

Bioénergétique cellulaire

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

Le cours de cette année a porté sur l'étude structurale et fonctionnelle des complexes cytochrome (cyt) b/c et b/f. Ces complexes sont les seuls éléments communs aux chaînes de transfert d'électrons intégrées dans les membranes des bactéries, des chloroplastes et des mitochondries. Il est donc probable que ces complexes étaient présents dans les formes ancestrales des appareils membranaires convertisseurs d'énergie qui ont donné naissance aux appareils photosynthétiques et respiratoires. Les complexes cyt b/c et b/f catalysent le transfert d'électrons entre les molécules de quinols présentes en solution dans la phase lipidique de la membrane et la forme oxydée de petites protéines hydrosolubles, cyt c dans le cas des chaînes respiratoires et des bactéries photosynthétiques, plastocyanine dans le cas des chaînes photosynthétiques oxygéniques. Ces protéines solubles assurent le transfert des électrons vers les complexes cytochrome-oxydase (cas des chaînes respiratoires) ou vers les complexes photochimiques (cas des bactéries photosynthétiques ou des chloroplastes).

I. La première partie du cours a été consacrée à une description structurale de ces édifices protéiques complexes, formés par l'association de 5 à 8 polypeptides dont la majorité comporte des segments transmembranaires (hélices α). Trois de ces polypeptides dont la structure primaire est hautement conservée portent 4 cofacteurs doués de propriétés redox. Sur le plan fonctionnel, on peut distinguer deux chaînes de transporteurs d'électrons associées aux complexes cyt b/c ou b/f (Figure 1).

Une première chaîne, dite « haut potentiel », comporte deux transporteurs : un centre redox comportant deux atomes de fer et deux atomes de soufre (protéine de Rieske) et un cytochrome de type c ancré dans la membrane par une hélice transmembranaire. Les potentiels de demi-réduction de ces transporteurs sont proches de + 300 mV. Ces transporteurs sont localisés sur la

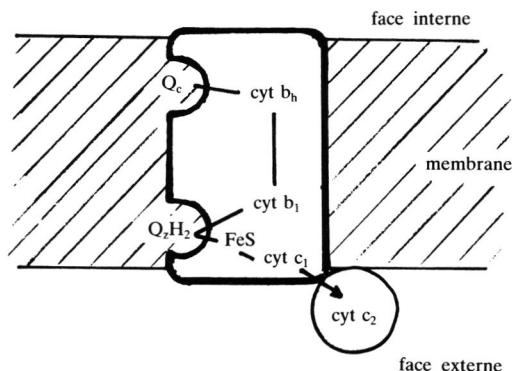


Figure 1. Localisation des transporteurs d'électrons dans le complexe cyt b/c des bactéries photosynthétiques.

face externe de la membrane mitochondriale ou de la membrane plasmique bactérienne et sur la face interne des vésicules thylakoïdales dans le cas des chloroplastes. Une seconde chaîne de transporteurs « bas potentiel » comporte deux hèmes de type b associés à un même polypeptide localisé à l'intérieur de la membrane. Les potentiels redox des cyt b sont compris entre 90 et -170 mV. Les complexes cyt b/c ou cyt b/f comportent d'autre part deux sites susceptibles de fixer les quinones ou quinols en solution dans la phase lipidique membranaire. Au transfert d'électrons à travers les complexes cyt b/c ou b/f est associé un pompage transmembranaire de protons. Ces complexes réalisent ainsi la conversion de l'énergie redox libérée lors du transfert d'électrons des quinols aux transporteurs de la chaîne haut potentiel ($0,3$ eV) en énergies électrique et osmotique transmembranaires, converties ultérieurement en énergie chimique par synthèse d'ATP. Une analyse critique des données expérimentales concernant l'efficacité des processus de pompage de protons et de formation de potentiel électrique transmembranaire permet de conclure qu'en régime stationnaire, le transfert d'un électron à travers les complexes b/c ou b/f induit le transfert électrogénique d'un proton à travers la membrane.

II. L'analyse des différents mécanismes proposés pour rendre compte des processus de transfert d'électrons et de protons intervenant dans les complexes cyt b/c et b/f constitue la seconde partie du cours. Ces mécanismes dérivent tous de l'hypothèse du « Q-cycle » ou cycle quinone formulée par Mitchell en 1976. Dans cette hypothèse, l'oxydation des quinols se produit à un site Q_z , proche de la face externe des membranes. L'oxydation d'une molécule de quinol est déclenchée par le transfert d'une charge positive aux transporteurs de la chaîne haut potentiel. La molécule de quinol cède alors séquentiellement un électron vers la chaîne haut potentiel et un second électron vers la chaîne

bas potentiel. A ce processus d'oxydation est associée la libération de deux protons dans la phase aqueuse proche du site Q_z .

Ce mécanisme de transfert séquentiel, qui se traduit par la formation d'une semiquinone de très courte durée de vie au site Q_z , est en accord avec les potentiels électrochimiques des couples redox QH_2/Q^- et Q^-/Q , mesurés en solution aqueuse. Cette hypothèse rend compte d'un résultat paradoxal concernant le processus de réduction du cyt b : l'addition de ferricyanure en présence d'un excès de quinol à une solution de cyt b/c solubilisé par des détergents, induit la réduction du cyt b. Il était difficile de comprendre comment l'addition d'un oxydant de haut potentiel ($E_m = 400\text{mV}$) pouvait provoquer la réduction d'un transporteur de bas potentiel tel que le cyt b. Ce résultat paradoxal est expliqué en admettant que le ferricyanure, en oxydant les transporteurs de la chaîne haut potentiel, déclenche le processus de réduction concertée des chaînes haut et bas potentiel (Schéma I).

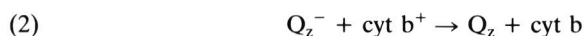
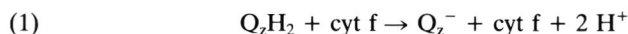


Schéma I

La seconde étape du cycle quinone intervient lorsque les deux hèmes b de la chaîne bas potentiel ont été réduits par l'oxydation séquentielle de deux quinols au site Q_z . Ces deux hèmes cèdent alors deux électrons à une molécule de quinone localisée au niveau d'un site Q_c proche de la face membranaire interne des mitochondries et bactéries et externe des chloroplastes. La réduction de la quinone s'accompagne d'un mouvement transmembranaire d'électrons à travers la chaîne bas potentiel et par conséquent de la formation d'un potentiel électrique transmembranaire. Lors de la réduction d'une molécule de quinone, deux protons sont prélevés dans la phase aqueuse proche du site Q_c (Schéma II).

