Bioénergétique cellulaire

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

Le cours de cette année a été consacré à l'étude de l'évolution des appareils membranaires convertisseurs d'énergie.

La première partie du cours a porté sur l'analyse des hypothèses concernant l'apparition des différents métabolismes énergétiques au cours de l'histoire de notre planète et sur les interactions entre ces différents métabolismes et l'évolution de l'environnement planétaire.

Les géophysiciens s'accordent généralement pour supposer qu'aux stades les plus précoces de l'histoire de la terre, l'atmosphère formée par les processus de dégazement de la croûte terrestre était totalement dépourvue d'oxygène moléculaire. D'une manière générale, l'environnement — qu'il s'agisse de l'atmosphère ou de l'hydrosphère — était extrêmement réducteur, excluant toute possibilité de respiration aérobie. Une hypothèse souvent formulée consiste à supposer que l'alimentation en énergie des premiers êtres vivants était assurée par la fermentation de produits hydrocarbonés synthétisés par des processus photochimiques abiotiques. Cette hypothèse rencontre cependant de nombreuses difficultés. En premier lieu, le couplage indispensable entre fermentation et synthèse d'adénosine triphosphate (ATP), seule source d'énergie directement utilisable par les êtres vivants, impose l'intervention d'un appareil enzymatique très complexe catalysant au moins 5 à 6 étapes. La fermentation n'apparaît donc pas comme un processus primitif. D'autre part, les processus de fermentations, dont le rendement énergétique est médiocre, imposent la consommation de quantités considérables de métabolites fermentescibles, ce qui aurait dû conduire à leur épuisement rapide.

Mis à part la fermentation, les autres processus générateurs d'énergie font appel à des appareils membranaires convertisseurs d'énergie. Ces appareils réalisent un couplage de type chimiosmotique entre des réactions de transfert d'électrons et la formation d'un gradient électrochimique de protons converti

ultérieurement en énergie chimique au niveau d'une ATPsynthétase membranaire. On peut envisager en premier lieu l'intervention de processus de respiration anaérobie. Dans ce cas, le milieu extracellulaire doit contenir un mélange de composés donneurs et accepteurs d'électrons. Ces composés ne représenteront une source d'énergie utilisable que dans la mesure où le potentiel redox du donneur d'électrons est largement inférieur à celui de l'accepteur. Ceci suppose que le milieu n'est pas en équilibre thermodynamique. L'intervention de réactions photochimiques abiotiques très efficaces serait seule susceptible de maintenir le milieu dans un état de non-équilibre thermodynamique. De plus, comme dans le cas de la fermentation, l'intervention de processus de respiration anaérobie devrait se traduire par un épuisement rapide des substrats donneurs ou accepteurs d'électrons.

L'apparition très précoce de réactions de type photosynthétique, mettant en œuvre la lumière solaire comme source d'énergie renouvelable, reste donc l'hypothèse la plus séduisante. Pierson et Olson proposent un modèle de centres réactionnels primitifs auxquels serait associée une molécule photosensible telle que la protoporphyrine, localisée sur la face externe de la membrane. Cette molécule, excitée par les radiations ultraviolettes très abondantes dans une atmosphère dépourvue d'oxygène, céderait un électron à un accepteur quinonique ou à une protéine fer-soufre localisés à proximité de la face interne de la membrane. La régénération de la forme active des centres photochimiques serait assurée par l'intervention de réducteurs situés dans le milieu externe (fer ferreux, par exemple) et d'un ou plusieurs accepteurs d'électrons intracellulaires. Le flux transmembranaire d'électrons induit par l'illumination assurerait la formation d'un gradient électrochimique de protons ultérieurement converti en ATP. Compte tenu de l'énergie d'un photon ultraviolet (environ 3,5 eV), on peut imaginer que des centres photochimiques présentant un rendement énergétique médiocre, seraient en mesure d'assurer l'alimentation en énergie de cellules primitives. En faveur de l'hypothèse d'une apparition précoce des appareils photosynthétiques, il faut souligner que les formes de vie les plus anciennes qui ont été identifiées correspondent à des bactéries photosynthétiques probablement analogues aux cyanobactéries actuelles. La présence de bactéries photosynthétiques a été déduite de l'étude des stromatolithes, structures dont l'âge remonte à $-$ 3,5 milliards d'années mais cependant analogues à celles formées par des colonies de cyanobactéries modernes. Il semble probable que ces bactéries réalisaient déjà la photolyse de l'eau grâce à un appareil photosynthétique très proche de celui présent dans les algues et les plantes supérieures actuelles. Les appareils photosynthétiques ont donc atteint leur forme ultime d'évolution moins de 400 millions d'années après l'apparition de la vie. On est alors frappé par le décalage de plus de 2 milliards d'années existant entre les débuts de la photosynthèse oxygénique et la période où l'oxygène a commencé à s'accumuler dans l'atmosphère. L'examen des données géochimiques permet cependant d'affir-

mer que pendant ce délai de 2 milliards d'années, une activité photosynthétique intense a profondément modifié les caractéristiques de la croûte terrestre. L'oxygène d'origine biologique a progressivement oxydé l'ensemble des composés réducteurs présents à la surface du globe, parmi lesquels il faut citer les sels ferreux dont l'oxydation a donné naissance à d'immenses dépôts de fer ferrique. Simultanément, des quantités très importantes de carbone se sont accumulées dans l'ensemble des sédiments. L'apparition de la respiration aérobie a suivi de près le développement de la photosynthèse oxygénique. En l'absence d'oxygène atmosphérique, ces chaînes respiratoires ne pouvaient être présentes qu'au sein même des cellules photosynthétiques ou dans des organismes vivant en étroite association avec des organismes photosynthétiques producteurs d'oxygène. L'apparition des cellules eucaryotes il y a environ 2 milliards d'années s'est accompagnée de phénomènes d'endosymbioses qui ont donné naissance aux centrales énergétiques très perfectionnées que représentent les chloroplastes et les mitochondries. Il y a environ 1 milliard d'années, l'épuisement des composés réducteurs a été suivi d'une augmentation brutale de la tension d'oxygène dans l'atmosphère. C'est alors que s'est produit la révolution biologique qui s'est traduite par le développement explosif des êtres multicellulaires.

