Bioénergétique Cellulaire

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

Le cours n'a pas eu lieu.

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

I. — STRUCTURE ET REPLIEMENT DES PROTÉINES MEMBRANAIRES

A) *Structure de la bactériorhodopsine*

[J.-L. POPOT, en collaboration avec F. SAMATEY et G. ZACCAÏ (Institut Laue Langevin, Grenoble), C. ECHEBEST et R. LAVERY (IBPC, Service de Biochimie Théorique) et P. TUFFERY (Boursier Organibio)]

Au cours des années précédentes, J.-L. Popot et coll. ont identifié par diffraction des neutrons la position et l'arrangement dans la molécule de bactériorhodopsine (BR) des segments de séquence 6-30 et 40-64 (hélices A et B) et indiqué la position probable du segment 76-100 (hélice C) (Popot *et al.*, 1989). Ces conclusions ont été confirmées par le récent travail de diffraction des électrons du groupe de R. Henderson (Cambridge). La résolution de la carte de densité électronique établie par ce groupe est de 3,5 Å dans le plan de la membrane et d'environ 10 Å dans la direction perpendiculaire. Elle permet de visualiser la position des hélices, leurs connexions extramembranaires et les plus grosses chaînes latérales (résidus aromatiques). Connaissant la séquence et la géométrie caractéristique des hélices α , on peut orienter la plupart d'entre elles en se basant sur la disposition des résidus aromatiques, sauf l'hélice D, qui n'en contient pas. L'orientation de l'hélice A coïncide exactement (précision $\approx 20^\circ$) avec celle déterminée par Popot et coll. L'orientation de l'hélice B est plus ambiguë ; entre deux positions possibles, Henderson et coll. ont choisi celle déterminée par Popot et coll., à nouveau à $\approx 20^\circ$ près.

Ces développements ouvrent de nouvelles perspectives, qui sont en cours d'exploration, concernant l'exploitation des données de diffraction des neutrons et la modélisation.

En ce qui concerne la diffraction des neutrons, le travail précédent (Popot *et al.*, 1989) avait été handicapé par la nécessité d'utiliser pour l'interprétation des données un modèle assez grossier de la structure de la BR, basé sur une carte de densité électronique à 7 Å. Ce modèle s'était révélé suffisant pour analyser les données provenant de la deutération des hélices A et B, mais trop peu précis pour permettre d'explorer l'ensemble plus compliqué formé par les cinq hélices C à G. F. Samatey et J.-L. Popot, en collaboration avec C. Etchebest, ont écrit un ensemble de programmes informatiques qui permettent de modifier le modèle structural d'Henderson et coll. en faisant tourner les hélices autour de leur axe et en donnant aux chaînes latérales les diverses conformations qui leur sont le plus facilement accessibles, et de calculer pour chacun des modèles ainsi construits les effets de divers modes de deutération. Cette nouvelle approche permet de retrouver très précisément les orientations des hélices A et B. La possibilité de déterminer de cette façon l'orientation de l'hélice D autour de son axe, et donc la position dans la molécule de résidus fonctionnellement importants tels que l'aspartate-115, est actuellement en cours d'examen.

P. Tuffery, R. Lavery et J.-L. Popot ont par ailleurs entrepris le développement de programmes destinés à prédire *ab initio* la façon dont deux hélices peuvent s'associer, sur la base de contraintes énergétiques. Ces programmes sont basés sur le développement antérieur par P. Tuffery, R. Lavery et coll. d'algorithmes qui permettent de prédire la conformation de la majorité des chaînes latérales d'une petite protéine étant donnés sa séquence et le tracé de la chaîne. En raison des contraintes imposées par les données de diffraction, la BR offre une occasion particulièrement favorable de tester l'application de cette approche à la prédiction de l'arrangement tridimensionnel des faisceaux d'hélices α transmembranaires.

B) Purification du complexe cytochrome b_6f de *Chlamydomonas reinhardtii* (Y. PIERRE et J.-L. POPOT)

Le nombre et la nature des sous-unités composant le complexe b_6f de *C. reinhardtii* ne sont pas définitivement établis. En dehors des quatre sous-unités « classiques » (cytochrome b_6 , cytochrome f, protéine de Rieske, sous-unité IV, l'existence d'une cinquième sous-unité de 16 kDa reste disputée et la présence éventuelle d'une petite sous-unité (≈ 4 kDa) correspondant au gène *petE* présent dans le génome chloroplastique n'a pas été examinée. La purification du complexe *cyt* b_6f a été entreprise afin de répondre à ces questions et, dans une étape ultérieure, d'examiner l'arrangement et le repliement des sous-unités constitutives.

Un protocole de purification a été mis au point, qui comporte une étape de solubilisation sélective par le détergent Hecameg, une étape de séparation sur gradient de saccharose, et une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite. Un soin particulier a dû être apporté au maniement du complexe en solution détergente, la protéine de Rieske se détachant avec beaucoup de facilité.

