

Bioénergétique Cellulaire

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

Le cours de cette année a porté sur l'étude des interactions électrostatiques intervenant au sein des systèmes membranaires convertisseurs d'énergie. La théorie chemiosmotique de Mitchell a souligné le rôle central que joue l'électrostatique et l'électrodynamique des systèmes membranaires dans les processus de couplage entre transfert d'électrons et synthèse d'adénosine triphosphate. D'autre part, les associations entre les édifices protéiques intégrés aux membranes sont en grande partie dépendantes de la valeur des interactions électrostatiques existant entre groupes chargés. La modification de ces interactions électrostatiques est souvent à l'origine de phénomènes de régulation contrôlant les processus de transfert d'électrons.

La première partie du cours a été consacrée à un rappel des lois fondamentales de l'électrostatique. Le cas particulier des milieux hétérogènes comportant des interfaces séparant des zones de faible constante diélectrique simulant les interfaces lipides ou protéines avec le solvant aqueux a été traité plus en détail. Cette analyse volontairement schématique met en évidence la valeur très élevée des interactions entre groupes chargés situés à l'intérieur de zones de basse constante diélectrique telles que les membranes ou les protéines. On peut estimer que pour des charges situées à plus de 10 nm de l'interface, l'énergie d'interaction entre des charges élémentaires situées à 5 Å de distance atteint des valeurs comprises entre 0,3 et 0,6 électrons/volts. On conçoit donc que le potentiel d'oxydo-réduction d'un transporteur d'électrons ou le pK d'un groupe protonable dépende de la présence de charges situées à proximité. Un cas particulièrement intéressant concerne le cas d'une charge située à proximité d'une interface séparant un milieu aqueux contenant des ions d'une région de basse constante diélectrique avec une membrane ou une protéine. Pour des concentrations ioniques physiologiques, le potentiel induit par charges élémentaires distantes de quelques Å reste très élevé (de l'ordre de 100 millivolts) en dépit de l'effet d'écrantage induit par l'eau et les ions en solution. L'influence de la charge se manifeste à des distances de plusieurs

dizaines d'Å, tout particulièrement dans le milieu de basse constante diélectrique. Les propriétés électrostatiques des membranes biologiques sont souvent traitées en supposant que l'interface membrane/eau porte une distribution homogène de charges négatives. Ces charges correspondent aux têtes polaires des lipides et aux groupes protonables présents à proximité de la surface des protéines. Dans ce cas, les équations de Gouy-Chapman permettent le calcul explicite des valeurs du potentiel en fonction de la distance à l'interface, de la concentration et de la valence des ions. L'effet d'écrantage se révèle beaucoup moins efficace pour les ions monovalents que pour les ions divalents et trivalents. Ainsi, les ions magnésium jouent un rôle essentiel dans la détermination du potentiel de surface. Il faut souligner que les charges situées à l'interface sont regroupées sur des protéines qui n'occupent qu'une fraction limitée de la surface membranaire. Une description satisfaisante des propriétés électrostatiques des membranes ne sera obtenue que lorsque l'organisation latérale et la structure des protéines intégrées dans les membranes biologiques seront parfaitement connus.

La seconde partie du cours a été consacrée à l'analyse des données expérimentales permettant de caractériser les interactions électrostatiques au sein des protéines et des membranes photosynthétiques.

De nombreuses méthodes ont été mises en œuvre pour mesurer les énergies d'interactions entre des charges situées au sein de protéines ou de membranes biologiques. Dans le cas de protéines solubles, il est possible de modifier l'environnement d'un groupe protonable en substituant par génie génétique un acide aminé chargé situé à proximité par un acide aminé non chargé. Pour des groupes situés à proximité de la surface et distants d'environ 10 Å, cette substitution induit des variations de pK de l'ordre de 0,4 unité pH. Différents modèles théoriques (Tanford-Kirkwood, Warschel) ont été proposés pour calculer les interactions entre charges localisées dans des protéines ou des membranes. Un accord satisfaisant avec les résultats expérimentaux est obtenu en admettant des constantes diélectriques de l'ordre de 30 à 40 pour des groupes situés à proximité de la surface et de l'ordre de 4 à 8 pour des groupes situés au milieu de la membrane.

Les centres photochimiques représentent un matériel de choix pour analyser les interactions entre les charges localisées sur les transporteurs d'électrons et les nombreux groupes protonables situés en majorité à proximité de la surface de ces protéines transmembranaires. Rappelons que la réaction photochimique primaire se traduit par le transfert de charges positives et négatives qui se localisent à proximité des deux faces opposées de la membrane. Ces charges positives et négatives induisent une variation du pK de nombreux groupes protonables, variations qui se traduisent par la libération ou la fixation de protons. La mesure de ces échanges de protons en fonction du pH de la solution permet de déterminer le nombre de groupes protonables impliqués ainsi que les énergies d'interaction électrostatique.

Les interactions électrostatiques entre groupes chargés, qu'il s'agisse de transporteurs d'électrons ou de groupes protonables, jouent un rôle déterminant dans la thermodynamique des processus des transferts d'électrons et de protons. En toute rigueur, le potentiel rédox d'un transporteur dépend de l'état de charges de l'ensemble des autres transporteurs et groupes protonables inclus dans la même protéine. Toute modification de l'état rédox d'un transporteur se traduira donc par une perturbation immédiate des potentiels rédox de tous les autres transporteurs. Ainsi, l'interprétation des titrations rédox est un problème complexe qui ne peut être résolu que si la position et l'environnement diélectrique de tous les groupes chargés inclus dans la protéine sont connus. Un certain nombre d'exemples expérimentaux ont été traités concernant la mesure des interactions électrostatiques entre des cytochromes appartenant à différents complexes transporteurs d'électrons, (centres réactionnels de *Rhodopseudomonas viridis*, complexes cytochrome bc et bf). Pour des cytochromes distants de 10 à 20 Å, les interactions électrostatiques se traduisent par des modifications du potentiel rédox supérieures à 100 millivolts.

Effets électrochromiques.