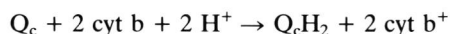


Schéma II

Lors d'un cycle complet, deux molécules de quinol sont oxydées au niveau du site Q_z et une molécule de quinone est réduite au niveau du site Q_c ; le bilan global se traduit donc par l'oxydation d'une seule molécule de quinol dont les deux électrons sont transférés à la chaîne haut potentiel. Les sites Q_z et Q_c étant localisés à proximité de faces opposées de la membrane, le processus de transfert d'électrons s'accompagne de la libération de quatre protons sur l'une des faces de la membrane et de la fixation de deux protons sur la face opposée. Les complexes cyt b/c réalisent ainsi le pompage électrogénique d'un proton par électron transféré à la chaîne haut potentiel. Paradoxalement, ce processus de pompage n'implique aucun mouvement transmembranaire de protons. L'hypothèse du cycle quinone rend compte d'une

manière satisfaisante de l'essentiel des données expérimentales concernant les transferts d'électrons et de protons dans les complexes cyt b/c des bactéries photosynthétiques et des mitochondries. Il n'en est pas de même dans le cas des complexes cyt b/f présents dans les chloroplastes ou dans certaines bactéries photosynthétiques vertes. En premier lieu, le potentiel de demi-réduction de l'un des deux hèmes de la chaîne bas potentiel des complexes cyt b/f est très négatif (-170 mv). Il en résulte que la réduction de cet hème bas potentiel est thermodynamiquement défavorable. En second lieu, des données expérimentales obtenues sur des algues unicellulaires placées en conditions suffisamment réductrices pour que les 2 hèmes b soient à l'état réduit semblent incompatibles avec l'hypothèse du cycle quinone (P. et A. Joliot). Cette hypothèse implique en effet que l'oxydation d'un quinol au site Q_z n'est possible que si un des 2 hèmes est à l'état oxydé (réaction 2, Schéma I). On observe cependant que l'illumination, par un éclair de courte durée, d'algues en conditions réductrices provoque l'oxydation du cyt b de bas potentiel. Cette oxydation est précédée par une phase électrogénique traduisant un mouvement transmembranaire d'électrons. La seule alternative consiste donc à supposer que la semiquinone formée au site Q_z (réaction 1, Schéma I) traverse la membrane et se fixe au site Q_c , déclenchant ainsi le processus d'oxydation des cyt b. Au mouvement transmembranaire d'une semiquinone chargée négativement serait associée la formation d'un potentiel de membrane. Ces résultats expérimentaux conduisent à proposer une hypothèse alternative à celle du cycle quinone pour rendre compte des processus de transfert d'électrons et de protons dans les complexes cyt b/f. Dans cette nouvelle hypothèse dite du « cycle semiquinone », la première étape correspondant à l'oxydation d'une première molécule de quinol est identique à celle proposée dans le cas du cycle quinone (Schéma I). Cette première étape conduit à la réduction d'un cyt b haut potentiel (-50 mV), réaction thermodynamiquement favorable. Lors de la seconde étape, l'oxydation partielle d'une seconde molécule de quinol au site Q_z conduit à la formation d'une semiquinone rapidement transférée au site Q_c (réaction électrogénique). Cette semiquinone est alors réduite par le transfert d'un électron venant du cyt b.

Des données expérimentales récentes obtenues sur des chloroplastes isolés placés en conditions oxydantes suggèrent que dans le cas du complexe cyt b/f, la quinone ne serait pas susceptible de se fixer au site Q_c , ce qui exclurait la possibilité d'un mécanisme du type cycle quinone.

Une analyse critique de l'ensemble des données expérimentales suggère que le mode de fonctionnement des complexes cyt b/c et cyt b/f pourrait être différent (cycles quinone et semiquinone respectivement) en dépit des fortes analogies structurales existant entre ces deux types de complexes. Il est important de souligner que les complexes cyt b/c sont présents dans des organismes (bactéries pourpres ou mitochondries) fonctionnant dans des conditions physiologiques suffisamment oxydantes pour qu'une fraction du pool de

quinones soit à l'état oxydé. Dans un mode de fonctionnement de type cycle quinone, ces quinones représentent un substrat disponible au site Q_c . Les complexes cyt b/f se rencontrent au contraire chez des organismes susceptibles de fonctionner dans des conditions suffisamment réductrices pour que le pool de quinones soit entièrement réduit. En l'absence de quinones, le seul substrat oxydant disponible au site Q_z serait alors la semiquinone formée au site Q_z . Le cycle semiquinone serait une réponse adaptative aux conditions très réductrices, caractéristique de l'environnement de certaines bactéries vertes (*Helio-bacterium*).

P. J.

SÉMINAIRES

M. Klaus BRETTEL, Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire, C.E.A., Saclay. « *Etude par spectroscopie d'absorption de la séparation de charges et des recombinaisons de charges intervenant dans le Photosystème I* ».

M. Pierre GANS, Laboratoire de Résonance Magnétique en Biologie et Médecine, Grenoble. « *Régulation inter-organites de l'énergétique cellulaire chez Chlamydomonas reinhardtii* ».

M. Jean-Jacques GIRERD, Laboratoire de Chimie Inorganique, Institut de Chimie Moléculaire, Orsay. « *Synthèse, structure et propriétés électroniques de complexes polynucléaires du manganèse. Modélisation structurale du site de dégagement d'oxygène des plantes* ».

M. Pierre NETTER, Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette. « *Analyse génétique et moléculaire des révertants fonctionnels, mais non sauvages, des mutants de la chaîne de respiration mitochondriale chez Saccharomyces cerevisiae* ».

M^{me} Mireille BLANCHARD-DESCE, Laboratoire de Chimie Moléculaire (Collège de France) et Service de Photosynthèse (Institut de Biologie Physico-Chimique). « *Quelques approches des systèmes artificiels de transport d'électrons transmembranaire* ».

M. John H. GOLBECK, Université du Nebraska. « *Reconstitution of the photosystem I complex with genetically modified psaC and psaD polypeptides expressed in Escherichia coli* ».

M. Leslie P. DUTTON, Université de Pennsylvanie. « *Quinone and redox catalysis in the Cytochrome bc₁ complex* ».

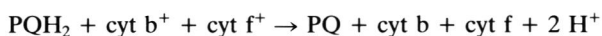
M. William A. CRAMER, Université de Purdue, Indiana. « *On the disassembly and assembly of thylakoid membrane protein complexes* ».

M. Peter RICH, The Glynn Research Foundation. « *Structure and function of cytochrome oxidase and bacterial cytochrome bo* ».

