

Bioénergétique cellulaire

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

Le cours de cette année a porté sur l'étude de l'organisation supramoléculaire des appareils membranaires convertisseurs d'énergie impliqués dans la synthèse d'adénosine-tri-phosphate (ATP), vecteur universel de l'énergie chez les êtres vivants. Notre vision de l'organisation structurale de ces appareils est dominée par la théorie chimiosmotique de Mitchell, qui a proposé un mécanisme rendant compte du couplage entre processus de transfert d'électrons et de synthèse d'ATP. Au transfert d'électrons par les chaînes de transporteurs est associé un pompage électrogénique de protons, induisant la formation d'un gradient électrochimique transmembranaire. La synthèse d'ATP au niveau d'une enzyme spécialisée, l'ATP-synthase, est associée à la dissipation de ce gradient électrochimique. La plupart des transporteurs d'électrons sont inclus et immobilisés dans des complexes transmembranaires, formés par l'association de plusieurs polypeptides liés par des liaisons non covalentes. Les transferts d'électrons entre ces complexes sont assurés par deux types de transporteurs mobiles, susceptibles de diffuser, soit dans la phase aqueuse, soit dans la zone hydrophobe de la membrane. Ces transporteurs peuvent assurer un transfert d'électrons efficace entre des complexes transmembranaires situés à grande distance les uns des autres. De la même manière, les protons et les ions sont susceptibles de diffuser rapidement dans les phases aqueuses au contact des membranes, assurant ainsi une délocalisation rapide du gradient électrochimique de protons. Les complexes transporteurs d'électrons et les complexes ATP-synthases peuvent donc être localisés dans des régions membranaires éloignées les unes des autres. On peut en conclure que la diffusion des transporteurs mobiles d'électrons, de protons et d'ions, permet une équilibration rapide du potentiel redox et du gradient électrochimique de protons sur l'ensemble de la membrane. L'hypothèse chimiosmotique n'impose donc aucune contrainte stricte quant à la localisation relative des différents complexes transmembranaires au sein de la membrane, tout au moins dans des conditions où le débit des chaînes de transfert d'électrons est suffisamment

faible pour que la vitesse du processus ne soit pas limitée par la diffusion des transporteurs mobiles. Ces considérations, d'ordre fonctionnel, expliquent que l'étude de l'organisation latérale des protéines au sein des membranes est un sujet d'étude le plus souvent négligé. La membrane est implicitement considérée comme une phase liquide à deux dimensions, au sein de laquelle les protéines et les transporteurs solubles se déplaçant librement, sont répartis d'une manière aléatoire. A l'opposé de ce modèle, on peut supposer que de fortes interactions attractives entre complexes conduisent, soit à des associations spécifiques entre protéines membranaires (supercomplexes), soit à la formation d'un réseau immobilisé occupant la totalité de la surface membranaire. De nombreux arguments structuraux, biochimiques ou fonctionnels montrent que de telles associations existent effectivement au sein des membranes des bactéries, des mitochondries et des chloroplastes. Ces associations entre complexes ont des conséquences importantes sur le plan fonctionnel en favorisant, ou en défavorisant, certaines voies concurrentes de transfert d'électrons.

La première partie du cours a été consacrée à décrire les principales techniques mises en œuvre dans l'étude de l'organisation supramoléculaire des appareils membranaires. Il est important de souligner que, si l'on dispose de nombreuses techniques permettant de caractériser, d'une part la structure des macromolécules, et d'autre part, les structures subcellulaires, l'échelle d'intégration intermédiaire, correspondant aux associations entre macromolécules, reste très difficilement accessible. Sur la base d'une analyse critique de l'arsenal des méthodes mises en œuvre dans ce domaine, qu'il s'agisse d'approches fonctionnelles ou de techniques structurales, biophysiques ou biochimiques, on peut conclure qu'aucune méthode, prise individuellement, ne permet d'acquérir des informations raisonnablement fiables et univoques à cette échelle d'intégration. Tout modèle, se proposant de décrire l'organisation ultrastructurale des composants membranaires, doit donc s'appuyer sur des informations convergentes, obtenues en mettant en œuvre plusieurs approches indépendantes.

La seconde partie du cours a été consacrée à l'étude des interactions entre les principaux constituants des membranes naturelles, essentiellement les lipides et les protéines. Les membranes naturelles comportent une grande variété de lipides, qui diffèrent aussi bien par la nature des chaînes hydrophobes que par celle des têtes polaires. En dépit de cette complexité, la composition des membranes biologiques est cependant remarquablement stable, ce qui suppose l'intervention de mécanismes de régulation efficaces, et suggère que l'hétérogénéité des lipides joue un rôle structural et fonctionnel important. L'hétérogénéité des chaînes hydrophobes, dont la conformation préférentielle dépend du degré de saturation des liaisons entre atomes de carbone, est à l'origine d'un désordre structural, qui évite la formation de membranes trop rigides. Dans le cas des appareils convertisseurs d'énergie, la

région hydrophobe conserve ainsi un degré de fluidité, suffisant pour autoriser la diffusion rapide de molécules liposolubles telles que les quinones. La répartition des différents lipides au sein de la membrane reste cependant un sujet de controverses. En effet, on ignore si les différents lipides se répartissent de manière aléatoire, ou s'il existe des hétérogénéités latérales traduisant une ségrégation plus ou moins poussée des différentes espèces lipidiques.

Les protéines transmembranaires, qui forment le plus souvent des faisceaux d'hélices α transmembranaires, représentent une autre source d'hétérogénéité. Ces protéines, qui peuvent occuper plus de 50 % de la surface membranaire, perturbent les propriétés des lipides situés à proximité, en réduisant leur mobilité et en augmentant ainsi la viscosité locale. Ces lipides peuvent cependant s'échanger rapidement avec les autres lipides membranaires. On peut donc exclure l'existence d'un anneau de lipides immobilisés en interaction permanente avec la protéine. Les associations entre protéines membranaires jouent un rôle central dans l'organisation supramoléculaire des membranes biologiques. Ces associations sont essentiellement contrôlées par les interactions, se produisant dans la région hydrophobe de la membrane entre les hélices transmembranaires appartenant aux polypeptides en interaction. Les forces d'attraction mises en jeu décroissent très rapidement avec la distance (forces de London). Leur valeur dépend étroitement de la géométrie de la surface externe des hélices en contact, et plus précisément, de la position relative des chaînes latérales des acides aminés constituant les hélices transmembranaires.

