

Bioénergétique cellulaire

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

Le cours de cette année, suite du cours précédent, porte sur l'étude des mécanismes de transfert de protons au sein des protéines impliquées dans les appareils photosynthétiques ou respiratoires assurant l'alimentation en énergie des êtres vivants.

La première partie du cours a été consacrée à approfondir et à développer certains des problèmes déjà abordés dans le cours précédent, en particulier ceux portant sur l'analyse théorique du mode de fonctionnement des pompes à protons couplées à des processus redox et mettant en jeu des canaux à protons transmembranaires. Je rappellerai que pour rendre compte de la stœchiométrie élevée du nombre de protons pompés par électron transféré au niveau de la cytochrome oxydase, enzyme terminale de la voie respiratoire, Wikström et ses collaborateurs avaient proposé l'intervention d'un nouveau type de mécanisme de pompage de protons, qui se distinguait fondamentalement de celui des boucles électrogéniques élaboré par Mitchell. On sait maintenant que ce type de pompe est impliqué au niveau de nombreux enzymes membranaires appartenant à différents types de chaînes respiratoires procaryotiques, ou eucaryotiques, et contribue de manière essentielle à l'établissement du gradient électrochimique de protons. Contrairement au modèle mitchellien, le fonctionnement de ces pompes implique un mouvement transmembranaire de protons à travers des canaux spécialisés. Ces protons sont entraînés par un moteur de type électrostatique couplé au changement d'état redox, et donc de la charge électrique, d'un transporteur d'électron au sein de la protéine membranaire. Lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire, les changements alternatifs de l'état d'oxydoréduction du transporteur induisent, par le jeu d'interactions électrostatiques, les changements du pK d'un acide aminé protonable situé à proximité. Ces modifications de pK induisent l'éjection ou la fixation d'un proton. La protéine-pompe doit, de plus, comporter un dispositif mobile jouant le rôle de valve connectant alternativement le groupe protonable à l'une ou l'autre des faces de la membrane par l'intermédiaire de

canaux à protons transmembranaires orientés vers l'une ou l'autre des deux faces de la membrane. Dans le modèle proposé par Wikström, la protéine-pompe oscille entre deux états conformationnels. Dans une première conformation, le transporteur d'électron (E) sous forme oxydée échange des électrons avec le compartiment bas potentiel de la chaîne de transfert d'électrons respiratoire, et l'acide aminé protonable (P) échange des protons avec l'une des faces de la membrane. La réduction de E, qui s'accompagne d'une augmentation de sa charge négative, induit la fixation d'un proton sur P. La protéine bascule alors dans une nouvelle conformation. Le transporteur d'électron se connecte au compartiment haut potentiel de la chaîne de transfert d'électrons, alors que le groupe protonable devient susceptible d'échanger des protons avec la phase aqueuse située sur l'autre face de la membrane. Dans ce mécanisme, le changement de conformation de la protéine réalise une double commutation intéressant à la fois la circulation des électrons et des protons. La stœchiométrie du nombre de protons et d'électrons transférés est alors obligatoirement égale à 1, comme dans le cas des pompes à protons fonctionnant sur le principe des boucles électrogéniques mitchelliennes. Il reste cependant très difficile d'imaginer un dispositif structural permettant d'établir ou d'interrompre le transfert d'électrons entre le transporteur E et les compartiments haut potentiel et bas potentiel de la chaîne de transfert d'électrons. En effet, les processus de transfert d'électrons s'effectuent par effet-tunnel, processus qui reste efficace pour des distances entre transporteurs dépassant 20 Å. La vitesse de transfert ne peut donc être modulée par une simple modification de la distance entre les transporteurs impliqués. Des processus plus complexes restent donc à imaginer pour rendre compte du fonctionnement de tels commutateurs.

Il n'en est pas de même dans le cas des mouvements de protons où un faible déplacement de la position de la chaîne latérale d'un acide aminé peut suffire pour interrompre ou établir un flux de protons à travers un canal. Sur la base de ce constat, une réflexion a été engagée pour déterminer dans quelle mesure un dispositif de pompe à protons peut faire l'économie d'un interrupteur modulant la vitesse de transfert d'électrons. Sous réserve de respecter certaines contraintes cinétiques et thermodynamiques, il est possible de construire un modèle de pompe à protons mettant en jeu un dispositif mobile dont la seule vocation serait d'orienter alternativement le flux de protons vers une face ou l'autre de la membrane. Dans un tel mécanisme, le rapport entre le nombre de protons pompés et le nombre d'électrons transférés dépend de la valeur des paramètres cinétiques et thermodynamiques des réactions de transfert d'électrons et de protons. Ce nouveau modèle permet de rendre compte de la valeur variable des stœchiométries entre nombre de protons et nombre d'électrons transférés observées expérimentalement dans le cas de différents complexes transducteurs d'énergie impliqués dans les chaînes respiratoires ou photosynthétiques.