Les complexes obtenus sont extrêmement purs, sur la base de leur composition en polypeptides examinée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée et de SDS. Après coloration au TMBZ (révélation des hèmes) et à l'argent, les gels montrent cinq bandes, dont les quatre premières correspondent au cytochrome f, à la protéine de Rieske, au cytochrome b_6 et à la sous-unité IV. Le peptide de 16 kDa n'est pas présent dans ces préparations ; il se sépare du complexe lors de la purification sur gradient. La cinquième bande migre avec la masse moléculaire apparente attendue du produit de petE. Il n'est pas certain à l'heure actuelle si elle recouvre un seul ou plusieurs polypeptides. Sa caractérisation est en cours (microséquençage, marquage par des anticorps préparés contre des peptides synthétiques correspondant aux extrémités N- et C-terminales du produit de petE), ainsi que l'examen de la stoechiométrie des différentes sous-unités et des propriétés fonctionnelles du complexe.

Les extrémités N-terminales du cytochrome f, de la protéine de Rieske, et du polypeptide de 16 kDa ont été établies par microséquençage, ainsi que la séquence d'un fragment interne de la protéine de Rieske. La séquence N-terminale du cytochrome f permet de définir la position du site de coupure du précurseur. Sur la base des segments de séquence obtenus sur la protéine de Rieske, des sondes oligonucléotidiques ont été synthétisées, qui ont permis à C. de Vitry d'amplifier un fragment de DNA génomique codant pour cette protéine. Le clonage du gène est en cours. La même stratégie sera employée pour caractériser la protéine de 16 kDa, dont la présence dans les membranes, selon des résultats antérieurs de C. Lemaire et F.-A. Wollman, apparaît strictement corrélée à celle du complexe b_6f , bien qu'elle ne soit pas présente dans nos préparations purifiées.

C) *Identification des cytochromes h_1 et h_2 et de la protéine P3 présents dans les préparations de thylakoïdes de *C. reinhardtii* [A. ATTEIA, C. de VITRY, Y. PIERRE et J.-L. POPOT, en collaboration avec J. OLIVE (Institut Jacques Monod, Paris)]*

Un certain nombre de polypeptides présents dans les préparations de thylakoïdes de *C. reinhardtii* n'ont pas été identifiés. C'est le cas de deux hémoprotéines, dénotées h_1 et h_2 , et d'un polypeptide, appelé P3, qui donne une réaction immunologique croisée avec la sous-unité β de l'ATPase chloroplastique (expériences antérieures de C. Lemaire et F.-A. Wollman). Inverse-

ment, un certain nombre de transporteurs d'électrons mis en évidence fonctionnellement n'ont pas été identifiés biochimiquement. Tel est le cas du cytochrome G, de type c', qui échange des électrons avec le complexe b₆f (expériences antérieures de J. Lavergne, P. Joliot et A. Joliot), ou des transporteurs impliqués dans la chlororespiration (expériences de P. Bennoun). Il a été proposé à plusieurs reprises que h₁ et h₂ sont des cytochromes impliqués dans la chlororespiration. h₂ par ailleurs migre sur gel de polyacrylamide avec une masse moléculaire apparente proche de celle des cytochromes c'.

Afin de tirer au clair l'identité de h₂, cette protéine a été partiellement purifiée. Ses caractéristiques physicochimiques et spectroscopiques ont été établies, ainsi qu'un fragment de séquence N-terminale. Une réaction croisée de h₂ avec divers cytochromes c mitochondriaux a été mise en évidence. La présence de h₁, h₂ et P3 dans des mutants de *C. reinhardtii* essentiellement dépourvus de thylakoïdes a été démontrée. Un fragment de séquence N-terminale de P3 a été déterminé. L'absence du cytochrome h₁ dans des mutants de *C. reinhardtii* dépourvus de complexe cytochrome bc₁ mitochondrial a été établie. L'ensemble de ces résultats permet de conclure que les préparations de membranes « de thylakoïdes » contiennent également des membranes mitochondriales. h₂ est le cytochrome c mitochondrial, P3 la sous-unité β de l'ATP synthase et h₁ fait partie du complexe bc₁ (Atteia *et al.*, 1991 ; Atteia *et al.*, soumis pour publication).

Cette étude clarifie considérablement la composition de ces préparations de membranes. Elle représente par ailleurs la première identification biochimique de protéines mitochondriales chez *C. reinhardtii*. Elle offre des perspectives très intéressantes pour l'étude de la biosynthèse et de l'importation de certaines de ces protéines, ainsi que pour la compréhension des interactions par lesquelles le chloroplaste contrôle les synthèses protéiques mitochondriales.

