

Bioénergétique cellulaire

P. Pierre JOLIOT, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

Le cours de cette année a porté sur l'étude des processus de collection de l'énergie lumineuse chez les organismes photosynthétiques.

La première partie du cours a été consacrée à un rappel historique montrant comment le concept d'appareil collecteur d'énergie lumineuse s'est progressivement imposé. Emerson et Arnold, étudiant l'émission d'oxygène par des algues unicellulaires illuminées par des éclairs répétitifs de courte durée, ont démontré qu'une enzyme présente à concentration beaucoup plus faible que la chlorophylle limite la quantité d'oxygène émise par éclairs. Gaffron et Wohl ont alors supposé que la majorité des pigments chlorophylliens ne jouait que le rôle de collecteur d'énergie lumineuse. L'énergie d'excitation apparaissant au niveau de ces pigments collecteurs est rapidement transférée vers des centres photochimiques, environ 200 fois moins concentrés. Gaffron et Wohl se sont appuyés sur les travaux de Jean Perrin et de Francis Perrin, puis de Förster qui avaient analysé sur le plan théorique les processus de transfert d'excitation par résonance intervenant entre molécules de propriétés spectroscopiques voisines. L'hypothèse des transferts d'excitation fut définitivement établie lorsque, grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes spectrophotométriques, il a été possible de mesurer les changements d'absorption photoinduits de la chlorophylle *in vivo*. Il est apparu qu'une très faible fraction de la chlorophylle (environ 1/200^e) était susceptible de réagir photochimiquement. Par contre, la section efficace de capture de ces chlorophylles photochimiques est environ 200 fois plus élevée que celle d'une seule molécule de chlorophylle, ce qui démontre que l'énergie absorbée par la majorité des pigments est rapidement transférée au centre photochimique. L'existence d'une antenne collectrice de lumière représente une remarquable adaptation aux conditions d'illumination solaire à la surface du globe. En effet, une molécule de chlorophylle absorbe environ 1 photon par seconde dans des conditions d'illumination solaire moyenne. Les chaînes de transfert d'électrons associées aux centres photochimiques sont susceptibles d'évacuer environ 100 charges positives et négatives par seconde. En multipliant la section de

capture des centres photochimiques par 200, l'antenne collectrice permet donc d'utiliser dans des conditions optimales les capacités d'évacuation de charges des chaînes de transfert d'électrons photosynthétiques.

La totalité des pigments collecteurs d'énergie est associée d'une manière non covalente à des protéines qui, dans la majorité des cas, sont intégrées dans les membranes photosynthétiques. Bien qu'une fraction importante de la surface membranaire soit occupée par les protéines portant les pigments collecteurs d'énergie, et que la densité de ces pigments par unité de surface soit élevée (environ 1 pigment pour 4nm^2), la fraction d'énergie incidente absorbée par une seule membrane photosynthétique reste faible. La presque totalité des organismes photosynthétiques a développé des structures cellulaires permettant de multiplier la surface membranaire. Les chloroplastes de plantes supérieures comportent ainsi des empilements de plus d'une centaine de membranes internes qui absorbent une fraction importante de l'énergie solaire incidente, tout particulièrement dans les bandes bleues et rouges de la chlorophylle. Dans le cas des feuilles de plantes supérieures, la superposition de plusieurs couches de chloroplastes permet d'intercepter la majeure partie du spectre solaire entre 400 et 700 nm. Dans un certain nombre de cas (bactéries vertes, cyanobactéries, algues à pigments accessoires), une partie importante de l'appareil collecteur d'énergie se trouve localisée dans des structures extramembranaires, tels que les chlorosomes ou les phycobilisomes. Ces structures extramembranaires sont en étroite interaction avec les protéines membranaires portant les pigments chlorophylliens et les centres photochimiques. L'énergie d'excitation apparaissant au niveau de ces pigments extramembranaires est transférée avec une très haute efficacité aux centres photochimiques.

La seconde partie du cours a été consacrée à l'analyse sur le plan thermodynamique des processus de transfert d'excitation et de conversion de l'énergie d'excitation en énergie chimique. L'appareil photosynthétique peut être considéré comme une machine thermique dont on peut définir le rendement de Carnot. La température de la source chaude correspond à celle d'un corps noir émettant des photons absorbés par la chlorophylle, la température de la source froide est celle du milieu dans lequel est plongé l'appareil photosynthétique. Le rendement maximum d'une telle machine thermique est donc fonction de la différence entre la température du corps noir, et la température de la source froide. Dans des conditions d'illumination solaire moyenne, le rendement maximum théorique de la photosynthèse est de l'ordre de 70 à 80 %, ce qui correspond à la fraction de l'énergie lumineuse qui peut être convertie en énergie libre sous forme chimique. Dans ces conditions de rendement maximum, les seules pertes d'énergie correspondent aux réactions de désexcitation radiative de la chlorophylle. L'adjonction d'un appareil collecteur d'énergie accroissant la section de capture des chlorophylles photochimiques ne modifie pas le rendement maximum du processus. Expérimentale-

ment, les rendements énergétiques mesurés dans le cas d'un centre réactionnel isolé sont nettement moins élevés et généralement compris entre 40 et 50 %. Cette baisse de rendement traduit l'intervention de réactions de désexcitation non radiative (conversion interne) ou de réactions de recombinaison entre les charges positives et négatives séparées lors de la réaction photochimique primaire. On peut démontrer que ce sont les réactions de recombinaison de charges, et non les pertes d'excitation non radiatives, qui limitent le rendement du processus photosynthétique. Dans ce cas, l'existence d'une antenne collectrice qui concentre l'énergie d'excitation sur les centres photochimiques se traduit par une amélioration du rendement énergétique qui peut atteindre 5 à 10 %.

