

Bioénergétique cellulaire

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

Le cours de cette année a été présenté dans son intégralité à l'Université Joseph Fourier de Grenoble. La première partie du cours a été consacrée à une réflexion sur les mécanismes de transferts d'électrons impliqués dans les processus bioénergétiques et sur la thermodynamique des réactions photochimiques en photosynthèse.

Transporteurs d'électrons

Deux classes de transporteurs d'électrons sont impliquées dans les chaînes photosynthétiques ou respiratoires. On peut distinguer les transporteurs d'électrons sensu stricto pour lesquels les processus d'oxydation et de réduction se traduisent exclusivement par le départ ou la fixation d'un électron. Dans ce cas, l'un des deux états redox est chargé électriquement. Cette forme chargée, positivement ou négativement, est le plus souvent une espèce radicalaire hautement réactive. Ces transporteurs, parmi lesquels on peut citer les cytochromes, les protéines fer-soufre et les chlorophylles, comportent souvent un atome métallique, qui peut être directement impliqué dans le processus redox. Une seconde classe de transporteurs comporte des formes réduites dont la charge négative est neutralisée par la fixation de protons. L'oxydation de ces molécules se traduit par la libération de deux électrons et deux ions hydrogène. Les formes oxydées et réduites de ces transporteurs, souvent qualifiés de « transporteurs d'hydrogène », sont donc électriquement neutres. Il s'agit généralement d'espèces très stables et ne pouvant réagir qu'au niveau de sites enzymatiques spécifiques. La totalité des molécules organiques constituant les êtres vivants peut être considérée comme des réducteurs puissants, mais faiblement réactifs et, le plus souvent, ces molécules ne sont pas en équilibre thermodynamique avec le milieu environnant. Les chaînes de transferts d'électrons des appareils photosynthétiques et respiratoires comportent toujours une alternance de transporteurs d'électrons et de transporteurs d'hydrogène. Les transferts d'électrons se produisant entre les deux classes de transporteurs

s'accompagnent donc d'une fixation ou d'une libération de protons. Ces échanges de protons jouent un rôle capital dans les processus de couplage énergétique entrant dans le cadre de la théorie chemiosmotique proposée par Peter Mitchell. La grande majorité des transporteurs d'électrons est intégrée dans des complexes protéiques transmembranaires. Cette localisation au sein d'édifices protéiques de grande dimension protège ces molécules hautement réactives de toute interaction non spécifique avec des transporteurs solubles. Les transferts d'électrons s'effectuent ainsi dans un environnement hydrophobe entre des transporteurs proches les uns des autres et placés les uns par rapport aux autres de manière favorable. Il s'agit donc d'une chimie à l'état solide à laquelle ne sont associés que des mouvements atomiques de faible amplitude. Les transferts d'électrons au sein des complexes membranaires sont des processus très rapides, se produisant dans des gammes de temps comprises entre la picoseconde et la centaine de microsecondes. Les transporteurs d'hydrogène sont, au contraire, des molécules hydrosolubles ou liposolubles, le plus souvent susceptibles de diffuser dans les phases aqueuses ou lipidiques. Les échanges d'électrons entre transporteurs d'hydrogène et transporteurs d'électrons s'effectuent au niveau de sites protéiques spécifiques localisés à proximité des interfaces protéine-phase aqueuse.

Réactions photochimiques

Parmi les transporteurs d'électrons, les chlorophylles et les bactériochlorophylles jouent un rôle central dans les processus de capture et de conversion d'énergie lumineuse. Ces molécules fortement hydrophobes, dont la structure biochimique rappelle celle des cytochromes, présentent des bandes d'absorption qui couvrent l'ensemble du spectre solaire parvenant à la surface du sol. Quelle que soit la longueur d'onde de la lumière absorbée, la capture d'un photon conduit à la formation de l'état excité correspondant dans le cas de la chlorophylle à l'absorption d'un photon rouge (1,8 eV) ou, dans le cas de la bactériochlorophylle, à l'absorption d'un photon dans le proche infrarouge (1,4 eV). Lors de la formation de l'état excité, l'énergie de liaison de l'électron impliqué dans la transition électronique diminue d'une valeur équivalente. Le potentiel de demi-réduction de la chlorophylle, qui est une fonction linéaire de l'énergie de liaison de l'électron, dépend donc de l'état d'excitation de la molécule. Lorsque la chlorophylle (Chl) est dans son état fondamental, le couple Chl/Chl^+ présente un potentiel de demi-réduction très positif. Dans le cas de la chlorophylle intégrée dans les centres photochimiques du photosystème II, le potentiel du couple Chl/Chl^+ atteint une valeur proche de 1 V, suffisamment positive pour induire l'oxydation de l'eau. Lorsque la chlorophylle est portée dans un état excité, le couple ($\text{Chl}^*/\text{Chl}^+$) présente au contraire un potentiel de demi-réduction fortement négatif (-0,8 V), traduisant la déstabilisation de l'électron impliqué dans la transition électronique. L'espèce réduite Chl^* est alors susceptible d'induire la réduction de couples redox fortement réducteurs. Il est important de souligner que l'énergie libre, disponible au niveau des réactions photochimiques impliquant la chloro-

phylle, soumise à un éclairage solaire moyen, est très inférieure à l'augmentation de l'énergie interne associée à la formation de l'état excité qui, dans le cas de la chlorophylle, correspond à l'énergie d'un photon rouge soit 1,8 eV. Rappelons, en effet, qu'une molécule de chlorophylle, soumise à un éclairage solaire moyen, absorbe en moyenne un photon toutes les dix secondes. La durée de vie maximum de l'état excité étant de l'ordre de 10^{-8} s, le rapport entre la concentration des chlorophylles excitées et la concentration des chlorophylles à l'état fondamental est donc de l'ordre de 10^{-9} . En tenant compte de ce facteur de concentration, on peut calculer que, dans des conditions d'illumination solaire moyenne, l'énergie libre effectivement disponible est de l'ordre de 1,35 eV. L'appareil photosynthétique peut être assimilé à une machine thermique dont la température de la source chaude serait proche de 1200° K, et celle de la source froide de 300° K. Le rendement maximum d'une telle machine (rendement de Carnot) est égal à 0,75. Dans les conditions d'environnement de la chlorophylle *in vivo*, la durée de vie maximum des états excités de la chlorophylle est réduit à 10^{-9} s par suite de l'intervention de processus de désactivation non radiatif par conversion interne. Le rendement énergétique maximum d'une réaction photochimique, sensibilisée par la chlorophylle, ne dépasse une valeur de 0,7. Cette valeur est à comparer au rendement énergétique mesuré expérimentalement qui, dans le cas de la photosynthèse oxygénique, est proche de 0,4, soit plus de 50 % du rendement maximum théorique. L'appareil photosynthétique apparaît donc comme une machine thermique remarquablement efficace, travaillant dans des conditions peu éloignées de la réversibilité. La confusion entre les notions d'énergie interne et d'énergie libre a été, et est encore, la source de nombreuses interprétations et modèles erronés qui apparaissent de manière récurrente dans la littérature. Le calcul du rendement énergétique maximum du processus photosynthétique permet d'affirmer que l'intervention d'une seule étape photochimique est insuffisante pour fournir l'énergie libre nécessaire au transfert d'un électron depuis l'eau jusqu'au gaz carbonique. Une telle conclusion aurait pu être formulée dès le début du siècle, sur la base des travaux d'Einstein portant sur la thermodynamique des réactions photochimiques, et aurait permis d'éviter de longues controverses portant sur la valeur maximum du rendement quantique de la photosynthèse. Il est maintenant clairement établi que, conformément aux prédictions basées sur des approches thermodynamiques, la chaîne photosynthétique oxygénique comporte deux types de centres réactionnels qui fournissent, en deux étapes successives, l'énergie libre nécessaire à la réaction de décomposition de l'eau et à la réduction du gaz carbonique.