II. — BIOÉNERGÉTIQUE

A) *Organisation des transporteurs d'électrons au sein de la membrane photosynthétique* (P. JOLIOT, J. LAVERGNE et A. JOLIOT)

Les réactions de transfert d'électrons, caractéristique du processus photosynthétique, se produisent pour la plupart entre des transporteurs strictement positionnés au sein de trois édifices protéiques transmembranaires, les complexes photochimiques I et II et le complexe cytochrome b₆f. Le photosystème II et le photosystème I sont localisés dans des régions différentes de la membrane photosynthétique distantes en moyenne de plusieurs centaines de nanomètres, alors que le cytochrome b₆f est réparti d'une manière uniforme

dans la membrane. De petites molécules solubles assurent les transferts d'électrons entre ces complexes transmembranaires qui peuvent être considérés comme immobiles dans des domaines de temps de l'ordre de la seconde. Une molécule liposoluble, la plastoquinone, assure les transferts d'électrons entre le photosystème II et le cytochrome b_6f , alors qu'une molécule hydrosoluble, la plastocyanine, assure les transferts d'électrons entre le cytochrome b_6f et les centres réactionnels du système I. Dans un travail décrit dans le précédent rapport, P. Joliot et J. Lavergne ont montré que les molécules de plastoquinone ne pouvaient diffuser librement que dans des domaines de petites dimensions dont la surface est très inférieure à celle des domaines granaires où sont exclusivement localisés les centres du photosystème II. Il apparaît donc que la plastoquinone ne serait pas en mesure de participer aux transferts d'électrons à longue distance intervenant entre les centres du photosystème II et les complexes cytochrome b_6f localisés dans les régions non granaires où se trouvent localisés les centres du système photochimique I. L'analyse des réactions de transfert d'électrons intervenant entre les systèmes photochimiques II et I a permis de conforter cette hypothèse. Les expériences ont été effectuées en présence de ferricyanure qui oxydant la totalité des transporteurs d'électrons situés entre les deux photosystèmes. Dans ces conditions, la plastoquinone réduite formée par l'activité du photosystème II n'a rapidement accès qu'à une fraction des complexes cytochrome b_6f , fraction de l'ordre des $2/3$ vraisemblablement localisés dans les régions granaires à proximité du photosystème II. Dans ces régions, le rapport entre les concentrations des centres du photosystème II et des complexes cytochrome b_6f est de l'ordre de 2. L'analyse des réactions de transfert d'électrons dans les conditions d'inhibition partielles des centres photochimiques II a permis de préciser la taille moyenne des domaines dans lesquels la plastoquinone peut diffuser librement. Ces domaines comporteraient en moyenne 4 centres photochimiques pour 2 complexes cytochrome b_6f , ce qui correspond effectivement à des domaines de petite taille comparée à celle des régions granaires qui incluent selon toute probabilité une centaine de centres photochimiques. Il faut cependant souligner que la taille de ces domaines ainsi que le rapport entre surfaces de membranes libres et nombre de centres photochimiques connectés à un domaine particulier varie dans de larges proportions. Une collaboration a été entreprise avec Jean-Philippe Bouchaud de l'Ecole Normale Supérieure, afin d'établir si les modèles classiques dérivés de la théorie de la percolation pouvaient rendre compte des résultats expérimentaux obtenus. Les premiers résultats de cette analyse théorique montrent qu'une description satisfaisante des phénomènes observés peut être obtenue en admettant que les obstacles à la diffusion constitués par les protéines occupent 50 % de la surface membranaire, chiffre compatible avec les données ultrastructurales. L'une des conclusions essentielles de ce travail est de démontrer que la plastocyanine est le seul transporteur impliqué dans les transferts d'électrons à longue distance intervenant entre les régions granaires et stromales.

L'analyse des cinétiques de transfert d'électrons mesurées en conditions oxydantes a également permis de démontrer que la vitesse de réduction des transporteurs appartenant aux chaînes haut et bas potentiel du cytochrome b_6 était exclusivement limitée par des réactions intervenant dans ce complexe et non pas par la vitesse de diffusion ou de fixation des molécules de plastoquinol. Dans des conditions plus réductrices, c'est-à-dire lorsque les transporteurs de la chaîne haut potentiel sont réduits à l'obscurité, les vitesses de réaction de transfert d'électrons intra-complexe sont beaucoup plus rapides. Ce résultat est paradoxal dans la mesure où une diminution de la concentration des transporteurs à l'état oxydé devrait se traduire par une diminution de la vitesse de réduction de ces transporteurs. L'intervention d'interactions électrostatiques à courte distance entre transporteurs associés au cytochrome b_6 devrait permettre de rendre compte de la dépendance entre vitesse réactionnelle et état rédox des transporteurs.

