

Bioénergétique cellulaire

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

Le cours de cette année a porté sur l'étude des réactions photochimiques primaires de la photosynthèse qui se produisent au sein des centres réactionnels, édifices transmembranaires complexes formés par l'association de plusieurs polypeptides. Les centres réactionnels, qui assurent la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, sont présents dans l'ensemble des chaînes de transfert d'électrons photosynthétiques, qu'il s'agisse de bactéries, d'algues ou de plantes supérieures. Les différents types de centres réactionnels présentent de fortes analogies tant sur le plan structural que fonctionnel, ce qui conduit à supposer qu'ils dérivent d'un ancêtre commun dont l'origine ne suit que de peu l'apparition de la vie sur terre. Le convertisseur primaire d'énergie commun à l'ensemble des centres réactionnels est un dimère de molécules de chlorophylles ou de bactériochlorophylles, qui constitue le donneur primaire d'électron. Lorsque ce donneur est porté dans un état électroniquement excité, il devient susceptible de céder un électron à un transporteur localisé à proximité au sein du même centre réactionnel (accepteur primaire d'électron). Ce transfert d'électron constitue la réaction photochimique primaire.

Formation de l'état excité des pigments chlorophylliens

L'acte initial du processus photosynthétique est l'absorption d'un photon par une molécule de chlorophylle ou de bactériochlorophylle conduisant à la formation d'un état excité. Ces deux types de molécules ont une structure très semblable dont le cœur est formé par quatre cycles pyrole. Les orbitales électroniques impliquées dans les processus d'excitation et de transfert d'électron sont délocalisées au niveau du noyau tétrapyrolique, qui comporte un ensemble de liaisons conjuguées. La formation d'un état excité se traduit par le transfert d'un électron depuis l'orbitale occupée de plus faible énergie vers l'orbitale non occupée de plus forte énergie. Cette transition électronique peut être induite par l'absorption d'un photon dont l'énergie correspond à la bande d'absorption de plus grande

longueur d'onde, soit ~ 700 nm pour la chlorophylle et 770 à 1 000 nm pour les molécules de bactériochlorophylle. Les énergies correspondantes sont égales à 1,7 eV pour la chlorophylle, et de 1,2 à 1,4 eV pour la bactériochlorophylle. La modification de la répartition des nuages électroniques lors du passage de l'état fondamental à l'état excité s'accompagne d'une modification de la position d'équilibre des atomes constituant cette molécule. Lors de l'absorption d'un photon, la transition électronique s'effectuant en un temps infiniment court par rapport aux mouvements atomiques (principe de Frank-Condon), la molécule se trouve hors équilibre et donc dans un état « vibrationnellement » excité. En raison des interactions entre la chlorophylle et la matrice protéique à laquelle cette molécule est associée, ces états vibrationnels relaxent très rapidement en cédant de la chaleur au milieu. Les niveaux d'énergie vibrationnels étant quantifiés, le spectre d'absorption d'une molécule complexe, telle que la chlorophylle, devrait comporter de nombreuses raies d'absorption associées aux différents modes vibrationnels susceptibles d'être excités lors de la transition électronique. Il est surprenant de constater qu'à température proche du zéro absolu, c'est-à-dire en l'absence de perturbations induites par l'agitation thermique, les molécules de chlorophylle associées à leur matrice protéique présentent une bande d'absorption continue dont la demi-largeur atteint plus de 10 nm. Cette absence de raies d'absorption s'explique par le fait que la protéine peut exister sous une multitude d'états conformationnels qui à la température de la pièce sont en équilibre dynamique. A très basse température, la protéine est présente sous de nombreux états conformationnels stables, qui diffèrent légèrement par la position de leurs raies d'absorption. La superposition de ces raies d'absorption forment un continuum qui se traduit par le spectre de bande observé expérimentalement. La technique dite du « hole burning » permet cependant de déterminer expérimentalement le spectre d'absorption de l'un quelconque des états conformationnels de la protéine. Le complexe chlorophylle-protéine, placé à basse température, est illuminé par un faisceau laser monochromatique de très forte intensité. Lorsque la longueur d'onde d'illumination correspond à une raie d'absorption d'une protéine dans un état conformationnel particulier, le pigment associé à cette protéine subit une transformation photochimique irréversible. Le spectre d'absorption de l'échantillon ainsi irradié présente des raies négatives qui sont l'image inversée du spectre d'absorption de l'espèce conformationnelle dont le pigment a été détruit photochimiquement. Ce spectre présente une raie d'absorption fine et très intense et de nombreuses raies d'absorption satellites de plus courtes longueurs d'ondes. La différence d'énergie entre les bandes satellites et la raie principale est égale à l'énergie des niveaux vibrationnels excités. On distingue d'une part quelques raies d'absorption correspondant à l'excitation de liaisons interatomiques, et dont les énergies sont de l'ordre de 0,1 eV. D'autre part, une série de bandes satellites très proches de la raie principale traduisent l'excitation de modes vibrationnels de très faible énergie (inférieure à 0,01 eV). Ces modes vibrationnels, dont les fréquences sont comprises entre 10^{13}s^{-1} et 10^{12}s^{-1} , sont associés à des mouvements d'ensemble de la protéine (phonons)

qui jouent un rôle essentiel dans les couplages entre mouvements électroniques et atomiques.

La durée de vie de l'état excité de la chlorophylle dépend des constantes de vitesse des processus de désactivation qui induisent le retour de la chlorophylle à son état fondamental. Un premier processus de désactivation, dont la constante de vitesse est de l'ordre 10^8 sec^{-1} , se traduit par l'émission d'un photon de fluorescence (désactivation radiative). D'autres processus de désactivation ne conduisent pas à l'émission d'un photon, l'énergie étant cédée au milieu environnant sous forme de chaleur (conversion interne). Dans le cas des complexes chlorophylle/protéine, la constante de vitesse des processus de désactivation non radiative est de l'ordre de 10^9 sec^{-1} , et représente donc la voie principale de désactivation. Il en résulte que le rendement de fluorescence maximum de la chlorophylle *in vivo* est égal ou inférieur à 10 %, et que la durée de vie de l'état excité est d'environ 1 nanoseconde. Cette durée de vie est très longue par rapport à la durée de vie des états vibrationnellement excités, formés lors de la transition électronique et dont de le temps de relaxation ne dépasse pas quelques picosecondes.

