-méthyl-2-propanethiolates à la 2,5-DCBQ a été réalisé et conduit à la 2,5-dichloro-3,6-di-*tert*-butylthio-1,4-benzoquinone comme nouveau candidat. En pratique, ce composé a été obtenu par la substitution de deux atomes de chlore du chloranil par deux groupements 2-méthyl-2-propanethiolate (**Fig 4.24**).

Détermination des potentiels d'oxydation et de réduction Comme précédemment, la voltamétrie cyclique nous permet de remonter au potentiel de réduction et d'oxydation de la quinone (**Fig 4.25**). Le potentiel de réduction de la quinone semble ne pas être modifié par rapport à la 2,5-DCBQ. Néanmoins, à cause du groupement thiol, le composé a tendance à s'adsorber sur l'électrode d'or, ce qui impliquerait de travailler avec un matériau d'électrode différent si cette quinone devait donner de bonnes performances.

Cytotoxicité Contrairement à ce qui était attendu, ce composé exhibe une cytotoxicité très élevée. Même incubé avec les algues à faible concentration (10 μM), un empoisonne-

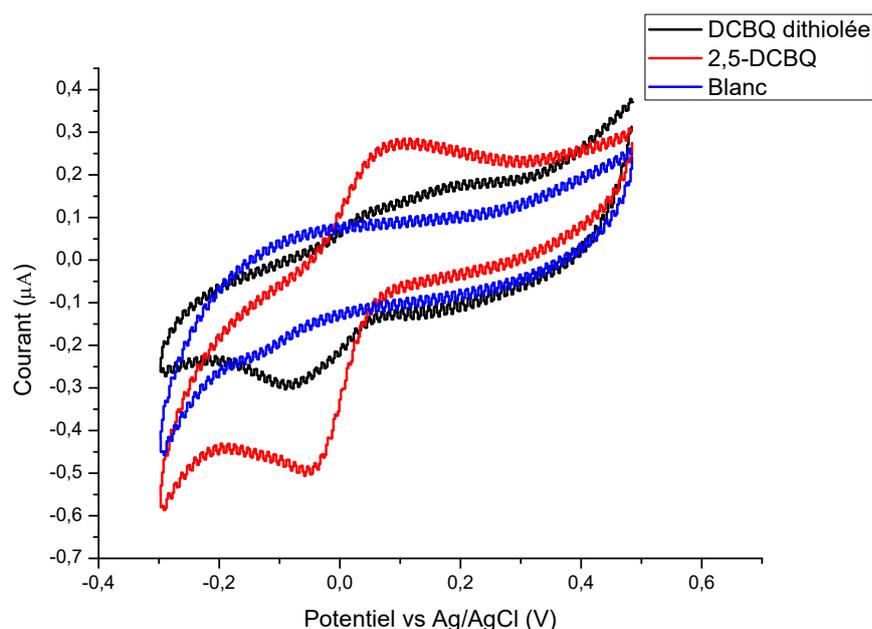


Figure 4.25: Voltamétrie cyclique de la 2,5-dichloro-3,6-di-tert-butylthio-1,4-benzoquinone dans du milieu minimum. Vitesse de balayage : $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

ment direct est observé avec une coloration des algues en rouge et une désagrégation très rapide des cellules. En effet, ce composé très lipophile peut éventuellement réagir via les atomes de soufre très nucléophiles au regard de leurs doublets encore libres, et causer la dénaturation des protéines de l'algue.

Ainsi ce composé se révèle autant voire plus toxique que le composé de départ. Dans ce cadre, aucune expérience de chronoampérométrie n'a été réalisée avec ce composé.

4.6.3 La 2,3-diméthyl-5-phényl-1,4-benzoquinone (DMPPBQ)

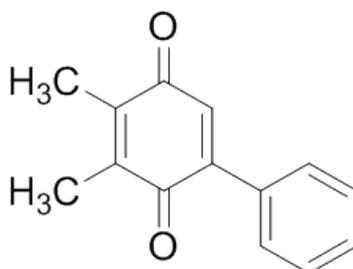


Figure 4.26: Formule de la 2,3-diméthyl 5-phényl 1,4-benzoquinone synthétisée au laboratoire.

L'addition de groupements encombrants sur les quinones chlorées n'ayant pas donné de

résultats probants (toxicité accrue ou faible capacité de dérivation), une autre possibilité consiste à travailler à partir de la phénylbenzoquinone, l'autre quinone qui dérive de façon significative. Le principe consiste à lui substituer deux groupements méthyles pour aboutir à un compromis entre empoisonnement et dérivation. En pratique, la 2,3-diméthyl-1,4-hydroquinone a servi de produit de départ et l'addition d'un groupement phényle a permis de former la structure souhaitée, la 2,3-diméthyl-4-phényl-1,4-benzoquinone. Il est à noter que cette quinone ressemble à la plastoquinone en étant trisubstituée avec deux groupements méthyles et un groupement phényle à la place des 9 isoprényles de la queue lipophile).

Détermination des potentiels d'oxydation et de réduction La structure de cette molécule se situe entre la phénylbenzoquinone et la diméthylbenzoquinone qui ont des potentiels de réduction différents et des propriétés différentes. Bien que toutes les deux acceptrices du PSII, la première dérive significativement au niveau de Q_B quand la seconde dérive peu et interagit plutôt avec le pool de plastoquinones. La voltamétrie cyclique montre que le potentiel de réduction de cette molécule est voisin de celui de la 2,6-DMBQ (Fig 4.27).

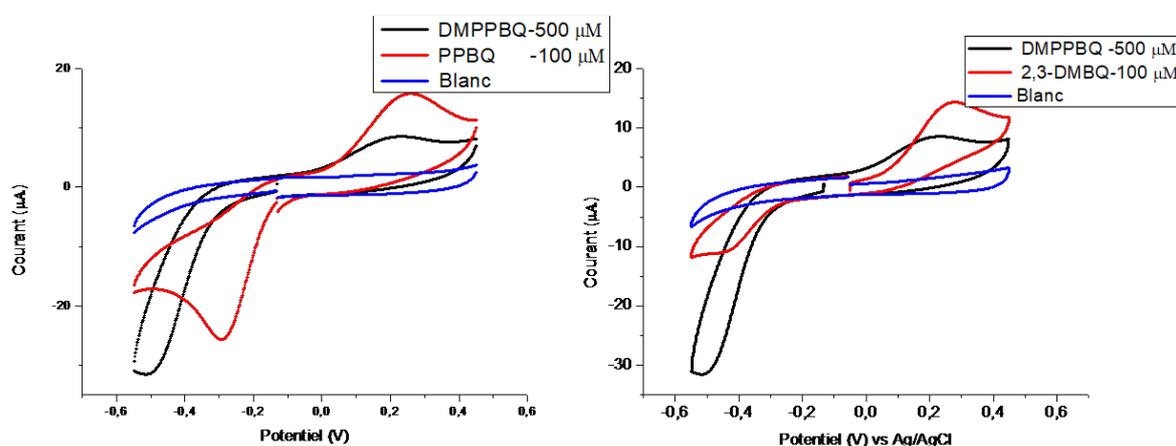


Figure 4.27: Voltamétrie cyclique de la 2,3-diméthyl-5-phényl-1,4-benzoquinone dans du milieu minimum; vitesse de balayage : $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Cytotoxicité La 2,3-diméthyl-4-phényl-1,4-benzoquinone n'est pas cytotoxique à $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et n'influe pas sur la croissance des algues. Les mêmes expériences que celles conduites dans le chapitre 2 de ce manuscrit ont ensuite été reconduites pour voir l'effet

de cette quinone sur les algues. Les expériences de spectroscopie d'absorbance ont permis de déceler un effet de cette quinone sur l'ATP synthase mais qui reste modéré (**Fig 4.28**). En effet, une légère inhibition des centres des photosystèmes II ou I semble prendre place comme le montre la baisse du maximum d'intensité atteint, mais l'activité de l'ATP synthase semble être conservée. Cela est attesté par la diminution rapide de l'intensité de fluorescence. Par ailleurs le transfert électronique vers le b_6f semble toujours en place, comme le montre la persistance d'une phase « b ». Lors d'une deuxième expérience, les algues ont été incubées avec cette quinone et on observe un quenching mais une fois lavées, elles semblent retrouver une grande partie de leur performance (contrairement aux autres quinones à ces concentrations) (**Fig 4.29**). En effet, alors que le Φ_{PSII} pour les échantillons incubés avec la 2,6-DCBQ puis lavés passe de 0,38 à 0,31 et qu'un quenching s'installe, ceux incubés avec la DMPPBQ puis lavés voient leur Φ_{PSII} passer de 0,32 à 0,41 avec un déquenching notable. Enfin même sans lavage, les cellules incubées avec cette quinone retrouvent au bout de quelques heures de bonnes performances (**Fig 4.30**). Ces résultats confirment que cette quinone est peu toxique à la concentration de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Capacité de dérivation Le Φ_{PSII} du système algues/DMPPBQ a été mesuré sur des périodes d'illumination longues (**Fig 4.31**). Les mesures révèlent un déquenching avec une reprise des performances progressive des algues. Cela est cohérent avec une capacité de dérivation modérée de cette quinone capable d'inhiber sous sa forme oxydée le transfert électronique dans la chaîne par quenching ou occupation du site Q_B et une difficulté à s'échanger avec le pool de plastoquinones mais également capable de se réduire en tant qu'accepteur d'électrons. Cette quinone aurait donc un effet inhibiteur réversible avec une capacité moyenne de dérivation.

Chronoampérométrie En chronoampérométrie, les photocourants atteints pour une concentration de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sont d'environ $6 \mu\text{A}$ (soit $9,5 \mu\text{A.cm}^{-2}$ dans nos conditions) et sont cohérents avec la capacité de dérivation moyenne de cette quinone obtenue par fluorescence (**Fig 4.32**). Il est en particulier à remarquer que sur une période de dérivation d'environ 3000 s, **le photocourant reste stationnaire, ce qui n'avait jamais été observé pour toutes les autres quinones considérées à ce jour.**

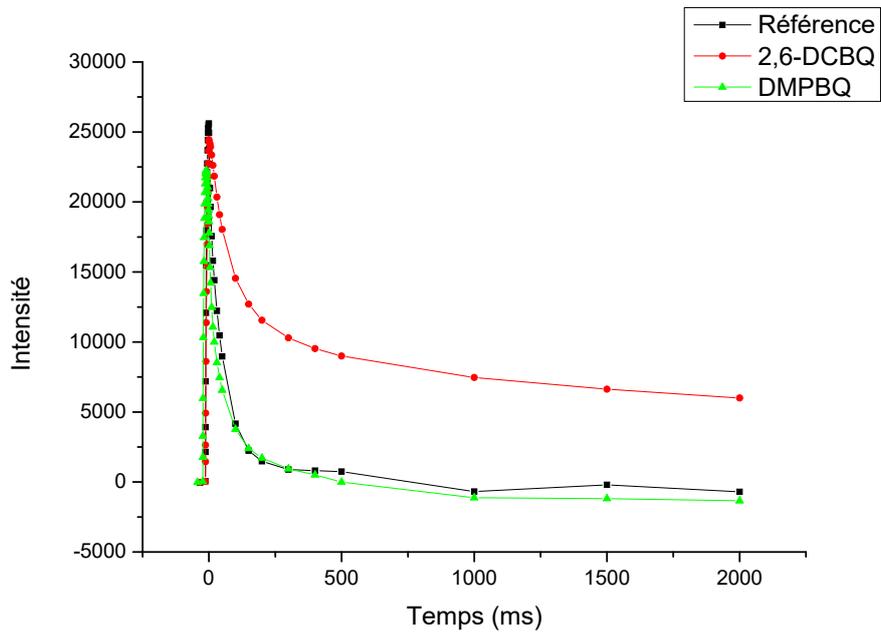


Figure 4.28: Suivi de l'état de l'ATP synthase; 100 μM en quinones; WT : $2 \cdot 10^7$ cellules/mL.

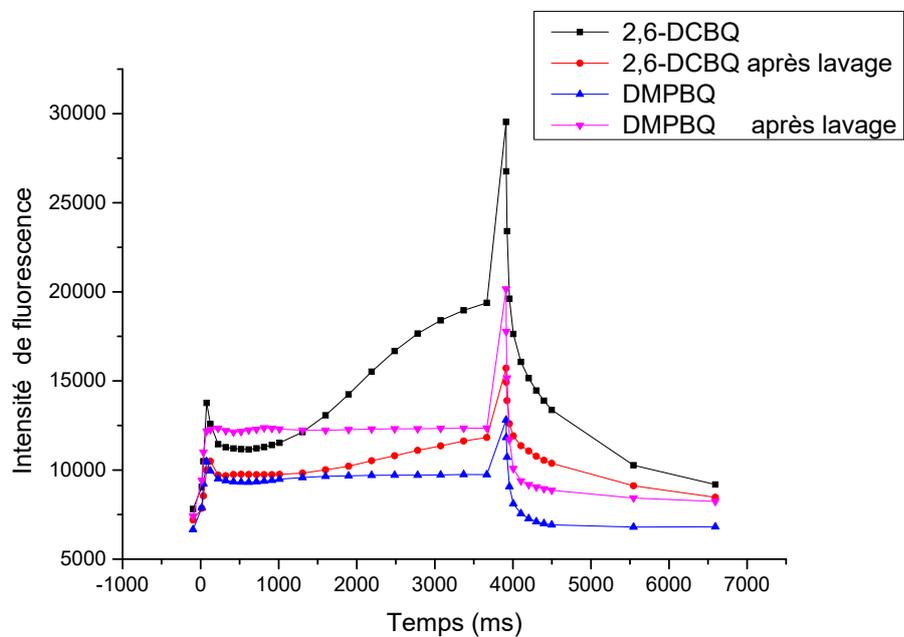


Figure 4.29: Induction de fluorescence sur des solutions d'algues incubées avec les quinones pendant 30 min avant et après lavage. [Q] :50 μM ; WT : 10^7 cellules/mL.