Collection de l'énergie lumineuse

L'analyse cinétique des réactions de transferts d'électrons montre que les chaînes photosynthétiques sont en mesure d'assurer le transfert d'une centaine d'électrons par seconde. Cette valeur doit être comparée à la fréquence d'absorption d'une molécule de chlorophylle, soumise à un éclairage solaire moyen qui

ne dépasse pas un photon toutes les dix secondes. L'intervention d'un appareil collecteur de lumière permet d'adapter la fréquence d'excitation des centres photochimiques à la capacité d'évacuation des charges des chaînes photosynthétiques. La majorité des pigments intégrés dans les membranes photosynthétiques ne sont pas directement impliqués dans les processus de transferts d'électrons, mais assurent simplement le rôle de sensibilisateur en accroissant la section de capture des centres photochimiques. La concentration des pigments collecteurs est ainsi 200 fois supérieure à celle des centres photochimiques. L'énergie d'excitation apparaissant au niveau des pigments collecteurs est transférée aux centres photochimiques en un temps très inférieur à la durée de vie de l'état excité. Comme l'ont établi Jean Perrin et Francis Perrin, puis Förster, les transferts d'excitation entre deux pigments voisins impliquent une interaction de type dipôle-dipôle induit, dont l'énergie décroît très rapidement avec la distance (en $1/r^6$). La remarquable efficacité, voisine de 95 %, des transferts d'excitation implique donc que la distance entre pigments soit en moyenne inférieure à 1 nm, et que ceux-ci forment un continuum dans lequel sont implantés les centres photochimiques. Par un processus de marche au hasard, l'état excité peut ainsi visiter plusieurs centaines de molécules de chlorophylle. Les états excités sont finalement piégés au niveau des centres photochimiques où s'effectue la conversion en énergie chimique. Les connaissances, récemment acquises, concernant la structure des protéines qui portent les pigments collecteurs et l'organisation ultrastructurale de ces protéines au sein de la membrane photosynthétique, montrent que l'appareil collecteur de lumière, associé aux centres photochimiques, représente un ensemble hautement organisé. Cet appareil permet une conduction efficace de l'énergie d'excitation dans des domaines membranaires incluant plusieurs centres photochimiques et dont la surface peut atteindre 10^5 nm^2 . Il est important de souligner que l'intervention d'un appareil collecteur d'énergie ne modifie pas le rendement énergétique théorique du processus photosynthétique. Par contre, l'appareil collecteur introduit une contrainte importante sur le plan cinétique. En effet, il est nécessaire que la vitesse de piégeage de l'excitation au niveau des centres photochimiques, vitesse égale à celle de l'étape primaire de séparation de charges, soit suffisamment rapide par rapport à la vitesse de transfert d'excitation vers les pigments voisins. La mise en œuvre technique de spectroscopie femtoseconde a permis d'établir que l'étape primaire de séparation de charges, se produisant au niveau des centres photochimiques, était terminée en quelques picosecondes. Ces réactions primaires sont donc suffisamment rapides pour assurer le drainage de l'énergie d'excitation formée en un point quelconque de l'appareil collecteur de lumière vers les pièges photochimiques.

Structure et fonction de l'appareil photosynthétique

La seconde partie du cours a été consacrée à une analyse des relations structure-fonction au niveau des différents types d'appareils photosynthétiques. Ce cours représente une synthèse des cours que j'ai présentés au Collège de France au

cours de ces dernières années. En premier lieu, les propriétés des complexes transmembranaires impliqués dans les différents types d'appareils photosynthétiques, centres photochimiques et complexe cyt b/c, ont été analysées sur le plan structural et fonctionnel. Le cours a ensuite porté sur l'organisation ultrastructurale des membranes photosynthétiques. L'accent a été mis sur les conséquences sur le plan fonctionnel de cette organisation ultrastructurale, dont l'importance est trop négligée dans la plupart des recherches modernes sur la photosynthèse.

La dernière partie du cours a été consacrée à une analyse critique de différentes hypothèses portant sur l'évolution des appareils photosynthétiques dont la forme la plus évoluée, la photosynthèse oxygénique, est apparue il y a plus de trois milliards d'années.

SÉMINAIRES

Jacques BRETON, Centre d'Études de Saclay. « *Relations structure/fonction dans les centres réactionnels photosynthétiques* »

Jean-Louis MARTIN, École Polytechnique, INSERM, « *Dynamique structurale et transfert d'électron dans le centre réactionnel bactérien* »

Ismaël MOYA, LURE « *Détection active et passive de la fluorescence bleue et rouge des végétaux* »

Diana KIRILOVSKY, École Normale Supérieure, « *Régulation par la lumière du turnover du Photosystème II* »

Pierre SETIF, Centre d'Études de Saclay, « *Interactions et transferts d'électrons entre centres réactionnels du Photosystème I et les accepteurs d'électrons ferredoxine et flavodoxine* »

Pierre SEBBAN, CNRS « *Transferts d'électrons et de protons dans les centres réactionnels bactériens* »

Francis-André WOLLMAN, Institut de Biologie Physico-Chimique « *Expression génétique et assemblage des protéines du chloroplaste* »

Bruno ROBERT, Centre d'Études de Saclay, « *Les protéines antennes des bactéries photosynthétiques : de l'étude des relations structure-fonction à la mise en place d'un modèle de protéine membranaire* »

Françoise REISS, CNRS « *Étude fonctionnelle et génétique des bactéries pourpres : *Rubrivivax gelatinosus* et *Rhodocyclus tenuis** »

André VERMEGLIO, Centre d'Études de Cadarache, « *Les bactéries photosynthétiques : un modèle pour les chaînes de transfert d'électrons et leurs interactions* »

I — BIOÉNERGÉTIQUE

A) *Étude des phases électrogéniques associées à la réaction photochimique sur les centres réactionnels bactériens.* (P. JOLIOT, A. JOLIOT, en collaboration avec A. VERMÉGLIO du Centre d'Études de Cadarache)

