

## Bioénergétique cellulaire

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

Le cours de cette année a porté sur l'étude des mécanismes de transfert de protons au sein ou à la surface des protéines impliquées dans les appareils photosynthétiques ou respiratoires de conversion d'énergie. L'hypothèse chemiosmotique, proposée en 1961 par Peter Mitchell, a fourni un cadre théorique permettant de rendre compte du mécanisme de couplage entre les processus de transferts d'électrons et de synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) au sein de ces appareils. L'hypothèse chemiosmotique privilégie le rôle des membranes, toujours présentes dans ces appareils convertisseurs d'énergie. Mitchell a proposé qu'un pompage de protons transmembranaire était associé au transfert d'électrons dans les chaînes photosynthétiques ou respiratoires. Ce pompage induit la formation d'un gradient électrochimique transmembranaire de protons. Sous l'effet des forces électrique (potentiel de membrane) ou osmotique (gradient de protons), les protons traversent la membrane en sens inverse au niveau d'une enzyme où s'effectue la synthèse d'ATP. La délocalisation rapide du gradient électrochimique de protons sur l'ensemble de la surface membranaire permet un couplage efficace entre les processus de transfert d'électrons et de synthèse d'ATP, même si les partenaires enzymatiques sont à grande distance les uns des autres. Il existe un grand nombre de pompes à protons couplées à des réactions de transfert d'électrons au sein des appareils photosynthétiques et respiratoires. On conçoit donc que l'un des problèmes clefs de la bioénergétique porte sur la compréhension des mécanismes permettant à une espèce chargée, tel qu'un proton, de traverser les régions hydrophobes des protéines transmembranaires impliquées dans le pompage des protons. Les lois de l'électrostatique nous enseignent que le coût énergétique du transfert d'un ion en solution dans un milieu de forte constante diélectrique telle que l'eau ( $\epsilon = 80$ ) vers un milieu de faible constante diélectrique telle qu'une membrane est considérable. Dans le cas d'un ion hydronium, cette énergie (énergie de Born) est de l'ordre de 1,8 eV. Cette forte énergie d'activation explique l'imperméabilité des membranes aux ions de petites dimensions. On peut donc affirmer que, sans dispositif structural adapté, un proton ou un ion

hydronium en phase aqueuse ne peut pénétrer dans les régions hydrophobes des membranes ou des protéines membranaires.

Dans le cadre de la théorie chemiosmotique, Peter Mitchell a proposé un mécanisme qui s'inspire d'une hypothèse, initialement proposée par Lündengarth, pour rendre compte du couplage entre transferts d'électrons et de protons. Il suppose que les complexes transmembranaires, qui constituent le cœur des appareils photosynthétiques ou respiratoires, comportent des chaînes de transfert d'électrons traversant la membrane. En raison de leur très faible masse et par suite de leur fort degré de délocalisation, les électrons sont susceptibles de traverser la barrière d'activation que représentent les régions hydrophobes, qui séparent les différents transporteurs par un processus d'effet tunnel. Les transporteurs d'électrons, associés à la matrice protéique et localisés aux interfaces membranaires, échangent des électrons avec les transporteurs d'hydrogène en solution dans les phases aqueuses. Le transfert d'électrons à travers une telle chaîne, qui comporte une alternance de transporteurs d'hydrogène et d'électrons, s'accompagne d'une libération de protons sur l'une des faces membranaires et d'une fixation sur la face opposée. Le bilan du processus se traduit bien par le pompage d'un proton par électron transféré, mais paradoxalement, ne comporte aucune étape impliquant un transfert transmembranaire de protons. Ce modèle apporte une solution élégante et simple au problème posé par l'existence d'une barrière d'activation, s'opposant au transfert de charges à travers la membrane. On peut supposer que les appareils convertisseurs d'énergie présents dans les organismes proches de l'origine de la vie comportaient des pompes à protons fonctionnant suivant le modèle de Lündengarth. Comme l'a souligné Mitchell, il est cependant impossible de coupler en série plusieurs pompes à protons n'impliquant que des transporteurs d'hydrogène hydrosolubles. Mitchell a alors proposé que le couplage entre deux pompes en série impliquait un transporteur d'hydrogène soluble dans la phase hydrophobe de la membrane. On sait, en effet, que toutes les chaînes photosynthétiques ou respiratoires comportent des quinones possédant une longue chaîne aliphatique hydrophobe, qui les confinent dans la phase lipidique de la membrane. Ces quinones, sous leur forme réduite et hydrogénée, assurent un flux d'atomes d'hydrogène neutre entre les deux faces de la membrane, réalisant ainsi la connexion entre deux pompes à protons consécutives. De nombreux complexes transmembranaires, fonctionnant suivant les principes énoncés par Mitchell, ont été identifiés au sein des appareils photosynthétiques et respiratoires. Il faut cependant souligner que l'analyse structurale et fonctionnelle de ces pompes à protons a montré que les sites, où interagissent transporteurs d'électrons et transporteurs d'hydrogène, sont le plus souvent localisés à l'intérieur des protéines membranaires, ce qui impose l'intervention de canaux permettant aux protons, éjectés ou fixés au niveau de ces sites, de traverser la protéine sur des distances parfois supérieures à 2 nanomètres. Le mécanisme imaginé par Lündengarth et Mitchell impose que la stœchiométrie entre le nombre de protons pompés à travers la membrane et le nombre d'électrons transférés à travers la