La seconde partie du cours a porté sur l'étude structurale et fonctionnelle de plusieurs complexes protéiques majeurs impliqués dans la chaîne de transfert d'électrons respiratoire.

La cytochrome oxydase est l'enzyme terminale de la chaîne respiratoire au sein de laquelle s'effectue le processus de réduction de l'oxygène en eau. L'énergie libre disponible lors du transfert d'un électron depuis le cytochrome c jusqu'à l'oxygène est de l'ordre de 420 meV, soit environ deux fois supérieure à celle nécessaire pour pomper un proton sous une différence de potentiel transmembranaire de l'ordre de 200 mV. Une telle valeur du potentiel électrique est nécessaire pour induire la synthèse d'ATP. Wikström a démontré que la réduction d'une molécule d'oxygène en eau par la cytochrome oxidase induisait le pompage de 8 protons depuis la face interne vers la face externe de la membrane mitochondriale. La réduction de l'oxygène impliquant le transfert de 4 électrons, on peut en déduire que le transfert d'un électron à travers la cytochrome oxydase induit le transfert de 2 protons. D'un point de vue thermodynamique, la quasi totalité de l'énergie redox disponible (420 meV) est donc convertie en énergie électrique, puis en énergie chimique sous forme d'ATP.

Bien que la structure de la cytochrome oxydase, d'origine bactérienne ou mitochondriale, soit maintenant résolue à l'échelle atomique, le mécanisme mis en jeu dans le couplage entre transferts d'électron et de proton est encore loin d'être élucidé et fait l'objet de vives controverses. Parmi les nombreux polypeptides qui forment le complexe, deux sous-unités fortement conservées depuis les procaryotes jusqu'aux eucaryotes sont directement impliquées dans les processus de transfert d'électrons et de protons. Ce complexe de taille minimum porte quatre cofacteurs : deux cytochromes a et deux atomes de cuivre. L'architecture de cette chaîne de transfert d'électrons, où tous les cofacteurs sont regroupés dans un espace de petite dimension localisé au milieu du complexe, diffère profondément de la chaîne de transporteurs présente dans les centres photochimiques du système II. Ce complexe membranaire impliqué dans la photooxydation de l'eau réalise la réaction inverse de celle se produisant au niveau de la cytochrome oxydase. Dans le cas du photosystème II, dont l'architecture est conforme à celle proposée par Mitchell pour les complexes transducteurs d'énergie, la formation d'un potentiel de membrane est essentiellement associée à un transfert d'électrons à travers une chaîne transmembranaire de transporteurs. La situation est inverse dans le cas de la cytochrome oxydase, où la formation du potentiel de membrane est essentiellement associée à des transferts de protons se produisant entre les deux faces de la membrane. L'étude fonctionnelle de mutants ponctuels, perturbés au niveau d'acides aminés polaires susceptibles d'être impliqués dans la circulation des protons et la stabilisation d'une file de molécules d'eau transmembranaire, a permis de caractériser deux canaux connectant la face interne de la membrane à la région de la protéine incluant les transporteurs d'électrons. Ces canaux permettent d'alimenter en électrons le site binucléaire (cyt a3 CuB) où s'effectue la réduction de l'oxygène, et en protons le ou les acides aminés protonables impliqués dans le processus de pompage de protons et situés à proximité de ces transporteurs d'électron. Le rôle respectif de ces canaux dans la conduction des protons « substrats » et des protons pompés

n'a pas été déterminé. Les protons non consommés dans le processus de réduction de l'oxygène (protons pompés) sont ensuite expulsés vers la face externe par un troisième canal implanté dans une région très hydrophile de la protéine.

Le processus de réduction de l'oxygène catalysé par le centre binucléaire (cyt a₃ CuB) implique le transfert séquentiel de quatre électrons et de quatre protons. La séquence des réactions conduisant à la réduction de l'oxygène a été en grande partie élucidée grâce à la mise en œuvre d'une batterie de méthodes associant la spectroscopie optique et infrarouge. La réaction est initiée par la réduction séquentielle du cuivre B et du cytochrome a₃, immédiatement suivie par la fixation d'oxygène. Les étapes suivantes impliquent la formation d'au moins quatre espèces de courte durée de vie au cours desquelles s'effectue la réduction progressive de l'oxygène associée aux transferts d'électrons et de protons. L'addition d'ATP à une suspension de mitochondries permet d'induire un fort potentiel de membrane associé à l'hydrolyse de l'ATP par l'ATP synthase membranaire. Dans une expérience particulièrement élégante, Wikström a montré que ce champ électrique établit un équilibre thermodynamique au niveau des deux étapes terminales du cycle de réduction de l'oxygène. Il est ainsi possible de stabiliser certaines espèces intermédiaires dont la durée de vie est très courte dans les conditions normales de fonctionnement de l'enzyme. En s'appuyant sur un raisonnement thermodynamique, Wikström a proposé que, parmi les six étapes impliquées dans le cycle fonctionnel de la cytochrome oxydase, le processus de pompage de protons est exclusivement couplé aux deux étapes terminales conduisant à la réduction de l'oxygène en eau. Ces conclusions sont cependant vivement contestées par H. Michel, qui propose que l'une des étapes de pompage de proton associée à la réduction du cytochrome a₃, n'implique pas la participation de l'oxygène ou de l'un de ses produits de réduction.