Il est important de souligner que l'état excité de plus faible énergie peut être indirectement peuplé par excitation de transitions de plus forte énergie (transitions $S_0 \rightarrow S_n$) que la transition $S_0 \rightarrow S_1$. Le transfert d'excitation vers le niveau excité de plus basse énergie s'accompagne d'une libération de chaleur cédée au milieu par un processus de conversion interne. La réaction photochimique peut donc être sensibilisée par la lumière absorbée dans toute l'étendue du spectre d'absorption des chlorophylles ou des bactériochlorophylles.

Réaction photochimique primaire : aspects théoriques

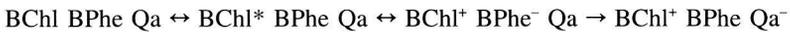
La seconde partie du cours a porté sur l'étude théorique et expérimentale de l'étape photochimique qui suit la formation de l'état excité. La molécule de chlorophylle, ou de bactériochlorophylle, portée dans un état excité (Chl^* ou BChl^*) peut être considérée comme une nouvelle espèce chimique. Lors de la formation de l'état excité (Chl^*), l'énergie de liaison de l'électron le plus faiblement lié diminue d'une valeur égale à l'énergie correspondant à la transition $S_0 \rightarrow S_1$. Ainsi, dans le cas de la chlorophylle donneur primaire d'électron des centres du photosystème II impliqués dans le processus de décomposition de l'eau, le potentiel du couple redox $\text{Chl}^*/\text{Chl}^+$ est de l'ordre de $-0,7 \text{ V}$, alors que celui du couple Chl/Chl^+ de l'ordre de $+1 \text{ V}$. La différence entre ces deux potentiels ($\sim 1,7 \text{ V}$) est approximativement égale à l'énergie d'un photon rouge susceptible d'exciter la transition $S_0 \rightarrow S_1$. Dans le cas des centres photochimiques II, l'espèce Chl^* est susceptible de céder un électron à une molécule de phéophytine située à proximité et dont le potentiel redox est proche de $-0,6 \text{ V}$, alors que l'espèce Chl^+ est un oxydant puissant susceptible d'oxyder l'eau (potentiel du couple $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2 \sim +0,8 \text{ volt}$).

Le processus par lequel un électron est transféré depuis la chlorophylle vers l'accepteur primaire ne se distingue pas des processus se déroulant entre les nombreux transporteurs inclus dans les chaînes de transfert d'électrons photosynthétiques ou respiratoires. La distance entre les transporteurs d'électrons, qui sont le plus souvent constitués par différents cofacteurs associés aux protéines, varie de quelques Angströms à quelques dizaines d'Angströms. Le transfert d'électrons depuis un donneur D vers un accepteur A s'effectue toujours à travers le milieu de faible constante diélectrique que constitue la protéine. En théorie classique, cette région de basse constante diélectrique représente une barrière infranchissable pour l'électron. Seules les théories quantiques permettent de rendre compte du processus d'effet tunnel, qui permet à un électron de traverser cette barrière d'activation sur des distances de plusieurs dizaines d'Angströms. En raison de sa faible masse, l'électron présente une probabilité de présence non négligeable à des distances considérables du transporteur redox sur lequel cet électron est localisé. C'est ce fort degré de délocalisation qui permet à l'électron de traverser la barrière d'activation qui sépare les deux transporteurs. Les bases théoriques des processus de transferts d'électrons au sein des protéines, essentiellement développées par Marcus, ont été brièvement exposées. En premier lieu, les mouvements électroniques pouvant être considérés comme infiniment rapides par rapport aux mouvements atomiques, le transfert d'électron entre un donneur D et un accepteur A s'effectue à configuration nucléaire constante. La protéine doit donc se trouver dans une configuration nucléaire commune aux états $D^+ A$ et $D A^-$. Dans la plupart des cas, cette configuration correspond à un état vibrationnellement excité de la protéine. Les réactions de transferts d'électrons présentent donc généralement un coefficient de température qui est fonction de l'énergie d'activation nécessaire pour atteindre l'état conformationnel permettant le processus de transfert d'électron. Il est surprenant de constater que l'énergie d'activation des réactions de transferts d'électrons primaires ou secondaires se produisant au sein des centres réactionnels est proche de zéro. Cette situation particulièrement favorable est probablement le fruit de l'évolution au cours de laquelle se sont élaborés les centres photochimiques actuels. Le paramètre essentiel déterminant la vitesse des réactions de transferts d'électrons reste cependant la distance séparant le donneur D de l'accepteur A, la constante de vitesse de transfert d'électron décroissant exponentiellement avec la distance. Comme l'a montré Dutton et collaborateurs, le coefficient de cette exponentielle est pratiquement indépendant de la protéine à laquelle sont associés les transporteurs. La décroissance de la constante de vitesse en fonction de la distance est extrêmement rapide. A titre d'exemple, un accroissement de 10 Å de la distance entre transporteurs se traduit par une diminution d'un facteur $\sim 10^6$ de la constante de vitesse.

Réaction photochimique primaire au sein des centres photochimiques bactériens

La réaction photochimique se produisant au niveau des centres réactionnels se traduit par le traversée de la membrane par un électron depuis un dimère de bactériochlorophylle (BChl), localisé à proximité de la face externe de la membrane, vers un accepteur quinonique Qa, localisé à proximité de la face interne. Un transporteur intermédiaire, une bactériophéophytine (BPhe), joue le rôle d'accepteur primaire d'électron, et de relais dans la réaction transmembranaire des transferts d'électron.

La séquence réactionnelle est indiquée sur le schéma suivant :



Les paramètres cinétiques des différentes étapes de transfert d'électron ont été déterminés grâce à la mise en œuvre des techniques de spectroscopie d'absorption femtoseconde dans la région rouge et infrarouge du spectre.