chaîne transmembranaire est rigoureusement égal à 1. Il est cependant apparu que certaines pompes étaient susceptibles de pomper des protons avec une stœchiométrie supérieure à 1, et donc incompatible avec les prédictions du modèle proposé par Mitchell. Dans le cas de la cytochrome-oxidase, Wikström et ses collaborateurs ont proposé l'intervention d'un mécanisme de pompage de protons fonctionnant en parallèle avec une pompe de type Mitchellien. Ce mécanisme original est fondé sur les interactions intervenant au sein de la protéine pompe entre un transporteur d'électrons et un acide aminé protonable. Le transporteur, dont la charge électrique dépend de l'état d'oxydoréduction, par le jeu d'interactions électrostatiques, module le pK de l'acide aminé protonable situé à proximité. Les changements de l'état d'oxydoréduction du transporteur induisent des changements alternatifs de pK, et par suite, l'éjection ou la fixation de protons prélevés sur une face membranaire, et libérés sur l'autre. Sur le plan structural, une telle pompe à protons comporte obligatoirement un canal transmembranaire connecté à l'acide aminé protonable, ainsi qu'un dispositif mobile jouant le rôle de valve anti-retour, qui permet d'éviter de prélever et d'éjecter les protons sur la même face membranaire. La pompe à protons, imaginée par Wikström, est donc un dispositif complexe dont de nombreux exemples ont été ultérieurement mis en évidence dans les chaînes respiratoires, bactériennes ou mitochondriales. D'autres pompes à protons, non couplées à des chaînes de transfert d'électrons, comportent indubitablement des canaux à protons transmembranaires. En premier lieu, il faut citer les ATP synthétases  $F_0F_1$ , enzymes clefs de la bioénergétique, et qui assurent chez tous les êtres vivants la conversion de l'énergie stockée dans le gradient électrochimique de protons en énergie chimique sous forme d'ATP. La bactériorhodopsine, pompe à protons photochimique présente chez des bactéries halophylles, est un autre exemple d'enzyme réalisant le couplage entre un changement de conformation induit par l'isomérisation photoinduite du rétinol et le pompage transmembranaire d'un proton. On peut considérer que la quasi-totalité des enzymes transmembranaires impliquées dans les processus de pompage de protons comportent des canaux permettant aux protons de se déplacer au sein des protéines membranaires.

La seconde partie du cours a porté sur l'étude théorique des mécanismes physico-chimiques impliqués dans les mouvements transmembranaires de charges. L'énergie nécessaire, pour faire pénétrer un ion présent dans la phase aqueuse dans une région de faible constante diélectrique, est inversement proportionnelle au diamètre de l'ion. En effet, on observe que les ions de grandes dimensions traversent aisément les membranes biologiques ou artificielles. Il s'agit là d'une stratégie développée par de nombreuses bactéries qui sécrètent des antibiotiques rendant la membrane perméable aux ions. La perte des ressources énergétiques, liée au découplage des processus chemiosmotiques, induit rapidement la mort de la cellule ainsi attaquée. Ces antibiotiques, telle que la valinomycine, forment une cage peptidique où est enfermé un ion, et dont le diamètre est de l'ordre de quelques nanomètres. De telles structures peuvent s'insérer sans difficulté au sein

de la bicouche lipidique, mais ne peuvent en aucun cas pénétrer au sein du réseau très dense de liaisons covalentes et de liaisons hydrogène présentes dans la protéine. Compte-tenu de ces contraintes thermodynamiques et structurales, il faut supposer que les mouvements d'ions à l'intérieur d'une protéine impliquent des structures spécialisées jouant le rôle de canaux à protons. L'amélioration des techniques cristallographiques d'analyse des structures des protéines membranaires a montré que les mouvements de protons se produisaient dans des régions comportant une forte proportion d'acides aminés polaires et, le plus souvent, un grand nombre de molécules d'eau dont certaines forment des files ininterrompues. Dans une telle hypothèse, les contraintes électrostatiques liées à la pénétration d'un ion dans la membrane sont essentiellement résolues. Par contre, subsistent les contraintes mécaniques liées au déplacement d'un élément matériel tel qu'un proton au sein d'un ensemble de molécules d'eau et d'acides aminés polaires fortement immobilisés par un réseau de liaisons hydrogène. L'analyse des propriétés physico-chimiques très particulières de l'eau permet d'apporter une réponse à cette question. La forte constante diélectrique de l'eau est directement liée à la valeur exceptionnellement élevée du moment dipolaire électrique de cette molécule. L'atome d'oxygène de la molécule d'eau comporte deux doublets électroniques libres, qui sont susceptibles de former des liaisons hydrogène avec les atomes d'hydrogène appartenant à des molécules d'eau voisines. Chaque molécule d'eau a donc la capacité d'établir des liaisons avec quatre molécules d'eau voisines ou avec des acides aminés polaires. Les molécules d'eau s'organisent donc en réseaux tétraédriques, dont la durée de vie est extrêmement brève. Un tel milieu structuré, mais en réorganisation perpétuelle, permet la diffusion des solutés et tout particulièrement des ions. Il est cependant paradoxal de constater que la diffusion des ions hydronium  $H_3O^+$  est environ 10 fois plus rapide que celle d'autres ions de charge et de dimensions comparables. Ce paradoxe est encore plus marqué dans le cas de la glace où les réseaux tétraédriques sont immobilisés et où la diffusion des ions hydrogène est cependant particulièrement rapide. Le mécanisme de transfert de protons au sein de ces réseaux immobilisés a été élucidé par l'école d'Onsager. Lors de ce processus, un grand nombre de protons se déplacent d'une manière synchrone sur des distances de quelques angströms. Ce processus concerté est équivalent au transfert à grande distance d'un seul proton. Il est apparu que de tels processus, impliquant le mouvement de protons dans un réseau immobilisé de molécules d'eau, jouaient un rôle essentiel dans les processus de transfert de protons à la surface des membranes ou dans les canaux intramembranaires.

***Diffusion facilitée des protons à l'interface membrane/phase aqueuse.*** Les protéines et les lipides localisés à l'interface membrane/phase aqueuse comportent de nombreux groupes chargés négativement qui sont susceptibles de former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau environnantes. Ces molécules d'eau sont alors immobilisées et vont former un réseau à deux dimensions, localisé à la surface de la membrane et particulièrement favorable à la diffusion des protons.

