

## Bioénergétique Cellulaire

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

Le cours de cette année a porté sur l'analyse cinétique et thermodynamique des réactions de transfert d'électrons se produisant dans les différents types d'appareil photosynthétique.

De nombreux complexes protéiques transmembranaires inclus dans les membranes photosynthétiques des bactéries, algues ou plantes supérieures, participent aux processus de collection de l'énergie lumineuse et de transfert d'électrons.

La chaîne de transfert d'électrons photosynthétique est essentiellement constituée de deux (bactéries) ou trois (algues ou plantes supérieures) complexes majeurs comportant chacun de nombreux transporteurs. Les échanges d'électrons entre ces complexes impliquent de petites molécules susceptibles de diffuser, soit dans la phase lipidique de la membrane (quinone), soit dans la phase aqueuse (cytochrome, plastocyanine). Les processus de transfert d'électrons entre transporteurs inclus dans un même complexe transmembranaire n'impliquent généralement aucun déplacement atomique important et *a fortiori*, aucun phénomène de diffusion de molécules. Les sauts d'électrons de transporteur à transporteur s'effectuent par effet tunnel, et les vitesses réactionnelles sont très fortement dépendantes des distances entre transporteurs. Ces distances étant généralement faibles ( $< 2\text{nm}$ ), les vitesses de transfert d'électrons sont le plus souvent très rapides. Lors d'une illumination continue, les différents transporteurs présents dans l'ensemble confiné que représente un complexe membranaire sont généralement proches de l'équilibre thermodynamique. Dans le cas des réactions de transfert d'électrons intervenant entre complexes membranaires différents, réactions qui impliquent la diffusion ou le déplacement de petites molécules liposolubles ou hydrosolubles, la situation est plus complexe. Il est généralement admis que la vitesse de diffusion de ces molécules est rapide et devrait être en mesure d'établir un équilibre thermodynamique entre des transporteurs implantés dans des domaines membranaires

de dimensions importantes. Si de telles conditions étaient remplies, le mécanisme des réactions de transfert d'électrons devrait, en première approximation, être indépendant de la position respective occupée par les différents complexes transporteurs d'électrons au sein de la membrane photosynthétique.

Les propriétés thermodynamiques des transporteurs d'électrons sont définies par la valeur des potentiels d'oxydo-réduction qui peuvent être déterminés par titration rédox. Il faut rappeler que toute titration rédox implique l'utilisation de médiateurs présents à basse concentration, médiateurs qui permettent d'établir un équilibre thermodynamique entre l'électrode de platine, la solution et les transporteurs. Les titrations d'oxydo-réduction de transporteurs implantés dans un appareil membranaire posent des problèmes techniques difficiles liés en grande partie à la lenteur des mises en équilibration thermodynamique d'un tel système. Les temps d'équilibration, qui dépassent souvent plusieurs minutes, sont considérablement plus lents que les temps d'équilibration à l'intérieur de la chaîne photosynthétique qui ne dépassent pas quelques dizaines de millisecondes. Les techniques de titration ont cependant permis de déterminer avec une précision acceptable les potentiels d'oxydo-réduction de la plupart des composants de la chaîne photosynthétique.

La détermination des potentiels d'oxydo-réduction des transporteurs solubles susceptibles de s'associer à des complexes protéiques membranaires pose des problèmes particuliers. Une modification de l'état d'oxydo-réduction d'un transporteur s'accompagne généralement d'une variation de la charge nette de la molécule. Par suite, les interactions électrostatiques entre protéines membranaires et molécules solubles jouant le rôle de substrat dépendent le plus souvent de l'état d'oxydo-réduction des deux partenaires. Pour des raisons thermodynamiques évidentes, le potentiel rédox des formes fixées ou libres d'un même transporteur soluble dépend directement des affinités relatives des formes oxydées et réduites. Il s'agit là d'un premier exemple démontrant les relations étroites existant entre les propriétés thermodynamiques et les caractéristiques structurales d'un système intégré tel que l'appareil photosynthétique. Les constantes d'équilibre des différentes réactions rédox impliquées dans la chaîne photosynthétique peuvent être calculées à partir des valeurs des potentiels rédox mesurés par titration. Les valeurs de ces mêmes constantes d'équilibre peuvent être mesurées, *in situ*, sur des chloroplastes isolés ou sur des algues vivantes en l'absence de médiateurs en déterminant l'état rédox des différents transporteurs par spectrophotométrie d'absorption. Ces mesures doivent être effectuées dans des conditions où les flux d'électrons sont suffisamment faibles pour que la vitesse du processus photosynthétique soit exclusivement limitée par les étapes photochimiques.

Des expériences déjà anciennes réalisées dans notre laboratoire et dans le laboratoire de Bessel Kok ont montré que dans la plupart des cas, des résultats paradoxaux étaient obtenus, les constantes d'équilibre apparentes

déterminées, *in situ*, sont généralement beaucoup plus faibles que celles déduites dans la mesure des potentiels d'oxydo-réduction standard des différents transporteurs. Ces nombreuses contradictions nous ont conduit à supposer que contrairement aux idées généralement admises, l'équilibre thermodynamique à longue distance n'est généralement pas réalisé dans les appareils membranaires convertisseurs d'énergie. L'interprétation la plus simple consiste à supposer que plusieurs complexes transmembranaires et molécules diffusantes sont confinés dans des domaines de petites dimensions au sein desquels l'équilibre thermodynamique est rapidement réalisé. Au contraire, les échanges d'électrons, et par suite la vitesse d'équilibration entre ces différents domaines seraient un processus lent ne jouant pas le rôle significatif dans les flux d'électrons photosynthétiques.