Les réactions de transfert d'électron se produisant au niveau des centres réactionnels bactériens se traduisent par des mouvements de charges transmembranaires auxquels sont associés la formation d'un potentiel de membrane. Ces réactions électrogéniques ont été étudiées sur des cellules vivantes de *Rhodobacter sphaeroides*, souche GA, à des températures comprises entre + 20° et - 20° C, en mettant en œuvre la technique spectrophotométrique adaptée aux mesures à basses températures décrite dans un précédent rapport. Rappelons que le potentiel électrique, délocalisé au niveau de la membrane bactérienne, induit des effets électrochromiques sur les pigments inclus dans les protéines membranaires. Dans le cas de la souche étudiée, les effets électrochromiques concernent essentiellement les caroténoïdes, et se traduisent par une augmentation d'absorption à 503 nm et une diminution d'absorption à 490 nm. L'amplitude de ces variations d'absorption est proportionnelle à la valeur du champ électrique intramembranaire, et les signaux obtenus peuvent être considérés comme une mesure linéaire de la valeur du potentiel de membrane délocalisé. Les phases électrogéniques photoinduites par un éclair de courte durée ont été analysées en présence de myxothiazol, qui bloque les réactions de transfert d'électron se produisant au niveau du complexe cytochrome b/c. Les travaux de Jackson et Dutton ont mis en évidence l'intervention de deux phases électrogéniques associées aux transferts d'électron primaires et secondaires se produisant au niveau des centres photochimiques. Une première phase est associée au transfert d'électron entre le donneur primaire (chlorophylle P870) et l'accepteur quinonique primaire Qa (phase I). L'origine de la seconde phase (phase II), qui est terminée en 1 ms environ à la température de la pièce, et dont l'amplitude représente environ 25 % de la phase I, est depuis longtemps un sujet de controverse. L'analyse de la cinétique de la phase II, en fonction de la température, montre que le processus devient biphasique pour des températures inférieures à 0° C. A une température de - 7° C et sur un échantillon maintenu à l'état liquide (état surfondu), une première phase (phase IIa), dont l'amplitude est d'environ 10 % de la phase I, présente un demi-temps de réaction de l'ordre de 200 µs. Le demi-temps de la seconde phase (phase IIb) est d'environ 2 ms et son amplitude égale à 15 % de la phase. La congélation à température constante ne modifie pas la cinétique de la phase IIa, alors que celle de la phase IIb est ralentie de plus d'un facteur 2. La phase IIa peut être attribuée au mouvement transmembranaire de protons associés à la protonation de l'accepteur quinonique secondaire doublement réduit, suivant la réaction $Qb^{2-} + 2 H^+ \rightarrow QbH_2$. Les travaux de L. Baciou et H. Michel ont montré que les protons étaient transférés depuis la phase aqueuse vers le site protéique portant l'accepteur Qb^- à travers une chaîne continue de 14 molécules d'eau caractérisée par analyse

cristallographique par diffraction de rayons X. Des expériences préliminaires, effectuées en collaboration avec L. Baciou et P. Sebban, ont montré que la cinétique de la phase I**b** était effectivement ralentie sur des mutants perturbés au niveau de la chaîne de molécules d'eau assurant la conduction des protons. Une collaboration avec L. Baciou et P. Sebban est donc envisagée pour caractériser, sur le plan fonctionnel, les mutants perturbés au niveau des transferts de protons intramoléculaires. La cinétique de la phase I**b** apparaît strictement corrélée à la cinétique de transfert d'électron entre le cytochrome c_2 et le donneur primaire P870. La diminution de vitesse de la phase I**b**, observée lors de la congélation du milieu, est liée à l'immobilisation partielle du cytochrome c_2 , petite molécule hydrophile dont l'affinité pour le centre réactionnel est diminuée par la présence d'une couche de glace à proximité de la surface membranaire. La phase I**b** est donc associée au mouvement de charge se produisant dans la zone hydrophobe qui sépare la chlorophylle P870 de la phase aqueuse localisée sur la face externe de la membrane.

L'analyse à basse température des cinétiques de formation du potentiel de membrane a donc permis de préciser l'origine et l'amplitude relative des phases électrogéniques associées à l'étape primaire et aux étapes secondaires de transfert d'électron se produisant au niveau des centres réactionnels bactériens.

B) *Analyse des transferts d'électrons entre donneurs primaire et secondaire dans la bactérie photosynthétique Heliobacillus mobilis.* (W. NITSCHKE, D. KRAMER, en collaboration avec U. LIEBL et K. MATSUURA)

La chaîne photosynthétique de transfert d'électron de la bactérie verte *Heliobacillus mobilis* comporte deux complexes membranaires : un centre photochimique analogue aux centres du photosystème I des plantes et des bactéries oxygéniques et un complexe de type cytochrome b/f.

H. mobilis est une bactérie strictement anaérobie dont la chaîne photosynthétique réalise un transfert d'électron cyclique, conduisant à la formation d'un gradient électrochimique de protons et à la synthèse d'ATP.

La nature et l'organisation ultrastructurale des transporteurs d'électrons, assurant la réduction du donneur photochimique primaire P798 et le transfert de charge entre le centre réactionnel et la chaîne haut potentiel du complexe cytochrome b/f, restent un sujet de controverse. Un consensus existe dans la littérature quant à l'implication d'un ou plusieurs cytochromes de type c présentant un maximum d'absorption à 553 nm. Contrairement au cytochrome c_2 soluble de *Rhodobacter sphaeroides*, le ou les cytochromes impliqués dans la réduction du donneur primaire P798 de *H. mobilis* sont associés aux membranes.

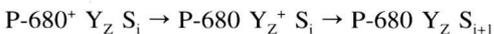
Les cinétiques de réduction de P798 et d'oxydation du cytochrome c ont été analysées sur des cellules vivantes ainsi que sur des fragments de membrane de *H. mobilis*. Dans le cas des cellules entières, la réduction de P798 présente une cinétique biphasique avec des demi-temps de 110 μ s et de 600 μ s. Les deux

phases ont des amplitudes voisines, et les cinétiques sont indépendantes de l'énergie de l'éclair, c'est-à-dire de la fraction des centres réactionnels ayant subi une réaction photochimique. On peut donc conclure que les processus de transfert d'électron entre donneurs primaires et secondaires ne sont pas limités par la diffusion et que les cytochromes c impliqués forment un complexe avec les centres photochimiques. Après extraction de fragments de membranes, on observe un fort ralentissement de la vitesse de réduction du donneur primaire dont le demi-temps est alors compris entre quelques millisecondes et quelques dizaines de millisecondes. La procédure d'extraction des membranes perturbe donc considérablement les interactions entre les cytochromes c membranaires et les centres réactionnels. Ces résultats permettent de mieux comprendre les contradictions existant dans la littérature concernant les cinétiques de réduction du donneur primaire. En effet, en raison de la sensibilité insuffisante des techniques spectrophotométriques généralement mises en œuvre, la plupart des mesures cinétiques sont effectuées sur des fragments de membrane dont les propriétés ultrastructurales ont été largement perturbées et, qui de plus, dépendent des conditions d'extraction. Ces expériences soulignent donc encore une fois l'importance fonctionnelle des associations supramoléculaires. La fragilité de ces édifices supramoléculaires, qui mettent en jeu des interactions de faible énergie, rend indispensable de pratiquer une analyse fonctionnelle sur des cellules intactes, dont les structures membranaires n'ont pas été perturbées par les procédures d'extraction.