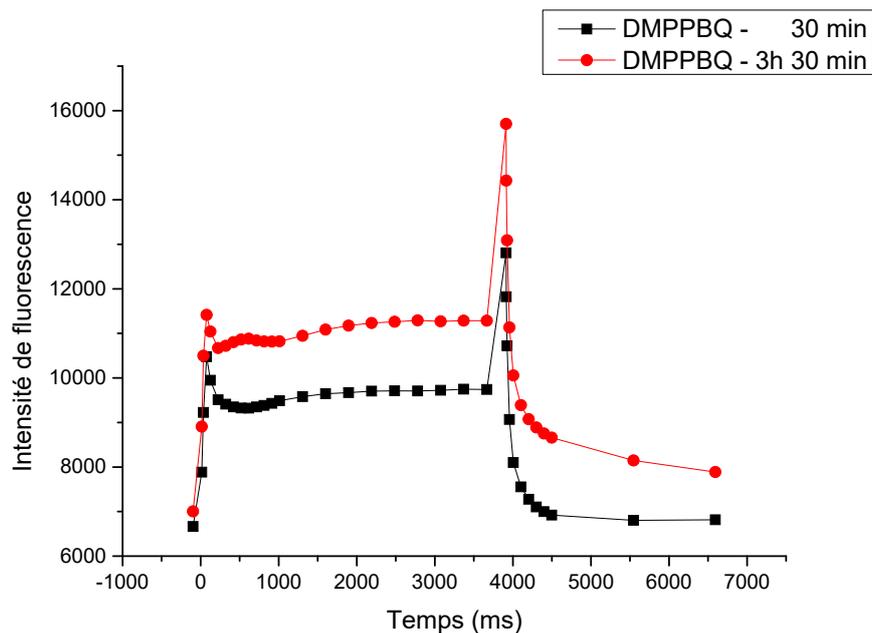


Figure 4.30: Induction de fluorescence sur des solutions d'algues incubées avec les quinones pendant 30 min et 3 h 30 min. [Q] :50 μM ; 10^7 cellules/mL.

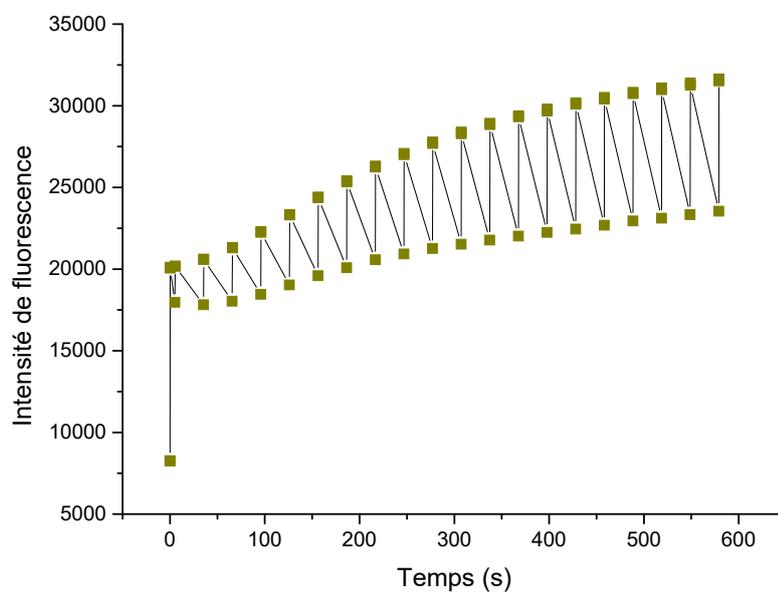


Figure 4.31: Induction de fluorescence prolongée sur des solutions d'algues incubées avec la DMPPBQ . [Q] :100 μM ; WT : $2 \cdot 10^7$ cellules/mL. On voit un déquenching avec un regain des performances du ΦPSII

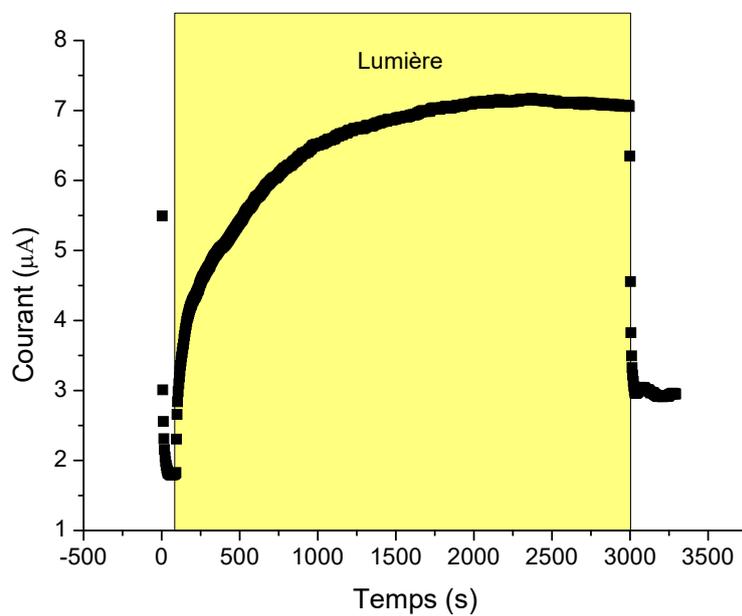


Figure 4.32: Chronoampérogramme obtenu. $P_I=20 \text{ mW.cm}^{-2}$; $[\text{DMPBQ}] : 100 \text{ }\mu\text{M}$; WT : $2.10^7 \text{ cellules/mL}$.

4.7 Choix de la meilleure quinone

Quinone	Conc seuil (μM)	I $\Delta f1$ (μA)	I WT (μA)
BQ	80	0	0
2,6-DCBQ	10	3	3
2,5-DCBQ	10	1,5	1,5
PPBQ	10	2,5	2,5
2,6-DMBQ	40	1	6
Duro	100	0	1
DMPPBQ	100	1	5,5

Table 4.3: Photocourants atteints hors du domaine des concentrations toxiques pour les algues sur les domaines stationnaires. $P_I=20 \text{ mW.cm}^{-2}$

La problématique du choix de la meilleure quinone pour réaliser la dérivation des électrons de la photosynthèse sur suspension d'algues peut se discuter selon deux grandes orientations. D'une part, il s'agit de choisir le meilleur accepteur du PSII en utilisant la 2,6-DCBQ ou la PPBQ. Ces deux quinones permettent de dériver de manière assez sélective en amont du b_6f . Néanmoins la grande toxicité de ces quinones obligera à travailler à faibles concentrations ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) pour limiter l'empoisonnement et de fait obtenir un photocourant faible sur la gamme de temps d'expérience (**Tab 4.3**). Pour ces quinones et à ces faibles concentrations, la dérivation sera probablement limitée par l'arrivée des quinones et le soulagement de la chaîne ne sera pas nécessairement effectif. La deuxième orientation consiste à utiliser des quinones à plus faible empoisonnement et les utiliser à des concentrations plus élevées pour que la dérivation puisse cette fois-ci être limitée par le transfert électronique. A cet égard, la 2,6-DMBQ ou la DMPPBQ donnent des courants 2 fois plus importants aux concentrations non toxiques (40 et 100 μM) que les deux précédentes, néanmoins la dérivation n'est pas sélective comme le montrent les faibles courants sur $\Delta f1$ par rapport au WT, ce qui limitera la portée du soulagement. Ceci montre que la stratégie de soulager la chaîne tout en produisant un photocourant significatif est difficilement atteignable avec la liste de quinones étudiées ici. Sur la base de ces résultats, un axe de travail propre consiste à orienter la recherche vers des quinones qui ne sont pas toxiques mais à la dérivation sélective.

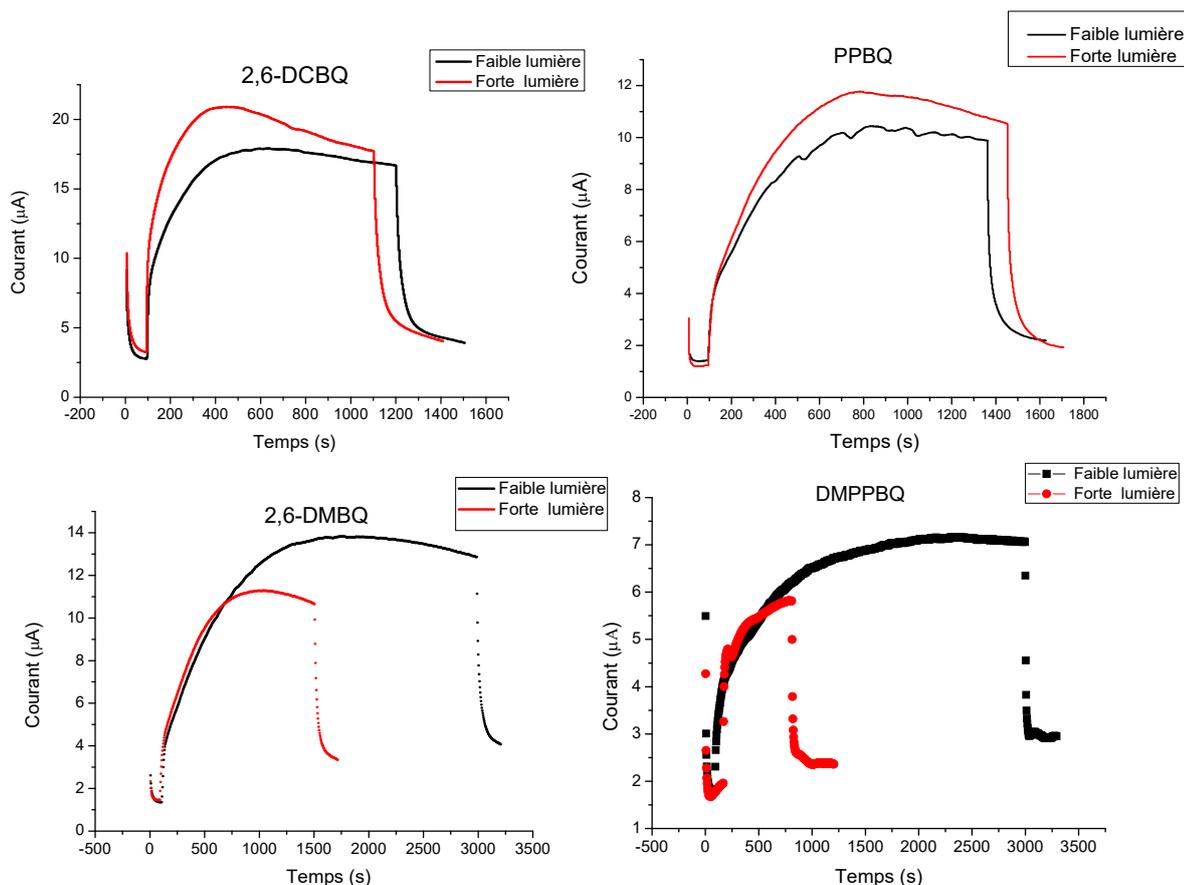


Figure 4.33: Chronoampérométries obtenus. 0,38 V vs Ag/AgCl; $P_I=20$ et 60 mW.cm^{-2} ; $[Q] : 100 \text{ } \mu\text{M}$; $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$. la 2,6-DMBQ et la DMPPBQ exhibent de meilleures performances sous lumière faible que forte ce qui montre que dans ces conditions les algues sont très sensibles à la photoinhibition et que le soulagement ne se fait pas d'une manière efficace.

4.8 Conclusion

Les quinones sont des composés électrophiles capables de réagir (directement ou indirectement) avec des macromolécules essentielles et d'induire une grande toxicité sur les algues *Chlamydomonas Reinhardtii*. A ce titre, les quinones commerciales les plus substituées avec des potentiels de réduction les plus faibles sont les moins toxiques. Par ailleurs, la synthèse de 3 nouvelles quinones a permis de confirmer que l'encombrement stérique et la diminution de leur potentiel de réduction leur fait perdre leur capacité à dériver les électrons de la photosynthèse. Il est donc nécessaire de trouver un compromis

entre toxicité et dérivation puisque dans la gamme de quinones sondées dans ce travail, les comportements d'empoisonnement et dérivation vont de pair. En conséquence, une benzoquinone trisubstituée apparaît comme la meilleure alternative actuelle même si elle n'est pas nécessairement sélective et ne soulage pas à forte lumière. La mise en place d'un couplage électrochimique et spectroscopique permettrait de faciliter à l'avenir le criblage des quinones en validant la capacité de dérivation non toxique de cette quinone et la persistance d'une photosynthèse normale dans les conditions de dérivation.

Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la dérivation des électrons photosynthétiques. Comme cela a été présenté dans l'étude bibliographique, le domaine est vaste et fourni que ce soit au niveau des stratégies ou de l'objet d'étude. A cet égard, nous avons considéré comme cible biologique une suspension d'algues unicellulaires *Chlamydomonas reinhardtii*, système a priori capable de se photo-réparer et d'être cultivé. L'impossibilité d'une connexion électrique directe entre l'électrode conductrice et la chaîne photosynthétique nous a donc conduits à utiliser des quinones exogènes en tant que médiateurs. Ce sont les différents effets (souhaités ou non) de ces quinones dans le contexte de la production de photobioélectricité qui ont fait l'objet de ce manuscrit.

