

Bioénergétique cellulaire

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

Le cours de cette année a porté sur l'étude de différentes méthodologies spécifiques permettant l'analyse fonctionnelle du processus photosynthétique. L'appareil photosynthétique est un système enzymatique intégré impliquant de nombreux édifices protéiques transmembranaires portant les différentes molécules actives : transporteurs d'électrons ou pigments collecteurs d'énergie lumineuse. Les progrès spectaculaires de la biochimie des systèmes membranaires ont permis d'isoler la plupart des complexes transmembranaires sous une forme active. De nombreuses expériences d'un très haut intérêt peuvent être réalisées sur des complexes isolés. Il n'en reste pas moins que de nombreux processus de conversion et de transfert d'énergie ne peuvent être observés qu'au sein de structures membranaires intactes, ce qui implique l'étude de matériels biologiques aussi complexes que des chloroplastes isolés ou des algues unicellulaires vivantes. Il faut alors remarquer que l'appareil photosynthétique représente un matériel particulièrement privilégié par rapport aux autres appareils membranaires. Il est en effet possible de déclencher les processus de transfert d'électrons en modifiant brutalement l'intensité d'illumination, par exemple en illuminant le matériel par un éclair de courte durée. L'appareil photosynthétique est le seul système biologique intact dont on peut étudier les propriétés cinétiques dans des domaines de temps allant de la centaine de femtosecondes jusqu'à l'heure. D'autre part, à la suite d'une perturbation brutale de l'intensité d'illumination, seul pourra être modifié l'état de molécules directement impliquées dans le processus photosynthétique et ceci sans aucune purification ou isolement de molécules actives. L'analyse cinétique des processus de transfert d'électrons est la base de la plupart des concepts essentiels de la photosynthèse, c'est ainsi que les démonstrations les plus convaincantes de la validité de la théorie chemiosmotique de Mitchell ont été apportées par l'analyse fonctionnelle des transferts d'électrons sur des structures intactes.

Au cours de ces vingt dernières années, on a assisté au développement d'un nombre très varié de techniques de plus en plus sophistiquées basées le plus

souvent sur des principes classiques, mais qui ont dû être étroitement adaptées à l'étude de l'appareil photosynthétique. Les progrès conceptuels récents ont été le plus souvent suivis de percées technologiques, tout particulièrement dans le domaine de la spectroscopie optique et hertzienne.

La première partie du cours a été consacrée à un rappel historique comparant le développement des méthodes d'étude des systèmes photosynthétique et respiratoire. On peut constater que les méthodes de spectrophotométrie d'absorption ont permis dès 1930 à Keilin d'identifier de nombreux transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire. Il a fallu au contraire attendre les années 60 pour que la spectrophotométrie d'absorption puisse être appliquée à l'étude du processus photosynthétique en raison de la très faible amplitude des signaux observés. Pendant longtemps, les seules informations disponibles sur le fonctionnement de l'appareil photosynthétique ont concerné les échanges gazeux (oxygène, gaz carbonique) se produisant entre le matériel biologique et le milieu environnant. Les premières données quantitatives ont été obtenues grâce à la méthode manométrique de Warburg, qui, en dépit d'une résolution temporelle très médiocre, a permis à des expérimentateurs hors-pair, comme Emerson et ses collaborateurs, de dégager certains des concepts fondamentaux qui ont marqué l'histoire de la photosynthèse. Citons les expériences d'Emerson et Lewis qui ont déterminé le rendement quantique maximum de la photosynthèse et la dépendance de ce rendement vis-à-vis de la longueur d'onde. Malgré l'imperfection des méthodes mises en œuvre, il s'agit-là probablement des mesures les plus précises dont nous disposons à l'heure actuelle. Emerson et Lewis ont démontré que le transfert d'un électron à travers la chaîne photosynthétique implique l'absorption de deux photons, résultat ayant conduit au concept de deux réactions photochimiques fonctionnant en série.

