

Bioénergétique cellulaire

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

Le cours de cette année, suite du cours de l'année dernière, a porté sur l'étude de l'organisation supramoléculaire des appareils convertisseurs d'énergie impliqués dans la synthèse de l'adénosine-tri-phosphate (ATP). L'accent a été mis sur l'étude de la structure de l'appareil photosynthétique oxygénique des algues vertes et des plantes supérieures.

La première partie du cours a porté sur l'étude de l'organisation à l'échelle subcellulaire du réseau membranaire, complexe dans lequel sont intégrés les chaînes de transfert d'électrons et les complexes collecteurs de l'énergie lumineuse. Ce réseau est formé par un ensemble de vésicules membranaires fermées aplaties (thylacoïdes) qui sont localisées au sein des chloroplastes, organites spécialisés possédant un large degré d'autonomie sur le plan génétique. L'analyse par microscopie électronique en coloration négative de coupes de chloroplastes fait apparaître une alternance de zones membranaires bien distinctes. On observe d'une part des cylindres d'environ 500 nm de diamètre, constitués par un empilement de 20 à 30 vésicules fortement accolées. Ces empilements sont associés à un second réseau de membranes, non accolées, directement en contact avec le stroma incolore qui contient les enzymes solubles impliqués dans l'assimilation du gaz carbonique. L'analyse fonctionnelle montre que les bicouches lipidiques et l'espace intérieur des vésicules des membranes accolées et non accolées sont connectés les uns aux autres. Le mode de connexion entre membranes ne peut être établi sur la base d'une image à deux dimensions obtenue à partir d'une coupe de chloroplaste. Seule l'étude de coupes sériées permet de proposer une image de la structure tridimensionnelle du chloroplaste (Brangeon et Mustardy). On observe que les membranes stromales s'enroulent en spirale autour des cylindres granaires. Les deux réseaux membranaires seraient interconnectés au niveau des intersections entre la spirale stromale et les empilements membranaires. L'élimination des cations divalents du milieu de suspension induit un profond bouleversement de l'architecture du chloroplaste. Les structures gra-

naires disparaissent et les membranes s'organisent sous la forme d'un réseau homogène de membranes non accolées. Ce processus est réversible, et l'addition de cations divalents permet de reconstituer une structure proche de la structure initiale. Il apparaît donc que la reconstitution de la structure native de l'appareil chloroplastique met en jeu un processus purement physicochimique, conduisant à un état d'énergie potentielle minimum. Contrairement aux hypothèses les plus couramment admises, il semble donc que la séquence d'événements observée lors de la biosynthèse du chloroplaste ne soit pas indispensable à l'élaboration des structures tridimensionnelles du réseau membranaire.

Barber et collaborateurs ont établi que les ions divalents, en se fixant à proximité des charges négatives présentes à la surface des protéines membranaires, diminuaient les forces de répulsion électrostatique, facilitant ainsi l'accolement des membranes. La théorie de Gouy-Chapman, qui rend compte des interactions entre surfaces chargées électriquement, peut être transposée au cas des membranes photosynthétiques. Cette théorie permet de prévoir quantitativement les effets relatifs de l'addition d'ions mono ou divalents sur l'accolement des membranes.

La seconde partie du cours a porté sur l'étude de la répartition des principaux constituants des membranes intrachloroplastiques entre les zones granaires et stromales. La phase lipidique est essentiellement constituée par des glycolipides non chargés. Ces lipides ne se rencontrent que dans les membranes photosynthétiques des organismes oxygéniques. On ignore si ces lipides ont un rôle fonctionnel significatif ou s'ils représentent un caractère hérité d'un ancêtre commun à tous les organismes oxygéniques. Les chaînes hydrophobes de lipides chloroplastiques comportent une proportion élevée d'acides gras polyinsaturés. La géométrie de ces chaînes est génératrice de désordre et explique pourquoi ces lipides dispersés dans l'eau ne s'organisent pas en bicouches. Le degré d'ordre nécessaire à la formation de membrane est imposé par les protéines membranaires qui représentent, en masse et en surface occupée, le composant majoritaire des thylacoïdes.

La mise en évidence d'une ségrégation éventuelle des différentes espèces de lipides au sein des membranes photosynthétiques a fait l'objet de très nombreux travaux. Une analyse critique des résultats souvent contradictoires obtenus ne permet pas de dégager des conclusions définitives quant à l'existence d'une ségrégation latérale qui pourrait être corrélée à la présence de zones accolées ou non accolées. La situation est différente en ce qui concerne les protéines transmembranaires dont la répartition est très hétérogène. Les centres photochimiques du système II sont localisés majoritairement dans les empilements granaires, alors que le photosystème I est localisé dans les membranes stromales non accolées. Seuls les complexes cytochrome b/f, qui participent au transfert d'électrons entre les deux systèmes photochimiques, sont répartis d'une manière homogène entre zones accolées et non accolées. On observe également que l'ATP synthase est exclusivement localisée dans les régions stromales. En l'ab-

sence de cations divalents, le désaccolement des membranes granaires s'accompagne d'une redistribution des complexes membranaires qui se répartissent uniformément sur l'ensemble des membranes chloroplastiques. Il s'agit d'un processus réversible dans la mesure où l'addition de cations divalents induit une ségrégation des protéines membranaires, associée à la reconstitution de la structure tridimensionnelle native.

De nombreuses études structurales biochimiques et fonctionnelles ont porté sur la localisation des complexes chlorophylle/protéine impliqués dans la collection de l'énergie lumineuse (antenne collectrice) et qui occupent une fraction importante de la surface membranaire. On peut distinguer deux types de complexes collecteurs de lumière : une première classe de complexes, comportant 40 à 90 chlorophylles, sont associés irréversiblement à chacun des deux types de centres photochimiques et constituent l'antenne cœur. La répartition de ces antennes cœur au sein des membranes chloroplastiques est donc strictement corrélée à celle des centres photochimiques. Une seconde classe de complexes collecteurs est constituée d'une dizaine de polypeptides transmembranaires de faible poids moléculaire (LHC), codés au niveau du génome nucléaire. Ces complexes comportent chacun une douzaine de pigments, et représentent une famille de polypeptides dont les structures primaires et secondaires sont analogues et qui dérivent tous d'un ancêtre commun. La structure de ces polypeptides a été récemment résolue à l'échelle atomique par W. Kühlbrandt, sur la base d'une analyse par diffraction électronique de cristaux à deux dimensions. Plusieurs de ces polypeptides sont associés d'une manière irréversible à chacun des deux types de complexes photochimiques. Deux de ces polypeptides (LHC II), qui représentent environ 50 % de l'appareil collecteur d'énergie, sont organisés en trimères. Suivant les conditions physiologiques, les complexes LHC II peuvent s'associer à l'un ou l'autre des photosystèmes et jouent à ce titre un rôle essentiel dans la régulation de l'alimentation en énergie lumineuse des centres photochimiques I et II. Ces processus de régulation impliquent obligatoirement que les trimères, formés par les complexes LHC II, puissent se déplacer latéralement sur plusieurs centaines de nanomètres, distance qui sépare les zones membranaires accolées des zones désaccollées. L'étude de ces processus de régulation fait l'objet de très nombreux travaux mettant en œuvre un arsenal des techniques fonctionnelles, ultrastructurales et biochimiques. Bennet et Allen ont établi que le mouvement des antennes collectrices était contrôlé par l'état de phosphorylation de résidus thréonine ou sérine appartenant aux polypeptides du LHC II. La phosphorylation, ou la déphosphorylation, des polypeptides est catalysée par des kinases et des phosphatases dont l'activité enzymatique dépend de l'état redox d'un des transporteurs clef de la chaîne de transfert d'électrons : la plastoquinone. Il apparaît également que le complexe cytochrome b/f joue un rôle essentiel dans le contrôle de ces processus de régulation.