Les effets électrochromiques ou effet Stark qui se traduisent par une perturbation des propriétés d'absorption de molécules soumises à un champ électrique représentent une méthode de choix pour étudier les interactions électrostatiques entre groupes chargés présents à l'intérieur des membranes ou des protéines transmembranaires. La théorie de l'effet Stark montre que dans le cas de molécules ne possédant pas de moment dipolaire permanent, le champ électrique provoque une diminution de l'énergie des transitions électroniques induites par l'absorption d'un photon et donc un déplacement des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'onde. L'amplitude des variations d'absorption est alors proportionnelle au carré du champ électrique. Au contraire, si la molécule possède un moment dipolaire permanent, ou, ce qui revient au même, est polarisée par la présence d'une charge permanente située à faible distance, les décalages spectraux peuvent se produire vers le rouge ou vers le bleu et l'amplitude des signaux est alors proportionnelle au champ électrique. L'amplitude des effets électrochromiques peut être mesurée *in vitro* en plaçant des couches minces de pigments entre les armatures d'un condensateur. Lorsqu'une couche de centres réactionnels isolés et désordonnés est soumise à un champ électrique, les spectres électrochromiques induits reproduisent la dérivée seconde des spectres d'absorption des différents pigments inclus dans ces centres. La théorie de l'effet Stark indique que les pigments concernés présentent un moment dipolaire permanent et sont donc soumis à l'influence de charges permanentes situées à proximité.

La mesure des effets électrochromiques *in situ* apporte des informations structurales intéressantes sur l'environnement des pigments inclus dans les protéines membranaires. Les champs électriques créés par une charge élémen-

taire située dans un milieu de basse constante diélectrique sont de l'ordre du million de volts par centimètre pour des distances de l'ordre de 10 à 20 Å. Ces champs électriques induisent donc un décalage des bandes d'absorption vers le rouge qui dans le cas des pigments photosynthétiques peut dépasser 20 nm. Le cas le plus spectaculaire est celui du rétinol qui, intégré au sein de la bactériorhodopsine, présente un maximum d'absorption décalé de 120 nm vers le rouge par rapport au même pigment en solution. Ce décalage est lié à la présence d'un groupe protéique chargé négativement situé à quelques Å du pigment.

Les effets électrochromiques se révèlent un outil précieux permettant de caractériser l'état d'oxydo-réduction de transporteurs et les réactions de transfert de charges se produisant dans les protéines membranaires. Dans le cas des centres photochimiques II, la réduction de la quinone (accepteur secondaire d'électrons) induit un effet électrochromique caractéristique intéressant une molécule de phéophytine, (accepteur primaire), situé au milieu de la membrane. Il est intéressant de constater que dans ce cas, le décalage spectral se produit vers le bleu, ce qui implique que la molécule de phéophytine est polarisée par une charge permanente induisant un champ électrique de signe opposé à celui induit par la semiquinone. De la même manière, les transferts d'électrons se produisant entre donneurs primaires et secondaires peuvent être suivis par les perturbations électrochromiques intéressant plusieurs molécules de chlorophylle situées à proximité.

La valeur du potentiel transmembranaire peut également être déterminée en mesurant les effets électrochromiques associés aux perturbations d'absorption de pigments de l'antenne collectrice de lumière (caroténoïdes et chlorophylles). Le fonctionnement de la chaîne de transfert d'électrons s'accompagne de la formation d'un potentiel transmembranaire pouvant atteindre des valeurs supérieures à 100 mV. Appliquées à une couche diélectrique d'environ 50 Å, ces potentiels créent un champ électrique compris entre 100 000 et 1 000 000 de volts par centimètre susceptibles d'induire des effets électrochromiques importants sur les pigments inclus dans la membrane. Les variations d'absorption mesurées sont essentiellement proportionnelles à la valeur du champ électrique et au potentiel transmembranaire. Il faut donc admettre une fois encore que les pigments impliqués sont eux-mêmes fortement polarisés par des charges permanentes situées à proximité. Les réponses électrochromiques de certains caroténoïdes sont cependant proportionnelles au carré du champ électrique. De telles réponses non linéaires permettent d'estimer la valeur du potentiel de membrane à l'obscurité, potentiel associé au transfert de protons se produisant à travers les ATPases membranaires.

Un dernier chapitre du cours a été consacré à l'étude des conséquences structurales des interactions électrostatiques se produisant au sein des membranes photosynthétiques.

Les phénomènes d'accolement membranaire observés dans les régions granaires sont contrôlés d'une part par des forces d'attraction intervenant à faible distance, (forces de Van der Waals) et des forces répulsives de type électrostatique essentiellement liées à la présence de charges négatives à la surface des protéines membranaires. L'addition d'ions divalents tel que le magnésium induit un accolement des membranes des régions granaires. La théorie de Gouy-Chapman permet une analyse quantitative de ces phénomènes. Elle prévoit que l'addition d'ions divalents provoque une atténuation très importante des forces répulsives, favorisant ainsi l'accolement des membranes. De la même manière, l'organisation latérale des protéines membranaires, et tout particulièrement, les associations entre complexes protéiques portant les pigments collecteurs de lumière et les centres photochimiques, est également contrôlée par la compétition intervenant entre des forces attractives à courte distance et les forces répulsives de type électrostatique. Les variations de l'état de phosphorylation des protéines membranaires s'accompagnent d'une modification de la charge de ces protéines qui déclenche des processus de migration des protéines-antenne entre les régions granaires où sont localisés les centres du photosystème II et les régions non granaires où sont localisés les centres du photosystème I. Ces migrations jouent un rôle capital dans la capacité d'adaptation de l'appareil photosynthétique à des modifications de l'environnement.

P.J.

SÉMINAIRES

M. Justin TEISSIE (Centre de Biochimie et de Génétique Cellulaire, CNRS, Toulouse).

Conduction de protons le long des interfaces lipides/eau.

M. Giuseppe ZACCAI (Institut Laue-Langevin, Grenoble)

Repliement et stabilisation des protéines : rôle des interactions avec l'eau et les sels.

M. Roberto POLJAK (Institut Pasteur)

Interactions moléculaires antigène/anticorps.

M. Hervé BOTTIN (C.E.A., Saclay)

Interactions et transferts d'électrons entre la plastocyanine et les centres réactionnels du Photosystème I.