La seconde partie du cours a porté sur l'analyse comparée des différents appareils membranaires convertisseurs d'énergie. Dans ce domaine, on est frappé par l'extraordinaire diversité des voies de transfert d'électrons présentes dans les différentes espèces bactériennes. Le seul élément commun à ces appareils membranaires est l'intervention d'un couplage de type chimiosmotique entre les processus de transfert d'électrons et de pompage de protons et la présence d'une ATPsynthétase. A cette multiplicité des chaînes de transfert d'électrons correspond une grande diversité de catalyseurs, membranaires ou solubles, qui sont loin d'avoir tous été identifiés. Les enzymes membranaires sont généralement formées par l'association de plusieurs polypeptides souvent porteurs de co-facteurs transporteurs d'électrons parmi lesquels on peut citer les cytochromes, les « clusters » fer-soufre, les quinones et les flavines. Ces polypeptides représentent des modules de base qui sont associés de manières variées pour former les différents complexes transporteurs d'électrons. Ces complexes représentent eux-mêmes des modules qui vont constituer les chaînes respiratoires aérobie ou anaérobie ainsi que les chaînes photosynthétiques. Ces deux niveaux de modularité permettent de constituer à partir d'un nombre limité de structures moléculaires de base les innombrables chaînes réactionnelles susceptibles d'assurer l'alimentation énergétique des cellules dans des environnements variés. L'élaboration des arbres phylogénétiques de ces complexes est une tâche difficile en raison même de leur extrême diversité. Parmi tous les mécanismes cellulaires, les appareils convertisseurs d'énergie sont les plus directement exposés à la pression de sélection lors d'une modification brutale de l'environnement. Il en résulte que les arbres phylogé-

nétiques de molécules ou de complexes intéressant la bioénergétique sont difficiles à concilier avec les arbres fondés sur l'analyse de l'ARN ribosomal 16S, molécule choisie en raison de son exceptionnelle stabilité au cours de l'évolution. Les contradictions entre les différents arbres phylogénétiques ne peuvent être résolues qu'en envisageant l'intervention de transferts latéraux de gènes. Ces processus permettent en effet le transfert en bloc de l'information génétique codant pour les différents polypeptides d'un complexe et parfois même pour plusieurs complexes appartenant à une même chaîne de transfert d'électrons.

La dernière partie du cours a été consacrée à l'analyse phylogénétique de plusieurs complexes membranaires appartenant à différents appareils convertisseurs d'énergie.

L'ATPsynthétase ou ATPase, qui assure la conversion de l'énergie d'un gradient électrochimique de protons en énergie chimique, est une enzyme comportant un secteur catalytique extramembranaire associé à un secteur membranaire constituant le canal à protons. Le domaine extramembranaire organisé d'une manière symétrique est formé par 3 sous-unités catalytiques associées à trois sous-unités régulatrices. Deux types d'ATPases sont présentes au sein des cellules eucaryotes. Les F.ATPases sont localisées dans les organites impliqués dans les processus de conversion d'énergie (chloroplastes et mitochondries) alors que les V.ATPases sont intégrées dans les membranes plasmiques. Les analogies structurales entre les deux types d'ATPase montrent qu'elles dérivent d'un ancêtre commun dont le secteur extramembranaire comportait 6 sous-unités catalytiques identiques. Une duplication de gènes très précoce aurait conduit à la différentiation des unités catalytiques et régulatrices. L'ancêtre commun aurait alors donné naissance aux V.ATPases présentes dans les archébactéries et aux F.ATPases caractéristiques des eubactéries. Des conclusions analogues peuvent être tirées de l'analyse des sous-unités constituant le secteur membranaire. L'examen de l'arbre phylogénétique des ATPases suggère que la lignée bactérienne ayant donné naissance aux cellules eucaryotes comportait des V.ATPases. Différentes eubactéries comportant des F.ATPases ont alors été intégrées dans ces cellules-hôtes par un processus d'endosymbiose en donnant naissance aux chloroplastes et aux mitochondries. Cette hypothèse explique la présence de deux types d'ATPases au sein des cellules eucaryotes.

Les centres réactionnels photosynthétiques représentent une seconde classe de protéines membranaires sur lesquelles on dispose d'un grand nombre d'informations structurales et fonctionnelles. Les appareils photosynthétiques comportent deux types de centres réactionnels d'architecture voisine. Ces deux catégories de centres diffèrent essentiellement par la nature des accepteurs secondaires d'électrons, protéine fer-soufre dans le cas des centres de type I et quinone pour les centres de type II. La plupart des bactéries photosynthéti-

ques ne comportent qu'un type de centres intégrés dans une chaîne cyclique de transfert d'électrons. Dans le cas des cyanobactéries, ces deux types de centres se sont associés pour former les chaînes de transfert d'électrons réalisant la photolyse de l'eau et la réduction du gaz carbonique. Les analogies structurales et fonctionnelles entre centres de types I et II sont suffisantes pour postuler l'existence d'un ancêtre commun et ceci bien que les structures primaires soient essentiellement différentes. L'ancêtre commun était probablement proche du centre primitif imaginé par Pierson et Olson. Ces centres se sont ensuite organisés en homodimères qui ont donné naissance à des hétérodimères à la suite d'un processus de duplication de gènes. Ces hétérodimères possèdent un axe de symétrie et comportent deux chaînes de transfert d'électrons dont généralement une seule est fonctionnelle. Les duplications de gènes conduisant à la structure hétérodimérique ont dû se produire plusieurs fois de manière indépendante au cours de l'évolution, suggérant que cette structure présente un avantage évolutif majeur. Les divergences entre les arbres phylogénétiques des centres réactionnels et les arbres construits à partir de la structure de l'ARN ribosomal 16 S suggèrent l'intervention de plusieurs processus de transferts latéraux intéressant les gènes codant pour les centres réactionnels.