#### I. — *Chaînes de transporteurs d'électrons des bactéries photosynthétiques pourpres*

La chaîne des donneurs d'électrons intervenant dans les bactéries pourpres ne comporte que quatre éléments : le donneur primaire, (chlorophylle P870), partie incluse dans le centre photochimique, le cytochrome c2, petite molécule soluble présente dans l'espace périplasmique susceptible de réduire le donneur primaire, le cytochrome c1 et une protéine fer-soufre incluse dans le complexe cytochrome b/c. Dans la vision classique de la membrane photosynthétique bactérienne, centres réactionnels et complexes cytochrome b/c sont isolés les uns des autres, le cytochrome c2 opérant la navette entre ces deux édifices protéiques qui peuvent être éloignés l'un de l'autre. En analysant la cinétique d'oxydation de ces donneurs primaires et secondaires lorsque des bactéries sont soumises à une faible illumination, on peut observer que ces différents transporteurs d'électrons ne sont pas en équilibre thermodynamique. Les constantes d'équilibre apparentes mesurées sont environ 10 fois plus faibles que les constantes d'équilibre théoriques. Ces résultats ont été interprétés en admettant que deux centres réactionnels, une molécule de cytochrome c2 et un complexe cytochrome b/c, sont groupés en formant un « supercomplexe ». A l'intérieur de cet édifice, les échanges d'électrons sont rapides, et un équilibre thermodynamique est réalisé en moins de 1 milliseconde. Au contraire, l'équilibration entre les différents supercomplexes ne se produit que dans des domaines de temps très supérieurs à la seconde, c'est-à-dire environ 10 000 fois plus lentement, ce qui implique que les processus de transfert d'électrons correspondants ne jouent qu'un rôle mineur dans le fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Cette hypothèse a pu être confirmée en analysant les cinétiques de transfert d'électrons induites par des éclairs de courte durée. Le supercomplexe possède trois sites susceptibles de fixer la molécule de cytochrome c2 soluble, sites correspondant aux trois protéines membranaires constituant le supercomplexe. Pour des raisons structurales non élucidées, la probabilité pour la molécule de cytochrome c2 de s'échapper de

ce domaine est extrêmement faible. Il est important de constater que l'occupation d'un seul des trois sites par le cytochrome c2 interdit, pour des raisons stériques ou électrostatiques, l'occupation des autres sites par une seconde molécule de cytochrome c2. Cette anti-coopérativité entre les trois sites suggère que les distances entre les différents partenaires membranaires d'un même supercomplexe sont très faibles. Il apparaît que dans certaines conditions physiologiques, l'ensemble des transporteurs constituant la chaîne photosynthétique de ces bactéries est inclus dans un ensemble parfaitement structuré où les phénomènes de diffusion intéressant les molécules solubles sont confinés dans des domaines membranaires inférieurs à  $1000 \text{ nm}^2$ . Un tel confinement rendrait compte de la remarquable efficacité sur le plan cinétique de l'ensemble des processus de transfert d'électrons cycliques, caractéristique de la photosynthèse bactérienne.

## II. — Appareil photosynthétique des algues unicellulaires et des plantes supérieures

De nombreuses informations ont été obtenues concernant la thermodynamique et la cinétique des réactions de transfert d'électrons intervenant dans l'appareil photosynthétique des algues unicellulaires et des plantes supérieures. Comme dans le cas des bactéries photosynthétiques, les mesures de constantes d'équilibre apparentes conduisent à supposer que les transporteurs d'électrons implantés dans la membrane photosynthétique ne sont pas en équilibre thermodynamique. Ainsi, la constante d'équilibre apparente des réactions de transfert d'électrons intervenant entre l'accepteur quinonique primaire du photosystème II et les molécules de plastoquinones supposées diffuser librement dans la phase lipidique de la membrane est proche de 1, alors que les valeurs théoriques déduites des mesures de potentiel d'oxydo-réduction sont proches de 100. Ces résultats paradoxaux ne peuvent être interprétés qu'en admettant que le rapport entre le nombre de molécules de plastoquinones libres et le nombre de centres photochimiques varie très largement d'une région à l'autre de la membrane photosynthétique. Une telle hétérogénéité implique que les molécules de plastoquinones ne peuvent diffuser rapidement que dans des domaines membranaires de dimensions limitées et isolés les uns des autres.

Les constantes d'équilibre entre accepteur primaire d'électrons du photosystème II (Q) et donneur primaire des centres photochimiques I (P700) ont également été déterminées, *in situ*, sur des algues unicellulaires ou des chloroplastes isolés de plantes supérieures. Dans ce cas encore, les constantes d'équilibre apparentes sont de l'ordre de 6, alors que les constantes d'équilibre théoriques déduites des valeurs de potentiel d'oxydo-réduction sont de l'ordre de  $10^6$ . Ces anomalies peuvent être interprétées en supposant que les concentrations relatives des centres photochimiques I et II varient largement d'une région membranaire à l'autre. D'une manière générale, il apparaît donc que des paramètres structuraux limitent les domaines de diffusion des trans-

porteurs solubles et que la membrane photosynthétique présente un large degré d'hétérogénéité.