La dernière partie du cours a porté sur l'analyse de l'organisation supramoléculaire de différents appareils convertisseurs d'énergie, présents dans les membranes bactériennes. Un premier exemple concerne la chaîne respiratoire de l'espèce *Paracoccus denitrificans*. Un complexe, présentant une forte activité quinol-oxydase, a été isolé après traitement des membranes par un détergent non ionique. Ce complexe comprend trois des constituants majeurs de la chaîne respiratoire : la cytochrome oxydase, le complexe cytochrome bc et le cytochrome c soluble. Le cytochrome c, piégé à l'intérieur du complexe, reste susceptible d'assurer un transfert d'électrons efficace jusqu'à des températures atteignant -40° . A cette température, les molécules solubles sont pratiquement immobilisées. Le transfert d'électrons entre ces deux complexes ne requiert donc que des mouvements mineurs du cytochrome c, ce qui implique que les sites de fixation de ce cytochrome, sur les complexes cytochrome bc et cytochrome oxydase, soient à proximité immédiate. Un complexe analogue, incluant la cytochrome oxydase, le cytochrome bc et un cytochrome c soluble, a été isolé chez la bactérie thermophile PS3. Comme dans le cas de *P. denitrificans*, ce complexe présente une activité quinol-oxydase très élevée, supérieure à celle mesurée après dissociation des constituants du supercomplexe.

La chaîne respiratoire de l'archéobactérie *Sulfolobus acidocaldarium*, bactérie adaptée à un environnement extrême en ce qui concerne la température et le pH, représente un cas limite, en ce qui concerne l'organisation de la chaîne respiratoire. On peut isoler un complexe, présentant une activité quinol oxydase, qui ne comporte que trois polypeptides. Ces polypeptides portent deux hèmes b, homologues des hèmes présents dans le complexe cytochrome bc, et deux hèmes a, homologues de ceux présents dans la cytochrome oxydase. Le transfert d'électrons entre les hèmes a et b s'effectue sans intervention d'un hème de type c. Toute tentative d'isolement des polypeptides de ce complexe se traduit par une perte complète d'activité, soulignant qu'il s'agit d'une entité fonctionnelle indissociable.

L'organisation de la chaîne respiratoire en supercomplexes, dont tous les exemples sont certainement loin d'être recensés, représente très probablement une réponse adaptative à des contraintes liées à l'environnement, ou aux caractéristiques ultrastructurales des bactéries.

Le dernier exemple concerne la bactérie pourpre *Rhodobacter sphaeroides*. Cette bactérie présente de nombreuses chaînes respiratoires, utilisant l'oxygène et d'autres substrats oxydants comme accepteur terminal. Ces bactéries comportent, en outre, une chaîne photosynthétique incluant deux complexes transmembranaires, les centres photochimiques et le complexe cytochrome bc, qui catalysent un transfert cyclique d'électrons, générant une différence de potentiel électrique entre les deux faces de la membrane. Les transferts d'électrons entre ces deux complexes sont assurés, comme dans le cas des chaînes respiratoires, par deux transporteurs mobiles, le cytochrome c2, molécule hydrophile, susceptible de diffuser dans la phase aqueuse située à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, et l'ubiquinone, molécule liposoluble diffusant dans la phase hydrophobe de la membrane. L'existence de deux compartiments membranaires a été mise en évidence sur la base d'une analyse cinétique et thermodynamique des processus de transferts d'électrons, intervenant entre le donneur photochimique primaire (P870) et les donneurs secondaires (cytochrome c2 et c1). Dans un premier compartiment, constitué par la membrane cytoplasmique, sont incluses les différentes chaînes respiratoires, ainsi qu'une faible fraction des chaînes photosynthétiques. Dans ce compartiment, le cytochrome c2 diffuse librement dans l'espace périplasmique, délimité par la membrane cytoplasmique et la membrane externe. Le cytochrome c2 assure ainsi le transfert d'électrons entre le complexe cytochrome b/c et la cytochrome oxydase d'une part, et les centres photochimiques d'autre part. Les différents complexes photosynthétiques, ou respiratoires, sont répartis d'une manière aléatoire sur la surface membranaire, permettant ainsi au complexe cytochrome b/c et au cytochrome c2 de participer indifféremment aux processus respiratoires et photosynthétiques. Un second compartiment est constitué par les nombreuses invaginations de la membrane cytoplasmique qui forme un réseau très dense de vésicules intracytoplasmiques. La majorité des

chaînes photosynthétiques sont incluses dans ce compartiment qui est dépourvu de chaînes respiratoires. Les chaînes photosynthétiques sont organisées en supercomplexes formés par l'association de deux centres photochimiques et d'un complexe cytochrome b/c. Une molécule de cytochrome c2 est piégée dans ce supercomplexe qui forme donc une entité fonctionnelle, comparable aux complexes respiratoires présents chez *P. denitrificans*. Le confinement de l'ensemble des transporteurs dans un domaine de dimensions réduites permet d'éliminer les contraintes cinétiques liées à la diffusion à longue distance de molécules solubles.

En conclusion, il apparaît que les chaînes de transferts d'électrons peuvent être organisées de différentes manières au sein d'une même cellule. On peut supposer que l'organisation supramoléculaire des complexes transmembranaires au sein des membranes bactériennes joue un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique.

P.J.

SÉMINAIRES

Pierre SEBBAN, UPR 407, CNRS, Gif-sur-Yvette. « *Conduction de protons dans les centres photochimiques bactériens : rôle électrostatique de la protéine* ».