Des expériences élégantes effectuées sur des fragments de membrane d'*Halobacterium halobium* ont montré que les échanges de protons entre deux sites membranaires, distants de quelques centaines de nanomètres, se produisaient dans des domaines de temps inférieurs à la microseconde. Ces processus de diffusion localisés à l'interface précèdent donc très largement l'équilibration avec la phase aqueuse proprement dite. Ces mouvements rapides de protons dans une couche bidimensionnelle d'eau structurée, présente à la surface des membranes, jouent un rôle majeur dans la délocalisation du gradient transmembranaire de protons. De plus, le confinement, même transitoire, des protons dans la couche d'eau structurée peut avoir des conséquences importantes sur le plan thermodynamique. En régime stationnaire de fonctionnement des appareils photosynthétiques ou respiratoires, cette augmentation locale de l'activité des protons favorisera ainsi le couplage énergétique entre processus de transfert d'électrons et de synthèse d'ATP. On peut même envisager, en contradiction apparente avec le dogme Mitchellien, un couplage chemiosmotique efficace se produisant au niveau de membranes ne formant pas de vésicules fermées.

**Mouvements de protons dans les canaux transmembranaires.** Les processus de transfert de protons se déroulant dans les canaux transmembranaires mettent vraisemblablement en jeu des mécanismes semblables à ceux impliqués dans la glace ou dans les réseaux de molécules d'eau immobilisées à la surface des membranes. Dans ce cas, la conduction de protons se produit à travers une file de molécules d'eau associées par des liaisons hydrogène. Conformément à un modèle initialement proposé par Nagle et Morowitz, la fixation d'un proton à une extrémité du canal induirait, par un mécanisme concerté, l'éjection d'un proton à l'autre extrémité. Le mécanisme comporte deux étapes se traduisant chacune par un déplacement de quelques angströms de tous les protons impliqués dans la chaîne de molécules d'eau.

Les processus de transfert de protons au sein des protéines ont pu être étudiés expérimentalement et analysés sur le plan théorique dans le cas d'un antibiotique synthétique : la gramicidine. Ce polypeptide, qui ne comporte que 15 acides aminés, forme, à l'état dimérique, un canal transmembranaire emprisonnant une chaîne ininterrompue de 12 molécules d'eau auxquelles il faut ajouter une dizaine de molécules d'eau localisées aux deux entrées du canal. Le débit maximum d'un tel canal est supérieur à  $10^9$  protons par seconde. La relative simplicité sur le plan structural de la molécule de gramicidine a rendu possible une analyse théorique du mécanisme de translocation des protons à travers la chaîne de molécules d'eau. Il apparaît que le transfert de protons est le résultat d'un processus hybride. Le mécanisme proposé serait intermédiaire entre le processus totalement concerté, imaginé par Nagle et Morowitz, et un processus de sauts incohérents des protons entre chaque molécule d'eau. Dans ce mécanisme, interviendraient, dans des temps inférieurs à la picoseconde, des mouvements de protons dans des domaines de taille variable, associant 2 à 5 molécules d'eau. Au contraire, les échanges de protons entre ces domaines impliqueraient des

réorganisations structurales mineures de la file de molécules d'eau qui se produiraient dans des domaines de temps de plusieurs dizaines de picosecondes.

La dernière partie du cours a été consacrée à l'étude de quelques exemples de canaux à protons intervenant dans des complexes transmembranaires impliqués dans les appareils photosynthétiques et respiratoires. Le cas de l'ATP-synthase, enzyme commune à l'ensemble des êtres vivants, a été traité plus en détail. Cette enzyme, d'une grande complexité structurale et fonctionnelle, comporte deux moteurs moléculaires couplés mécaniquement. Le gradient électrochimique de protons représente la source d'énergie d'un premier moteur de type électrique, formé d'un stator comportant un canal à protons, et d'un rotor circulaire formé par une douzaine de polypeptides transmembranaires. Ce rotor entraîne un moteur chimique, localisé à l'extérieur de la membrane, au niveau duquel s'effectue une conversion en énergie conformationnelle. Ce dispositif est probablement proche des moteurs moléculaires impliqués dans la rotation des flagelles. Les propriétés des canaux à protons, ainsi que les mécanismes électrostatiques responsables de la rotation du rotor, restent encore actuellement un sujet de controverses. L'étude détaillée de différents modèles de pompes à protons couplées à des processus redox fera l'objet du cours de l'année prochaine.

P. J.

#### SÉMINAIRES

Pierre DORLET (CEA Saclay) « Étude par RPE à haut champ de l'interaction entre le radical Tyr Z' et le cluster du manganèse du Photosystème II ».

Jean HOUMARD (ENS Paris) « Perception et transmission des signaux de l'environnement (Lumière et Azote) par les cyanobactéries ».

Colette JUNGAS (CEA Cadarache) « Organisation supramoléculaire de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons chez *Rhodobacter sphaeroides* ».

Jérôme SANTOLINI (CEA Saclay) « Inhibition et suractivation de l'ATP-synthase chloroplastique par une phytoxine naturelle, la tentoxine ».

Winfried LEIBL (CEA Saclay) « Étude par photovoltage du transfert de charge transmembranaire ».

Marten VOS (École Polytechnique-ENSTA Palaiseau) « Rôle fonctionnel des mouvements cohérents dans deux protéines membranaires : centre réactionnel bactérien et cytochrome-oxydase ».

Gwendal LATOUCHE (CNRS Orsay) « Fluorescence du NADPH dans les chloroplastes ».

Olivier VALLON (CNRS IBPC Paris) « La protéolyse dans le chloroplaste : le rôle de ClpP ».