Il est intéressant de confronter les valeurs des constantes de vitesse mesurées expérimentalement avec les données structurales obtenues par cristallographie des centres réactionnels de *Rhodospseudomonas viridis* et *Rhodobacter sphaeroides*. Comme le prévoit la théorie, la vitesse de transfert d'électron apparaît fortement dépendante de la distance entre transporteurs. La constante de vitesse de la réaction primaire de séparation de charge (réaction 1) est égale à $5 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$, pour une distance centre à centre entre transporteurs d'environ 5 Å. La constante de vitesse de la réaction (2) est de l'ordre de $5 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ ps pour une distance de l'ordre de 15 Å. En ce qui concerne la réaction de recombinaison de charge intervenant entre BChl^+ et Qa^- , la constante de vitesse est proche de 10 s^{-1} pour une distance d'environ 25 Å, soit environ $5 \cdot 10^{10}$ fois plus lente que la constante de vitesse de la réaction primaire de séparation de charges. On peut constater que pour la réaction de transfert de charges conduisant à la disparition de l'état excité du donneur primaire (BChl^*), la constante de vitesse est environ 500 fois plus élevée que la constante de vitesse de la réaction de désactivation non radiative ($\sim 10^9$), ce qui, dans le cas d'un centre photochimique isolé, conduit à un rendement quantique proche de l'unité. Il est important de souligner que si la réaction transmembranaire de séparation de charges s'effectuait en une seule étape, la distance entre donneur et accepteur serait égale ou supérieure à 25 Å. La valeur de la constante de vitesse photochimique serait alors proche de 10^2 . La valeur du rendement quantique qui est égal au rapport entre la constante de vitesse de séparation de charge et la constante de vitesse des processus de conversion interne conduisant à la désactivation de l'état excité (10^9) serait alors proche de zéro. On peut donc conclure que les centres photochimiques les plus primitifs, dont l'origine doit remonter à près de quatre milliards d'années, devaient déjà comporter un transporteur relais (accepteur primaire) localisé au milieu de la membrane entre le donneur primaire et l'accepteur secondaire.

Les cinétiques des réactions primaires et secondaires de transfert d'électron (BChl \rightarrow BPhe et BPhe \rightarrow Qa) présentent un caractère multiexponentiel qui suggère que les centres photochimiques sont présents sous de multiples conformations auxquelles correspondent des constantes de vitesse de transfert de charge différentes. Il pourrait s'agir du même type d'hétérogénéité structurale que celle déjà envisagée pour rendre compte de la largeur des bandes d'absorption mesurées à basse température (paragraphe 1).

La théorie que Marcus a développée pour rendre compte du mécanisme de transfert d'électron suppose implicitement que les espèces chimiques, donneur et accepteur, sont en équilibre thermodynamique avec le milieu extérieur. Cette condition n'est probablement pas remplie lorsque le donneur primaire est associé à un accepteur primaire (Bph) à l'état oxydé. Dans ce cas, le processus de transfert d'électron entre donneur et accepteur limite la durée de vie de l'état excité du donneur primaire à des valeurs comprises entre 1,3 à 2,7 μ s. J.-L. Martin et ses collaborateurs ont montré que la durée de vie des modes vibrationnels de plus faible énergie, dont les fréquences sont de l'ordre de 10^{13} à 10^{12} sec^{-1} , est largement supérieure à la durée de vie de l'état électroniquement excité. Ces modes vibrationnels de basse fréquence se traduisent par des mouvements intéressant l'ensemble de l'hétérodimère qui constitue le centre réactionnel (phonons). J.-L. Martin et ses collaborateurs ont mesuré, dans la région infra-rouge du spectre, des variations périodiques de l'absorption qui sont directement corrélées aux mouvements vibrationnels de la protéine. Il apparaît donc que la réaction primaire de transferts de charges s'effectue avant complète relaxation des états vibrationnellement excités. L'interprétation du mécanisme de transfert de charges photochimiques suppose donc l'élaboration d'un outil plus élaboré que la théorie développée par Marcus.

L'analyse structurale réalisée par H. Michel, H. Deisenhofer et R. Huber montre que les centres réactionnels bactériens sont constitués par un hétérodimère comportant deux chaînes de transfert d'électron pratiquement symétriques par rapport à un axe perpendiculaire au plan de la membrane. En dépit de cette symétrie apparente, une seule de ces deux chaînes est fonctionnelle, ce qui pose un problème majeur quant à la compréhension des relations structure-fonction au sein d'une protéine. De nombreuses hypothèses ont été proposées pour rendre compte de cette dissymétrie fonctionnelle, invoquant par exemple une répartition dissymétrique de charges au sein de l'hétérodimère. La mise en œuvre des techniques de mutagenèse dirigée a permis de substituer des acides aminés ou des groupes d'acides aminés au niveau du monomère portant la chaîne de transfert inactive, substitution tendant à symétriser la structure primaire de l'hétérodimère. Il est surprenant de constater qu'aucune de ces manipulations génétique n'a permis d'améliorer l'efficacité de la voie inactive. Ces résultats démontrent que toute approche théorique ne prenant en compte que des paramètres géométriques simples, telles que la distance et l'orientation dans l'espace des transporteurs, ainsi que la valeur moyenne de la constante diélectrique au sein de la protéine,

n'est pas suffisante pour prédire l'ordre de grandeur des constantes de vitesse de transfert d'électrons. Les données expérimentales prises en compte par Dutton et collaborateurs, qui font apparaître une dépendance exponentielle de la vitesse de transferts d'électrons vis-à-vis de la distance entre transporteurs, concernent des protéines dont la structure tridimensionnelle a été optimisée au cours de l'évolution dans le sens d'une efficacité de transfert maximum. Toute approche théorique devra obligatoirement prendre en compte les détails de la structure tridimensionnelle de la matrice protéique située dans l'environnement des transporteurs. Les centres réactionnels apparaissent donc comme un objet d'étude privilégié pour les physiciens, théoriciens et expérimentateurs. La mise en œuvre coordonnée des méthodes d'analyse fonctionnelle et structurale, associées aux possibilités qu'offre la mutagénèse dirigée de perturber de manière contrôlée l'édifice protéique devrait permettre de tester expérimentalement la validité de nouvelles hypothèses théoriques.

P. J.

SÉMINAIRES

William CRAMER (Purdue University) « To beta or not to beta : the extended p-side reactive domain of the cytochrome b6f complex in oxygenic photosynthesis ».

Francis HARAUX (CEA, Saclay) « Étude du mécanisme de l'ATPsynthase à protons de type $F_0 F_1$ ».

Wolfgang NITSCHKE (CNRS, Marseille) « Diversité des complexes bc du domaine " *Bacteria* " ».

Chantal ASTIER (CNRS, Gif-sur-Yvette) « Organisation et étude des gènes *puf* et *crt* de la bactérie pourpre *Rx. gelatinosus*. Rôle photoprotecteur des caroténoïdes ».

Antoine TRÉMOLIÈRES (CNRS, Orsay) « Rôle du phosphatidylglycérol dans la biogénèse et l'organisation fonctionnelle de la membrane photosynthétique des eucaryotes ».

William RUTHERFORD (CEA, Saclay) « Photosystème II, photosystème I, émission d'oxygène, etc., étudiés principalement (mais non exclusivement) par RPE ».

Anne-Lise ÉTIENNE (ENS, Paris) « Régulation de l'expression des gènes codant pour les composants des phycobilisomes d'une algue rouge ».