I. — BIOÉNERGÉTIQUE

A) *Analyse du transfert d'électrons entre les centres réactionnels du photosystème II et le complexe cytochrome b/f* (P. JOLIOT et A. JOLIOT)

Le transfert d'électrons des accepteurs quinoniques des centres réactionnels du photosystème II (PSII) aux complexes cyt b/f a été étudié sur des chloroplastes d'épinard en présence de ferricyanure. Cette incubation en conditions oxydantes induit l'oxydation du pool de plastoquinone en solution dans la phase lipidique de la membrane. Dans ces conditions, les réactions de transfert d'électrons se produisant au niveau du complexe cyt b/f sont déclenchées par le transfert de molécules de plastoquinol du site accepteur d'électrons du PSII au site Q_z des complexes cyt b/f et proche de la face interne des membranes thylacoïdales. La molécule de quinol associée au site Q_z transfère alors deux électrons aux chaînes bas et haut potentiels du complexe cyt b/f suivant la réaction :



L'analyse de la cinétique de réduction du cyt b sur des chloroplastes soumis à une illumination saturante montre qu'environ 2/3 des complexes cyt b/f sont rapidement accessibles aux molécules de quinol formées par le PSII (< 10 ms) alors que la fraction restante n'est accessible que dans des domaines de temps supérieurs à la centaine de ms. Cette hétérogénéité fonctionnelle peut être rapprochée de l'hétérogénéité structurale portant sur la localisation respective des centres du PSII et des complexes cyt b/f. L'analyse par microscopie électronique des membranes chloroplastiques montre en effet que les centres PSII sont localisés dans des régions dites granaires occupant environ les 2/3 de la surface membranaire totale alors que les complexes cyt b/f sont répartis d'une manière homogène sur la totalité de cette surface. On peut alors supposer que seuls les complexes cyt b/f localisés dans les régions granaires, c'est-à-dire à proximité immédiate des centres PSII, peuvent interagir rapidement avec les molécules de quinone produites par la réaction photochimique II. Cette hypothèse implique que les molécules de quinol ne peuvent diffuser rapidement des régions granaires vers les régions stromales. Ces expériences apportent une confirmation nouvelle de la validité d'un modèle structural proposé par P. Joliot et J. Lavergne, basé sur une analyse des cinétiques de réduction de la plastoquinone. Dans ce modèle, les protéines membranaires forment des réseaux qui délimitent des domaines fermés. Ces réseaux interdisent la diffusion rapide de la plastoquinone sur des distances excédant la centaine de nm. Le transfert d'électrons à longue distance entre les régions granaires et stromales serait assuré par la diffusion de la plastocyanine, petite molécule localisée dans la phase aqueuse interne des thylacoïdes. L'étude des cinétiques de réduction du cyt b en présence de concentration non saturante d'inhibiteur du PSII a permis d'estimer la taille des domaines

membranaires fermés, qui incluraient en moyenne 4 centres PSII et 2 complexes cyt b/f. Cette estimation est voisine de celle proposée par P. Joliot et J. Lavergne sur la base d'expériences portant sur la réduction du pool de plastoquinone sous illumination saturante.

L'analyse des cinétiques de réduction du cytochrome b sur des chloroplastes illuminés par des éclairs de courte durée montre que la vitesse des réactions de transfert d'électrons des accepteurs du PSII aux transporteurs du complexe cyt b/f n'est pas limitée par la vitesse de diffusion de la plastoquinone entre ces deux complexes membranaires. Ce résultat suggère que les complexes photochimiques II et cyt b/f pourraient être associés en formant des « supercomplexes » analogues à ceux identifiés chez les bactéries photosynthétiques *Rhodobacter sphaeroides* (voir précédents rapports). Les molécules de quinol produites par la réaction photochimique II seraient piégées dans une poche protéique interne au supercomplexe et directement transférées au site Q_z du complexe cyt b/f.

B) Hétérogénéité des centres du Photosystème II (J. LAVERGNE)

De nombreuses indications cinétiques suggèrent une hétérogénéité des centres PS II. Outre la majorité de centres « normaux », situés dans les régions accolées des membranes, dotés d'une « grande antenne » de 250-300 chlorophylles par centre et effectuant une rotation photochimique rapide (réoxydation de l'accepteur quinonique primaire Q_A par la quinone secondaire Q_B en moins d'une milliseconde), interviennent également des populations minoritaires différant par certaines de ces caractéristiques. Pour plusieurs auteurs, on aurait en fait une seule population minoritaire, celle des centres situés dans les régions non accolées, dotés d'une petite antenne et incapables d'effectuer un transfert rapide entre Q_A et Q_B . Il a été proposé que cette population représenterait une étape dans le cycle de réparation associé à la photo-inhibition des centres normaux. Le réexamen de ces questions par J. Lavergne amène à rejeter cette vision simplificatrice et à distinguer entre plusieurs populations minoritaires distinctes.

1 — Centres inactifs. On désigne par ce terme les centres (de l'ordre de 15 % du PSII total) dont le transfert d'électron vers Q_B est bloqué. L'analyse du spectre résultant de l'illumination de ces centres révèle une séparation de charges $S_1Q_A \rightarrow S_2Q_A^-$ semblable à celle qui intervient sur des centres « normaux » bloqués par addition d'un inhibiteur, et de même, la réouverture du centre s'effectue par recombinaison inverse en quelques secondes. Ces expériences confirment donc une anomalie fonctionnelle portant sur la quinone secondaire Q_B et la présence d'un système donneur apparemment normalement équipé du système de dégagement d'oxygène. L'étude de l'efficacité photochimique de ces centres a permis à J. Lavergne de conclure qu'ils étaient

alimentés en énergie d'excitation par une antenne chlorophyllienne de taille tout à fait similaire à celle de la majorité des PSII. Ce résultat, renforcé par d'autres indications, permet d'exclure que les centres inactifs soient spécifiquement associés aux régions stromales et dotés d'une petite antenne.

2 — Centres PSII des régions stromales (en collaboration avec R. Bassi). Le travail a consisté à étudier les cinétiques de variation du rendement de fluorescence (reflétant l'état rédox de Q_A) sur des préparations de fractions membranaires stromales obtenues avec un haut degré de pureté par R. Bassi (Université de Padoue) qui en a effectué la caractérisation biochimique. Il s'avère que les centres PSII du stroma (qui représentent une fraction de l'ordre de 10 % du PSII total) présentent une vitesse de transfert $Q_A \rightarrow Q_B$ nettement ralentie par rapport aux centres granaires (d'un facteur 100) mais restent tout à fait distincts des centres inactifs où le blocage est quasi total, et participent à l'émission d'oxygène et à la réduction du pool de quinones. D'autre part, leur spectre de sensibilité aux inhibiteurs ou accepteurs exogènes est complètement différent de celui des centres normaux.

C) Transfert d'électrons et libération de protons dans le système de dégagement d'oxygène (M. BLANCHARD-DESCE, F. RAPPAPORT, J. LAVERGNE)

On sait que le processus de photolyse de l'eau par le centre PSII fait intervenir quatre étapes successives d'oxydation parcourant les états $S_0 \dots S_4$ du cycle de Kok. Les travaux des années précédentes avaient consisté à établir les spectres des changements d'absorption associés à ces transitions, puis à déterminer les stoechiométries des libérations de protons intervenant à chaque étape. Ces coefficients stoechiométriques ne sont en général pas entiers et leur dépendance en fonction du pH a été décrite par un modèle impliquant 4 groupes protonables dont le pK est modulé par l'état d'oxydation du système. Le développement actuel de ce travail porte sur les aspects cinétiques : d'une part, vitesses du transfert d'électron entre le donneur secondaire Y_z (la tyrosine oxydée par la chlorophylle photoactive du centre PSII) et le système de stockage de charges (le cluster de manganèses pour la plupart des transitions et, peut-être, un autre transporteur pour l'une d'entre elles) ; d'autre part, vitesses des libérations de protons.