Bruce A. DINER, Dupont de Nemours Cie, Wilmington, Delaware, USA. « *Caractérisation biophysique du côté donneur d'électrons du photosystème II chez des mutants dirigés de Synechocystis 6803* ».

Bernard LAGOUTTE, CEA, Centre d'Etudes de Saclay. « *Interactions protéiques et transfert d'électrons au site ferredoxine du photosystème I* ».

D. LEMESLE-MEUNIER, Université d'Aix-Marseille II Luminy. « *Mutants et révertants pseudo-sauvages du gène du cytochrome b du complexe b/c₁ chez la levure S. cerevisiae : un outil pour l'étude de la structure/fonction du complexe* ».

Paul MATHIS, CEA, Centre d'Etudes de Saclay. « *Interaction fonctionnelle entre cytochrome c et centre réactionnel dans les bactéries photosynthétiques* ».

Claude JACQ, Ecole Normale Supérieure, Paris. « *Biogénèse des mitochondries : étude expérimentale de l'importation des protéines hydrophobes* ».

Gervaise MOSSER, CEA, Centre d'Etudes de Saclay. « *Carte de projection du complexe cytochromique b₆/f à 20 Å de résolution déterminée par cristallographie électronique* ».

Werner KÜHLBRANDT, EMBL Heidelberg. « *Atomic model of plant light harvesting complex determined by electron cryomicroscopy of 2D crystals* ».

I. — BIOÉNERGÉTIQUE

A) *Système de dégagement d'oxygène et équilibres redox intervenant du côté donneur du PS II* (F. RAPPAPORT et J. LAVERGNE)

Le système de dégagement d'oxygène est constitué par une enzyme à manganèse associée au côté donneur (oxydant) du PS II. Il catalyse l'oxydation de deux molécules d'eau en un processus impliquant l'extraction de quatre électrons et de quatre protons. Le cycle de Kok, décrivant formellement l'accumulation d'équivalents oxydés (« états S »), fait intervenir quatre actes photochimiques monoélectroniques successifs et une réaction finale concertée s'accompagnant de la libération d'une molécule d'oxygène.

Au cours des années antérieures, cette équipe a d'abord établi la stoechiométrie des libérations de protons associées à chacune des étapes d'oxydation, mettant en évidence des valeurs non-entières et dépendantes du pH. L'étape suivante a été l'analyse des aspects cinétiques de la libération de protons au cours des quatre réactions de transfert d'électron intervenant entre le donneur photochimique primaire (la chlorophylle P-680) et le centre catalytique, via le transporteur intermédiaire Y_z (la tyrosine-161 du polypeptide D1 du centre réactionnel). Cette étude a montré que sur certaines des transitions entre états S, une fraction de la déprotonation était déclenchée électrostatiquement par l'oxydation de Y_z , précédant l'extraction d'électron du centre catalytique. Ce mécanisme intervient en particulier lors de l'étape finale $S_4 \rightarrow S_0$ recouvrant le processus multi-électronique d'oxydation de l'eau et le dégagement d'oxygène. Un résultat intéressant est que cette phase rapide de déprotonation (demi-temps de 30 μ s) correspond à une phase de délai de la cinétique de réduction de Y_z^+ , suggérant que la déprotonation s'effectue à partir du donneur terminal d'électron (le centre catalytique, ou le substrat H_2O).

Le travail effectué cette année a porté sur l'analyse des effets électrostatiques, résultant du bilan des déprotonations et oxydations, sur les équilibres redox entre P-680, Y_z et le centre catalytique. 10 μ s après chaque éclair, on s'attend à ce que le centre PS II se trouve essentiellement dans l'état P-680 $Y_z^+ Q_A^-$ puisque l'oxydation de Y_z intervient dans le domaine sub-microseconde, cependant que sa re-réduction, comme la réoxydation de l'accepteur Q_A^- , intervient dans le domaine des centaines de microsecondes. L'analyse des changements d'absorption détectés à 10 μ s a cependant révélé la présence d'une composante supplémentaire, qui se manifeste spécifiquement en présence des états S_2 et S_3 du système d'accumulation d'oxydants. Le spectre de cette composante indique la présence d'une fraction de P-680⁺ en équilibre avec les états $Y_z^+S_2$ et $Y_z^+S_3$. L'interprétation proposée est que la charge électrostatique supplémentaire présente sur le centre catalytique dans les états S_2 et S_3 (conséquence de la stoechiométrie des déprotonations) affecte le

potentiel du couple Y_z^+/Y_z de sorte que la constante d'équilibre $[P680 Y_z^+]/[P680^+Y_z]$ est significativement diminuée. Cette information est à rapprocher de deux types de résultats de la littérature : d'une part l'observation d'un quenching de la fluorescence chlorophyllienne intervenant aux temps courts en présence de S_2 et S_3 (ce qui est cohérent avec le rôle connu de $P-680^+$ comme quencher) ; d'autre part, la modulation des cinétiques $P-680^+Y_z \rightarrow P-680 Y_z^+$ par les états S.

En accord avec l'idée d'une modulation de l'équilibre entre $P-680$ et Y_z par la charge nette du centre catalytique, Rappaport et Lavergne ont montré que la phase rapide de déprotonation (30 μ s) intervenant sur l'état $Y_z^+S_3$ s'accompagnait d'une re-réduction de la fraction de $P-680^+$ initialement en équilibre avec Y_z^+ , traduisant la relaxation de la contrainte électrostatique correspondant au départ du proton.

L'ensemble de ces résultats suggère un tableau d'interactions électrostatiques relativement fortes au sein de l'ensemble de la chaîne des donneurs du PS II, notamment entre Y_z et le centre catalytique, en accord avec le point de vue avancé par les auteurs selon lequel Y_z^+ participerait directement à la réaction concertée d'oxydation de l'eau.