Au sein du premier chapitre, nous avons dans un premier temps mis au point un dispositif préservant à la fois une échelle préparative et analytique afin de pouvoir réaliser des chronampérogrammes dans des gammes de temps acceptables et ainsi étudier différents paramètres expérimentaux. L'étude des effets de la nature du médiateur (fort accepteur du PSII : 2,6-DCBQ ou faible accepteur du PSII : 2,6-DMBQ), sa concentration ou l'effet de l'intensité lumineuse confirme que l'étape déterminante de production du photocourant est la réduction de la quinone par la chaîne photosynthétique. Toutefois, l'analyse des photocourants « stationnaires » montre que ces derniers ne perdurent pas selon les conditions et révèlent un possible effet « dual » des quinones, à savoir à un caractère accepteur du PSII mais aussi une faculté d'empoisonnement. Enfin, des efforts pour remonter aux vitesses de réduction des quinones par les algues ont été réalisés dans le but d'estimer le photocourant théorique maximal attendu et la part du flux électronique « prélevé » sur l'ensemble du flux électronique parcourant la chaîne photosynthétique.

Dans le second chapitre, nous sommes intéressés par des mesures de fluorescence aux interactions entre la chaîne photosynthétique et différentes quinones. Il a ainsi pu être mis en évidence que la diminution des performances des algues en présence des quinones relevait dans un premier temps d'un quenching cinétique qui diminue la capacité des algues à réaliser la séparation des charges. Par ailleurs, sur des périodes de temps plus longues, l'intégrité des PSII est elle même altérée comme l'ont montré les calculs de correction du quenching. Enfin la spécificité de l'interaction des quinones avec le site de dérivation, leur efficacité et leur toxicité (en particulier au niveau de l'ATP synthase) ont pu être étudiées. Un premier montage de circulation a été mis en place pour tenter de suivre l'état de la chaîne photosynthétique en se rapprochant le plus des conditions de dérivation.

Dans le troisième chapitre, nous avons étudié plus avant l'effet d'empoisonnement des quinones et mis en évidence que, dans nos conditions et au vu des quinones mises en jeu, les quinones les plus électrophiles sont les plus cytotoxiques. Ce résultat, qui suggère que le stress oxydant est peu mis en jeu dans ce contexte, a permis de réfléchir à un « design » de quinones qui préserveraient leur faculté à être réduites par la chaîne photosynthétique tout en limitant leur effet d'empoisonnement. Ainsi, la quinone la plus prometteuse est celle contenant deux groupements méthyles et un phényle, et combinant ainsi le faible effet poison de la DMBQ et la faculté à dériver de la PPBQ.

Au vu des résultats obtenus, l'utilisation de quinones comme médiateurs pour l'extraction des électrons photosynthétiques sur suspension d'algues unicellulaires *Chlamydomonas reinhardtii* semble ne pouvoir être qu'un fin compromis lié à la structure du médiateur.

Une première piste d'évolution possible est de jouer sur le montage expérimental pour favoriser la dérivation et limiter l'empoisonnement. Partant du principe que l'empoisonnement et la dérivation par les quinones ne correspondent pas nécessairement aux mêmes échelles de temps (dérivation aux temps « courts » à quelques secondes vs effet « poison » aux temps « longs » à quelques minutes). La microfabrication et la microfluidique sont à même de tirer bénéfice de cette situation à travers l'effet de confinement et de « coflux » (4.34).

Un système adapté permettrait alors de jouer sur le temps de « contact » entre qui-

nonnes et algues et de le maintenir dans une échelle de temps compatible avec une dérivation prédominante. Il peut être ainsi pertinent de poursuivre le « design » de nouvelles qui-

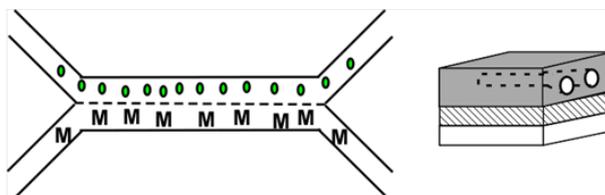


Figure 4.34: Dispositif « coflux » (points verts = suspension d'algues ; « M » = médiateur).

nonnes en fonctionnalisant le motif « benzoquinone » par les substituants adaptés sur la base des résultats obtenus précédemment. Par ailleurs, une orientation parallèle vise à ne plus considérer de quinones mais à chercher ou synthétiser d'autres médiateurs redox. Des structures prometteuses à base de polymères fonctionnalisés par du ferrocène ont été récemment rapportées dans la littérature [137]. Il s'agit donc ici de mettre à profit la chimie du ferrocène et la fonctionnalisation des cycles cyclopentadiényles pour jouer à la fois sur le potentiel redox de la sonde et son caractère lipophile (**Fig 4.35**). On notera qu'en fonction des résultats sur algues *Chlamydomonas reinhardtii*, la possibilité de changer ou d'étendre la sonde à d'autres organismes comme les cyanobactéries constitue une alternative.

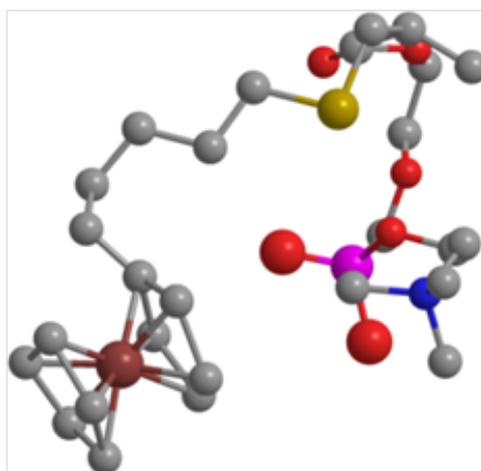


Figure 4.35: Dérivé ferrocénique envisagé comme nouveau médiateur.

Que l'on persévère dans l'utilisation de quinones ou de nouveaux médiateurs, l'analyse des performances ne peut être que multiple (évolution du photocourant, rendement du

PSII...). A ce jour, mesures électrochimiques et spectroscopiques ont réalisées de manière indépendante. La mise en place d'un couplage entre collection du courant à partir d'une suspension d'algues sous illumination et mesures de fluorescence dans une cellule spectroélectrochimique adaptée est donc une perspective importante.

Notons enfin que le système actuel est dans une configuration de type « $\frac{1}{2}$ pile ». En d'autres termes, l'expérimentateur impose un potentiel pour recueillir du courant, ce qui n'est pas le but ultime du système. L'insertion de la photobioanode développée dans le projet nécessite donc son association avec une cathode afin que le système produise effectivement de l'énergie et puisse être caractérisé comme tel au moyen de courbes de polarisation ou de puissance. Dans ce contexte, de premières piles devront être mises en place avec des cathodes classiques comme du platine et ensuite optimisées par le biais de biocathodes (immobilisation de laccase ou de bilirubine oxydase afin de catalyser la réduction du dioxygène en eau) voire de photobiocathode à base de PSI dont la stabilité et l'efficacité sont connues dans la littérature.

Partie expérimentale

Milieux et réactifs

TAP

Les cellules ont été cultivées dans du milieu Tris Acétate Phosphate (TAP) constitué de tris (HOCH_2)₃CNH₂ (20 mmol.L⁻¹), NH₄Cl (7 mmol.L⁻¹), MgSO₄ (0,83 mmol.L⁻¹), CaCl₂ (0,45 mmol.L⁻¹), K₂HPO₄ (1,65 mmol.L⁻¹), KH₂PO₄ (1,05 mmol.L⁻¹) et d'acétate C₂H₃O₂⁻ (3.10⁻⁴ mol.L⁻¹) à 25 ° C sous des conditions d'illumination douces (environ 50 μE.m⁻².s⁻¹).

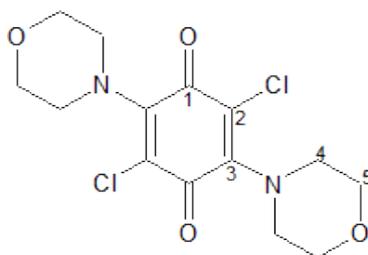
Le milieu minimum

Le milieu minimum contient les éléments précédents mais est dépourvu d'acétate.

Les réactifs

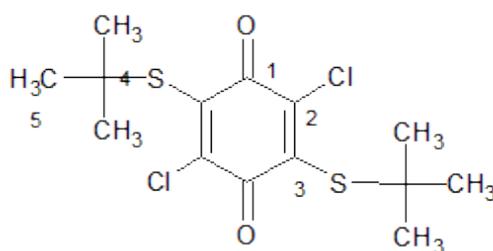
La plupart des quinones et hydroquinones mentionnées dans ce manuscrit sont commerciales et ont été fournies par la société SIGMA-ALDRICH (Saint-Quentin Fallavier, France). Elles ont été utilisées sans purification supplémentaire. Des solutions dans l'éthanol (95 %) sont fraîchement préparées à une concentration de 10 mmol.L⁻¹. Le volume nécessaire de solution mère est ensuite ajouté au milieu aqueux de travail à l'aide d'une micropipette pour aboutir à une concentration de l'ordre de quelques centaines de μmol.L⁻¹ en fonction de l'étude.

Trois structures de type quinone ne sont pas commerciales et ont fait l'objet d'une synthèse dédiée.

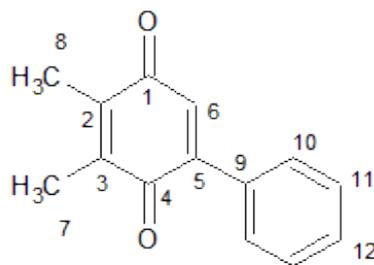


2,5-Dichloro-3,6-dimorpholino-1,4-benzoquinone Dans un ballon de 50 mL, du chloranil (246 mg, 1 mmol, 1 équivalent) a été dissous dans du 1,4-dioxane (10 mL). De la morpholine (0,496 mL, 500 mg, 5,7 équivalent) a ensuite été ajoutée. La réaction a lieu instantanément avec un changement de couleur vers le brun jaune. 10 min après, du méthanol (10 mL) et de l'eau (1 mL) ont été ajoutés. 15 min après le solide formé est collecté. Le solide est ensuite filtré sous vide. La masse pesée est de 0,253 g (0,72 mmol) soit un rendement de 72% et présente un aspect poudreux de couleur marron clair.

^1H RMN (300 MHz; CDCl_3) : δ 3,59-3,65 (m; 8H; H_4) ; 3,81-3,86 (m; 8H; H_5) ppm.



2,5-Dichloro-3,6-di-*tert*-butylthio-1,4-benzoquinone Dans un ballon de 50 mL, du chloranil (682,7 mg; 2,8 mmol; 1 équivalent), du 2-méthylpropanethiolate de sodium (690,0 mg, 6,16 mmol; 2,2 équivalent) et de l'acide acétique (478 μL ; 8,33 mmol; 3 équivalent) ont été ajoutés à température ambiante. Le produit a été précipité dans un mélange équimolaire éthanol/dichlorométhane. Le mélange est lavé dans une ampoule à décanter avec de l'eau. L'extrait organique est séché avec du MgSO_4 . Le MgSO_4 est éliminé par filtration et la solution concentrée à l'évaporateur rotatif. Le produit obtenu est une poudre de couleur marron foncé. Le rendement obtenu est de 60%. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) : δ 1,44 (s; 18H; H_5) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) : δ 173,9 (C_1) ; 151,4 (C_2) ; 141,5 (C_3) ; 53,5 (C_4) ; 32,5 (C_5).



2,3-Dimethyl-5-phenyl-1,4-benzoquinone Dans un tube à pression de 25 mL, du 2,3-diméthylbenzoquinone (138,1 mg; 1 mmol; 1 équivalent), du palladium(II) acétyl acétonate (15,2 mg; 0,05 mmol; 0,05 équivalent), du carbonate d'argent Ag_2CO_3 (827,5 mg; 3 mmol; 3 équivalent), de l'acide pyvalique (205 mg; 2 mmol; 2 équivalent), du DMSO (250 μL ; 3,5 mmol; 3,5 équivalent), du benzène (6 mL, attention cancérigène suivre les consignes de sécurité) ont été chauffés à 140°⁷. Le mélange a été évaporé. Ensuite une chromatographie « éclair » est réalisée avec du toluène. On récupère une masse de 118,5 mg de cristaux jaunes soit un rendement de 56%.

¹H RMN (300 MHz, CDCl_3) : δ 2,14 (m; 3H; H_7 ou H_8), 2,17 (s; 3H; H_7 ou H_8); 6,84 (s; 1H; H_6); 7,46 (m; 5H; H_{aro}) ppm

Culture des algues

Culture

La culture cellulaire a été réalisée en boîtes de Petri dans du Tris–Acétate–Phosphate gélifié (TAP). Le repiquage qui consiste à transférer une fine partie de la culture d'une boîte de Petri à une autre vide, se fait alors toutes les deux semaines et assure la survie et le maintien des souches. Les boîtes sont maintenues dans une étagère à lumière ambiante. Deux jours avant la date l'expérience, les cellules sont inoculées dans des erlenmeyers de TAP liquide de 100 ou de 200 mL et mises sous agitation. Le milieu liquide permet une croissance accélérée (duplication toutes les 8 h) des algues sur des volumes quantitatifs. Ensuite une fois les cellules parvenues à des concentrations élevées (10^6 cellules/mL), elles sont diluées tous les jours sur la base des besoins et des concentrations visées.

7. La pression du mélange a été estimée avec le paramètre d'Antoine à environ 5 bar ce qui est inférieur à la pression maximale tolérée 20 bar.

