

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 de Méditerranée Aix-Marseille 2 devant un public d'étudiants et de chercheurs. Ce cours est une synthèse de plusieurs enseignements plus spécialisés que j'ai dispensés ces dernières années au Collège de France.

La première partie du cours a été consacrée à une analyse théorique des mécanismes de transferts d'électron intervenant entre les nombreux composés redox formant les chaînes réactionnelles impliquées dans les grands processus de la bioénergétique tels que la respiration et la photosynthèse. Ces composés redox sont le plus souvent des cofacteurs associés à des édifices protéiques de grandes dimensions. Les transferts d'électron intervenant entre ces différents cofacteurs impliquent toujours la traversée de la protéine, milieu isolant de faible constante diélectrique, sur des distances de plusieurs Angströms. Les transferts d'électron s'effectuent donc obligatoirement par effet tunnel, processus dont l'efficacité décroît très rapidement avec la distance. Les constantes de vitesses prévues théoriquement et mesurées expérimentalement varient de plus de dix ordres de grandeur (10^{12} à 10 s⁻¹) pour des distances comprises entre 3 et 30 Angströms. Les changements d'état d'oxydo-réduction des transporteurs d'électrons sont souvent accompagnés de processus de protonation ou de déprotonation, intéressant le transporteur lui-même ou des groupes protonables localisés à proximité. Ces échanges de protons permettent de limiter les contraintes électrostatiques liées à l'apparition d'espèces radicalaires chargées positivement ou négativement au sein des édifices protéiques. Les formes réduites des transporteurs d'électrons, susceptibles de diffuser librement dans la phase aqueuse, sont le plus souvent électriquement neutres à la suite de la fixation de un ou deux protons. Ces espèces réductrices ne peuvent réagir qu'au niveau de sites enzymatiques et forment l'essentiel de la matière organique constituant les êtres vivants.

L'étude théorique et expérimentale des processus d'absorption de la lumière a été abordée en s'intéressant plus particulièrement aux complexes pigments-pro-

téines chlorophylliens, qui constituent l'essentiel de l'appareil collecteur d'énergie lumineuse des algues et des plantes supérieures. La nature des différents paramètres responsables de l'élargissement des bandes d'absorption des complexes pigments-protéines a été discutée en détail. Cet élargissement s'explique en partie par la coexistence de multiples conformations de la protéine qui se traduisent par une large distribution des positions des bandes d'absorption. L'absorption d'un photon par une molécule se traduit par un transfert intramoléculaire d'électron depuis une orbitale de faible énergie vers une orbitale non occupée. Dans le cas de certains complexes pigments-protéines spécialisés (centres réactionnels), l'électron ainsi porté dans un état excité et faiblement lié peut être transféré vers un accepteur d'électron situé à proximité. Ce transfert constitue la réaction photochimique primaire, au cours de laquelle s'effectue la conversion d'énergie lumineuse en énergie chimique. Le rendement de la réaction photochimique est donc directement proportionnel au rapport de la vitesse de la réaction primaire de transfert d'électron à la vitesse de la réaction inverse conduisant au retour de l'électron dans son état fondamental. La durée de vie de l'état excité étant de l'ordre de 10^{-9} s, la constante de vitesse de la réaction primaire de transfert d'électron doit être supérieure à 10^{10} s⁻¹. Cette contrainte d'ordre cinétique impose que la distance entre le pigment excité et l'accepteur primaire d'électron soit extrêmement faible (< 5 Angströms).

Le cours a ensuite porté sur l'exposé des processus de couplage entre réactions de transfert d'électron et de synthèse d'adénosine triphosphate (ATP), mécanisme élucidé par Mitchell dans le cadre de la théorie chemiosmotique. Cette théorie unificatrice s'applique à l'ensemble des processus de la bioénergie impliqués dans la production de l'énergie utilisée par les êtres vivants. Le couplage entre réaction de transfert d'électron et synthèse d'ATP met en jeu des formes d'énergies électrique et osmotique, délocalisées au niveau des membranes qui forment des vésicules fermées et qui portent l'essentiel des catalyseurs constituant les appareils respiratoire ou photosynthétique. Une réflexion sur les bases de la théorie chemiosmotique permet de formuler quelques hypothèses quant à la nature des formes les plus primitives des appareils convertisseurs d'énergie, qu'ils soient de type photosynthétique ou respiratoire. Dans ce dernier cas, et compte tenu du caractère très réducteur de l'environnement avant l'apparition de la photosynthèse oxygénique, l'oxydant nécessaire au processus respiratoire ne pouvait être que l'oxygène produit par des réactions photochimiques abiotiques, impliquant la décomposition de l'eau par la lumière ultraviolette, alors distribuée abondamment à la surface du globe. Les convertisseurs d'énergie les plus primitifs étaient probablement formés d'une seule protéine, comportant une chaîne de transfert d'électron transmembranaire et connecté à deux transporteurs d'hydrogène localisés respectivement dans les phases aqueuses, situées de part et d'autre de la membrane et jouant le rôle de donneur et d'accepteur d'électron. Un tel dispositif était suffisant pour assurer un pompage transmembranaire de protons, et par conséquent, l'accumulation d'énergie sous forme électrique et osmotique. Cette

énergie induisait la synthèse d'ATP au niveau d'une ATP synthase, pompe à proton réversible implantée dans le même sac membranaire.