P. J.

SÉMINAIRES

Hervé PHILIPPE, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Université de Paris-Sud. « *Méthodes de construction d'arbres phylogénétiques et évaluation de leur robustesse* ».

André ADOUTTE, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Université de Paris-Sud. « *L'origine des mitochondries et des plastes : apport des phylogénies moléculaires* ».

Jean-Pierre JACQUOT, Laboratoire de Physiologie Végétale Moléculaire, Université de Paris-Sud. « *Le système ferredoxine thioredoxine : un relais du transport d'électrons membranaires pour la régulation d'enzymes stromatiques* ».

Brigitte GONTERO, Institut Jacques Monod, Paris. « *Contribution de complexes multienzymatiques non membranaires à l'organisation du chloroplaste et de la mitochondrie* ».

André VERMEGLIO, C.E. de Cadarache. « *Interactions entre activité photosynthétique, activité respiratoire et dénitrification chez Rhodobacter sphaeroides* ».

Jean-Paul ISSARTEL, CEN de Grenoble. « *La NADH, coenzyme reductase de Rhodobacter capsulatus. Un système modèle du complexe I mitochondrial* ».

Jean-Luc POPOT, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris. « *Assemblage et évolution des domaines transmembranaires. Observations, spéculations* ».

David M. KRAMER. Université d'Illinois, Urbana. « *Towards a unified mechanism for the cytochrome b_6f complex of higher plants* ».

I. — BIOÉNERGÉTIQUE

A) *Cinétiques de transfert d'électrons et de protons dans le système de dégagement d'oxygène* (F. RAPPAPORT, M. BLANCHARD, J. LAVERGNE)

Le système de dégagement d'oxygène est une enzyme à manganèse associée au côté donneur du centre PSII. La réaction d'oxydation de l'eau requiert l'accumulation préalable de quatre équivalents oxydés résultant de quatre rotations photochimiques successives du centre réactionnel. Le système décrit ainsi un cycle parcourant des états de nombre d'oxydation croissant (dénommés $S_0 \ldots S_4$) où le dernier état, S_4 se désactive spontanément vers S_0 de façon concomitante avec la libération d'oxygène moléculaire. Les recherches de J. Lavergne et de ses collaborateurs portent sur les mécanismes intervenant lors de chacune des quatre étapes d'oxydation (transitions « $S_i \rightarrow S_{i+1}$ ») étudiés par des techniques de changements d'absorption UV-visible. Le travail effectué cette année a consisté à achever l'analyse des cinétiques de transfert d'électrons et de libération de protons intervenant lors de chaque transition à la suite de la réaction photochimique déclenchée de façon synchrone par un éclair court et saturant.

Le transfert d'électrons intervenant du côté donneur du PSII implique deux étapes : une oxydation très rapide (sub-μs) du donneur secondaire (tyrosine Y_z) par le donneur primaire chlorophyllien, suivie de l'oxydation par Y_z^+ du système de stockage de charges (essentiellement les atomes de manganèse du centre catalytique). Ces cinétiques de réduction de Y_z^+ ont été étudiées pour chacune des transitions par les changements d'absorption dans le proche UV (295 nm). Parallèlement, les cinétiques intervenant dans la région bleue du spectre (autour de 435 nm) ont été mesurées. Le signal détecté dans cette région est dû à un déplacement électrochromique du spectre d'une chlorophylle et reflète les variations de potentiel électrostatique ressenties par cette sonde endogène. Ces variations sont causées par deux mécanismes : d'une part, le transfert de la charge positive de Y_z^+ vers le centre catalytique correspond à une diminution du signal d'environ un facteur deux ; d'autre part, le signal est modulé par le bilan électrostatique global du système de stockage traduisant, outre l'extraction d'un électron, un départ de protons. Dans leurs travaux antérieurs, les auteurs avaient d'une part établi la stoechiométrie, en général non entière et dépendante du pH, des libérations de

protons intervenant à chaque étape et d'autre part la corrélation entre la réponse électrochromique et le bilan de charge nette portée par le centre catalytique. L'étude parallèle à différents pH des cinétiques de transfert d'électrons et de la réponse électrochromique permet de préciser les cinétiques, et dans une certaine mesure, le mécanisme, des réactions de déprotonation.

Un premier résultat concerne la vitesse de transfert d'électrons sur la transition $S_0Y_z^+ \rightarrow S_1Y_z$ dont le $t_{1/2}$ s'avère être de 250 µs au lieu de la valeur précédemment admise de 30-50 µs. L'erreur commise dans les déterminations antérieures est imputable en partie aux techniques de déconvolution, mais surtout à l'utilisation d'un spectre erroné pour la transition $S_0 \rightarrow S_1$. Les constantes de temps obtenues pour les autres transitions sont proches de celles de la littérature, mais les résultats révèlent un biphasisme des cinétiques de transfert d'électrons faisant intervenir un délai (« lag ») sur les transitions $S_0 \rightarrow S_1$ et $S_3 \rightarrow S_0$. La comparaison avec les cinétiques de la réponse électrochromique permet d'interpréter ce phénomène. On a en effet là aussi affaire à des cinétiques biphasiques, mais avec une phase rapide décroissante dans la région où se manifeste le délai observé sur les cinétiques UV. Ceci suggère que la formation de Y_z^+ déclenche lors de ces transitions une déprotonation qui à son tour rend possible le transfert d'électrons. Le phénomène est particulièrement net pour la réaction finale $S_3Y_z^+ \rightarrow S_0Y_z$ où s'effectue le dégagement d'oxygène. L'analyse de la cinétique électrochromique permet de conclure que le bilan d'environ 1,5 proton libéré lors de cette transition recouvre deux processus. Une première fraction (estimée à 1 proton) est libérée en une trentaine de µs, préalablement à la réaction ($\approx$ 1 ms) de réduction de Y_z^+ concomitante avec l'émission d'O_2 et à la libération du reste (0,5) des protons. Ce résultat met en évidence le mécanisme (expulsion d'un proton du centre catalytique sous l'influence électrostatique de Y_z^+) qui déclenche la réaction catalytique finale d'oxydation de l'eau. Le seul effet significatif du pH sur les cinétiques observées est une accélération de la réponse électrochromique sur $S_0 \rightarrow S_1$ à pH alcalin alors que la vitesse du transfert d'électrons reste inchangée, suggérant une fixation de OH^- au lieu d'une libération de H^+ sur cette transition.