Le cours a ensuite porté sur l'analyse des propriétés spectroscopiques de la chlorophylle et sur l'importance des couplages entre transition électronique et transition vibrationnelle dans la définition des spectres d'absorption des pigments photosynthétiques. Les processus de transfert d'excitation entre pigments ont ensuite été analysés sur le plan théorique. Les paramètres essentiels définissant l'efficacité de transfert d'excitation entre deux molécules sont la distance, l'orientation relative des moments de transition des deux molécules et le recouvrement entre le spectre d'émission de la molécule donneur et le spectre d'absorption de la molécule accepteur. La distance entre les molécules joue un rôle prépondérant dans la mesure où les vitesses de transfert varient comme l'inverse de la puissance sixième de cette distance. La probabilité de transfert peut être définie comme le rapport entre la constante de vitesse de transfert de la molécule donneur vers la molécule accepteur et l'inverse de la durée de vie de l'excitation présente sur la molécule donneur isolée. Pour des pigments de propriétés spectrales voisines, les probabilités de transfert d'excitation de 50 % sont atteintes pour des distances de l'ordre de 4 à 5 nm. Une multiplication par un facteur 2 de cette distance se traduira par une diminution d'un facteur 64 de la probabilité de transfert. La position relative des molécules de pigments joue également un rôle important dans la mesure où la probabilité de transfert d'excitation dépend de l'orientation relative des moments de transition électronique des molécules donneurs et accepteurs. Un calcul théorique des probabilités de transfert implique que soient connues avec précision la structure des protéines membranaires et la position exacte des chromophores.

On distingue d'une manière qualitative deux modes de couplage entre molécules de pigments. Le couplage fort correspond au cas où les distances intermoléculaires sont très faibles et les orientations relatives des moments de transition favorables. Dans ce cas, les propriétés d'absorption des molécules fortement couplées sont perturbées, et pendant des durées de l'ordre de 0,1 picoseconde, l'excitation électronique apparaît comme une propriété collective des molécules couplées. Les spectres d'absorption sont fortement perturbés et il apparaît deux bandes excitoniques situées en position symétrique par rap-

port à la bande d'absorption de la molécule isolée. Un certain nombre de complexes chlorophylle-protéine de l'antenne collectrice d'énergie présente de telles bandes excitoniques. Des informations structurales ont pu être atteintes par une analyse théorique de ces bandes excitoniques. Le cas le plus général correspond au mode de couplage faible qui s'observe lorsque les distances entre pigments sont de l'ordre de quelques nanomètres. Dans ce cas, les propriétés spectrales des molécules ne sont que peu modifiées par la présence des pigments voisins, et l'excitation peut être considérée comme localisée à un instant donné sur une seule molécule.

La dernière partie du cours a porté sur l'analyse des processus de transfert d'excitation dans les membranes photosynthétiques. Les caractéristiques des très nombreuses protéines membranaires portant les pigments collecteurs d'énergie ont été analysées en détail. Il s'agit la plupart du temps d'édifices moléculaires de grandes dimensions formés par l'association non covalente de polypeptides de faible poids moléculaire (souvent de l'ordre de 20 000 kD). Le nombre de pigments associés à chacun de ces polypeptides reste un sujet de controverse. Les estimations les plus récentes conduisent à supposer que des monomères de l'ordre de 20 000 kD pourraient fixer plus de 12 molécules de chlorophylle. Ceci pose un problème sur le plan structural dans la mesure où les résidus d'acides aminés susceptibles de fixer des molécules de chlorophylle, tels que par exemple les résidus histidine, sont en nombre insuffisant dans ces structures. Ces polypeptides comportent probablement de 3 à 4 hélices α transmembranaires. Qu'il s'agisse des chromoprotéines collectrices d'énergie provenant de bactéries photosynthétiques ou de plantes supérieures, on observe que les positions des bandes d'absorption d'un même pigment peuvent varier dans de très larges proportions. Ainsi, dans le cas des bactéries photosynthétiques pourpres, la position des bandes d'absorption de la bactériochlorophylle a peut varier de 800 à 880 nm. Les propriétés d'absorption des pigments dépendent de l'environnement local et du mode de fixation des pigments sur les protéines collectrices d'énergie lumineuse. Ces effets d'environnement élargissent les domaines spectraux dans lesquels la lumière solaire est absorbée et par conséquent améliorent sensiblement l'efficacité de collection de l'énergie lumineuse.

D'une manière générale, on peut distinguer deux types d'édifices moléculaires formés chacun par l'association de plusieurs polypeptides porteurs de pigments chlorophylliens. Un premier type d'édifices porte les centres réactionnels associés à un certain nombre de chlorophylles collectrices (50 à 100). Ce type de structure souvent dénommé « cœur » est présent dans la totalité des organismes photosynthétiques. Les protéines constituant les antennes cœur ainsi que les centres photochimiques sont toujours intégrés aux membranes photosynthétiques. Une seconde catégorie d'édifices protéiques ne comporte que des molécules collectrices d'énergie. Ces édifices protéiques constituent l'antenne collectrice périphérique. Les caractéristiques biochimiques et structu-

rales de ces antennes périphériques sont beaucoup plus variées que celles des antennes cœur. Il s'agit le plus souvent de protéines membranaires. Cependant, certaines antennes périphériques forment des structures extra-membranaires et sont constituées de protéines hydrophiles. D'une manière générale, les pigments de l'antenne périphérique absorbent à plus courte longueur d'onde que les pigments proches des centres photochimiques. Les transferts d'excitation depuis l'antenne périphérique vers les centres photochimiques s'accompagnent donc d'une certaine perte d'énergie à laquelle correspond un certain degré d'irréversibilité. Il y a donc concentration de l'énergie d'excitation sur les pigments proches des centres photochimiques, ce qui améliore l'efficacité de la collection de l'énergie lumineuse.