### III. — *Organisation de la membrane photosynthétique*

L'analyse cinétique et thermodynamique des réactions de transfert d'électrons montre que le fonctionnement de la chaîne photosynthétique ne peut être compris qu'en s'intéressant à la localisation respective des différents transporteurs au sein de la membrane. Il devient alors indispensable de confronter les informations fonctionnelles avec les nombreuses données structurales portant sur la localisation des différents complexes protéiques membranaires. L'essentiel des informations a été obtenu en analysant par microscopie électronique des coupes de chloroplastes ou des surfaces membranaires obtenues par cryofracture. L'étude comparative de différents mutants présentant des déficiences bien caractérisées sur le plan biochimique a été l'un des outils les plus puissants ayant permis de localiser les principaux complexes protéiques membranaires. L'immunocytochimie qui permet le marquage de certains des complexes à l'aide de micro-billes d'or associées à des anticorps est également une technique de choix dont la spécificité est tout-à-fait remarquable. Différentes méthodes biochimiques permettent de séparer des fragments membranaires appartenant à différentes régions du chloroplaste. Après séparation, il est alors possible de caractériser les polypeptides associés à ces différentes fractions membranaires. L'ensemble des méthodes d'analyse structurale et biochimique conduit à une image cohérente de la membrane photosynthétique. L'observation de coupes de chloroplastes permet de distinguer aisément des régions où les thylakoïdes sont empilés les uns sur les autres (régions granaires), et d'autres régions où ces sacs membranaires sont isolés les uns des autres (régions non accolées ou agraires). Il existe une convergence remarquable entre les résultats obtenus par les différentes méthodes structurales ou biochimiques permettant d'analyser la composition des membranes photosynthétiques. En ce qui concerne les transporteurs d'électrons, il existe une très forte ségrégation des différents complexes protéiques membranaires entre les deux zones membranaires ainsi définies. Les régions granaires comportent la presque totalité du système photochimique II, alors que les régions non accolées comportent la presque totalité du système photochimique I. Par contre, le complexe cytochrome b<sub>6</sub>/f est réparti d'une manière égale entre les deux zones membranaires.

En confrontant les données structurales et fonctionnelles, il est possible de proposer un modèle cohérent, bien qu'hypothétique, de l'organisation fonctionnelle de la membrane photosynthétique. Il est important de distinguer deux modes de fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Dans un premier mode (linéaire), les électrons issus de la décomposition de l'eau intervenant au niveau du système photochimique II sont transférés au système photochimique I, les réducteurs ainsi formés permettent ultérieurement la

réduction du gaz carbonique en glucides. Dans un second mode, les électrons apparaissant au niveau des accepteurs du photosystème I sont immédiatement réinjectés au niveau des donneurs d'électrons du même système photochimique. Ce fonctionnement cyclique de l'appareil photosynthétique conduit à la formation d'un gradient électrochimique de protons apparaissant entre les faces aqueuses interne et externe du thylakoïde. L'énergie correspondante permet ultérieurement la synthèse d'adénosine triphosphate au niveau d'une enzyme membranaire spécialisée. En régime linéaire, le transfert d'électrons entre les deux photosystèmes implique le déplacement de molécules solubles depuis les régions granaires vers les régions agraires sur des distances moyennes de plusieurs centaines de nanomètres. L'analyse fonctionnelle montre que la plastoquinone, dont les domaines de diffusion sont limités, ne peut être impliquée dans ce processus. La plastocyanine, molécule soluble présente dans la phase aqueuse interne du thylakoïde, serait essentiellement responsable de ces transferts d'électrons à longue distance. Dans le mode de fonctionnement linéaire, les électrons apparaissant au niveau des accepteurs du photosystème II seraient tout d'abord transférés à la plastoquinone, puis au complexe cytochrome b6/f localisé à proximité. Les molécules de plastocyanine effectueraient alors une navette entre le cytochrome b6/f situé dans les zones granaires et le photosystème I situé dans les zones agraires. En régime cyclique, les électrons apparaissant au niveau des accepteurs du PSI seraient transférés aux transporteurs associés au cytochrome b6/f localisé dans les régions agraires. Il semble probable que le photosystème I et le cytochrome b6/f forment des supercomplexes auxquels seraient associées une ou deux molécules de plastocyanine. Comme dans le cas des bactéries photosynthétiques, le fonctionnement cyclique de la chaîne de transfert d'électrons n'impliquerait pas de mouvements importants de molécules solubles.

La distribution des complexes cytochrome b6/f entre les zones granaires et agraires serait soumise à des processus de régulation qui favoriseraient le fonctionnement de la chaîne photosynthétique suivant un régime linéaire ou cyclique.

P.J.