La seconde partie du cours a été consacrée à l'étude des méthodes électrochimiques modernes permettant la détection de l'émission d'oxygène photosynthétique ainsi que la mesure des concentrations de réducteurs formés lors du transfert d'électrons se produisant entre la chaîne photosynthétique et des oxydants artificiels introduits dans le milieu. Ces méthodes sont basées sur la mesure des courants électriques associés à la réduction de l'oxygène ou à l'oxydation des réducteurs, réactions se produisant au niveau d'une électrode métallique placée au contact direct du matériel photosynthétique. Bien que ces méthodes ne permettent que la mesure du flux d'entrée et de sortie des électrons dans la chaîne de transfert, de nombreuses informations quantitatives concernant les caractéristiques cinétiques et thermodynamiques des réactions de transfert d'électrons ont été obtenues. Un progrès considérable a été réalisé en utilisant des électrodes de platine sur lesquelles est sédimentée une couche fine de matériel biologique. Lorsque ce matériel est illuminé par une lumière modulée en intensité à des fréquences comprises entre 10 et 1 000 Hz, le courant ampérométrique lié à la réduction de l'oxygène ou à l'oxydation

des oxydants accepteurs d'électrons est également modulé à la même fréquence. J'ai été amené à développer des techniques ampérométriques en lumière modulée qui se sont révélées d'une sensibilité exceptionnelle. Elles permettent de mesurer avec une résolution temporelle comprise entre quelques millisecondes et quelques centaines de millisecondes des vitesses de production d'oxygène de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-14} moles d'oxygène par seconde. Ces techniques ont permis de déterminer avec une grande précision les spectres d'action des deux réactions photochimiques. En mesurant la différence entre la phase du courant ampérométrique lié à la réduction de l'oxygène et la phase de la lumière modulée, il a été possible de déterminer la valeur de la constante de vitesse ($1\ 000\ \text{sec}^{-1}$) des réactions limitantes intervenant entre la réaction photochimique et la formation de l'oxygène. Les mêmes électrodes permettent également de déterminer avec une précision inégalée les quantités d'oxygène émises lors de l'illumination du matériel biologique par un éclair de courte durée. Il est apparu que lors de l'illumination par une série d'éclairs d'un matériel adapté à l'obscurité, les quantités d'oxygène émises, nulles à la suite des deux premiers éclairs, présentent des oscillations de période 4 progressivement amorties. C'est sur cette base que Kok a pu ultérieurement démontrer que la production d'une molécule d'oxygène impliquait l'absorption séquentielle de 4 photons par un centre photochimique. Ce résultat impliquait donc que les centres photochimiques et l'appareillage enzymatique permettant la formation d'une molécule d'oxygène représentaient des entités totalement isolées les unes des autres.

La dernière partie du cours a été consacrée à l'étude des techniques de spectrophotométrie d'absorption qui ont joué un rôle déterminant au cours de ces vingt dernières années en permettant l'identification de la plupart des transporteurs de la chaîne photosynthétique, ainsi que la détermination des caractéristiques cinétiques et thermodynamiques des réactions de transfert d'électrons. Le retard important pris dans le développement des méthodes spectrophotométriques appliquées à la photosynthèse s'explique par les contraintes très sévères rencontrées dans ce type de mesures. En premier lieu, les pigments chlorophylliens, dont le seul rôle est de capter l'énergie lumineuse incidente, sont présents à des concentrations environ 400 fois plus élevées que la plupart des molécules de la chaîne de transporteurs d'électrons. Ces pigments atténuent considérablement l'intensité de la lumière transmise à travers la suspension. Dans ces conditions, les variations de transmission d'une suspension d'algues unicellulaires ou de chloroplastes isolés qui peuvent être induites par des changements d'éclairement sont extrêmement faibles et le plus souvent comprises entre 10^{-4} et 10^{-2} en valeur relative. Il est d'autre part nécessaire de détecter ces faibles changements d'absorption avec la meilleure résolution temporelle possible. Une seconde contrainte importante est liée au fait que la lumière monochromatique nécessaire pour les mesures d'absorption excite obligatoirement les pigments chlorophylliens et perturbe donc l'état des