Cécile BREYTON (IBPC, Paris) « Le cytochrome b6f : État d'oligomérisation, délipidation et présence mystérieuse d'une chlorophylle ».

Gilles PELTIER (CEA, Cadarache) « Réactions de transferts d'électrons au sein du chloroplaste : adaptation à des stress environnementaux ».

Jérôme LAVERGNE (CEA, Cadarache) « Stabilisation de la séparation de charges dans le centre du Photosystème II ».

Paul MATHIS (CEA, Saclay) « Transfert d'électron entre cytochrome *c* et centre réactionnel des bactéries pourpres. Relations structure-fonction ».

I. DÉVELOPPEMENT DE TECHNIQUES D'ANALYSE FONCTIONNELLE DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE

A) *Imagerie digitale de la fluorescence et de la luminescence des algues* (Pierre BENNOUN, Daniel BÉAL)

Les processus primaires de la photosynthèse impliquent des réactions d'oxydoréduction associées à une chaîne membranaire de transfert d'électrons, ainsi que des transferts vectoriels de charges à travers la membrane des thylacoïdes donnant naissance à un gradient électrochimique. Le rendement de la fluorescence de la chlorophylle *in vivo* peut être considéré comme inversement proportionnel à la vitesse de la réaction photochimique II au début d'un transitoire obscurité-lumière. Les mesures de fluorescence permettent donc d'étudier le transfert d'électrons en photosynthèse, tout en préservant parfaitement le matériel biologique. Elles fournissent ainsi un crible irremplaçable pour sélectionner des colonies d'algues présentant des anomalies de transfert d'électrons. La puissance de cette méthode a été largement accrue en faisant appel aux techniques d'imagerie numérique. P. Bennoun et D. Béal ont mis au point un appareillage basé sur l'utilisation d'une caméra CCD associée à un ordinateur. Un logiciel adapté a été développé, qui assure la commande d'expérience, le traitement des données et leur visualisation (celle-ci, réalisée en couleurs artificielles, procure une amplification visuelle des gradations d'intensité dans l'image).

Au cours d'un transitoire obscurité-lumière, plusieurs images de la fluorescence émise par des colonies d'algues présentes sur une boîte de Pétri, sont captées à la demande. Des images correspondant à toutes combinaisons algébriques de ces dernières peuvent être calculées très rapidement. Ces possibilités, jointes à l'utilisation de couleurs artificielles, permettent de mettre en évidence toutes sortes d'anomalies de fluorescence, des plus évidentes aux plus subtiles. Cette technique s'avère d'une grande richesse, tant dans le domaine de la génétique classique en autorisant la détection de nouvelles classes de mutants, que dans celui de la génétique moléculaire en rendant possible la détection de colonies mutantes après transformation. Dans le cas de transformations chloroplastiques, un phénotype mutant n'apparaît qu'après de nombreuses ségrégations mitotiques, il est donc nécessaire de détecter le plus tôt possible des colonies hétéroplasmiques présentant un phénotype intermédiaire entre sauvage et mutant : la finesse de l'imagerie numérique est alors indispensable.

Si les méthodes de sélection de mutants par fluorescence sont couramment utilisées depuis de nombreuses années, aucun crible n'a permis à ce jour de

décélérer des variations du gradient électrochimique établi de part et d'autre des thylacoïdes. P. Bennoun et D. Béal ont pu mettre au point un tel crible, basé sur l'imagerie numérique de la fluorescence retardée (luminescence) de la chlorophylle *in vivo*. L'intensité de luminescence étant extrêmement faible (environ mille fois plus faible que celle de la fluorescence), la méthode développée fait appel à une caméra refroidie autorisant une intégration des photoélectrons sur le CCD pendant des temps de l'ordre de la seconde. La luminescence des organismes photosynthétiques, qui résulte d'une recombinaison de charges au niveau des centres photochimiques II, est stimulée par le gradient électrochimique transmembranaire qui comporte une composante permanente (présente à l'obscurité) et une composante induite à la lumière. Selon le mode d'éclairage délivré (actinique ou détecteur), des images reflétant l'une ou l'autre de ces composantes peuvent être obtenues. La mise en œuvre de cette nouvelle technique devrait permettre d'isoler de nouveaux mutants perturbés au niveau de différents types de pompes à protons transmembranaires impliquées dans la formation du gradient électrochimique de protons.

B) *Développement d'une technique de spectrophotométrie d'éclair de haute sensibilité et de résolution temporelle égale à 10 nanosecondes*
(Daniel BÉAL, Pierre JOLIOT)

Le principe des méthodes spectrophotométriques développées depuis plusieurs années dans notre laboratoire consiste à échantillonner l'absorption d'une solution, d'une suspension d'objets biologiques ou d'une feuille de plante supérieure à l'aide d'éclairs monochromatiques, dont la durée détermine la résolution temporelle de la méthode. Sur ce principe, plusieurs appareils de haute sensibilité ont déjà été réalisés, mettant en œuvre des éclairs détecteurs fournis par des tubes à éclairs xénon, dont la résolution temporelle est alors limitée à 2 μ s. Une nouvelle technique a été réalisée dans laquelle les éclairs détecteurs sont produits par un laser Yag triplé, illuminant un oscillateur paramétrique (OPO) Spectra Physics. Ce dispositif, continûment accordable en longueur d'onde, délivre des éclairs monochromatiques dans une gamme allant de 410 nm à 2 000 nm. La durée à mi-hauteur des éclairs détecteurs est d'environ 8 ns, et la largeur de bande spectrale est de l'ordre du nm. Les réactions photochimiques sont déclenchées par des éclairs de forte énergie (7 mJ) fournis par un laser Yag, associé à un laser à colorant. L'appareil permet d'analyser les cinétiques de changements d'absorption photoinduits avec une résolution temporelle de 10 ns et dans un domaine de temps allant de 10 ns à 1 minute, soit environ 10 ordres de grandeur. Les fluctuations d'énergie des éclairs détecteurs (environ 15 %) sont éliminées en calculant pour chaque éclair le rapport entre l'énergie de la lumière, transmise par la cuve de mesure et la cuve de référence. Ce calcul ne permet pas de supprimer totalement les fluctuations de l'éclair détecteur en raison de faibles défauts de linéarité des deux chaînes de mesure. Ces défauts ont été étalonnés, puis compensés à l'aide d'un programme de calcul approprié. Le rapport signal/

bruit de fond est alors essentiellement déterminé par le bruit quantique au niveau des photodétecteurs. Dans les conditions optimum de mesure, le rapport signal/bruit de fond : $I/\Delta I$, où I est l'intensité de la lumière transmise, est de l'ordre de 10^5 . Cet excellent rapport signal/bruit de fond peut être obtenu sur des échantillons dont la densité optique dépasse 3 (moins de 1/1 000 de la lumière incidente transmise). Il est ainsi possible d'analyser les changements d'absorption photoinduits sur une feuille de plante supérieure qui, dans la région bleue du spectre, présente une densité optique proche de 3. Nous envisageons d'élargir le domaine d'analyse spectrale à la région ultraviolette en adaptant un dispositif doubleur de fréquence au laser Yag OPO dont nous disposons.