La dernière partie du cours a porté sur l'analyse de l'organisation supramoléculaire des complexes membranaires au sein de la membrane photosynthétique.

En ce qui concerne les régions granaires, une analyse critique des données ultra-structurales et biochimiques permet de conclure que les centres photochimiques forment des dimères dont la stabilité est suffisante pour qu'ils puissent être extraits intacts de la membrane. Aux dimères de centres photochimiques sont associés les antennes-cœur, puis huit polypeptides de type LHC disposés symétriquement par rapport au centre du dimère. On peut supposer que des interactions spécifiques entre les différents complexes donnent naissance à un édifice supramoléculaire dont la structure est reproductible. En contact avec cet édifice sont disposés les nombreux trimères formés par les polypeptides du LHC II. Les associations entre trimères et complexes photochimiques sont vraisemblablement moins spécifiques et autorisent un certain degré de désordre. Ces antennes périphériques représenteraient un domaine commun à plusieurs dimères et assureraient ainsi une libre circulation de l'énergie d'excitation électronique sur des surfaces membranaires de grande dimension.

L'ensemble des informations structurales et fonctionnelles actuellement disponibles montrent clairement que les interactions électrostatiques entre sites protéiques chargés négativement jouent en rôle central dans l'organisation à la fois statique et dynamique des membranes photosynthétiques, depuis l'échelle moléculaire jusqu'à l'échelle cellulaire. Ces interactions s'exercent aussi bien dans un plan perpendiculaire à la membrane, en modulant les processus d'accolements membranaires, que dans un plan parallèle à la membrane, en contrôlant les associations ou dissociations entre protéines membranaires.

P.J.

SÉMINAIRES

Siriam SUBRAMANIAM, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA.
« *Mechanism of light transduction by bacteriorhodopsin* ».

Frauke BAYMANN, Institut für Biophysik und Strahlenbiologie, Fribourg, Allemagne. « *Spectroscopic and electrochemical investigations of Cytochrome b_6 complex from Rhodobacter capsulatus* ».

Richard KURAS, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris. « *Etude de l'assemblage du complexe cytochrome b_6 -f. Une approche par transformation biolittique de l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii* ».

Klaus BRETTEL, Centre d'Etudes de Saclay. « *La recombinaison de la paire primaire dans le photosystème II : caractérisation cinétique et spectrale* ».

Lise CARON, Ecole Normale Supérieure, Paris. « *Structure du complexe collecteur de lumière des algues à Fucoxanthine : rôles des Xanthophylles* ».

René DELOSME, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris. « *Transferts d'excitation dans la photosynthèse : étude par spectroscopie photoacoustique* ».

David KLUG, Imperial College, Londres. « *Does Femtosecond spectroscopy tell us anything useful about photosystem II ?* ».

I. — BIOÉNERGÉTIQUE

A) *Mise au point d'une technique spectrophotométrique permettant l'analyse des processus de transfert d'électrons à des températures comprises entre + 40° et - 60°* (D. BÉAL et P. JOLIOT)

Une nouvelle technique spectrophotométrique mettant en œuvre des éclaircs détecteurs monochromatiques a été développée par D. Béal et P. Joliot. Cette technique est particulièrement adaptée à la mesure des réactions de transfert d'électrons se produisant dans différents types de matériel photosynthétique ou à la détection de changements d'absorption photoinduits sur tout matériel photosensible (hémoprotéines, par exemple), à des températures inférieures à 0°.

Les cuves de référence et de mesure, dont l'épaisseur est de 0,2 mm et la surface de 2 cm², sont appliquées sur un dispositif à effet Peltier (« frigatron ») qui permet de contrôler la température de l'échantillon.

D'une manière inattendue, les échantillons placés dans les cuves restent à l'état liquide à des températures atteignant - 12°, même en l'absence de composés anti-gel. La durée de vie de cet état de surfusion dépasse 1 heure à - 10° et atteint plusieurs minutes à - 13°.

Cette nouvelle technique, dont la sensibilité est de l'ordre de 5.10⁻⁶ unités d'absorption, ouvre des perspectives particulièrement intéressantes pour l'étude à basse température de différents matériels biologiques photosensibles, en milieu liquide ou gelé.

B) *Organisation de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons chez les bactéries pourpres*

Dans un travail antérieur, effectué en collaboration avec A. Verméglio au Centre d'Etudes de Cadarache, P. Joliot 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 de supercomplexe, comportant deux centres réactionnels et un complexe cytochrome (cyt) b/c_1 . Une molécule de cytochrome c_2 est piégée à l'intérieur de ce supercomplexe et assure le transfert d'électrons entre les composants de la chaîne haut potentiel du complexe cyt b/c_1 (cytochrome c_1 et protéine de Rieske) et le donneur primaire des centres photochimiques (P870).

Les processus de transfert d'électrons ont été analysés sur différentes espèces de bactéries pourpres à des températures comprises entre 20° et -30°, grâce à la nouvelle technique spectrophotométrique décrite au paragraphe I.