#### SÉMINAIRES

M. Jérôme LAVERGNE (Institut de Biologie Physico-Chimique), Paris  
*Equilibre rédox partiel ou global entre les complexes de transfert d'électrons.*

M. Francis HARAUX (C.N.R.S., Gif-sur-Yvette)  
*Activation de l'ATPase des membranes photosynthétiques par le gradient électrochimique d'ions  $H^+$  : mécanismes sous-jacents.*

M. Philippe DEVAUX (Institut de Biologie Physico-Chimique), Paris  
*Mouvements moléculaires dans les membranes.*

M. Mogens LEHMAN (Institut Laue-Langevin, Grenoble)  
*L'eau et les macromolécules.*

M. Francis-André WOLLMAN (Institut de Biologie Physico-Chimique), Paris  
*Interactions protéine-protéine dans les thylakoïdes.*

Pr. Peter LAUGER (Université de Constance)  
*Internal motions of proteins and kinetic properties of ion channels and ion pumps.*

Pr. Nam Hai CHUA (Rockefeller University)  
*Expression of photosynthetic genes and their regulation.*

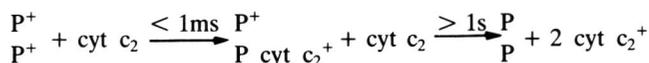
#### RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

##### I. — *Structure et fonction des chaînes de transfert d'électrons des bactéries photosynthétiques pourpres*

(P. JOLIOT, A. JOLIOT, J. LAVERGNE, en collaboration avec A. VERMÉGLIO)

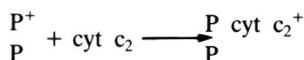
En collaboration avec A. Verméglio du Centre d'Etudes Nucléaires de Cadarache, P. Joliot et A. Joliot ont entrepris une étude des réactions de transfert d'électrons dans les chaînes photosynthétiques de différentes espèces de bactéries pourpres. Les processus de transfert d'électrons intervenant entre le donneur primaire des centres réactionnels (P) et les donneurs secondaires (cytochrome c2, cytochrome c1 et protéine fer-soufre) sont analysés sur des bactéries entières ayant conservé leur membrane externe périplasmique, et dont la structure membranaire n'a pas été perturbée. Dans le cas de *Rhodobacter sphaeroides* (voir précédent rapport), des structures complexes incluant deux centres réactionnels, une molécule de cytochrome c2 soluble et un complexe cytochrome b/c1 ont été mises en évidence. Dans ce cas particulier, la diffusion d'une molécule de cytochrome c2 est limitée au domaine membranaire correspondant aux supercomplexes. Les processus de transfert d'électrons ont été analysés sur une autre espèce de bactérie pourpre, *Rhodospirillum rubrum*, en mettant en œuvre une méthodologie identique à celle mise au point dans le cas de *Rb. sphaeroides*. Les résultats obtenus suggèrent que l'organisation fonctionnelle des transporteurs d'électrons est notablement différente chez ces deux espèces bactériennes. En premier lieu, il apparaît que la forme réduite du cytochrome c2 soluble ne peut former de complexes stables avec les centres réactionnels. D'autre part, à la suite d'un éclair de courte durée, on observe que les réactions de réduction du donneur primaire et d'oxydation du cytochrome c2 suivent une cinétique du second ordre. Ces résultats impliquent que le cytochrome c2 peut librement diffuser dans

l'espace périplasmique dans des domaines membranaires de dimensions importantes incluant de nombreux centres photochimiques. L'ensemble des données cinétiques ne peut être interprété d'une manière satisfaisante dans un modèle simple où centres photochimiques et cytochrome c2 sont répartis aléatoirement dans la membrane. Il apparaît en effet qu'à la suite d'un éclair saturant, la réduction du donneur primaire P suit une cinétique biphasique. Une première phase intéressant 50 % des centres photochimiques est terminée en moins de 1 milliseconde. La seconde phase, considérablement plus lente, suit une cinétique complexe et variable, la réduction totale du donneur primaire n'étant atteinte qu'après des périodes d'obscurité de plusieurs secondes. Un modèle structural intégrant certaines caractéristiques du modèle déjà proposé dans le cas de *Rb. sphaeroides* rend compte d'une manière satisfaisante de l'ensemble des résultats expérimentaux. Chez les deux espèces bactériennes, les centres réactionnels seraient toujours associés sous forme de dimères comportant donc deux sites susceptibles de fixer une molécule de cytochrome c2. La forme réduite du cytochrome c2 présente une faible affinité pour ces sites, alors que la forme oxydée présente une affinité très élevée. Lorsque l'un des deux sites du dimère est occupé par l'une des molécules de cytochrome c2 oxydé, l'autre site n'est plus accessible par suite d'interactions d'ordre stérique ou électrostatique. A la suite d'un éclair saturant, les donneurs du centre réactionnel sont portés dans un état doublement oxydé ( $P^+ P^+$ ) : la séquence des réactions est alors la suivante :



La moitié des donneurs primaires est réduite en moins de 1ms, le cytochrome c2 oxydé joue le rôle d'inhibiteur qui ralentit la réduction de la seconde moitié des donneurs primaires.

Dans le cas d'un éclair de très faible énergie, la majorité des donneurs primaires oxydés sont inclus dans des dimères dans l'état ( $P^+ P$ ) : la réduction de P suit alors une cinétique du pseudo premier ordre, dans la mesure où la concentration du cytochrome c2 soluble est beaucoup plus élevée que celle des donneurs oxydés formés par un éclair de faible énergie.



Jérôme Lavergne a développé un programme sur ordinateur permettant de simuler les cinétiques de réduction de  $P^+$  et d'oxydation du cytochrome c. L'accord entre résultats expérimentaux et calculs théoriques est excellent dans toute la gamme des conditions expérimentales analysées. Le modèle théorique décrit en particulier d'une manière très satisfaisante la dépendance des cinétiques de réduction du donneur primaire en fonction de l'énergie des éclairs.