B) *Mécanisme de la chlororespiration* (P. BENNOUN)

En 1982, P. Bennoun a proposé l'existence d'une chaîne respiratoire chloroplastique possédant des éléments communs à la chaîne photosynthétique (plastoquinone, ATPase) à l'instar de ce que l'on observe chez les procaryotes photosynthétiques. Cette voie chlororespiratoire oxyderait le NAD(P)H par l'intermédiaire d'une NAD(P) plastoquinone oxydo-réductase et oxyderait les plastoquinones via une oxydase chloroplastique. L'ensemble de ces transferts d'électrons serait électrogénique et responsable pour une part du gradient

électrochimique existant à l'obscurité au niveau des thylacoïdes. Cette chlororespiration permet de rendre compte des observations suivantes :

1. l'oxydation des plastoquinones à l'obscurité est assurée par un mécanisme sensible à l'intégrité des chloroplastes ;

2. une réduction des plastoquinones à l'obscurité est induite par une variété d'inhibiteurs des chaînes respiratoires (inhibiteurs du transfert d'électrons, inhibiteurs d'oxydase ou d'ATPase, découplants) ;

3. une diminution simultanée du gradient électrochimique établi à l'obscurité de part et d'autre des membranes photosynthétiques s'observe en présence de ces mêmes inhibiteurs.

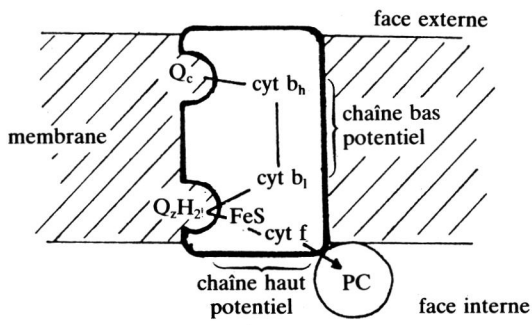
La découverte ultérieure des gènes codant plusieurs sous-unités d'une NADH déshydrogénase dans les génomes chloroplastiques de plantes supérieures a conforté ce modèle de chlororespiration. Cette enzyme est en effet le plus communément présente à l'entrée des voies respiratoires procaryotes ou eucaryotes. Pour autant, le mécanisme d'oxydation des plastoquinones à l'obscurité via une oxydase chloroplastique reste hypothétique, car à ce jour, aucune oxydase de ce type n'a été mise en évidence. Il était donc intéressant de rechercher si l'on pouvait faire l'économie de cette oxydase pour rendre compte des trois faits expérimentaux cités plus haut. Un second modèle, proposé par P. Bennoun, fait appel à des propriétés connues des NADH déshydrogénases : le fonctionnement normal de cette enzyme est électrogénique lors d'un transfert d'électrons dans le sens thermodynamique ; inversement, cette enzyme peut réaliser un transfert d'électrons contre le potentiel (des quinones vers le $NAD(P)^+$) en prélevant l'énergie nécessaire sur le gradient électrochimique transmembranaire. L'état redox des plastoquinones à l'obscurité dépendrait du rapport $NAD(P)H/NAD(P)^+$ ainsi que de la concentration intracellulaire d'ATP car l'on suppose que le fonctionnement inversé des ATPases chloroplastiques participe à l'établissement du gradient électrochimique. En dessous d'une valeur critique, la concentration d'ATP intracellulaire ne permettrait plus d'établir un gradient transmembranaire suffisant pour assurer l'oxydation des plastoquinones. Dans ce modèle, les inhibiteurs de chaînes respiratoires ayant pour effet de réduire les plastoquinones et de diminuer la valeur du gradient électrochimique au niveau des thylacoïdes agiraient sur la seule respiration mitochondriale, et ce en réduisant la concentration intracellulaire d'ATP. Pour départager ces deux modèles, il est nécessaire, entre autres, de définir avec certitude le site d'action de ces inhibiteurs.

Cette distinction a pu être effectuée dans un cas, grâce aux développements accomplis par P. Bennoun dans le domaine de la génétique mitochondriale. Des mutants résistant au myxothiazol ont été isolés dans le gène COB codant le cytochrome b mitochondrial. Cette drogue bloque le transfert d'électrons mitochondrial au niveau du cytochrome b et induit dans le chloroplaste une réduction des plastoquinones et une diminution du gradient électrochimique

transmembranaire. L'ensemble de ces phénomènes disparaît dès lors qu'une mutation de résistance au myxothiazol est introduite dans le gène COB. Ceci démontre clairement que l'action du myxothiazol dans le chloroplaste résulte d'une inhibition de la respiration mitochondriale et non d'un effet direct sur la voie chlororespiratoire. Il existe donc une interaction bioénergétique entre mitochondries et chloroplastes que tout modèle de chlororespiration doit prendre en compte.

C) *Mécanismes de transfert d'électrons et de protons dans le complexe cytochrome b/f* (P. JOLIOT et A. JOLIOT)

Les complexes cytochrome b/f catalysent l'oxydation des quinols et la réduction d'une petite protéine hydrosoluble, la plastocyanine, assurant ainsi le transfert d'électrons entre les deux photosystèmes. A ce transfert d'électrons est associé un transfert électrogénique de protons à travers la membrane. Les complexes cytochrome b/f comportent 4 transporteurs d'électrons et deux sites Q_z et Q_c susceptibles de fixer les molécules de quinol et de quinone respectivement localisés à proximité des faces interne et externe de la membrane. Le mécanisme universellement admis pour rendre compte des processus de transfert d'électrons et de protons a été proposé par Mitchell (Q-cycle, voir schéma). Dans ce processus, l'oxydation d'une molécule de quinol au site Q_z induit la réduction simultanée d'un transporteur de la chaîne haut potentiel et d'un hème b. Les deux hèmes b réduits sont alors réoxydés en cédant deux électrons à une quinone localisée au site Q_c. Dans cette hypothèse, les réactions électrogéniques sont exclusivement associées au transfert d'électrons à travers la chaîne bas potentiel. De nombreux résultats expérimentaux obtenus ces dernières années par P. et A. Joliot sur des chloroplastes isolés de plantes supérieures ou sur des algues unicellulaires paraissent incompatibles avec l'hypothèse du Q-cycle. L'étude de ce problème a été reprise sur des algues *Chlorella* placées en condition anaérobie qui induit la réduction complète du pool de plastoquinones.