transporteurs d'électrons. Cette contrainte est particulièrement sévère en raison de l'existence d'antennes collectrices de lumière qui concentrent l'énergie absorbée par les pigments chlorophylliens sur des centres réactionnels beaucoup moins concentrés. L'intensité des faisceaux détecteurs monochromatiques utilisés dans les méthodes spectrophotométriques doit donc être extrêmement faible afin qu'au cours d'une mesure, la probabilité d'excitation d'un centre photochimique reste faible. Cette contrainte limite très fortement la sensibilité des méthodes spectrophotométriques mises en œuvre. H.T. Witt, à Berlin, a mis au point des techniques spectrophotométriques particulièrement adaptées à la mesure des changements d'absorption induits par des éclairs de courte durée. Ces techniques présentent cependant de faibles rapports signaux/bruit de fond, ce qui rend nécessaire la sommation d'un grand nombre d'expériences identiques. A titre d'exemple, les mesures réalisées par Witt et ses collaborateurs avec des résolutions temporelles de l'ordre de la microseconde nécessitent la répétition et la sommation de 10 000 expériences. Au cours de ces dernières années, nous avons réalisé dans notre laboratoire une technique de très haute sensibilité permettant une utilisation plus rationnelle de la lumière détectrice. Dans cette méthode, la lumière détectrice est distribuée sous forme d'éclairs de courte durée, environ $1 \mu\text{s}$, cette durée définissant la résolution temporelle de la méthode. L'expérimentateur reste libre du choix de l'intervalle de temps entre deux éclairs successifs, ce qui lui permet de s'adapter au mieux aux caractéristiques temporelles particulières du phénomène cinétique qu'il étudie. Il est ainsi possible, en illuminant le matériel par un nombre limité d'éclairs, d'analyser des phénomènes cinétiques couvrant un domaine temporel allant de la microseconde à la minute. La sensibilité exceptionnelle de ces méthodes permet d'éviter le plus souvent la sommation d'expériences.

Un dernier chapitre a été consacré à la spectrophotométrie ultra-rapide appliquée à l'étude des processus primaires de séparation de charges photochimiques. Ces méthodes mettant en œuvre des lasers de très forte puissance et produisant des éclairs de très courte durée (30 à 100 femtosecondes) ont permis d'analyser la cinétique des réactions de transfert d'électrons se produisant au niveau des centres réactionnels bactériens entre le dimère de chlorophylle, donneur primaire d'électrons, et la molécule de phéophytine, accepteur primaire d'électrons. Un même éclair de forte intensité est utilisé pour illuminer l'échantillon biologique et déclencher les réactions photochimiques et pour générer sur la base de processus non linéaires, une lumière blanche qui, convenablement filtrée, servira de lumière détectrice. Dans des domaines de temps aussi courts, le décalage entre l'illumination détectrice et l'illumination actinique est réalisé par des retards optiques. De telles méthodes ont permis de démontrer que la séparation de charges primaires était terminée en moins de 5 picosecondes, une seconde réaction intervenant dans un domaine de temps de quelques centaines de picosecondes permet le transfert d'électrons

entre la molécule de phéophytine et une molécule de quinone, premier accepteur d'électrons stable. La confrontation entre ces données cinétiques et les informations très complètes dont on dispose maintenant concernant la structure de l'appareil photosynthétique devrait permettre de mieux comprendre le mécanisme de transfert d'électrons intervenant dans les édifices protéiques complexes.

P.J.

SÉMINAIRES

M^{me} Françoise REISS-HUSSON (Laboratoire de Photosynthèse, ER 307, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette), *Cristallisation des protéines membranaires : méthodes et intérêts.*

M. Jacques JOYARD (C.E.N., Grenoble), *Préparation et fonction de l'enveloppe des chloroplastes.*

M. Jean-Luc POPOT (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris), *Modèles de repliement des protéines membranaires : justification théorique et exploitation expérimentale.*

M. Claude JACO (Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette), *Transfert des gènes mitochondriaux dans le noyau de levure comme moyen d'étude des protéines mitochondriales.*

M. Jean-Louis MARTIN (Laboratoire d'Optique Appliquée, Ecole Polytechnique), *Dynamique réactionnelle des systèmes biologiques dans le domaine de la femtoseconde.*

M^{me} Eliane NABEDRYK (C.E.A., Saclay), *Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier du centre réactionnel bactérien.*

M. Ismaël MOYA (L.U.R.E., Orsay), *Techniques pour la résolution temporelle des émissions lumineuses dans le domaine de la nanoseconde. Application à l'étude des systèmes photosynthétiques oxygéniques.*

M. Bruno ROBERT (C.E.A., Saclay), *Etude par spectrométrie Raman de résonance des étapes primaires de la photosynthèse.*

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

I. — *Associations entre complexes portant les transporteurs d'électrons dans les membranes photosynthétiques bactériennes*