B) *Organisation de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons chez les bactéries pourpres* (P. JOLIOT, A. JOLIOT)

Dans un travail antérieur, effectué en collaboration avec A. Verméglio du Centre d'Etudes de Cadarache, P. et A. Joliot avaient analysé l'organisation ultrastructurale des complexes transmembranaires formant la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons d'un mutant appauvri en pigments collecteurs de lumière (R26) de la bactérie pourpre *Rhodobacter sphaeroides*. Il apparaît que les transporteurs d'électrons de la chaîne photosynthétique sont associés sous forme d'un supercomplexe comportant deux centres réactionnels et un complexe cytochrome bc. Une molécule de cytochrome c2 est piégée à l'intérieur de ce supercomplexe et assure le transfert d'électrons entre les composants de la chaîne haut potentiel du complexe cytochrome bc (cytochrome cl et protéine de Rieske) et le donneur primaire des centres photochimiques (P870). Ce modèle est essentiellement fondé sur des arguments d'ordre thermodynamique et cinétique. Les supercomplexes apparaissent, en effet, comme des domaines isolés les uns des autres. A l'intérieur d'un supercomplexe, un équilibre thermodynamique local est réalisé moins de 1 ms après un éclair de courte durée. Au contraire, les temps d'équilibration entre supercomplexes sont supérieurs à la dizaine de secondes.

L'analyse de ce problème a été reprise dans le cas de la souche sauvage de *R. sphaeroides*, dont l'ultrastructure diffère notablement de celle du mutant

R26. En s'appuyant sur une analyse cinétique et thermodynamique des réactions de transfert d'électrons intéressant les donneurs primaires et secondaires des centres photochimiques, A. Verméglio, P. Joliot et A. Joliot ont mis en évidence l'existence de deux compartiments membranaires. La totalité des chaînes respiratoires, ainsi qu'une faible fraction des chaînes photosynthétiques, sont localisées dans un premier compartiment correspondant à la membrane cytoplasmique. Dans ce compartiment, le cytochrome c2 est libre de diffuser dans l'espace périplasmique, délimité par la membrane cytoplasmique et la membrane externe. L'organisation ultrastructurale de ce compartiment diffère donc de celle des membranes du mutant R26. L'absence de structuration permet au cytochrome c2 et au complexe bc, éléments communs aux chaînes respiratoire et photosynthétique, de participer indifféremment aux deux processus. Le second compartiment est constitué par le réseau de membranes internes, qui forme des vésicules sphériques intracytoplasmiques. Ce compartiment, qui inclue la majorité des chaînes photosynthétiques, est organisé en supercomplexes, identiques à ceux déjà mis en évidence dans le cas de la souche R26. Cette organisation en supercomplexes, dans laquelle les centres réactionnels et le complexe cytochrome bc sont situés à proximité, élimine les contraintes cinétiques liées à la diffusion des transporteurs mobiles, cytochrome c2 et ubiquinone. La taille respective des deux compartiments peut être aisément modulée en modifiant les conditions de culture. Lorsque les bactéries sont cultivées en présence de faible concentration d'oxygène, on observe une diminution de la surface des membranes intracytoplasmiques à laquelle est associée une diminution corrélative du rapport entre le nombre de chaînes photosynthétiques et respiratoires. En condition d'anaérobiose stricte, et sous faible illumination, on observe, au contraire, une augmentation spectaculaire du nombre de vésicules intracytoplasmiques, associée à une augmentation correspondante du nombre de chaînes photosynthétiques. La modulation de l'ultrastructure de la bactérie et de la nature des complexes membranaires permet ainsi aux bactéries de répondre aux contraintes de l'environnement, en favorisant la voie d'alimentation en énergie la mieux adaptée.

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

Le spectromètre photoacoustique mis au point par P. Joliot et D. Béal, qui permet de mesurer les changements de volume associés aux réactions photochimiques, a été utilisé pour l'étude du rendement quantique de la séparation de charges induite par un éclair laser monochromatique.

A. Mesure du rendement photochimique en valeur absolue : la dépendance du signal photoacoustique vis-à-vis de la température a permis à R. Delosme de déterminer séparément les deux composantes de ce signal :

a) une composante conformationnelle qui traduit une contraction d'origine électrostatique au voisinage du centre photochimique. Cette contraction a été évaluée à environ 20 \AA^3 par photon absorbé.

b) une composante thermique, qui traduit la conversion en chaleur de l'énergie lumineuse non utilisée par la photochimie. Comparée à l'énergie absorbée, cette quantité permet de mesurer le rendement énergétique de la réaction photochimique. Dans chacun des deux photosystèmes, l'énergie stockée par la séparation de charges pendant la microseconde qui suit l'éclair a été trouvée proche de 1 eV par photon absorbé, conformément à ce que l'on prévoit pour la formation (avec un rendement quantique de 1) des paires de radicaux $Z^+Q_A^-$ dans le photosystème II, et $P700^+(F_A, F_B)^-$ dans le photosystème I.

B. Mesure de l'efficacité des différents pigments : dans cette seconde application de la technique, le rendement quantique n'est mesuré qu'en valeur relative à une seule température, et l'on étudie sa dépendance vis-à-vis de la longueur d'onde de la lumière absorbée. R. Delosme a réalisé cette étude sur diverses souches de *Chlamydomonas reinhardtii*, placées dans des conditions qui favorisent soit l'état 1 (antenne PSII principalement connectée aux centres PSII), soit l'état 2 (antenne PSII partiellement connectée aux centres PSI). Il a montré que la transition de l'état 1 vers l'état 2 se traduit effectivement par un changement substantiel du spectre de rendement quantique des centres PSI, preuve qu'une très importante fraction de l'antenne périphérique du PSII (LHCII) se déconnecte des centres PSII pour venir alimenter les centres PSI. Cette propriété n'existe pas dans les mutants dépourvus de complexe cytochrome b/f, dont le spectre de rendement quantique indique clairement le blocage dans l'état 1. Ce résultat confirme l'implication du complexe cyt b/f dans la mobilité du LHCII.