De nombreux modèles ont été proposés pour rendre compte du mécanisme de pompage de protons couplé au transfert d'électrons à travers la cytochrome oxydase. L'ensemble des partenaires impliqués, qu'il s'agisse de transporteurs d'électron ou des acides aminés protonables, sont regroupés dans un volume de petite dimension rendant particulièrement complexe l'analyse théorique des multiples interactions électrostatiques induisant le processus de pompage de protons. L'analyse critique des différents modèles proposés ne permet pas encore d'opérer un choix motivé entre des modèles encore très spéculatifs. Il est intéressant de souligner que la connaissance, à l'échelle atomique de la structure de la cytochrome oxydase ne permet pas d'élaborer un modèle fonctionnel plausible, soulignant ainsi la nécessité de recourir à des méthodes d'analyse fonctionnelle de plus en plus sophistiquées.

La dernière partie du cours a été consacrée à l'étude du complexe I, voie principale d'entrée des électrons dans les chaînes respiratoires des procaryotes et des eucaryotes. Le complexe I est une enzyme transmembranaire de très grande dimension qui, sous sa forme la plus simple, présente chez les procaryotes, est formé de 14 sous-unités. Ce complexe réalise le transfert d'électrons entre

le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) et l'ubiquinone en solution dans la phase lipidique de la membrane. Au transfert d'un électron à travers le complexe est associé le pompage transmembranaire de deux protons à travers la membrane. Le complexe est formé d'un segment extérieur de la membrane comportant la totalité des groupes prosthétiques et d'un segment membranaire. Les électrons sont injectés au niveau d'une flavo-protéine (FMN), située dans le segment extramembranaire. Les électrons sont ensuite transférés à travers une chaîne de transporteurs formée par 6 à 8 centres redox de « clusters » Fer-Soufre. Cette chaîne assure le transfert des électrons sur une distance d'environ 80 Å depuis la flavoprotéine vers un transporteur Fer-Soufre situé à proximité de l'interface entre le segment protéique hydrophile et le segment membranaire. La partie membranaire dont la dimension dans le plan de la membrane dépasse 150 Å ne comprend aucun groupe prosthétique, mais porte au moins trois sites de fixation de l'ubiquinone. Il est probable que le processus de pompage de protons se produit exclusivement au niveau de la partie membranaire de l'enzyme. Un modèle fonctionnel du complexe I, s'inspirant du mécanisme du Q-cycle qui rend compte du fonctionnement du complexe cytochrome b/c, a été proposé par Dutton et collaborateurs. Ce modèle purement hypothétique a cependant le mérite de proposer un exemple du type de mécanisme qui pourrait être impliqué dans la partie membranaire de cette enzyme qui ne contient aucun cofacteur. Il reste surprenant de constater que le complexe I, qui joue un rôle majeur dans les processus de conversion d'énergie se produisant dans les chaînes respiratoires, reste le seul complexe convertisseur d'énergie dont les caractéristiques structurales et fonctionnelles restent encore si mal connues.

P. J.

SÉMINAIRES

Andy PASCAL (CEA Saclay) « La gestion des flux d'énergie dans la photosynthèse végétale ».

Nicolas GINET (CEA Cadarache) « Interactions électrostatiques et conformationnelles entre accepteurs quinoniques et donneur primaire du centre réactionnel bactérien ».

Soufian OUCHANE (CNRS-CGM Gif-sur-Yvette) « Régulation des gènes de la photosynthèse chez *Rhodobacter sphaeroides* ».

Danielle LEMESLE-MEUNIER (CNRS Marseille) « Le complexe bc₁ et le transfert reverse d'électrons chez la bactérie acidophile chimiolithotrophe *T. ferroxidans* ».

Jean Paul DI RAGO (CNRS Bordeaux) « Identification d'un gène nucléaire nécessaire à l'assemblage du complexe ATP synthétase à haute température ».

Pierre SÉTIF (CEA Saclay) « Cinétiques de transfert d'électron et équilibre redox impliquant cytochromes et agrégats fer-soufre dans les centres réactionnels de la bactérie verte sulfureuse *Chlorobium tepidum* ».