Aucun modèle satisfaisant ne permet actuellement de rendre compte du caractère biphasique des cinétiques de réduction du donneur primaire et d'oxydation des cytochromes de type c. L'hypothèse d'une hétérogénéité des centres photochimiques semble en contradiction avec toutes les données biochimiques actuellement disponibles.

C) *Système de dégagement d'oxygène et côté donneur du PSII* (J. LAVERGNE, F. RAPPAPORT)

La réaction d'oxydation de l'eau intervient après accumulation préalable, sur le côté donneur du PS II, de quatre équivalents oxydés. Chaque étape d'oxydation est déclenchée par la photo-oxydation du donneur primaire P-680 et fait intervenir deux réactions successives :



Dans ce schéma, on a noté par \dot{S}_i les états $S_0 \dots S_4$ du cycle de Kok qui représentent l'état d'oxydation du système d'accumulation (constitué essentiellement d'un « cluster » de 4 atomes de Mn). D'autre part, le transporteur intermédiaire noté Y_Z est la tyrosine 161 du polypeptide D1.

1. *Déprotonation induite par l'oxydation de la tyrosine Y_Z* (F. RAPPAPORT, J. LAVERGNE)

Au cours des années précédentes, ces chercheurs ont étudié les mécanismes de transfert d'électrons et de protons mis en œuvre par le système de dégagement d'oxygène, et les phénomènes électrostatiques associés. Le champ créé par les charges électriques intervenant dans le système (centres rédox et groupes acido-basiques) provoque des déplacements spectraux d'une ou de plusieurs des chlorophylles voisines (effet Stark). L'étude de ces changements d'absorption « électrochromiques » ont ainsi permis de mesurer l'amplitude et les cinétiques des événements électrostatiques (mouvements d'électrons et de protons) vus par une sonde locale. Il a ainsi pu être montré que sur certaines des transitions entre états S, une déprotonation rapide (30 μ s) est déclenchée par l'oxydation de Y_Z . Compte tenu des données sur la chimie de la tyrosine, il est très probable que l'oxydation de Y_Z implique une déprotonation du phénol résultant en un radical neutre ($Y_Z\bullet$). Mais si tel est le cas, on s'attend à une disparition rapide du signal électrochromique traduisant la présence d'une charge nette positive. Les résultats expérimentaux montrent que tel n'est pas le cas, et que la présence de la tyrosine oxydée est toujours associée à celle du déplacement électrochromique. Une solution possible de cette contradiction est que le proton issu de la tyrosine reste piégé localement, conservant un caractère cationique à l'ensemble ($Y_Z\bullet H^+$). Cette entité chargée peut être à l'origine non seulement du signal électrochromique, mais aussi de l'expulsion, par interaction électrostatique, d'un proton secondaire (« domino »).

Le travail effectué cette année vise à examiner le mécanisme de la déprotonation induite par l'oxydation de Y_Z en étudiant le système simplifié découlant de la solubilisation des Mn par lavage au Tris. L'élimination du complexe de dégagement d'oxygène a pour effet de rallonger considérablement la durée de vie de la tyrosine oxydée. En utilisant un inhibiteur (DCMU) du transfert d'électron de Q_A vers Q_B le fonctionnement du système est essentiellement cyclique (séparation de charges induite par un éclair, suivie d'une recombinaison).

L'ensemble des résultats obtenus suggère que l'oxydation de Y_Z induit la déprotonation d'un groupe de pK proche de 6. Selon le matériel utilisé (fragments de membranes ou particules PS II monodisperses), l'apparition du proton dans le milieu et sa reprise lors de la recombinaison interviennent avec des cinétiques très différentes, traduisant l'existence d'une forte barrière de diffusion dans le cas des membranes. Dans tous les cas, la dépendance avec le pH de la vitesse de recombinaison est similaire, traduisant la modulation par le groupe de pK ≈ 6 , et indiquant que, localement, ce processus implique la reprise d'un proton même si cet événement n'affecte le pH du milieu aqueux qu'après un considérable délai.

Ces résultats confortent l'idée que le proton apparu dans le milieu n'est pas directement celui issu de la déprotonation du phénol, mais bien un proton « domino » expulsé électrostatiquement d'un autre site. Ce confinement local du

proton de Y_Z est un élément important au regard de discussions actuelles concernant le rôle de la tyrosine dans la réaction d'oxydation de l'eau et impliquant un éventuel transport concerté d'électron et de proton. Ce travail a fait l'objet d'une communication à l'ESF-workshop (Protolytic Events in Reaction Centers) en août dernier, et un article est en préparation.

2. *Interaction du formate avec le système des Mn* (A. STEMLER, J. LAVERGNE)

En visite dans notre laboratoire pour une année sabbatique, le Professeur A. Stemler (Davis, Californie) a entrepris, en collaboration avec J. Lavergne, d'étudier l'effet du formate sur le système de dégagement d'oxygène. En utilisant les changements d'absorption UV associés aux transitions entre états S, ces chercheurs ont observé un décalage de phase du cycle de Kok causé par le formate. Habituellement, la majorité des centres PS II (75-95 %) se trouve, après une période d'obscurité de quelques minutes, dans l'état stable S_1 , de sorte que lorsque le système est soumis à une séquence d'éclairs courts et saturants, un maximum du dégagement d'oxygène (transition $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$) a lieu au troisième éclair. Après une incubation en formate, en présence de concentrations catalytiques de dichlorobenzoquinone (DCBQ) réduite, cette étape intervient au quatrième éclair, et le système est donc dans un état équivalent à S_0 . Il semble cependant que l'on n'a pas affaire à l'état S_0 ordinaire car les changements d'absorption observés lors du premier éclair sont différents de ceux qui interviennent normalement sur la transition $S_0 \rightarrow S_1$. L'interprétation proposée est que le formate interagit avec le complexe des Mn, provoquant l'accessibilité à un réducteur (DCBQ) convertissant S_1 en S_0 .

D) *Dissipation dans les chaînes bioénergétiques* (J. LAVERGNE, P. JOLIOT)

A la suite d'une invitation à écrire une revue sur le transfert d'électron, ces auteurs ont entrepris une réflexion sur les problèmes de rendement énergétique de la photosynthèse ou des chaînes de transfert d'électron en général. Les données théoriques de base ont été établies dans les années 70 : notion de rendement de Carnot d'un convertisseur photochimique et calcul du compromis flux/force permettant de maximiser la puissance délivrée. Mais au-delà de ce point de départ, beaucoup de questions restaient posées et ont fait l'objet du travail de J. Lavergne et P. Joliot : minimisation des pertes dans une chaîne de transfert d'électrons (notion de chaîne « sans frottement »), rôle de l'étagement des potentiels rédox standards, de celui des constantes de vitesse, rôle énergétique de l'antenne chlorophyllienne en photosynthèse, rendement énergétique des systèmes faisant intervenir une « conversion stœchiométrique » (système de dégagement d'oxygène et sites impliquant des quinones). Les auteurs ont également établi une évaluation détaillée des pertes intervenant dans le centre réactionnel photosynthétique bactérien où les données cinétiques et thermodynamiques sont maintenant connues avec une bonne précision.