Les transporteurs d'électrons impliqués dans la chaîne photosynthétique des bactéries pourpres sont inclus dans deux complexes transmembranaires, les centres réactionnels et le complexe du cytochrome bc et une protéine soluble incluse dans l'espace périplasmique, le cytochrome C2. Les charges positives apparaissant au niveau du donneur primaire d'électrons P870 (dimère de bactériochlorophylle) sont tout d'abord transférées au cytochrome C2, puis à la chaîne de transfert d'électrons haut potentiel appartenant au complexe cytochrome bc et comprenant le cytochrome C1 et la protéine de Rieske (centre Fes). Les expériences effectuées sur des chromatophores (fragments de membranes isolés) sont généralement interprétées en admettant que le cytochrome C2, molécule soluble, assure, par un processus de diffusion, le transfert d'électrons entre les deux complexes transmembranaires : centres réactionnels et cytochrome bc.

P. Joliot et A. Joliot, en collaboration avec A. Vermeglio (CEN de Cadarache) ont analysé les processus d'oxydation des différents donneurs d'électrons primaires et secondaires sur des cellules bactériennes dont la membrane périplasmique est restée intacte. Ces expériences ont été effectuées en présence de myxothiazol, inhibiteur bloquant le site quinonique au niveau duquel s'opère la réduction des transporteurs de la chaîne haut potentiel du complexe cytochrome bc (protéine de Rieske, cytochrome C1).

Les bactéries ont été soumises à une illumination continue, la fréquence d'excitation des centres réactionnels (un photon toutes les 15 millisecondes) étant suffisamment faible pour qu'à tout moment, l'équilibre soit réalisé entre les états rédox des donneurs primaires et secondaires (P870, cytochrome C2, cytochrome C1 et protéine de Rieske). Compte tenu des valeurs des potentiels de demi-réduction des différents donneurs *, l'oxydation des cytochromes devrait très largement précéder celle de P870. On observe au contraire une oxydation rapide de P870, ce qui correspondrait à des constantes d'équilibre apparentes entre P870 et les cytochromes inférieures à 10. Les divergences entre données expérimentales et théoriques sont encore plus marquées lorsque le potentiel d'oxydo-réduction intracellulaire est ajusté à des valeurs telles qu'une fraction notable des molécules de cytochrome est à l'état oxydé avant la période d'illumination (faibles concentrations de cyanure). Des expériences

* P870 $E_{m7} = 450$ mV ; Cyt C2 $E_{m7} = 340$ mV ; Cyt C1 $E_{m7} = 260$ mV

analogues ont été conduites en illuminant les bactéries par une série d'éclairs d'énergie saturante et de courte durée. Lorsque la totalité des donneurs est à l'état réduit avant l'illumination, un éclair saturant induit l'oxydation stable d'environ 10 à 15 % de P870 et d'environ 50 % du cytochrome présent. L'application de la loi de l'action des masses prédit que dans ces conditions, la quantité de P870 oxydée devrait être négligeable.

Ces expériences montrent clairement qu'un équilibre thermodynamique n'est pas réalisé entre l'ensemble des donneurs d'électrons présents dans la membrane photosynthétique. Les données expérimentales sont correctement représentées en admettant que les transferts d'électrons se produisent au sein de « super-complexes » associant les centres réactionnels, le cytochrome C2 et le complexe bc. Nous avons été conduits à supposer que les centres réactionnels sont toujours associés par paires (duplex). Pour environ 25 % des centres réactionnels, une telle paire est associée à une molécule de cytochrome C2. Ces centres ne peuvent transférer des charges positives au complexe bc (centres P-P-C2). 75 % des centres réactionnels sont engagés dans des « super-complexes » comprenant de plus le complexe bc (centres P-P-C2-C1). Dans des domaines de temps inférieurs à quelques secondes, ces « super-complexes » peuvent être considérés comme isolés les uns des autres. L'équilibre thermodynamique est rapidement réalisé à l'intérieur de chaque complexe (en moins de 2 ms). Dans des domaines de temps beaucoup plus longs (supérieurs à la minute), des échanges de charges impliquant des molécules diffusantes réalisent un équilibre thermodynamique entre l'ensemble des donneurs présents dans la membrane.

En résumé, après une longue période d'obscurité, l'état rédox du système est correctement décrit en appliquant la loi d'action de masse en solution à l'ensemble des donneurs. La constante d'équilibre concernant les réactions de transfert d'électrons entre P870 et les cytochromes est de l'ordre de 70, ce qui correspond à une différence de 110 mv pour les potentiels de demi-réduction. Au contraire, pendant l'illumination, chaque « super-complexe » doit être considéré comme une entité isolée, la répartition des charges entre les différents donneurs étant alors différente de celle qui serait observée dans le cas d'un équilibre thermodynamique global.