Une collaboration est envisagée avec l'équipe dirigée par Jean-Louis Martin (Unité INSERM 451) portant sur l'étude de macromolécules non photochimiques, tel que le récepteur cholinergique. Un ligand photoactivable sera associé au site actif de cette protéine.

La nouvelle technique que nous avons réalisée présente donc des champs d'application très divers, allant de l'étude de processus biologiques impliquant directement la lumière (photosynthèse, vision, bactériorhodopsine) jusqu'à l'analyse des relations structure/fonction au niveau de nombreuses macromolécules douées de propriétés enzymatiques et non directement photoactivables.

II. BIOÉNERGÉTIQUE

A) *Organisation de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons chez les bactéries pourpres* (Pierre JOLIOT, Anne JOLIOT, en collaboration avec André VERMÉGLIO, CEA, Cadarache)

L'analyse thermodynamique et cinétique des processus de transfert d'électrons chez la bactérie pourpre *Rhodobacter sphaeroides* avait conduit P. Joliot, A. Joliot et A. Verméglio à supposer que les différents complexes protéiques de la chaîne photosynthétique étaient associés pour former un supercomplexe comprenant deux centres photochimiques et un complexe cytochrome (cyt) bc1. Une petite molécule hydrophile, le cyt c2, est piégée dans ce supercomplexe et assure le transfert de charge entre le donneur primaire (P) et les donneurs secondaires associés au complexe cyt bc1 (cyt c1 et protéine fer soufre). Ce transfert de charge entre donneur primaire et secondaire s'effectue en moins de 2 ms, alors que le temps d'équilibration entre supercomplexes peut dépasser la dizaine de secondes. Les données structurales récentes concernant les protéines antennes, qui alimentent en énergie d'excitation les centres photochimiques, apparaissent difficilement compatibles avec le modèle des supercomplexes. Les antennes collectrices forment un anneau parfaitement circulaire entourant chaque centre photochimique. Cet anneau de protéines transmembranaires devrait donc interdire toute interaction directe entre centre photochimique et complexe cyt bc1. Afin de tester la validité du modèle des supercomplexes, l'étude des processus de transfert d'élec-

trons entre donneur primaire et secondaire a donc été reprise sur un mutant de *Rhodobacter capsulatus* (obtenu par F. Daldal et coll.) qui ne comporte pas de cyt c2 soluble. Ce mutant, qui pousse à la lumière, possède un transporteur alternatif, le cyt cy, qui contrairement au cyt c2 possède une ancre transmembranaire formée par une hélice α . Le cyt cy assure le transfert de charge entre centres réactionnels et complexes cyt bc1. L'analyse des cinétiques de réduction du donneur primaire et d'oxydation des cytochromes cy et c1 montre que pour une fraction des centres (environ 30 %), les charges positives, apparaissant au niveau du donneur primaire des centres réactionnels, sont transférées au complexe cyt bc1 en moins de 1 ms. Pour une seconde fraction de centres, la réduction du donneur primaire s'effectue exclusivement par recombinaison de charges, montrant que ces centres sont inaccessibles au cyt cy. L'analyse du transfert d'excitation entre antenne collectrice de lumière et centre photochimique montre que les centres connectés au donneur secondaire et les centres isolés sont répartis d'une manière aléatoire et que les deux types de centres sont à proximité les uns des autres. Ces résultats démontrent que les mouvements du cyt cy sont confinés à des domaines de petite dimension n'incluant qu'un seul complexe cyt bc1, en accord avec l'hypothèse des supercomplexes.

L'analyse d'un double mutant dépourvu à la fois de cyt bc1 et de cyt c2 apporte des arguments supplémentaires en faveur de l'hypothèse des supercomplexes. Les cinétiques de réduction du donneur primaire et d'oxydation du cyt cy mesurées sur ce double mutant sont fortement ralenties par rapport au cas du simple mutant. Elles présentent de plus un caractère multiphasique suggérant que le cyt cy est alors réparti de manière aléatoire dans la membrane. La vitesse d'oxydation du cyt cy est déterminée par la fréquence des collisions entre cyt cy et centres réactionnels, processus limité par la diffusion du cyt cy qui est fortement ralentie par la présence d'une ancre transmembranaire. On peut en conclure que l'association du complexe cyt bc1 aux centres réactionnels permet le confinement du cyt cy dans un domaine membranaire de petite dimension, comme le prévoit l'hypothèse des supercomplexes.

L'efficacité des processus de transfert d'électrons impliquant un cytochrome membranaire, tel que le cyt cy, reste difficile à réconcilier avec les données structurales qui suggèrent l'existence d'une couronne d'antennes séparant le centre réactionnel de la phase lipidique. Il est donc possible que dans des conditions physiologiques, les interactions entre centres réactionnels et complexes cyt bc1 brisent la symétrie de la couronne d'antennes uniquement observées sur un système reconstitué, autorisant ainsi l'établissement de contacts directs entre les différentes protéines membranaires portant les transporteurs d'électrons.

B) Caractérisation de la différence de potentiel transmembranaire sur des cellules entières (Giovanni FINAZZI, Fabrice RAPPAPORT)