B) *Système de dégagement d'oxygène* (J. LAVERGNE et F. RAPPAPORT)

Les travaux de J. Lavergne et de F. Rappaport sont axés autour du système de dégagement d'oxygène (SDO) intervenant du côté donneur du PSII. La réaction photochimique génère successivement les 4 équivalents oxydés utilisés dans la réaction globale $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$. Les modalités de stockage de ces intermédiaires de très haut potentiel (les « états S » du système de Kok) et le mécanisme catalytique mis en jeu font l'objet de nombreux travaux recouvrant toute la gamme des techniques spectroscopiques. Le rôle essentiel semble joué par un « cluster » de Mn qui interviendrait à la fois dans l'accumulation d'équivalents oxydés et comme site réactionnel. Les recherches effectuées dans notre laboratoire concernent deux aspects : les spectres de changement d'absorption UV-visible associés aux étapes d'oxydation successives du système, et d'autre part, l'étude des libérations de protons accompagnant ces transitions.

La méthodologie utilisée dans ce type d'étude consiste à mesurer les réponses intervenant au cours d'une séquence d'éclairs courts et saturants. Si de tels éclairs induisaient un acte photochimique unique sur la totalité des centres, on pourrait ainsi préparer successivement les différents états S. Les choses sont en réalité moins simples car il faut compter à la fois avec une incertitude concernant l'état initial du système, et avec le mélange progressif causé par les probabilités de « ratés » et de « double-coups » intervenant sur chaque éclair. Une autre source de difficultés expérimentales réside dans la contamination éventuelle des résultats par des signaux étrangers au SDO, provenant en particulier du côté accepteur du PSII. Une amélioration significative des techniques de déconvolution de séquences a été réalisée cette année : J. Lavergne a montré qu'en utilisant la différence de deux séquences expérimentales correspondant à une répartition initiale différente des deux

états stables (S_0 et S_1), on pouvait à la fois s'affranchir de l'incertitude sur les conditions initiales et éliminer les signaux étrangers.

Engagé dans une controverse avec d'autres auteurs à propos des spectres de changements d'absorption associés aux transitions du SDO, J. Lavergne a pu, muni de cette nouvelle méthode, confirmer, avec une résolution accrue les résultats précédemment obtenus.

Parallèlement, il s'est intéressé avec F. Rappaport à un autre aspect important du fonctionnement du SDO, à savoir les stoechiométries de libérations de protons associées aux différentes transitions. Le schéma stoechiométrique couramment admis est (1, 0, 1, 2), c'est-à-dire libération d'un proton sur la transition $S_0 \rightarrow S_1$, zéro sur la transition $S_1 \rightarrow S_2$, etc.

J. Lavergne et F. Rappaport ont été amenés à réviser ce schéma et à proposer une stoechiométrie non-entière et dépendante du pH ambiant. Un premier élément conduisant à cette révision provient d'une réinterprétation des résultats obtenus avec le rouge neutre, un colorant permettant en présence d'un tampon non-perméant (BSA) de mesurer l'acidification intervenant dans le lumen des thylakoïdes. Les réponses de ce colorant présentent un caractère biphasique. Jusqu'à présent, seule la phase rapide était prise en compte dans l'établissement de la stoechiométrie car elle seule semblait cinétiquement cohérente avec les vitesses de transferts d'électrons générant les libérations de protons. J. Lavergne et F. Rappaport ont pu montrer, en collaboration avec P. Jahns et W. Junge (Osnäbruck), que la phase lente résultait d'un transitoire dû à l'alcalinisation intervenant du côté donneur du PSII, dans les régions accolées (qui ne s'équilibrent que lentement avec le milieu extérieur tamponné par la BSA). Ce résultat conduit à prendre en compte l'amplitude totale de la réponse et non plus celle de la seule phase rapide. Cette nouvelle approche conduit à une stoechiométrie non-entière incompatible avec le modèle 1, 0, 1, 2.

Une stoechiométrie non-entière peut paraître paradoxale, mais est en fait typique de la réponse d'une protéine à l'apparition d'une charge supplémentaire en son sein. Les déplacements de pK de résidus aminoacides en réponse à la variation du potentiel électrostatique s'accompagnent, en général, d'échanges de protons avec le milieu, dont le bilan dépend des états de protonation de ces résidus en absence et en présence d'une charge. Si de tels mécanismes interviennent du côté donneur du PSII, on s'attend à ce que la stoechiométrie observée dépende du pH ambiant. F. Rappaport et J. Lavergne ont donc entrepris une étude détaillée de la libération de protons par le SDO en fonction du pH. Ce travail, effectué sur des particules enrichies en PSII, en présence de colorants hydrophiles, apporte une confirmation indépendante du caractère non-entier de la stoechiométrie et met en évidence une nette dépendance vis-à-vis du pH. Entre pH 5,5 et 7, la déprotonation intervenant sur $S_0 \rightarrow S_1$ décroît, passant de 1,75 à 1 H^+ , pour rester constante et égale à

1 jusqu'à pH 8. Dans la même région, la stoechiométrie sur la transition $S_1 \rightarrow S_2$ varie entre 0 et 0,5 et décline de nouveau au-delà de pH 7,75. Celle de $S_2 \rightarrow S_3$, elle, reste constante et égale à 1. Ces résultats ont été interprétés par un modèle minimum faisant appel à quatre groupes protonables en interaction électrostatique plus ou moins forte avec les sites d'accumulation de charges.