Nos connaissances actuelles sur les mécanismes de transfert d'excitation mesurés sur des membranes photosynthétiques intactes reposent en grande partie sur la mesure de la fluorescence des pigments photosynthétiques. La fluorescence est une voie de dissipation de l'énergie d'excitation qui est en compétition avec la conversion photochimique. La fluorescence apporte donc des informations précieuses sur la vitesse des processus de piégeage de l'excitation par les centres photochimiques. L'analyse des cinétiques de variation du rendement de la fluorescence ainsi que celle des cinétiques des réactions photochimiques a permis d'établir que l'énergie d'excitation peut circuler dans des domaines membranaires comportant plusieurs centres photochimiques. On observe en effet que, dans des conditions d'illumination constante, la probabilité de capture de l'excitation par un centre photochimique augmente lorsque le nombre de centres photochimiques diminue. On peut en conclure que plusieurs centres photochimiques sont en compétition pour la capture de l'énergie d'excitation. Les domaines membranaires dans lesquels l'oxydation électronique peut circuler librement comportent probablement plusieurs milliers de molécules de pigments et 3 à 4 centres photochimiques.

Des informations précieuses peuvent également être obtenues en analysant les spectres d'excitation et d'émission de la fluorescence. Les spectres d'excitation apportent des renseignements sur la nature des pigments absorbant la lumière, alors que les spectres d'émission apportent des informations sur la nature des pigments où s'accumule de manière préférentielle l'énergie d'excitation, pigments qui, comme nous l'avons vu, sont généralement proches des centres photochimiques. La mesure des durées de vie de fluorescence apporte également des données sur les mécanismes de transfert de l'énergie d'excitation à l'intérieur des complexes protéiques collecteurs d'énergie ou entre ces complexes.

Les données fonctionnelles obtenues par une grande variété de techniques physiques sont intéressantes à confronter aux données structurales obtenues analysant par microscopie électronique la structure des membranes photosynthétiques. Les méthodes de cryofracture qui permettent de séparer les deux

feuilletés lipidiques dans une membrane se sont révélées particulièrement adaptées à l'étude des membranes photosynthétiques. Ces méthodes ont permis de localiser les complexes protéiques portant les centres photochimiques II impliqués dans le mécanisme de photolyse de l'eau. Ces complexes sont répartis dans la membrane d'une manière relativement aléatoire, les distances moyennes entre complexes étant de l'ordre de 20 à 30 nm. Une partie des antennes périphériques est associée directement aux centres photochimiques, l'ensemble formant des édifices dont le diamètre est de l'ordre de 12 nm. Le reste de l'antenne périphérique est plus difficile à localiser dans la mesure où les protéines correspondantes se retrouvent dans une face de fracture différente de celle où se trouvent les centres photochimiques. La distance bord à bord entre les édifices supra-moléculaires portant les centres réactionnels étant de l'ordre de 10 nm, la probabilité de transfert d'excitation directe de centre à centre est relativement faible. Il est donc probable que certaines protéines de l'antenne périphérique jouent le rôle d'un relais facilitant le transfert de l'excitation. La structure de l'appareil pigmentaire conduit donc à distinguer deux types de transfert d'excitation. Une première catégorie de transfert se déroule entre pigments appartenant à un même polypeptide ou à l'intérieur d'un complexe formé par plusieurs de ces polypeptides. Dans ce cas, les distances entre molécules de pigments sont inférieures à 5 nm, et la vitesse de transfert d'excitation doit être rapide. L'énergie peut visiter l'ensemble des molécules du complexe en un temps très inférieur à la durée de vie de l'excitation (200 picosecondes). Une seconde catégorie de transferts se produit entre les complexes. Cette fois-ci, les distances bord à bord sont généralement supérieures à 5 nanomètres. Dans ce cas, la vitesse des transferts d'excitation est un facteur limitant et les pertes par désexcitation radiative ou non radiative ne peuvent plus être négligées.

Il m'apparaît important de souligner que la détermination des facteurs limitant l'efficacité des processus de collection de l'énergie lumineuse repose sur une meilleure connaissance de l'implantation relative des différents complexes implantés dans la membrane photosynthétique. De telles études ne nécessitent pas une résolution supérieure à quelques nanomètres, qui peut facilement être atteinte en faisant appel à la microscopie électronique classique. Des progrès dans ce domaine peuvent être espérés en étudiant des mutants perturbés au niveau de l'appareil pigmentaire. Une analyse fonctionnelle et structurale de ces membranes photosynthétiques perturbées devrait conduire à des progrès décisifs quant à notre compréhension des mécanismes de collection d'énergie par les plantes.

P.J.

SÉMINAIRES

Les séminaires suivants ont été organisés en liaison étroite avec le thème du cours.