Dans le cas des cellules vivantes de *Rb. sphaeroides*, les cinétiques de transfert d'électrons se produisant entre les donneurs secondaires (cytochromes c_2 et c_1) et primaire (P) ont été analysées à des températures comprises entre 20° et -12°. Lorsque l'échantillon reste à l'état liquide, l'énergie d'activation du processus est faible (30 kcal). La congélation de l'échantillon induit un ralentissement proche d'un facteur 50 de la vitesse de réduction du donneur primaire, ainsi qu'une augmentation spectaculaire de l'énergie d'activation de ce processus (environ 120 kcal). Cependant, la totalité des charges positives formées au niveau des centres réactionnels par un éclair saturant peut toujours être transférée vers le complexe cyt b/c_1 . Ce transfert implique un va-et-vient du cytochrome c_2 entre deux complexes membranaires. De plus, les réactions de transfert d'électrons et de protons se produisant au niveau du complexe cyt b/c_1 restent fonctionnelles. On observe, en particulier, que la phase électrogénique associée à l'oxydation de l'ubiquinol au site Qo du complexe cyt b/c_1 — et qui traduit un transfert transmembraire d'électrons et de protons — conserve une amplitude identique à celle mesurée à l'état liquide. Après congélation, l'ensemble des réactions de transfert d'électrons dans la chaîne photosynthétique est essentiellement limité par la vitesse de formation d'un complexe entre le cytochrome c_2 et le centre réactionnel, et non par la vitesse de diffusion du cytochrome c_2 ou par la vitesse d'association du cytochrome c_2 avec le complexe cyt b/c_1 . Ces résultats s'inscrivent parfaitement dans le cadre de l'hypothèse des supercomplexes, qui implique que le transfert d'électrons entre centres réactionnels, complexes cyt b/c_1 et cytochrome c_2 ne nécessite qu'un faible déplacement du cytochrome c_2 dont la vitesse ne serait que peu perturbée par la congélation. La formation d'un complexe entre le cytochrome c_2 et le centre réactionnel serait fortement ralentie par la présence d'une couche de glace à proximité de la membrane. Un comportement totalement différent a été observé dans le cas de la bactérie *Rhodospirillum rubrum* où le cytochrome c_2 n'est pas piégé au sein de supercomplexes. Dans ce cas, la congélation du milieu induit une diminution de la vitesse de transfert d'électrons entre donneur primaire et cytochrome c_2 et une diminution corrélée de la fraction des centres réactionnels susceptibles d'interagir avec le cytochrome c_2 . Le fait que la congélation ne bloque pas totalement l'oxydation du cytochrome c_2 montre cependant que cette petite molécule hydrosoluble peut encore se déplacer sur de courtes distances. Il est donc probable qu'une couche d'eau

liquide, dont l'épaisseur serait à l'ordre de grandeur du diamètre de la molécule de cytochrome c_2 , s'interpose entre la membrane et la couche de glace.

C) *Caractérisation fonctionnelle d'un mutant de Chlamydomonas reinhardtii déficient en une petite protéine extrinsèque associée au centre réactionnel du photosystème I* (F. RAPPAPORT, Y. CHOQUET, P. JOLIOT, en collaboration avec J. FARAH et J.-D. ROCHAIX, Département de Biologie Moléculaire de l'Université de Genève)

Le rôle d'un polypeptide de petite dimension (Psaf), associé au centre réactionnel du photosystème I sur la face lumenale du complexe, a pu être élucidé en caractérisant les propriétés fonctionnelles d'un mutant déficient en Psaf, obtenu par J. Farah et J.-D. Rochaix. La cinétique de réduction du donneur primaire du photosystème I (P700) a été analysée en mesurant le nombre de séparations de charges induites par un éclair saturant, mesure effectuée en condition d'anaérobiose sur des cellules vivantes de *Chlamydomonas reinhardtii*. Le nombre de séparations de charges est proportionnel au potentiel transmembranaire photo-induit par un éclair de courte durée et traduit par un changement d'absorption électrochromique mesuré à 515 nm. Dans le cas de la souche sauvage, la réduction de P700 est extrêmement rapide ($t_{1/2} \approx 4 \mu\text{sec}$) et correspond à un transfert d'électrons se produisant au sein d'un complexe associant le donneur secondaire (plastocyanine) et P700. Dans le cas du mutant déficient en Psaf, le demi-temps de réduction de P700 (1,2 ms) est environ 300 fois plus long que dans le cas de la souche sauvage. L'interprétation la plus probable est que le polypeptide Psaf est impliqué dans la stabilisation du complexe associant la plastocyanine et le centre réactionnel PSI. En son absence, la plastocyanine ne serait pas associée de manière stable au centre réactionnel. La vitesse de réduction de P700 serait alors limitée par une réaction collisionnelle, impliquant la formation d'un complexe de courte durée de vie.

D) *Systèmes de dégagement d'oxygène* (J. LAVERGNE et F. RAPPAPORT)

La formation d'une molécule d'oxygène à partir de deux molécules d'eau nécessite l'extraction de quatre électrons et de quatre protons. Les quatre équivalents oxydés sont formés séquentiellement par quatre rotations photochimiques successives du centre PS II, qui peuvent être largement séparées dans le temps, et leur mise en œuvre concertée intervient après la dernière étape d'oxydation déclenchant l'émission d'oxygène.

Les travaux de Lavergne et Rappaport ont porté au cours des années précédentes sur les problèmes de libération des protons : les stoechiométries (et leur dépendance en fonction du pH) et les cinétiques des déprotonations intervenant lors de chaque transition. Les développements récents concernent principalement l'étude des conséquences électrostatiques de ces déprotonations, analysées par le biais d'effets électrochromiques locaux. En effet, dans les régions des pics

d'absorption de la chlorophylle (autour de 435 nm et 680 nm), les mouvements de charges (électrons et protons) intervenant sur le côté donneur du PS II se manifestent par des déplacements spectraux (effet Stark).

L'hypothèse favorisée par ces auteurs était que la « sonde » électrochromique sensible à l'oxydation de la tyrosine Y_Z n'était autre que la chlorophylle-donneur primaire, P-680. Une collaboration avec l'équipe de B. Diner (Wilmington, USA) a permis de tester cette hypothèse. Cette équipe a obtenu par mutagenèse dirigée un mutant de cyanobactérie où le spectre (bande de Soret) de P-680 se trouve être décalé de 2,5 nm vers les courtes longueurs d'onde par rapport à celui du sauvage. Des préparations de particules-cœur PS II du sauvage et du mutant ont été confiées à J. Lavergne qui a pu comparer les spectres électrochromiques associés à Y_Z^+ . Il s'est avéré que ces spectres manifestaient le même décalage que les spectres de P-680, ce qui est un argument fort pour confirmer l'identification de la seconde électrochromique comme étant P-680.