L'analyse des vitesses de déprotonation à partir de changements d'absorption d'indicateurs colorés hydrophiles conduit à des cinétiques lentes, qui ne traduisent manifestement pas directement les événements intervenant au niveau du centre catalytique, mais reflètent des étapes de diffusion lente dues à des tampons membranaires ou à des barrières structurales. Aussi une autre approche a été mise en œuvre, utilisant la réponse d'une sonde endogène sensible aux effets électrostatiques locaux. L'oxydation du donneur intermédiaire Y_z d'une part, l'état électrostatique du système de stockage de charges

d'autre part, modulent un déplacement électrochromique du spectre d'absorption d'une chlorophylle que l'on peut suivre commodément par les changements d'absorption dans la bande bleue. La sonde répond avec une plus grande sensibilité à la présence d'une charge sur Y_z que sur les manganèses, ce qui reflète probablement l'arrangement géométrique du système. Lorsque la charge est stabilisée sur le donneur terminal (manganèse), le sens et l'amplitude de la réponse sont corrélés au bilan électrostatique global du système, qui pour chaque transition implique le départ d'un électron et d'une quantité de protons dépendant de la transition considérée (et du pH). La cinétique déclenchée par un éclair court reflète donc deux types d'événements : l'éloignement de la charge par rapport à la sonde correspondant à la re-réduction de Y_z et, d'autre part, le départ de protons.

Pour pouvoir interpréter cet indicateur mixte, il était nécessaire d'effectuer parallèlement une mesure des changements d'absorption UV spécifiquement associés au transfert d'électron vers Y_z . Le premier bilan des résultats obtenus pour cette comparaison des cinétiques $Y_z^+S_i \rightarrow Y_zS_{i+1}$ dans la région UV et pour la réponse électrochromique apporte deux résultats nouveaux. D'une part, la cinétique de transfert d'électron dans la transition $Y_z^+S_0 \rightarrow Y_zS_1$ présente un $t_{1/2}$ global d'environ 400 μs , alors que les données de la littérature indiquaient une vitesse 10 fois plus rapide (mesurée à partir d'un spectre erroné pour cette transition). D'autre part, pour la transition finale $Y_z^+S_3 \rightarrow (S_4 \rightarrow) Y_zS_0 (+ O_2)$, le transfert d'électron est monophasique, avec un $t_{1/2}$ de 1,2 ms, en accord avec les résultats de la littérature et confirmant la simultanéité entre la réduction de Y_z^+ et la formation de S_0 accompagnant la libération d'oxygène (pas d'intermédiaire S_4 cinétiquement décelable). En revanche, la cinétique électrochromique est biphasique : on retrouve la phase lente de $t_{1/2} \approx 1,2$ ms, mais une phase rapide $t_{1/2} \approx 45 \mu s$ intervient également et concerne 40 % de l'amplitude totale. Il est clair dans ce cas que cette phase rapide traduit une expulsion de proton (ou fixation de OH^-) provoquée par l'oxydation de Y_z et précédant le transfert d'électron. Ce résultat est important car il donne la première indication d'une étape intermédiaire dans la réaction globale $Y_z^+S_3 (+ 2 H_2O) \rightarrow Y_zS_0 (+ O_2)$.

D) *Application de la spectroscopie photoacoustique à l'étude de la conversion d'énergie dans la photosynthèse* (P. JOLIOT, D. BÉAL, G. LABEYRIE et R. DELOSME)

P. Joliot et D. Béal ont récemment mis au point une technique de mesure des échanges d'énergie associés aux réactions photochimiques. Fondée sur le principe de la spectroscopie photoacoustique, elle permet de mesurer avec une grande sensibilité les variations de volume induites par l'absorption d'un éclair laser dans une suspension de matériel photosynthétique. Ces variations de volume produisent une onde de pression, qui est détectée par une céramique

piézoélectrique. Le signal acoustique amplifié est intégré numériquement sur une durée de 1 μ s après l'éclair.

Le signal photoacoustique est la somme d'une composante thermique (conversion en chaleur d'une fraction plus ou moins grande de l'énergie lumineuse) et d'une composante conformationnelle (électrostriction au voisinage des radicaux chargés produits par la photochimie). De la comparaison des signaux photoacoustiques émis dans un échantillon actif et dans un échantillon inactif, on peut déduire le rendement énergétique de la séparation de charges transmembranaire.

Une des applications principales de la méthode consiste à mesurer les variations spectrales du rendement quantique. G. Labeyrie, puis R. Delosme, ont étudié la dépendance spectrale du rendement quantique dans divers systèmes photosynthétiques : préparations de photosystème I purifié, chloroplastes isolés, et diverses souches d'algues vertes unicellulaires. Dans la région spectrale explorée (630 à 705 nm), le rendement quantique du photosystème I purifié est indépendant de la longueur d'onde de l'éclair. Ce résultat est une bonne vérification de la validité de la méthode employée. Dans les chloroplastes isolés et les algues dont le photosystème II est inactif et le photosystème I actif, le spectre du rendement quantique fait apparaître une profonde dépression dans la région d'absorption de l'antenne du PSII. Dans ce cas, la méthode dose la proportion de centres réactionnels actifs et inactifs. Mais elle permet aussi de mesurer l'efficacité des transferts d'excitation entre les différents types d'antennes et les différents types de centres, et d'observer les transitions entre l'état 1 (antenne PSII connectée aux centres PSII) et l'état 2 (antenne PSII partiellement connectée aux centres PSI). La transition de l'état 1 vers l'état 2 se traduit par un changement substantiel du spectre (dans l'exemple ci-dessus, comblement de la dépression du rendement quantique dans la zone d'absorption de l'antenne PSII), preuve qu'une fraction notable de l'antenne PSII se déconnecte alors des centres PSII pour venir alimenter les centres PSI. Au vu de ces premiers résultats, la technique photoacoustique récemment mise au point apparaît d'ores et déjà comme un outil biophysique précieux pour étudier la régulation des transferts d'énergie dans la membrane photosynthétique.

E) Transfert d'électrons dans les bactéries *Heliobacterium* (W. NITSCHKE)

Les bactéries vertes du genre *Heliobacterium* représentent une classe récemment découverte de bactéries anaérobies sur lesquelles on ne dispose que de peu d'informations structurales et fonctionnelles. Ces bactéries se développent dans des conditions très fortement réductrices et comportent des centres réactionnels présentant de fortes analogies avec le Photosystème I des chloroplastes. Les réactions de transfert d'électrons intervenant entre le donneur

primaire P_{798} et les donneurs secondaires ont été étudiées lors de l'illumination des bactéries par des éclairs laser saturants de courte durée ($< 1 \mu s$). Dans le cas de cellules vivantes en bon état physiologique, une réduction rapide du donneur primaire associée à l'oxydation d'un cytochrome de type c est observée dans un domaine de temps de l'ordre de la μs . Ce cytochrome est inclus dans une protéine portant 4 hèmes de type c et irréversiblement associée au centre réactionnel. Les centres réactionnels d'*Heliobacterium* présentent ainsi de fortes analogies avec les centres réactionnels d'autres espèces bactériennes, telles que *Rhodospseudomonas viridis*, dont les centres ont été cristallisés par H. Michel et collaborateurs. Toute tentative d'isolement des membranes ou *a fortiori*, de solubilisation des centres, s'accompagne d'une dissociation de la protéine tétrahème et d'une perte corrélée de la phase de réduction rapide du donneur primaire. Cette instabilité du complexe formé par les centres et la protéine tétrahème rend compte des résultats contradictoires publiés dans ce domaine et justifie le choix de cellules vivantes comme matériel d'étude.