Préparation des échantillons

Les cellules cultivées dans du TAP liquide sont récoltées en phase mi-exponentielle de leur croissance (environ $2 \cdot 10^6$ cellules/mL) et comptées sur le microscope optique avec une lame de Malassez. Elles sont ensuite centrifugées pendant 5 min à 4000 g à température ambiante et concentrées dans du milieu minimum aux concentrations désirées (de l'ordre de 10^7 cellules/mL).

Effet des quinones sur la division cellulaire

Les cellules concentrées à $2 \cdot 10^7$ cellules/mL dans le milieu minimum et mises sous agitation sous lumière faible ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) sont incubées avec les quinones à des concentrations allant de 0 à $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pendant une heure. Les cellules sont ensuite diluées par 100 et 10^4 et laissées repousser dans du milieu TAP frais dans les conditions de culture classique. Le matériel utilisé a été préalablement autoclavé. Toutes les 24 h, leur aspect visuel est contrôlé et lorsqu'elles sont suffisamment concentrées, leur concentration est déterminée par lame de Malassez et le temps nécessaire à cette croissance noté.

Expériences d'électrochimie

Fabrication du dispositif utilisé pour les expériences de dérivation

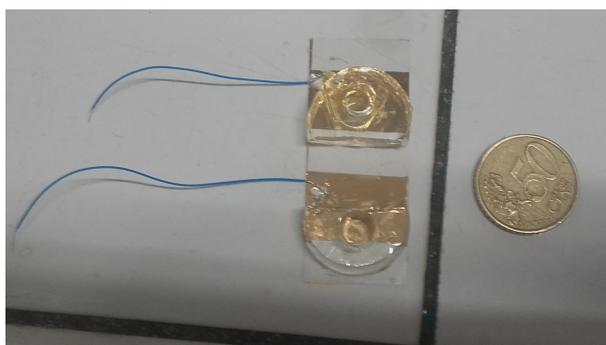


Figure 4.36: Deux puits utilisés dans les expériences d'électrochimie

L'électrode de travail consiste en une lamelle de verre (Deckglaser Menzel-Glaser ; $24 \times 48 \text{ mm} \times 170 \mu\text{m}$) modifiée avec de l'ITO et de l'or. L'électrode a été obtenue par pulvérisation cathodique avec un premier film d'ITO (10 nm) qui joue le rôle d'une couche d'accroche suivie par le dépôt d'une autre couche d'or (d'environ 50 nm d'épaisseur) à

l'aide d'un pulvérisateur cathodique de type EMITECH K675X. Une pièce de PDMS (polydiméthylsiloxane RTV-615; Momentive Performance Materials) avec un trou de 9 mm de diamètre et d'une hauteur d'environ 6 mm (fait à l'aide d'un poinçon) a ensuite été collée à la lamelle de verre modifiée ITO-Or à l'aide d'un traitement plasma à 400 mtorr (100 W) pendant 3 min suivi d'un traitement thermique à 80°C pendant 24 h à l'étuve. Le dispositif final correspond à un puits de PDMS possédant une électrode d'or au fond (**Fig 4.36**). Un fil de cuivre est relié à l'électrode par dépôt manuel d'une couche d'argent (RoHs, silver conductive paint). L'argent est isolé par déposition d'une colle glue (UHU Creative durcisseur/résine : 1/1) ce qui assure la tenue mécanique de l'ensemble.



Figure 4.37: Photo du dispositif utilisé

Toutes les mesures électrochimiques ont été réalisées avec un potentiostat de type Princeton Parstat 2273 et du logiciel Powersuite.

Voltamétrie cyclique

Le montage est à 3 électrodes. L'électrode de travail est en or et se trouve au fond du puits. L'électrode de référence est une Ag/AgCl (obtenue par chloruration d'un fil d'Ag (L :35 mm ; D :0,5 mm) via une électrolyse à potentiel contrôlé « pulsée » ($\pm 15V$, 10 pulses de 15 s chacun) dans une solution aqueuse de NaCl 1 mol.L⁻¹) et la contre-électrode en platine (L :30 mm ; D :1 mm). Lors de chaque mesure de voltamétrie, le milieu est laissé

5 secondes au potentiel d'équilibre avant d'effectuer la voltamétrie cyclique proprement dite. Toutes les mesures ont été effectuées avec un balayage linéaire de tension, à savoir une vitesse de balayage constante et comprise entre $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ et $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Le milieu minimum qui constitue le milieu de travail en présence d'algues ou en leur absence fait office d'électrolyte support.

Chronoampérométrie – Protocole de dérivation des électrons photosynthétiques sous illumination

Lumière incidente Les cellules sont irradiées par une lampe à halogène de type Schott KL 1500 LCD. Deux fibres optiques permettent d'acheminer le faisceau jusqu'au dispositif. Avec cet appareil, un flux de lumière continu peut être maintenu en dépit des fluctuations du réseau de tension qui alimente la lampe grâce à la stabilisation électronique du voltage interne (jusqu'à 10%). Les densités de lumière peuvent être contrôlées en surface de l'électrode entre 16 et $320 \text{ mW}/\text{cm}^2$. Le spectre de la lumière incidente est celui d'une lampe à halogène chauffée à 3000 K.

Protocole de mesure Le montage à 3 électrodes est le même que celui utilisé plus haut en voltamétrie cyclique, à savoir une électrode de travail en or au fond du puits, une électrode de référence de type Ag/AgCl et une contre-électrode en platine.

Les algues sont maintenues à l'obscurité sous agitation. Pour réaliser une expérience, un volume de 500 μL est prélevé à l'aide d'une micropipette et mis dans le puits suivi de l'ajout du volume adapté (typiquement 5 μL) de la solution-mère de quinones. Une chronoampérométrie au potentiel de réoxydation de la forme réduite de la quinone augmenté de 100 mV est alors déclenchée avec un filtre à 5 kHz mis en place. Après 90 s de polarisation, le courant capacitif tend à disparaître et la ligne de base stabilisée. A ce moment là, la lumière est déclenchée. Deux minutes avant la fin de l'expérience, la lumière est éteinte pour permettre un retour à la ligne de base. La cellule électrochimique est nettoyée à l'eau et l'éthanol.

Expériences de spectroscopie

Les mesures de spectroscopie ont été obtenues en utilisant un spectrophotomètre JTS (Biologic). Le logiciel de traitement de données utilisé a été réalisé au sein de l'IBPC et porte le nom de Spectrometer. Les échantillons ont été préparés comme précisé précédemment.

Fluorescence

Induction de fluorescence Avant les mesures de fluorescence, les échantillons sont maintenus sous obscurité pendant au moins une demi-heure. La fluorescence détectée est provoquée par de courts flashes lumineux (d'une durée de 4 μ s) et d'une intensité suffisamment faible pour avoir un effet actinique négligeable. Ces flashes sont fournis par une LED blanche, la longueur d'onde étant sélectionnée par la combinaison de 2 filtres de 3 mm BG39 et BG3 (Schott filters). La lumière actinique est fournie par une LED rouge à 640 nm. La fluorescence maximale est mesurée 100 μ s après un pulse de lumière saturante de 250 ms induisant une réduction complète de tous les accepteurs d'électrons.



Figure 4.38: Photo de la cuve utilisée pour le montage à circulation

Montage à circulation Le même appareil a été utilisé. La cuvette en verre a été remplacée par une autre horizontale conçue pour le JTS (**Fig 4.38**). Le montage à circulation est fait au laboratoire. L'écoulement se fait sous l'effet de la gravité et le réservoir contenant la solution de quinones est mis en hauteur. Le contrôle du flux se fait à l'aide d'une pince sur le tuyau et est ajusté à environ 1 goutte par seconde.

Absorbance

Le flash de lumière saturante (5 ns) a été assuré par un laser organique (640 nm) pompé par un laser ND-YAG deuxième harmonique (Minilite Continuum). Les filtres interférentiels ont été utilisés pour laisser passer la lumière aux longueurs d'onde sélectionnées. Le filtre de 6 nm de bande passante (BG-39, Schott) a été mis devant les diodes pour arrêter l'excès de la lumière excitatrice.

Bibliographie

- [1] [//courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/overview-of-photosynthesis/](https://courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/overview-of-photosynthesis/).
- [2] <https://commons.wikimedia.org/wiki/file:z-scheme.png>.
- [3] P. Joliot and A. Joliot. Electron-transfer between photosystem-2 and the cytochrome-b/f complex - mechanistic and structural implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1102(1) :53–61, 1992.
- [4] J. P. Hosler and C. F. Yocum. Regulation of cyclic photophosphorylation during ferredoxin-mediated electron-transport - effect of dcmu and the nadph nadp+ ratio. *Plant Physiology*, 83(4) :965–969, 1987.
- [5] <http://biology4isc.weebly.com/c-photosynthesis.html>.
- [6] https://fr.wikipedia.org/wiki/cycle_de_calvin#/media/file:calvin-cycle4.svg.
- [7] A. J. McCormick, P. Bombelli, R. W. Bradley, R. Thorne, T. Wenzel, and C. J. Howe. Biophotovoltaics : oxygenic photosynthetic organisms in the world of bioelectrochemical systems. *Energy & Environmental Science*, 8(4) :1092–1109, 2015.
- [8] M. Rosenbaum, Z. He, and L. T. Angenent. Light energy to bioelectricity : photosynthetic microbial fuel cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3) :259–264, 2010.
- [9] C. F. Meunier, X. Y. Yang, J. C. Rooke, and B. L. Su. Biofuel cells based on the immobilization of photosynthetically active bioentities. *ChemCatChem*, 3(3) :476–488, 2011.
- [10] D Strik, R. A. Timmers, M. Helder, K. J. J. Steinbusch, H. V. M. Hamelers, and C. J. N. Buisman. Microbial solar cells : applying photosynthetic and electrochemically active organisms. *Trends in Biotechnology*, 29(1) :41–49, 2011.

- [11] R. A. Voloshin, V. D. Kreslavski, S. K. Zharmukhamedov, V. S. Bedbenov, S. Ramakrishna, and S. I. Allakhverdiev. Photoelectrochemical cells based on photosynthetic systems : a review. *Biofuel Research Journal-Brj*, 2(2) :227–235, 2015.
- [12] M.M. Nowaczyk N.Plumere. Biophotoelectrochemistry of photosynthetic proteins. *Advanced Biochemical Engineering Biotechnolpgy*, (158) :11–136, 2016.
- [13] N. Sekar and R. P. Ramasamy. Recent advances in photosynthetic energy conversion. *Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews*, 22 :19–33, 2015.
- [14] L. H. Kim, Y. J. Kim, H. Hong, D. Yang, M. Han, G. Yoo, H. W. Song, Y. Chae, J. C. Pyun, A. R. Grossman, and W. Ryu. Patterned nanowire electrode array for direct extraction of photosynthetic electrons from multiple living algal cells. *Advanced Functional Materials*, 26(42) :7679–7689, 2016.
- [15] W. Ryu, S. J. Bai, J. S. Park, Z. B. Huang, J. Moseley, T. Fabian, R. J. Fasching, A. R. Grossman, and F. B. Prinz. Direct extraction of photosynthetic electrons from single algal cells by nanoprobng system. *Nano Letters*, 10(4) :1137–1143, 2010.
- [16] A. Badura, T. Kothe, W. Schuhmann, and M. Rogner. Wiring photosynthetic enzymes to electrodes. *Energy & Environmental Science*, 4(9) :3263–3274, 2011.
- [17] R. Tel-Vered and I. Willner. Photo-bioelectrochemical cells for energy conversion, sensing, and optoelectronic applications. *ChemElectroChem*, 1(11) :1778–1797, 2014.
- [18] M. Kato, J. Z. Zhang, N. Paul, and E. Reisner. Protein film photoelectrochemistry of the water oxidation enzyme photosystem 2. *Chemical Society Reviews*, 43(18) :6485–6497, 2014.
- [19] M. Kato, T. Cardona, A. W. Rutherford, and E. Reisner. Photoelectrochemical water oxidation with photosystem 2 integrated in a mesoporous indium tin oxide electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 134(20) :8332–8335, 2012.
- [20] O. Yehezkeli, R. Tel-Vered, J. Wasserman, A. Trifonov, D. Michaeli, R. Nechush-tai, and I. Willner. Integrated photosystem 2-based photo-bioelectrochemical cells. *Nature Communications*, 3, 2012.