## II. — *Mécanisme de formation d'oxygène. Spectre des états S.*

(J. LAVERGNE)

Le mécanisme et la structure du système de dégagement de l'oxygène sont actuellement étudiés par de nombreuses équipes, à partir de multiples techniques. On sait que le côté donneur du PSII gère l'accumulation des quatre équivalents oxydés (résultant d'autant de rotations photochimiques du centre), mis en jeu dans l'oxydation de deux molécules d'eau et la libération d'oxygène moléculaire. La nature de ces états d'oxydo-réduction intermédiaires (« états S » du modèle de Kok) n'est pas clairement établie : il est toutefois admis qu'une oxydation d'un « cluster » de 4 atomes de manganèse intervient sur certaines de ces étapes. J. Lavergne a entrepris depuis quelques années d'établir les spectres des changements d'absorption (UV et visible) associés à ces transitions. Il a mis au point à cette fin des protocoles permettant, d'une part d'éliminer la contamination des mesures par des signaux provenant des accepteurs PSII, et d'autre part d'effectuer de façon fiable la déconvolution des spectres individuels à partir des données expérimentales. Les résultats recourent ceux obtenus par une équipe hollandaise en ce qui concerne les transitions  $S1 \rightarrow S2$  et  $S2 \rightarrow S3$ , avec une bande autour de 300 nm probablement associée à une oxydation  $MnIII \rightarrow MnIV$ . En revanche, les spectres obtenus par J. Lavergne révèlent l'absence d'une telle bande pour la transition  $S0 \rightarrow S1$ , ce qui suggère pour cette étape une réaction de nature différente. La controverse avec d'autres équipes sur ce dernier point a conduit J. Lavergne à rechercher une méthode indépendante, permettant de comparer les changements d'absorption dus à  $S0 \rightarrow S1$  et  $S1 \rightarrow S2$  sans calculs de déconvolution, ni estimation des paramètres du modèle de Kok. La méthode fait intervenir une mesure du changement d'absorption intervenant entre deux états complètement désactivés et ne différant que par leur composition relative en  $S0$  et  $S1$  (les deux états stables). Les résultats, confirmant la petitesse relative du spectre  $S0-S1$ , sont décrits dans un article publié dans *Photochemistry & Photobiology*, associés à une discussion critique des résultats contradictoires de la littérature.

## III. — *Libération des protons par le système de dégagement d'oxygène (SDO)*

(J. LAVERGNE)

Quatre protons sont libérés dans l'espace interne du thylakoïde (lumen) à chaque cycle de SDO. Selon le consensus actuel, deux d'entre eux seraient émis en même temps que la réaction de dégagement d'oxygène (étape  $S3 \rightarrow S4 \rightarrow S0$ ), un sur l'étape  $S0 \rightarrow S1$ , et un sur l'étape  $S2 \rightarrow S3$  (modèle 1,0,1,2), toutes ces réactions intervenant de façon rapide (en quelques ms pour la plus lente). J. Lavergne a repris l'étude de ce problème, en utilisant les techniques classiques de mesure de changements d'absorption d'indicateurs sensibles au pH, soit dans l'espace interne (rouge neutre en présence d'un tampon non perméant), soit dans l'espace externe (rouge de crésol). Les

résultats font apparaître une situation plus complexe que celle couramment admise : on retrouve en effet la composante rapide associée à la stoechiométrie 1,2,1,2, mais celle-ci ne rend compte que de la moitié environ des protons associés à l'oxydation de l'eau, l'autre moitié correspondant à une libération sensiblement constante à chacune des transitions. On est donc conduit à une stoechiométrie non entière : 1, 1/2, 1, 3/2, qui impose un remaniement notable de l'interprétation mécanistique de ces réactions.

#### IV. — Réponses mitochondriales à l'émission d'oxygène photosynthétique (J. LAVERGNE)

En plaçant des algues vertes unicellulaires en conditions anaérobiques, J. Lavergne a mis en évidence des changements d'absorption mitochondriaux déclenchés par l'émission d'oxygène photosynthétique. A partir d'une impulsion d'oxygène induite par un éclair court, on observe une oxydation transitoire de l'hème *a3* de la cytochrome oxydase (culminant vers 3.5 ms), suivie d'une oxydation de l'hème *a* et du cytochrome *c* ( $t_{1/2} \cong 3$  ms). Les cinétiques obtenues imposent un piègeage direct de l'oxygène émis du chloroplaste par les mitochondries d'une même cellule. La fraction de l'oxygène photosynthétique ainsi recyclé de façon intracellulaire est évaluée par J. Lavergne à plus de 30 %, et devrait avoir des conséquences physiologiques significatives. D'autre part, cette technique s'annonce prometteuse pour l'étude des réactions de la cytochrome oxydase *in vivo*, en réponse à une impulsion d'oxygène induisant une rotation unique de l'enzyme. Une autre retombée est de fournir une méthode alternative à la détection polarographique de l'oxygène : on a pu ainsi confirmer l'estimation (Joliot, 1966) d'une constante de vitesse de l'ordre de la milliseconde pour la réaction de libération de l'oxygène, en contradiction avec la valeur 10 à 100 fois plus lente récemment proposée par une équipe hollandaise.