La seconde partie du cours a porté sur l'étude des principaux complexes transmembranaires formant les chaînes de transfert d'électron des appareils photosynthétiques présents dans les bactéries, les algues et les plantes supérieures. C'est au niveau des centres réactionnels que s'effectue la conversion photochimique entre énergie lumineuse et énergie chimique. La structure de certains centres réactionnels a pu être résolue à l'échelle atomique. Il s'agit d'édifices transmembranaires formés par l'association de plusieurs polypeptides et portant un ensemble de cofacteurs impliqués dans la réaction photochimique primaire et le transfert d'électron transmembranaire. On peut distinguer deux familles de centres réactionnels qui diffèrent par la nature des accepteurs d'électron terminaux. Les centres de type I comportent des accepteurs constitués par les associations de plusieurs atomes de fer et de soufre, alors que les centres de type II comportent des quinones comme accepteurs terminaux. Les chaînes de transfert d'électron des bactéries photosynthétiques ne comportent généralement qu'un seul type de centre réactionnel, alors que les organismes oxygéniques comportent obligatoirement les deux types de centres fonctionnant en série. L'intervention séquentielle de deux réactions photochimiques est en effet nécessaire pour fournir l'énergie requise par le transfert d'électron depuis l'eau jusqu'au gaz carbonique. Les centres de types I et II ne présentent aucune homologie significative quant à la composition des chaînes polypeptidiques, mais de très forte similitude sur le plan structural et fonctionnel. On constate en effet que les centres réactionnels sont toujours organisés sous forme de dimères et que l'organisation spatiale des principaux cofacteurs qui les constituent sont pratiquement identiques. De même, la séquence et la cinétique des réactions de transfert d'électron sont analogues. Il semble difficile d'admettre qu'une telle analogie fonctionnelle et structurale entre les deux types de centres soit le résultat d'une convergence intervenue au cours de l'évolution. Il faut alors supposer l'existence d'un ancêtre commun aux deux types de centres photochimiques. Cet ancêtre commun serait apparu à des temps proches de l'origine de la vie puisque la photosynthèse oxygénique, qui implique la participation simultanée des centres de types I et II, était déjà présente il y a environ 3,5 milliards d'années.

Les chaînes de transfert d'électron photosynthétiques comportent un second type de complexe, le complexe cytochrome bc ou cytochrome bf qui catalyse l'oxydation de différents types de quinones présentes dans la phase lipidique de la membrane et la réduction de petites protéines solubles, telles que la plastocyanine ou le cytochrome c_2 . Les caractéristiques structurales et fonctionnelles de ces complexes ont été analysées en détail. L'accent a été mis sur l'analyse des différents mécanismes susceptibles de participer au pompage électrogénique de protons associés au processus de transfert d'électrons. Les dernières données obtenues dans notre laboratoire laissent supposer que plusieurs processus indépendants, boucles électrogéniques proposées par Mitchell et pompes impliquant

un mouvement de proton transmembranaire, seraient impliqués dans la conversion d'énergie chimique en énergies électrique et osmotique se produisant au niveau des complexes de type cytochrome bf.

SÉMINAIRES

Bernard LAGOUTTE (CEA Saclay), « Le site récepteur de la ferredoxine sur le photosystème I : données préliminaires ».

Yaroslava MIKSOVSKA (CNRS Gif-sur-Yvette), « Flexibilité de la structure tridimensionnelle des centres réactionnels vis-à-vis du transfert de protons ».

Yves CHOQUET (IBPC Paris), « Le contrôle par épistasie de la synthèse du cytochrome *f* dans le chloroplaste de *C. reinhardtii* ».

Monique SABATY (LBC CEA Cadarache), « Le rôle essentiel de la nitrate réductase périplasmique dans la voie bioénergétique de dénitrification chez *Rhodobacter sphaeroides denitrificans* ».

Catherine BERTHOMIEU (CEA Saclay), « Étude des tyrosines redox du photosystème II par spectroscopie infrarouge ».

Andy PASCAL (CEA Saclay), « Les bases structurales de la capture de l'énergie lumineuse chez les plantes et les algues ».

Fabienne PERSELLO (LMC CEA Cadarache), « Identification d'un nouveau composant du système d'adressage chloroplastique des antennes collectrices de lumière grâce aux mutants chaos ».

Lise CARON (ENS Paris), « Complexes collecteurs d'énergie à fucoxantine : interactions pigments-protéines ».

Myriam BRUGNA (CNRS Marseille), « Étude du changement conformationnel de la protéine de Rieske par RPE ».

Daniel PICOT (IBPC, Paris), « Vers une détermination structurale de toutes les protéines photosynthétiques ».