M. Marc LUTZ (C.E.N., Saclay), *Conformations et environnements locaux des pigments photosynthétiques dans les complexes collecteurs de lumière ; approches par spectroscopie Raman.*

M. Guy PAILLOTIN (I.N.R.A.), *Mécanismes de transfert de l'énergie d'excitation.*

M. Ismaël MOYA (L.U.R.E.), *Durée de vie et rendement de fluorescence des complexes collecteurs de lumière, isolés ou intégrés dans la membrane photosynthétique.*

M. Jean DEPRez (C.E.N., Saclay), *Annihilation de l'exciton durant la migration de l'énergie dans la membrane photosynthétique.*

M. Francis-André WOLLMAN (Institut de Biologie Physico-Chimique), *Bases moléculaires de la régulation de la distribution de l'énergie lumineuse entre les deux photosystèmes.*

M. Pierre TAPIE (C.E.N., Cadarache), *Les pigments du complexe-antenne des plantes supérieures : caractérisation et aspects fonctionnels.*

M. Jean-Claude THOMAS (Ecole Normale Supérieure), *Antennes extrinsèques chez les cyanobactéries.*

M. John F. ALLEN (Université de Leeds, Grande-Bretagne), *Control by protein phosphorylation of photosynthetic unit function : a general model.*

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

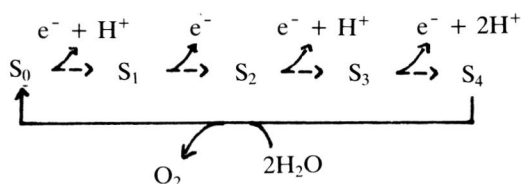
Au cours de l'année 1986-1987, les recherches du groupe de Bioénergétique ont porté essentiellement sur l'analyse structurale et fonctionnelle de l'appareil photosynthétique.

Jean-Luc POPOT a poursuivi ses recherches sur la caractérisation et la structure de la bactériorhodopsine.

I. — Mécanisme de photolyse de l'eau et de dégagement d'oxygène (J. LAVERGNE)

Les centres photochimiques du Photosystème II directement impliqués dans le mécanisme de photolyse de l'eau comportent des chaînes de transfert d'électrons permettant l'évacuation des charges positives (donneurs d'électrons) et négatives (accepteurs d'électrons) formées lors de la réaction photochimique primaire. Les charges positives sont finalement transférées à un ensemble de transporteurs (Système S). La chaîne des accepteurs comporte deux molécules de plastoquinone, Q_A et Q_B . La molécule Q_B est réduite par un processus impliquant le transfert séquentiel de deux électrons.

L'élucidation du mécanisme d'oxydation photosynthétique de l'eau recouvre des enjeux importants à beaucoup d'égards, tant du point de vue du rôle de cette réaction dans la biosphère et de son importance dans l'évolution, que du point de vue purement mécanistique. Le système de dégagement d'oxygène (SDO) est une machine enzymatique aux performances exceptionnelles, mettant en œuvre quatre intermédiaires de potentiel rédox très élevé (proches de + 1000 mV) accumulés séquentiellement, dans une réaction de haut rendement quantique et énergétique. Le schéma général de la réaction (modèle de Kok) est connu depuis longtemps :



Les « états-S » représentent cinq degrés d'oxydation successifs du système, la re-réduction de S_4 s'effectuant spontanément avec libération d'une molécule d'oxygène. Les étapes d'oxydation (dont certaines s'accompagnent d'une libération de protons) sont déclenchées par la rotation photochimique du Photosystème II dont le SDO est le donneur terminal d'électrons. Les états S_0 et S_1 sont stables à l'obscurité, alors que S_2 et S_3 se désactivent lentement (plusieurs dizaines de secondes) vers S_1 .

Le problème de l'identification en termes biochimiques des mécanismes d'oxydation intervenant dans le cycle S est l'objet du travail de nombreuses équipes. Une question importante est de déterminer si certaines étapes correspondent à des oxydations intermédiaires de l'eau ou si l'accumulation des quatre équivalents oxydés est entièrement prise en charge par des centres