- [21] A. Badura, D. Guschin, B. Esper, T. Kothe, S. Neugebauer, W. Schuhmann, and M. Rogner. Photo-induced electron transfer between photosystem 2 via cross-linked redox hydrogels. *Electroanalysis*, 20(10) :1043–1047, 2008.
- [22] V. Hartmann, T. Kothe, S. Poller, E. El-Mohsnawy, M. M. Nowaczyk, N. Plumere, W. Schuhmann, and M. Rogner. Redox hydrogels with adjusted redox potential for improved efficiency in z-scheme inspired biophotovoltaic cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(24) :11936–11941, 2014.
- [23] K. P. Sokol, D. Mersch, V. Hartmann, J. Z. Zhang, M. M. Nowaczyk, M. Rogner, A. Ruff, W. Schuhmann, N. Plumere, and E. Reisner. Rational wiring of photosystem ii to hierarchical indium tin oxide electrodes using redox polymers. *Energy & Environmental Science*, 9(12) :3698–3709, 2016.
- [24] A. Badura, B. Esper, K. Ataka, C. Grunwald, C. Woll, J. Kuhlmann, J. Heberle, and M. Rogner. Light-driven water splitting for (bio-)hydrogen production : photosystem 2 as the central part of a bioelectrochemical device. *Photochemistry and Photobiology*, 82(5) :1385–1390, 2006.
- [25] F. Y. Zhao, K. Sliozberg, M. Rogner, N. Plumere, and W. Schuhmann. The role of hydrophobicity of os-complex-modified polymers for photosystem 1 based photocathodes. *Journal of the Electrochemical Society*, 161(13) :H3035–H3041.
- [26] T. Kothe, S. Poller, F. Y. Zhao, P. Fortgang, M. Rogner, W. Schuhmann, and N. Plumere. Engineered electron-transfer chain in photosystem 1 based photocathodes outperforms electron-transfer rates in natural photosynthesis. *Chemistry-a European Journal*, 20(35) :11029–11034, 2014.
- [27] F. Y. Zhao, F. Conzuelo, V. Hartmann, H. G. Li, M. M. Nowaczyk, N. Plumere, M. Rogner, and W. Schuhmann. Light induced h₂ evolution from a biophotocathode based on photosystem 1-pt nanoparticles complexes integrated in solvated redox polymers films. *Journal of Physical Chemistry B*, 119(43) :13726–13731, 2015.
- [28] S. C. Feifel, K. R. Stieger, H. Lokstein, H. Lux, and F. Lisdat. High photocurrent generation by photosystem 1 on artificial interfaces composed of pi-system-modified graphene. *Journal of Materials Chemistry A*, 3(23) :12188–12196, 2015.

- [29] K. R. Stieger, S. C. Feifel, H. Lokstein, and F. Lisdat. Advanced unidirectional photocurrent generation via cytochrome c as reaction partner for directed assembly of photosystem i. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(29) :15667–15674, 2014.
- [30] C. Tapia, R. D. Milton, G. Pankratova, S. D. Minter, H. E. Akerlund, D. Leech, A. L. De Lacey, M. Pita, and L. Gorton. Wiring of photosystem i and hydrogenase on an electrode for photoelectrochemical h₂ production by using redox polymers for relatively positive onset potential. *ChemElectroChem*, 4(1) :90–95, 2017.
- [31] K. Hasan, Y. Dilgin, S. C. Emek, M. Tavahodi, H. E. Akerlund, P. A. Aringberg, and L. Gorton. Photoelectrochemical communication between thylakoid membranes and gold electrodes through different quinone derivatives. *ChemElectroChem*, 1(1) :131–139, 2014.
- [32] R. I. Pinhasi, D. Kallmann, G. Soper, S. Larom, A. Linkov, A. Boulouis, M. A. Schottler, R. Bock, A. Rothschild, N. Adir, and G. Schuster. Photosynthetic membranes of synechocystis or plants convert sunlight to photocurrent through different pathways due to different architectures. *Plos One*, 10(4), 2015.
- [33] P. Bombelli, R. W. Bradley, A. M. Scott, A. J. Philips, A. J. McCormick, S. M. Cruz, A. Anderson, K. Yunus, D. S. Bendall, P. J. Cameron, J. M. Davies, A. G. Smith, C. J. Howe, and A. C. Fisher. Quantitative analysis of the factors limiting solar power transduction by synechocystis sp. pcc 6803 in biological photovoltaic devices. *Energy & Environmental Science*, 4(11) :4690–4698, 2011.
- [34] J. O. Calkins, Y. Umasankar, H. O’Neill, and R. P. Ramasamy. High photoelectrochemical activity of thylakoid-carbon nanotube composites for photosynthetic energy conversion. *Energy & Environmental Science*, 6(6) :1891–1900, 2013.
- [35] N. D. Kirchhofer, M. A. Rasmussen, F. W. Dahlquist, S. D. Minter, and G. C. Bazan. The photobioelectrochemical activity of thylakoid bioanodes is increased via photocurrent generation and improved contacts by membrane-intercalating conjugated oligoelectrolytes. *Energy & Environmental Science*, 8(9) :2698–2706, 2015.
- [36] K. H. Sjöholm, M. Rasmussen, and S. D. Minter. Bio-solar cells incorporating catalase for stabilization of thylakoid bioelectrodes during direct photoelectrocatalysis. *ECS Electrochemistry Letters*, 1(5) :G7–G9, 2012.

- [37] M. Rasmussen, A. Shrier, and S. D. Minteer. High performance thylakoid bio-solar cell using laccase enzymatic biocathodes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(23) :9062–9065, 2013.
- [38] M. Rasmussen and S. D. Minteer. Thylakoid direct photobioelectrocatalysis : utilizing stroma thylakoids to improve bio-solar cell performance. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(32) :17327–17331, 2014.
- [39] H. Hamidi, K. Hasan, S. C. Emek, Y. Dilgin, H. E. Akerlund, P. A. Albertsson, D. Leech, and L. Gorton. Photocurrent generation from thylakoid membranes on osmium-redox-polymer-modified electrodes. *ChemSusChem*, 8(6) :990–993, 2015.
- [40] G. Pankratova, D. Pankratov, K. Hasan, H. E. Akerlund, P. A. Albertsson, D. Leech, S. Shleev, and L. Gorton. Supercapacitive photo-bioanodes and biosolar cells : A novel approach for solar energy harnessing. *Advanced Energy Materials*, 7(12), 2017.
- [41] K. Hasan, R. D. Milton, M. Grattieri, T. Wang, M. Stephanz, and S. D. Minteer. Photobioelectrocatalysis of intact chloroplasts for solar energy conversion. *ACS Catalysis*, 7(4) :2257–2265, 2017.
- [42] N. Sekar, Y. Umasankar, and R. P. Ramasamy. Photocurrent generation by immobilized cyanobacteria via direct electron transport in photo-bioelectrochemical cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(17) :7862–7871, 2014.
- [43] K. Hasan, H. B. Yildiz, E. Sperling, P. O. Conghaile, M. A. Packer, D. Leech, C. Hagerhall, and L. Gorton. Photo-electrochemical communication between cyanobacteria (*leptolyngbia* sp.) and osmium redox polymer modified electrodes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(45) :24676–24680, 2014.
- [44] K. Hasan, K. V. R. Reddy, V. Essmann, K. Gorecki, P. O. Conghaile, W. Schuhmann, D. Leech, C. Hagerhall, and L. Gorton. Electrochemical communication between electrodes and rhodobacter capsulatus grown in different metabolic modes. *Electroanalysis*, 27(1) :118–127, 2015.
- [45] Lv Yan-xia chenz Zhao-an Lu Hong-bin Den Mai-cun Xue Song Zhang Wei. Characterization of the photoelectrode based on the immobilization of the microalgae. *China Biotechnology*, 32(4) :96–102, 2012.

- [46] B. De Caprariis, P. De Filippis, A. Di Battista, L. Di Palma, and M. Scarsella. *Exoelectrogenic Activity of a Green Microalgae, Chlorella vulgaris, in a Bio-Photovoltaic Cells (BPVs)*, volume 38 of *Chemical Engineering Transactions*, pages 523–528. 2014.
- [47] L. F. Huang, J. Y. Lin, K. Y. Pan, C. K. Huang, and Y. K. Chu. Overexpressing ferredoxins in *Chlamydomonas reinhardtii* increase starch and oil yields and enhance electric power production in a photo microbial fuel cell. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8) :19308–19325, 2015.
- [48] S. Izawa. Acceptors and donors and chloroplast electron transport. *Methods in Enzymology*, 69 :413–434, 1980.
- [49] D. V. Yanykin, A. A. Khorobrykh, S. A. Khorobrykh, and V. V. Klimov. Photoconsumption of molecular oxygen on both donor and acceptor sides of photosystem ii in mn-depleted subchloroplast membrane fragments. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1797(4) :516–523, 2010.
- [50] Y. Degani and A. Heller. Electrical communication between redox centers of glucose-oxidase and electrodes via electrostatically and covalently bound redox polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 111(6) :2357–2358, 1989.
- [51] K. Hasan, S. A. Patil, D. Leech, C. Hagerhall, and L. Gorton. Electrochemical communication between microbial cells and electrodes via osmium redox systems. *Biochemical Society Transactions*, 40 :1330–1335, 2012.
- [52] A. Heller. Electron-conducting redox hydrogels : design, characteristics and synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(6) :664–672, 2006.
- [53] X. M. Li, T. X. Liu, K. Wang, and T. D. Waite. Light-induced extracellular electron transport by the marine raphidophyte chattonella marina. *Environmental Science & Technology*, 49(3) :1392–1399, 2015.
- [54] H. Lee and S. Choi. A micro-sized bio-solar cell for self-sustaining power generation. *Lab on a Chip*, 15(2) :391–398, 2015.
- [55] L. Darus, T. Sadakane, P. Ledezma, S. Tsujimura, I. Osadebe, D. Leech, L. Gorton, and S. Freguia. Redox-polymers enable uninterrupted day/night photo-driven elec-

- tricity generation in biophotovoltaic devices. *Journal of the Electrochemical Society*, 164(3) :H3037–H3040, 2017.
- [56] J. M. Pisciotta, Y. Zou, and I. V. Baskakov. Light-dependent electrogenic activity of cyanobacteria. *Plos One*, 5(5), 2010.
- [57] P. Bombelli, T. Muller, T. W. Herling, C. J. Howe, and T. P. J. Knowles. A high power-density, mediator-free, microfluidic biophotovoltaic device for cyanobacterial cells. *Advanced Energy Materials*, 5(2), 2015.
- [58] M. Grattieri, K. Hasan, and S. D. Minter. Bioelectrochemical systems as a multi-purpose biosensing tool : Present perspective and future outlook. *ChemElectroChem*, 4(4) :834–842, 2017.
- [59] Purcell.R Carpentier.M. Immobilized plant thylakoid membranes as a biosensor for herbicides. *Biotechnology Techniques*, V(5) :363–368, 1990.
- [60] M. Rasmussen and S. D. Minter. Self-powered herbicide biosensor utilizing thylakoid membranes. *Analytical Methods*, 5(5) :1140–1144, 2013.
- [61] J. Maly, J. Masojidek, A. Masci, M. Ilie, E. Cianci, V. Foglietti, W. Vastarella, and R. Pilloton. Direct mediatorless electron transport between the monolayer of photosystem ii and poly (mercapto-p-benzoquinone) modified gold electrode-new design of biosensor for herbicide detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 21(6) :923–932, 2005.
- [62] M. Torimura, A. Miki, A. Wadano, K. Kano, and T. Ikeda. Electrochemical investigation of cyanobacteria synechococcus sp pcc7942-catalyzed photoreduction of exogenous quinones and photoelectrochemical oxidation of water. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 496(1-2) :21–28, 2001.
- [63] M. Kasuno, M. Torimura, Y. Tsukatani, D. Murakami, S. Hanada, T. Matsushita, and H. Tao. Characterization of the photoinduced electron transfer reaction from the photosynthetic system in rhodobacter sphaeroides to an exogenous electron acceptor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 636(1-2) :101–106, 2009.
- [64] M. Kasuno, H. Kimura, H. Yasutomo, M. Torimura, D. Murakami, Y. Tsukatani, S. Hanada, T. Matsushita, and H. Tao. An evaluation of sensor performance for

- harmful compounds by using photo-induced electron transfer from photosynthetic membranes to electrodes. *Sensors*, 16(4), 2016.
- [65] S. B. Powles. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible-light. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 35 :15–44, 1984.
- [66] M. D. Lambreva, D. Russo, F. Polticelli, V. Scognamiglio, A. Antonacci, V. Zobnina, G. Campi, and G. Rea. Structure/function/dynamics of photosystem ii plastoquinone binding sites. *Current Protein & Peptide Science*, 15(4) :285–295, 2014.
- [67] E. M. Aro, I. Virgin, and B. Andersson. Photoinhibition of photosystem-2 - inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica Φ_{PSII} Biophysica Acta*, 1143(2) :113–134, 1993.
- [68] D. J. Blubaugh, M. Atamian, G. T. Babcock, J. H. Golbeck, and G. M. Cheniae. Photoinhibition of hydroxylamine-extracted photosystem-ii membranes - identification of the sites of photodamage. *Biochemistry*, 30(30) :7586–7597, 1991.
- [69] G. H. Krause and E. Weis. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis - the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42 :313–349, 1991.
- [70] G. Oquist, W. S. Chow, and J. M. Anderson. Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem-ii. *Planta*, 186(3) :450–460, 1992.
- [71] Govindjee and J. J. Eatonrye. Electron-transfer through photosystem-ii acceptors - interaction with anions. *Photosynthesis Research*, 10(3) :365–379, 1986.
- [72] S. S. Merchant, S. E. Prochnik, O Vallon, and al. The chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318(5848) :245–251, 2007.
- [73] <http://www.metamicrobe.com/chlamy/>.
- [74] A. Melis and T. Happe. Trails of green alga hydrogen research - from hans gaffron to new frontiers. *Photosynthesis Research*, 80(1-3) :401–409, 2004.
- [75] G. Y. Xu, B. B. Li, and X. L. Luo. Carbon nanotube doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for the electrocatalytic oxidation and detection of hydroquinone. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 176 :69–74, 2013.