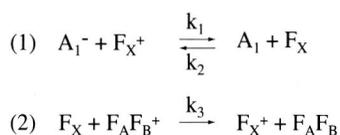
Fabrice RAPPAPORT (CNRS IBPC Paris) « La différence de potentiel transmembranaire à l'obscurité : génération et conséquences sur le fonctionnement de la chaîne photosynthétique ».

1) ANALYSE *IN VIVO* DU TRANSFERT D'ÉLECTRONS AU NIVEAU DES CENTRES PHOTOCHEMISTIQUES I (P. Joliot et A. Joliot)

La réalisation dans notre laboratoire d'un nouveau spectrophotomètre dont le temps de résolution est de l'ordre de 5 ns (voir rapports précédents) nous a permis d'aborder l'étude des transferts d'électron se produisant entre les accepteurs du Photosystème I sur des algues intactes. Ces algues comportent donc des centres photochimiques placés dans leur environnement physiologique normal et dont les propriétés n'ont pas été perturbées par des procédures d'extraction et de purification. Cette nouvelle technique permet ainsi d'analyser, sur des algues intactes, les cinétiques de transfert d'électron induites par un éclair de courte durée avec une rapport signal/bruit de fond environ 10 à 20 fois supérieur à celui atteint sur des centres purifiés analysés à l'aide de spectrophotomètres de type classique, qu'il s'agisse d'appareils commerciaux ou réalisés dans les laboratoires.

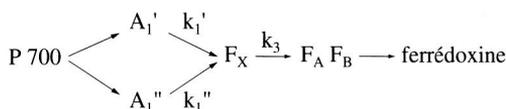
Sur le plan structural, les centres réactionnels du Photosystème I sont formés par un hétérodimère auquel sont associées deux chaînes de transporteurs localisées d'une manière quasiment symétrique par rapport à l'axe de symétrie de la molécule. Il est généralement admis qu'une seule de ces deux chaînes participe au transfert d'électron sans que les raisons d'une telle dissymétrie fonctionnelle n'ait été élucidée. La réaction photochimique primaire se produisant au niveau du Photosystème I se traduit par le transfert d'un électron depuis un dimère de chlorophylle (P700), situé à proximité de la face luménale du centre, vers une autre chlorophylle (accepteur  $A_0$ ). Les électrons sont ensuite transférés vers un accepteur secondaire : la phylloquinone (accepteur  $A_1$ ) localisée approximativement à mi-distance entre les deux faces membranaires. Ces deux premières étapes de transfert d'électron sont terminées en moins de 1 ns, temps inférieur à la résolution temporelle de notre méthode. Ce travail a porté sur l'analyse des transferts d'électron entre l'accepteur  $A_1$  et la ferrédoxine, transporteur soluble localisé sur la face stromale de la membrane, à l'opposé du donneur d'électron primaire P700. Ces expériences ont été effectuées sur un mutant de l'algue unicellulaire *Chlorella sorokiniana* dépourvu de la majorité de l'antenne chlorophyllienne périphérique. Les changements d'absorption associés à l'oxydation de  $A_1^-$  et à la réduction d'accepteurs d'électron constitués par des « clusters » fer-soufre  $F_X$ ,  $F_A$  et  $F_B$  ont été caractérisés dans un domaine spectral s'étendant du proche ultraviolet au visible. Ces réactions se traduisent par une décroissance d'absorption à 377 nm qui correspond à une bande d'absorption caractéristique de la phylloquinone et par la décroissance de deux bandes d'absorption dont les maxima sont situés à 480 nm et 515 nm respectivement. Ces bandes d'absorption sont vraisemblablement associées à un effet électrochromique local induit par la

forme chargée de la molécule de  $A_1$  sur une molécule de caroténoïde implantée à proximité immédiate dans le centre photochimique. On sait en effet que le champ électrique très élevé associé à la présence d'une charge négative dans un milieu de faible constante diélectrique peut induire un décalage des spectres d'absorption de pigments situés à proximité (effet Stark). La cinétique d'oxydation de  $A_1^-$  a été déterminée par mesure des changements d'absorption à plusieurs longueurs d'onde caractéristiques et présente deux phases cinétiques d'amplitudes comparables dont les demi-temps sont de 18 ns et 160 ns respectivement. La cinétique de croissance du potentiel transmembranaire associée aux transferts d'électron au niveau du Photosystème I a également été analysée dans un domaine de temps comparable en mesurant les perturbations électrochromiques induites au niveau des pigments répartis dans la membrane du thylacoïde. Cette cinétique présente un caractère biphasique dont la phase rapide est synchrone de la phase rapide d'oxydation de  $A_1^-$ . Plusieurs interprétations peuvent être proposées pour rendre compte du caractère biphasique de l'oxydation de  $A_1^-$ . Dans une première hypothèse, initialement proposée par Sétif et Brettel, on suppose que la constante d'équilibre  $K = k_1/k_2$  de la réaction (1) est proche de 1 (Schéma 1).



Dans cette hypothèse, la constante de temps de 18 ns est associée à l'établissement de l'équilibre (1) alors que la phase de 160 ns est associée au transfert d'électron depuis l'accepteur  $F_X$  vers les accepteurs fer - soufre  $F_A$  ou  $F_B$ . Dans une telle hypothèse et dans la mesure où le transfert d'électron entre  $A_1$  et  $F_X$  génère un potentiel de membrane, la constante d'équilibre devrait dépendre de la valeur du potentiel transmembranaire. Les cinétiques de réoxydation de  $A_1^-$  ont été analysées en l'absence ou en présence d'un potentiel de membrane permanent induit par l'hydrolyse de l'ATP au niveau de l'ATPsynthétase membranaire. L'indépendance des cinétiques, et donc de la valeur de  $K$ , vis-à-vis du potentiel de membrane permet d'éliminer cette première hypothèse. Dans une seconde hypothèse, on suppose qu'il existe deux classes de phylloquinones qui se distinguent par leur vitesse d'oxydation. Cette hétérogénéité sur le plan structural peut traduire l'existence de deux états conformationnels des centres photochimiques. La quasi égalité des amplitudes des phases rapide et lente d'oxydation de  $A_1^-$  implique que la constante d'équilibre entre ces deux états est proche de 1. Une hypothèse, plus séduisante, consiste à admettre que les deux chaînes de transporteurs d'électron associées à l'hétérodimère qui forme le cœur du centre réactionnel sont toutes deux actives (schéma 2).