Dans le cadre de la théorie de Mitchell, la force motrice pour la synthèse d'ATP est la différence de potentiel électrochimique transmembranaire qui résulte

des processus bioénergétiques (respiratoires ou photosynthétiques). Cette différence de potentiel transmembranaire a deux composantes : une composante électrique proprement dite, reflétant la dissymétrie de la répartition de part et d'autre de la membrane des donneurs (porteurs de charges positives) et accepteurs (porteurs de charges négatives) d'électrons et une composante osmotique résultant de la différence de concentration des protons de part et d'autre de la membrane. Bien que cette théorie fasse autorité depuis les années 1960-70, on dispose de peu d'information sur l'amplitude relative de ces deux composantes dans des conditions physiologiques. L'étude du fonctionnement du complexe cyt b6f de la chaîne photosynthétique constitue un moyen d'approche de ce problème particulièrement adapté, le cyt b6f catalysant une réaction de transfert d'électrons, aussi bien du côté interne que du côté externe de la membrane, ainsi que des réactions électrogéniques (c'est-à-dire qui participent à l'établissement de la différence de potentiel électrochimique) qui doivent être fortement modulées par la différence de potentiel transmembranaire. Les auteurs ont étudié les conséquences de l'addition de découplants ou d'ionophores spécifiques pour les protons sur les réactions de transfert d'électrons du côté interne de la membrane et sur les réactions électrogéniques dans des conditions d'anaérobiose. Dans ces conditions, on sait que la voie métabolique de fermentation permet l'établissement d'une différence de potentiel électrochimique transmembranaire. Comme l'on peut s'y attendre, ces réactions sont plus rapides en présence de découplant qu'en leur absence. Cependant, l'addition de nigéricine (un protonophore spécifique) provoque une accélération similaire à celle observée en présence de découplant non spécifique. Ceci indique que la composante différence de potentiel électrochimique pour les protons est prépondérante. En utilisant des tampons perméants, G. Finazzi et F. Rappaport ont pu mesurer la dépendance vis-à-vis du pH de la vitesse de la réaction électrogénique. Ils ont observé que celle-ci est ralentie à pH acide (4,5-5). Ces mesures ont également permis d'estimer l'amplitude de la différence de potentiel chimique pour les protons à 1.5 unités pH, soit 150 mV. Cette valeur est à comparer à celle estimée précédemment pour la composante électrique de la différence de potentiel transmembranaire (80 mV).

C) *Chlororespiration et gradient électrochimique transmembranaire permanent*
(Pierre BENNOUN)

A l'instar des cyanobactéries chez lesquelles photosynthèse et respiration coexistent dans les mêmes membranes, l'existence d'une chaîne électrogénique de transfert d'électrons dans les membranes thylacoïdales des chloroplastes a été proposée par P. Bennoun (1982). Dans ce modèle de « chlororespiration », la plastoquinone serait réduite par une NAD(P)H déshydrogénase et réoxydée à l'obscurité au dépend de l'oxygène par une oxydase.

En accord avec ce modèle, de nombreuses évidences moléculaires de l'existence d'une NADH déshydrogénase chloroplastique se sont accumulées chez les

plantes supérieures, mais aucune chez *Chlamydomonas*. Chez cette algue, l'existence d'une voie reliant des réducteurs présents dans le stroma à la plastoquinone est bien démontrée par des arguments d'ordre physiologique, mais aucune indication relative à sa nature moléculaire n'a pu être apportée. Par contre, en aucun cas l'existence d'une oxydase chloroplastique n'a pu être étayée par des arguments d'ordre moléculaire, bien que celle-ci soit prévue par le modèle de chlororespiration. De plus, l'existence d'interactions mitochondries-chloroplaste a été démontrée. Gans et Rebeillé (1990) ont proposé la séquence d'événements suivante : une diminution de la synthèse d'ATP mitochondriale stimule la voie glycolytique dans le chloroplaste, générant des nucléotides réduits qui vont réduire la plastoquinone. L'utilisation de mutants mitochondriaux du *cyt b* présentant une résistance au myxothiazol a permis à P. Bennoun (1994) de démontrer l'existence d'un lien de cause à effet entre l'inhibition de la respiration mitochondriale et la réduction de la plastoquinone. Dès lors que de telles interactions sont possibles, il devient très difficile de définir dans quel compartiment, chloroplaste ou mitochondrie, l'oxygène est consommé lors de l'oxydation de la plastoquinone à l'obscurité. P. Bennoun a proposé récemment un modèle alternatif à celui de la chlororespiration. Dans cette hypothèse, l'oxydation de la forme réduite de la plastoquinone impliquerait un transfert inverse d'électrons à travers la NADH-déshydrogénase, l'énergie nécessaire étant fournie par le fort gradient électrochimique de protons existant à l'obscurité et qui résulte de l'hydrolyse de molécules d'ATP d'origine mitochondriale.

P. Bennoun a également montré que la valeur du gradient électrochimique transmembranaire mesuré à l'obscurité était environ deux fois plus élevée sur les mutants totalement dépourvus d'ATPase membranaire CF_0CF_1 que sur la souche sauvage. Ce résultat paradoxal a conduit P. Bennoun à proposer l'existence d'un nouveau générateur de gradient ATP-dépendant associé au thylacoïdes. Les propriétés de ce nouveau générateur transmembranaire seraient voisines de celles des ATPases vacuolaires qui fonctionnent en générateur de gradient, même lorsqu'un fort gradient est déjà établi.

P. Joliot et A. Joliot (1994) ont démontré chez *Chlorella sorokiniana* la présence d'un gradient permanent en stricte anaérobiose, confirmant ainsi l'absence de lien entre un processus respiratoire et la formation de ce gradient : dans ces conditions, la formation du gradient chez *C. sorokiniana* est rendue possible grâce aux processus fermentatoires immédiatement actifs en anaérobiose chez cette algue, qui fournissent de l'ATP lorsque la source mitochondriale vient à manquer. P. Bennoun a pu montrer que dans ces conditions anaérobiques, c'est-à-dire dans des conditions où l'intervention d'une oxydase chloroplastique peut être exclue, un mutant de *C. sorokiniana* dépourvu d'ATP synthase CF_0CF_1 présentait toujours un fort gradient électrochimique de protons à l'obscurité. Ce gradient est sensible à des concentrations submicromolaires de tri-N-butyltin (inhibiteur du canal à protons des ATPases), renforçant ainsi son hypothèse de deux pompes ATP-dépendantes coexistant dans les membranes thylacoïdales.