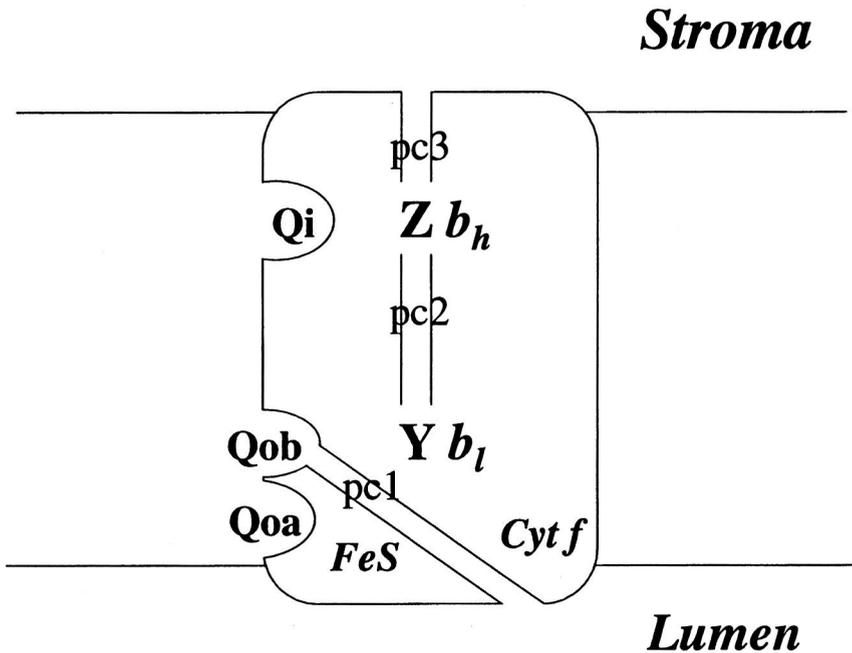
I. MÉCANISME DE TRANSFERT D'ÉLECTRON ET DE PROTÓN DANS LE COMPLEXE CYTOCHROME B₆F

A) Mise en évidence d'une pompe à protons couplée à la réduction du cyt *b* (P. JOLIOT et A. JOLIOT)

Les transferts d'électron à travers le complexe cytochrome b₆f sont associés à un pompage de proton induisant la formation d'un gradient électrochimique de protons transmembranaire. Mitchell a proposé l'hypothèse du cycle Q pour rendre compte du mécanisme de couplage entre transfert d'électron et transfert de proton dans le cas des complexes cytochrome (cyt) bc ou (cyt) b₆f (voir précédent

rapport). Ce mécanisme représente un cas particulier de boucle électrogénique, modèle imaginé antérieurement par Mitchell dans le cadre plus général de la théorie chemiosmotique. Dans cette classe de modèles, les réactions électrogéniques, conduisant à la formation d'un gradient électrochimique de protons, sont essentiellement associées à un mouvement transmembranaire d'électrons à travers une chaîne de transfert d'électron implantée dans le complexe membranaire. A ce mouvement d'électrons est associé le mouvement d'un transporteur d'hydrogène en sens opposé. Dans le cas particulier du complexe $\text{cyt } b_6f$, ce transporteur est une molécule de plastoquinol (PQH_2) en solution dans la phase lipidique de la membrane. L'originalité de ce type de processus réside dans le fait que ce pompage de proton, qui résulte d'un transfert d'électron et d'un transfert d'atomes d'hydrogène, n'implique pas de mouvement transmembranaire de protons. Les seules espèces chargées concernées sont donc les électrons qui, en raison de leur faible masse, peuvent aisément traverser par effet tunnel les régions hydrophobes de la protéine. Dans une seconde classe de mécanismes, le pompage de proton implique effectivement un mouvement transmembranaire. La protéine doit alors comporter un canal, où des résidus polaires et des molécules d'eau permettent aux protons de se déplacer dans les régions hydrophobes. Le fonctionnement de cette pompe implique d'autre part l'intervention d'un mécanisme moléculaire jouant le rôle de valve anti-retour. L'exemple le plus caractéristique de ce type de pompe est l'ATP-synthase ou ATPase, enzyme réversible, qui assure la conversion des énergies électrique et osmotique en énergie chimique sous forme d'ATP. La Bactériorhodopsine, qui réalise directement la conversion de l'énergie lumineuse en énergies électrique et osmotique, représente un second exemple de pompe à proton. Wikström et ses collaborateurs ont montré que dans le cas de la cytochrome oxydase, enzyme terminal de la chaîne respiratoire, les deux types de mécanismes opèrent en parallèle. L'efficacité globale du processus de pompage de proton est alors supérieure à celle prévue par le modèle classique de Mitchell. Dans le précédent rapport, P. Joliot et A. Joliot ont proposé que les deux classes de mécanismes sont également impliquées dans les processus de pompage de proton se produisant au niveau complexe $\text{cyt } b_6f$ des algues unicellulaires. Cette hypothèse est fondée sur l'analyse des cinétiques initiales de formation du potentiel de membrane. Un mouvement transmembranaire de proton serait associé à la réduction du cytochrome b localisé à proximité du site Q_0 (Schéma 1). Ce pompage de proton additionnel est inhibé par le DCCD, inhibiteur spécifique des canaux à proton. P. Joliot et A. Joliot ont pu confirmer cette hypothèse en montrant que le rapport entre le nombre de charges transférées à travers la membrane au niveau du complexe $\text{cyt } b_6f$ et le nombre de charges positives formées au niveau du photosystème I est supérieur à celui qui peut être calculé sur la base de l'hypothèse du cycle Q. Lors de l'illumination par éclairs de faible énergie, 2 charges sont transférées à travers la membrane par charge positive transférée au complexe $\text{cyt } b_6f$. Ces résultats impliquent sans ambiguïté l'intervention d'une réaction électrogénique supplémentaire, sous réserve que les changements d'absorption mesurés à 515 nm représentent une mesure fiable de la valeur du potentiel