E) *Induction de fluorescence et hétérogénéité du PS II*

1 — *Théorie de l'induction de fluorescence (J. LAVERGNE et H.-W. TRISSL)*

La majeure partie de la fluorescence chlorophyllienne *in vivo* est émise à partir de l'antenne du PS II. Le rendement en est fortement modulé par l'état du centre PS II. Dans l'état « fermé » du centre (accepteur Q_A réduit), le rendement (F_m) est environ quatre fois plus élevé qu'à l'état « ouvert » (F_o). La facilité de détection de la fluorescence (y compris sur des feuilles) en a fait un outil de routine pour l'observation du PS II. La cinétique de montée (« induction ») de F_o à F_m sur une illumination continue, en présence d'un inhibiteur de la réoxydation de Q_A^- (DCMU) n'est pas exponentielle, mais sigmoïde, et cette caractéristique a été l'un des arguments établissant le transfert d'excitation au sein d'une antenne pigmentaire commune à plusieurs centres PS II. L'existence d'une phase lente de l'induction a été, d'autre part, à la base de la caractérisation de l'hétérogénéité α/β du PS II.

Les connaissances, émanant de la spectroscopie pico- et femto-seconde, concernant les transferts d'excitation, les constantes de vitesse de piégeage photochimique, l'équilibre entre la paire radicalaire résultant de ce piégeage et l'exciton d'antenne, ont considérablement progressé depuis une dizaine d'années et il importait d'actualiser l'approche théorique des cinétiques d'induction de fluorescence. Le travail de Lavergne et Trissl (Osnabrück, RFA) a consisté à proposer un traitement mathématique original permettant d'aborder des modèles assez généraux de dynamique de l'excitation et de préciser le rôle des différentes constantes de vitesse estimées par les techniques de spectroscopie rapide. Il a été ainsi obtenu des expressions générales — et simples — pour la loi cinétique gouvernant l'induction, la signification de la fonction intégrale de cette cinétique (en relation avec le nombre d'électrons transférés) et la signification du para-

mètre de « sigmoidicité » des courbes (rôle des centres et de la connectivité de l'antenne). L'application aux données expérimentales permet de conclure à un modèle d'unités connectées pour le PS II, intermédiaire entre unités isolées et la totale connectivité du « lake model ».

2 — Hétérogénéité α/β (J. LAVERGNE et M. GUERGOVA)

Selon la littérature, le PS II se répartit en deux grandes catégories dites α et β . Une forte minorité (de 25 à 50 %) des centres PS II seraient de type β , dotés d'une antenne collectrice deux fois plus petite que celle du PS II — α , dont ils se distingueraient également par d'autres différences touchant au fonctionnement du centre. J. Lavergne a entrepris, avec M. Guergova, de réexaminer un certain nombre des questions fondamentales concernant la nature des centres β . Cette démarche a bénéficié du travail théorique évoqué plus haut qui a permis la réalisation d'un programme de décomposition des courbes d'induction de fluorescence. L'analyse directe des données par cette méthode s'avère beaucoup plus fiable que par les calculs d'aire utilisés jusqu'à présent. On peut résumer ainsi les résultats obtenus jusqu'à présent : (1) Les inductions de fluorescence obtenues dans la gamme des faibles concentrations de DCMU ont un caractère α pur (pas de phase lente), ce qui suggère une moindre affinité des centres β pour cet inhibiteur. (2) Le phénomène β peut-être distingué d'une troisième phase de l'induction (encore plus lente), sur la base de l'efficacité d'un éclair court et saturant. (3) Une série d'expériences destinées à tester l'idée, généralement admise, d'une différence d'antenne (taille et composition pigmentaire) entre PS II α et β ont donné des résultats négatifs, suggérant que le phénomène β repose en fait sur une hétérogénéité de centres plutôt que d'antenne. La poursuite de ce travail devrait amener ces chercheurs à formuler une interprétation nouvelle de l'hétérogénéité α/β .

F) Application de la spectroscopie photoacoustique à l'étude de la conversion d'énergie dans la photosynthèse (R. DELOSME)

Le spectromètre photoacoustique mis au point par P. Joliot et D. Béal permet de mesurer les changements de volume associés aux réactions photochimiques induites par un éclair laser monochromatique d'une durée de 3 ns. Dans l'intervalle de temps de 1 μ s actuellement exploré, ces réactions sont essentiellement la formation de la paire de radicaux $Z^+Q_A^-$ dans le photosystème II, et $P700^+$ (F_A , F_B) $^-$ dans le photosystème I. La dépendance du signal photoacoustique vis-à-vis de la température a permis à R. Delosme de déterminer séparément les deux composants 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 $\text{\AA}^3$ 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 lumineuse absorbée, cette quantité permet de mesurer le rendement énergétique de la réaction photochimique. Dans chacun des deux photosystèmes, l'énergie stockée 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 $Z^+Q_A^-$ et $P700^+$ (F_A , F_B)⁻.

1 — *Distribution de l'énergie lumineuse entre les deux photosystèmes*

En mesurant la dépendance du rendement quantique vis-à-vis de la longueur d'onde de la lumière absorbée, on peut évaluer l'efficacité des différents pigments. R. Delosme a réalisé cette étude sur diverses souches de *Chlamydomonas reinhardtii*, placées dans des conditions qui favorisent soit l'état 1 (pool de plastoquinone oxydé, forte concentration d'ATP), soit l'état 2 (pool de plastoquinone réduit, faible concentration d'ATP). Il a montré que dans la souche sauvage, la transition de l'état 1 vers l'état 2 se traduit par un changement substantiel du spectre de rendement quantique des centres PSI, preuve qu'une très importante fraction — environ 80 % — de l'antenne périphérique du PSII (LHCII) se déconnecte des centres PSII pour venir alimenter les centres PSI. Ce résultat confirme la théorie selon laquelle les transitions d'états régulent le transfert d'électrons en modifiant la distribution d'énergie entre les deux photosystèmes, contrairement à celle qui voudrait n'y voir qu'une régulation du seul photosystème 2. Le même résultat est obtenu chez les mutants dépourvus de centres PSII, prouvant alors sans ambiguïté que dans l'état 2, la quasi-totalité du LHCII se connecte aux 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, quelles que soient les conditions. Ce résultat confirme l'implication du complexe cyt b/f dans la mobilité du LHCII.

2 — *Fonctions des caroténoïdes*

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, valable dans toutes les espèces étudiées (plantes supérieures, algues vertes, algues rouges, bactéries pourpres), 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. Il semble que dans le photosystème II, les xanthophylles de l'antenne périphérique (lutéine) assurent la pre-

mière fonction (transfert d'énergie efficace vers les chlorophylles), tandis que le carotène proche du centre réactionnel assurerait la seconde (avec un faible rendement de transfert à la chlorophylle). Une étude analogue est en cours pour le photosystème I, dans lequel des caroténoïdes interviennent à nettement plus grande longueur d'onde que dans le photosystème II. Devant la complexité des spectres de rendement quantique, due à la multiplicité des holochromes présents dans l'ensemble de l'appareil photosynthétique, D. Béal et R. Delosme ont été amenés à mettre au point un programme informatique qui permet de déconvoluer ces spectres en leurs différents composants (quantité et efficacité de transfert), à partir des spectres d'absorption des différents holochromes.