M. Michel GOLDBERG (Institut Pasteur)

Modulation de la structure tertiaire des protéines par leurs interactions quaternaires.

M. Franc PATTUS (E.M.B.L)

Structure et fonction de la colicine A et de l'aérollysine d'Aeromonas Hydrophila, deux types de toxines capables de former des canaux ioniques dans des membranes biologiques : une approche pluridisciplinaire.

Pr. Richard HENDERSON (Medical Research Center, Cambridge)

A model for the structure of bacteriorhodopsin based on high resolution electron microscopy.

Pr. John WHITMARSH (University of Illinois)

Electron transfer between two photosystems.

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

I. — STRUCTURE DES PROTÉINES MEMBRANAIRES

A) *Structure de la bactériorhodopsine*

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

L'identification par diffraction des neutrons de la position et de l'arrangement dans la molécule de bactériorhodopsine (BR) des segments de séquence 6-30 et 40-64 (hélices A et B) a été achevée et la position probable du segment 76-100 (hélice C) déterminée. Ces trois hélices occupent respectivement les positions 1, 7 et 6 de la carte structurale, c'est-à-dire qu'elles se suivent dans la structure tridimensionnelle dans leur ordre d'apparition dans la séquence. Ces résultats permettent de réinterpréter des résultats antérieurs, et de conclure que l'ensemble des hélices transmembranaires de la bactériorhodopsine suit ce schéma de repliement. En d'autres termes, la structure finale est telle qu'on pourrait l'obtenir en refermant sur lui-même un chapelet de sept hélices, sans enchevêtrement. Ce modèle très simple est en accord avec les résultats des expériences de mutagenèse dirigée du laboratoire de H.G. Khorana (MIT, Boston).

L'orientation des hélices A et B par rapport au cœur de la molécule de BR, également déterminée par diffraction des neutrons, est telle que ces deux hélices exposent aux lipides leur face la plus hydrophobe et tournent vers le cœur de la protéine leurs résidus les plus polaires. Cette disposition est en accord avec l'idée que des interactions de type polaire entre hélices contribuent à déterminer la structure tridimensionnelle de la BR, et avec la nécessité de stabiliser dans le cœur de la molécule les groupes polaires (aspartates protonés ou chargés, base de Schiff) qui assurent le pompage des protons.

B) *Le modèle de repliement en deux étapes des protéines membranaires intégrales et ses implications.*

1. *Le modèle* [J.-L. POPOT, en collaboration avec D.M. ENGELMAN (Université Yale)].

Les expériences de renaturation par fragments sur la bactériorhodopsine, l'étude de la topologie transmembranaire du récepteur nicotinique de l'acétylcholine, ainsi que des arguments thermodynamiques et l'examen de la structure tridimensionnelle des centres réactionnels bactériens et de la bactériorhodopsine amènent à privilégier un modèle de repliement en deux étapes pour les protéines membranaires intégrales. Selon ce modèle, la région transmembranaire de ces protéines est formée par l'accrétion de segments transmembranaires préformés, plus spécifiquement des hélices α hydrophobes. Chaque hélice a les propriétés d'un domaine de repliement autonome, analogue, en beaucoup plus petit, aux domaines de repliement mis en évidence chez les protéines solubles. La justification de ce modèle, ses limites et certaines de ses implications ont été discutées dans un article de revue.

2. *Le microassemblage des protéines membranaires et l'importation des protéines intégrales dans la mitochondrie et le chloroplaste* (J.-L. POPOT et C. de VITRY).

Une conséquence plausible de l'autonomie structurale des hélices α transmembranaires est la possibilité d'assembler des régions transmembranaires fonctionnelles à partir de fragments de protéines, voir d'hélices isolées (« microassemblage »). De nombreux exemples existent désormais de protéines intégrales assemblées à partir de fragments (naturels ou artificiels) préalablement renaturés ou synthétisés indépendamment les uns des autres, *in vivo* ou *in vitro*.

L'existence et la distribution de sous-unités intégrales très petites dans les différents compartiments cellulaires ont été examinées. On observe que de telles sous-unités existent en abondance dans les membranes internes de la mitochondrie et du chloroplaste, alors qu'elles sont très rares dans la membrane plasmique. Beaucoup d'entre elles ne comportent guère plus qu'une simple hélice α hydrophobe (par exemple les sous-unités α et β du cytochrome b_{559}). L'existence même de telles sous-unités est un argument supplémentaire en faveur de l'autonomie structurale des hélices α transmembranaires. Leur distribution suggère l'existence d'un avantage sélectif en faveur de la présence de petites sous-unités dans les complexes chloroplastiques et mitochondriaux. Cet avantage semble être lié au mode particulier d'assemblage de ces complexes, qui combinent sous-unités synthétisées localement dans les organites et sous-unités importées depuis le cytosol. Les sous-unités importées, en effet, comportent presque toujours un nombre réduit de segments hydrophobes (hélices transmembranaires potentielles), alors que les protéines synthétisées dans les organites, comme celles de la membrane

plasmique, peuvent en comporter un très grand nombre. Cette distribution pourrait refléter une limitation des performances de l'appareil d'importation post-traductionnelle des protéines dans les organites. Spécifiquement, il est suggéré qu'une ou plusieurs étapes du mécanisme d'importation sont compromises lorsque la protéine à importer contient de trop nombreux segments hydrophobes. Parmi les hypothèses discutées, la mauvaise solubilité dans le cytosol des précurseurs de ces protéines ou la dissociation trop lente des complexes précurseurs/chaperonines.

Il était intéressant d'examiner la composition en protéines intégrales d'une autre membrane vers laquelle le transport de segments de séquence hydrophobes semble présenter des difficultés, la membrane externe des bactéries Gram⁻. L'hydrophobicité des segments les plus hydrophobes contenus dans les séquences de ces protéines a été comparée à celle des quelque 600 hélices transmembranaires potentielles identifiées chez les eucaryotes. Cette analyse confirme de manière quantitative que les protéines de la membrane externe ne contiennent pas de segments fortement hydrophobes. Cette conclusion recoupe celle de récentes expériences de fusion de gènes, montrant que l'insertion de tels segments dans une protéine soluble bloque son exportation. Il est tentant de conclure que cette contrainte est responsable de la structure inhabituelle (en pli β) des porines de la membrane externe, encore que d'autres facteurs (notamment l'environnement très particulier de ces protéines) ne doivent pas être oubliés.