membranaire. Rappelons que le potentiel de membrane induit des effets électrochromiques sur des pigments implantés dans des complexes pigments protéines transmembranaires (essentiellement chlorophylle b et caroténoïdes) et présentant un maximum d'absorption à 515 nm. En comparant les signaux obtenus sur une souche sauvage et sur un mutant dépourvu de complexe $\text{cyt } b_6f$, P. Joliot et A. Joliot ont démontré que l'augmentation d'absorption à 515 nm mesurée sur la souche sauvage dans un domaine de temps compris entre 100 μs et 50 ms était exclusivement associée aux réactions de transfert de charges se produisant au niveau du complexe $\text{cyt } b_6f$. D'autre part, ils ont observé que ces signaux sont de très faible amplitude dans le cas de mutants dépourvus d'antenne chlorophyllienne périphérique qui porte l'essentiel des sondes électrochromiques. On peut en conclure que les changements d'absorption mesurés à 515 nm traduisent exclusivement la formation d'un potentiel délocalisé correspondant aux mouvements transmembranaires de charge se produisant au niveau du complexe $\text{cyt } b_6f$.



Un modèle structural et fonctionnel rendant compte de l'ensemble des processus de transferts d'électron et de proton intervenant au niveau du complexe $\text{cyt } b_6f$ a été proposé (Schéma 1). Dans ce modèle, le complexe $\text{cyt } b_6f$ comporte un ensemble de canaux permettant aux protons de traverser la membrane. La séquence des réactions de transfert d'électron est identique à celle proposée dans l'hypothèse du cycle Q. Ce modèle comporte cependant une étape supplémentaire, correspondant à un mouvement de proton transmembranaire. La semiquinone

chargée négativement, formée transitoirement au site Q_o , induit par interaction électrostatique, une augmentation du pK d'un résidu protonable Y situé à proximité de ce site. Cette modification de pK entraîne la fixation d'un proton qui provient du canal transmembranaire pc 2. A cette réaction de protonation est donc associée une phase électrogénique correspondant au pompage d'un proton depuis le stroma vers le lumen. Cette étape supplémentaire se superpose aux processus de pompage de proton associés aux réactions de transfert d'électron et décrite par le cycle Q. L'implication d'une étape supplémentaire de pompage de proton améliore le rendement énergétique de la conversion d'énergie redox en énergies électrique et osmotique se produisant au niveau du complexe cyt b_6f .

B) Conséquences de la substitution isotopique hydrogène/deutérium (H/D) sur le fonctionnement du cytochrome b_6f (C. DENIAU et F. RAPPAPORT)

L'hypothèse selon laquelle un pompage de proton est associé à la réduction du cytochrome b, localisé à proximité du lumen, implique l'intervention de canaux à protons transmembranaires (Schéma). Les études structurales les plus récentes montrent que ces canaux sont formés par des files de molécules d'eau localisées à l'intérieur de la protéine et associées les unes aux autres par des liaisons hydrogène. On pouvait alors supposer que le mouvement de proton à travers ces canaux serait particulièrement sensible à une substitution eau légère-eau lourde (H/D). C. Deniau et F. Rappaport ont observé que la substitution isotopique H/D ralentit de façon remarquablement spécifique la phase initiale de croissance du potentiel de membrane qui, dans l'hypothèse de P. Joliot et A. Joliot, est associée au pompage de proton. Par ailleurs, la substitution isotopique ne modifie que peu les vitesses de transfert d'électron se traduisant par la réduction des cytochromes b et f. La substitution isotopique H/D induirait donc un ralentissement du mouvement des protons à travers le canal connectant le site Q_o au lumen (pc 1, Schéma). Il est possible de plus, en utilisant un inhibiteur du site Q_i , de diminuer de façon spécifique la contribution des étapes électrogéniques impliquant uniquement des transferts d'électrons. Dans ces conditions, l'électrogénicité totale résultant du fonctionnement du cytochrome b_6f est diminuée dans des proportions très inférieures à celles prévues par le cycle Q. Là encore, la substitution isotopique H/D ralentit de façon spécifique la vitesse initiale des changements d'absorption mesurés à 515 nm. Ceci permet d'attribuer sans ambiguïté cette phase à un transfert de protons étayant ainsi le modèle de pompage de protons corrélé à la réduction de b_1 proposé par P. Joliot et A. Joliot.