- [76] B. Nasr, G. Abdellatif, P. Canizares, C. Saez, J. Lobato, and M. A. Rodrigo. Electrochemical oxidation of hydroquinone, resorcinol, and catechol on boron-doped diamond anodes. *Environmental Science & Technology*, 39(18) :7234–7239, 2005.
- [77] A. Fischer and G. N. Henderson. Oxidation of hydroquinones, catechols, and phenols using ceric ammonium-nitrate and ammonium dichromate coated on silica - an efficient and convenient preparation of quinones. *Synthesis-Stuttgart*, (6-7) :641–643, 1985.
- [78] O. Warburg and W. Luttgens. Fotokhimicheskoe vosstanovlenie khinona v zelenykh granulakh. *Biokhimiya*, 11(4) :303–322, 1946.
- [79] K. Satoh, M. Ohhashi, Y. Kashino, and H. Koike. Mechanism of electron flow through the qb site in photosystem-2 .1. kinetics of the reduction of electron-acceptors at the q(b) and plastoquinone sites in photosystem-ii particles from the cyanobacterium *synechococcus-vulcanus*. *Plant and Cell Physiology*, 36(4) :597–605, 1995.
- [80] G. Renger, B. Hanssum, H. Gleiter, H. Koike, and Y. Inoue. Interaction of 1,4-benzoquinones with photosystem-ii in thylakoids and photosystem-ii membrane-fragments from spinach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 936(3) :435–446, 1988.
- [81] D. Joly and R. Carpentier. The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the i-peak in the o-j-i-p chlorophyll fluorescence rise : Effects of various electron acceptors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 88(1) :43–50, 2007.
- [82] B. Rimbault, D. Esposito, D. Drapier, Y. Choquet, D. Stern, and F. A. Wollman. Identification of the initiation codon for the atpb gene in *chlamydomonas* chloroplasts excludes translation of a precursor form of the beta subunit of the atp synthase. *Molecular and General Genetics*, 264(4) :486–491, 2000.
- [83] G. Longatte, H. Y. Fu, O. Buriez, E. Labbe, F. A. Wollman, C. Amatore, F. Rappaport, M. Guille-Collignon, and F. Lemaitre. Evaluation of photosynthetic electrons derivation by exogenous redox mediators. *Biophysical Chemistry*, 205 :1–8, 2015.
- [84] G. R. Seely. Energetics of electron-transfer reactions of chlorophyll and other compounds. *Photochemistry and Photobiology*, 27(5) :639–654, 1978.

- [85] Y. Tanakakitani, K. Satoh, and S. Katoh. Interaction of benzoquinones with qa- and qb- in oxygen-evolving photosystem-ii particles from the thermophilic cyanobacterium *synechococcus-elongatus*. *Plant and Cell Physiology*, 31(7) :1039–1047, 1990.
- [86] K. Satoh, H. Koike, T. Ichimura, and S. Katoh. Binding affinities of benzoquinones to the q(b) site of photosystem-ii in *synechococcus* oxygen-evolving preparation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1102(1) :45–52, 1992.
- [87] K. Satoh, S. Katoh, A. Donner, and W. Oettmeier. Binding affinities of oxidized and reduced forms of tetrahalogenated benzoquinones to the q(b) site in oxygen-evolving photosystem-ii particles from *synechococcus-elongatus*. *Plant and Cell Physiology*, 35(3) :461–468, 1994.
- [88] S. A. Patil, K. Hasan, D. Leech, C. Hagerhall, and L. Gorton. Improved microbial electrocatalysis with osmium polymer modified electrodes. *Chemical Communications*, 48(82) :10183–10185, 2012.
- [89] P. R. Rich and R. Harper. Partition-coefficients of quinones and hydroquinones and their relation to biochemical reactivity. *Febs Letters*, 269(1) :139–144, 1990.
- [90] G. Longatte, F. Rappaport, F. A. Wollman, M. Guille-Collignon, and F. Lemaitre. Mechanism and analyses for extracting photosynthetic electrons using exogenous quinones - what makes a good extraction pathway? *Photochemical & Photobiological Sciences*, 15(8) :969–979, 2016.
- [91] G. Longatte, F. Rappaport, F. A. Wollman, M. Guille-Collignon, and F. Lemaitre. Electrochemical harvesting of photosynthetic electrons from unicellular algae population at the preparative scale by using 2,6-dichlorobenzoquinone. *Electrochimica Acta*, 236 :327–332, 2017.
- [92] G. Longatte, M. Guille-Collignon, and F. Lemaitre. Electrocatalytic mechanism involving michaelis-menten kinetics at the preparative scale : Theory and applicability to photocurrents from a photosynthetic algae suspension with quinones. *ChemPhysChem*, 18(19) :2643–2650, 2017.
- [93] H. Kirst, J. G. Garcia-Cerdan, A. Zurbriggen, T. Ruehle, and A. Melis. Truncated photosystem chlorophyll antenna size in the green microalga *chlamydomonas rein-*

- hardtii upon deletion of the tla3-cpsrp43 gene. *Plant Physiology*, 160(4) :2251–2260, 2012.
- [94] R. A. Craigie and T. Cavalier-Smith. Cell-volume and the control of the chlamydomonas cell-cycle. *Journal of Cell Science*, 54(APR) :173–191, 1982.
- [95] Elizabeth H.Harris. The chlamydomonas source book. 1 :29–30, 2009.
- [96] H. Y. Fu, D. Picot, Y. Choquet, G. Longatte, A. Sayegh, J. Delacotte, M. Guille-Collignon, F. Lemaitre, F. Rappaport, and F. A. Wollman. Redesigning the q(a) binding site of photosystem 2 allows reduction of exogenous quinones. *Nature Communications*, 8, 2017.
- [97] I. Zudans, J. R. Paddock, H. Kuramitz, A. T. Maghasi, C. M. Wansapura, S. D. Conklin, N. Kaval, T. Shtoyko, D. J. Monk, S. A. Bryan, T. L. Hubler, J. N. Richardson, C. J. Seliskar, and W. R. Heineman. Electrochemical and optical evaluation of noble metal- and carbon-ito hybrid optically transparent electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 565(2) :311–320, 2004.
- [98] K. Brinkert, F. Le Formal, X. E. Li, J. Durrant, A. W. Rutherford, and A. Fantuzzi. Photocurrents from photosystem ii in a metal oxide hybrid system : Electron transfer pathways. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1857(9) :1497–1505, 2016.
- [99] C. Costentin, S. Drouet, M. Robert, and J. M. Saveant. Turnover numbers, turnover frequencies, and overpotential in molecular catalysis of electrochemical reactions. cyclic voltammetry and preparative-scale electrolysis. *Journal of the American Chemical Society*, 134(27) :11235–11242, 2012.
- [100] Jean-Michel Savéant. Elements of molecular and biomolecular electrochemistry. *A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION*, page 110, 2006.
- [101] D. Marchal, W. Boireau, J. M. Laval, J. Moiroux, and C. Bourdillon. Electrochemical measurement of lateral diffusion coefficients of ubiquinones and plastoquinones of various isoprenoid chain lengths incorporated in model bilayers. *Biophysical Journal*, 74(4) :1937–1948, 1998.
- [102] K. Maxwell and G. N. Johnson. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345) :659–668, 2000.

- [103] M. F. Garbulsky, I. Filella, A. Verger, and J. Penuelas. Photosynthetic light use efficiency from satellite sensors : From global to mediterranean vegetation. *Environmental and Experimental Botany*, 103 :3–11, 2014.
- [104] G. H. Krause and E. Weis. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis - the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42 :313–349, 1991.
- [105] Warren L. Butler. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annual Review Plant Physiology*, (29) :345–78, 1978.
- [106] Blankenship RE. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, pages 149–51, 2002.
- [107] N. R. Baker. Chlorophyll fluorescence : A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59 :89–113, 2008.
- [108] B. Genty, J. M. Briantais, and N. R. Baker. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990(1) :87–92, 1989.
- [109] M. J. Fryer, J. R. Andrews, K. Oxborough, D. A. Blowers, and N. R. Baker. Relationship between CO_2 assimilation, photosynthetic electron transport, and active O_2 metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology*, 116(2) :571–580, 1998.
- [110] L. Bulte and F. A. Wollman. Stabilization of state-i and state-ii by p-benzoquinone treatment of intact-cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1016(2) :253–258, 1990.
- [111] B. Bailleul, P. Cardol, C. Breyton, and G. Finazzi. Electrochromism : a useful probe to study algal photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 106(1-2) :179–189, 2010.
- [112] P. Joliot and R. Delosme. Flash-induced 519nm absorption change in green-algae. *Biochimica et Biophysica Acta*, 357(2) :267–284, 1974.
- [113] Iupac. compendium of chemical terminology, 2nd ed. (the "gold book"). compiled by a. d. mcnaught and a. wilkinson. blackwell scientific publications, oxford (1997). xml on-line corrected version : <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by m. nic, j. jirat, b. kosata ; updates compiled by a. jenkins. isbn 0-9678550-9-8.
- [114] T. J. Monks, R. P. Hanzlik, G. M. Cohen, D. Ross, and D. G. Graham. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 112(1) :2–16, 1992.

- [115] Réactions chimiques et anciens procédés de photographie. *Bulletin. de l'Union. des Physiciens*, (718) :1299–1320.
- [116] G. Powis. Free-radical formation by antitumor quinones. *Free Radical Biology and Medicine*, 6(1) :63–101, 1989.
- [117] A. A. Kuttyrev and V. V. Moskva. Nucleophilic reactions of quinones. *Uspekhi Khimii*, 60(1) :134–168, 1991.
- [118] Y. Song and G. R. Buettner. Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(6) :919–962, 2010.
- [119] G. A. Pascoe, C. J. Calleman, and T. A. Baille. Identification of s-(2,5-dihydroxyphenyl)-cysteine and s-(2,5-dihydroxyphenyl)-n-acetyl-cysteine as urinary metabolites of acetaminophen in the mouse - evidence for p-benzoquinone as a reactive intermediate in acetaminophen metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, 68(1-2) :85–98, 1988.
- [120] D. G. Graham, S. M. Tiffany, W. R. Bell, and W. F. Gutknecht. Autoxidation versus covalent binding of quinones as mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward c1300-neuroblastoma cells in-vitro. *Molecular Pharmacology*, 14(4) :644–653, 1978.
- [121] J. R. Gillette, J. R. Mitchell, and B. B. Brodie. Biochemical mechanisms of drug toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 14 :271–288, 1974.
- [122] D. W. Potter and J. A. Hinson. Mechanisms of acetaminophen oxidation to n-acetyl-p-benzoquinone imine by horseradish-peroxidase and cytochrome-p-450. *Journal of Biological Chemistry*, 262(3) :966–973, 1987.
- [123] A. Brunmark and E. Cadenas. Reductive addition of glutathione to para-benzoquinone, 2-hydroxy-para-benzoquinone, and para-benzoquinone epoxides - effect of the hydroxy and glutathionyl substituents on para-benzohydroquinone autoxidation. *Chemico-Biological Interactions*, 68(3-4) :273–298, 1988.
- [124] K. G. Eckert, P. Eyer, J. Sonnenbichler, and I. Zetl. Activation and detoxication of aminophenols .2. synthesis and structural elucidation of various thiol addition-

- products of 1,4-benzoquinoneimine and n-acetyl-1,4-benzoquinoneimine. *Xenobiotica*, 20(4) :333–350, 1990.
- [125] P. Eyer, E. Lierheimer, and M. Strosar. Site and mechanism of covalent binding of 4-dimethylaminophenol to human-hemoglobin, and its implications to the functional-properties. *Molecular Pharmacology*, 24(2) :282–290, 1983.
- [126] C. Lemaire and F. A. Wollman. The chloroplast atp synthase in *chlamydomonas-reinhardtii* .2. biochemical-studies on its biogenesis using mutants defective in photophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 264(17) :10235–10242, 1989.
- [127] R. J. Gerson, A. Casini, D. Gilfor, A. Serroni, and J. L. Farber. Oxygen-mediated cell injury in the killing of cultured-hepatocytes by acetaminophen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 126(3) :1129–1137, 1985.
- [128] P. J. Obrien. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 80(1) :1–41, 1991.
- [129] J. L. Bolton, M. A. Trush, T. M. Penning, G. Dryhurst, and T. J. Monks. Role of quinones in toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 13(3) :135–160, 2000.
- [130] H. Thor, M. T. Smith, P. Hartzell, G. Bellomo, S. A. Jewell, and S. Orrenius. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes - a study of the implications of oxidative stress in intact-cells. *Journal of Biological Chemistry*, 257(20) :2419–2425, 1982.
- [131] J. R. Babson, N. S. Abell, and D. J. Reed. Protective role of the glutathione redox cycle against adriamycin-mediated toxicity in isolated hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 30(16) :2299–2304, 1981.
- [132] L. Rossi, G. A. Moore, S. Orrenius, and P. J. Obrien. Quinone toxicity in hepatocytes without oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251(1) :25–35, 1986.
- [133] G. A. Moore, L. Rossi, P. Nicotera, S. Orrenius, and P. J. Obrien. Quinone toxicity in hepatocytes - studies on mitochondrial ca^{2+} release induced by benzoquinone derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 259(2) :283–295, 1987.

- [134] G. A. Moore, M. Weis, S. Orrenius, and P. J. Obrien. Role of sulfhydryl-groups in benzoquinone-induced Ca^{2+} release by rat-liver mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267(2) :539–550, 1988.
- [135] X. W. Guo and H. Mayr. Quantification of the ambident electrophilicities of halogen-substituted quinones. *Journal of the American Chemical Society*, 136(32) :11499–11512, 2014.
- [136] S. P. Damodaran, S. Eberhard, L. Boitard, J. G. Rodriguez, Y. Wang, N. Bremond, J. Baudry, J. Bibette, and F. A. Wollman. A millifluidic study of cell-to-cell heterogeneity in growth-rate and cell-division capability in populations of isogenic cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plos One*, 10(3), 2015.
- [137] K. Tanaka, M. Kaneko, M. Ishikawa, S. Kato, H. Ito, T. Kamachi, K. Kamiya, and S. Nakanishi. Specific interaction between redox phospholipid polymers and plastoquinone in photosynthetic electron transport chain. *ChemPhysChem*, 18(8) :878–881, 2017.