II. — STRUCTURE ET REPLIEMENT DES PROTÉINES

A) Purification et étude structurale du complexe cytochrome b_6f de *Chlamydomonas reinhardtii*

1 — Purification du complexe ; composition et masse moléculaire (Y. PIERRE, C. BREYTON, C. TRIBET, J.-L. POPOT)

Un protocole de purification permettant la préparation de cytochrome b_6f hautement purifié à partir de membranes thylacoidales de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* a été mis au point (Pierre *et al.*, 1995) (voir rapport précédent). Le complexe b_6f purifié catalyse le transfert d'électrons entre un donneur, le décylplastoquinol, et un accepteur, la plastocyanine. Ce transfert est bloqué par la C_{13}^- stigmatelline (1 μ M). Les préparations comportent 7 sous-unités (cytochrome f , cytochrome b_6 , protéine de Rieske, sous-unité IV, et trois mini-sous-unités comprenant chacune moins de 40 résidus, PetG, PetX et PetL. Chaque sous-unité est vraisemblablement présente en un exemplaire par monomère de b_6f .

La caractérisation spectroscopique du complexe purifié est en cours : spectres d'absorption (Pierre *et al.*, 1995), dichroïsme linéaire (coll. avec B. Schoepp et A. Verméglio, CEA Cadarache), spectroscopie Raman (coll. avec B. Robert, CEA Saclay). Les potentiels redox des trois hèmes ont été déterminés (coll. avec D. Kramer, Univ. of Illinois) (Pierre *et al.*, 1995).

2 — Séquences (Y. PIERRE, C. DE VITRY, J.-L. POPOT)

Des séquences protéiques N-terminales ou internes ont été déterminées pour le cytochrome f et pour la protéine de Rieske, ainsi que la séquence complète de la sous-unité PetX (Pierre & Popot, 1993 ; Pierre *et al.*, 1995 ; de Vitry *et al.*, 1995). Les séquences N-terminales définissent les sites de maturation de ces deux protéines. Après synthèse de sondes oligonucléotidiques basées sur les données de séquence protéique de la protéine de Rieske, 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, Université de Genève). La séquence du gène (nucléaire) de la protéine de Rieske a ainsi pu être établie (de Vitry, 1994). La même approche a récemment permis le clonage et le séquençage du gène codant pour la sous-unité PetX (de Vitry *et al.*, 1995).

3 — *Mode d'association de la protéine de Rieske et des sous-unités PetG, PetL et PetX avec le complexe* (C. BREYTON, C. DE VITRY, J.-L. POPOT)

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 (Breyton *et al.*, 1994). 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 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 lauryl-maltoside) et migre sur tamis moléculaire et lors d'ultracentrifugations comme un monomère de masse moléculaire $20,0 \pm 1,7$ kDa, en bon accord avec la masse de 18,5 kDa calculée à partir de la séquence. La confrontation des données biochimiques (Breyton *et al.*, 1994) et des données de séquence (de Vitry, 1994) 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.

La même approche a permis de conclure que les sous-unités PetG (Breyton *et al.*, 1994), PetL (Takahashi *et al.*, 1995) et PetX (de Vitry *et al.*, 1995) étaient des protéines intégrales. Chacune d'entre elles représente un exemple de ces protéines constituées essentiellement d'une hélice transmembranaire, dont l'existence est un argument très fort en faveur de l'idée d'autonomie de repliement de ces hélices (Popot, 1993) et du « microassemblage » des régions transmembranaires (Popot & de Vitry, 1990).

4 — *Présence d'une molécule de chlorophylle a au sein du complexe b_6f* (Y. PIERRE, C. BREYTON, J.-L. POPOT).

La plupart des préparations de cytochrome b_6f décrites dans la littérature (cytochrome b_6f de plantes supérieures ou de Cyanophycées) contiennent de la chlorophylle. Nous avons également observé que même des préparations très pures biochimiquement (sur la base de leur composition polypeptidique) de cytochrome b_6f de *C. reinhardtii* sont « contaminées » par de la chlorophylle *a*. Diverses observations, dont certaines encore préliminaires, nous ont amenés à

conclure que celle-ci est un composant authentique du complexe. Sa fonction éventuelle est en cours d'examen.

5 — *Purification à grande échelle, reconstitution et cristallisation* (Y. PIERRE, C. BREYTON, D. PICOT, J.-L. POPOT)

Nous avons mis au point la reconstitution du cytochrome b_6f purifié dans des vésicules lipidiques (C. Breyton, non publié). Ce protocole a permis d'effectuer des reconstitutions et co-reconstitutions destinées aux mesures de dichroïsme linéaire et à la microscopie électronique. Il sera également utilisé pour les expériences de pontage en milieu hydrophobe.

L'adaptation du protocole de purification à l'obtention de plus grandes quantités de complexe purifié (dizaines de milligrammes) est en cours de mise au point : culture de *C. reinhardtii* en grand volume (coll. avec Y. Le Gall, Concarneau), purification du complexe b_6f sur gradient de saccharose dans des rotors à angle fixe, recherche de tensioactifs meilleur marché. Deux programmes de cristallo-genèse ont pu être lancés. Le premier programme a permis d'obtenir des objets cristalloïdes, dont nous ignorons actuellement s'ils diffractent les électrons (D. Picot et J.-L. Popot, résultats non publiés). Le second programme, conduit en collaboration avec G. Mosser et J.-L. Rigaud (Institut Curie), est dirigé vers l'obtention de cristaux bidimensionnels dans un système reconstitué. Des cristaux de grande taille (plusieurs microns) ont été obtenus, qui diffractent à 18 Å après coloration négative mais sont constitués de plusieurs couches de molécules. Leur amélioration est en cours.