L'égalité entre les amplitudes des phases  $\sim 18$  ns et  $\sim 160$  ns implique alors que les vitesses de transfert d'électron entre le donneur primaire P700 et les deux



molécules  $A_1'$  et  $A_1''$  sont voisines. Sur le plan structural, la position relative des deux accepteurs homologues serait donc symétrique par rapport à P700. Par contre, l'accepteur  $F_X$  occuperait une position asymétrique par rapport aux transporteurs  $A_1'$  et  $A_1''$ . Une telle hypothèse, en contradiction avec les concepts généralement admis concernant le fonctionnement des centres photochimique ne pourra être établie d'une manière définitive que par l'analyse de mutants perturbés dans l'environnement de l'un ou l'autre des deux sites de fixation des molécules de phylloquinone.

## 2) ÉTUDE DE L'ÉTAT DE PROTONATION DE LA TYROSINE $D_1161$ DU PHOTOSYSTÈME II (F. Rappaport en collaboration avec B. Diner, Dupont de Nemours, USA)

La tyrosine 161 du polypeptide  $D_1$  du photosystème II réduit la chlorophylle  $P_{680}^+$  oxydée photochimiquement. Elle est ensuite réduite par un électron extrait du complexe d'oxydation de l'eau. D'après les résultats de spectroscopie magnétique (Résonance paramagnétique électronique), la tyrosine est déprotonée à l'état oxydé. Pour autant, les variations d'absorption induites par l'oxydation de cette tyrosine suggèrent qu'elle est protonée à l'état réduit. On peut alors envisager deux séquences réactionnelles pour l'oxydation-déprotonation de cette tyrosine : i) l'oxydation précède la déprotonation, ii) la déprotonation précède le transfert d'électrons. La première hypothèse est peu probable, du fait du potentiel d'oxydoréduction du couple tyrosine/(tyrosine-oxydée-protonée) de 1,5 V en solution (significativement supérieur au potentiel du couple oxydant  $P_{680}^+ / P_{680}$  (1,1 V)). Dans le cadre de la deuxième, l'absence d'effet de la substitution isotopique H/D suggère que la déprotonation préalable de la tyrosine ne constitue pas une étape limitante. On s'attend par conséquent à ce qu'elle intervienne dans le domaine de quelques nanosecondes puisque le transfert d'électrons à proprement parler a une constante de temps de quelques dizaines de nanosecondes. Nous avons mesuré les variations d'absorption induites par l'oxydation de  $P_{680}$  dans l'UV (250-350 nm), région où la déprotonation de la tyrosine se traduit par des changements d'absorption caractéristiques. En comparant ces spectres à ceux obtenus sur des particules de PSII isolées à partir d'un mutant où  $YD_1161$  a été substitué par une phénylalanine, on constate que le spectre de ( $P_{680}^+ - P_{680}$ ), mesuré dans les photosystèmes II sauvages, est en fait une combinaison linéaire du spectre d'oxydation de  $P_{680}$  mesuré en absence de  $YD_1161$  et du spectre de déprotonation d'une tyrosine. Ceci suggère qu'en effet, la déprotonation précède le transfert d'électron. Celle-ci serait déclenchée électrostatiquement par l'oxydation de  $P_{680}$  et permettrait d'abaisser la barrière d'activation de l'oxydation d'une tyrosine protonée.

3) ÉTUDE DES INTERACTIONS ÉLECTROSTATIQUES ENTRE LE DONNEUR CHLOROPHYLLIEN ET LE TÉTRAHÈME DES CENTRES RÉACTIONNELS DE BACTÉRIES POURPRES (F. Rappaport, F. Baymann en collaboration avec C. Astier, Gif-sur-Yvette)

Notre récente étude sur le centre réactionnel de *Rhodopseudomonas viridis* nous avait permis de montrer qu'une interaction électrostatique importante (de l'ordre de 90 mV) existe entre le donneur chlorophyllien P et le cytochrome qui lui est le plus proche. Il est possible d'aborder la question des interactions électrostatiques entre cofacteurs par une approche différente de celle suivie jusqu'à présent. Dans le cas présent de l'interaction électrostatique entre le donneur chlorophyllien P et le cytochrome le plus proche, on peut comparer la vitesse des réactions de recombinaison de charge entre  $P^+$  et  $Q_A^-$  en présence et en absence de charge sur le cytochrome. S'il existe une interaction électrostatique importante, on s'attend à ce que le potentiel redox du couple  $P^+/P$  soit modifié, et que par conséquent la vitesse de recombinaison de charge le soit également. Nous avons donc élargi l'étude précédente à un autre organisme, *Rubrivivax gelatinosus*, qui présente de grandes analogies avec *Rhodopseudomonas viridis* (un cytochrome tétrahémique en particulier). Cette bactérie, contrairement à *Rhodopseudomonas viridis*, peut croître de façon hétérotrophe, ce qui autorise la construction de mutants éventuellement fonctionnellement altérés. En particulier, il est possible de déléter la sous-unité cytochrome tétrahémique. La comparaison des observables thermodynamiques ou cinétiques entre sauvage et mutant sans tétrahème autorise la caractérisation des conséquences énergétiques de l'oxydation du tétrahème sur le potentiel redox du couple  $P^+/P$ . Nos résultats suggèrent que les interactions électrostatiques entre P et le tétrahème sont bien moins grandes que chez *Rhodopseudomonas viridis*. Le potentiel redox du couple  $P^+/P$  dépend peu de l'état d'oxydoréduction du tétrahème. De même, la cinétique de réduction de  $P^+$  confirme que la constante d'équilibre de la réaction de transfert d'électrons entre  $P^+$  et le tétrahème est grande. Les deux sous-unités semblent donc « isolées » électrostatiquement. Il est tentant de corrélérer cette observation avec le fait que le tétrahème est très labile chez *R. gelatinosus*, alors qu'il est quasiment impossible de le décrocher chez *Rhodopseudomonas viridis*.