3. *Modélisation de la topologie transmembranaire du protéolipide majeur de la myéline (PLP)* [J.-L. POPOT, en collaboration avec A. DAUTIGNY et D. PHAM DINH (Université Paris V)].

Le modèle de repliement en deux étapes postule que toute région transmembranaire est constituée de segments susceptibles d'exister sous forme d'une entité indépendante stable insérée isolément dans la bicouche lipidique. Les rares exceptions à ce principe, qu'elles soient certaines (plis β chez les porines) ou probables (hélices chargées dans les canaux ioniques régulés par le potentiel membranaire), peuvent s'interpréter par l'existence de contraintes soit biosynthétiques (voir ci-dessus), soit fonctionnelles (nécessité d'un détecteur des changements de potentiel membranaire).

Il est d'un grand intérêt d'examiner s'il est d'autres cas où le domaine transmembranaire d'une protéine intégrale incorpore des éléments qui ne seraient pas stables sous forme isolée. Le coût énergétique d'une rupture du réseau de liaisons hydrogène d'une hélice α dans un milieu hydrophobe est très élevé (4-6 kcal/liaison). Le modèle de repliement en deux étapes ne peut donc s'accommoder d'hélices qui s'interrompraient au milieu de la membrane pour repartir en sens inverse, comme il a été proposé pour la séquence d'ancrage du cytochrome b_5 (dont la topologie est d'ailleurs controversée). Il n'existe à l'heure actuelle qu'une seule protéine polytopique (comportant

plusieurs segments transmembranaires) dont la topologie proposée comporte de telles « demi-hélices », le protéolipide majeur de la myéline (PLP).

Le PLP est la protéine intégrale majeure de la gaine de myéline. Diverses mutations ponctuelles du PLP affectent la formation de cette gaine et sont responsables de maladies neurologiques graves chez l'homme ou l'animal. L'interprétation du mécanisme de ces mutations dépend de l'organisation transmembranaire du PLP. L'identification du modèle de repliement transmembranaire correct présente donc un intérêt biomédical aussi bien que fondamental. La séquence du PLP et de ses formes mutées a été comparée aux séquences de la bactériorhodopsine, des protéines des centres réactionnels bactériens, et des quelque 200 protéines intégrales analysées précédemment. Les données structurales biochimiques, biophysiques ou immunologiques disponibles ont par ailleurs fait l'objet d'un examen critique.

A l'issue de cette analyse, aucun des trois modèles de repliement existants n'apparaît très satisfaisant. On est conduit à proposer comme plus vraisemblable une topologie transmembranaire « classique » constituée d'un faisceau de 4 hélices α hydrophobes. Le nouveau modèle permet de suggérer des interprétations raisonnables de l'effet (ou de l'absence d'effet) des mutations actuellement connues. Les prédictions qui en découlent quant à l'exposition sur l'une ou l'autre face de la membrane de différentes régions de la séquence sont en cours d'examen expérimental dans le laboratoire d'A. Dautigny.

II. — BIOGÉNÈSE ET INTÉGRATION DES PROTÉINES DU THYLAKOÏDE

A) *Régulation de l'organisation de l'appareil photosynthétique de C. reinhardtii* (C. LEMAIRE, J. GIRARD-BASCOU, L. BULTÉ, C. de VITRY, F.-A. WOLLMAN en collaboration avec P. GANS, F. REBEILLÉ (CEN Cadarache))

Après avoir observé que la réduction des transporteurs intermédiaires de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique est responsable *in vivo* de l'activation d'une kinase membranaire (LHC-kinase), qui phosphoryle les protéines de l'antenne, F.-A. Wollman a démontré, en collaboration avec J. Girard-Bascou et C. Lemaire, que le complexe b6/f est nécessaire à l'activation de kinase. Ce travail a renouvelé la compréhension du mode d'activation de cet enzyme qui était antérieurement attribué à la réduction des plastoquinones situées en amont de complexe b6/f dans la chaîne de transfert d'électrons.

Les profils de phosphorylations protéiques observés dans les mutants de *C. reinhardtii* dépourvus de complexe b6/f et dans les mutants d'antennes pigmentaires ont conduit C. Lemaire, C. de Vitry et F.-A. Wollman à envisager l'existence de plusieurs kinases opérant dans la membrane des thylakoïdes et de processus de type « phosphotransférase » agissant en particulier entre les

sous-unités phosphorylées de l'antenne pigmentaire et certaines sous-unités du complexe photosystème II.

Les conditions physiologiques dans lesquelles la LHC-kinase est activée ont été étudiées de façon plus approfondie par L. Bulté et F.-A. Wollman. Ces chercheurs ont dans un premier temps mis au point une méthode de fixation des deux états extrêmes, kinase active/ kinase inactive, qui permet l'étude biochimique des polypeptides phosphorylables et des modifications d'interactions protéines/protéines consécutives. L'agent pontant utilisé, la parabenzoquinone, agit probablement par un pontage intramoléculaire inactivant à la fois la phosphatase et la LHC-kinase responsables de la régulation. La classe d'enzymes inhibés par la para-benzoquinone regroupe des protéines ayant des sites de fixation pour des nucléotides, ce qui suggère que non seulement la kinase mais aussi la phosphatase renferment de tels sites.

En collaboration avec P. Gans et F. Rebeillé (CEN Cadarache), L. Bulté et F.-A. Wollman ont montré qu'un déficit en ATP intracellulaire induisait l'activation de la LHC-kinase. Son retour à un état inactif nécessite une synthèse nette d'ATP. Cela indique que les changements d'état redox impliquant le b6/f ne gouvernent pas à eux seuls la régulation *in vivo*. En revanche, le rôle essentiel de l'ATP intracellulaire indique que l'objet de cette régulation serait moins une adaptation chromatique visant à optimiser la synthèse des sucres qu'une adaptation de la photosynthèse aux besoins énergétiques de la cellule. Un déficit d'ATP induirait la mise en place d'une photophosphorylation cyclique autour du PSI et du complexe b6/f, au détriment du transfert linéaire d'électrons engageant les deux photosystèmes dans la synthèse des sucres. De premiers résultats indiquent que ces transitions d'état seraient effectivement accompagnées d'un changement des interactions du complexe b6/f avec les photosystèmes I et II (Wollman et Bulté, 1989).