B) *Mise au point d'un nouveau type d'agent pour le maintien et la manipulation en solution des protéines membranaires intégrales : les amphiphiles polymères* (C. TRIBET, J.-L. POPOT)

En collaboration avec le laboratoire de Physicochimie Macromoléculaire de R. Audebert (ESPCI), nous avons entrepris de développer une famille de composés qui constitue une alternative potentiellement très intéressante aux détergents classiques. Il s'agit de polymères synthétiques amphiphiles, constitués d'un squelette de poly-acrylate sur lequel sont greffées des chaînes alkyle (Petit *et al.*, 1995). Ces molécules ont été conçues pour pouvoir s'adsorber à la surface hydrophobe des régions transmembranaires de protéines intégrales, comme le font les détergents classiques. Toutefois, à la différence de ceux-ci, leur constante de dissociation est extrêmement faible, de sorte qu'en l'absence de compétition avec un détergent classique l'adsorption est irréversible. La protéine peut donc être manipulée en solution aqueuse, en l'absence de tensioactif libre, comme une protéine soluble. Nous avons validé cette approche en montrant qu'elle permettait de maintenir en solution aqueuse le cytochrome b_6f en l'absence de détergent ou

de polymère libre (C. Tribet, R. Audebert & J.-L. Popot, résultats non publiés). Le complexe ainsi formé comporte un dimère de cytochrome b_6f , d'une masse moléculaire de 210 kDa, associé à 50 kDa de polymère. Il est intact, monodisperse, fonctionnel et stable sur une période d'au moins deux semaines. Par comparaison, la masse de détergent classique (laurylmaltoside) permettant de maintenir le même complexe en solution est de l'ordre de 140 kDa (Pierre *et al.*, 1995).

Cette approche a de nombreuses applications potentielles, dont l'examen fait partie de nos projets de recherches.

III. — BIOGÉNÈSE ET INTÉGRATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES DU THYLACOÏDE

A) *Expression génétique et assemblage des protéines du thylacoïde chez C. REINHARDTII*

1 — *L'ATP synthétase* [D. DRAPIER, S. KETCHNER, S. GAUDRIAULT, J. GIRARD-BASCOU, F.-A. WOLLMAN, en collaboration avec J. OLIVE (Institut Jacques Monod, Paris)]

La mutation FUD16, évoquée dans un rapport précédent, correspond à une double substitution Ile184/Asn et Asn 186/Tyr dans la séquence polypeptidique de la sous-unité α du CF1. L'accumulation spectaculaire de cette sous-unité α mutée et de la sous-unité β dans la souche FUD16, provient de la formation d'un corps d'inclusion intrachloroplastique comprenant ces deux sous-unités dans un rapport non-stoichiométrique. L'existence de corps d'inclusion dans les organelles n'avait jamais été observée antérieurement. La comparaison des propriétés de synthèse des deux sous-unités dans le mutant et dans la souche sauvage indique qu'une interaction précoce se développe au cours de leur biosynthèse.

2 — *Le complexe cytochrome b_6f*

1. *Biogénèse du cytochrome f* (R. KURAS, S. BÜSCHLEN, F.-A. WOLLMAN)

La diminution de synthèse du cytochrome f observée en l'absence de ses partenaires d'assemblage, a conduit F.-A. Wollman et collaborateurs à produire par mutagénèse dirigée des formes altérées de cytochrome f. Cette protéine est attachée à la membrane une seule hélice transmembranaire du côté C-terminal, et subit deux processus de maturation de sa séquence primaire : le clivage d'un signal d'adressage lumenal et l'association covalente d'un hème de type c. Ces auteurs ont donc constitué des souches exprimant un cytochrome f tronqué, dépourvu de son ancre transmembranaire, un cytochrome f dépourvu des cys-

téines ligands de l'hème, et un cytochrome f dépourvu de la séquence consensus AQA pour la lumenal peptidase. Des combinaisons de ces modifications ainsi que leur association à des délétions de la su.IV ont également été effectuées. Parmi les nombreuses observations issues de ces travaux, notons que contrairement aux prédictions des études cristallographiques, la fixation de l'hème et la conversion de la forme précurseur du cytochrome f sont deux mécanismes largement indépendants. L'ensemble de ces travaux conduit à proposer que le domaine C-terminal du cytochrome f exerce une régulation négative sur la poursuite de la traduction du cytochrome sur les polysomes liés aux membranes. Ce mécanisme pourrait être de portée générale puisque des épistasies dans les synthèses thylacoïdales ont été observées pour chaque complexe protéique de la photosynthèse.

En collaboration avec P. Joliot, R. Kuras et F.-A. Wollman ont montré que le cytochrome f dépourvu de l'ancre C-terminal se comporte comme un cytochrome soluble dans le lumen du thylacoïde. Cette protéine conserve des propriétés inaltérées de transfert d'électrons au photosystème I, via la plastocyanine. Par contre, sa reréduction est ralentie par un facteur 10^4 , ce que l'on peut attribuer à l'absence d'assemblage stable du complexe cyt b_6f dans cette souche.

2. Contrôle nucléaire de l'expression des gènes chloroplastiques *petA*, *petB*, *petD* [J. GIRARD-BASCOU, Y. CHOQUET, R. KURAS, F.-A. WOLLMAN, en collaboration avec N. GUMPEL et S. PURTON (Uni. Col. Londres) et G. HOWE et S. MERCHANT (Uni. Cal. Los Angeles)]

Une large collection de mutants nucléaires, produit par mutagenèse classique ou par interruption aléatoire de gènes, a été sélectionnée sur la base de déficiences en complexe cyt b_6f . J. Girard-Bascou a conduit une analyse génétique de plusieurs dizaines de ces souches. Par analyse de recombinaisons et de complémentation, plusieurs loci nucléaires ont été identifiés par la déficience fonctionnelle associée à leur mutation. Certains mutants n'expriment pas le cytochrome f en raison d'une altération d'un facteur nucléaire impliqué dans la stabilité du transcrit de *petA* ou d'un facteur nucléaire gouvernant la traduction de *petA*. D'autres expriment un cytochrome f instable du fait d'une altération du processus de liaison de l'hème c sur l'apoprotéine. Cette classe de mutants a permis de mettre en évidence trois gènes nucléaires et un gène chloroplastique contribuant à la conversion de l'apocytochrome f en holocytochrome f. Cette collection de mutants nous a également permis d'identifier au moins un locus nucléaire gouvernant la stabilité du transcrit de *petD* (su IV), un autre gouvernant la stabilité de *petB* (cyt b_6) et quatre autres impliqués dans la fixation de l'hème B sur l'apocytochrome b_6 . Dans deux cas, nous avons pu étiqueter le gène interrompu, ce qui devrait permettre à terme de les cloner et les séquencer.

B) Différenciation cellulaire de *C. reinhardtii*

1 — La mutation *gag* (O. VALLON et F.-A. WOLLMAN)

Cette mutation affecte les processus de o-glycosylation chez *C. reinhardtii*. La souche mutante est thermosensible pour l'expression de la majeure partie de son phénotype : les glycoprotéines de paroi sont altérées et les cellules s'aggrègent à la température restrictive (32° C). Cependant une stérilité liée au sexe, exprimée seulement par les souches *mt+*, est observée à toutes les températures étudiées. Elle provient d'une perte des propriétés d'agglutination avec le partenaire *mt-*. La thermosensibilité différentielle exprimée dans le mutant est très originale et peut être interprétée à l'aide d'hypothèses très différentes, redondance de certains processus métaboliques ou existence de glycoenzymes monomériques et oligomériques par exemple.