Les observations précédentes concernaient la région rouge du spectre (630 à 705 nm), où seules les chlorophylles absorbent la lumière. En étendant les mesures à la totalité du spectre visible, R. Delosme et D. Béal ont mis en évidence une nette dépression du rendement quantique dans la région où une part importante de l'absorption est due aux caroténoïdes (longueurs d'onde inférieures à 540 nm). Cette observation confirme que les caroténoïdes ne transfèrent pas la totalité de leur énergie d'excitation aux chlorophylles photoactives. La technique photoacoustique permet d'étudier avec une excellente résolution spectrale les détails du spectre de rendement quantique dans cette région. R. Delosme a entrepris de localiser, par ce moyen, les différentes fractions pigmentaires qui interviennent soit comme collecteurs d'énergie lumineuse, soit comme pièges à énergie impliqués dans la photoprotection.

II. — STRUCTURE ET REPLIEMENT DES PROTÉINES MEMBRANAIRES

A) *Structure des protéines membranaires intégrales : analyse de séquence et modélisation* (J.-L. POPOT, F.A. SAMATEY, C. XU, en collaboration avec C. ETCHEBEST et R. LAVERY (IBPC, Paris) et V. GELI (CNRS, Marseille).

L'examen et l'application d'un modèle général de repliement des protéines membranaires intégrales ont été poursuivis. Ce modèle, proposé antérieurement par J.-L. Popot et D.M. Engelman, est applicable à celles de ces protéines dont la région transmembranaire est entièrement constituée d'hélices α hydrophobes. Il postule que la structure tridimensionnelle finale de la région transmembranaire résulte de l'accrétion d'hélices α préformées (« repliement en 2 étapes »). Un certain nombre d'observations récentes concernant la structure, le repliement, l'assemblage et l'évolution des protéines membranaires intégrales, examinées et discutées dans deux articles de revue, sont en bon accord avec l'idée que chaque hélice transmembranaire hydrophobe se comporte, en première approximation, comme un domaine de repliement autonome.

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. J.-L. Popot et F.A. Samatey se sont notamment intéressés aux questions suivantes : 1) Dans quelle mesure peut-on prouver le caractère hélicoïdal des segments transmembranaires putatifs identifiés sur la base de leur hydrophobicité ? 2) Dans quelle mesure peut-on déterminer leur orientation latérale par rapport au cœur du faisceau d'hélices et aux lipides ?

Un examen systématique de la périodicité de la distribution des différentes classes de résidus dans une large banque de segments transmembranaires putatifs a été entrepris. Cette analyse repose sur la construction d'une série de matrices de corrélation pour chaque périodicité considérée. Elle a permis de mettre en évidence qu'une grande partie de ces segments, dont la structure secondaire est généralement inconnue, présente effectivement une périodicité d'environ 3,6 résidus/tour, caractéristique du repliement en hélice α . Les résidus à chaîne latérale aliphatique tendent à se regrouper sur une face de chaque hélice, les résidus ionisables sur l'autre. Les résidus aromatiques et les résidus polaires non ionisables ont tendance à se distribuer sur la face polaire de l'hélice. L'examen des structures connues, ainsi que des critères de variabilité au cours de l'évolution, indiquent que cette face polaire fait face au cœur du faisceau d'hélices. Cette distribution suggère l'existence d'un « cœur aromatique » au sein des régions transmembranaires α -hélicoïdales. Dans un programme de modélisation, l'« échelle de propension » ainsi établie devrait aider

a) à déterminer si un segment transmembranaire donné présente ou non un caractère hélicoïdal, et b), dans ce dernier cas, à identifier la face d'hélice tournée vers l'intérieur du faisceau.

Le groupe de V. Géli (CNRS, Marseille) a identifié un certain nombre de mutations qui affectent la fonction des protéines Tol de la membrane plasmique d'*Escherichia coli*, et notamment leur capacité à reconnaître les colicines de type A. L'examen des séquences des protéines TolR et TolQ suggère que leur région transmembranaire comporte, respectivement, une et trois hélices α . En collaboration avec ce groupe, J.-L. Popot et F.A. Samatey ont étudié la répartition et l'effet possible des mutations et de leurs révertants, en utilisant les techniques de modélisation en cours de développement au laboratoire (coll. avec C. Etchebest et R. Lavery, IBPC). L'ensemble des données suggère l'existence d'une interaction directe entre les régions transmembranaires de TolR et TolQ et permet d'identifier la face de la troisième hélice transmembranaire de TolQ qui est en contact avec les autres segments transmembranaires du complexe.

B) *Purification et étude structurale du complexe cytochrome b_{6f} de Chlamydomonas reinhardtii* (C. BREYTON, C. de VITRY, Y. PIERRE, C. TRIBET, J.-L. POPOT).

1 — Purification du complexe

Un protocole permettant la préparation de cytochrome b_{6f} hautement purifié a été mis au point par Y. Pierre et J.-L. Popot. 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 sous-unité, jusqu'à présent inconnue, que nous avons baptisée *petX*.

C. Tribet et C. Breyton ont étudié les propriétés hydrodynamiques du complexe b_{6f} en solution dans le détergent laurylmaltoside. La particule b_{6f} /détergent a une masse moléculaire de 354 ± 30 kDa et comporte 160 ± 10 molécules de détergent par b_{6f} . Cette masse moléculaire est très proche de celle calculée pour un complexe *dimérique* (374 kDa). Après réinsertion dans des vésicules lipidiques, le complexe apparaît comme une particule de 10-11 nm de diamètre (coll. avec J. Olive et M. Recouvreur, CNRS, Paris). Une forme monomérique (MM = 172 ± 10 kDa) peut être obtenue par délipidation. Cette forme a perdu la protéine de Rieske et est enzymatiquement inactive.