La stoechiométrie de libération de protons a une incidence directe sur la charge du système dans ses différents états. Les variations de cette charge influencent le spectre d'une chlorophylle a voisine, par déplacement électrochromique. On observe ainsi dans les régions bleue et rouge du spectre de la chlorophylle des changements d'absorption manifestant la périodicité de 4 éclairs associée au cycle de Kok. F. Rappaport et J. Lavergne ont mesuré l'amplitude de ce signal sur les différentes transitions en fonction du pH. Il apparaît ainsi une bonne corrélation entre la titration de l'amplitude du déplacement électrochromique et celle du dégagement de protons. Sur chaque transition apparaît une charge positive, plus ou moins compensée par une déprotonation. Sur $S_0 \rightarrow S_1$ on a une sur-compensation (plus d'un proton libéré) qui se traduit par un signal électrochromique de signe inverse de celui observé sur $S_1 \rightarrow S_2$ où moins d'un proton est dégagé. Si, en première approximation, l'information électrochromique traduit essentiellement le bilan électrostatique net du système, une analyse plus fine suggère des effets géométriques indiquant des distances différentes entre les groupes chargés et la chlorophylle sonde.

L'ensemble de ce travail renouvelle significativement la conception des réactions de déprotonation associées aux étapes du cycle de Kok. Une stoechiométrie entière suggérerait une série de corrélations strictes entre étapes d'oxydation et libération de proton. Il apparaît au contraire que pour deux de ces étapes ($S_0 \rightarrow S_1$ et $S_1 \rightarrow S_2$), les déprotonations proviennent d'une influence électrostatique à distance entre résidus aminoacides et centres rédox. En revanche, la troisième étape ($S_2 \rightarrow S_3$), impliquant la libération d'un proton quel que soit le pH, semble correspondre à une déprotonation chimique directe de l'espèce oxydée. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse avancée par ailleurs (avec A. Boussac, W. Rutherford et J.-L. Zimmermann de Saclay) de la formation d'un « OH-adduct » radicalaire sur un aminoacide (histidine) dans la transition $S_2 \rightarrow S_3$.

III. — BIOGÈNESE ET INTÉGRATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES DU THYLAKOÏDE

A) *Régulation de l'organisation de l'appareil photosynthétique* [L. BULTÉ, F.-A. WOLLMAN en collaboration avec P. GANS et F. REBEILLÉ (CEN, Cada-

rache), R. BASSI et P. DAINESE (Université de Padoue), O. VALLON et J. OLIVE (Inst. J. Monod, Paris)]

Les transitions état I/état II dont F.-A. Wollman et collaborateurs ont entamé l'étude il y a une dizaine d'années sont comprises comme une adaptation chromatique commune aux algues vertes et aux végétaux supérieurs. Elles impliquent une phosphorylation réversible des principaux complexes protéiques portant les antennes chlorophylliennes (LHCII) permettant leur déplacement entre les centres réactionnels PSI et PSII dans les membranes thylakoïdales. F.-A. Wollman et R. Bassi, analysant la composition biochimique des antennes chez *C. reinhardtii*, ont montré que deux complexes chlorophylle-protéine, les CP29 et CP26, sont phosphorylables chez cette algue tandis qu'ils ne le sont pas chez les plantes supérieures. La phosphorylation de ces complexes pourrait expliquer l'amplitude particulièrement grande des réorganisations d'antenne observées chez *C. reinhardtii*.

En collaboration avec P. Gans et F. Rebeillé, L. Bulté et F.-A. Wollman ont démontré que les transitions état I/état II sont induites par des variations d'exigence cellulaire en ATP. Ces travaux permettent de comprendre que cette régulation n'est sans doute pas essentiellement destinée à optimiser la synthèse des sucres par équilibration des fréquences de séparation de charges dans les deux photosystèmes (adaptation chromatique). Elle permettrait au chloroplaste d'organiser l'activité photosynthétique pour la production d'ATP ou de sucres suivant les variations du métabolisme intracellulaire. A l'appui de cette thèse, L. Bulté et F.-A. Wollman, en collaboration avec les groupes de J. Olive et de R. Bassi, ont montré que le complexe cyt b_6f se déplace latéralement entre les deux photosystèmes pendant cette régulation. Associé au PSI dans l'état II, il faciliterait un transfert cyclique d'électron couplé à la seule production d'ATP tandis qu'à l'état I, il participerait essentiellement au transfert linéaire d'électrons entre les deux photosystèmes, ce qui permet la synthèse des sucres.