II. MISE EN ÉVIDENCE D'UN NOUVEAU GÉNÉRATEUR DE DIFFÉRENCE DE POTENTIEL ÉLECTROCHIMIQUE DANS LES MEMBRANES THYLACOÏDALES (F. RAPPAPORT, G. FINAZZI, Y. PIERRE et P. BENNOUN)

A l'aide d'une technique d'imagerie digitale de la luminescence émise par la chaîne photosynthétique P. Bennoun a pu isoler des mutants de *Chlorella soro-*

kiniana déficients en complexe CF_0CF_1 ATPase. L'étude biochimique de ces souches montre une absence d'accumulation et même de synthèse des sous unités α - CF_1 et β - CF_1 de l'ATPase CF_0CF_1 . En se fondant sur des travaux antérieurs selon lesquels un certain nombre d'observables sont sensibles à l'existence d'une différence de potentiel transmembranaire, ces auteurs ont montré que malgré l'absence de complexe CF_0CF_1 , une différence de potentiel est établie de part et d'autre de la membrane thylacoïdale, et ceci aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose. Par ailleurs, ce gradient électrochimique est constitué essentiellement d'une composante électrique alors qu'en présence de CF_0CF_1 ATPase, la composante gradient de pH prédomine. Ces résultats indiquent que ni la présence résiduelle de CF_0CF_1 ATPase, ni un processus respiratoire ne permettent de rendre compte de la persistance de ce gradient électrique dans les souches mutantes, étayant ainsi l'hypothèse, formulée par P. Bennoun, de l'existence d'une autre pompe ionique que l'ATPase dans les membranes des thylakoïdes. De plus, ces résultats montrent que cette pompe transporte d'autres ions que des protons.

III. ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ DE LA SÉPARATION DE CHARGE PHOTOCHEMIE AU SEIN DU PHOTOSYSTÈME II (J. LAVERGNE et F. RAPPAPORT)

Lorsque l'on illumine des centres réactionnels photosystème II par une séquence d'éclairs courts et saturants, l'émission d'oxygène présente une dépendance marquée en fonction du numéro de l'éclair avec des maxima lors des troisièmes, septièmes, onzièmes ... éclairs comme l'avait initialement montré P. Joliot. Ceci reflète la nécessité d'accumuler quatre équivalents oxydés afin d'atteindre le pouvoir oxydant suffisant pour oxyder deux molécules d'eau en oxygène. Toutefois, le caractère oscillant de l'émission d'oxygène est significativement amorti lors de la séquence d'illumination. Cet amortissement a été interprété par Forbush et Kok comme traduisant le fait que lors de chaque éclair, une fraction de centre réactionnel apparaît incapable d'effectuer la séparation de charges. Ce phénomène est aléatoire en ce sens qu'il ne traduit pas une hétérogénéité fonctionnelle, mais plutôt le fait que pour chaque éclair, chaque centre a une probabilité de l'ordre de 5 % de ne pas convertir l'énergie lumineuse absorbée en une différence de potentiel électrochimique. Deux types d'hypothèses permettent de rendre compte de ces « ratés photochimiques ». Soit, du fait des équilibres redox prévalant du côté accepteur ou donneur d'électron, une fraction de centres est incapable d'effectuer la séparation de charges primaires, soit la séparation de charges a bien lieu, mais une fraction de centres retourne à l'état initial à cause d'une compétition entre recombinaison et stabilisation de l'état « charge séparée ». A partir des données que l'on possède sur les constantes des équilibres redox, il est possible de montrer que la première hypothèse ne suffit pas à rendre compte de l'amplitude du phénomène. En utilisant des inhibiteurs des transferts d'électrons du côté donneur d'une part et du côté accepteur d'autre part, de façon à s'affranchir des équilibres redox prévalant avant l'illumination,

F. Rappaport en collaboration avec J. Lavergne (CEA Cadarache) montrent qu'une compétition entre recombinaison et stabilisation de l'état « charge séparée » intervient et que celle-ci est modulée par un équilibre conformationnel.

IV. ÉTUDE DES TRANSFERTS D'ÉLECTRONS DU CÔTÉ DONNEUR D'ÉLECTRON
DU CENTRE RÉACTIONNEL DE *RHODOPSEUDOMONAS VIRIDIS* SUR CELLULES ENTIÈRES
(F. BAYMANN, D. BÉAL, P. JOLIOT, A. VERMÉGLIO ET F. RAPPAPORT)

Le développement récent au laboratoire d'une nouvelle technique spectroscopique autorise l'étude des réactions de transfert d'électron dont la vitesse est inférieure à la μs . Ces auteurs ont utilisé cette technique pour étudier les transferts d'électrons entre le donneur chlorophyllien photooxydé P et le cytochrome tétrahémique de *Rhodopseudomonas viridis* sur des cellules entières, ainsi que sur des fragments de membrane. Ces réactions ayant été déjà caractérisées par différents auteurs sur des centres réactionnels purifiés ou sur des fragments de membrane, outre la validation expérimentale d'une nouvelle technique, cette étude permet de préciser l'influence de paramètres bioénergétiques tels que la différence de potentiel transmembranaire induite par l'activité photosynthétique, sur les paramètres thermodynamiques et cinétiques des réactions de transfert d'électron. En effet, cette étude montre que la constante d'équilibre de la réaction de transfert d'électron entre P et l'hème donneur d'électron *c559* est de 2 sur des cellules entières. Par ailleurs, l'addition d'un découplant, permettant d'annuler la différence de potentiel électrochimique induite par l'activité métabolique de la cellule, se traduit par une augmentation de cette constante d'équilibre qui a, alors, une valeur similaire à celle mesurée sur des fragments de membrane (6-7). Ce résultat suggère que, comme on pouvait s'y attendre, les potentiels redox des différents transporteurs d'électron sont sensibles à la différence de potentiel transmembranaire. Ainsi la différence de potentiel entre le couple P⁺/P et le couple *c559*⁺/*c559* serait diminuée d'environ 20 mV par l'existence de la différence du potentiel transmembranaire. Pour autant, et même en absence de potentiel transmembranaire, la constante d'équilibre s'avère plus faible que celle prévue à partir des différences de potentiels redox (100). Ces anomalies ont été interprétées par l'intervention d'interactions électrostatiques existant entre les différents transporteurs d'électrons, interactions qui, bien qu'intervenant lorsque les potentiels d'oxydoréduction sont mesurés par titration redox, n'avaient pas été prises en compte pour le calcul des constantes d'équilibre des réactions de transferts d'électrons.