II — BIOGÉNÈSE ET INTÉGRATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES DU THYLACOÏDE

A) *L'ATP synthétase* (D. DRAPIER, D. STERN, J. GIRARD-BASCOU, F.-A. WOLLMAN)

Le gène chloroplastique *atpA*, codant la sous-unité α de l'ATP synthétase, est transcrit sous forme d'un polycistron qui, après maturation, génère des transcrits mono, di, tri et tétra-cistroniques. La mutation nucléaire, *NCC1*, précédemment identifiée dans le laboratoire, conduit à une déstabilisation sélective du transcrit monocistronique du gène chloroplastique *atpA*. Des expériences antérieures, basées sur l'action de la S1 nucléase, avaient indiqué que la cible de *NCC1* était probablement l'extrémité 3' du transcrit. Nous avons confirmé cette observation en montrant que le transcrit d'un gène rapporteur fusionné à l'extrémité 5' non-traduite de *atpA* n'était pas déstabilisé dans un contexte *NCC 1*. La mutation a été étudiée dans différents contextes génétiques. Elle est dominante dans un contexte nucléaire diploïde. Dans des transformants chloroplastiques portant une petite délétion recouvrant, soit l'extrémité 3' du transcrit monocistronique, soit l'extrémité 3' du transcrit dicistronique, soit éliminant les deux extrémités, la mutation *NCC1* conserve une action déstabilisatrice sur le transcrit majoritaire *atpA* restant. L'ensemble de ces observations nous conduit à proposer que la mutation *NCC 1* modifie l'activité d'une exo ou d'une endonucléase impliquée dans la maturation des transcrits polycistroniques du locus *atpA*.

B) *Le complexe cytochrome b6f*B.1. *Le rôle de la Leucine 204 du cytochrome b6* (F. ZITO, R. KURAS, Y. CHOQUET, F.-A. WOLLMAN, en collaboration avec H. KÖSSEL de l'Université de Freiburg)

La séquence du cytochrome b6 est conservée à plus de 80 % entre les chloroplastes de plantes supérieures et de *Chlamydomonas reinhardtii*. Le gène correspondant, *petB*, comporte en position 204 un codon Proline chez le Maïs et le Tabac, qui est édité en un codon Leucine au niveau de l'ARNm. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la position 204 de *petB* correspond d'emblée à un codon Leucine. Afin de comprendre la fonction de l'édition Prol/Leu à ce site du cytochrome b6, un codon Proline a été introduit dans le chloroplaste de l'algue par transformation génétique, en utilisant une souche réceptrice comportant une délétion du gène *petB*. Aucun transformant phototrophe n'a été obtenu. Par co-transformation de la souche sauvage à l'aide d'un gène de résistance à la spectinomycine, les transformants résistant à l'antibiotique présentaient le signe d'une altération du transfert d'électrons au niveau du complexe cytochrome b6f. Leur analyse biochimique a montré que cette protéine oligomérique n'est plus assemblée. Par comparaison avec des mutants de cytochrome b6 dépourvus de l'un des ligands de l'hème bh, F. Zito et collaborateurs ont montré que la présence d'une proline en position 204 interdit l'association de l'apocytochrome b6 avec

l'hème bh. L'édition du transcrit de *petB* en position 204 chez le Tabac et le Maïs est donc requise pour la biogénèse d'un complexe cytochrome b6f fonctionnel.

B.2 Étude du mutant FUD2. (G. FINAZZI, S. BÜSCHLEN, F. RAPPAPORT, C. DE VITRY, P. JOLIOT, F.-A. WOLLMAN)

Ce mutant de cytochrome b6f, d'hérédité chloroplastique, comporte une duplication de 36 paires de bases dans le gène *petB*. En conséquence, le cytochrome b6 comporte une duplication de 12 résidus dans une boucle côté luménal entre sa troisième et sa quatrième hélice transmembranaire. Le complexe cytochrome b6f est néanmoins assemblé et s'accumule jusqu'à 60 % de son contenu dans la souche sauvage. Après solubilisation des thylacoïdes en présence de détergents qui préservent l'intégrité du complexe cytochrome b6f de la souche sauvage, on observe une dissociation de la protéine de Rieske du reste du complexe dans le mutant. Cette observation indique que la face luménale du complexe protéique où se situe l'interaction avec la protéine de Rieske, est perturbée par la duplication des 12 acides aminés. Le transfert d'électrons est altéré dans ce mutant car il ne pousse pas en conditions phototrophes. Une étude spectroscopique *in vivo* a montré que le site Qo, siège de l'oxydation des plastoquinols, est profondément altéré dans le mutant : le transfert de charges à travers la membrane (mesuré par effet électrochromique), consécutif à l'oxydation concertée du plastoquinol, est ralenti par un facteur 10 (30ms vs 3.7ms) comme le sont les vitesses de réduction du cytochrome f et du cytochrome b6. Par contre, la vitesse d'oxydation du cytochrome f reste inchangée, ce qui indique que l'interaction cytochrome f/plastocyanine n'est pas altérée par la mutation. L'évolution des vitesses d'oxydation des plastoquinols au site Qo en fonction de l'état redox du pool des plastoquinones suggère que le cytochrome b6 du mutant FUD2 a une moindre affinité pour les plastoquinols au site Qo. La mutation du FUD2 aurait donc pour effet d'abaisser l'affinité pour les plastoquinols au site Qo.

B.3 Régulation épistatique de la synthèse du cytochrome f. (Y. CHOQUET, D. STERN, F.-A. WOLLMAN)

L'analyse des taux de synthèse du cytochrome f dans différentes souches mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii* montrait une diminution de sa synthèse en l'absence d'un partenaire d'assemblage du complexe cytochrome b6f. A l'inverse, des souches exprimant un cytochrome f dépourvu de son ancre transmembranaire C-terminale, ou portant une mutation conduisant à sa dégradation rapide, présentent une forte augmentation de synthèse de la protéine. Ces observations avaient conduit F.-A. Wollman et collaborateurs à proposer que la traduction du cytochrome f dépende de son état d'assemblage dans le complexe cytochrome b6f via un motif protéique situé dans la partie C-terminale de la protéine. A l'appui de cette proposition, ces chercheurs ont montré que l'effecteur de la régulation épistatique requiert les 10 premiers des 15 résidus situés dans le stroma à la suite de l'hélice transmembranaire du cytochrome f : une souche

exprimant un cytochrome f dépourvu de ce motif conserve un taux de synthèse élevé en l'absence d'assemblage. La cible de la régulation est l'extrémité 5'-non traduite (5'-UTR) du mRNA codant le cytochrome f. En effet, la synthèse du cytochrome f n'est plus sous régulation épistatique lorsque l'on fusionne la séquence codante de *petA* (gène du cytochrome f) avec l'extrémité 5'-non traduite du gène *atpA*. Cette expérience indique que la région 5'-UTR *petA* est requise pour que s'exprime la régulation. De plus, un gène rapporteur conférant une résistance à la spectinomycine, perd cette capacité lorsqu'il est fusionné avec le 5'-UTR *petA* et placé dans une souche n'assemblant pas le cytochrome f. Cette dernière observation indique donc que l'extrémité 5' non traduite de *petA* suffit à placer la traduction d'un gène exogène sous la dépendance du cytochrome f non-assemblé. L'ensemble de ces travaux suggère que le taux d'initiation de la traduction du cytochrome f est gouverné par une autorégulation négative titrant la présence d'extrémité protéique stromale non-assemblée.