#### V. — Echange de quinones au site $Q_A$ du centre réactionnel du photosystème II de *Chlamydomonas reinhardtii*

[C. de VITRY et J.-L. POPOT, en collaboration avec B.A. DINER (Wilmington)]

Le centre réactionnel du photosystème II (PSII) effectue la séparation de charges primaire dans la photosynthèse des plantes vertes et des cyanophycées. Associé aux protéines extrinsèques du site de production de l'oxygène, il réalise l'oxydation de l'eau. Cette structure très complexe comporte au moins six polypeptides et une cinquantaine de cofacteurs (voir de Vitry et al., 1987). Le nombre exact de polypeptides de petit poids moléculaire (<10 Kd) n'est pas connu avec précision. Les peptides  $D_1$  et  $D_2$  sont homologues des peptides L et M du centre réactionnel de bactérie pourpre (*Rhodobacter viridis*). Comme L,  $D_1$  peut effectivement être marqué par des analogues d'herbicides

qui entrent en compétition avec la plastoquinone pour le site de liaison de l'accepteur quinonique secondaire  $Q_B$ . Ceci conduit à penser que  $D_1$  et  $D_2$  jouent dans les centres PSII le rôle joué par L et M dans les centres de *R. viridis*, et notamment portent les chlorophylles de la paire spéciale et les sites de liaison des phéophytines et des quinones et effectuent la séparation de charge. Cette hypothèse a été récemment confirmée par l'étude de préparations simplifiées, débarrassées des polypeptides les plus lourds, à l'exclusion de  $D_1$  et  $D_2$ . L'accepteur primaire d'électron, une plastoquinone, est fixée sur un site appelé  $Q_A$ , vraisemblablement porté par  $D_2$ . Chez les bactéries pourpres, la quinone qui joue ce rôle peut être échangée et remplacée par de nombreux analogues, ce qui a permis d'étudier la stéréospécificité du site  $Q_A$  et l'énergétique du transfert d'électrons. Dans le centre réactionnel du PSII, cette substitution n'avait jamais pu être réalisée.

La stabilité de préparations solubilisées de centres réactionnels PSII de *Chlamydomonas reinhardtii* dépend de la concentration de détergent (Triton X-100). Lorsque celle-ci augmente, le transfert d'électrons au site  $Q_A$  disparaît plus rapidement. Ceci suggérerait que la plastoquinone liée à ce site était susceptible de diffuser dans les micelles de Triton. B. Diner, C. de Vitry et J.-L. Popot ont établi que telle est bien la cause de l'inactivation observée. Celle-ci peut être fortement ralentie si les micelles de détergent contiennent de la plastoquinone. L'affinité de celles-ci pour le site  $Q_A$  a pu être estimée. De plus, la plastoquinone peut être remplacée par une ubiquinone si les centres sont incubés en présence de micelles de Triton contenant un excès d'ubiquinone.

Ces expériences ouvrent des perspectives intéressantes pour l'étude du site  $Q_A$  et pour l'obtention de préparations de centres purifiés stables sur une longue période, un préalable indispensable aux tentatives de cristallisation.

#### VI. — Détermination du trajet de la chaîne polypeptidique de la bactériorhodopsine dans la structure tridimensionnelle par diffraction des neutrons

[J.-L. POPOT en collaboration avec G. ZACCAÏ (Institut Laue Langevin, Grenoble) et D.M. ENGELMAN (Université Yale)].

La structure tridimensionnelle de la bactériorhodopsine (BR) 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 extramembranaires connectant les sept hélices  $\alpha$  transmembranaires, 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. L'étude structurale a jusqu'à présent buté sur 1) l'absence de cristaux tridimensionnels de bonne qualité et 2) l'extrême difficulté à pousser au-delà de 6-7 Å l'étude de cristaux plans par diffraction des électrons. Depuis que la séquence de la BR est connue (1979), de nombreuses

tentatives ont été faites pour placer cette séquence dans la structure, sans que la position d'aucun des sept segments hydrophobes qu'elle contient ait jamais pu être établie de façon non ambiguë.

Les techniques de renaturation/reconstitution/cristallisation mises au point au cours des années précédentes ont été appliquées à l'élucidation du trajet de la chaîne polypeptidique dans la structure tridimensionnelle. L'approche choisie consiste à introduire du deutérium dans l'un ou l'autre de deux fragments chymotryptiques et à localiser le deutérium dans la structure renaturée par diffraction des neutrons.

Dans un premier temps, cette méthode a permis d'identifier les régions de la structure occupées par chacun des deux fragments (Popot et al., 1986 ; Trehwella et al., 1986). Plus récemment, grâce à l'amélioration des procédures de marquage et d'analyse des résultats, il a été possible d'identifier sans ambiguïté deux segments et de proposer une position probable pour un troisième : les deux premiers segments hydrophobes dans la séquence (A et B) correspondent respectivement aux hélices 1 et 7 de la carte structurale, le troisième (C) correspond vraisemblablement à l'hélice 6 (Popot et al., 1989). Ces résultats contraignent si fortement les modèles de repliement possibles qu'il devient faisable, en s'appuyant sur d'autres données de la littérature, d'identifier le modèle le plus vraisemblable. Dans celui-ci, les sept hélices transmembranaires se suivent dans la structure, sans s'intercaler. Cette situation ressemble à celle rencontrée dans les protéines du centre réactionnel bactérien ou chez les protéines solubles constituées d'assemblages d'hélices  $\alpha$ . Elle est facile à réconcilier avec un modèle de repliement en deux étapes (Popot et al., 1987) selon lequel les hélices transmembranaires se forment, puis s'assemblent. Une autre conclusion intéressante de ce travail est la présence vers le milieu de l'hélice 7 d'un résidu proline. Or, cette hélice n'apparaît pas coudée dans la carte de densité électronique. Ceci suggère que la présence du cycle de la proline est accommodée non par un cou dage de l'hélice, comme c'est généralement le cas chez les protéines solubles, mais par une dislocation locale sans changement de direction, comme observé dans l'une des formes cristallines de l'alaméthycine.