V. CORRÉLATIONS STRUCTURE-FONCTION DANS LE COMPLEXE CYTOCHROME *B₆F* : LE RÔLE DU RÉSIDU GLU 78 DE LA SOUS-UNITÉ IV DANS LA FONCTION DU SITE Q₀
(F. ZITO, G. FINAZZI, P. JOLIOT ET F.-A. WOLLMAN)

Nous avons entrepris la caractérisation du site Q₀ de fixation des plastoquinols sur le complexe cytochrome *b₆f* en effectuant des expériences de mutagenèse

dirigée chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Nous avons choisi la séquence protéique PEWY, parfaitement conservée dans tous les complexes bc 1 et b_6f , dont la participation à l'organisation du site Qo a été suggérée sur la base d'expériences réalisées avec les complexes bc des mitochondries et des bactéries. La séquence PEWY est située entre les deux hélices transmembranaires E et F de la sous-unité IV du complexe protéique, dans une boucle polypeptidique située du côté lumenal de la membrane thylacoïdale. Nous avons converti le résidu glutamique 78 en d'autres résidus présentant sensiblement le même encombrement stérique, mais différent radicalement par leur charge. L'analyse fonctionnelle a été menée *in vivo* dans des conditions anaérobiques dans un régime d'illumination par éclairs courts et non saturants. Lorsqu'une lysine ou une leucine sont placées en position 78, la cinétique du transfert d'électron au site Qo est ralentie par un facteur 3 à 5. Lorsqu'un résidu glutamine ou asparagine est placé en position 78, une modification profonde du mode de fonctionnement du complexe cyt b_6f se fait jour. La stœchiométrie des charges traversant la membrane par électron injecté dans la chaîne de haut potentiel (protéine de Rieske et cytochrome f) augmente au-delà de ce qui est prévu par le modèle de fonctionnement — le Q cycle — couramment admis pour le complexe cytochrome b_6f . Parallèlement à cette augmentation, la phase de réduction des cytochromes b est de particulièrement faible amplitude dans les deux mutants. Ces résultats peuvent s'interpréter convenablement dans le cadre d'une pompe à protons associée au complexe cytochrome b_6f dont le fonctionnement serait exalté dans ces mutants. Ainsi la séquence PEWY détermine bien le transfert d'électron au site Qo et la présence du résidu glutamique, chargé négativement, gouverne les stœchiométries relatives des charges transférées au photosystème I et des charges transloquées à travers la membrane des thylacoïdes.

VI. EXPRESSION GÉNÉTIQUE DU CHLOROPLASTE

A) *Le groupement génique atpA chez Chlamydomonas reinhardtii* (D. DRAPIER, B. RIMBAULT, F.-A. WOLLMAN en collaboration avec H. SUSUKI, H. LEVY, K.L. KINDLE et D.B. STERN de l'Institut Boyce Thompson de l'Université Cornell)

Comme nous l'avons indiqué dans un rapport précédent, nous avons observé que le gène chloroplastique *atpA* de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, codant une sous-unité majeure de l'ATP synthétase du chloroplaste, appartient à une unité de transcription polycistronique qui comporte également en aval les gènes *psbI* (photosystème II), *cemA* (une protéine de l'enveloppe) et *atpH* (sous-unité du segment transmembranaire de l'ATP synthétase). Ce type d'unité de transcription se rencontre fréquemment dans le chloroplaste des plantes vasculaires, mais elle n'a été que rarement identifiée dans les génomes d'algues vertes unicellulaires. Nous avons identifié les 8 transcrits mono-, di-, tri- et tétra-cistroniques qui sont issus de cette région du chromosome plastidial, et nous avons

déterminé leurs extrémités 5' et 3'. Une des propriétés originales de cette région génique est de présenter une organisation transcriptionnelle redondante puisque des régions promotrices ont été identifiées en amont des gènes *atpA*, *psbI* et *atpH*. En introduisant, par transformation génétique du chloroplaste, de petites délétions ou des sites de coupure endonucléolytique dans cette région, nous avons démontré que la sous-unité α de l'ATP synthétase peut être traduite indifféremment par les transcrits mono-, di-, tri- ou tétra-cistroniques. De plus, son taux de traduction reste très largement insensible à de grandes variations de la concentration stationnaire de transcrits portant la séquence *atpA*. Ces observations renforcent nos conclusions précédentes relatives à la part prééminente de l'étape traductionnelle dans le niveau d'expression protéique dans le chloroplaste.