L'adaptation du protocole de purification à l'obtention de plus grandes quantités de complexe purifié (milligrammes) est en cours de mise au point. Elle a permis de lancer deux programmes de cristallogenèse, l'un visant à obtenir des cristaux tridimensionnels de complexes *b₆f*/détergent, l'autre, conduit en collaboration avec G. Mosser et J.-L. Rigaud (Institut Curie), dirigé vers l'obtention de cristaux bidimensionnels dans un système reconstitué.

2 — Identification et caractérisation de la sous-unité *petX*

La séquence de *petX*, déterminée en totalité par dégradation d'Edman, comporte 38 résidus :

GEAEFIAGTALTMVGMTLVGLAIGFVLLRVESLVEEGK

La masse moléculaire correspondante est de 3 880 Da. Des expériences de marquage biosynthétique bref au ¹⁴C en présence d'inhibiteurs des synthèses chloroplastiques ou cytoplasmiques indiquent que le gène *petX* est nucléaire. La stoechiométrie de *petX* est très probablement d'une copie par complexe (deux par dimère). Un anticorps a été produit contre un peptide synthétique dont la séquence correspond à l'extrémité N-terminale de *petX*.

L'examen de la séquence de *petX* suggère qu'il s'agit d'une protéine intégrale formant une simple hélice transmembranaire, l'extrémité C-terminale faisant face au stroma chloroplastique. En accord avec cette prédiction, C. Breyton a établi la nature transmembranaire de *petX* en étudiant sa résistance à l'extraction par des agents chaotropes ou par des changements de force ionique ou de pH. L'orientation de *petX in situ* est en cours d'examen.

III. — BIOGENÈSE ET INTÉGRATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES DU THYLAKOÏDE

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

1 — Etude de la transcription du gène chloroplastique *petD* codant la sous-unité IV du complexe *cyt b₆f* (Richard KURAS, Sylvie BUSCHLEN et Francis-André WOLLMAN en collaboration avec Nancy STURM, Wataru SAKAMOTO, Karen KINDLE et David STERN de l'Université Cornell)

L'origine d'une mutation chloroplastique présente dans la souche FUD6, spécifiquement altérée dans la synthèse de la sous-unité IV, a été identifiée. Il s'agit d'une délétion de 236 paires de bases comprises entre deux répétitions directes du génome chloroplastique. Elle s'étend des positions - 72-82 en amont de l'extrémité 5' du mARN de *petD* jusqu'aux positions + 156-166 en aval de cette extrémité. Elle couvre donc la région promoteur putative et une partie de l'extrémité 5' non-traduite de *petD*.

En conséquence, le mRNA de *petD* de 0.9 kb, présent dans la souche sauvage, est absent dans le FUD6. Par contre, un transcript dicistronique est présent dans ce mutant, transcript contenant les régions codant pour la sous-unité IV et le cytochrome f, produit du gène *petA*, situé en amont du gène *petD*. La transcription du gène *petD* a lieu à des taux voisins dans le mutant FUD6 et la souche sauvage. Cette activité transcriptionnelle est éliminée lorsque l'on interrompt la région promoteur de *petA*. Les transcripts, comportant *petD* dans le FUD6, sont donc rapidement dégradés lorsque l'on génère le transcript de *petA* qui s'accumule, lui, à des niveaux identiques dans le mutant et la souche sauvage. Nous avons construit un transformant chloroplastique dans lequel seule la région - 81/- 2, en amont de l'extrémité 5' du transcript du gène *petD*, est délétée. Cette souche présente une croissance phototrophe, et exprime des quantités de complexe *cyt b₆f* fonctionnel semblables à la souche sauvage. Lorsque cette dernière souche est transformée plus avant par une interruption du promoteur de *petA*, aucun transcript de *petD* n'est plus détectable. Nous en concluons que le gène *petD* peut être transcrit par deux promoteurs distincts, mais redondants sur le plan fonctionnel. Cette observation implique qu'il n'y a pas de signal d'arrêt de transcription efficace pour le gène *petA* dans la région intergénique située en amont de *petD*.

2 — *Etude de la mutation chloroplastique FUD16 altérant l'ATP-synthétase* (S. KETCHNER, D. DRAPIER, S. GAUDRIault, J. OLIVE, J. GIRARD-BASCOU et F.-A. WOLLMAN)

Ce mutant d'origine chloroplastique présente l'originalité de produire de plus grandes quantités de sous-unité α que la souche sauvage. Seule, une faible fraction de ces sous-unités s'associe à la membrane des thylacoïdes. La majorité se retrouve dans des complexes α/β de stoechiométrie anormale non associés aux membranes. Ces complexes protéiques, analysés par ultracentrifugation sur gradient de saccharose, présentent une densité à l'équilibre de 1,26 et une masse moléculaire de plusieurs millions de daltons. Ces agrégats sont stables en présence de détergents, mais sont dispersés par traitement à l'urée. Cette dernière observation, alliée à une analyse immunocytochimique par microscopie électronique, a conduit ces chercheurs à identifier ces agrégats à des corps d'inclusion intrachloroplastiques, analogues à ceux produits par des bactéries surexprimant des protéines exogènes.

Les souches portant la mutation FUD16 sont donc largement déficientes en synthèse d'ATP chloroplastique. Par transformation du génome chloroplastique FUD16 avec différents fragments d'ADN de la souche sauvage, cette mutation a été localisée dans la région codante du gène *atpA* de la sous-unité α de l'ATP-synthétase ; il s'agit de deux substitutions de base contiguës, conduisant à une double mutation Ile189/Asn et Asn191/Tyr. Le phénotype FUD16 est donc le résultat d'une modification des interactions α/β et de leur

stoechiométrie dans de nouveaux complexes protéiques permettant une plus grande accumulation intracellulaire de la sous-unité α . Cette double mutation, située dans le premier tiers de la région codante de la sous-unité α , présente la propriété spectaculaire d'augmenter le taux de synthèse du polypeptide par un facteur 4 au cours d'un marquage pulsé au C14 pendant 5 minutes. Elle pourrait correspondre à la suppression d'une pause au cours de la traduction du gène *atpA*. Nous avons placé cette souche dans le contexte nucléaire portant la mutation *nccl*, qui déstabilise les transcrits de *atpA* par un facteur 10 et diminue le taux de synthèse de α par un facteur 3, sans modifier l'accumulation cellulaire de cette sous-unité. La souche résultante, FUD16 $nccl$, n'accumule, ni la sous-unité α , ni la sous-unité β , bien que leur synthèse soit toujours détectable. Ce résultat indique que la diminution du taux de synthèse de sous-unités α modifiées en positions 189/191, diminue la probabilité d'une association rapide avec la sous-unité β , favorisant ainsi les processus de dégradation protéolytique des sous-unités non assemblées.