Les données de diffraction des neutrons permettent par ailleurs de déterminer approximativement l'orientation des hélices par rapport à la molécule de BR (Popot et al., 1989). Cette orientation est cohérente avec l'idée que la bactériorhodopsine tend à tourner vers la phase lipidique les surfaces hélicoïdales les plus hydrophobes. Ces conclusions sont en bon accord avec les résultats des expériences de mutagenèse dirigée récemment décrites par Khorana et collaborateurs, dont elles permettent de préciser, voire corriger, quelques interprétations. Ainsi, les quatre résidus tyrosine présents dans les hélices A et B apparaissent tous situés trop loin de la base de Schiff et du rétinol pour interagir directement avec eux. L'effet sur la stabilité de la BR

du remplacement de la tyrosine 57 par une phénylalanine pourrait résulter de la perte de liaisons hydrogène stabilisant l'association des hélices 1 et 7.

*Analyse comparative de la structure des protéines membranaires intégrales* (J.-L. POPOT & C. de VITRY).

Les résultats expérimentaux obtenus antérieurement (Popot et al., 1987) suggèrent que la région transmembranaire des protéines intégrales résulte de l'assemblage d'hélices  $\alpha$  qui se comportent comme autant de domaines de repliement autonomes. L'examen de l'impact possible de ce mécanisme de repliement sur la structure des protéines intégrales ou des complexes de protéines intégrales a été entrepris. Une base de données a été constituée, qui comporte actuellement environ 200 séquences de protéines membranaires intégrales. Des programmes ont été écrits pour la recherche et l'évaluation des segments susceptibles de former des hélices  $\alpha$  hydrophobes. Les résultats ont été systématiquement confrontés aux modèles de repliement proposés dans la littérature.

De cette étude encore en cours, quelques conclusions se dégagent. D'une part, il existe un grand nombre de protéines intégrales très petites, ne comprenant parfois guère plus qu'une simple hélice hydrophobe (par exemple les deux sous-unités du cytochrome  $b_{559}$ ). La capacité de ces petits peptides à s'assembler en complexes constitue une indication supplémentaire de l'autonomie de repliement des hélices transmembranaires. D'autre part, des différences de structure remarquables apparaissent entre les protéines intégrales selon la membrane à laquelle elles appartiennent (membrane plasmique, membranes internes des organites, membrane externe des bactéries Gram-) et selon que leur biosynthèse implique ou non leur transport à travers une membrane. Par exemple, il semble que des restrictions existent quant au nombre d'hélices hydrophobes que peuvent comporter les protéines synthétisées dans le cytoplasme, puis importées dans les mitochondries ou les chloroplastes. Cette restriction peut tenir au mécanisme d'importation lui-même, ou à une étape antérieure ou postérieure (dépliage, interaction avec des chaperonines). L'identification de son mécanisme permettrait sans doute de mieux comprendre la biosynthèse de ces protéines, ainsi que les facteurs qui ont influencé, au cours de l'évolution, la répartition des gènes entre les génomes nucléaires, chloroplastiques et mitochondriaux.

#### PUBLICATIONS

Y. CHOQUET, M. GOLDSCHMIDT-CLERMONT, J. GIRARD-BASCOU, U. KUCK, P. BENNOUN and J.D. ROCHAIX. *Mutant phenotypes support a trans-*

*trans-splicing mechanism for the expression of the tripartite psaA gene in the C. reinhardtii chloroplast. (Cell. 52 (1988) 903-913).*

B.A. DINER, C. DE VITRY and J-L. POPOT. *Quinone exchange in the  $Q_A$  binding site of Photosystem II reaction center core preparations isolated from Chlamydomonas reinhardtii. (Biochim. Biophys. Acta 934 (1988) 47-54).*

Y. CHOQUET, C. DE VITRY, P. DELEPELAIRE, F-A. WOLLMAN and P. TAPIE. *Spectroscopic characterization of the Photosystem II chlorophyll-protein complexes. (Biochim. Biophys. Acta 934 (1988) 389-395).*

J-L. POPOT & D-M. ENGELMAN. *Bacteriorhodopsin in and out in shape : Experimental evidence in favor of a two-stage mechanism for integral membrane protein folding. (In : Transport Through Membranes : Carriers, Channels and Pumps, pp 381-398. 1988. Eds. A. Pullman et al. Kluwer Academic Publishers).*

J.D. ROCHAIX, M. KUCHKA, S. MAYFIELD, M. SCHIRMER-RAHIRE, J. GIRARD-BASCOU & P. BENNOUN. *Nuclear and chloroplast mutations affect the synthesis or stability of the chloroplast psbC gene product in Chlamydomonas reinhardtii. (The EMBO Journal vol. 8 n° 4 (1989) 1013-1021).*