Le résultat le plus original obtenu par W. Nitschke porte sur la mise en évidence d'un complexe cyt b/f chez *Heliobacterium*. Jusqu'ici, le complexe cyt b/f n'avait été identifié que chez les organismes photosynthétiques oxygéniques. Sur la base de mesures spectroscopiques, W. Nitschke a pu identifier une chaîne de transfert cyclique d'électrons, formée par les centres réactionnels et les complexes cyt b/f et dont le fonctionnement conduit à la formation d'un gradient électrochimique de protons, l'énergie correspondante étant ultérieurement convertie en énergie chimique par synthèse d'ATP. Le complexe cyt b/f d'*Heliobacterium* a été caractérisé sur le plan structural et fonctionnel. Les potentiels redox de demi-réduction des différents transporteurs de ce complexe ont été déterminés par spectroscopie optique et par résonance paramagnétique électronique. Les valeurs de ces potentiels sont très largement décalées vers des valeurs négatives par rapport à celles mesurées dans le complexe cyt b/f des organismes oxygéniques. Il s'agit probablement là d'une adaptation aux conditions particulièrement réductrices, caractéristiques de l'environnement de ces bactéries. La comparaison des structures primaires des deux types de complexes cyt b/f devrait permettre de caractériser les paramètres structuraux contrôlant la valeur des potentiels redox de cofacteurs associés à des protéines.

Les premières données structurales et fonctionnelles disponibles montrent que *Heliobacterium* est un sujet d'étude privilégié. Cette espèce représente un chaînon essentiel dans l'évolution des appareils photosynthétiques. On peut imaginer qu'une fusion entre des bactéries pourpres dont les centres photochimiques sont proches des centres du Photosystème II et de bactéries vertes du type *Heliobacterium* a été à l'origine des premières bactéries réalisant la photosynthèse oxygénique.

II. — STRUCTURE ET REPLIEMENT DES PROTÉINES MEMBRANAIRES INTÉGRALES

A) *Structure de la bactériorhodopsine* [J.-L. POPOT, en collaboration avec F. SAMATEY et G. ZACCAÏ (Institut Laue Langevin, Grenoble), C. ETCHEBEST et R. LAVERY (IBPC, Service de Biochimie Théorique) et P. TUFFÉRY (IBPC, sur contrat joint R. LAVERY/J.-L. POPOT)]

L'étude structurale de la bactériorhodopsine (BR) s'est poursuivie sur deux plans : 1) raffinement de la structure par diffraction des neutrons (F. Samatey ; collaboration avec G. Zaccaï et C. Etchebest) ; 2) mise au point de programmes de modélisation des faisceaux d'hélices α transmembranaires (P. Tufféry ; collaboration avec R. Lavery). Les deux programmes sont liés, l'étude expérimentale fine de l'arrangement rotationnel des hélices permettant d'apprécier le degré de fiabilité des prédictions de la modélisation.

Diffraction des neutrons

L'étude cristallographique par diffraction des neutrons a pour but de préciser la position rotationnelle de 5 des 7 hélices α transmembranaires de la BR (hélices C à G). La position des deux premières hélices, A et B, a été établie par cette approche lors d'un travail précédent (Popot *et al.*, 1989) et exactement confirmée par le travail ultérieur de microscopie et cristallographie électroniques de R. Henderson et collaborateurs, publié en 1990. Les seules observations directes actuellement disponibles concernant les hélices C à G proviennent de cette dernière étude. La résolution de la carte de densité électronique établie par Henderson et coll. 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. Dans le cas de l'hélice D, qui n'en contient pas, l'orientation choisie est essentiellement basée sur des considérations fonctionnelles, et donc assez incertaine.

L'étude par diffraction des neutrons a porté sur les clichés de diffraction de trois échantillons sélectivement deutérés dans certaines classes de résidus ; le cas échéant, cette deutération est de plus limitée à certaines régions de la séquence. Comme précédemment, les données ont été analysées en comparant les intensités observées des pics de diffraction aux intensités théoriques calculées pour différentes hypothèses concernant la position rotationnelle des hélices transmembranaires. Pour chaque hélice, y compris pour l'hélice D, le meilleur ajustement des données de diffraction est obtenu pour des positions ne s'écartant pas de plus de 20° de celles du modèle de Henderson et coll. Cette analyse affermit et précise la base structurale des modèles proposés pour expliquer le pompage des protons par la BR. Elle fournit par ailleurs un

point de référence solide pour l'évaluation des performances des programmes de modélisation.

Modélisation

La prédiction *ab initio* de la structure atomique d'une protéine membranaire intégrale est un problème actuellement non résolu. Pour les protéines dont la région transmembranaire est constituée d'un assemblage d'hélices α hydrophobes, probablement les plus nombreuses, on peut schématiser ainsi 6 étapes qui permettraient en principe de passer d'une séquence à une structure atomique :

- 1) identifier les segments de séquence qui forment des hélices α transmembranaires (topologie transmembranaire) ;
- 2) déterminer la face que chacune de ces hélices tourne vers l'intérieur du faisceau d'hélices ;
- 3) déterminer l'arrangement des hélices (voisinages) ;
- 4) déterminer les angles et distances interaxes ;
- 5) déterminer la position exacte des C^α : organisation rotationnelle précise des hélices, registre, déformations du brin polypeptidique)
- 6) positionner les chaînes latérales.

L'étape 1 peut être abordée par une analyse de la distribution des résidus hydrophobes dans la séquence, et il existe différentes méthodes biochimiques ou génétiques pour valider les topologies proposées. L'examen de l'amphipathie latérale et de la mutabilité différentielle des faces d'hélices permet souvent d'identifier la face que chaque hélice tourne vers le cœur du faisceau (étape 2). En l'absence de contraintes spécifiques ou d'informations structurales, les étapes 3 à 5 sont actuellement hors de portée. L'étape 6 (positionner les chaînes latérales connaissant la position exacte des C^α) peut être résolue dans le cas de petites protéines.

Le travail de modélisation entrepris sur la BR a pour but d'aborder les différents problèmes posés par l'étape 5. Dans un premier temps, on a examiné la possibilité de prédire l'arrangement rotationnel relatif d'hélices α dont on connaîtrait la séquence, la position des axes, le registre et les déformations. On a donc effacé de la structure cristallographique de la BR toute l'information concernant la conformation des chaînes latérales et l'arrangement rotationnel des hélices. L'objectif recherché est de retrouver par le calcul l'orientation des hélices, en recherchant la combinaison de positions rotationnelles qui permet les interactions les plus favorables entre chaînes latérales.