2 — Séquence de *L-amino-acide oxydase* (O. VALLON)

Cette protéine est exprimée spécifiquement dans certaines conditions de gamétogénèse. O. Vallon a établi sa séquence à partir d'un cDNA. Elle montre des homologies limitées mais très nettes avec d'autres flavoprotéines. Des clones génomiques ont également été isolés, ce qui devrait permettre à terme d'identifier la région promoteur siège de la régulation de la transcription pour cette protéine.

3 — Gamétogénèse, division mitotique et cycle cellulaire [L. BULTÉ, O. VALLON, F.-A. WOLLMAN en collaboration avec C. BECK (Université de Fribourg)]

L'expression de la *L-amino-acide oxydase* au cours d'une carence azotée ouvrait la possibilité d'étudier le comportement de *Chlamydomonas* en présence d'acides aminés comme seule source d'azote. Ces travaux ont montré que, en effet, *Chlamydomonas* peut croître par divisions végétatives dans de telles conditions. Les cellules expriment alors plusieurs caractères spécifiques des gamètes, considérées jusqu'alors comme incapables de divisions mitotiques continues. L'usage de cultures synchrones, au cours de cycles alternant lumière et obscurité, a montré que les propriétés gamétiques apparaissent en phase G1 du cycle cellulaire. Notons cependant que, si ces pseudo-gamètes présentent des propriétés d'agglutination, elles expriment une compétence sexuelle atténuée comparativement à celle des gamètes générées par absence totale de substrat azoté.

IV. — GÉNÉTIQUE

A) Caractérisation des membranes mitochondriales de *C. reinhardtii*

(P. BENNOUN, A. ATTEIA, Y. PIERRE et M. DELOSME)

Les progrès enregistrés à ce jour dans le domaine de la génétique moléculaire des mitochondries de *C. reinhardtii* ont été beaucoup entravés du fait de l'ab-

sence de méthodes permettant d'isoler des mitochondries ou des membranes mitochondriales (celles-ci se retrouvent généralement dans les fractions enrichies en thylacoïdes). Pour pallier cette difficulté, P. Bennoun et collaborateurs ont étudié une fraction membranaire issue de cellules étiolées de *C. reinhardtii*. Ces cellules proviennent de souches portant une mutation conditionnelle bloquant à l'obscurité la synthèse de chlorophylle. Elles possèdent un compartiment chloroplastique pratiquement dépourvu de thylacoïdes. L'analyse biochimique de cette fraction membranaire a montré qu'elle contient un mélange de membranes d'étioplastes et de membranes mitochondriales.

Il est apparu que les membranes d'étioplastes contiennent en quantité importante au moins 2 complexes présents dans les thylacoïdes, l'ATP synthase et le complexe cytochrome b_6f ainsi que des polypeptides associés au dégagement d'oxygène. Le rôle et la localisation des membranes d'étioplastes ne sont pas connus. Ces membranes pourraient être liées à l'enveloppe des chloroplastes qui est impliquée dans la biogenèse des thylacoïdes. Une étude immunocytochimique pourrait préciser ce point.

La présence de membranes mitochondriales dans la fraction membranaire issue de cellules étiolées a été démontrée grâce à des anticorps dirigés contre différents complexes mitochondriaux (ATP synthase, cytochrome oxydase, NADH deshydrogenase). On observe un enrichissement considérable en membranes mitochondriales dans la fraction issue de cellules étiolées si on la compare aux préparations de thylacoïdes obtenues à partir de cellules vertes. Ce matériel, facile à obtenir, ouvre donc la voie à des études impossibles à réaliser jusqu'à présent. En particulier, la caractérisation de mutants déficients mitorespiratoire et celle des synthèses protéiques mitochondriales.

Une caractérisation spectroscopique des cytochromes mitochondriaux a pu être réalisée pour la première fois grâce à ce matériel, et ce, aussi bien pour des souches compétentes que déficientes respiratoires. Dans ce but, des souches étiolées déficientes en cytochrome b_6f ont été construites afin de ne pas être gênées par la composante étioplaste de la fraction membranaire utilisée. L'usage conjoint d'anticorps spécifiques et de mutants spécifiquement déficients en certains complexes respiratoires devrait permettre de caractériser progressivement l'ensemble des polypeptides membranaires des mitochondries. On peut donc attendre de ce travail qu'il fournisse une impulsion nouvelle à l'étude de la génétique moléculaire des mitochondries chez *C. reinhardtii*.

B) *Chlororespiration* (P. BENNOUN et D. BEAL)

L'étude de l'appareil photosynthétique à l'obscurité a conduit P. Bennoun à proposer l'existence d'une chaîne respiratoire intriquée à l'appareil photosynthétique dans les thylacoïdes. Ce modèle de « chlororespiration » ouvre un vaste champ d'expériences et lui a récemment permis de mettre en évidence des interactions bioénergétiques entre mitochondries et chloroplastes, ainsi que l'existen-

ce d'un fort gradient électrochimique transmembranaire établi à l'obscurité au niveau des thylacoïdes. P. Bennoun a pu montrer que l'ATP synthase chloroplastique n'était pas à l'origine de ce gradient qui résulterait de l'activité d'une pompe ionique non identifiée à ce jour. Ces études reposent largement sur l'utilisation de mutants de photosynthèse ou de mitorespiration. Afin de poursuivre cette voie de recherche, P. Bennoun développe, en collaboration avec D. Béal, une technique de détection de mutants d'algues vertes basée sur une mesure de luminescence de la chlorophylle *in vivo* (l'intensité de luminescence est modulée par la valeur du gradient électrochimique transmembranaire). Cette méthode fait appel à une caméra vidéo refroidie permettant une intégration du signal au niveau du CCD et à un traitement numérique des images. Cette nouvelle technique permettra de distinguer des colonies d'algues sur une boîte de Petri en fonction des valeurs de gradients électrochimiques établis au niveau des thylacoïdes. Il s'agit d'une méthode délicate à mettre en œuvre, compte tenu des très faibles intensités lumineuses à détecter. D'ores et déjà, la distinction a pu être faite entre des colonies de souches sauvages et déficientes en ATP synthase chloroplastique. Le développement de cette nouvelle méthodologie va se poursuivre et sa mise en œuvre devrait déboucher sur l'isolement de nouvelles classes de mutants affectant des complexes fonctionnels des membranes photosynthétiques inconnus à ce jour.