C) *Étude de la L-amino-acide oxydase périplasmique de Chlamydomonas reinhardtii.* (O. VALLON)

Cette protéine du périplasma est exprimée dans des conditions de carence azotée qui conduisent à la destruction du complexe cytochrome b6f dans le chloroplaste. Après avoir séquencé le gène codant cette protéine, *LAO1* (voir rapport antérieur), O. Vallon a montré que l'expression de *LAO1* est régulée au niveau transcriptionnel. L'étude fine de cette régulation a montré que son expression est abolie dans des souches carencées en azote qui ne produisent pas de nitrate réductase en raison d'une mutation dans son gène de structure, *NIT1*, ou dans un gène gouvernant la biosynthèse de son cofacteur molybdène. Seuls les mutants qui sont affectés dans le gène *NIT2*, gouvernant l'expression de *NIT1* et d'autres gènes impliqués dans l'importation du nitrate et du nitrite, *NAR2*, *NAR3* et *NAR4* persistent à produire l'amino-acide oxydase et à détruire le complexe cytochrome b6f. Il s'avère donc que la régulation transcriptionnelle de *LAO1*, et des gènes responsables de la destruction du complexe cytochrome b6f, requiert l'activité de la nitrate réductase sauf quand le système d'importation nitrate/nitrite n'est pas exprimé. Ces observations suggèrent que le promoteur de *LAO1* est réprimé en présence d'ammonium mais aussi en présence de nitrate intracellulaire.

III — STRUCTURE ET REPLIEMENT DES PROTÉINES MEMBRANAIRES

Le centre d'intérêt principal du travail du groupe *Structure & repliement des protéines membranaires* est l'étude structurale des protéines membranaires intégrales et la compréhension des règles qui régissent leur repliement et définissent leur structure tridimensionnelle. Les principaux systèmes biologiques étudiés sont la bactériorhodopsine (diffraction des neutrons, modélisation), le cytochrome *b₆f* (biochimie, génétique moléculaire, spectroscopie, cristallisation), et le protéolipide majeur de la myéline (modélisation). Une attention particulière est portée au développement d'approches théoriques et expérimentales générales, transposables

à d'autres systèmes biologiques. En 1995-1996, les développements les plus marquants ont concerné la caractérisation biochimique et la cristallisation du complexe cytochrome b_6f de *Chlamydomonas reinhardtii*, ainsi que la conception et la mise en œuvre d'une nouvelle famille de molécules destinées à l'étude en solution des protéines membranaires intégrales, les amphipols.

A) *Théorie-Modélisation*

1. Modélisation. Le modèle de repliement en deux étapes des protéines membranaires intégrales proposé par J.-L. POPOT et D.M. ENGELMAN légitime (en principe) l'approche consistant à construire des modèles de domaines transmembranaires par assemblage d'hélices α préformées. J.-L. POPOT et coll. ont poursuivi l'examen de certaines des questions soulevées par cette approche, et notamment :

a) *Partant de la seule séquence d'une protéine membranaire intégrale, dans quelle mesure peut-on prouver le caractère hélicoïdal des segments transmembranaires putatifs et déterminer leur orientation latérale par rapport au cœur du faisceau d'hélices et aux lipides ?* (N. UGOLIN, F.A. SAMATEY, J.-L. POPOT, en coll. avec C. ETCHEBEST et R. LAVERY (CNRS URA 77, IBPC))

L'étude de l'asymétrie de distribution des résidus dans les hélices transmembranaires (Samatey *et al.*, 1995) a été poursuivie. Les informations contenues 1) dans la distribution non aléatoire des différentes classes d'acides aminés sur les faces d'hélices selon qu'elles sont ou non exposées aux lipides, et 2) dans la variabilité différentielle des deux types de faces au cours de l'évolution, sont analysées en vue d'identifier l'orientation probable de chaque hélice par rapport à la phase lipidique. Ces approches ont été utilisées jusqu'à présent de façon assez qualitative. N. UGOLIN et collègues ont entrepris une étude systématique de leurs performances en fonction des échelles et des algorithmes utilisés ainsi que de la taille de la base de données (séquences alignées). La fiabilité des prédictions est estimée par comparaison avec des protéines de structure connue (bactériorhodopsine, cytochrome *c* oxydase) ou relativement certaine (rhodopsine). Cette étude, qui n'est pas achevée, a déjà permis de définir des conditions dans lesquelles la fiabilité des prédictions avoisine les $\pm 30^\circ$. Elle sera prochainement étendue à la famille des cytochromes bc_1 et b_6f .

b) *Dans quelle mesure peut-on utiliser la recherche de mutations complémentaires dans les faisceaux d'hélices α transmembranaires pour en déduire des informations sur l'organisation tridimensionnelle des hélices ?*

Le groupe de V. GÉLI (CNRS UPR 9027, 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 de mutations situées dans la région transmembranaire

de TolQ, ainsi que celle de révertants phénotypiques, dans lesquels une mutation située sur une hélice transmembranaire différente de celle portant la mutation initiale rétablit la fonctionnalité du complexe Tol. 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. Les mutations donnant une réversion phénotypique sont toutefois trop dispersées pour en tirer des conclusions fiables quant à l'identité de la face d'hélice de TolR qui interagit avec TolQ. Cette approche semble prometteuse pour explorer l'organisation tridimensionnelle des faisceaux d'hélices α transmembranaires, mais il est clair que le nombre de réversions phénotypiques doit être élevé pour que des informations structurales fiables puissent en être déduites (Lazzaroni *et al.*, 1995).

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

1. Composition polypeptidique du complexe, séquences des sous-unités (Y. PIERRE, C. BREYTON, C. TRIBET, C. DE VITRY, J.-L. POPOT).

Le protocole de préparation de cytochrome b_6f hautement purifié à partir de membranes thylacoïdales de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (Pierre *et al.*, 1995) a permis plusieurs avancées significatives concernant, notamment, son organisation structurale. 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, PetM et PetL). Chaque sous-unité est vraisemblablement présente en deux exemplaires par dimère de b_6f (Pierre *et al.*, 1995). Après synthèse de sondes oligonucléotidiques basées sur les données de séquence protéique de PetM obtenues par Y. PIERRE et J.-L. POPOT, C. DE VITRY a pu amplifier par PCR un fragment de l'ADNc 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 *PetM* a ainsi pu être établie (de Vitry *et al.*, 1996). La présence et la séquence de la sous-unité PetL ont été établies en collaboration avec J.-D. ROCHAIX (Université de Genève) et Y. TAKAHASHI (Université d'Okayama) (Takahashi *et al.*, 1996). Le mode d'association des trois petites sous-unités avec le complexe a été examiné. Différentes méthodes d'extraction indiquent qu'elles se comportent toutes trois comme des protéines intrinsèques. 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 et du « microassemblage » des régions transmembranaires.