4) MUTANTS DE LA PROTÉINE DE RIESKE DU CHLOROPLASTE (C. de Vitry)

L'interaction entre la protéine de Rieske et le cytochrome  $b_6$  est particulièrement intéressante car elle forme un site de fixation de quinone situé sur la face luminale qui est un site clef pour le transfert d'électrons. Dans les cristaux de complexe cytochrome  $bc_1$ , la protéine de Rieske est formée d'un large domaine soluble lié par une boucle flexible à l'ancre transmembranaire ; ce domaine occupe différentes positions dans le complexe co-cristallisé avec différents inhibiteurs, ce qui a suggéré un mouvement de la protéine de Rieske lors du transfert d'électron. Seule la structure du domaine soluble de la protéine de Rieske du complexe

cytochrome  $b_6f$  d'épinard a été déterminée. Les structures ne sont similaires qu'à proximité du cluster  $Fe_2S_2$  mais les principaux domaines de repliement sont conservés. La protéine de Rieske du chloroplaste de *Chlamydomonas* est codée par le gène nucléaire *PetC*, importée dans le chloroplaste, insérée dans la membrane du thylacoïde et intégrée dans le complexe  $b_6f$ . *Chlamydomonas* offre de nombreux avantages pour la mutagenèse de la protéine de Rieske ; notamment, le cytochrome  $b_6f$  n'est pas nécessaire pour sa croissance contrairement aux cyanobactéries. La transformation nucléaire a lieu majoritairement par intégration non-homologue chez *Chlamydomonas*. Pour la mutagenèse dirigée, il fallait absolument une souche réceptrice nulle dans le gène *PetC*. Nous avons caractérisé trois souches déficientes en protéine de Rieske dont une avec une délétion, stabilisé la protéine de Rieske mutée par atténuation de la dégradation, et mis au point la mutagenèse dirigée dans le noyau pour la protéine de Rieske du chloroplaste.

#### A) Mutants de mutagenèse classique déficients en protéine de Rieske

Trois souches mutantes déficientes en protéine de Rieske obtenues par mutagenèse UV ont été caractérisées. L'une a une délétion stable qui élimine totalement la protéine. Les deux autres portent les substitutions Y87D et W163R et présentent une accumulation très réduite de la protéine de Rieske. Les autres sous-unités s'accumulent environ à 60 % du niveau de la souche sauvage. Les complexes bc et bf sont purifiés sous une forme active dimérique. La purification de complexes cytochrome  $b_6f$  des mutants déficients en Rieske montre que la forme dimérique est conservée. Ceci indique que ce n'est pas la protéine de Rieske qui contrôle l'état d'oligomérisation du complexe. Les mesures de reréduction du cytochrome f et de la phase lente (phase b) du signal électrochromique à 515 nm indiquent un blocage complet du transfert d'électrons dans la souche portant la délétion  $\Delta PetC$ , un ralentissement d'un facteur 10 à 20 de l'efficacité pour le transfert d'électrons de la protéine de Rieske mutée dans les souches Y87D et W163R. D'après la structure de l'épinard, W163 est plus périphérique que Y87 ; Y87 occupe une poche qui, lors de la très déstabilisante substitution Y87D, est plus ouverte et plus polaire.

#### B) Stabilisation de la protéine de Rieske mutée par atténuation d'une protéase du stroma

Nous avons réussi à augmenter la stabilité de la protéine de Rieske mutée en atténuant le système de dégradation par croisement avec une souche exprimant moins la protéase ClpP dans le stroma du chloroplaste. L'accumulation des protéines de Rieske mutées en Y87D et W163R est environ quatre fois plus importante dans les double-mutants. Ceci a amélioré les analyses spectroscopiques en faible lumière de l'efficacité pour le transfert d'électrons de ces protéines de Rieske mutées.

C) *Mise au point de la mutagenèse dirigée dans le noyau pour la protéine de Rieske*

Les mutations ont été faites sur le plasmide pACR4.5, un plasmide dérivé de pALTER-1 (Proméga) qui permet la sélection sur antibiotiques des plasmides mutants et porte le gène *PetC* dans un fragment de 4,5 kb de DNA génomique. Les plasmides mutés dérivés de PACR4.5 ont été introduit dans la souche  $\Delta$ PetC par bombardement avec des particules de tungstène accélérées par une pression d'hélium. Les transformants ont dans un premier temps été sélectionnés par restauration de la phototrophie. Six glycines ont été remplacées par des alanines dans la boucle flexible critique pour le mouvement du domaine extramembranaire (6G6A), des substitutions ont été créées près du cluster  $Fe_2S_2$  (S128A, S128C, S128T, W163A) et 7 résidus C-terminaux ont été délétés (G171och). Bien que les mutations 6G6A et G171och affectent des segments très conservés dans les protéines de Rieske de complexes  $b_6f$ , les mutants avaient une photosynthèse de type sauvage.

Ces résultats établissent les bases de la mutagenèse dirigée de la protéine de Rieske codée dans le noyau et adressée au chloroplaste.