Le pouvoir de prédiction du modèle théorique est excellent dans la mesure où il décrit correctement les processus d'oxydation des donneurs primaires et secondaires induits par une illumination continue ou par une série d'éclairs, quelles que soient les conditions rédox initiales.

L'analyse des cinétiques d'oxydation des donneurs primaires et secondaires mesurées après un éclair de courte durée apporte des arguments supplémentaires en faveur du modèle proposé. Dans le cas de l'illumination par un éclair saturant d'un matériel dont la totalité des donneurs primaires et secondaires est réduite, deux charges positives sont formées simultanément au

niveau des donneurs P870 appartenant aux deux centres réactionnels formant le duplex. Une première charge positive est transférée au cytochrome C2 en moins de 20 microsecondes, réaction limitée par le transfert de charges entre le cytochrome C2 et le complexe bc (schéma 1).

Après un éclair saturant :

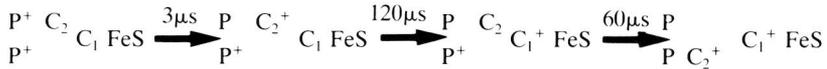


Schéma I

Lors de l'illumination du même matériel par un éclair de très faible énergie, la probabilité pour que deux donneurs primaires appartenant à un même « super-complexe » soient oxydés simultanément devient négligeable. On observe alors que pour la moitié des complexes comportant un donneur primaire oxydé, les charges positives sont transférées au cytochrome C2 en moins de 20 μ s. La phase rapide de réduction de P870 est suivie d'une phase plus lente ($t^{1/2}$ 60 μ s). Ces résultats peuvent être interprétés en admettant qu'au moment de l'éclair, le cytochrome C2 a 50 % de chances d'être associé avec l'un ou l'autre des centres réactionnels du duplex. La phase lente est alors limitée par la vitesse d'échange du cytochrome C2 entre les deux centres réactionnels (schéma II).

Après un éclair non saturant :

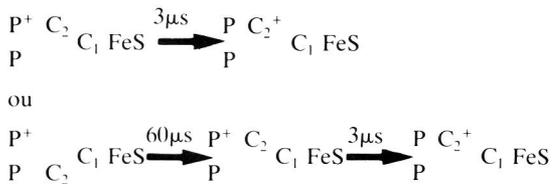


Schéma II

Un certain nombre de résultats préliminaires montre que la proportion relative des deux types des « super-complexes » (PPC2, PPC2C1, FeS) est susceptible de varier d'une manière importante en fonction des conditions physiologiques. Il est probable que la formation et la dissociation des « super-complexes » jouent un rôle essentiel dans la régulation des processus de transfert d'électrons dans les appareils photosynthétique et respiratoire bactériens.

visible, la transition S_1 - S_2 , et elle seulement, donne lieu à divers changements d'absorption d'origine électronique.

D'autres équipes (en Hollande et en Allemagne) travaillant sur ce problème avaient conclu à l'existence d'une bande U-V associée à la transition S_0 - S_1 , plus ou moins proche de celle intervenant sur les autres transitions en contradiction avec nos résultats montrant l'absence d'une telle bande. Depuis la parution de l'article de J. Lavergne, ces équipes ont publié un rectificatif admettant que le spectre de S_0 - S_1 doit être significativement plus petit que celui des autres transitions. Sans permettre d'exclure définitivement l'interprétation de la transition S_0 - S_1 par une oxydation de Mn, ce résultat la rend moins vraisemblable.

III. — *Etude du repliement des protéines membranaires*

Ces expériences visent à comprendre comment la séquence des protéines membranaires détermine leur structure tri-dimensionnelle. Les travaux expérimentaux effectués au cours de l'année écoulée ont surtout porté sur la bactériorhodopsine. Deux complexes de la membrane photosynthétique, le photosystème II et le cytochrome b6/f, ont également été abordés, de façon préliminaire. Un effort de réflexion théorique a été poursuivi.

A) *Bactériorhodopsine (J.-L. Popot)*

La bactériorhodopsine (BR) est une photo-pompe à protons, composée d'une seule chaîne polypeptidique courte à laquelle est liée une molécule de rétinol. Les techniques de renaturation/reconstitution mises au point précédemment (Popot et al., 1986-1987) ont été appliquées à deux problèmes.