D) Mécanismes de transfert d'électrons et de protons dans le complexe cyt b6f

1. Implication d'une pompe à protons au niveau du complexe cyt b6f

(P. JOLIOT, A. JOLIOT)

Les processus de transfert d'électrons et de protons intervenant au niveau des complexes cyt b6f et cyt b6l sont généralement interprétés dans le cadre de l'hypothèse du « Q cycle » proposé en 1966 par P. Mitchell. Dans cette hypothèse, la forme réduite de la plastoquinone est oxydée au niveau d'un site (Qo) localisé à proximité de la face interne de la membrane du thylacoïde. A cette oxydation est associée la réduction d'un cyt b et du cyt f et la libération de deux protons dans le lumen. La forme oxydée de la plastoquinone est ensuite réduite au niveau d'un site Qi localisé à proximité de la face externe de la membrane. A cette réduction est associée l'oxydation de deux cyt b et la fixation de deux protons prélevés dans le stroma. Dans ce modèle, les réactions électrogéniques se traduisant par la génération d'un potentiel électrique transmembranaire sont essentiellement associées au transfert d'électrons entre deux cyt b implantés en position transmembranaire. P. Joliot et A. Joliot ont montré que ce modèle ne rendait pas compte de nombreux faits expérimentaux. En premier lieu, dans des conditions où les deux cyt b sont à l'état réduit, l'illumination par un éclair induit une large phase électrogénique alors que tout transfert d'électron entre cyt b est interdit. Dans des conditions plus oxydantes, la vitesse initiale de formation du potentiel de membrane est toujours largement supérieure à celle qui peut être déduite de la vitesse des transferts d'électrons entre les deux cyt b. Ces contradictions suggèrent l'intervention d'un processus électrogénique supplémentaire non prévu par l'hypothèse du Q-cycle. P. Joliot et A. Joliot ont été conduits à proposer qu'un mouvement transmembranaire de protons était associé à la réduction du cyt b localisé à proximité de la face luménale du complexe. Cette hypothèse a été testée en étudiant l'effet du DCCD, inhibiteur spécifique des canaux à protons de l'ATPase et de la cytochrome oxydase. L'addition du DCCD *in vivo* induit l'apparition d'un délai dans la cinétique de croissance de la phase électrogénique. Ce délai n'est pas associé à un ralentissement sensible de la vitesse de réduction du cyt f et du cyt b. De plus, l'amplitude de la phase électrogénique est significativement réduite. Ces résultats suggèrent qu'au processus de transfert d'électrons et de protons, prévu dans le cadre de l'hypothèse du Q-cycle, se superpose un processus de pompage de protons depuis la face stromale vers la face luménale de la membrane. L'intervention d'un canal à protons avait été déjà été proposée par D. Beattie sur la base d'expériences effectuées sur des complexes cyt b6l et cyt b6f purifiés.

2. Changement d'absorption photoinduit associé à un effet électrochromique portant sur la chlorophylle associée au complexe cytochrome cyt b6f

(A. JOLIOT et P. JOLIOT)

Un changement d'absorption photoinduit (« signal rouge ») a été mis en évidence dans la région rouge du spectre sur différentes espèces d'algues unicellu-

laïres vertes. Le spectre photoinduit correspond à un décalage vers le rouge de la bande d'absorption d'une chlorophylle, et suggère l'intervention d'un effet électrochromique traduisant une modification de l'environnement électrostatique de ce pigment. Le signal rouge, dont la durée de vie est de plusieurs secondes, est observé en présence de dicyclohexanol-18 *crown-6*, composé qui annule rapidement le potentiel électrique transmembranaire. L'effet d'inhibiteur spécifique du complexe cyt b6f montre que le signal rouge est associé au processus d'oxydation du plastoquinol et de réduction du cytochrome f intervenant au site Qo du complexe cyt b6f. La décroissance du signal rouge n'est corrélée à aucun changement de l'état d'oxydoréduction d'un transporteur du complexe cyt b6f. Le signal rouge traduit probablement un effet électrochromique local, portant sur la chlorophylle associée au complexe cyt b6f, et identifiée par Y. Pierre et J.-L. Popot. Cet effet électrochromique serait provoqué par la fixation sur des groupes protonables des protons libérés lors du processus d'oxydation de la plastoquinone.

III. BIOGÉNÈSE ET INTÉGRATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES DU TYLACOÏDE

A) *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, University College, Londres et G. HOWE et S. MERCHANT, Université de Californie, 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 b6f. 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 b6) et quatre autres impliqués dans la fixation de l'hème b sur l'apocytochrome b6. Dans deux cas, les gènes interrompus ont pu être étiquetés, ce qui devrait permettre à terme de les cloner et les séquencer.

B) *Biogénèse du cytochrome b6* (R. KURAS, C. de VITRY, Y. CHOQUET, J. GIRARD-BASCOU, S. BUSCHLEN et F-A. WOLLMAN, en collaboration avec D. CULLER et S. MERCHANT de UCLA, USA)

Les mutants nucléaires évoqués ci-dessus ont donc révélé l'existence inattendue de plusieurs facteurs nucléaires requis dans la conversion de l'apocytochrome b6 en holocytochrome b6. Leur phénotype a pu être ainsi caractérisé par comparaison avec des mutants obtenus par mutagenèse dirigée du gène *petB*, dont les codons histidine, responsables de la coordination des hèmes *b* dans le cytochrome b6, ont été modifiés en d'autres acides aminés. Ces mutants nucléaires présentent une forme immunoréactive du cytochrome b6 sous forme de doublet après électrophorèse. Ils sont en cela analogues aux mutants dépourvus des ligands de l'hème bh tandis que les mutants de ligation de l'hème bl présentent une seule bande électrophorétique. Des expériences de croissance cellulaire en présence de gabaculine, un inhibiteur de la synthèse des tétrapyroles, ont démontré que la formation de la bande supérieure du doublet est conditionnée par la biosynthèse des hèmes. Sa persistance en conditions dénaturantes, comme la possibilité de détecter un hème sur le cytochrome b6 de la souche sauvage dans les mêmes conditions, suggère que l'interaction hème b/apocytochrome b6 diffère sensiblement des interactions non-covalentes habituelles.

C) *Identification du locus nucléaire TAB1, gouvernant la traduction d'une sous-unité chloroplastique du centre PSI* (J. GIRARD-BASCOU et P. BENNOUN, en collaboration avec O. STAMPACCHIA, J-L. ZANASCO, W. ZERGES et J-D. ROCHAIX, Université de Genève)

L'expression des gènes chloroplastiques est également étroitement contrôlée par des gènes nucléaires. Une souche mutante au locus *TAB1*, la souche F15, exprime 20 % du transcrit du gène chloroplastique *psaB* codant l'une des deux sous-unités du centre réactionnel PSI. La synthèse des deux sous-unités du centre PSI est indétectable dans ce mutant. Des transformations chloroplastiques à l'aide de gènes chimères comportant les régions 5' non-traduites des gènes codant l'une ou l'autre des sous-unités du centre PSI fusionnées à un gène rapporteur, ont permis de montrer que la cible du facteur nucléaire issu du locus *TAB1*, est située en 5' du gène *psaB*. Une mutation chloroplastique supprimant la mutation nucléaire *TAB1-F15* a été isolée. Elle concerne une paire de bases proche du codon d'initiation du gène *psaB* et suffit à restaurer la synthèse des deux sous-unités du centre PSI. Ces résultats indiquent que le produit du locus *TAB1* intervient dans l'activation de la traduction du messager de *psaB*, et fournit une nouvelle illustration de régulation épistatique des synthèses protéiques chloroplastiques, la synthèse du produit PSAA dépendant de l'expression de PSAB.