Une analyse comparée des cinétiques initiales de réduction du cyt b et de la réaction électrogénique qui traduit le transfert transmembranaire de charges a été effectuée sur des algues illuminées par des éclairs de faible énergie. En raison de la faible amplitude des signaux spectroscopiques obtenus, ces expériences n'ont pu être réalisées qu'après la mise au point par D. Béal et P. Joliot d'un nouveau spectrophotomètre qui autorise un renouvellement rapide de l'échantillon à partir d'un réservoir de matériel maintenu en conditions très réductrices. La possibilité de sommer de nombreuses expériences permet d'atteindre une résolution supérieure à 10^{-6} unités d'absorption.

Lors d'une illumination par des éclairs répétitifs non saturants, on observe que la vitesse de la réaction électrogénique est très supérieure à la vitesse théorique qui peut être déduite de la vitesse de réduction des hèmes b. En présence d'un inhibiteur spécifique du site Q_c (NQNO), la vitesse de la réaction électrogénique est fortement diminuée alors que la vitesse de réduction des hèmes b est augmentée. Ces résultats montrent sans ambiguïté que les réactions électrogéniques ne sont pas exclusivement liées au mouvement de charges à travers la chaîne bas potentiel comme le prévoit l'hypothèse du Q-cycle. Il est donc nécessaire de supposer l'intervention d'une réaction électrogénique supplémentaire qui pourrait correspondre au transfert d'une semiquinone chargée du site Q_z au site Q_c (cycle semiquinone) ; ce transfert serait inhibé par l'addition de NQNO, bloquant l'accès au site Q_c. Les mêmes expériences ont été effectuées en illuminant par un éclair unique des algues adaptées à l'obscurité. Dans ces conditions, la totalité du cyt b_h et une fraction significative du cyt b_l sont à l'état réduit avant l'éclair. On observe cependant que la vitesse initiale de la réaction électrogénique reste rapide et proche de celle mesurée en éclairs répétitifs. La vitesse de réduction du cyt b est par contre fortement diminuée. La réduction du cyt b_l, proche de la face interne de la membrane, ne devrait pas s'accompagner de la formation d'un potentiel de membrane. La forte vitesse de croissance du potentiel de membrane observée dans ces conditions implique qu'une espèce chargée, qui ne peut être que la semiquinone ou un proton, traverse la membrane. L'ensemble de ces résultats apporte donc des arguments directs en faveur de l'hypothèse du cycle semiquinone. Ce mécanisme qui se caractérise par un piégeage dans le complexe des oxydants produits au site Q_z (semiquinones) paraît particulièrement bien adapté à un fonctionnement dans des conditions réductrices qui induisent la réduction totale du pool de quinones. On peut envisager au contraire que les complexes cyt b/c des bactéries pourpres et des mitochondries, adaptés à des conditions plus oxydantes (pool de quinones partiellement oxydé) fonctionneraient suivant le mécanisme du Q-cycle. Ces différences fonctionnelles entre les deux types de complexes pourraient avoir des conséquences importantes sur le plan de l'évolution des appareils membranaires convertisseurs d'énergie.

II. — STRUCTURE ET REPLIEMENT DES PROTÉINES MEMBRANAIRES

A) *Structure des protéines membranaires intégrales : analyses de séquence, modélisation* (J.-L. POPOT, P. TUFFÉRY et F. SAMATEY, en collaboration avec G. ZACCAÏ (Institut Laue Langevin, Grenoble), C. ETCHEBEST et R. LAVERY (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, Service de Biochimie Théorique) et M. CLAROS et C. JACQ (Ecole Normale Supérieure, Paris).

Le modèle de repliement des protéines membranaires intégrales dit « en 2 étapes », applicable à celles de ces protéines dont la région transmembrane est entièrement constituée d'hélices α, postule que la structure tridimensionnelle finale résulte de l'accrétion d'hélices α transmembranaires préformées. Résultats récents et implications de ce mode de repliement ont été examinés et discutés dans deux articles de revue. En particulier :

1) La structure des complexes membranaires dans les organelles résulte du « microassemblage » de sous-unités d'origine cytosolique, comportant peu de segments transmembranaires, et de sous-unités d'origine chloroplastique ou mitochondriale, qui peuvent en comporter beaucoup. Cette distribution suggère l'existence de restrictions à l'importation dans les organelles, qui limitent le nombre de segments hydrophobes présents dans la séquence du précurseur. Cette dernière hypothèse est fortement soutenue par des expériences d'importation de protéines chimériques dans la mitochondrie de *Saccharomyces cerevisiae,* expériences réalisées dans le laboratoire de C. Jacq (ENS) et analysées en coll. avec ce groupe.

2) L'examen des remaniements subis par les domaines transmembranaires, soit expérimentalement, soit au cours de l'évolution, suggère que les éléments transposables peuvent être aussi bien l'hélice α transmembranaire individuelle que le faisceau d'hélices α.