Le premier projet consiste à localiser par diffraction des neutrons les segments de séquence correspondant aux sept α -hélices transmembranaires qui composent la structure (collaboration, G. Zaccai, Institut Laue-Langevin, Grenoble) et D.M. Engelman (Université Yale, USA). Les premiers résultats obtenus ont été publiés. Ce travail de cartographie se poursuit grâce aux moyens informatiques mis en place au laboratoire pour l'exploitation des données de diffraction des neutrons. L'analyse des données collectées sur des échantillons deutérés au niveau des résidus leucine et tryptophane de différentes parties de la séquence, actuellement en cours, devrait permettre de localiser de façon non équivoque, deux, voire trois des segments de séquence dans la structure, ce qui contraindra de façon considérable les modèles de repliement possibles (leur nombre passant de 5 040 à 120 ou 24 selon que deux ou trois segments seront localisés). Pour distinguer entre les modèles restants, deux stratégies complémentaires seront tentées.

1) D'une part, en collaboration avec R. Lavery et le groupe de A. Pullman à l'Institut de Biologie Physico-Chimique, J.-L. Popot examine les contraintes stériques résultant de la juxtaposition des hélices de la BR. Cette approche implique la construction de modèles tridimensionnels de la BR plus sophistiqués que le modèle assez grossier utilisé actuellement pour l'analyse des données de diffraction des neutrons.

2) D'autre part, les modèles ainsi construits sont testés par rapport aux données de diffraction des électrons et des neutrons et, s'ils se révèlent effectivement meilleurs que le modèle approché actuellement utilisé, les données de diffraction des neutrons sont réanalysées en s'appuyant sur les nouveaux modèles. Cette analyse pourrait permettre l'identification de nouveaux segments transmembranaires, et par là faciliter l'identification du modèle de repliement correct.

L'ensemble de cette étude devrait permettre de mieux évaluer dans quelle mesure l'analyse théorique de données de séquence peut être utilisée pour construire des modèles structuraux approchés. On peut en effet imaginer d'étendre dans l'avenir, à d'autres protéines membranaires que la BR, la combinaison de données structurales à basse résolution et de contraintes d'empaquetage, ce qui permettrait de court-circuiter le blocage que constitue le plus souvent l'impossibilité d'obtenir des cristaux tridimensionnels de protéines membranaires diffractant à haute résolution.

Le second projet visait à mieux comprendre les forces qui stabilisent la BR et la façon dont elle se structure lors de sa biosynthèse. Ce problème a été abordé par le biais d'une étude des modalités de renaturation et de réassociation de fragments protéolytiques 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 al., 1987). Cette série d'expériences est en faveur d'un modèle de repliement en deux étapes thermodynamiquement contrôlées, selon lequel chaque α -hélice hydrophobe transmembranaire se comporte comme un domaine de repliement autonome. Ce modèle est applicable à celles des protéines membranaires qui ne comportent que des segments transmembranaires hydrophobes.

IV. — *Etude de l'assemblage du centre PSII et de l'ATPsynthétase chloroplastique*

1) Le complexe protéique assurant le transfert d'électrons au sein du photosystème II est constitué de quatre sous-unités intrinsèques principales, P5/P6/D1/D2, codées par le génome chloroplastique et responsables de la sépara-

tion de charges primaire, et de trois sous-unités extrinsèques OEE1/2/3, d'origine nucléaire, participant à la formation du site d'émission d'oxygène. La coordination des synthèses de ces sous-unités, qui leur permet de s'accumuler dans la membrane dans une stoechiométrie correspondant à celle qui est réalisée dans le complexe assemblé, suppose que des régulations sont mises en œuvre soit au niveau de la synthèse (transcription ou traduction) des sous-unités, de leur association ou de leur stabilisation dans la membrane des thylakoides.