B) *Analyse des complexes Chla/b-protéine du PSII chez C. reinhardtii* (F.-A. WOLLMAN en collaboration avec R. BASSI (Université de Padoue)).

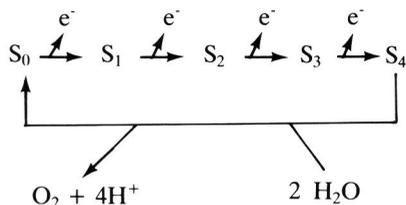
Les différentes classes de protéines liant des chlorophylles a et b, et constituant les antennes photosynthétiques collectrices d'énergie chez *C. reinhardtii* ont été analysées. Ce travail a permis de montrer que cette algue verte unicellulaire, sur laquelle des approches de génétique classique et de transformation génétique sont aisément réalisables, constitue un bon système modèle de l'organisation des antennes chez les plantes supérieures. R. Bassi et F.-A. Wollman ont en effet établi une correspondance entre les complexes Chla/b-protéine de *C. reinhardtii* et des plantes supérieures. Après avoir obtenu des fragments de membranes contenant exclusivement les pigments associés au photosystème II, ces chercheurs ont démontré que sept polypeptides différents lient des Chla et b dans le photosystème II et ont établi l'existence d'antennes intermédiaires (CP29, CP26, CP24) entre l'antenne cœur (CP47 et CP43) et

l'antenne périphérique, LHCI, qui existe sous une forme oligomérique. La connaissance de la composition en sous-unités des différents complexes et la production d'anticorps spécifiques permettent maintenant d'aborder l'étude de la localisation des différents complexes dans la membrane et de leur participation respective aux régulations de la distribution de l'énergie aux deux photosystèmes.

III. — STRUCTURE ET FONCTION DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE

A) *Transfert d'électrons et de protons dans le système de dégagement d'oxygène* (J. LAVERGNE et F. RAPPAPORT)

Le système de dégagement d'oxygène (SDO), associé au côté donneur du PSII, effectue l'oxydation de deux molécules d'eau à partir de quatre équivalents oxydés de haut potentiel générés par quatre réactions photochimiques successives du centre réactionnel. Le schéma d'ensemble de la réaction est décrit par le modèle de Kok :



Les états S₀ ... S₄ désignent des états successifs d'oxydation qui ne sont pas encore précisément identifiés en termes biochimiques. On sait que l'enzyme est dotée d'un « cluster » de 4 atomes de manganèse, dont le rôle précis est actuellement l'objet de nombreux travaux, mettant en œuvre diverses techniques spectroscopiques. Ces questions sont étudiées dans notre laboratoire par J. Lavergne, qui s'est attaché à établir et à interpréter les spectres de changements d'absorption UV-visible associés aux différentes transitions. Parallèlement, J. Lavergne et F. Rappaport étudient les mécanismes de libération de protons mis en jeu au cours du cycle de Kok.

Toutes les études visant à caractériser individuellement les états S se heurtent à une difficulté commune qui est l'impossibilité d'obtenir une population homogène de chacun des états. S₀ et S₁ sont stables à l'obscurité, alors que S₂ et S₃ se désactivent lentement vers S₁, et que S₄ se réduit rapidement vers S₀ en synchronie avec la réaction de dégagement d'oxygène. Pour préparer les états S₂ ou S₃, on soumet le système désactivé à des éclairs courts et saturants qui, malheureusement, ne se traduisent pas par une rotation photochimique unique de l'ensemble des centres, mais s'accompagnent d'une certaine probabilité de « ratés » et de « double-coups ». Ainsi,

même si l'on a réalisé une situation initiale homogène (par exemple 100 % de S_1), on ne pourra obtenir de population pure des autres états, mais un mélange devenant de plus en plus hétérogène au cours d'une séquence d'éclairs. J. Lavergne s'est attaché à mettre au point des techniques expérimentales permettant de déterminer dans les meilleures conditions les contributions des différentes transitions dans des expériences de ce type. Le principe de la méthode est de traiter de façon couplée des données obtenues à partir de deux situations initiales différant par la population des états stables S_0 et S_1 . De telles situations sont préparées par le jeu de préilluminations suivies de la désactivation du système.

Spectres des transitions du SDO

Les résultats déjà publiés par J. Lavergne révélèrent des spectres différents pour chacune des transitions : peu ou pas de changement d'absorption pour $S_0 \rightarrow S_1$, une bande d'augmentation d'absorption centrée autour de 305 nm pour $S_1 \rightarrow S_2$, et une bande plus petite et plus large pour $S_2 \rightarrow S_3$. Ces résultats contredisaient pour partie ceux rapportés par une équipe hollandaise décrivant un spectre identique pour chaque transition. Le travail effectué cette année a pour objectif d'apporter de nouveaux éléments à ce débat, et d'analyser l'origine de la contradiction. Une première étape a permis de s'assurer que les protocoles de préillumination/désactivation utilisés ne faisaient pas survenir d'état « anormal » du système, tel un état S_0 « relaxé » évoqué par certains auteurs, spectralement différent de l'état actif. Un deuxième objectif était de reprendre les expériences en utilisant le même matériel (des fragments de membrane enrichis en PSII : « particules BBY »), et des conditions expérimentales proches de celles utilisées par l'équipe hollandaise. Les résultats actuels permettent d'une part de confirmer les spectres précédemment obtenus sur algues par J. Lavergne, en améliorant la résolution, et de situer l'origine probable du désaccord.