3) Le modèle de repliement en deux étapes légitime (en principe) l'approche consistant à construire des modèles de domaines transmembranaires par assemblage d'hélices α préformées. Certaines des questions soulevées par cette approche ont été examinées, et notamment :

a) *à quel point le modèle est-il général ?* Une topologie révisée du protéolipide majeur de la myéline (PLP), compatible avec ce mode de repliement, a été proposée et utilisée pour interpréter le mécanisme de mutations humaines responsables de dysmyélinisations graves (maladie de Pelizaeus-Merzbacher. Cette topologie révisée a reçu récemment de très fortes confirmations expérimentales.

b) *est-il possible de calculer* ab initio *la façon dont les hélices s'assemblent, étant connus leurs séquences et leurs axes ?* Cette dernière question a fait l'objet d'une étude très approfondie conduite sur la bactériorhodopsine. Les

résultats des calculs de modélisation ont été confrontés à ceux de l'étude expérimentale par diffraction des neutrons et des électrons et sont en parfait accord avec elle (*cf. rapport 1992).*

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

1 — *Purification du complexe*

Un protocole de purification permettant la préparation de cytochrome b_6f hautement purifié a été mis au point. Le complexe b_6f purifié catalyse le transfert d'électrons entre un donneur, le décylplastoquinol, et un accepteur, le cytochrome *c* oxydé, en présence de quantités catalytiques de plastocyanine. Les préparations comportent 6 sous-unités (cytochrome *f,* cytochrome b_6, protéine de Rieske, sous-unité IV, protéine codée par le gène *petG,* et une sixième, très petite sous-unité, jusqu'à présent inconnue), dont la stoechiométrie (vraisemblablement 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1) est en cours de confirmation.

Ce travail permet d'établir définitivement la composition du complexe b_6f de *C. reinhardtii,* qui était controversée. Il fournit une base indispensable aux études structurales du complexe, à celle de son fonctionnement *in vitro,* et aux tentatives de cristallisation. La caractérisation spectroscopique du complexe purifié est en cours (coll. avec A. Verméglio (CEA Cadarache) et B. Robert (CEA Saclay)). F. Brisset (Université Paul Sabatier, Toulouse) a entrepris de déterminer s'il est possible de substituer au détergent habituellement utilisé lors de la purification, l'hécameg, une nouvelle classe de détergents (les aminolactitols) synthétisés dans le laboratoire d'A. Lattes et I. Rico (Toulouse).

2 — *Anticorps*

Des anticorps anti-peptides ont été produits contre 5 des 6 sous-unités du complexe. Ces anticorps ont permis d'établir l'identité de la protéine codée par le gène *petG* et de montrer que les régions N- et C-terminales de l'apocytochrome b_6 et de la sous-unité IV étaient présentes dans les protéines matures. Ils ont également permis d'examiner le comportement des différentes sous-unités lors d'expériences d'extraction ménagée (voir ci-dessous) et ont été utilisés par le groupe de F.-A. Wollman pour mesurer l'accumulation des différentes sous-unités dans des souches de *C. reinhardtii* obtenues après délétion des gènes chloroplastiques codant pour l'apocytochrome b_6, la sous-unité IV ou l'apocytochrome *f*. Ces anticorps serviront également à analyser les produits obtenus par pontage en milieu hydrophobe.

3 — *Séquences*

Des séquences N-terminales ou internes ont été déterminées pour le cytochrome *f* et pour la protéine de Rieske. Les séquences N-terminales 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 pour analyser une banque d'ADN génomique (fournie par J.-D. Rochaix, Genève). La séquence du gène (nucléaire) de la protéine de Rieske a ainsi pu être établie.

4 — *Mode d'association de la protéine de Rieske avec le complexe*

Le mode d'association de la protéine de Rieske avec la membrane, qui fait l'objet de vives controverses, a été examiné par des approches biochimiques. Différentes méthodes d'extraction indiquent que la protéine de Rieske se comporte comme une protéine extrinsèque (non transmembranaire). Cependant, son association avec le reste du complexe repose avant tout sur des interactions de type hydrophobe, ce qui explique la relative inefficacité des méthodes d'extraction par élévation de pH, en partie à l'origine de la polémique actuelle. En accord avec ces observations, la protéine de Rieske séparée du complexe se comporte comme une protéine soluble : elle ne se lie pas aux micelles de détergent ($C_{12}E_8$ ou laurylmaltoside) et migre sur tamis moléculaire et lors d'ultracentrifugations comme un monomère de masse moléculaire 20,0 ± 1,7 kDa, en bon accord avec la masse de 18,5 kDa calculée à partir de la séquence. La confrontation des données biochimiques et des données de séquence conduit à la conclusion que, lors de la biosynthèse, la région N-terminale hydrophobe de la protéine de Rieske se comporte comme une séquence signal sécrétée. C'est une situation assez rare, mais que l'on retrouve chez l'ovalbumine ou l'inhibiteur-2 du plasminogène.

III. — BIOGENÈSE ET INTÉGRATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES DU THYLACOÏDE

A) *Le complexe cytochrome b_6/f*

1 — Localisation et séquence nucléotidique des gènes petA, petB, petD (S. BÜSCHLEN, R. KURAS, F.-A. WOLLMAN, Y. CHOQUET)

Les gènes codant pour les trois principales sous-unités chloroplastiques du complexe cyt b_6/f, petA (cyt f), petB (cyt b_6) 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 b_6 et de la sous-unité IV présentent environ 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-aminés) correspondant au signal d'adressage lumenal du cyt f ne présente aucune homologie avec les séquences signal de cyt f d'autres organismes qui 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 thylacoïde de *C. reinhardtii* pourraient être spécifiques de cette algue.

2 — *Assemblage du complexe des cytochromes b/f* (R. KURAS et F.-A. WOLLMAN)

F.-A. Wollman et collaborateurs ont antérieurement démontré l'accumulation concertée dans la membrane thylacoidale des trois sous-unités transmembranaires majeures du complexe, le cytochrome f, le cytochrome b_6 et la sous-unité IV (su IV). Cette observation suggère que leur assemblage leur confère une protection contre la dégradation protéolitique. Afin d'étudier plus finement les interactions entre les sous-unités de ce complexe protéique, ces chercheurs ont construit, par transformation génétique du chloroplaste, trois souches mutantes de *C. reinhardtii* portant chacune une délétion de la séquence codante de l'un des trois gènes correspondants à ces sous-unités : petA, petB et petD.