F.-A. Wollman, C. de Vitry, D. Drapier, en collaboration avec J. Olive (Laboratoire de Microscopie Electronique, Institut Jacques Monod) ont comparé la biogénèse des sous-unités PSII dans un ensemble de mutants n'accumulant pas tout ou partie du centre PSII. Chacune des 7 sous-unités principales du complexe a ainsi été étudiée sous l'angle de son degré d'accumulation cellulaire, d'association membranaire, d'hétérogénéité de distribution latérale et de sa capacité de lier des cofacteurs ou d'interagir avec les autres sous-unités PSII. Un groupe de trois sous-unités intrinsèques P5/D1/D2 présente une insertion membranaire cotraductionnelle coordonnée par l'insertion initiale du polypeptide D1. Ces trois sous-unités s'assemblent dans la membrane, en l'absence de la quatrième sous-unité intrinsèque P6, et se retrouvent dans les régions granaires, siège du photosystème II fonctionnel. Ce centre partiellement formé, est protégé d'une dégradation par les protéases endogènes, donc accumulé, lors de l'assemblage avec la quatrième sous-unité intrinsèque P6. La sous-unité OEE1 peut alors s'associer au centre indépendamment des deux autres sous-unités extrinsèques, dont l'association au centre se produit séquentiellement, la sous-unité OEE2 précédant OEE3. La fixation de ces deux sous-unités protège la sous-unité intrinsèque P6 d'une dégradation protéolytique.

Notons également deux observations originales : — P5 et P6 lient des chlorophylles dès leur insertion dans la membrane : — les sous-unités extrinsèques bien que synthétisées dans le cytoplasme sont, en l'absence de synthèse du centre PSII, accumulées de façon stable à l'intérieur du thylakoïde où elles rentrent en interaction faible avec la face interne de la membrane.

2) Une démarche analogue a été poursuivie par F.-A. Wollman et C. Le maire pour étudier la mise en place des sous-unités codées par le génome chloroplastique, de l'ATP synthétase du thylakoïde chez *C. Reinhardtii*. Comme le complexe PSII, l'ATP synthétase se compose d'une partie extrinsèque CF1, comportant trois sous-unités chloroplastiques $\alpha/\beta/\epsilon$ et deux nucléaires γ/δ , responsable de l'activité catalytique, et d'une partie intrinsèque CF0, comportant trois sous-unités chloroplastiques I, III, IV et une nucléaire II, dont l'assemblage constitue un canal à protons. Il apparaît que l'expression génétique des sous-unités α et β est gouvernée par au moins deux gènes de régulation communs, l'un nucléaire, l'autre chloroplastique. La synthèse de la

sous-unité β protège la sous-unité α d'une dégradation rapide dans le stroma. Cette observation est en faveur de l'existence d'une forme associée $\alpha\beta$, libre dans le stroma du chloroplaste.

Au moins un gène nucléaire gouverne l'insertion co-traditionnelle, ou la transcription, des sous-unités III et IV du CF0. La présence de la sous-unité III, principale sous-unité engagée dans la formation du canal à protons, apparaît nécessaire à l'association à la membrane d'une première sous-unité β . A cet ensemble s'ajouteraient séquentiellement une sous-unité α , une autre sous-unité β puis la sous-unité ϵ . Le déroulement de cette séquence d'assemblage est nécessaire à la stabilisation des sous-unités du CF0 comme du CF1. En effet, à la différence des sous-unités extrinsèques du PSII qui présentent des taux d'accumulation identiques dans le lumen des thylakoides, que le centre soit constitué ou non, les sous-unités α et β ne s'accumulent que partiellement dans le stroma des mutants dépourvus de certaines sous-unités du CF0. Cela provient sans doute d'une différence d'activité protéolytique entre les deux compartiments.

PUBLICATIONS

C. LEMAIRE, J. GIRARD-BASCOU and F.A. WOLLMAN. *Characterization of the $b6/f$ complex subunits and studies on the LHC-kinase in Chlamydomonas reinhardtii using mutant strains altered in the $b6/f$ (in Progress in Photosynthesis Research, Volume IV, 10, 655-10, 658, Martinus Nijhoff Publishers, 1987).*

J. OLIVE and F.A. WOLLMAN. *Localization of the $b6/f$ complex by freeze-fracture analysis of the Chlamydomonas reinhardtii and Chlorella sorokiniana mutants lacking in this complex (in Progress in Photosynthesis Research, Volume II, 4, 325-4, 328, Martinus Nijhoff Publishers, 1987).*

O. VALLON, F.A. WOLLMAN and J. OLIVE. *Immunocytochemical studies on the organization of thylakoid membrane proteins (in Progress in Photosynthesis Research, Volume II, 4, 329-4, 332, 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, 313-318).*

U. KUCK, Y. CHOQUET, M. SCHNEIDER, M. DRON and P. BENNOUN. *Structural and transcription analysis of two homologous genes for the P700 chlorophyll a -apoproteins in Chlamydomonas reinhardtii : evidence for in vivo trans-splicing. (EMBO Journal, vol. 6, 2185-2195, 1987).*

R. DELOSME, P. JOLIOT and A. TREBST. *Flash-induced oxidation of cytochrome b-563 in algae under anaerobic conditions : effect of dinitrophenylether of iodonitrothymol.* (*Biochim. Biophys., Acta*, 893, 1-6, 1987).