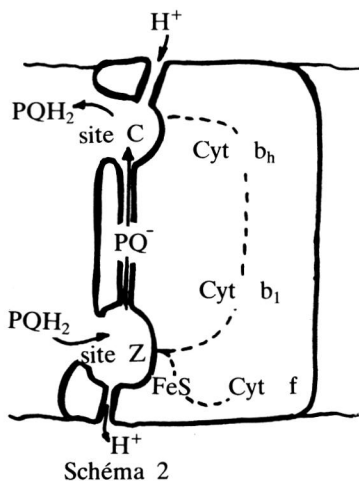
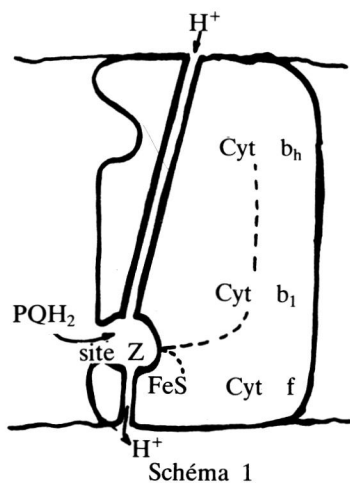
rédox spécifiques, auquel cas l'oxydation des deux molécules d'eau n'interviendrait que dans une réaction finale concertée à quatre électrons. On sait que quatre atomes de manganèse sont nécessaires à l'intégrité fonctionnelle du SDO, et l'interprétation d'un signal RPE spécifique de l'état S_2 suggère que l'étape $S_1 \rightarrow S_2$ consiste en une oxydation $Mn(III) \rightarrow Mn(IV)$. Plusieurs groupes, dont le nôtre, ont entrepris d'établir les spectres des changements d'absorption dans l'ultraviolet qui permettent de suivre les changements de l'état d'oxydoréduction du manganèse. Ce travail est difficile, en raison notamment des contributions spectrales étrangères au système S, et tout particulièrement celles d'un autre système cyclique (de période deux, celui-là), correspondant à la formation et disparition successives de la forme semiquinone de l'accepteur secondaire Q_B . Pour éliminer ce signal, J. Lavergne a mis au point une méthode basée sur l'utilisation d'une préillumination en présence de FCCP, une substance qui accélère la re-réduction des états S_2 et S_3 sans affecter l'état redox des accepteurs Q_B . En utilisant divers protocoles de préillumination (lumière continue et éclairs), on peut faire varier l'état initial du système S entre les situations initiales où les centres sont en majorité en S_1 (près de 100 %) ou en S_0 (60 % S_0 - 40 % S_1). Les séquences de changement d'absorption obtenues lors d'une série d'éclairs à partir de ces deux types de conditions initiales sont beaucoup plus riches en informations exploitables que lorsque l'on part de la seule situation de mélange 25 % S_0 - 75 % S_1 généralement rencontrées sur du matériel non préilluminé. On peut alors effectuer dans de bonnes conditions la déconvolution des spectres de différence des transitions $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$ et $S_2 \rightarrow S_3$ (la transition $S_3 \rightarrow S_4$ échappant encore à l'analyse pour des raisons cinétiques). Les résultats obtenus par J. Lavergne peuvent se résumer ainsi : 1) La transition $S_0 \rightarrow S_1$ ne s'accompagne d'aucun changement d'absorption significatif dans la région spectrale étudiée (290-570 nm). 2) La transition $S_1 \rightarrow S_2$ fait apparaître une bande d'absorption autour de 310 nm et une oscillation dans la région bleue qui s'interprète comme une perturbation électrochromique du spectre de la Chla. 3) Cette perturbation est absente du spectre de $S_2 \rightarrow S_3$ qui en revanche comporte une bande d'absorption dans l'ultraviolet, quoique significativement différente, de celle associée à $S_1 \rightarrow S_2$.

Ces résultats rendent peu plausibles le modèle proposé par Dekker et Van Gorkom selon lequel chacune des étapes $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$, $S_2 \rightarrow S_3$ correspondrait à une même oxydation $Mn(III) \rightarrow Mn(IV)$ successivement sur trois atomes de Mn. Les spectres de différence observés dans l'U-V pour $S_1 \rightarrow S_2$ et $S_2 \rightarrow S_3$ peuvent être associés à des bandes de transfert de charge ligand $\rightarrow Mn$. Malheureusement, la position de telles bandes ne dépend pas uniquement du degré d'oxydation du métal, mais aussi du potentiel d'ionisation des ligands (inconnus). Si l'on accepte la conclusion des études RPE du signal associé à S_2 , la transition $S_1 \rightarrow S_2$ devrait correspondre à $Mn(III) \rightarrow Mn(IV)$.

II. — Etude du complexe transmembranaire du cytochrome b6/f

(P. JOLIOT, A. JOLIOT)

Le mécanisme de transfert d'électrons et de pompage de protons intervenant au niveau du complexe transmembranaire cytochrome b6/f reste certainement l'un des problèmes majeurs non résolus de la bioénergétique membranaire. Ce complexe présent, aussi bien dans les chloroplastes que dans les membranes mitochondriales bactériennes, joue un rôle central en réalisant l'oxydation de molécules solubles dans la phase lipidique (plastoquinones ou ubiquinones) et la réduction de molécules hydro-solubles (plastocyanine ou cytochrome c). A ce transfert d'électrons est associé le pompage d'un proton à travers la membrane. Les résultats récents obtenus dans notre laboratoire ont montré que les processus de pompage de protons observés lorsque le complexe est placé dans des conditions très réductrices ne pouvaient être interprétés de manière satisfaisante par les modèles classiques de boucle électrogénique proposés par Mitchell. Deux types de mécanismes peuvent rendre compte de nos expériences. Dans tous les cas, la réaction est initiée par le transfert d'une charge positive depuis les donneurs du Système photochimique I vers le cytochrome f, transporteur localisé à proximité de la face interne du thylakoïde. Cette charge positive induit l'oxydation d'une plastoquinone en semiquinone chargée au niveau d'un site qui est également proche de la face interne de la membrane (site Z). Dans des conditions très réductrices, les deux molécules de cytochrome b sont présentes à l'état réduit. Un électron va être transféré depuis l'une des molécules de cytochrome b vers la semiquinone qui sera alors réduite en dihydroquinone. Deux classes de modèles permettent de rendre compte du processus de réduction de la semiquinone formée lors de la première étape réactionnelle. Dans un premier modèle (schéma 1), on suppose que la semiquinone reste fixée sur le site Z proche de la face interne de la membrane.