B) *Expression génétique et assemblage des protéines du thylakoïde chez C. reinhardtii*

a) *Mutants de trans-splicing* [J. GIRARD-BASCOU en collaboration avec M. GOLDSCHMIDT-CLERMONT, Y. CHOQUET et J.-D. ROCHAIX (Université de Genève, Suisse)]

Chez l'algue verte *C. reinhardtii*, les gènes *psaA* et *psaB*, codant pour les apoprotéines du CPI, ne sont pas adjacents et cotranscrits comme chez les plantes supérieures. De plus, le gène *psaA* est composé de trois exons largement dispersés le long du génome chloroplastique, les exons 1 et 2 étant transcrits en sens opposés. Cette situation très exceptionnelle laisse supposer que l'ARN messager mature du gène *psaA* est formé à partir de plusieurs

ARNm précurseurs. J. Girard-Bascou et ses collaborateurs ont analysé de nombreux mutants PSI d'origine nucléaire ou chloroplastique déficients quant à leur capacité à former un ARNm de *psaA* mature. Ils ont trouvé que ces mutants appartiennent à 14 groupes de complémentation dispersés le long du génome nucléaire et un locus chloroplastique. Cette situation indique l'existence de nombreux facteurs protéiques d'origine nucléaire intervenant dans les réactions d'épissage. Le locus chloroplastique *tscA*, défini par plusieurs délétions, est éloigné des trois exons du gène *psaA* et doit donc coder pour un facteur qui agirait en trans, la nature de ce facteur reste à l'étude. Les mutants définissent trois phénotypes selon les précurseurs accumulés indiquant des défauts dans l'une ou l'autre des réactions de jonction des ARN précurseurs (classes A et C) ou des deux (classe B). Ces phénotypes et ceux de double mutants (notamment AC) sont en accord avec l'hypothèse de deux voies d'épissages alternatives.

b) *Localisation et séquence nucléotidique des gènes petA, petB, petD*
(S. BÜSCHLEN, R. KURAS, F.-A. WOLLMAN en collaboration avec Y. CHOQUET)

Les gènes codant pour les trois principales sous-unités chloroplastiques du complexe *cyt b₆f*, *petA* (*cyt f*), *petB* (*cyt b₆*) et *petD* (su.IV) ont été séquencés dans la souche sauvage de *C. reinhardtii*. Ils diffèrent de leurs homologues des plantes supérieures par leur localisation (*petB* et *petD* ne sont pas adjacents) et par l'absence d'introns. Les séquences d'acides aminés du *cyt b₆* et de la sous-unité IV sont très bien conservées (plus de 80 % d'homologie avec les séquences correspondantes d'autres organismes) tandis que celle du *cyt f* est un peu plus divergente (60-70 % d'homologie). L'extension N-terminal (de 29 acides-amino) correspondant au signal d'adressage lumenal du *cyt f* ne présente aucune homologie avec les séquences signal de *cyt f* d'autres organismes. Ceux-ci présentent en général 50 % d'homologies de séquence. Une telle différence incite à penser que certains aspects du mécanisme d'insertion du *cyt f* dans le thylakoïde de *C. reinhardtii* pourraient être spécifiques de cette algue.

c) *Interaction des génomes nucléaire et chloroplastique dans l'expression des sous-unités α et β de l'ATP synthétase* (D. DRAPIER, J. GIRARD-BASCOU et F.A. WOLLMAN)

Trois mutants nucléaires modulant l'expression des sous-unités α et β du CF1, codées dans le chloroplaste, ont été étudiés au niveau post-transcriptionnel et traductionnel. Cette étude fait apparaître la diversité des contrôles qu'exerce le noyau sur l'expression des gènes chloroplastiques. L'une des mutations étudiées affecte un facteur nucléaire impliqué dans la traduction de la sous-unité α , les deux autres affectent des facteurs nucléaires impliqués dans la stabilité des ARNm des sous-unités α ou β . Dans ce dernier groupe,

la mutation altérant l'expression de α a pour effet de déstabiliser l'ARNm d'un facteur 10 sans pourtant altérer la traduction et l'accumulation de cette sous-unité de plus d'un facteur 3. Des expériences utilisant la nucléase S1 indiquent que ces facteurs nucléaires protégeraient les ARNm de l'action d'une exonucléase agissant sur l'extrémité 3' des transcripts. Enfin la comparaison des vitesses de synthèse des sous-unités α et β dans les différentes souches mettent en évidence une interaction dans l'expression de ces sous-unités au niveau traductionnel.