3 — *Effet du cyanure sur les transitions d'état* (F.-A. WOLLMAN en collaboration avec P. GANS, CEN de Grenoble)

L'appareil photosynthétique des algues vertes et plantes supérieures peut modifier son organisation supramoléculaire dans la membrane thylacoïdale. Dans l'état 1, l'antenne principale et le complexe cytochrome *b6f* sont étroitement associés au PSII, tandis qu'ils interagissent plus étroitement avec le PSI dans l'état 2. Ces changements d'organisation sont gouvernés par une phosphorylation réversible de protéines membranaires due à l'action combinée d'une kinase activable et d'une phosphatase. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, ces chercheurs ont montré que le cyanure, dans la gamme 50-500 μ M, provoque, *in vivo*, une transition vers l'état 2, confirmant leurs travaux antérieurs sur l'effet métabolique d'une inhibition de la production d'ATP mitochondrial. Par contre vers 20mM, le cyanure provoque un passage à l'état 1. Ces chercheurs ont démontré que cet effet, également observé *in vitro* sur thylacoïdes isolés, provient d'une inhibition par le cyanure de la kinase responsable de la transition à l'état 2.

B) *Etude de la différenciation cellulaire*

1 — *Etude de la gamétogénèse de C. reinhardtii : identification d'une L amino-acide oxydase produite au cours d'une carence en azote* (L. BULTÉ, O. VALLON et F.-A. WOLLMAN)

Devant une carence en ammonium, les cellules végétatives haploïdes de *C. reinhardtii* se différencient en gamètes susceptibles de fusionner avec des gamètes de signe sexuel opposé, pour former des zygotes diploïdes dont la plupart passeront par une phase de division méiotique.

Un nouveau polypeptide M α de 63kDa apparaît au cours de la gamétogénèse à mesure que le complexe cyt b₆f est détruit (voir rapports antérieurs).

Le complexe protéique M, associant plusieurs exemplaires de M α et une autre sous-unité M β , se révèle être une L amino-acide oxydase périplasmique 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.

Mettant à profit la découverte de cette activité L-amino acide oxydase en carence azoté, ces chercheurs ont démontré que les gamètes de *Chlamydomonas reinhardtii* peuvent croître en présence d'amino acides exogènes comme seule source d'azote, à la même vitesse que les cellules végétatives en présence d'ammonium. Ces cellules en division continue conservent les propriétés sexuelles des gamètes.

PUBLICATIONS

Références de publications citées sous presse dans le rapport 1993

J.-L. POPOT. « Integral membrane protein structure : transmembrane α -helices as autonomous folding domains ». *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1993, **3**, 279-296.

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.*, 1993, **215**, 3571-3600.

P. JOLIOT. « Earlier researches on the mechanism of oxygen evolution : a personal account ». *Photosynthesis Research*, 1993, **38**, 214-223.

J. LAVERGNE & W. JUNGE. « Proton release during the redox cycle of the water oxidase ». *Photosynthesis Research.*, 1993, **38**, 279-296.

Nouvelles publications

A. ATTEIA. « Identification of mitochondrial respiratory proteins from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* ». *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 1994, **317**, 11-19.

F. SAMATEY, G. ZACCAI, D.M. ENGELMAN, C. ETCHEBEST & J.-L. POPOT. « Rotational orientation of transmembrane α -helices in Bacteriorhodopsin. A neutron diffraction study ». *J. Mol. Biol.*, 1994, **236**, 1093-1104.

P. TUFFERY, C. ETCHEBEST, J.-L. POPOT & R. LAVERY. « Prediction of the positioning of the seven transmembrane α -helices of Bacteriorhodopsin. A molecular simulation study ». *J. Mol. Biol.*, 1994, **236**, 1105-1122.

C. BREYTON, C. de VITRY & J.-L. POPOT. « Membrane association of cytochrome b_6f subunits. The Rieske iron-sulfur protein from *Chlamydomonas reinhardtii* is an extrinsic protein ». *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 7597-7602.

C. de VITRY. « Characterization of the gene of the chloroplast Rieske iron-sulfur protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. Indications for an uncleaved lumen targeting sequence ». *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 7603-7609.

R. KURAS & F.-A. WOLLMAN. « The assembly of cytochrome b_6f complexes : an approach using genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* ». *EMBO J.*, 1994, **13 no 5**, 1019-1027.

P. JOLIOT and A. JOLIOT. « Mechanism of electron transfer in the cytochrome b/f complex of algae : Evidence for a semiquinone cycle ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 1034-1038.

F. RAPPAPORT, M. BLANCHARD-DESCE & J. LAVERGNE. « Kinetics of electron transfer and electrochromic change during the redox transitions of the photosynthetic oxygen-evolving complex ». *Biochim. Biophys. Acta.*, 1994, **1184**, 178-192.

D.K. KRAMER, A. JOLIOT, P. JOLIOT & A. CROFTS. « Competition among plastoquinol and artificial quinone/quinol couples at the quinol oxidizing site of the cytochrome bf complex ». *Biochim. Biophys. Acta.*, 1994, **1184**, 251-262.

R. DELOSME, D. BÉAL & P. JOLIOT. « Photoacoustic detection of flash-induced charge separation in photosynthetic systems. Spectral dependence of the quantum yield ». *Biochim. Biophys. Acta.*, 1994, **1185**, 56-64.