Des premiers résultats de ce travail, on peut tirer 3 conclusions : 1) pour chacune des onze paires d'hélices α considérées, il existe une solution cor-

recte (énergie d'interaction basse) pour des positions rotationnelles proches de la position donnée par les études cristallographiques ; 2) cette solution n'est pas unique ; 3) toutefois, lorsque les contraintes résultant de tous les voisinages entre hélices sont prises en compte simultanément, une solution unique émerge, pour laquelle 5 des 7 hélices sont à leur position cristallographique, tandis que les 2 autres s'en écartent de seulement 20°, ce qui est dans la marge d'erreur expérimentale (Tufféry *et al.*, 1992). Le développement méthodologique de cette approche est en cours, ainsi que l'examen de son application à la famille de la BR et aux mutants de BR.

B) Purification et étude structurale du complexe cytochrome b_6f de *Chlamydomonas reinhardtii* (Y. PIERRE, C. DE VITRY et J.-L. POPOT)

Y. Pierre et J.-L. Popot ont mis au point un protocole permettant la préparation de cytochrome b_6f hautement purifié. Le complexe b_6f purifié catalyse le transfert d'électrons entre un donneur, le décylplastoquinol, et un accepteur, le cytochrome *c* oxydé. Les préparations comportent 5 sous-unités (cytochrome *f*, cytochrome b_6 , protéine de Rieske, sous-unité IV, protéine codée par le gène *petG*), dont la stoechiométrie (1 : 1 : 1 : 1 : 1 ou 1 : 1 : 1 : 1 : 2) est en voie d'établissement. Ce travail devrait permettre d'établir définitivement la composition du complexe b_6f de *C. reinhardtii*, qui est controversée.

Des anticorps anti-peptides ont été produits contre les sous-unités *f*, Rieske, IV et *petG*, afin d'établir l'identité de *petG* et en vue d'expériences de pontage en milieu hydrophobe destinées à établir l'arrangement des sous-unités et des hélices α transmembranaires les unes par rapport aux autres.

Des séquences N-terminales ou internes ont été déterminées pour le cytochrome *f* et pour la protéine de Rieske. Ces séquences définissent les sites de maturation de ces deux protéines. Après synthèse de sondes oligonucléotidiques basées sur ces données de séquence protéique, ainsi que sur des segments de séquence hautement conservés chez les protéines de Rieske d'autres organismes, C. de Vitry a pu amplifier par PCR un fragment de l'ADN correspondant, qu'elle a ensuite utilisé comme sonde. Le séquençage du gène (nucléaire) de la protéine de Rieske est en cours.

Le complexe cytochrome b_6f de *C. reinhardtii* s'inactive facilement lors de sa purification. Cette inactivation est liée à la délipidation du complexe et, au moins dans certains cas, à la dissociation de la protéine de Rieske qui semble en être une conséquence. Une caractérisation plus poussée des mécanismes d'inactivation (et de réactivation par les lipides) est en cours. A ce problème se rattache celui du mode d'association de la protéine de Rieske au reste du complexe. Comme indiqué ci-dessus, le N-terminus de la protéine de Rieske a été établi par séquençage de la protéine mature. La séquence de cette région,

déduite de la séquence codante, contient un segment susceptible de former une hélice transmembranaire hydrophobe. Toutefois, l'hydrophobicité de l'hélice prédite est moyenne, ce qui ne permet pas de conclure avec certitude à sa position transmembranaire. Des expériences préliminaires indiquent, par ailleurs, que la protéine de Rieske se détache du complexe en présence d'agents chaotropes et se comporte en solution non-détergente d'une façon caractéristique d'une sous-unité périphérique. Ces expériences seront poursuivies. L'établissement de la séquence d'adressage par séquençage du gène devrait également contribuer à résoudre cette question (présence ou non d'un signal de transfert dans le lumen du thylacoïde).

C) Divers

A. Atteia a poursuivi son travail d'analyse des complexes mitochondriaux de *C. reinhardtii* (NADH-Q oxydoréductase, complexe bc_1 , cytochrome *c* oxydase, ATP synthase). J.-L. Popot, C. de Vitry et A. Atteia ont examiné dans un article de revue le repliement et l'assemblage des protéines membranaires intégrales dans les différents compartiments cellulaires (Popot *et al.*, 1992). J.-L. Popot, A. Dautigny et collègues ont fait le point sur l'analyse génétique des mutations du protéolipide majeur de la myéline (PLP) responsables du syndrome de Pelizaeus-Merzbacher et sur la modélisation de leurs conséquences structurales (Pham-Dinh *et al.*, 1992).

III. — BIOGÈNESE ET INTÉGRATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES DU THYLACOÏDE

A) *Etude de l'assemblage partiel des complexes protéiques PSII dans les membranes du thylacoïde* [F.-A. WOLLMAN, J. GIRARD-BASCOU et F. LAQUERRIÈRE en collaboration avec M. RECOUVREUR et J. OLIVE (Institut Jacques Monod, Paris)]

Les centres PSII sont principalement constitués de l'association de deux sous-unités, D1 et D2, portant les cofacteurs des séparations de charges primaires de la photosynthèse et de deux sous-unités, P5 et P6, portant un petit nombre de chlorophylles « antenne ». Lorsque les centres PSII sont convenablement assemblés, ils forment de nombreuses particules visibles dans les membranes cryofracturées des thylacoïdes. Ayant antérieurement mis en évidence un assemblage partiel des sous-unités du centre PSII chez des mutants de l'algue verte unicellulaire *C. reinhardtii* dépourvus d'activité PSII (de Vitry *et al.*, J. Cell Biol.), F.-A. Wollman et collaborateurs ont recherché l'existence éventuelle de structures particulières repérables dans les membranes cryofracturées de ces mutants. A cette fin, ils ont constitué un ensemble de souches simple mutante, double mutante et triple mutante

permettant une étude comparative des membranes cryofracturées. Les souches simple mutantes utilisées contiennent, soit 10 % d'un sous-ensemble du PSII, D1/D2/P5, et pas d'antenne cœur P6, soit 10 % de P6 et pas complexe D1/D2/P5. Les triple et double mutants sont soit totalement dépourvus de sous-unités PSII et de tout complexe cyt b_6/f , soit dépourvus du seul PSII, soit dépourvus d'un sous-ensemble PSII (P6 ou D1/D2/P5) et du complexe cyt b_6/f .

Cette étude a montré que les complexes PSII partiellement assemblés forment effectivement des particules sur les faces EF des thylacoïdes. Ces hémicomplexes sont pour une large part associés aux complexes cyt b_6/f . En l'absence d'assemblage intégral du PSII (P6/D1/D2/P5), les complexes cyt b_6/f seraient requis pour la translocation de P6 et de D1/D2/P5 des régions non accolées vers les régions accolées des membranes des thylacoïdes.