Table des figures

1.1	Schéma de la structure du chloroplaste [1].	17
1.2	Schéma dit en « Z » de la chaîne de transfert d'électrons de la photosynthèse. L'appellation « Z » vient du chemin suivi par les potentiels des différents couples mis en jeu au sein de la chaîne [2].	19
1.3	Schéma montrant les temps caractéristiques des différentes étapes du transfert électronique entre le PSII et le PSI.	20
1.4	Schéma de la phosphorylation cyclique [5].	21
1.5	Schéma du cycle de Calvin [6].	22
1.6	Représentation schématique de PSII immobilisés au sein d'un polymère d'osmium d'après les travaux de Badura et coll [21].	27
1.7	Stratégie générale d'utilisation de PSI isolé dans une cellule photobioélectrochimique d'après les travaux de Badura et coll [16].	28
1.8	Production d'un courant de réduction à partir de PSI isolé au sein d'un polymère conducteur en présence d'oxygène et de méthyl viologène d'après les travaux de Badura et coll [16].	29
1.9	Nomenclature et formule chimique de plusieurs quinones couramment employées dans les systèmes biophotoélectrochimiques.	36
1.10	Haut : interaction de quinones exogènes avec une cyanobactérie à travers un transfert électronique au niveau du PSII. Bas : interaction de l'anion ferricyanure avec une cyanobactérie à travers un transfert électronique au niveau de la membrane cytoplasmique. D'après Sekar et coll [42] et Bombelli et coll [33].	37

1.11 Schéma montrant le principe de l'utilisation des polymères d'osmium extrait des travaux de Hasan et coll [51].	38
1.12 Schéma du dispositif biophotovoltaïque microfluidique extrait des travaux de Bombelli et coll [57].	40
1.13 Représentation schématique du PSII dans les plantes supérieures montrant les polypeptides majeurs et les cofacteurs impliqués dans la photochimie du PSII. La partie centrale montre l'hétérodimère D1/D2 avec les composants redox liés. ; CP : Chlorophyll protein ; OEC : Oxygen Evolving Complex [66].	44
1.14 Schéma des mécanismes postulés pour la photoinhibition lors des inactivations par site accepteur ou donneur [67].	47
1.15 Schéma récapitulant les différentes étapes de transferts électroniques le long de la chaîne photosynthétique, avec le temps caractéristique de chaque étape et le potentiel de demi-vague des couples rédox mis en jeu par rapport à l'ENH [71].	50
1.16 Morphologie de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> [73].	51
1.17 Formule semi-développée de la plastoquinone	52
1.18 Schéma montrant le couple oxydant réducteur 1,4-benzoquinone/1,4-hydroquinone et la demi-réaction correspondante	52
1.19 Variation de la fluorescence mesurée sur une suspension d'algues <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; a-sans quinones exogènes ; b- en présence de quinones exogènes [83].	55
1.20 Evolution de la proportion de centres ouverts (ou oxydés) en fonction de la concentration en quinones exogènes. $I=340 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$ [83].	56
1.21 Dérivation électronique (paramètre D) en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ en $\mu mol.L^{-1}$ introduite (C_{tot} , en rouge) et accessible au quenching (C_Q , en noir) sur une suspension de mutant Δ PetA de l'algue unicellulaire <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (10^7 cellules par mL environ) ; $I=340\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ [83].	57

1.22	Tableau récapitulatif des différents résultats obtenus : $E_{1/2}$ potentiel de demi vague ; C_{sat} concentration des quinones perdues dans les membranes à saturation ; D_{∞} dérivation lorsque la concentration en quinones est infinie ; r_0 pente de la dérivation à concentration nulle ; Résultats obtenus dans les conditions suivantes : 10^7 cellules par mL ; $I = 340 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$ [83].	58
1.23	Les concentrations inhibitrices médianes (I_{50}) par la DCMU du flux électronique de Q_A^- à Q_B en présence de différents accepteurs électroniques et les affinités chimiques (K_b) pour le site Q_B de différentes benzoquinones méthyl et chloro-substituées déduites du décalage des valeurs de I_{50} . K_b^a affinités chimiques déterminées sur des particules PSII de <i>S.elongatus</i> [87].	60
1.24	Structure chimique des quinones, leurs $E_{1/2}$ et les densités de courant obtenues dans les expériences conduites par Hasan et coll [88].	62
1.25	Schéma du mécanisme postulé et validé par les mesures de fluorescence dans le cas de l'interaction entre la 2,6-DCBQ et la poche Q_B , tiré de [90].	64
1.26	Diagramme de zone exprimant la proportion de centres ouverts en fonction du log de la lumière incidente et du log de la concentration en quinones, tiré de [90].	65
1.27	Photo du montage mis en place par Longatte au sein du laboratoire. A gauche la cellule spectroélectrochimique. La zone d'illumination est située au fond de la cellule. A droite le montage entier.	66
1.28	Courant réel obtenu vs le courant modélisé [92].	68
2.1	Principe de la dérivation des électrons de la photosynthèse dans la demi-pile sur algue	74
2.2	Schéma du dispositif mis en place au laboratoire utilisé pour dériver les électrons de la photosynthèse sur une suspension d'algues.	75
2.3	Schéma explicitant la répartition des quinones entre les différentes phases. .	78
2.4	Formules chimiques des quinones utilisées	79
2.5	Comparaison des voltamétries cycliques de la 2,6-DCBQ sur électrode d'ITO et d'or. $100 \text{ mV}.s^{-1}$; 2,6-DCBQ :300 μM ; WT : 2.10^7 cellules.mL $^{-1}$	79

2.6	Voltamétrie cyclique de la 2,6-DCBQ en présence d'algues sous lumière et sous obscurité sur or. 100 mV.s ⁻¹ ; P _I =60 mW.cm ⁻² ; 2,6-DCBQ : 100 μM ; WT : 2.10 ⁷ cellules.mL ⁻¹	80
2.7	Voltamétrie cyclique de la 2,6-DMBQ en présence d'algues sous lumière et sous obscurité sur or. 100 mV.s ⁻¹ ; P _I =60 mW.cm ⁻² ; 2,6-DMBQ :100 μM ; WT : 2.10 ⁷ cellules.mL ⁻¹	82
2.8	Chronoampérogramme obtenu sur électrode d'or. 0,38V vs Ag/AgCl ; P _I =60 mW.cm ⁻² ; 2,6-DCBQ : 100 μM ; WT : 2.10 ⁷ cellules.mL ⁻¹	83
2.9	Cycles d'illumination-obscurité ; 0,38 V vs Ag/AgCl ; 2,6-DCBQ :100 μM ; P _I =60 mW.cm ⁻² ; WT : 2.10 ⁷ cellules.mL ⁻¹	85
2.10	Chronoampérogrammes obtenus et normalisés en présence ou absence de Ficoll par rapport à la valeur maximale de courant atteinte. 0,38 V vs Ag/AgCl ; P _I =60 mW.cm ⁻² ; 2,6-DCBQ :100 μM ; WT : 2.10 ⁷ cellules.mL ⁻¹	86
2.11	Voltamogrammes obtenus en présence ou absence de Ficoll dans du milieu minimum. 100 mV.s ⁻¹ ; 2,6-DCBQ :100 μM.	87
2.12	Chronoampérogrammes obtenus après une sédimentation supposée. 0,38 V vs Ag/AgCl ; P _I =60 mW.cm ⁻² ; 2,5-DCHQ :100 μM ; WT : 2.10 ⁷ cellules.mL ⁻¹	87
2.13	Chronoampérogrammes obtenus pour deux intensités différentes. 0,38 V vs Ag/AgCl ; Lumière faible : P _I =20 mWcm. ⁻² et Lumière forte : P _I =60 mW.cm ⁻² ; 2,6-DMBQ :100 μM ; 2.10 ⁷ cellules.mL ⁻¹	88
2.14	Chronoampérogrammes obtenus pour deux souches différentes WT et Δf1. Pour la souche mutée la chronoampérométrie a été arrêtée dès la stabilisation du courant. 0,38 V vs Ag/AgCl ; P _I =60 mW.cm ⁻² ; 2,6-DCBQ : 100 μM ; 2.10 ⁷ cellules.mL ⁻¹	89
2.15	Chronoampérogrammes obtenus à des concentrations en cellules différentes (en cellules.mL ⁻¹) ; 0,38 V vs Ag/AgCl ; P _I =60 mW.cm ⁻² ; 2,6-DCBQ :100 μM.	90
2.16	Courants stationnaires en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ introduite ; 0,38 V vs Ag/AgCl ; P _I =60 mW.cm ⁻² ; WT :2.10 ⁷ cellules.mL ⁻¹ . Modélisation par une courbe de type $\frac{a.C_Q}{C_Q+b}$ avec a=71,3 et b=44,5.	91

2.17	Courants stationnaires en fonction de la concentration en 2,6-DMBQ introduite. ; 0,38 V vs Ag/AgCl; $P_I=60 \text{ mW.cm}^{-2}$; WT : $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$. Modélisation par une courbe de type $\frac{a.C_Q}{C_Q+b}$ avec a=61 et b=14,8.	92
2.18	Schéma montrant le principe de la catalyse d'après Costentin et coll [99]. . .	95
2.19	Figures montrant le principe d'extraction des grandeurs cinétiques. A gauche le courant augmente quand la vitesse de balayage diminue. A droite $\frac{i_{cat}}{i_0}$ varie linéairement avec $\log v$ [100].	97
2.20	Voltamétries du système sous irradiation à différentes vitesses de balayage ; $P_I=60 \text{ mW.cm}^{-2}$; 2,5-DCHQ : $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$; WT : $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$. . .	98
2.21	Graphes rendant compte de la linéarité du courant stationnaire en fonction de la concentration en quinones exogènes sur la gamme 0-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Modélisation de la courbe par une droite « $a.C_Q+b$ » ; a=0,2; b=0,6. . . .	99
2.22	Graphes montrants l'extraction des grandeurs cinétiques. En haut à gauche tracé du rapport de I sous lumière et de I sous obscurité à différentes vitesses de balayage en fonction de $1/\sqrt{v}$. En haut à droite tracé du rapport de I stationnaire (valeur de I tirée de la chronoampérométrie) et de I obscurité à différentes vitesses de balayage en fonction de $1/\sqrt{v}$. En bas même graphe qu'en haut à droite mais zoomé sur la droite affine	100
2.23	Tracé du courant stationnaire en fonction de la racine carrée de la concentration en PSII	102
2.24	Epuisement du système en fonction des valeurs de photocourants stationnaires atteints pour la 2,6-DCBQ ; 0,38 V vs Ag/AgCl; $\Delta f1 :2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$; $P_I=20 \text{ mW.cm}^{-2}$	103
2.25	Cycles alternés jour/nuit ; 0,38 V vs Ag/AgCl ; 2,6-DCBQ : $100 \mu\text{M}$; $P_I=20\text{mW.cm}^{-2}$; $\Delta f1 :2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$. Courbe orange qui relie les maximums de courant lors de la période jour des cycles afin de comparer avec la courbe sous lumière continue.	104
2.26	Cycles alternés jour/nuit ; 0,38 V vs Ag/AgCl ; 2,6-DCBQ : $100 \mu\text{M}$; $P_I=20 \text{ mW.cm}^{-2}$; WT : $2.10^7 \text{ cellules.mL}^{-1}$. La courbe orange relie les maximums de courant atteints lors de la période jour des cycles afin de comparer avec la courbe sous lumière continue.	105

2.27	Cycles alternés jour/nuit ; 0,38 V vs Ag/AgCl ; 2,6-DMBQ :100 μM ; $P_I=60$ mW.cm^{-2} ; WT : 2.10^7 cellules.mL $^{-1}$. Courbe orange qui relie les maximums de courant lors de la période jour des cycles afin de comparer avec la courbe sous lumière continue.	106
2.28	Chronoampérogrammes obtenus après des périodes d'incubation différentes ; 0,38V vs Ag/AgCl ; 2,6-DCBQ :100 μM ; $P_I= 60$ mW.cm^{-2} ; WT : 2.10^7 cellules.mL $^{-1}$. Irradiation à partir de 90 s pour toutes les quinones sauf pour celle après 15 min d'incubation qui est irradiée à 130 s pour donner le temps au courant capacitif de s'estomper.	107
2.29	Mise en évidence de la dégradation des performances des algues sur ITO. 0,72 V vs Ag/AgCl ; $\Delta f1$: 2.10^7 cellules/mL ; 400 μL ;2,6-DCBQ : 100 μM ou 200 μM ; $P_I= 226$ mW.cm^{-2}	108
2.30	Chronoampérogrammes en présence/ absence d'acétate pour plusieurs quinones ; 0,38 V vs Ag/AgCl ; 100 μM ; $P_I=60$ mW ; WT : 2.10^7 cellules.mL $^{-1}$. Les quinones ont été ajoutées au temps 0 du chronoampérogramme. La chronoampérométrie pour la duroquinone en présence d'acétate a été arrêtée avant les autres à environ 600 s	109
2.31	Structures chimiques de l'ubiquinone et de la duroquinone.	109
2.32	Soulagement de la chaîne photosynthétique 0,38 V vs Ag/AgCl ; 2,6-DCBQ :100 μM ; $P_I=90$ mW.cm^{-2} ; $\Delta f1$: 2.10^7 cellules.mL $^{-1}$	110
2.33	Schéma montrant la modification de l'environnement du site Q_A réalisée par mutagenèse pour permettre un accès plus aisé de la quinone exogène au site de dérivation. [96].	111
2.34	Mise en évidence du reroutage des électrons [96]. A gauche courant en absence et présence de DCMU sur souche mutée. A droite courant en absence et présence de DCMU sur souche sauvage.	112
3.1	Schéma illustrant les différentes voies de désexcitation de la chlorophylle excitée [103].	117
3.2	Schéma illustrant les différentes cas de figure pour les centres [Q_A] dits ouverts/fermés.	120