La réduction de la semiquinone en dihydroquinone s'accompagne de la fixation de deux protons qui sont prélevés sur la face externe de la membrane. Un tel modèle suppose donc l'existence d'un canal à protons mettant en communication le site interne de fixation de la quinone avec la face externe. Dans un second modèle, on suppose que la semiquinone chargée peut traverser la membrane et venir se fixer sur un site C localisé à proximité de la face externe de la membrane (voir schéma 2). Dans ce modèle, la semiquinone est réduite par le cytochrome b haut potentiel et fixe 2 protons provenant de la face la plus proche du site considéré, c'est-à-dire de la face externe. Dans ces deux modèles, il est nécessaire de supposer que des espèces chargées, protons ou semiquinones, peuvent traverser les zones hydrophobes de la membrane. Pour des raisons énergétiques évidentes, ces modèles supposent donc l'existence de structures protéiques spécialisées réalisant des canaux transmembranaires. Ces structures comportent obligatoirement des acides aminés hydrophiles. La structure primaire des polypeptides constituant dans le complexe cytochrome b₆/f étant maintenant connue, nous rechercherons en collaboration avec Jean-Luc Popot quelle pourrait être la nature de ces zones transmembranaires permettant le mouvement de protons ou de semiquinones.

Les données expérimentales actuellement connues ne nous permettant d'opérer un choix parmi les différents modèles fonctionnels possibles, il nous a paru nécessaire de mieux caractériser les propriétés spectroscopiques et les propriétés redox des différents transporteurs d'électrons associés au complexe cytochrome b₆/f. De nombreuses controverses se sont développées quant aux valeurs des potentiels d'oxydo-réduction des deux cytochromes b. D'autre part, des travaux antérieurs de Jérôme Lavergne effectués dans notre laboratoire avaient conduit celui-ci à supposer l'existence d'un cinquième transporteur d'électrons, G, qui serait associé au complexe cytochrome b₆/f. J. Lavergne avait conclu que ce transporteur hypothétique G était localisé sur la face externe de la membrane et pouvait échanger des électrons avec l'un des cytochromes b situé au milieu de la membrane.

L'analyse détaillée des variations spectrales induites par illumination d'une algue vivante placée en condition d'anaérobiose nous a permis de déterminer les spectres des deux cytochromes b, ainsi que le spectre du transporteur G. L'intermédiaire G présente un spectre très voisin de celui des cytochromes c'. Il s'agit d'une classe de cytochromes présents dans différentes bactéries dont le spectre est particulièrement aisé à distinguer des autres cytochromes de la chaîne photosynthétique, mais dont la fonction est totalement inconnue. Ces résultats peuvent suggérer que le transporteur G (comme les autres cytochromes c') est une molécule soluble localisée dans la phase aqueuse externe au thylakoïde qui pourrait s'associer par une réaction réversible au complexe b₆/f. Le transporteur G apparaît comme un élément essentiel d'une nouvelle chaîne de transporteurs d'électrons établissant un lien entre les transporteurs redox de bas potentiel tel que la nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate

et le cytochrome b. Cette chaîne de transporteurs d'électrons permettrait la réduction directe du cytochrome b par une voie n'impliquant pas les sites Z ou C fixant la quinone. Cette chaîne de transporteurs jouerait un rôle capital en catalysant d'une manière spécifique les réactions de transfert cyclique autour du système photochimique I.

III. — *Etude de l'ATPase des thylakoïdes de C. reinhardtii* — *Le cas d'un mutant dépourvu du complexe qui survit en conditions phototrophes*

Le processus de conversion d'un gradient électrochimique de protons en énergie chimique par formation d'adénosine triphosphate ou ATP s'effectue au niveau d'une enzyme membranaire, l'ATPase. Cette enzyme est formée par l'association de polypeptides transmembranaires (CF0) et extramembranaires (CF1).

C. Lemaire et F.A. Wollman ont identifié toutes les sous-unités du complexe CF1-CF0 des thylakoïdes de *C. reinhardtii* par le double critère de la présence de ces sous-unités dans le complexe purifié et de leur absence dans des mutants dépourvus d'activité ATPasique. Le site de synthèse, chloroplastique ou nucléaire, de chaque sous-unité a été identifié par l'usage d'inhibiteur spécifique de la traduction chloroplastique ou cytoplasmique. Quelques informations sur la mise en place du complexe ont été obtenues à partir de l'étude de différents mutants. Il y a attachement solidaire des sous-unités du CF1 à la membrane des thylakoïdes, sans doute par pré-assemblage puis fixation. En l'absence du CF1, les sous-unités du CF0 s'insèrent dans la membrane mais ne peuvent pas s'accumuler.

F.A. Wollman et C. Lemaire ont mis en évidence un polypeptide extrinsèque de 60kDa qui possède des sites antigéniques communs avec l'une des sous-unités (β) du CF1 ou du F1 de différents organismes non photosynthétiques. Ce polypeptide n'a pas d'équivalent dans les thylakoïdes de plantes supérieures. Nous avons montré qu'il ne permet pas d'utiliser le potentiel de membrane en l'absence de CF1-CF0. Sa fonction reste donc à déterminer.

Une mutagenèse à l'azide, réalisée sur un mutant dépourvu d'ATPase et ne poussant donc qu'en condition hétérotrophe, a permis à P. Bennoun d'isoler un clone, FUD50su, poussant en condition phototrophe, donc capable de fixer le dioxyde de carbone atmosphérique. Par une analyse biochimique des thylakoïdes de ce double mutant, F.A. Wollman et C. Lemaire ont pu exclure une restauration de l'ATPase par réversion génétique ou par transfert d'information entre les génomes nucléaires et chloroplastiques. De plus, le potentiel électrochimique de protons ne peut induire la synthèse d'ATP comme dans le mutant d'origine. F.A. Wollman et C. Lemaire ont démontré que la source de

production d'ATP, utilisée pour la photosynthèse de ce mutant, provenait des mitochondries dont le fonctionnement était lui-même tributaire des réducteurs produits dans le chloroplaste. En effet, la souche FUD50su, cultivée en condition phototrophe, est sensible à l'antimycine et au myxothiazol, inhibiteurs de la respiration, alors que la souche sauvage ne l'est pas. De plus, ces mêmes inhibiteurs bloquent l'émission d'oxygène dans le mutant seulement, indiquant que l'absence de production d'ATP par les mitochondries bloque le fonctionnement du cycle de Calvin interrompant alors le flux d'électrons photosynthétiques en forte lumière continue. Ces observations se heurtent au fait que les chloroplastes n'ont en principe pas la propriété d'importer de l'ATP. L'hypothèse serait donc que la mutation produite dans le FUD50su a permis d'implanter un échangeur ATP/ADP, semblable à celui qui se trouve dans la membrane mitochondriale, dans l'enveloppe chloroplastique du mutant.