C) *Evolution de la photosynthèse au cours de la différenciation cellulaire de l'algue verte unicellulaire C. reinhardtii*

a) *Etude de la fusion des membranes des thylakoïdes au cours de la formation des zygotes* [B. BALDAN, J. GIRARD-BASCOU, F.-A. WOLLMAN en collaboration avec J. OLIVE (Institut Jacques Monod, Paris)]

Au cours du cycle sexuel de l'algue verte *C. reinhardtii*, les cellules haploïdes végétatives se différencient en gamètes dont la fusion conduit à la formation d'un zygote diploïde qui conserve une activité photosynthétique pendant au moins 48 h après la fécondation. Dans les premières heures de formation du zygote, on observe une fusion des noyaux et des chloroplastes des gamètes parentaux. Les réseaux de membranes internes des chloroplastes, les thylakoïdes, apportés par les deux parents se retrouvent donc dans un compartiment unique. Ces membranes contiennent les protéines responsables du transfert d'électrons photosynthétique. B. Baldan et ses collaborateurs ont montré par immunocytochimie et cryofracture que les thylakoïdes apportés par les deux gamètes fusionnaient dans le chloroplaste du zygote. Cette démonstration a été effectuée en croisant les gamètes de deux mutants de photosynthèse altérés dans l'activité du PSI et du PSII du fait qu'une sous-unité d'origine chloroplastique de l'un des centres photochimiques était absente. Afin de conserver les déficiences parentales, les deux souches ont été croisées en présence d'un antibiotique inhibant les synthèses chloroplastiques. Une redistribution latérale des protéines membranaires apportées par les deux parents a alors été observée au cours des premières 24 h de formation du zygote. Cette fusion thylakoïdale permet alors de restaurer un transfert d'électrons photosynthétique entre le PSII et le PSI dans ce zygote formé à partir de deux mutants qui ne possédaient que l'un ou l'autre des deux photosystèmes. Ces chercheurs ont donc démontré l'existence d'une complémentation « biochimique » dans le zygote qui se distingue de la complémentation génétique qui requiert quant à elle des synthèses polypeptidiques *de novo*.

b) *Déstabilisation spécifique d'une protéine transmembranaire, le complexe cyt b_6f , au cours de la gamétogénèse* (L. BULTÉ et F.-A. WOLLMAN)

Ces chercheurs ont montré qu'une inactivation de la photosynthèse se développe au cours de la gamétogénèse. Elle provient de la disparition

sélective des cinq sous-unités du complexe cyt b_6f par un mécanisme impliquant une reconnaissance et une déstabilisation du complexe accumulé dans les membranes thylakoïdales avant la gamétogénèse. Deux signaux intracellulaires responsables du déclenchement de ce mécanisme ont été mis en évidence : une augmentation de l'ambiguïté de traduction et une élévation des ressources énergétiques intracellulaires due essentiellement à l'augmentation spectaculaire des réserves d'amidon dans les gamètes. L. Bulté et F.-A. Wollman ont ensuite identifié un intermédiaire protéique impliqué dans la disparition du complexe cyt b_6f . Il s'agit d'un complexe protéique soluble, de poids moléculaire élevé (10^6), dont la formation est gouvernée par des facteurs codés par le noyau. L'une des sous-unités principales de ce complexe comporte des épitopes communs avec le cyt f qui pourrait se trouver ainsi associé à des polypeptides traduits dans le cytoplasme et ayant une fonction analogue à celle des chaperons.

PUBLICATIONS

F.-A. WOLLMAN & L. BULTÉ. « *Towards an understanding of the physiological role of state transitions* ». In : *Photoconversion Processes for Energy and Chemicals*. Eds. D.O. Hall & G. Grassi. Elsevier Publishers, 1989, pp. 198-207.

J.-L. POPOT. « *On the folding of membrane receptors* ». Symposium sur les progrès de la structure et du fonctionnement des récepteurs. *Actual. Chim. Théor.* 1989, 16, 105-110.

D.M. ENGELMAN, B.D. ADAIR, J.F. KAHN & J.-L. POPOT. « *Protein folding inside membrane bilayers* ». *Biophys. J.* 1989, 55, 398a.

J.-L. POPOT, D.M. ENGELMAN, G. ZACCAÏ & C. de VITRY. « *The "micro-assembly" of integral membrane proteins : applications et implications* ». In : *Horizons in Membrane. Biotechnology*, 1990, Wiley-Liss, Inc. pp. 237-262.

L. BULTÉ, P. GANS, F. REBÉILLÉ & F.-A. WOLLMAN. « *ATP control on state transitions in vivo in Chlamydomonas reinhardtii* ». *Biochim. Biophys. Acta.* 1990, 1020, 72-80.

A. BOUSSAC, J.-L. ZIMMERMANN, A.-W. RUTHERFORD & J. LAVERGNE. « *Histidine oxidation in the oxygen-evolving photosystem-II enzyme* ». *Nature*, 1990, 347, n° 6290, 303-306.