5) CORRÉLATIONS STRUCTURE-FONCTION DANS LE COMPLEXE CYTOCHROME  $b_6f$

A) *Le rôle du motif PEWY dans la séquence de la sous-unité IV* (F. Zito, G. Finazzi, R. Delosme, W. Nitschke, D. Picot et F.-A. Wollman)

Après avoir démontré que le résidu glutamique 78 (E) de la sous-unité IV contribue à la stœchiométrie des charges transloquées à travers la membrane par électrons transférés du PSII au PSI via le cytochrome  $b_6f$  (voir rapport précédent), nous avons entrepris une étude du rôle de l'ensemble de la séquence PEWY dans la fonction du cytochrome  $b_6f$ . La résolution de la structure cristallisée du complexe cytochrome bc des mitochondries, analogue du cytochrome  $b_6f$  du chloroplaste, nous a permis de déterminer la position de la séquence PEWY dans le complexe macromoléculaire. Cette séquence devait contribuer fortement au repliement du site Qo, l'un des deux sites de liaison de plastoquinones au cytochrome  $b_6f$ . Nous avons modifié cette séquence par une permutation des trois derniers résidus, générant ainsi une séquence PWYE, qui a été introduite dans le complexe protéique *in vivo* par transformation génétique du chloroplaste de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Les souches transformées se sont révélées incapables d'une croissance phototrophe. L'analyse de leur contenu protéique a montré que la mutation n'avait compromis ni l'assemblage ni l'accumulation du cytochrome  $b_6f$  dans les membranes des thylacoïdes. Par spectroscopie optique, nous avons observé la disparition de la phase de réduction du cytochrome f consécutive à son oxydation par le Photosystème I après un éclair lumineux dans la souche sauvage. De même, nous avons observé la disparition du signal optique à 515 nm, qui signe, dans la souche sauvage, un

effet électrochromique dû à la translocation des charges à travers la membrane par le cytochrome  $b_6f$ . Ces informations spectroscopiques nous ont conduit à conclure que l'interaction entre le quinol et le cytochrome  $f$  via le site  $Q_o$  était interrompue dans le mutant PWYE. Une analyse par RPE des signaux dus à la protéine de Rieske, qui sont sensibles à la présence d'une quinone dans le site  $Q_o$ , nous a permis de conclure que c'est la liaison du quinol au site  $Q_o$ , plutôt que le transfert d'électrons entre le quinol fixé au site et le cytochrome  $f$ , qui est altéré dans le mutant PWYE.

Disposant d'une souche comportant un complexe cytochrome  $b_6f$  dépourvu de site  $Q_o$ , nous avons pu mettre à l'épreuve l'hypothèse d'une activation, par un quinol fixé au site  $Q_o$ , de la LHCII-kinase, cytochrome  $b_6f$  dépendante. Cette kinase est activée en conditions réductrices et l'implication éventuelle du site  $Q_o$  de fixation d'un quinol pouvait donc être étudiée dans le mutant PWYE. Nous avons démontré que les protéines du LHCII ne sont plus phosphorylées en conditions réductrices dans ce mutant. L'analyse de la distribution de l'antenne collectrice entre les deux photosystèmes a permis de conclure que le LHCII reste associé au PSII, aussi bien en conditions oxydantes que réductrices. Ces observations démontrent que la liaison d'un quinol au site  $Q_o$  est bien le facteur de régulation principal qui gouverne la sensibilité redox de la LHCII-kinase.

*B) Caractérisation fonctionnelle de mutants de Chlamydomonas déficients dans la maturation du cytochrome  $f$*  (F. Baymann, F. Zito, R. Kuras, L. Minai, W. Nitschke et F.-A. Wollman)

La biogénèse du cytochrome  $f$  implique une succession de modifications post-traductionnelles qui assurent la conversion du pré-apocytochrome  $f$ , codé par le gène chloroplastique *petA*, en holocytochrome  $f$ . Cette sous-unité essentielle du complexe des cytochromes  $b_6f$ , est intégrée dans les membranes des thylacoïdes, probablement de façon co-traductionnelle. Une préséquence clivable d'adressage au lumen assure la mise en place de l'extrémité N-terminale de la protéine mature du côté luménal, opposé au site d'insertion de la protéine sur la face stromale des membranes. Le clivage de la préséquence est assuré par une peptidase non-identifiée à ce jour, qui reconnaît un motif protéique, AxA, semblable à celui porté par les séquences d'exportation des protéines chez *E. coli*. Un complexe multiprotéique actif sur la face lumenale des thylacoïdes assure alors la liaison covalente de l'hème  $c$  sur l'apocytochrome  $f$ . La protéine fonctionnelle mature utilise comme ligand axial de l'hème  $c$ , son extrémité N-terminale portée par une tyrosine.

Nous avons altéré de deux façon distinctes le processus de conversion du pré-apocytochrome  $f$  en cytochrome  $f$  mature : (i) le signal de reconnaissance de la peptidase AQA, a été modifié en LQL ; (ii) le résidu tyrosine, assurant la fonction de sixième ligand de l'hème  $c$ , a été modifié en proline, un résidu incapable d'assurer la même fonction puisqu'il ne présente pas de groupement  $NH_2$  terminal. Après transformation chloroplastique du gène *petA* avec des versions géniques