La stratégie choisie a consisté à substituer, dans un plasmide contenant le gène à déléter, une cassette conçue par M. Clermont-Goldschmidt de l'Université de Genève, qui porte des signaux de transcription et de terminaison empruntés à d'autres gènes chloroplastiques encadrant le gène aadA de *E. Coli* qui confère la résistance à la spectinomycine. La transformation du génome chloroplastique se produisant par recombinaison homologue, ils ont ainsi pu échanger le gène pet présent dans la souche sauvage réceptrice, sensible à la spectinomycine, contre la cassette conférant la résistance à l'antibiotique. Les souches ainsi transformées ont donc pu être aisément sélectionnées en présence de spectinomycine. Ces souches ont permis d'étudier la synthèse et la stabilité dans la membrane, de deux sous-unités transmembranaires du complexe en l'absence de la troisième. Il apparaît que le cytochrome b_6 est considérablement déstabilisé en l'absence de l'un quelconque de ses deux partenaires. La su IV est beaucoup plus rapidement dégradée en l'absence de cytochrome b_6 qu'en l'absence de cytochrome f. Ces observations suggèrent qu'il y a une interaction préférentielle entre la su IV et le cyt b_6, le cyt f interagissant probablement avec ce groupe via le cyt b_6.

Alors que ces déstabilisations protéiques dans les souches transformées n'affectent pas les taux de synthèse de la su IV ou du cyt b_6, qui restent

identiques à ceux de la souche sauvage, la synthèse du cyt f dans les souches délétées en su IV ou cyt b_6, est considérablement affaiblie. Plus surprenant encore, le peu de cyt f synthétisé présente une stabilité semblable à celle du cyt f produit dans la souche sauvage qui assemble le complexe. Ces observations conduisent R. Kuras et F.-A. Wollman à conclure 1) que le cyt f isolé est stable dans le thylacoïde ; 2) que son niveau de synthèse dans la souche sauvage est étroitement gouverné par la présence de précomplexes cyt b_6/ su IV.

L'obtention d'une concentration de chaque sous-unité transmembranaire du complexe, adaptée à la stoechiométrie 1 : 1 : 1 du complexe fonctionnel, se ferait donc par une régulation *post-traductionnelle* pour le cyt b_6 et la su IV, l'excès étant rapidemment dégradé, mais par une régulation *traductionnelle* pour le cyt f, son niveau d'expression étant déterminé par la présence de ses partenaires d'assemblage.

B) *L'ATP synthétase*

1 — *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 ce facteur nucléaire protégerait les ARNm de l'action d'une exonucléase agissant sur l'extrémité 3′ des transcripts. L'analyse de cette mutation dans un contexte diploïde a montré sa dominance. Il s'agit là de la première mise en évidence d'une mutation dominante affectant l'expression d'un gène codant pour une protéine de l'appareil photosynthétique.

Par ailleurs, la comparaison des vitesses de synthèse des sous-unités α et β dans les différentes souches font apparaître en évidence une interaction dans l'expression de ces sous-unités au niveau traductionnel. Enfin, la comparaison des taux d'accumulation des sous-unités α et de β dans ces souches démontre que β est requise pour stabiliser α dans le stroma de la cellule.

C) *Etude de la fusion des membranes des thylacoïdes 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 thylacoïdes, 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 thylacoïdes 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 thylacoïdale permet alors de restaurer un transfert d'électrons photosynthétiques 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.

D) *Etude de la gamétogénèse*

1 — *Identification d'une L amino-acide oxydase* (L. BULTÉ, O. VALLON, R. KURAS et F.-A. WOLLMAN)

Un nouveau polypeptide Mα de 63 kDa apparaît au cours de la gamétogénèse à mesure que le complexe cyt *b/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/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 Mα n'est pas formé. L'hypo-

thèse d'une interconversion cytochrome f/Mα a donc été étudiée. Ces chercheurs ont alors construit une souche délétée dans le gène petA codant le cytochrome f. Tous les transformants obtenus, dépourvus de synthèse de cytochrome f, se sont révélés capables de produire, à l'état de gamète, des quantités de Mα comparables à la souche sauvage. Cette observation a permis d'exclure toute relation moléculaire directe entre Mα et le cytochrome f.

L'analyse de la séquence N-terminale du polypeptide Mα 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 Mα 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 Mα 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 Mr 1,2-1,3 10^6 à l'état natif, comprenant 13-16 sous-unités Mα associées à 3-4 sous-unités de plus haut poids moléculaire Mβ, de 135 kDa. 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. La protéine M s'accumule dans le périplasme des gamètes et est relarguée dans le milieu extracellulaire au cours du croisement de gamètes de signe sexuel opposé. Le complexe protéique M se révèle être une L aminoacide oxidase dont le spectre de substrat est particulièrement large. Ses propriétés enzymologiques indiquent qu'elle est adaptée à travailler dans un milieu où les acides aminés sont très peu concentrés. Cela paraît bien adapté aux conditions physiologiques de la gamétogénèse qui se produit après une carence en azote, dans un milieu où la concentration extracellulaire en acides aminés sera faible puisqu'ils ne proviendront que de la dégradation de protéines excrétées par des cellules voisines ou relarguées au cours de leur mort cellulaire.

PUBLICATIONS

Références de publications citées sous presse dans le rapport 1992

P. JOLIOT, J. LAVERGNE & D. BÉAL. « Plastoquinone compartmentation in chloroplasts. I. Evidence for domains with different rates of photo-reduction ». *Biochim. Biophys. Acta,* 1992, 1101, 1-12.

J. LAVERGNE, J.-P. BOUCHAUD & P. JOLIOT. « Plastoquinone compartmentation in chloroplasts. II. Theoretical aspects ». *Biochim. Biophys. Acta,* 1992, 1101, 13-22.

D. PHAM-DINH, J.-L. NUSSBAUM, J.-L. POPOT, O. BŒSPFLUG-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*, 1992, 8, 664-672.

P. JOLIOT & A. JOLIOT. « Electron transfer between Photosystem II and the cytochrome b/f complex : mechanistic and structural implications ». *Biochim. Biophys. Acta.*, 1992, 1102, 53-61.