La masse moléculaire du complexe solubilisé en laurylmaltoïde a été déterminée à partir de ses coefficients de diffusion et de sédimentation et de sa densité estimée sur la base de la composition de la particule. La particule b_6f /détergent

a une masse moléculaire de 300 ± 25 kDa et comporte 260 ± 20 molécules de détergent. Cette masse moléculaire est très proche de celle calculée pour un complexe *dimérique* (344 ± 10 kDa). Après réinsertion dans des vésicules lipidiques, cryofracture et ombrage, le complexe dimérique apparaît comme une particule de 10-11 nm de diamètre (coll. avec J. OLIVE, Institut Jacques Monod, Paris). Une forme monomérique (MM = 128 ± 10 kDa) peut être obtenue par délipidation. Cette forme a perdu la protéine de Rieske et est enzymatiquement inactive (Breyton *et al.*, 1995). L'absence de la sous-unité PetL (provoquée par l'inactivation du gène *petL*) n'empêche pas l'assemblage des autres sous-unités. Toutefois, l'absence de PetL affecte légèrement les propriétés fonctionnelles du complexe *in vivo* et le rend très instable en solution détergente, où il se monomériserait rapidement et perd la sous-unité de Rieske et son activité enzymatique (Takahashi *et al.*, 1996).

La caractérisation spectroscopique du complexe purifié est en cours : spectres d'absorption (Pierre *et al.*, 1995), dichroïsme linéaire (coll. avec B. SCHÆPP et A. VERMÉGLIO, CEA Cadarache), spectroscopie Raman (coll. avec B. ROBERT, CEA Saclay), spectroscopie de fluorescence (coll. avec C. VERNOTTE, CNRS, Gif sur Yvette). Les potentiels redox des trois hèmes ont été déterminés (coll. avec D. KRAMER, Univ. of Illinois) (Pierre *et al.*, 1995).

2. 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. De la même façon, même des préparations très pures biochimiquement (sur la base de leur composition polypeptidique) de cytochrome b_6f de *C. reinhardtii* apparaissent « contaminées » par de la chlorophylle *a*. Diverses observations indiquent que celle-ci est un composant authentique du complexe, présent à raison de deux molécules par dimère (Popot *et al.*, 1995). Sa fonction éventuelle est en cours d'examen.

3. Cristallisation (C. BREYTON, D. PICOT, J.-L. POPOT).

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 GAL, Concarneau), purification du complexe b_6f sur gradient de saccharose dans des rotors à angle fixe à large capacité. Deux programmes de cristallogenèse ont pu être lancés. Le premier programme a permis d'obtenir des objets tridimensionnels cristalloïdes, dont il n'est pas établi s'ils diffractent ou non les rayons X (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 10 Å après coloration négative mais sont constitués de plusieurs couches de molécules (Mosser *et al.*,

1995). Des cartes en projections du complexe ont été calculées, qui montrent très clairement l'organisation dimérique et révèlent la position dans la structure du sous-complexe cytochrome *b₆f*/protéine de Rieske.

C) Les amphiphols : des polymères qui permettent la manipulation en solution des protéines membranaires intégrales en l'absence de détergent. (C. TRIBET, J.-L. POPOT). C. TRIBET, R. AUDEBERT (CNRS URA 278, Laboratoire de Physicochimie Macromoléculaire, ESPCI) et J.-L. POPOT ont poursuivi le développement d'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 polyacrylate sur lequel sont greffées des chaînes alkyle. Ces molécules, les « amphipols », ont été conçues pour pouvoir s'absorber 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 basse, 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. Cette approche permet de maintenir en solution aqueuse le cytochrome *b₆f* en l'absence de détergent ou d'amphipol libre. Le complexe ainsi formé comporte un dimère de cytochrome *b₆f*, d'une masse moléculaire de 210 kDa, associé à 50 kDa d'amphipol. 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. Cette approche semble très générale, puisqu'elle est également applicable à la bactériorhodopsine, à la rhodopsine, à la porine OmpF et à un centre réactionnel bactérien (Tribet *et al.*, 1996 ; et résultats non publiés). Elle a de nombreuses applications potentielles, dont plusieurs sont actuellement en cours d'examen.

PUBLICATIONS

Références de publications citées sous presse dans le rapport 1995.

M.G. CLAROS, J. PEREA, Y. SHU, F.-A. SAMATEY, J.-L. POPOT & C. JACQ. « Limitations to *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome *b* ». *Eur. J. Biochem.*, 1995, 228, 762-771.

Nouvelles publications

O. VALLON & F.-A. WOLLMAN. « Mutations affecting O-Glycosylation in *Chlamydomonas reinhardtii* cause delayed cell wall degradation and sex-limited sterility ». *Plant Physiol.* 1995, 108, 703-712.

A. VERMÉGLIO, P. JOLIOT & A. JOLIOT. « Organization of electron transfer components and supercomplexes ». In : Anoxygenic Photosynthetic Bacteria.

(R.E. Blankenship, M.T. Madigan & C. E. Bauer eds). Series Advances in Photosynthesis. Kluwer Academic Publishers 1995. pp 279-295.

R. KURAS, S. BÜSCHLEN & F.A. WOLLMAN. « Maturation of Pre-apocytochrome f *in vivo* ». *J. Biol. Chem.* 1995, 270, N°46, 27797-27803.

R. BASSI, J. MARKUARDT & J. LAVERGNE. « Biochemical and functional properties of Photosystem II in agranal membranes from maize mesophyll and bundle sheath chloroplasts ». *European J. of Biochem.* 1995, 233, 709-719.

P. BENNOUN, A. ATTEIA, Y. PIERRE & M. DELOSME. « Etiolated cells of *Chlamydomonas reinhardtii*: Choice material for characterization of mitochondrial membrane polypeptides ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, 92, 10202-10206.

J. FARAH, F. RAPPAPORT, Y. CHOQUET, P. JOLIOT & J.-D. ROCHAIX. « Isolation of a Psaf deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*: Efficient interaction of plastocyanin with the PSI reaction center is mediated by the Psaf subunit ». *EMBO J.* 1995, Vol 14 N°20, 4976-4985.

J.-L. POPOT & M. SARASTE. « Engineering membrane proteins ». *Curr. Opin. Biotech.* 1995, 6, 394-402.

N. GUMPEL, J. GIRARD-BASCOU, J. NUGENT, F.-A. WOLLMAN & S. PURTON. « Nuclear mutants of *C. reinhardtii* defective in the biogenesis of the cyt b6f complex ». *Plant Mol. Biol.* 1995, 29, 921-932.

Y. PIERRE, C. BREYTON, D. KRAMER & J.-L. POPOT. « Purification and characterization of the cytochrome b₆f complex of *Chlamydomonas reinhardtii* ». *J. Biol. Chem.* 1995, 49, 29342-29349.

W. NITSCHKE, U. LIEBL, K. MATSUURA & D. KRAMER. « Membrane-bound c-Type cytochromes in *Heliobacillus mobilis*. *In vivo* study of the Hemes involved in electron donation to the photosynthetic reaction center ». *Biochemistry*, 1995, 34, 11831-11839.