IV. — *Etude de la structure et du repliement des protéines membranaires intégrales* (J.L. Popot)

Cette ligne de recherche est en cours de développement dans le laboratoire. Son objectif est, à travers l'étude de quelques cas particuliers, de comprendre comment la séquence des protéines membranaires se traduit en une structure tridimensionnelle. L'étude structurale des complexes photosynthétiques PSII et b6/f sera développée dans cet esprit. Dans un premier temps, leur composition et leur manipulation en solution sont en cours d'examen. Deux autres systèmes modèles ont été étudiés, une protéine bactérienne qui effectue une forme primitive de photosynthèse, la bactériorhodopsine, et une protéine formant un canal transmembranaire, le récepteur de l'acétylcholine. Ces expériences suggèrent un modèle de repliement à deux étapes que conforte l'examen des données structurales disponibles dans la littérature concernant d'autres systèmes, tels que les centres réactionnels de *Rhodobacter viridis*.

Etude sur la bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine (BR) est une photo-pompe à protons, composée d'une seule chaîne polypeptidique courte (248 acides aminés) à laquelle est liée covalamment une molécule de rétinol. La séquence est connue. Données cristallographiques, spectroscopiques, biochimiques et énergétiques indiquent que le domaine transmembranaire, qui représente environ 75 % de la masse protéique, est constitué de sept hélices α , dont la position dans la séquence peut être inférée avec une relative précision. La structure tridimensionnelle est connue à une résolution d'environ 6,5 Å grâce à l'étude par diffraction électronique de cristaux bidimensionnels. Cette résolution ne permet ni de

visualiser les boucles connectant les hélices, ni d'identifier la séquence de ces dernières. En conséquence, la disposition des groupes chimiques dans la molécule et le mécanisme de pompage des protons restent inconnus.

Les techniques de renaturation/reconstitution que J.L. Popot a mises au point lors d'un séjour à l'Université Yale ont été appliquées à deux problèmes, l'élucidation du trajet de la chaîne polypeptidique dans la structure tridimensionnelle et l'étude de son mode de repliement.

Le premier projet consiste à localiser par diffraction des neutrons les segments de séquence correspondant aux sept α -hélices transmembranaires qui composent la structure. Des échantillons de BR native sont préparés, dans lesquels certains résidus d'acides aminés ont été biosynthétiquement deutérés. La BR est clivée chymotryptiquement entre la deuxième et la troisième hélice, et les deux fragments résultants sont purifiés (à l'état dénaturé). Le protocole de renaturation/reconstitution permet de réassocier chaque fragment au fragment complémentaire non marqué et de reformer des cristaux bidimensionnels. L'étude de ces derniers par diffraction des rayons X et des neutrons indique que la structure BR renaturée est indistinguable de celle de la BR native. La position du deutérium dans la structure, déterminée par diffraction des neutrons, doit permettre de localiser les segments de séquence marqués. Les premiers résultats obtenus par cette technique ont été récemment publiés (POPOT et coll., 1986, TREWHELLA et coll., 1986). Ce travail de cartographie se poursuit en collaboration avec G. Zaccai (Institut Laue-Langevin, Grenoble) et D.M. Engelman (Université Yale, USA).

Le second projet vise à mieux comprendre les forces qui stabilisent la BR et la façon dont elle se structure lors de sa biosynthèse. Ce problème est abordé par le biais d'une étude des modalités de renaturation et de réassociation des fragments chymotryptiques de BR. Nous avons démontré que la structure correcte peut être régénérée à partir de fragments séparément renaturés et réinsérés dans des vésicules lipidiques distinctes, lesquelles sont ensuite fusionnées (POPOT et coll., 1987). Cette série d'expériences est en faveur d'un modèle de repliement en deux étapes thermodynamiquement contrôlées ; dans une première étape, des interactions locales du polypeptide avec les phases aqueuse et membranaire détermineraient le nombre et la position des hélices α transmembranaires. Celles-ci s'assembleraient dans une seconde étape, sans changement de leur nombre, ni essentiellement, de leurs limites dans la séquence.

Le modèle de repliement en deux étapes est cohérent avec les seules structures connues à haute résolution, celles des trois protéines intégrales des centres réactionnels de *Rhodobacter viridis*. Il est en principe applicable à celles des protéines membranaires qui ne comportent que des segments transmembranaires hydrophobes.

PUBLICATIONS

V. PETROULEAS and B.A. DINER. *Identification of Q400, a high-potential electron acceptor of Photosystem I, with the iron of the quinone-iron acceptor complex.* (Biochim. Biophys. Acta, 849, 264-275, 1986).

D.S. BENDALL, M. SANGUANERMSRI, J. GIRARD-BASCOU and P. BENNOUN. *Mutations of Chlamydomonas reinhardtii affecting the cytochrome b/f complex.* (FEBS Letters 203 n° 1, 31-35, 1986).