PUBLICATIONS

Références de publications citées sous presse dans le rapport 1994.

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

J.-L. POPOT, C. DE VITRY & A. ATTEIA. « Folding and assembly of integral membrane proteins : an introduction ». In : *Membrane Protein Structure : Experimental Approaches*. Ed. STEPHEN H. WHITE, Oxford University Press, 1994, 41-95.

N.S. STURM, R. KURAS, S. BÜSCHLEN, W. SAKAMOTO, K.L. KINDLE, D.B. STERN & F.-A. WOLLMAN. « The *petD* gene is transcribed by functionally redundant promoters in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts ». *Mol. Cell. Biol.*, Sept. 1994, 6171-6179.

Nouvelles publications

F.-A. WOLLMAN & J. GIRARD-BASCOU. « Une algue pour l'étude de la génétique des organites : *Chlamydomonas reinhardtii* ». Société Française de Génétique, Médecine-Sciences, 1994, n° **11**, vol. **10**, 1-13.

H.W. TRISSL & J. LAVERGNE. « Fluorescence induction from Photosystem II : Analytical equations for the yields of photochemistry and fluorescence derived

from analysis of a model including exciton-radical pair equilibrium and restricted energy transfer between photosynthetic units ». *Aus. J. Plant. Physiol.*, 1994, **22**, 183-193.

P. GANS & F.-A. WOLLMAN. « The effect of cyanide on state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1228**, 51-57.

F.A. SAMATEY, C. XU & J.-L. POPOT. « On the distribution of amino acid residues in transmembrane α -helix bundles ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 4577-4581.

J. LAVERGNE & H.W. TRISSL. « Theory of fluorescence induction in Photosystem II : Derivation of analytical expressions in a model including exciton-radical-pair equilibrium and restricted energy transfer between photosynthetic units ».

J.-C. LAZZARONI, A. VIANNEY, J.-L. POPOT, H. BÉNÉDETTI, F. SAMATEY, C. LAZDUNSKI, R. PORTALIER & V. GELI. « Transmembrane α -helix interactions are required for the functional assembly of the *Escherichia coli* tol complex ». *J. Mol. Biol.*, 1995, **246**, 1-7.

M. TURMEL, Y. CHOQUET, M. GOLDSCHMIDT-CLERMONT, J.-D. ROCHAIX, C. OTIS & C. LEMIEUX. « The trans-spliced intron 1 in the *psaA* gene of the *Chlamydomonas* chloroplast : a comparative analysis ». *Curr. Genet.*, 1995, **27**, 270-279.

R. KURAS, F.-A. WOLLMAN & P. JOLIOT. « Conversion of cytochrome *f* to a soluble form *in vivo* in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Biochemistry*, 1995, **34**, n° 22, 7468-7475.

S.L. KETCHNER, D. DRAPIER, J. OLIVE, S. GAUDRIAULT, J. GIRARD-BASCOU & F.-A. WOLLMAN. « Chloroplasts can accommodate inclusion bodies. Evidence from a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in the assembly of the chloroplast ATPsynthase ». *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, n° 25, 15299-15306.

Publications sous presse

J. LAVERGNE & J.-M. BRIANTAIS. « Photosystem II heterogeneity ». In : *Oxygenic photosynthesis : The light Reactions*. Ort, D.R. & Yocum, C.F. eds. Series *Advances in Photosynthesis*. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, 1995, sous presse.

M.-G. CLAROS, J. PEREA, Y. SHU, F.-A. SAMATEY, J.-L. POPOT & C. JACQ. « Limitations *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized *pocytocrome b* ». *FEBS*, 1995, sous presse.

Thèse

R. KURAS. « Etude de l'assemblage du complexe cytochrome *b₆f* chez *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Thèse de Doctorat de l'Université de Paris VI*, soutenue le 11 avril 1995.

CONGRÈS

Juin 1994 - Juin 1995

4th International Congress « Plant Molecular Biology », Amsterdam, 19-24 juin 1994. C. DELEPELAIRE.

ESF Summer School on « Spectroscopic methods in the study of the photosynthetic apparatus ». Saclay, 3-12 juillet 1994. Cours et Travaux Pratiques de P. JOLIOT et de J. LAVERGNE.

EMBO Practical Course on « Current Methods in Membrane Protein Research ». Heidelberg, 6-15 juillet 1995. Cours de J.-L. POPOT.

Gordon Conference on Photosynthesis. La Jolla, USA, 7-12 août 1994. F. RAPPAPORT.

Ecole d'Ete sur les Systèmes Moléculaires Organisés, Cargese, 22 août-3 septembre 1994. Cours de J.-L. POPOT, C. BREYTON.

Journées Nature au Collège de France, Paris. « La Science dans le XX^e siècle : Témoignages et itinéraires personnels ». 28-29 octobre 1994. Conférence de P. JOLIOT.

Colloque de l'« American Society of Nephrology ». Orlando, USA, 28 octobre-2 novembre 1994. J.-L. POPOT.

European Science Foundation Workshop on « The Oxygen Evolving Enzyme ». Gif-sur-Yvette, 6-9 novembre 1994. Conférence de J. LAVERGNE, F. RAPPAPORT.

Colloque « On the special occasion of Prof. R.C. Starr's 70 Birthday ». Kölner Algentag, Allemagne, 6-8 novembre 1994. Chairman, F.-A. WOLLMAN. Conférences de L. BULTÉ et de O. VALLON.

II^e Forum de Biologie, Association de la Montagne Sainte Geneviève, Paris, 21-22 novembre 1994. Conférence de R. KURAS.

Réunion du GDR « Systèmes Colloïdaux Mixtes », Saint-Lary, 30 janvier-3 février 1995. J.-L. POPOT, Y. PIERRE, C. BREYTON, C. TRIBET.

XXVI^e Rencontres de Méribel/Les Arcs, 19-25 mars 1995. F.-A. WOLLMAN.

4^e Congrès de la Société Française de Microbiologie, Tours, 2-5 mai 1995. Conférence de Y. CHOQUET.

Euroconference on the Experimental Biology of Chlamydomonas, Amsterdam, 29-31 mai 1995. Conférences de P. BENNOUN, C. DELEPELAIRE, J. GIRARD-BASCOU et de F.-A. WOLLMAN. Affiches de Y. CHOQUET, D. DRAPIER, C. TING, C. DELEPELAIRE, J. GIRARD-BASCOU.

Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne. L'Institut de Chimie-Physique fête ses 30 ans d'existence. Lausanne, 18-19 juin 1995. Conférence de P. JOLIOT.