B) *Une exoribonucléase 5'-3' active dans le chloroplaste de Chlamydomonas reinhardtii* (J. GIRARD-BASCOU, Y. CHOQUET en collaboration avec R. DRAGER, K.L. KINDLE et D.B. STERN de l'Institut Boyce Thompson de l'Université Cornell)

Nous avons caractérisé la souche mutante nucléaire F16, dépourvue de complexe cytochrome b_6f . La mutation *mcd1-F16* affecte spécifiquement la stabilité du transcrit chloroplastique *petD*, qui code la sous-unité IV du complexe $cyt\ b_6f$. Par transformation génétique à l'aide de gènes chimères, nous avons localisé la cible du facteur MCD1 en 5' du transcrit du gène *petD*. Curieusement, le contexte mutant *mcd1-F16* ne déstabilise pas les transcrits porteurs de cette région 5', lorsque celle-ci est placée en aval d'une autre séquence dans un transcrit du chloroplaste. Cette observation nous a conduit à insérer des séquences polyguanosines dans la région 5' non traduite du transcrit *petD*. Ces séquences sont réputées former des structures en cage qui sont autant d'obstacles à l'action des exonucléases dans les organites intracellulaires. L'insertion polyG nous a en effet permis de stabiliser les transcrits de gènes chimères portant la région 5' non traduite de *petD*, dans le contexte mutant *mcd1-F16*. Toutefois, ces transcrits présentent une extrémité 5' différente de l'extrémité native. La nouvelle extrémité correspond à la position d'insertion de la séquence polyG protectrice. En conclusion de cette étude, nous avons donc démontré l'existence d'une activité exoribonucléase 5'-3' dans le chloroplaste jusqu'alors inconnue. Enfin, nous avons démontré que le facteur MCD1 joue un rôle dans la stabilisation du transcrit *petD*, en le protégeant de l'action de cette 5'-3' exoribonucléase chloroplastique.

C) *Un réarrangement chromosomique dans le chloroplaste peut supprimer l'effet d'une délétion nucléotidique bloquant l'expression du gène petD* (R. KURAS et F.-A. WOLLMAN en collaboration avec D.C. HIGGS, K.L. KINDLE et D.B. STERN de l'Institut Boyce Thompson de l'Université Cornell)

Nous avons antérieurement caractérisé une souche mutante de *Chlamydomonas reinhardtii* portant une délétion de 236 paires de bases dans le génome chloroplastique de l'algue. Cette délétion recouvre une partie de la région promoteur et

de la région 5' transcrite, mais non traduite du gène *petD* codant la sous-unité IV du complexe cytochrome b_6f . La souche mutante est alors dans l'incapacité de produire un complexe cytochrome b_6f , essentiel à la photosynthèse, et elle ne peut croître en conditions phototrophes.

De façon très inattendue, nous avons isolé quelques révertants phénotypiques apparaissant à une faible fréquence. L'analyse moléculaire de ces souches « révertantes » — au sens où elles sont dotées de la même quantité de complexe cytochrome b_6f que la souche sauvage — a démontré l'existence d'un remaniement par inversion dans le génome chloroplastique qui conduit à placer le gène *petD* sous le gouvernement de signaux d'expression, promoteur et extrémité 5' non traduite, empruntés à un autre gène chloroplastique, *ycf9*, de fonction inconnue. Nous avons ensuite vérifié par transformation génétique du chloroplaste, que la délétion du gène *ycf9* est sans effet phénotypique majeur, ce qui explique que son inactivation au cours du remaniement observé chez les révertants de FUD6, n'a pas de conséquences délétères sur la croissance phototrophe de l'algue. La dynamique du génome chloroplastique révélée par ces expériences témoigne de processus qui peuvent avoir contribué à l'évolution divergente des différents génomes chloroplastiques.

PUBLICATIONS

W. ZERGES, J. GIRARD-BASCOU & J.-D. ROCHAIX. « Translation of the chloroplast psbC mRNA is controlled by interactions between its 5' " leader and the nuclear loci TBC 1 and TBC 3 in *Chlamydomonas reinhardtii* » ». *Mol. Cell. Biol.* 1997, **17**, 3440-3448.

D.M. KRAMER, B. SCHOEPP, U. LIEBL & W. NITSCHKE. « Cyclic electron transfer in *Heliobacillus mobilis* involving a menaquinol-oxidizing cytochrome *bc* complex and an RCI-type reaction center ». *Biochemistry*, 1997, **36**, 4203-4211.

R. KURAS, C. DE VITRY, Y. CHOQUET, J. GIRARD-BASCOU, D. CULLER, S. BÜSCHLEN, S. MERCHANT & F.A. WOLLMAN. « Molecular genetic identification of a pathway for heme binding to cytochrome b_6 ». *J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 32427-32435.

D. ALBOUY, P. JOLIOT, B. ROBERT & W. NITSCHKE. « Electron transfer towards the RCI-type photosystem in the green sulphur bacterium *Chlorobium limicola* forma *thiosulphatophilum* studied by time-resolved optical spectroscopy *in vivo*. *Eur. J. Biochem.* 1997, **249**, 630-636.

F. RAPPAPORT & J. LAVERGNE. « Charge recombination and proton transfer in manganese-depleted Photosystem II ». *Biochemistry*, 1997, **36**, 15294-15302.