P.D. McCREA ; D.M. ENGELMAN & J-L. POPOT. *Topography of integral membrane proteins : hydrophobicity analysis vs immunolocalization. (Trends Biochem. Sci. 13 (1988) 289-290).*

J-L. POPOT. *On the folding of membrane receptors. Comptes-Rendus des 24<sup>e</sup> Rencontres de Chimie Thérapeutique « Progrès de la Connaissance de la Structure et du Fonctionnement des Récepteurs : Perspectives en Chimie Thérapeutique ». (Société de Chimie Thérapeutique, Chatenay-Malabry, pp 105-110).*

P. JOLIOT & A. JOLIOT. *Characterization of linear and quadratic electrochromic probes in Chlorella sorokiniana and Chlamydomonas reinhardtii. (Biochim. Biophys. Acta. 1989. Sous presse).*

P. JOLIOT, A. VERMEGLIO & A. JOLIOT. *Evidence for supercomplexes between reaction centers cytochrome c2 and cytochrome bc1 complex in R. sphaeroides whole cells. (Biochim. Biophys. Acta. 1989. 975, 336-345).*

J. LAVERGNE, P. JOLIOT & A. VERMEGLIO. *Partial equilibration of photosynthetic electron carriers under weak illumination : a theoretical and experimental study. (Biochim. Biophys. Acta. 1989. 975, 346-354).*

C. LEMAIRE & F-A. WOLLMAN. *The chloroplast ATP-synthase in Chlamydomonas reinhardtii. I : Characterization of its nine constitutive subunits. (J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264 n° 17, 10228-10234).*

C. LEMAIRE & F-A. WOLLMAN. *The chloroplast ATP-synthase in Chlamydomonas reinhardtii. II : Biochemical studies on its biogenesis using mutants defective in photophosphorylation. (J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264 n° 17, 10235-10242).*

C. DE VITRY, J. OLIVE, D. DRAPIER, M. RECOUVREUR & F-A. WOLLMAN. *Post-translational event leading to the assembly of photosystem II protein complex : a study using photosynthesis mutants from Chlamydomonas reinhardtii.* (*J. Cell. Biol.* 1989. Sous presse).

F-A. WOLLMAN & L. BULTE. *Towards an understanding of the physiological role of state transitions. Photochemical and photobiological processes for the production of energy-rich compounds.* (Commission des Communautés Européennes. 1989. Sous presse).

J. LAVERGNE. *Difference spectra of the oxidized intermediates in the photosynthetic oxygen-evolving system : evidence for a small  $S_0 \rightarrow S_1$  absorption change.* (*Photochem. Photobiol.* 1989. Vol. 50 n° 2, 235-241).

#### CONGRÈS, COLLOQUES, INVITATIONS

21st Jérusalem Symposium « Transport through Membranes : carriers, channel and pumps. Jean-Luc POPOT. Jérusalem, Mai 1988.

Colloque-Bilan des Actions « Interface Physique-Biologie » et « Physique vers la Biologie ». Président : Pierre JOLIOT. Ecole Polytechnique, Palaiseau, 2 et 3 Juin 1988.

Conférence Jacques Monod « Structure et fonction des protéines membranaires impliquées dans les transferts d'électrons dans l'appareil photosynthétique ». Président : Pierre JOLIOT. Roscoff, 13-17 Juin 1988.

Conférences de Pierre JOLIOT, Jérôme LAVERGNE, Jean-Luc POPOT, Francis-André WOLLMAN.

Participants : Sylvie BUSCHLEN, René DELOSME, Dominique DRAPIER, Anne JOLIOT, C. DE VITRY-DELEPELAIRE.

Congrès d'Automne de la Société de Chimie Biologique « Ingénierie des protéines et cristallographie ». Conférence de Jean-Luc POPOT. Ecole Polytechnique, Palaiseau, 22 et 23 Septembre 1988.

Colloque EMBO « Organelle genomes and the nucleus ». Conférence de Pierre BENNOUN. Participants : Jacqueline GIRARD-BASCOU, Catherine DE VITRY-DELEPELAIRE, Yves CHOQUET, Heidelberg, 26-29 Septembre 1988.

Colloque C.E.A. « Régulations et photosynthèse ». Conférence de Francis-André WOLLMAN. Cadarache, 14 et 15 décembre 1988.

II<sup>e</sup> Congrès International « Society for Plant Molecular Biology ». Yves CHOQUET. Jérusalem, 13-18 Novembre 1988.

Table Ronde Roussel-Uclaf « Structure, function and molecular mechanisms in photosystem II ». Catherine DE VITRY-DELEPELAIRE, Francis-André WOLLMAN. Paris, 8 et 9 Décembre 1988.

Colloque de Lassay « Atmosphère et Climat ». Pierre JOLIOT. Paris, 4 Mars 1989.

Workshop « Photochemical & Photobiological Processes for Producing Energy-rich Compounds ». Commission des Communautés Européennes. Conférence de Francis-André WOLLMAN. Londres, 18-21 Avril 1989.

Conférence « Bio-ethics and the Environment. Pierre JOLIOT. Bruxelles, 10-12 Mai 1989.

Colloque « Planète Terre et son Avenir ». Pierre JOLIOT. Paris, 12 et 13 Juin 1989.

Mission d'Etude au Japon, 12 Mai-3 Juin 1989. Jean-Luc POPOT.