B) *Etude de la gamétogénèse chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii* [L. BULTÉ, R. KURAS et F.-A. WOLLMAN en collaboration avec O. VALLON et J. OLIVE (Institut Jacques Monod, Paris)]

Ces chercheurs ont montré antérieurement que l'inhibition de l'activité photosynthétique qui accompagne la différenciation des cellules végétatives en gamètes (obtenues chez *C. reinhardtii* par une carence en azote) provient d'une déstabilisation sélective du complexe cyt b_6/f présent dans les thylacoïdes des gamètes. Un nouveau polypeptide $M\alpha$ de 63kDa apparaît au cours de la gamétogénèse à mesure que le complexe cyt b_6/f est détruit. Ce polypeptide, soluble, est reconnu par des anticorps dirigés contre le cytochrome f, l'une des sous-unités transmembranaires majeures du complexe cyt b_6/f . Lorsque les gamètes sont placées dans des conditions qui protègent le cyt b_6/f de cette déstabilisation, par exemple lors d'une inhibition de la production d'ATP couplée au transfert d'électrons dans la mitochondrie, le polypeptide $M\alpha$ n'est pas formé. L'hypothèse d'une interconversion cytochrome f/ $M\alpha$ a donc été étudiée. Des mutants n'accumulant pas le complexe cyt b_6/f à l'état végétatif ont été analysés pour leur capacité à produire $M\alpha$. Les six souches étudiées ont toutes la faculté de produire $M\alpha$ à l'état de gamète mais l'une d'elles, totalement bloquée dans l'expression du cytochrome f, produit des quantités très réduites de $M\alpha$. L'ambiguïté de ce résultat a conduit ces chercheurs à construire une souche délétée dans le gène *petA* codant le cytochrome f. Cette souche a été obtenue par transformation du génome chloroplastique par la méthode « biolistique » en insérant en lieu et place de la délétion de *petA* un marqueur de sélection contenant le gène *aadA* de *E. coli* conférant une résistance à la spectinomycine. Tous les transformants obtenus, dépourvus de synthèse de cytochrome f, se sont révélés capables de produire, à l'état de gamète, des quantités de $M\alpha$ comparables à la souche sauvage. Cette observation a permis d'exclure toute relation moléculaire directe entre $M\alpha$ et le cytochrome f.

L'analyse de la séquence N-terminale du polypeptide M α a montré la présence d'un pentapeptide, EKVGL, également présent au milieu de la séquence codant le cytochrome f. Un peptide synthétique contenant ce pentapeptide s'est révélé capable d'une inhibition compétitive de la reconnaissance de M α par les anticorps polyclonaux dirigés contre le cytochrome f. Cette expérience a donc fourni l'explication de la parenté immunologique antérieurement observée entre les deux protéines.

La deuxième étape de ce travail a consisté à comprendre la nature de ce polypeptide M α qui est un des principaux polypeptides spécifiquement exprimé par les gamètes. Il s'agit d'un polypeptide codé par le génome nucléaire qui fait partie d'un complexe protéique M de 800 kDa à l'état natif, comprenant 5 à 9 sous-unités M α associées à une sous-unité de plus haut poids moléculaire MB. Les deux sous-unités sont glycosylées, ce qui explique que les anticorps polyclonaux préparés contre l'une d'elles présentent un même spectre de réactions croisées. M s'accumule dans le périplasme des gamètes et est relargué dans le milieu extracellulaire au cours du croisement de gamètes de signe sexuel opposé. La fonction de cette protéine dans le processus de gamétogénèse est actuellement à l'étude.

C) Contrôle par le génome nucléaire de l'expression du génome chloroplastique : cas des mutations nucléaires F34 et F35 qui contrôlent respectivement l'expression des gènes chloroplastiques psbC et psbA (J. GIRARD-BASCOU, Y. PIERRE et D. DRAPIER)

L'action concertée des deux génomes nucléaires et chloroplastiques pour la biosynthèse de l'appareil photosynthétique est démontrée par la mise en évidence de mutations nucléaires altérant spécifiquement la synthèse d'un produit du génome chloroplastique. Un petit nombre de telles mutations a été décrit jusqu'à maintenant. Parmi celles-ci, la mutation F34 a fait l'objet d'une controverse. Plusieurs études de notre laboratoire avaient montré que la mutation F34 entraîne l'absence de synthèse du polypeptide 6, l'apoprotéine du complexe chlorophylle-protéine CPIV qui fait partie du photosystème II. Un autre laboratoire a publié que cette mutation entraîne l'absence de synthèse de D1, une sous-unité du centre réactionnel du photosystème II et n'altère que faiblement la synthèse de P6 (Jensen et coll. 1986). Une étude génétique et biochimique des deux souches utilisées par les deux laboratoires a été reprise par J. Girard-Bascou, Y. Pierre et D. Drapier. L'étude génétique a montré que la souche conservée dans notre laboratoire est simple mutante alors que la souche utilisée par Jensen et coll. porte 3 mutations. Les deux souches portent cependant une mutation en commun qui est vraisemblablement la mutation F34. La souche utilisée par Jensen et coll. porte également un suppresseur partiel de la mutation F34 et une mutation PSII dans un autre gène que F34 qui a été appelée F35. Cette constitution génétique laisse

supposer que la souche F34 sur laquelle Jensen et coll. ont travaillé à spontanément réversé par suppression et qu'en voulant resélectionner une souche déficiente PSII, ils ont sélectionné une nouvelle mutation PSII. Cet exemple montre l'instabilité de certaines mutations et la difficulté de les conserver.

L'étude biochimique sur des souches simples mutantes F34 et F35 a confirmé l'effet de la mutation F34 spécifiquement sur P6 et a montré un effet de la mutation F35 principalement sur la synthèse de D1 et partiellement sur P5 et L7. Cet effet pléiotrope de la mutation F35 peut s'expliquer par l'appartenance de ces trois polypeptides à un sous-ensemble du centre réactionnel PSII dont les synthèses et l'assemblage semblent coordonnés. L'étude des ARN messagers des gènes *psbC* et *psbA* dans les souches simples mutantes F34 et F35 a montré que ces ARN se trouvent présents comme dans la souche sauvage. Ces mutations affectent donc des produits du génome nucléaire requis pour l'expression des gènes *psbC* ou *psbA* dans une étape post-transcriptionnelle. La mutation F35 est la première mutation nucléaire décrite affectant la synthèse du produit du gène *psbA*, D1. Son étude pourrait permettre de comprendre la coordination de l'expression du sous-ensemble du centre réactionnel D1, P5 et L7.

PUBLICATIONS

Références de publications citées sous presse dans le rapport de 1991

B. BALDAN, J. GIRARD-BASCOU, F.-A. WOLLAN & J. OLIVE. « Evidence for thylakoid membrane during zygote formation in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *J. Cell. Biol.*, 1991, vol. 14, n° 5, 905-915.

D. PHAM-DINH, J.-L. POPOT, O. BÆSPFLUG-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, 88, 7562-7566.

R. DELOSME. « Electron transfer from cytochrome f to photosystem I in green algae ». *Photosynthesis Research*, 1991, 29, 45-54.

Nouvelles publications

J. LAVERGNE. « Improved UV-visible spectra of the S-transitions in the photosynthetic oxygen-evolving system ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1060, 175-188.

F. RAPPAPORT & J. LAVERGNE. « Proton release during successive oxidation steps of the photosynthetic water oxidation process : stoichiometries and pH dependence ». *Biochemistry*, 1991, 30, 10004-10012.

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

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, 266, n° 25, 16614-16621.