L. COURNAC, G. GUEDENEY, P. BENNOUN & G. PELTIER. « Involvement of the chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex in photosystem II-dependent reverse electron flow during oxygen photosynthesis ». *FEBS Letters*, 1997, **416**, 65-68.

O. STAMPACCHIA, J. GIRARD-BASCOU, J. ZANASCO, W. ZERGES, P. BENNOUN, J.D. ROCHAIX. « A nuclear function essential for translation of the chloroplast ». *Plant Cell*, 1997, 773-782.

O. VALLON & F.A. WOLLMAN. « cDNA sequence of Malpha, the catalytic subunit of the *Chlamydomonas reinhardtii* L-Amino-Acid Oxidase (Accession No. U78797): A new sequence motif shared by a wide variety of flavoproteins ». *Plant Physiol.*, 1997, **115**, 1729.

R.G. DRAGER, J. GIRARD-BASCOU, Y. CHOQUET, K.L. KINDLE & D.B. STERN. « *In vivo* evidence for 5' → 3' exoribonuclease degradation of an unstable chloroplast mRNA ». *The Plant Journal*, 1998, **13**, 85-96.

Z. XIE, D. CULLER, B.W. DREYFUS, R. KURAS, F.A. WOLLMAN, J. GIRARD-BASCOU & S. MERCHANT. « Genetic analysis of Chloroplast *c*-type cytochrome assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*: One chloroplast locus and at least four nuclear loci are required for heme attachment. *Genetics*, 1998, **148**, 681-692.

Y. CHOQUET, D.B. STERN, K. WOSTRIKOFF, R. KURAS, J. GIRARD-BASCOU & F.A. WOLLMAN. « Translation of cytochrome f is autoregulated through the 5'-untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 4380-4385.

D. DRAPIER, H. SUZUKI, H. LEVY, B. RIMBAULT, K.L. KINDLE, D.B. STERN & F.A. WOLLMAN. « The chloroplast *atpA* gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*: Functional analysis of polycistronic transcription unit ». *Plant Physiol.* 1998, **117**, 629-641.

J. LAVERGNE & F. RAPPAPORT. « Stabilization of charge separation and photochemical misses in photosystem II ». *Biochemistry*, 1998, **37**, 7899-7906.

F. RAPPAPORT, D. BÉAL, A. VERMÉGLIO & P. JOLIOT. « Time resolved electron transfer at the donor side of *Rhodospseudomonas viridis* photosynthetic reaction centers in whole cells ». *Photosynthesis Research*. 1998, **55**, 317-323.

M.J. SCHILSTRA, F. RAPPAPORT, J.H. NUGENT, C. BARNETT & D. KLUG. « Proton/hydrogen transfer affects the S-state-dependent microsecond phases of P680⁺: Reduction during water splitting ». *Biochemistry*, 1998, **37**, 11.

P. BENNOUN and D. BÉAL. « New digital imaging instrument for measuring fluorescence and delayed luminescence ». In : « Molecular Biology of *Chlamydomonas* », J.-D. Rochaix *et al.* eds., Kluwer Academic publishers, 1998, pp. 451-458.

P. BENNOUN. « Chlororespiration, fifteen years later ». In : « Molecular Biology of *Chlamydomonas* », J.-D. Rochaix *et al.* eds., Kluwer Academic publishers, 1998, pp. 675-683.

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, 1998, pp. 433-449.

F.-A. WOLLMAN. « *Chlamydomonas* research on the structure, function and biogenesis of cytochrome b_6f complexes ». In : « Molecular Biology of *Chlamydomonas* », J.-D. Rochaix *et al.* eds., Kluwer Academic publishers, 1998, pp. 459-476.

J. OLIVE & F.-A. WOLLMAN. « Structural organization of thylakoid membranes ». In : « Molecular Biology of *Chlamydomonas* », J.-D. Rochaix *et al.* eds., Kluwer Academic publishers, 1998, pp. 233-254.

G. FINAZZI & F. RAPPAPORT. « *In vivo* characterization of the electrochemical proton gradient generated in darkness in green algae and its kinetics effects of the cytochrome b_6f turnover ». *Biochemistry*, 1998, 37, 9999-10005.

D. HIGGS, R. KURAS, K.L. KINDLE, F.A. WOLLMAN & D.B. STERN. « Inversions in the *Chlamydomonas* chloroplast genome suppress a pet D'5' untranslated region deletion by creating functional chimeric mRNAs ». *Plant Journal*, 1998, 14, 663-671.

P. JOLIOT & A. JOLIOT. « *In vivo* analysis of the effect of Dicyclohexycarbodiimide on electron and proton transfers in Cytochrome b_6f complex of *Chlorella sorokiniana* ». *Biochemistry*, 1998, 29, 10404-10410.

F. ZITO, G. FINAZZI, P. JOLIOT & F.A. WOLLMAN. « Glu 78 from the conserved PEWY sequence of subunit IV, has a key function in cytochrome b_6f turnover ». *Biochemistry*, 1998, 29, 10395-10403.

PUBLICATIONS SOUS PRESSE

F. BAYMANN & F. RAPPAPORT. « Electrostatic interaction in the donor side of the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* ». *Biochemistry*, sous presse.