P. TUFFÉRY, J.-L. POPOT & R. LAVERY. « Modelling bundles of transmembrane of transmembranes α-helices ». Proc. Vth International Conference on Retinal Proteins (J.L. Rigaud, Ed. Colloque INSERM/John Libbey, Eurotext, pp. 13-16).

Nouvelles publications

F. SAMATEY, J.-L. POPOT, C. ETCHEBEST & G. ZACCAÏ. « Rotational orientation of transembrane α-helices in bacteriorhodopsin studied by neutron diffraction ». Proc. Vth International Conference on Retinal Proteins (J.L. Rigaud, Ed. Colloque INSERM/John Libbey, Eurotext, pp. 9-12).

P. BENNOUN, M. DELOSME, I. GODEHARDT & U. KÜCK. « New tools for mitochondrial genetics of *Chlamydomonas reinhardtii :* manganese mutagenesis and cytoduction ». *Mol. Gen. Genet.,* 1992, 234, 147-154.

W. NITSCHKE, P. JOLIOT, U. LIEBL, A.W. RUTHERFORD, G. HAUSKA, A. MÜLLER and A. RIEDEL. « The pH dependence of the redox midpoint potential of the 2Fe2S cluster from cytochrome b_6f complex (the « Rieske centre ») ». *Biochim. Biophys. Acta.*, 1992, 1102, 266-268.

J. LAVERGNE, M. BLANCHARD-DESCE & F. RAPPAPORT. « Oxidation and deprotonation reactions in the Kok cycle ». N. Murata (ed.) Research in Photosynthesis, Vol. II, 273-280. 1992. Kluwer Academic Publishers.

S. ZIRNGIBL, D.L. XIE, A. RIEDEL, W. NITSCHKE, H. NELSON, N. NELSON, U. LIEBL, J. LECOUTRE, G.H. AUSKA, E. KELLNER, D. GRODZITZKI and M. BÜTTNER. « Low-potential Rieske FeS-centers of menaquinol oxidizing cytochrome bc-complexes ». N. Murata (ed.) Research in Photosynthesis, Vol. II, 471-478. 1992. Kluwer Academic Publishers.

W. NITSCHKE & U. LIEBL. « The cytochromes in *Heliobacillus mobilis* ». N. Murata (ed.) Research in Photosynthesis, Vol. II, 507-510. 1992. Kluwer Academic Publishers.

J. OLIVE, M. RECOUVREUR, J. GIRARD-BASCOU & F.-A. WOLLMAN. « Further identification of the exoplasmic face particles on the freeze-fractured

thylakoid membranes : a study using double and triple mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking various photosystem II subunits and the cytochrome b_6/f complex ». *European Journal of Cell Biology,* 1992, 59, 176-186.

J.-L. POPOT. « Les protéines membranaires intégrales : structure, repliement, modélisation ». *Annales de l'Institut Pasteur,* 1992, 3, 4, 241-251.

J. LAVERGNE & E. LECI. « Properties of inactive Photosystem II centers ». *Photosynthesis Research,* 1993, 35, 323-343.

P. JOLIOT, A. VERMÉGLIO & A. JOLIOT. « Supramolecular membrane protein assemblies in photosynthesis and respiration ». *Biochim. Biophys. Acta,* 1993, 1141, 151-174.

Publications sous presse

J.-L. POPOT. « Transmembrane α-helices of integral proteins as autonomous folding domains ». *Curr. Opin. Struc. Biol.* 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.

O. VALLON, L. BULTÉ, R. KURAS, J. OLIVE & F.-A. WOLLMAN. « Extensive accumulation of an extracellular L-amino-acid oxidase during gametogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Eur. J. Biochem.* Sous presse.

J. LAVERGNE et W. JUNGE. « Proton release during the redox cycle of the water oxidase ». *Photosynthesis Research.* Sous presse.

CONGRÈS

The Fifth International Conference on Retinal Proteins. Dourdan, 28 juin-2 juillet 1992. J.-L. POPOT.

Ateliers de Formation EMBO/INSERM. « Current methods in membrane protein research ». Le Vésinet, 9-10 juillet 1992, Heidelberg, 13-18 juillet 1992. J.-L. POPOT.

Ecole Imabio, Toulouse, 15-16 octobre 1992. J.-L. POPOT.

Colloque du Campus de la Montagne Sainte-Geneviève. Paris, 23-24 octobre. P. JOLIOT, J.-L. POPOT.

International Congress on Photosynthesis Research. Nagoya (Japon), 30 août-4 septembre 1993. Conférences de J. LAVERGNE et de W. NITSCHKE.

« Symposium of Membrane Biophysics, Membrane-Confined Reactions ». American Chemical Society Meeting. Washington, 9 décembre 1992. Conférence de P. JOLIOT.

Colloque « Bioénergétique Cellulaire ». Lyon, Janvier 1993. Conférence de F.-A. WOLLMAN.

Ecole Internationale « Technologie des protéines membranaires ». Tunis, 4-6 février 1993, J.-L. POPOT.

European Research Conferences « Molecular Basis of Biological Membrane Protein : Structure and Function ». Naples, 17-22 avril 1993. Conférence de J.-L. POPOT.

Colloque « Assemblages moléculaires complexes : problèmes et modèles ». Lyon, 10-11 mai 1993. Conférence de J.-L. POPOT.

Colloque International Pasteur/Weizmann/Rockefeller « La structure des macromolécules biologiques en quatre dimensions ». Paris, 17-19 mai 1993. Conférence de J.-L. POPOT.

Symposium « Regulation of Gene, Expression in *Chlamydomonas* ». Amsterdam, 25-27 mai 1993. A. ATTEIA, L. BULTÉ, J. GIRARD-BASCOU, Conférences de P. BENNOUN, O. VALLON et F.-A. WOLLMAN.

Colloque de l'Académie des Sciences « Organisation et processus dans les systèmes biologiques ». Paris, 26-28 mai 1993. P. JOLIOT.

Conférence Jacques Monod. « Protein-Protein Interactions in the Photosynthetic Apparatus ». Aussois, 27 juin-2 juillet 1993. R. KURAS, C. BREYTON. Conférences de P. JOLIOT et de J.-L. POPOT.