présentant ces deux types de modifications dans leurs séquences nucléotidiques, nous avons observé que le mutant de signal peptidase, F29L-31L, ne pouvait croître en conditions phototrophes, tandis que le mutant du sixième ligand, F32P, avait préservé ses propriétés de croissance photosynthétique. Paradoxalement, les deux mutants présentaient les mêmes propriétés biochimiques. Dans les deux cas, trois formes du cytochrome f pouvaient être observées, chacune étant compétente pour lier un hème c et pour s'assembler dans un complexe cytochrome  $b_6f$  résistant aux protéases *in vivo*. Si la forme de plus haut poids moléculaire correspond bien à la préprotéine non clivée, une forme de taille intermédiaire due à une maturation inappropriée s'accumule dans les deux mutants, ainsi qu'une forme de poids moléculaire apparent semblable au cytochrome f présent dans la souche sauvage. Sur le plan fonctionnel, les deux mutants possèdent un cytochrome f de haut spin, dû à l'absence de sixième ligand de l'hème c, ainsi que du cytochrome f de bas spin, dont le potentiel est déplacé vers des valeurs plus négatives que dans la souche sauvage. Nous avons conclu que la forme de haut spin, inactive en transfert d'électrons, est due à du pré-holocytocrome f, tandis que les formes de bas spin correspondent à des formes d'holocytocrome f clivées par la peptidase en des sites voisins du site AQA. Seul le mutant F32P présentait une population mineure de cytochrome f dont le potentiel et le spectre restent semblables à ceux du cytochrome f de la souche sauvage. Nous avons attribué cette dernière forme de cytochrome f à un clivage par la signal-peptidase en position A29 chez le mutant F32P, un résidu qui n'est plus présent dans le mutant F29L-31L. Ce travail a permis de démontrer (i) que la liaison covalente de l'hème c ne requiert par la maturation préalable du pré-apocytocrome f, (ii) que la position dans la séquence peptidique du sixième ligand de l'hème c détermine le potentiel de l'holocytocrome f, (iii) que la signal-peptidase peut tolérer des sites de clivage distincts du site canonique, une activité qui doit probablement exister à faible fréquence dans la souche sauvage elle-même.

#### PUBLICATIONS

F. BAYMANN & F. RAPPAPORT. « Electrostatic interaction in the donor side of the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* ». *Biochemistry*, 1998, **37**, 15320-15326.

A. VERMÉGLIO, A. JOLIOT & P. JOLIOT. « Supramolecular organization of the photosynthetic chain in mutants of *Rhodobacter capsulatus* deleted in cytochrome  $c_2$  ». *Photosynthesis Research*, 1998, **56**, 329-337.

R. DELOSME. « Wavelength dependence of the quantum yield of charge separation in photosynthesis : photoacoustic study of light energy distribution among various pigment complexes ». *Israel Journal of Chemistry*, 1998, **38**, 237-246.

C. DE VITRY, Y. CHOQUET, F. BAYMANN, G. FINAZZI & T. KALLAS. « Deficient mutants and site-directed mutagenesis of the nuclear-encoded chloroplast Rieske 2Fe-2S protein ». In *Photosynthesis : Mechanisms and Effects*, Proceedings of the

XIth International Congress on Photosynthesis, Budapest, 17-22 Août 1998, pp. 3151-3154.

F. BAYMANN, F. ZITO, R. KURAS, W. NITSCHKE, P. JOLIOT, L. MINAÏ & F.-A. WOLLMAN. « Characterization of cytochrome f mutants in the  $b_6f$  complex of *Chlamydomonas reinhardtii* ». In : Photosynthesis : Mechanisms and Effects, Proceedings of the XIth International Congress on Photosynthesis, Budapest, 17-22 Août 1998, pp. 1549-1552.

A. JOLIOT & P. JOLIOT. « Proton pumping within cytochrome *bf* complex ». In : Photosynthesis : Mechanisms and Effects, Proceedings of the XIth International Congress on Photosynthesis, Budapest, 17-22 Août 1998, pp. 1573-1576.

P. JOLIOT, D. BÉAL & F. RAPPAPORT. « A new high-sensitivity 10 ns time-resolution spectrophotometric technique adapted to *in vivo* analysis of the photosynthetic apparatus ». In : Photosynthesis : Mechanisms and Effects, Proceedings of the XIth International Congress on Photosynthesis, Budapest, 17-22 Août 1998, pp. 4247-4252.

D. BÉAL, F. RAPPAPORT & P. JOLIOT. « A new high-sensitivity 10-ns time-resolution spectrophotometric technique adapted *in vivo* analysis of the photosynthetic apparatus ». *Review of Scientific Instruments*, 1999, **70**, 202-207.

F.A. WOLLMAN, L. MINAÏ & R. NECHUSHTAÏ. « The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1411**, 21-85.

C. JUNGAS, J-L. RANCK, J-L. RIGAUD, P. JOLIOT & A. VERMÉGLIO. « Supramolecular organization of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides* ». *The EMBO Journal*, 1999, **18**, 534-542.

F. ZITO, G. FINAZZI, R. DELOSME, W. NITSCHKE, D. PICOT & F.-A. WOLLMAN. « The Qo site of cytochrome  $b_6f$  complexes controls the activation of the LHCII kinase ». *The EMBO Journal*, 1999, **18**, 2961-2969.

P. JOLIOT & A. JOLIOT. « *In vivo* analysis of the electron transfer within Photosystem I : Are the two phylloquinones involved ? ». *Biochemistry*, 1999, **38**, 11130-11136.

C. DE VITRY & O. VALLON. « Mutants of *Chlamydomonas* : tools to study thylakoid membrane structure, function and biogenesis ». *Biochimie*, 1999, **81**, 631-643.

M. SCHRODA, O. VALLON, F.A. WOLLMAN & C. BECK. « A chloroplast-targeted HSP70 contributes to the photoprotection and repair of Photosystem II during and after photoinhibition ». *Plant Cell*, 1999, **11**, 1165-1178.

F. BAYMANN, F. ZITO, R. KURAS, L. MINAÏ, W. NITSCHKE & F.-A. WOLLMAN. « Functional characterization of *Chlamydomonas* mutants defective in cytochrome f maturation ». *J. Biol. Chem.* 1999, **274**, 22957-22967.

O. VALLON. « New sequence motifs shared by a wide variety of flavoproteins : evidence for common ancestry and tools to predict structure ». *Proteins : Structure, Function & Genetics*, 1999, sous presse.