En collaboration avec A. Boussac, W. Rutherford et J.-L. Zimmerman (Département de Biophysique de Saclay), J. Lavergne a étudié le spectre de la transition $S_2 \rightarrow S_3$ intervenant sur le SDO modifié par extraction de Ca^{2+} . Ce matériel se trouve stabilisé à l'obscurité dans l'état S_2 , et effectue à la lumière une transition unique vers un état « S_3 modifié ». Cet état donne lieu à un spectre RPE nouveau, analysé par l'équipe de Saclay comme dû à une interaction entre un radical organique et le cluster de Mn. Le spectre UV obtenu pour cette transition s'avère remarquablement similaire à celui établi *in vitro* pour la formation d'un radical oxydé d'imidazole (histidine). En revanche, aucun autre candidat, aminoacide ou cofacteur, ne présente de spectre proche. Une oxydation d'histidine semble donc intervenir lors de la transition $S_2 \rightarrow S_3$ sur le système modifié. Le spectre de cette transition sur le système intact est au moins en partie proche de celui obtenu en absence de Ca^{2+} , suggérant là encore la formation d'un radical d'histidine. Notons que

l'implication d'un aminoacide comme transporteur d'électron a déjà récemment été mise en évidence sur le côté donneur du PSII avec l'identification de Y_z (intermédiaire entre la chlorophylle centre et le SDO) comme une tyrosine.

A partir de cet ensemble de résultats, les interprétations suivantes peuvent être proposées. Le changement d'absorption dû à $S_1 \rightarrow S_2$ s'accorde bien avec une oxydation $Mn^{III} \rightarrow Mn^{IV}$ suggérée par les résultats de RPE et de spectroscopie X. Cette dernière technique semble également impliquer une oxydation de Mn sur la transition $S_0 \rightarrow S_1$: cependant, l'absence de changement d'absorption dans le proche UV exclut une réaction identique à $S_1 \rightarrow S_2$, et l'éventualité la plus plausible est une oxydation $Mn^{II} \rightarrow Mn^{III}$. Quant à la transition $S_2 \rightarrow S_3$, l'hypothèse d'une oxydation d'histidine s'accorde bien avec les données de spectroscopie X ne décelant pas d'oxydation de Mn sur cette étape. La séquence des polypeptides du centre PSII est connue, et la structure tridimensionnelle en est approchée à partir de la forte analogie avec le centre réactionnel des bactéries pourpres. L'identification d'une histidine comme partie intégrante du système d'accumulation de charges, en interaction avec le cluster de Mn, devrait constituer une avancée très significative dans la description de la structure et du mécanisme du système de dégagement d'oxygène.

Libération de protons par le SDO

Il est généralement admis que la libération des protons correspondant à l'oxydation de l'eau intervient selon la stoechiométrie 1 (transition $S_0 \rightarrow S_1$), 0 ($S_1 \rightarrow S_2$), 1 ($S_2 \rightarrow S_3$), 2 ($S_3 \rightarrow S_0$) au cours du cycle de Kok. A partir d'expériences menées sur des chloroplastes en utilisant divers indicateurs colorés, J. Lavergne et F. Rappaport ont été amenés à proposer une révision de ce modèle. En effet, les signaux traduisant l'acidification du lumen au cours d'une séquence d'éclairs présentent une dépendance moins marquée en fonction des états S que ne le prédisait le modèle, ce qui suggère une stoechiométrie non entière, par exemple 1, 1/2, 1, 3/2 au lieu de 1, 0, 1, 2.

Ce programme a été repris en utilisant des particules « BBY » qui présentent une série d'avantages : pas de perturbation due au PS I ou au complexe b6-f, et possibilité de comparer aisément les réponses d'acidification avec les changements d'absorption UV traduisant l'état du SDO. L'objectif est de parvenir à une détermination réellement quantitative de la stoechiométrie de libération des protons, mettant à profit les techniques mises au point pour la déconvolution des changements d'absorption associés aux états S. Les résultats obtenus actuellement confirment l'hypothèse d'une stoechiométrie non-entière. Pour en rendre compte, il faut considérer que certaines étapes d'oxydation se traduisent par de faibles variations de pK (soit directement sur l'espèce oxydée, soit sur un groupe en interaction électrostatique avec elle). L'étude actuellement en cours de la dépendance de la stoechiométrie en fonction du pH du milieu devrait déboucher sur une description fine de ces mécanismes, et contribuer à l'élucidation de la nature des états d'oxydation du SDO.

B) *Organisation du pool de plastoquinones au sein des membranes photosynthétiques des plantes supérieures et des algues unicellulaires.* (P. JOLIOT, J. LAVERGNE, A. JOLIOT, D. BÉAL).

La chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques comporte trois complexes transmembranaires : le photosystème II, le complexe cytochrome b6/f et le photosystème I. Des molécules solubles assurent les transferts d'électrons entre ces complexes transmembranaires qui peuvent être considérés comme immobilisés, tout au moins dans des domaines de temps de l'ordre de la minute. La plastoquinone confinée dans la phase lipidique de la membrane assure le transfert d'électrons entre le photosystème II et le complexe cytochrome b6/f, alors que la plastocyanine présente dans la phase aqueuse intrathylakoïdale assure les transferts d'électrons entre le cytochrome b6/f et le photosystème I. Le photosystème II et le photosystème I sont localisés dans des régions différentes de la membrane photosynthétique (région granaire et agranaire respectivement) distantes en moyenne de plusieurs centaines de nanomètres, alors que le cytochrome b6/f est réparti d'une manière relativement uniforme dans la membrane. Il est généralement admis que la plastoquinone peut diffuser rapidement sur des distances importantes, et assurer ainsi un transfert d'électrons efficace entre le photosystème II et la totalité des complexes b6/f quelle que soit leur localisation. Il y a plusieurs années, des travaux entrepris dans notre laboratoire et le laboratoire de Bessel Kok aux Etats-Unis avaient mis en évidence des anomalies concernant la valeur des constantes d'équilibre existant entre l'accepteur primaire d'électrons du photosystème II, Q, et le pool de plastoquinones. Les constantes d'équilibre théoriques déduites de la valeur des potentiels rédox de ces deux transporteurs sont proches de 100. Les valeurs expérimentales mesurées sur des chloroplastes isolés lors de la réduction du pool de plastoquinone par une illumination de faible intensité sont comprises entre 1 et 5. De même, les séquences d'émission d'oxygène obtenues par illumination d'algues ou de chloroplastes par une série d'éclairs saturants ne peuvent être interprétées simplement dans le cadre du modèle classique de Kok et Forbush. L'ensemble de ces résultats expérimentaux peut être interprété d'une manière satisfaisante en admettant que les molécules de plastoquinone ne peuvent diffuser librement dans la membrane photosynthétique. Une diffusion rapide de la plastoquinone ne serait observée que dans des domaines membranaires de taille limitée incluant un petit nombre de centres photochimiques II (moins de 8). Le rapport entre le nombre de molécules de plastoquinone et le nombre de centres appartenant à un même domaine varie très largement. Sur le plan structural, ces résultats peuvent être interprétés qualitativement en remarquant que la fraction de la surface membranaire occupée par les protéines transmembranaires dépasse très probablement 50 %. Une telle surface est supérieure au seuil de percolation, et on peut alors admettre que les domaines de la membrane où la plastoquinone peut diffuser librement sont limités par les obstacles constitués par des réseaux de protéines transmembranaires. Un tel