P. JOLIOT, A. VERMÉGLIO & A. JOLIOT. « Organization of electron transfer pathway and supercomplexes », dans *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, (R.E. Blankenship & M.T. Madigan, eds) *Advances in Photosynthesis*, Kluwer Acad. Publ. (à paraître).

P. BENNOUN. « Chlororespiration revisited : mitochondrial interactions in *Chlamydomonas* ». *Biochim. Biophys. Acta.*, 1994, **1186**, 59-66.

J. LAVERGNE & J.M. BRIANTAIS. « Oxygenic photosynthesis : the light reaction ». Dans *The Series Advances in Photosynthesis*, Kluwer Acad. Publ. (à paraître).

N. STURM, R. KURAS, S. BUSCHLEN, W. SAKAMOTO, L. KINDLE, D. STERN & F.-A. WOLLMAN. « The *petD* gene is transcribed by functionally redundant promoters in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *J. Mol. Cell. Biol.* (à paraître).

THÈSES

Ariane ATTEIA. « Contribution à l'étude des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* », soutenue le 26 avril 1994, Paris VII.

Fabrice RAPPAPORT. « Les libérations de protons associées au fonctionnement du système de dégagement d'oxygène du photosystème II de la photosynthèse », soutenue le 17 mai 1994, Paris VI.

CONGRÈS

Juin 1993-Juin 1994

Conférence Jacques MONOD. « Protein-Protein Interactions in the Photosynthetic Apparatus ». Aussois, 27 juin-2 juillet 1993.

Conférences de P. JOLIOT. « Restricted diffusion and supercomplexes », et de J.-L. POPOT. « Protein/protein interactions in the b_6f complex from *Chlamydomonas reinhardtii* » .

Affiches de C. BREYTON, C. de VITRY, Y. PIERRE & J.-L. POPOT : « Membrane association of cytochrome b_6f subunits : the Rieske iron-sulfur protein from *Chlamydomonas reinhardtii* is an extrinsic protein », et de R. KURAS and F.-A. WOLLMAN. « The assembly of cytochrome b_6f complexes : an approach using genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* » .

22nd FEBS Meeting. Stockholm, 4-9 Juillet 1993. Affiche de O. VALLON, L. BULTÉ, J. OLIVE et F.-A. WOLLMAN. « The periplasmic amino-acid oxidase of *Chlamydomonas reinhardtii* » .

Satellite Meeting « Molecular and mechanistic links between photosynthetic and respiratory electron-transfer complexes in oxygenic and anoxygenic phototrophs ». Gmunden, Autriche, 1-5 août 1993. Conférence de P. BENNOUN. « Effect of myxothiazol on chlororespiration in *Chlamydomonas reinhardtii* » .

Gordon Research Conference « Photosynthetic Biochemical Aspects ». New Hampshire, USA, 2-6 août 1993. Conférence de F.-A. WOLLMAN « Study of Cytochrome b_6f assembly » .

Affiche de P. JOLIOT & A. JOLIOT. « Mechanism of electron transfer in the cytochrome b/f complex of algae : evidence for a semiquinone cycle » .

Workshop on structure-function of ion-translocating complexes ». Fribourg, Allemagne, 3-7 octobre 1993. A. ATTEIA.

Complex structures and their functional implications. Autrans, 7-11 octobre 1993. Conférence de J.-L. POPOT. « Structure prediction of membrane proteins ». Affiche de F.A. SAMATEY, C. ETCHEBEST, G. ZACCAI & J.-L. POPOT.

Journées de l'ARSEP, Paris, décembre 1992 « Protéolipide majeur de la myéline et maladie de Pelizaeus-Merzbacher : l'apport de la modélisation moléculaire ». Affiche de F.A. SAMATEY & J.-L. POPOT).

Congrès du Groupe Français de Bioénergétique « Systèmes solubles et membranaires. Conversion d'Energie ». Presqu'île de Giens, 11-13 octobre 1993. Conférence de F.A. WOLLMAN. « Régulation de l'expression génétique dans le chloroplaste de *Chlamydomonas reinhardtii* ».

Second Nordic Congress on Photosynthesis. Oslo, 4-6 novembre 1993. Conférence de J. LAVERGNE. « Photosystem II and related systems ».

Biochemical Society Meeting on Photosynthetic Oxygen Evolution, Londres, 20-22 décembre 1993. Affiche de F. RAPPAPORT, M. BLANCHARD-DESCE & J. LAVERGNE « Proton release and the electrostatics of the water splitting enzyme of PSII ».

Gordon Conference « Protons and Membrane Reactions ». Ventura, USA, 30 janvier-4 février 1994. Affiche de F. RAPPAPORT « Proton release and the electrostatics of the water-splitting enzyme ».

Réunion Scientifique de l'Association de la Montagne Sainte-Geneviève « Des Films Moléculaires aux Biomembranes ». Paris, 6 et 7 mai 1994. Conférences de J. LAVERGNE « Transport d'électrons par la plastoquinone dans la membrane photosynthétique » et de J.-L. POPOT « Repliement des protéines transmembranaires ; approches expérimentales et analyse des séquences ». Affiche de C. BREYTON, C. de VITRY, Y. PIERRE et J.-L. POPOT « Membrane association of cytochrome b_f subunits : the Rieske iron-sulfur protein from *C. reinhardtii* is an extrinsic protein ».

Réunion de la Société Française de Biophysique « Membranes Naturelles, Membranes Artificielles ». Montpellier, 7 juin 1994. Conférence de P. JOLIOT « Les membranes dans les appareils convertisseurs d'énergie ».

Fourth International Congress Plant Molecular Biology. Amsterdam, 19-24 juin 1994. Affiche de C. de VITRY, C. BREYTON, Y. PIERRE, J.-L. POPOT, F.-A. WOLLMAN & J. OLIVE. « Nuclear-encoded subunits of cytochrome b_f : membrane association, targeting and evolution ».