V. PETROULEAS and B.A. DINER. *Light-induced oxidation of the acceptor-side Fe(II) of Photosystem II by exogenous quinones acting through the QB binding site. I. Quinones, kinetics and pH-dependance.* (*Biochim. Biophys., Acta*, 893, 126-137, 1987).

B.A. DINER and V. PETROULEAS. *Light-induced oxidation of the acceptor-side Fe(II) of Photosystem II by exogenous quinones acting through the QB binding site. II. Blocage by inhibitors and their effects on the Fe(III) EPR spectra.* (*Biochim. Biophys., Acta*, 893, 138-148, 1987).

J. GIRARD-BASCOU. *Mutations in four chloroplast loci of Chlamydomonas reinhardtii affecting the photosystem I reaction centers* (*Curr Genet* 12, 483-488, 1987).

J. GIRARD-BASCOU, Y. CHOQUET, M. SCHNEIDER, M. DELOSME and M. DRON. *Characterization of a chloroplast mutation in the psaA2 gene of Chlamydomonas reinhardtii.* (*Curr Genet* 12, 489-495, 1987).

J. LAVERGNE. *Optical-difference spectra of the S-state transitions in the photosynthetic oxygen-evolving complex.* (*Biochim. Biophys., Acta*, 894, 91-107, 1987).

J.L. POPOT. *La structure des protéines membranaires.* (*La Recherche*, n° 192, 1170-1181, 1987).

Y. CHOQUET. *Contribution à l'étude de la structure et de la biogénèse des centres photochimiques des végétaux supérieurs et de l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii* (Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, 12 octobre 1987).

C. LEMAIRE. *De l'utilisation de mutants photosynthétiques dans l'étude des complexes ATP synthétase et cytochromes b6/f chez Chlamydomonas reinhardtii : composition polypeptidique, assemblage et rôle de ces complexes dans la régulation de l'activité photosynthétique.* (Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6, 28 octobre 1987).

P. MCCREA, J.L. POPOT and D.M. ENGELMAN. *Transmembrane topography of the nicotinic acetylcholine receptor δ subunit.* (*The EMBO Journal*, 6, 3619-3626, 1987).

J.L. POPOT, S.E. GERCHMAN and D.M. ENGELMAN. *Refolding of Bacteriorhodopsin in lipid bilayers : A thermodynamically controlled two-state process.* (*J. Mol. Biol.*, 198, 655-676, 1987).

F.A. WOLLMAN and C. LEMAIRE. *Studies on kinase-controlled state transitions in Photosystem II and b6/f mutants from Chlamydomonas reinhardtii which lack quinone-binding proteins.* (*Biochim. Biophys., Acta*, 933, 85-94, 1988).

P. JOLIOT and A. JOLIOT. *The low-potential electron-transfer chain in the cytochrome b/f complex.* (*Biochim. Biophys. Acta*, 933, 319-333, 1988).

F.A. WOLLMAN and C. LEMAIRE. *Phosphorylation processes interacting in vivo in the thylakoid membranes from Chlamydomonas reinhardtii (in Photocatalytic production of energy rich compounds.* D. Hall/Grassi, eds. Elsevier, pp. 210-214, 1988).

C. LEMAIRE, F.A. WOLLMAN and P. BENNOUN. *Restoration of phototrophic growth in a mutant of Chlamydomonas reinhardtii in which the chloroplast atpB gene of the ATP synthase has a deletion : An example of mitochondria-dependent photosynthesis.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1344-1348, 1988).

J. GIRARD-BASCOU. *Contribution à l'étude génétique de l'appareil photosynthétique chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii.* (*Thèse de Doctorat d'Etat, Université Paris-Sud, janvier 1988*).

C. DE VITRY and F.A. WOLLMAN. *Changes in phosphorylation of thylakoid membrane proteins in light-harvesting complex mutants from Chlamydomonas reinhardtii.* (*Biochim. Biophys. Acta*, 933, 444-449, 1988).