D) *Caractérisation du mode d'action des produits des loci nucléaires TBC1 et TBC3, gouvernant la traduction du gène chloroplastique psbC, du photosystème II* (J. GIRARD-BASCOU en collaboration avec W. ZERGES et J-D. ROCHAIX, Université de Genève)

L'action des produits de ces deux loci a été caractérisée par l'usage de gènes chimères et l'effet suppresseur de mutations de *TBC3* sur des mutations chloroplastiques du gène *psbC*. *TBC1* et *TBC3* agissent tout deux sur l'initiation de la traduction en 5' de ce gène. Une mutation nucléaire au locus *TBC3* a un effet suppresseur sur le blocage traductionnel dû à des modifications en cis dans la région en tige-boucle du 5' non-traduit de *psbC*, région cible pour le facteur *TBC1*. La même mutation supprime le blocage traductionnel produit par une mutation de *TBC1*. Ces observations suggèrent l'existence de deux sites distincts pouvant assurer l'initiation de la traduction de *psbC*. Le produit sauvage *TBC3* pourrait intervenir comme un répresseur de l'initiation de la traduction au site qui n'est pas impliqué dans l'activation par *TBC1*.

E) *Étude de mutations dans les gènes Pcy1 et Pcy2, impliqués dans la biogénèse de la plastocyanine* (J. GIRARD-BASCOU en collaboration avec H.H. LI, J. QUINN, D. CULLER & S. MERCHANT)

Plusieurs mutants altérés dans les gènes *Pcy1*, gène de structure de la plastocyanine, et *Pcy2*, responsable de la conversion apo-/holo-plastocyanine, ont été caractérisés au niveau génétique et moléculaire. Quatre allèles mutantes de *Pcy1* ont ainsi été identifiées, conduisant soit à la déstabilisation de l'ARNm, à son non-traductibilité, ou à une extension au C-terminal de la protéine. Dans ce dernier cas, la protéine est rapidement dégradée dans le lumen du thylacoïde, ce qui confirme l'existence d'une protéase active dans ce compartiment. Le mutant de *Pcy2* accumule l'apoprotéine dans le lumen et celle-ci disparaît en l'absence de cuivre. Il s'avère donc que l'apo- et l'holo-forme de plastocyanine sont activement détruites en carence en cuivre.

PUBLICATIONS

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, 1996, pp. 265-287.

P. JOLIOT, A. VERMÉGLIO & A. JOLIOT. « Supramolecular organization of the photosynthetic chain in chromatophores and cells of *Rhodobacter sphaeroides* ». *Photosynthesis Research*, **48**, 1996, 291-299.

J. LAVERGNE & P. JOLIOT. « Dissipation in bioenergetic electron transfer chains ». *Photosynthesis Research*, 1996, **48**, 127-138.

H.H. LI, J. QUINN, D. CULLER, J. GIARD-BASCOU & S. MERCHANT. « Molecular genetic analysis of plastocyanin biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *J. Biol. Chem.* 1996, **49**, 31283-31289.

D. HAHN, P. BENNOUN & U. KÜCK. « Altered expression of nuclear genes encoding chloroplast polypeptides in non-photosynthetic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* : evidence for post-transcriptional regulation ». *Mol. Gen. Genet* 1996, **252**, 362-370.

F. ZITO, R. KURAS, Y. CHOQUET, H. HÖSSEL & F.A. WOLLMAN. « Mutations of cytochrome b6 in *Chlamydomonas reinhardtii* provide the functional significance of a proline to leucine conversion by petB editing in maize and tobacco ». *Plant Molecular Biology*, 1997, **33**, 79-86.

G. FINAZZI, S. BÜSCHLEN, C. de VITRY, F. RAPPAPORT, P. JOLIOT & F. RAPPAPORT. « Function-directed mutagenesis of the cytochrome b6f complex in *Chlamydomonas reinhardtii* : Involvement of the cd loop of cytochrome b6 in quinol binding to the Qo site ». *Biochemistry*, 1997, **36**, 2867-2874.

P. JOLIOT, A. JOLIOT & A. VERMÉGLIO. « Photo-induced cyclic electron transfer operates in frozen cells of *Rhodobacter sphaeroides* ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, **1318**, 374-384.

P. BENNOUN & D. BÉAL. « Screening algal mutant colonies with altered thylakoid electrochemical gradient through fluorescence and delayed luminescence imaging ». *Photosynthesis Research*. 1997, **51**, 161-165.

PUBLICATIONS SOUS PRESSE

O. STAMPACCHIA, J. GIRARD-BASCOU, J.-L. ZANASCO, W. ZERGES, P. BENNOUN & J.-D. ROCHAIX. « A nuclear function essential for translation of the chloroplast ». *Plant Cell*, sous presse.

P. BENNOUN & D. BÉAL. « Fluorescence and delayed luminescence digital imaging ». In : « Molecular Biology of *Chlamydomonas* », J.-D. Rochaix et al. eds., Kluwer academic publishers, sous presse.

P. BENNOUN. « Chlororespiration, fifteen years later ». In : « Molecular Biology of *Chlamydomonas* » J.-D. Rochaix et al. eds., Kluwer academic publishers, sous presse.

D. M. KRAMPER, B. SHOEPPE, U. LIEBL & W. NITSCHKE. « Cyclic electron transfer in *Heliobacillus mobilis* involving a menaquinol oxidizing cytochrome bc complex and an RCI-type reaction center ». *Biochemistry*, sous presse.

P. JOLIOT, D. BÉAL, R. DELOSME. « *In vivo* measurements of photosynthetic activity ». In : « Molecular Biology of *Chlamydomonas* » J.-D. Rochaix et al. eds., Kluwer academic publishers, sous presse.

F.-A. WOLLMAN. « *Chlamydomonas* research on the structure, function and biogenesis of cytochrome b6f complexes ». In : « Molecular Biology of *Chlamydomonas* ». J.-D. Rochaix et al. eds., Kluwer academic publishers, sous presse.

F.-A. WOLLMAN & J. OLIVE. « Structural organization of thylakoid membranes ». In : « Molecular Biology of Chlamydomonas ». J.-D Rochaix et al. eds., Kluwer academic publishers, sous presse.

Thèse

C. BREYTON. « Contribution à l'étude structurale et fonctionnelle du complexe cytochrome b6f de la chaîne photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie*, soutenue le 9 Janvier 1997.