3.3	Courbe d'induction de fluorescence obtenue pour les souches Wild Type; I=135 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 2.10^7 cellules/mL.	124
3.4	Formules des quinones utilisées	125
3.5	Evolution en fonction du temps d'incubation du Φ_{PSII} d'échantillons d'algues incubés à l'obscurité avec des quinones sous forme oxydée. [Q]=100 μM ; [WT] : 2.10^7 cellules.mL ⁻¹ ; I=150 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	126
3.6	Evolution en fonction du temps du NPQ d'échantillons d'algues incubés à l'obscurité avec des quinones de forme oxydée. Mêmes conditions expéri- mentales que figure 3.5	128
3.7	Evolution en fonction du temps d'incubation du Φ_{PSII} des quinones de forme réduite. Mêmes conditions que figures 3.5 et 3.6. MH : Methylhydro- quinone.	128
3.8	Variation du $[Q_A]$ relatif en fonction du quenching NPQ. La valeur de Q_A a été normalisée à 1 pour la première mesure; 100 μM de quinones; 2.10^7 cellules/mL.	130
3.9	Evolution en fonction du temps du Φ_{PSII} corrigé d'échantillons d'algues incubés sous obscurité avec des quinones de forme oxydée. 100 μM de qui- nones; WT : 2.10^7 cellules.mL ⁻¹ ; I=150 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	134
3.10	Suivi de l'état de l'ATP synthase; A gauche sans quinones. A droite avec plusieurs quinones. Pulse appliqué; [Q] :100 μM ; 2.10^7 cellules/mL.	137
3.11	Suivi de l'état de l'ATP synthase; 100 μM de quinones; Flash appliqué; 2.10^7 cellules/mL; [Q] :100 μM ;	138
3.12	Vitesse d'oxydation de Q_A^- en présence de quinones; 50 μM de quinones; 10^7 cellules/mL.	139
3.13	Diminution de la fluorescence. 50 μM de quinones; 10^7 cellules/mL. Zoom sur la descente. Lorsque la diminution de la fluorescence est plus rapide, la réoxydation de Q_A^- l'est aussi. Pour cela il suffit de comparer les pentes aux temps courts.	140
3.14	Diminution de la fluorescence en présence de quinones à différentes concen- trations. 10^7 cellules/mL. A droite zoom sur la descente sur une plus grande plage de concentrations.	140

3.15	A gauche fluorescence sous lumière actinique et sous une série de pulses saturants permettant d'obtenir l'évolution de F_{stat} et F_M au cours du temps ; A droite Evolution du Φ_{PSII} déduit de la courbe à gauche.	141
3.16	Illumination continue et suivi de F_{max} et de F_{stat} ; 50 μM de quinones et référence ; 10^7 cellules/mL. A droite variation du Φ_{PSII} calculée pour 50 μM et la référence.	142
3.17	Illumination continue et suivi de F_{max} et de F_{stat} ; 10 μM de quinones et référence ; 10^7 cellules/mL. A droite variation du Φ_{PSII} calculée pour 10 μM et la référence.	143
3.18	A gauche illumination continue et suivi de F_{max} et de F_{stat} ; 100 μM de quinones et milieu minimum ; $I=700 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; $4\cdot 10^7$ cellules/mL. A droite évolution du Φ_{PSII} pour les deux échantillons.	143
4.1	Structures de la 1,2-benzoquinone (gauche) et de la 1,4-benzoquinone (droite)	147
4.2	Structure de l'alizarine	148
4.3	Répartition des électrons π sur la 1,4-benzoquinone.	149
4.4	Schéma de l'addition nucléophile 1-4 sur la benzoquinone.	149
4.5	Structure de la 1,4-benzoquinone, 2-substituée.	150
4.6	Réaction d'hydrolyse de la chloranil [117]	150
4.7	Mécanisme catalytique supposé d'hydroxylation de la 2,6-dichlorobenzoquinone	151
4.8	Voltammogramme de la 2,6-DCBQ à 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans du milieu minimum sur le dispositif expérimental usuel, vitesse de balayage 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, sens de balayage vers la réduction.	153
4.9	Voltammogramme de la 2,6-DCBQ à 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans du milieu minimum sur le dispositif expérimental usuel, vitesse de balayage 50 mV/s , sens de balayage vers l'oxydation.	154
4.10	Structure de l'acétaminophène	155
4.11	Métabolisme oxydatif de l'acétaminophène [119] ; MPO : Myeloperoxydase	156
4.12	Auto-oxydation de l'adrénaline [119]	157
4.13	«Cross-linking» de la protéine par la quinone [126]	158

4.14 Schémas de cycles redox catalysés par la quinone. L'astérisque indique une possibilité de réalisation uniquement pour les quinones qui s'autooxydent [129]	160
4.15 Bilan comparatif de la cytotoxicité des benzoquinones [128].	162
4.16 Bilan comparatif de la cytotoxicité des naphtoquinones [128].	163
4.17 Ordre de réactivité attendu selon la nature du mécanisme de réaction prédominant.	165
4.18 Facteur de croissance cellulaire moyen en fonction du temps.	166
4.19 Logarithme du facteur de croissance cellulaire moyen en fonction du temps.	166
4.20 Structure de la 2,5-dichloro-3,6-dimorpholine-1,4-benzoquinone synthétisée au laboratoire.	169
4.21 Voltamétrie cyclique de la 2,5-dichloro-3,6-dimorpholine-1,4-benzoquinone dans du milieu minimum. Vitesse de balayage :100 mV.s ⁻¹ ; 500 μmol.L ⁻¹ .	170
4.22 Courants obtenus. 0,38V vs Ag/AgCl ; Quinones :100 μM ; I=60mW ; WT :2.10 ⁷ cellules.mL ⁻¹	170
4.23 Graphe d'induction de fluorescence. I=135 μE.m ⁻² .s ⁻¹ ; Quinones :100 μM ; WT :2.10 ⁷ cellules.mL ⁻¹	171
4.24 Formule de la 2,5-Dichloro-3,6-di- <i>tert</i> -butylthio1,4-benzoquinone synthétisée au laboratoire.	172
4.25 Voltamétrie cyclique de la 2,5-dichloro-3,6-di- <i>tert</i> -butylthio-1,4-benzoquinone dans du milieu minimum. Vitesse de balayage :100 mV.s ⁻¹ . 100 μmol.L ⁻¹ .	173
4.26 Formule de la 2,3-diméthyl 5-phényl 1-4-benzoquinone synthétisée au laboratoire.	173
4.27 Voltamétrie cyclique de la 2,3-diméthyl-5-phényl-1,4-benzoquinone dans du milieu minimum ; vitesse de balayage : 100 mV.s ⁻¹	174
4.28 Suivi de l'état de l'ATP synthase ; 100 μM en quinones ; WT : 2.10 ⁷ cellules/mL.	176
4.29 Induction de fluorescence sur des solutions d'algues incubées avec les quinones pendant 30 min avant et après lavage. [Q] :50 μM ; WT : 10 ⁷ cellules/mL.	176

4.30	Induction de fluorescence sur des solutions d'algues incubées avec les quinones pendant 30 min et 3 h 30 min. [Q] :50 μM ; 10^7 cellules/mL.	177
4.31	Induction de fluorescence prolongée sur des solutions d'algues incubées avec la DMPPBQ . [Q] :100 μM ; WT : 2.10^7 cellules/mL. On voit un déquenching avec un regain des performances du ΦPSII	177
4.32	Chronoampérogramme obtenu. $P_I=20 \text{ mW.cm}^{-2}$; [DMPBQ] :100 μM ; WT : 2.10^7 cellules/mL.	178
4.33	Chronoampérogrammes obtenus. 0,38 V vs Ag/AgCl; $P_I=20$ et 60 mW.cm^{-2} ; [Q] :100 μM ; 2.10^7 cellules.mL $^{-1}$. la 2,6-DMBQ et la DMPPBQ exhibent de meilleures performances sous lumière faible que forte ce qui montre que dans ces conditions les algues sont très sensibles à la photoinhibition et que le soulagement ne se fait pas d'une manière efficace.	180
4.34	Dispositif « coflux » (points verts = suspension d'algues ; « M » = médiateur).185	
4.35	Dérivé ferrocénique envisagé comme nouveau médiateur.	185
4.36	Deux puits utilisés dans les expériences d'électrochimie	190
4.37	Photo du dispositif utilisé	191
4.38	Photo de la cuve utilisée pour le montage à circulation	193

Liste des tableaux

- 2.1 Tableau récapitulatif des différents potentiels de réduction et d'oxydation vs Ag/AgCl obtenus par voltamétrie cycliques sur électrode d'or et d'ITO dans les conditions d'études similaires. 82
- 2.2 Courants obtenus sur Souche sauvage (WT) et mutée ($\Delta f1$) avec différentes quinones normalisés par rapport à la valeur du courant obtenu avec la 2,6-DCBQ. 93
- 3.1 Valeurs de Φ_{PSII} et de NPQ calculées pour les algues incubées avec des quinones différentes avant et après lavage. Le NPQ a été calculé en prenant comme valeur de référence l'échantillon non incubé avec des quinones avant ou après lavage selon le cas. Les formules utilisées sont celles définies équations 3.6 et 3.10. 136
- 4.1 Énergie des orbitales frontalières π (E_{HO} et E_{BV}) et de la transition $\pi^* \leftarrow \pi$ (ΔE) de la 2,6-dichlorobenzoquinone et de la 2,6-dichloro-3-hydroxyhydroquinone selon la méthode de HÜCKEL simple. $\alpha > 0$ et $\beta < 0$ correspondent respectivement aux intégrales coulombienne et de résonance de HÜCKEL. Modélisation sur le logiciel HULIS®. Les longueurs d'onde de maxima d'absorption λ_{abs} ont été estimées en prenant $\beta = -250 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 152
- 4.2 Tableau récapitulatif des différentes concentrations seuil de toxicité C_{M80} et C_{V80} pour différentes quinones. Photocourants enregistrés sur WT normalisés par rapport à la 2,6-DCBQ. Potentiels de pic de réduction indicatifs extraits de la voltamétrie cyclique de la forme benzoquinone vs Ag/AgCl. 167

4.3 Photocourants atteints hors du domaine des concentrations toxiques pour
les algues sur les domaines stationnaires. $P_I=20 \text{ mW.cm}^{-2}$ 179

Résumé :

L'énergie est un enjeu crucial pour les sociétés actuelles et le recours à des énergies alternatives est de jour. Or la photosynthèse apparaît comme une piste intéressante et les unités photosynthétiques comme des convertisseurs potentiels sélectionnés par l'Evolution. Lors de la photosynthèse l'électron poursuit son cheminement le long de la chaîne photosynthétique pour permettre la mise en marche des différents complexes enzymatiques nécessaires au maintien de la vie de l'organisme photosynthétique.

L'étape cinétiquement limitante de ce transfert électronique se situe en amont du cytochrome b_6f . C'est cette limitation qui serait responsable des dommages encourus par les algues sous forte lumière connus sous le nom de photoinhibition. Ainsi pour ne pas compromettre la vie de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, la stratégie mise en place durant ces travaux de thèse a été de dériver les électrons d'une manière sélective en amont de l'étape cinétiquement limitante. Pour cela des quinones exogènes sont utilisées comme accepteurs d'électrons capables d'atteindre la chaîne photosynthétique, de récupérer les électrons et de venir s'oxyder à l'électrode polarisée.

Une demi-pile a été mise en place et la stabilité du courant dans le temps étudiée. Une toxicité des quinones a en particulier été mise en évidence et serait responsable de la dégradation des performances du système au cours du temps. Les spectroscopies de fluorescence et d'absorption ont pu fournir des éléments de réponse.

Des critères de choix de quinones ont été identifiés et partant de là de la synthèse organique a été effectuée pour essayer de trouver un compromis entre dérivation et toxicité.

Mots clés : [Photosynthèse, algues, quinones, étape cinétiquement limitante, dérivation, électrons]

Photosynthetic electron derivation on living organism using quinones: the case of *Chlamydomonas reinhardtii*

Abstract :

Nowadays, energy is a major concern to societies and research is focusing on finding new sources of clean and sustainable energy.

In this context, photosynthesis may be an appropriate way to meet this objective. Indeed solar light provides the chemical energy required by photosynthetic organisms to maintain their cellular activity.

Taking advantage of photosynthesis to produce a photocurrent requires intercepting electrons exchanged in the oxidation/reduction processes occurring along the photosynthetic chain. This is why we consider here an electrochemical device involving a gold electrode able to derive photosynthetic electrons from a population of *Chlamydomonas reinhardtii* algae. However photosynthesis is a multi-speed process and a rate controlling step was identified just before the b_6f complex. This is why the strategy of this work aimed at deriving electrons before the b_6f cytochrome. This allows to relieve algae from stress under high light conditions.

Known as efficient PSII acceptors, quinones were used as exogenous mediators to transfer the electrons from the photosynthetic chain to the electrode surface. Therefore, the resulting photocurrents under illumination, were commented and discussed in order to understand and define the best appropriate experimental conditions for this bio-solar generator. Quinones were shown to induce toxicity on algae. Focus was directed on finding the best chemical structure which would combine good derivation properties and little toxicity.

Keywords : [photosynthesis, algae, quinones, toxicity, rate controlling step, *Chlamydomonas reinhardtii*, electrons, derivation]