O. VALLON, L. BULTÉ, P. DAINESE, J. OLIVE, R. BASSI & F.A. WOLLMAN. « Lateral redistribution of cytochrome b_6f complexes along thylakoid membranes upon state transitions ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 8262-8266.

M. GOLDSCHMIDT-CLERMONT, Y. CHOQUET, J. GIRARD-BASCOU, F. MICHEL, M. SCHIRMER-RAHIRE & J.D. ROCHAIX. « A small chloroplast RNA may be required for Trans-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Cell*, 1991, 65, 135-143.

F.-A. WOLLMAN. « Proteins in photosynthesis : when molecular genetics extends biophysical knowledge ». Meeting review, The Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus, A Jacques Monod Conference. *The New Biologist*, vol. 3, n° 12 (December), 1991, pp. 1169-1176.

J.-L. POPOT. « L'hélice α transmembranaire considérée comme un domaine de repliement autonome : observations, implications, applications ». Actes du 14^e Colloque de la Société Française de Microbiologie. Conception, Sélection, Production et Analyse des Protéines de Nouvelle Génération », 1991, 185-197.

L. BULTÉ and F.A. WOLLMAN. « Evidence for a selective destabilization of an integral membrane protein, the cytochrome b_6f complex, during gametogenesis ». *Eur. J. Biochem.*, 1992, 204, 327-336.

A. ATTEIA, C. DE VITRY, Y. PIERRE & J.-L. POPOT. « Identification of mitochondrial proteins in membrane preparations from *Chlamydomonas reinhardtii* ». *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 226-234.

D. DRAPIER, J. GIRARD-BASCOU & F.-A. WOLLMAN. « Evidence for nuclear control of the expression of the *atpA* and *atpB* chloroplast genes in *Chlamydomonas* ». *Plant Cell*, 1992, 4, 283-295.

Y. CHOQUET, M. RAHIRE, J. GIRARD-BASCOU, J. ERICKSON & J.-D. ROCHAIX. « A chloroplast gene is required for the light-independent accumulation of chlorophyll in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *EMBO J.*, 1992, vol. 11, n° 5, 1697-1704.

J. GIRARD-BASCOU, Y. PIERRE & D. DRAPIER. « A nuclear mutation affects the synthesis of the chloroplast *psbA* gene production *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Curr. Genet.*, 1992, 22, 47-52.

Publications sous presse

J.-L. POPOT, C. DE VITRY & A. ATTEIA. « Folding and assembly of integral membrane proteins. An introduction ». In : *Membrane protein structure : Experimental approaches* (S.H. White, Ed.), Oxford University Press. Sous presse.

D. PHAM-DINH, J.-L. NUSSBAUM, J.-L. POPOT, O. BESPFLUG-TANGUY, P. LANDRIEU & A. DAUTIGNY. « Mutations du gène codant pour les protéolipides de la myéline (PLP et DM20) et dysmyélinisations liées au chromosome X ». *Médecine/Sciences*. Sous presse.

P. TUFFERY, J.-L. POPOT & R. LAVERY. « Modelling bundles of transmembranes α -hélices ». Proc. Vth International Conference on Retinal proteins. Sous presse.

F. SAMATEY, J.-L. POPOT, C. ETCHEBEST & G. ZACCAÏ. « Rotational orientation of transmembrane α -helices in bacteriorhodopsin studied by neutron diffraction ». Proc. Vth International Conference on Retinal proteins ». Sous presse.

P. JOLIOT, J. LAVERGNE & D. BÉAL. « Plastoquinone compartmentation in chloroplasts. I : Evidence for domains with different rates of photoreduction ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, sous presse.

J. LAVERGNE, J.-P. BOUCHAUD & P. JOLIOT. « Plastoquinone compartmentation in chloroplasts. II : Theoretical aspects ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1992. Sous presse.

P. JOLIOT & A. JOLIOT. « Electron transfer between photosystem II and the cytochrome b/f complex : mechanistic and structural implications ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1992. Sous presse.

COLLOQUES JUILLET 1991 - JUIN 1992

FEBS Advance Course « Use of detergents in the investigation of membrane proteins ». Orsay, 1^{er}-5 juillet 1991. J.-L. POPOT, A. ATTEIA. Conférence de J.-L. POPOT.

VIIth International Symposium on photosynthetic prokaryotes. Amherst, Massachussets, 21-26 juillet 1991. Conférence de W. NITSCHKE.

Gordon Conference « Photosynthesis, biophysical aspects ». New Hampshire, USA, 29 juillet-2 août 1992. P. JOLIOT, A. JOLIOT, J. LAVERGNE, W. NITSCHKE, F.-A. WOLLMAN. Conférences de J. LAVERGNE et de W. NITSCHKE.

Colloque « The Maltose System : Molecular genetics and cell biology ». Constance, 1^{er}-6 septembre 1992. Conférence de J.-L. POPOT.

The 37th Harden Conference « The molecular & structural basis of regulation in photosynthesis ». Ashford, Grande-Bretagne, 15-20 septembre 1991. Conférence de F.-A. WOLLMAN.

Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire « Systèmes membranaires et bioénergétiques ». Strasbourg, 16-18 septembre 1991. Conférence de J.-L. POPOT.

Congrès SFC 91. Strasbourg, 17-20 septembre 1991. Conférence de J.-L. POPOT.

Satellite Conference « Molecular aspects of photosynthesis ». Tempe, Arizona, USA, 3-5 octobre 1991. Conférence de F.-A. WOLLMAN.

Journées du Programme Environnement, Saint-Malo, 8-9 octobre 1991.

Troisièmes Rencontres de Blois « Frontiers of Life ». 14-19 octobre 1991. Conférence de P. JOLIOT.

Grand Colloque de Prospective « Systèmes moléculaires organisés ». Bordeaux, 23-25 octobre 1991. Conférences de P. JOLIOT et de J.-L. POPOT.

Journées de Phycologie. Roscoff, 5-7 novembre 1991. Conférence de Y. CHOQUET.

Workshop ESF « Biophysics of Photosynthesis ». Paris, CEA, 13-14 février 1992. Conférences de P. JOLIOT et de J. LAVERGNE.

Colloque « Nouveaux Matériaux tensiactifs ». Doucy, 29 mars-4 avril 1992. Conférence de J.-L. POPOT.

Colloque Pharmacia « Clonage et Expression dans les Cellules Eucaryotes ». Saint-Quentin-en-Yvelines, 19-20 mai 1992. Conférence de J.-L. POPOT.

The Fifth International Conference on the cell and molecular biology of Chlamydomonas. Pacific Grove, California, USA, 26-31 mai 1992. A. ATTEIA, Pierre BENNOUN, Jacqueline GIRARD-BASCOU, F.-A. WOLLMAN. Conférences de A. ATTEIA, de P. BENNOUN et de F.-A. WOLLMAN.

Colloque Organibio. Paris, 3 juin 1992. Conférence de J.-L. POPOT.

Huitième Conférence Internationale sur les Phénomènes Ultra-rapides. Antibes-Juan-les-Pins, 8-12 juin 1992. P. JOLIOT, F. RAPPAPORT. Présidence d'une section par P. JOLIOT.