J.M. ERICKSON, M. RAHIRE, P. MALNOE, J. GIRARD-BASCOU, Y. PIERRE, P. BENNOUN and J.D. ROCHAIX. *Lack of the D2 protein in a Chlamydomonas reinhardtii psbD mutant affects photosystem II stability and D1 expression.* (The EMBO Journal, 5 n° 8, 1745-1754, 1986).

C. LEMAIRE, J. GIRARD-BASCOU, F.A. WOLLMAN and P. BENNOUN. *Studies on the cytochrome b6/f complex. I. Characterization of the complex subunits in Chlamydomonas reinhardtii.* (Biochim. Biophys., Acta, 851, 229-238, 1986).

J. OLIVE, O. VALLON, F.A. WOLLMAN, M. RECOUVREUR and P. BENNOUN. *Studies on the cytochrome b6/f complex. II. Localization of the complex in the thylakoid membranes from spinach and Chlamydomonas reinhardtii by immunocytochemistry and freeze-fracture analysis of b6/f mutants.* (Biochim. Biophys., Acta, 851, 239-248, 1986).

P. BENNOUN. *Le contrôle par la lumière de synthèses protéiques chloroplastiques chez Chlamydomonas reinhardtii fait intervenir les ribosomes attachés aux thylakoïdes.* (C.R. Acad. Sc., Paris, 303, 645-650, 1986).

J. OLIVE, I. M'BINA, C. VERNOTTE, C. ASTIER and F.A. WOLLMAN. *Randomization of the EF particles in thylakoid membranes of Synechocystis 6714 upon transition from state I to state II.* (FEBS Letters 208, n° 2, 308-312, 1986).

O. VALLON, F.A. WOLLMAN, J. OLIVE. *Lateral distribution of the main protein complexes of the photosynthetic apparatus in Chlamydomonas reinhardtii and in spinach : an immunocytochemical study using intact thylakoid membranes and a PS II enriched membrane preparation.* (Photobiochem. Photobiophys., 12, 203-220, 1986).

C. DE VITRY, B.A. DINER and Y. LEMOINE. *Chemical composition of Photosystem II reaction centers (PSII) : phosphorylation of PSII polypeptides.* (Progress in Photosynthesis Research, Volume II, 1, 105-108, ed. J. Biggins, Martinus Nijhoff Publishers, 1987).

S.P. MAYFIELD, P. BENNOUN and J.D. ROCHAIX. *Expression of the nuclear encoded OEE1 protein is required for oxygen evolution and stability of photosystem II particles in Chlamydomonas reinhardtii.* (EMBO Journal, vol. 6, n° 2, pp. 313-318, 1987).

P. TAPIE, Y. CHOQUET, F.A. WOLLMAN, B. DINER and J. BRETON. *Orientation of the pigments in Photosystem II : a low-temperature linear dichroism and polarized fluorescence emission study of chlorophyll-protein complexes isolated from Chlamydomonas reinhardtii*. (*Biochim. Biophys. Acta*, 850, 156-161, 1986).

J.L. POPOT, J. TREWHELLA and D.M. ENGELMAN. *Reformation of crystalline purple membrane from purified bacteriorhodospin fragments*. (*The EMBO Journal*, 5, 3039-3044, 1986).

J. TREWHELLA, J.L. POPOT, G. ZACCAI and D.M. ENGELMAN. *Localization of two chymotryptic fragments in the structure of renatured bacteriorhodopsin by neutron diffraction*. (*The EMBO Journal*, 5, 3045-3049, 1986).

CONGRÉS ET COLLOQUES

S. BUSCHLEN, R. DELOSME, B. DINER, J. GIRARD-BASCOU, P. JOLIOT, A. JOLIOT, C. LEMAIRE, C. DE VITRY, F.A. WOLLMAN. Colloque de Photosynthèse, Saclay, 24-25 avril 1986.

B. DINER, P. JOLIOT. International Workshop « Primary processes of Photosynthesis in green plants : From water oxidation to cyt b6 reduction ». Osnabrück, Allemagne, 15-18 juin 1986.

P. JOLIOT, A. JOLIOT. Visite du Glynn Research Institute. Cornwall, Grande-Bretagne, 14-18 juillet 1986.

P. DELEPELAIRE, J. GIRARD-BASCOU. Colloque « Biologie Moléculaire Végétale ». Strasbourg, 8-11 juillet 1986.

P. JOLIOT. Photochemical Conversion and storage at Solar Energy. UNESCO, Paris, 21-25, juillet 1986.

B. DINER, C. LEMAIRE, C. DE VITRY, F.A. WOLLMAN. VII^e Congrès International de Photosynthèse, Brown University. Providence, USA, 10-15 août 1986.

P. JOLIOT. Journées Interface Physique-Biologie. C.N.R.S. Paris, 8-9 octobre 1986.

P. JOLIOT. Colloque « Relation structure-réactivité en milieux organisés ». C.N.R.S. Paris, 15-17 décembre 1986.

F.A. WOLLMAN. XVIII^e Rencontre de Méribel sur la différenciation cellulaire. Les Arcs, 15-21 mars 1987.

P. JOLIOT, J.L. POPOT. International Symposium on « Cytochrome Systems ; Molecular Biology and Bioenergetics ». Bari, Italie, 7-11 avril 1987.

J.L. POPOT. Atelier de Cristallisation. Orsay, 21-24 avril 1987.