modèle permet de rendre compte du fort degré d'hétérogénéité du système, les surfaces de ces domaines ainsi que le nombre de centres réactionnels qui leur sont associés étant susceptibles de varier dans de larges proportions. La vitesse de diffusion des molécules de plastoquinone à l'intérieur d'un domaine est extrêmement rapide, l'équilibre thermodynamique étant réalisé en quelques millisecondes. Au contraire, l'équilibration entre différents domaines ne se produirait que dans des domaines de temps compris entre quelques secondes et quelques dizaines de secondes.

Le confinement de la plastoquinone dans des domaines de taille réduite implique *a fortiori* que cette dernière ne peut diffuser rapidement entre les régions granaires et non granaires distantes de plusieurs centaines de nanomètres. Cette hypothèse a pu être vérifiée en analysant les réactions de transfert d'électrons intervenant entre la plastoquinone réduite formée par l'activité du photosystème II et le complexe cytochrome b6/f. Il apparaît que la fraction des molécules de cytochrome b6/f accessible dans ces conditions ne représente que les 2/3 de la quantité totale de cytochromes b6/f. Ces résultats sont en accord avec les conclusions des analyses ultrastructurales effectuées par Olive et collaborateurs, qui ont mesuré la répartition du complexe b6/f dans les régions granaires et agraires.

L'ensemble de ces résultats modifie sensiblement nos conceptions sur le mécanisme de transfert d'électrons dans le processus photosynthétique. Dans des conditions de fonctionnement linéaire de la chaîne de transfert, les électrons produits par la réaction photochimique II seraient transférés aux complexes b6/f localisés dans la même région membranaire. Les transferts d'électrons entre régions granaires et non granaires seraient exclusivement assurés par la diffusion de la plastocyanine dans la phase aqueuse intrathylakoïdale. Les molécules de cytochrome b6/f localisées à proximité du photosystème I seraient spécialisées dans le fonctionnement cyclique de l'appareil photosynthétique qui s'accompagne exclusivement d'une synthèse d'ATP. Ces résultats s'accordent donc avec les concepts récents développés dans notre laboratoire par F-A. Wollman et ses collaborateurs sur la base de données expérimentales différentes.

C) Transfert d'électrons du cytochrome f au photosystème I.

(R. DELOSME)

R. Delosme a étudié les cinétiques de réduction de $P700^+$ et d'oxydation du cytochrome f après un éclair laser, chez divers mutants d'algues vertes unicellulaires. La majorité de $P700^+$ est réduite suivant une réaction d'ordre 1, avec un temps de demi-réduction de $4\mu s$. Ce temps est nettement inférieur à celui qui a été mesuré par d'autres auteurs dans le cas de chloroplastes isolés ou de préparations de photosystème I solubilisé. Il existe donc entre $P700$ et son donneur d'électrons (la plastocyanine) une association suffisamment efficace pour assurer un transfert extrêmement rapide *in vivo*.

La vitesse d'oxydation du cytochrome f dépend très largement des conditions expérimentales, le temps de demi-oxydation pouvant varier entre 60 μ s et 1 ms. Deux types d'hypothèses permettent d'expliquer l'ensemble des cinétiques observées :

a) le facteur limitant la vitesse d'oxydation du cytochrome f est la vitesse de dissociation du complexe P700-plastocyanine, c'est-à-dire la vitesse de libération de la plastocyanine oxydée. Celle-ci pourrait varier par suite de changements dans l'environnement électrostatique du centre réactionnel.

b) le facteur limitant est la vitesse de diffusion de la plastocyanine oxydée vers le cytochrome f. Dans ce cas, on suppose variable la distance entre les centres réactionnels du photosystème 1 et les complexes cytochrome b_6f . Cette hypothèse s'accorderait avec les résultats de Wollman et al., qui ont mis en évidence par immunocytochimie une répartition variable des complexes cytochrome b_6f .

R. Delosme a montré que l'oxydation du cytochrome f par le photosystème I est rapide dans des conditions où le potentiel de membrane est faible (présence de découplants), et lente dans des conditions de potentiel de membrane élevé. Ces observations suggèrent que l'association entre complexe cytochrome et photosystème I serait gouvernée par une régulation où interviendrait le potentiel de membrane (ou la concentration d'ATP). Un déficit d'ATP favoriserait l'association cytochrome-photosystème I, donc la photophosphorylation cyclique. Inversement, un excès d'ATP favoriserait l'association cytochrome-photosystème II, donc le transfert d'électrons linéaire $H_2O \rightarrow NADP$.

PUBLICATIONS

J. LAVERGNE. « *Mitochondrial responses to intracellular pulses of photosynthetic oxygen* ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989, Vol 86, 8768-8772.

C. de VITRY & J.-L. POPOT. « *Le microassemblage des protéines membranaires mitochondriales et chloroplastiques* ». *C.R. Acad. Sci. Paris, Série III*, 1989, 309, 709-714.

J.-L. POPOT, D.M. ENGELMAN, O. GUREL & G. ZACCAI. « *Tertiary structure of bacteriorhodopsin : position and orientation of sequence segments A and B in the structural map determined by neutron diffraction* ». *J. Mol. Biol.* 1989, 210, 829-847.