R. BASSI & F.-A. WOLLMAN. « *The chlorophyll a/b proteins of photosystem II in Chlamydomonas reinhardtii* ». *Planta*, 1991, 183, 423-433.

J. LAVERGNE & P. JOLIOT. « *Restricted diffusion in photosynthetic membranes* ». *Trends in Biochemical Sciences*, 1991, vol. 16, n° 4, 129-134.

J.-L. POPOT, D. PHAM-DINH & A. DAUTIGNY. « *Major myelin proteolipid : the α -helix topology* ». *J. Membrane. Biol.* 1991, 120, 233-246.

J.-L. POPOT & D.M. ENGELMAN. « *Folding models for integral membrane proteins : probabilities and possibilities* ». In *Proteins : form and function* (R.A. Bradshaw & M. Purton, eds), Elsevier Trends Journals, Cambridge, pp. 147-151.

A. ATTEIA, C. de VITRY, Y. PIERRE, H. DINERSTEIN & J.-L. POPOT. « *Identification of mitochondrial proteins in membrane fractions from Chlamydomonas reinhardtii* ». *Biophys. J.*, 1991, 59, 512a.

P. JAHNS, J. LAVERGNE, F. RAPPAPORT & W. JUNGE. « *Stoichiometry of proton release during photosynthetic water oxidation : a reinterpretation of the responses of Neutral red leads to anon-integer pattern* ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1057, 313-319.

C. de VITRY, B.A. DINER & J.-L. POPOT. « *Photosystem II particles from Chlamydomonas reinhardtii : purification, molecular weight, small subunit composition, protein phosphorylation* » *J. Biol. Chem.*, 1991, sous presse.

O. VALLON, L. BULTÉ, P. DAINESE, J. OLIVE, R. BASSI & F.-A. WOLLMAN. « *Lateral redistribution of cytochrome b6f complexes along thylakoid membranes upon state transitions* ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, sous presse.

S. BÜSCHLEN, Y. CHOQUET, R. KURAS & F.-A. WOLLMAN. « *Nucleotide sequences of the continuous and separated petA, pet B and petD chloroplast genes in Chlamydomonas reinhardtii* ». *FEBS Lett.*, 1991, 284, 257-262.

B. BALDAN, J. GIRARD-BASCOU, F.-A. WOLLMAN & J. OLIVE. « *Evidence for thylakoid membrane during zygote formation in Chlamydomonas reinhardtii* » *J. Cell. Biology*, 1991, sous presse.

D. PHAM-DINH, J.-L. POPOT, O. BËSPFLUG-TANGUY, P. LANDRIEU, J.F. DELEUZE, J. BOUE, P. JOLLES & A. DAUTIGNY. « *Pelizaeus-Merzbacher disease : a new point mutation in a putative extracellular loop of myelin proteolipid* ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, sous presse.

R. DELOSME. « *Electron transfer from cytochrome f to photosystem I in green algae* » *Photosynthesis Research*, 1991, sous presse.

THÈSE

L. BULTÉ. « *Régulations de l'activité photosynthétique engageant le complexe Cyt b6f chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii* ». Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, 19 juin 1990.

CONGRÈS ET MISSIONS DE MAI 1990 À JUIN 1991

Gordon Conference « Biochemical Aspects of Photosynthesis ». New London, New Hampshire, USA, 16-20 juillet 1990. P. JOLIOT, F.-A. WOLLMAN.

« Third European Congress on Cell Biology ». Florence, 2-7 septembre 1990. L. BULTÉ.

Workshop « Physique inspirée de la Biologie ». Cargèse, Corse, 3-13 septembre 1990. P. JOLIOT.

Colloque « Recherche et Environnement ». Strasbourg, 24 & 25 septembre 1990. P. JOLIOT.

Congress of the « Deutsche Botanische Gesellschaft ». Regensburg, 30 septembre-5 octobre 1990. F.-A. WOLLMAN.

« 35th Annual Meeting of the Biophysical Society ». San Francisco, 24-28 février 1991. J.-L. POPOT.

Rencontres Biologie Moléculaire - Informatique. Paris, 16-18 avril 1991. C. DE VITRY.

Colloque des Société Française de Microbiologie et Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire « Conception, Selection, Production et Analyse des Protéines de nouvelle génération ». Ecole Polytechnique, Palaiseau, 15-17 mai 1991. J.-L. POPOT.

« Evolution of Photosynthesis ». San Antonio, Texas, USA, 21-26 juin 1991. W. NITSCHKE.

Jacques Monod Conference « The Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus ». Roscoff, 24-28 juin 1991. Conférenciers : Y. CHOQUET, J. GIRARD-BASCOU, F.-A. WOLLMAN. Participants : S. BÜSCHLEN, D. DRAPIER, R. KURAS & C. DE VITRY.