A. JOLIOT & P. JOLIOT. « A shift in a chlorophyll spectrum associated with electron transfer within the cytochrome b/f complex ». In *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Vol. II, 615-618. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Montpellier, 20-25 August 1995 (P. Mathis, ed.) 1995 Kluwer Academic Publishers.

P. JOLIOT, A. JOLIOT & A. VERMÉGLIO. « Organization of the electron transfer chain in purple bacteria at subzero temperatures ». In *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Vol. III, 201-206. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Montpellier, 20-25 August 1995 (P. Mathis, ed.) 1995 Kluwer Academic Publishers.

A. VERMÉGLIO, W. BARTZ, A. JOLIOT, P. JOLIOT & D. OESTERHELT. « Supramolecular organization of the photosynthetic chain in *Rhodobacter sphaeroides* ». In *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Vol. III, 219-224. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Montpellier, 20-25 August 1995 (P. Mathis, ed.) 1995 Kluwer Academic Publishers.

F. RAPPAPORT, G. PORTER, J. BARBER, D. KLUG & J. LAVERGNE. « Reinvestigation of the phases of reduction of P_{680}^+ in the microsecond time domain ». In *Photosynthesis : from Light to Biosphere*, Vol. II, 345-348. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Montpellier, 20-25 August 1995 (P. Mathis, ed.) 1995 Kluwer Academic Publishers.

A. STEMLER & J. LAVERGNE. « Effects of formate on the oxygen-evolving mechanism ». In *Photosynthesis : from Light to Biosphere*, Vol. II, 451-454. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Montpellier, 20-25 August 1995 (P. Mathis, ed.) 1995 Kluwer Academic Publishers.

M. TURNER, N. GUMPEL, L. RALLEY, J. GIRARD-BASCOU, F.-A. WOLLMAN & S. PURTON. « Nuclear genes required for the biogenesis of the cytochrome b_6f complex in *Chlamydomonas reinhardtii* ». In *Photosynthesis : from Light to Biosphere*, Vol. III, 667-670. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Montpellier, 20-25 August 1995 (P. Mathis, ed.) 1995 Kluwer Academic Publishers.

J. GIRARD-BASCOU, Y. CHOQUET, N. GUMPEL, D. CULLER, S. PURTON, S. MERCHANT, F. LAQUERRÈRE & F.-A. WOLLMAN. « Nuclear control of the expression of the chloroplast *pet* genes in *Chlamydomonas reinhardtii* ». In *Photosynthesis : from Light to Biosphere*, Vol. III, 683-686. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Montpellier, 20-25 August 1995 (P. Mathis, ed.) 1995 Kluwer Academic Publishers.

F.-A. WOLLMAN, R. KURAS & Y. CHOQUET. « Epistatic effects in thylakoid protein synthesis : the example of cytochrome *f* ». In *Photosynthesis : from Light to Biosphere*, Vol. III, 737-742. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Montpellier, 20-25 August 1995 (P. Mathis, ed.) 1995 Kluwer Academic Publishers.

J.-L. POPOT, Y. PIERRE, C. BREYTON, Y. LEMOINE, Y. TAKAHASHI, & J.-D. ROCHAIX. « Purification and composition of the cytochrome b_6f complex from *Chlamydomonas reinhardtii* ». In *Photosynthesis : from Light to Biosphere*, Vol. II, 507-512. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Montpellier, 20-25 August 1995 (P. Mathis, ed.) 1995 Kluwer Academic Publishers.

C. TING, F.-A. WOLLMAN & J.-L. POPOT. « The cytochrome b_6f complex and state transitions : a biochemical evaluation in the chlorophyte alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In *Photosynthesis : from Light to Biosphere*, Vol. II, 519-522. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Montpellier, 20-25 August 1995 (P. Mathis, ed.) 1995 Kluwer Academic Publishers.

C. BREYTON, C. TRIBET, J. OLIVE, M. RECOUVREUR & J.-L. POPOT. « Molecular weight and state of association of the purified b_6f complex from *Chlamydomonas reinhardtii* ». In *Photosynthesis : from Light to Biosphere*, Vol. II, 591-594. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Montpellier, 20-25 August 1995 (P. Mathis, ed.) 1995 Kluwer Academic Publishers.

C. DE VITRY, C. BREYTON, Y. PIERRE & J.-L. POPOT. « The 4-kDa chloroplast polypeptide of cytochrome b_6f complex encoded by the nuclear *petX* gene : nucleic and protein sequences, targeting signals, and membrane topology ». In *Photosynthesis : from Light to Biosphere*, Vol. II, 595-598. Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis, Montpellier, 20-25 August 1995 (P. Mathis, ed.) 1995 Kluwer Academic Publishers.

Y. PIERRE, C. BREYTON, D. KRAMER & J.-L. POPOT. « Purification and characterization of the cytochrome b_6f complex from *Chlamydomonas reinhardtii* ». *J. Bio. Chem.* 1995, 270 N°49, 29342-29349.

R. DELOSME, J. OLIVE & F.-A. WOLLMAN. « Changes in light energy distribution upon state transitions : *in vivo* photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1273, 150-158.

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.

CONGRÈS

Juillet 1995 — Juillet 1996

Xème Congrès International de Photosynthèse, Montpellier, 20-25 Août 1995. Conférences de P. JOLIOT, J.-L. POPOT et de F.A. WOLLMAN.

ESF Workshop on « Protolytic events in photosynthetic reaction centers ». Nant, 26-29 Août 1996. Conférence de J. LAVERGNE.

Colloque « Organisation et dynamique fonctionnelles des biomembranes », Toulouse, 25-29 Septembre 1995. Conférences de P. JOLIOT, J.-L. POPOT et de D. PICOT.

Atelier « Protéines membranaires » Garchy-Pouilly-sur-Loire, 10-13 Octobre 1995. Conférence de J.-L. POPOT.

Colloque de la Montagne Sainte-Geneviève « Biologie Structurale », Paris, 6-7 Novembre 1995. Conférence de D. PICOT.

BCA Winter Meeting Biological Structures Group. Londres, 13 Décembre 1995. C. BREYTON.

Colloque de Génétique Végétale. Versailles, 10-11 Janvier 1996. J. GIRARD-BASCOU.

Troisième Rencontre du Département de Biologie Moléculaire et Structurale de Grenoble. Villard-de-Lans, 25-27 Janvier 1996. O. VALLON.

Colloque du 50ème Anniversaire du CEA « La Photosynthèse : comment les êtres vivants utilisent l'énergie solaire ? », Aix-en-Provence, 16 Mars 1996. Conférence de P. JOLIOT.

Conférence Jacques Monod « Synthesis and function of photosynthetic complexes ». Aussois, 25-29 Mars 1996. Conférence de F.A. WOLLMAN.

Workshsop « The cytochrome b6f complex — Electron transfer, proton translocaton and redox sensing », Regensburg, 24-26 Mai 1996. Conférence de F.A. WOLLMAN.

Seventh International Conference on the Cell of *Chlamydomonas* « Regensburg, 27 Mai — 1^{er} Juin 1996. Conférence de F.A. WOLLAMN.

Gordon Research Conference « Mitochondrial and Chloroplast » New Hampshire, USA, 16-21 Juin 1996. Conférence de F.A. WOLLMAN.