L. BULTÉ & F.-A. WOLLMAN. « *Stabilization of states I and II by p-benzoquinone treatment of intact cells of Chlamydomonas reinhardtii* ». *Biochim. Biophys. Acta*. 1990, 1016, 253-258.

L. BULTÉ & F.-A. WOLLMAN. « *Mechanism and control of the inactivation of cyt b_6/f complexes during gametogenesis in C. reinhardtii* ». *Current Research in Photosynthesis*, Vol. III, 715-718. 1990. Kluwer Academic Publishers.

P. GANS, L. BULTÉ, F. REBEILLE & F-A. WOLLMAN. « *ATP deprivation induces state I to state II transition in the dark in Chlamydomonas reinhardtii* ». *Current Research in Photosynthesis*, Vol. IV, 43-46. 1990. Kluwer Academic Publishers.

P. JOLIOT, A. VERMEGLIO & A. JOLIOT. « *Electron transfer between primary & secondary donors in photosynthetic bacteria : evidence for « supercomplexes »* ». *Current Research in Photosynthesis*, Vol. III, 247-253. 1990. Kluwer Academic Publishers.

P. JOLIOT, J. LAVERGNE & D. BÉAL. « *Organization of the plastoquinone pool in chloroplasts : evidence for clusters of different sizes* ». *Current Research in Photosynthesis*, Vol. II, 879-882. 1990. Kluwer Academic Publishers.

J. LAVERGNE. « *Detection of photosynthetic oxygen through mitochondrial absorption changes in algal cells* ». *Current Research in Photosynthesis*, Vol. I, 893-896. 1990. Kluwer Academic Publishers.

J. LAVERGNE & F. RAPPAPORT. « *On the stoichiometry of proton release by the oxygen-evolving system* ». *Current Research in Photosynthesis*, Vol. I, 873-876. 1990. Kluwer Academic Publishers.

J.-L. POPOT & C. de VITRY. « *On the microassembly of integral membrane proteins* ». *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1990, 19, 369-403.

J.-L. POPOT & G. ZACCAI. « *Anatomie d'une protéine. La diffraction des neutrons explore la structure d'une protéine membranaire* ». *Pour la Science*. n° 148, 1990, 20-22.

D.M. ENGELMAN, B.D. ADAIR, J.F. HUNT, T.W. KAHN & J.-L. POPOT. « *Bacteriorhodopsin folding in membranes : a two-stage process* » *Curr. Topics. Memb. Transp.* 38 (1990) 38, 71-78.

P. JOLIOT, A. VERMEGLIO & A. JOLIOT. « *Electron transfer between primary and secondary donors in Rhodospirillum rubrum : Evidence for a dimeric association of reaction centers* ». *Biochemistry* (1990) 29, 4355-4361.

J.-L. POPOT & D.M. ENGELMAN. « *Membrane protein folding and oligomerization : the two-stage model* ». *Biochemistry* (1990) 29, 4031-4037

J.-L. POPOT, D.M. ENGELMAN, G. ZACCAI & C. de VITRY. « *The « micro-assembly » of integral membrane proteins : applications & implications* ». Sous presse.

L. BULTÉ & F-A. WOLLMAN. « *ATP control on state transitions in vivo in C. reinhardtii* ». *Biochim. Biophys. Acta* (1990) Sous presse.

J.-L. POPOT & D.M. ENGELMAN. « *Membrane protein models : possibilities and probabilities* » in « *Proteins : form and function* » (Ralph A. Bradshaw & M. Purton eds), Elsevier, Cambridge, 1990, pp. 147-151.

L. BULTÉ & P. BENNOUN. « *Translational accuracy and sexual differentiation in Chlamydomonas reinhardtii* ». *Curr. Genet.* (1990) 18, 155-160.

CONGRÈS, COLLOQUES, CONFÉRENCES

« Membranforum ». Conférencier : J-L. POPOT, Francfort, 3-6 avril 1989.

19th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies.
Conférencier : P. JOLIOT. Rome, 2-7 juillet 1989.

Gordon Conference « Molecular Membrane Biology ». Conférencier : J.-L. POPOT. New London, (New Hampshire) Etats-Unis, 3-7 juillet 1989.

VIIIth International Congress on Photosynthesis. Conférencier : P. JOLIOT, Posters : D. BÉAL, L. BULTÉ, P. JOLIOT, A. JOLIOT, J. LAVERGNE, J.-L. POPOT, F. RAPPAPORT, F.-A. WOLLMAN. Stockholm, 6-11 août 1989.

Symposium on Membrane Biotechnology, Conférencier : J-L. POPOT, College Station, Etats-Unis. 16-18 septembre 1989.

Congrès Annuel de la Société Française de Biophysique « La membrane dans tous ses états ». Conférenciers : P. JOLIOT, J-L. POPOT. Participant : A. JOLIOT. Ile d'Oléron, 28 septembre-1^{er} octobre 1989.

Colloque Scientifique sur l'Histoire du CNRS 1939-1989. Participant : P. JOLIOT. Paris, 23-24 octobre 1989.

Colloque « Patrimoine Génétique et Droits de l'Humanité ». Président de Table Ronde : P. JOLIOT. Paris, 25-28 octobre 1989.

Entretiens de l'Institut de Biologie Physico-Chimique. Conférenciers : L. BULTÉ, R. DELOSME, F.-A. WOLLMAN. Paris, 7 novembre 1989.

Premières Assises Audiovisuelles. Participant : P. JOLIOT. Paris, 30 septembre-2 octobre 1989.

Meeting of the European Network of Laboratories « Concerted approaches to the study of structure-function relationships in the reaction centre of photosynthetic bacteria ». Conférencier : P. JOLIOT. Saclay, 1-2 décembre 1989.

Meeting « Intra and Inter-Membrane Interactions ». J.-L. POPOT. Ecole Normale Supérieure, Paris, 14-15 décembre 1989.

Quelles langues pour la Science. P. JOLIOT. 9-10 janvier 1990.

Winter Organelle Meeting. Conférencier : P. BENNOUN. Poster : D. DRAPIER. Clearwater, Floride, Etats-Unis, 22-25 février 1990.

Fourth International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas. F.-A. WOLLMAN, C. de VITRY. Lake Lawn Lodge, Delavan, Wisconsin, 7-12 avril 1990.