Laurent COURNAC (CEA Cadarache) « Réduction et oxydation non-photochimiques des plastoquinones : implications bioénergétiques et physiologiques ».

Mariana GUERGOVA-KURAS (IBPC Paris) « Intervention de deux voies de transfert d'électrons au niveau du Système I ».

Pierre SEBBAN (CNRS-CGM Gif-sur-Yvette) « Conséquences de la formation de Q_A^- dans les centres réactionnels bactériens ».

Francis HARAUX (CEA Saclay) « Interaction de la thiorédoxine avec le domaine régulateur de l'ATP synthase chloroplastique ».

ANALYSE *IN VIVO* DU TRANSFERT D'ÉLECTRONS AU NIVEAU DES CENTRES PHOTOCHIMIQUES I

(P. Joliot, A. Joliot, M. Guergova-Kuras)

L'étude des transferts d'électron se produisant entre les accepteurs du photosystème I sur des algues intactes a été rendu possible par la réalisation dans notre laboratoire d'un nouveau spectrophotomètre de très haute sensibilité, dont le temps de résolution est de l'ordre de 5 ns. Il est ainsi possible d'étudier les centres photochimiques placés dans leur environnement physiologique naturel et dont les propriétés n'ont pas été perturbées par des procédures d'extraction et de purification.

Sur le plan structural, les centres réactionnels du Photosystème I sont formés par un hétérodimère, constitué de deux polypeptides PsaA et PsaB, auxquels 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. 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), puis vers un accepteur secondaire, la phylloquinone, localisée approximativement à mi-distance entre les deux faces membranaires. Un travail décrit dans le précédent rapport avait porté sur l'analyse des transferts d'électrons entre la phylloquinone et les accepteurs constitués de centres Fer-soufre (Fx Fa Fb), localisés à proximité de la face stromale de la membrane. La cinétique d'oxydation de la phylloquinone présente deux phases cinétiques d'amplitudes relatives comparables dont les demi-temps sont respectivement de 18 ns et 160 ns comme l'avait observé précédemment K. Brettel. Pour rendre compte de cette biphasicité, K. Brettel avait proposé que la constante d'équilibre de la réaction d'oxydation de la phylloquinone soit de l'ordre de 1, si bien que 50 % de la phylloquinone restait oxydée après équilibration et ne pouvait être oxydée qu'après oxydation de l'accepteur Fx. L'indépendance de la constante d'équilibre et des cinétiques de transfert d'électron vis-a-vis de la valeur du champ électrique transmembranaire avait conduit P. et A. Joliot à proposer que les deux phases

cinétiques d'oxydation de la phylloquinone reflètent une hétérogénéité fonctionnelle. Celle-ci s'impose d'elle-même dans un modèle fonctionnel où les deux branches de cofacteurs, et par conséquent les deux phylloquinones, participent au processus de transfert d'électron.

Afin de vérifier la validité de cette hypothèse, une collaboration a été engagée avec Kevin Redding (Université d'Alabama, USA) portant sur l'analyse de mutants de l'algue verte *Chlamydomonas* perturbés au niveau de tryptophanes localisés à proximité des deux phylloquinones dans chacun des monomères PsaA et PsaB formant le cœur du centre photochimique. Les cinétiques du mutant perturbé au niveau du polypeptide PsaA présentent une phase rapide de réoxydation de la phylloquinone inchangée, alors que la phase lente est ralentie d'un facteur 2.5 ($t_{1/2}=700$ ns). Au contraire, dans le cas du mutant perturbé au niveau du polypeptide PsaB, la phase rapide est ralentie d'un facteur 5 ($t_{1/2}=105$ ns). Dans le cas du double mutant, les phases rapides et lentes sont toutes les deux ralenties.

Ces expériences établissent sans ambiguïté que les deux chaînes de transfert d'électron associées à l'un et l'autre des monomères formant le cœur du photosystème I participent au processus de séparation de charge transmembranaire. Les centres photochimiques du photosystème I se distinguent donc fondamentalement des centres photochimiques des bactéries pourpres ou des centres du photosystème II impliqués dans la formation d'oxygène qui, bien que formés comme le photosystème I par un hétérodimère presque symétrique, ne comportent qu'une seule voie compétente pour le transfert d'électron.

LA POMPE À PROTON DANS LE CYTOCHROME b_6f (P. Joliot, A. Joliot)

Les processus de transfert d'électrons et de protons intervenant au niveau des complexes $cyt\ bc_1$ et b_6f 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 (Q_o), localisé à proximité de la face interne de la membrane du thylacoïde. À cette oxydation sont associées 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 Q_i , localisé à proximité de la face stromale de la membrane. À cette réduction sont associées l'oxydation de deux $cyt\ b$ et la fixation de deux protons prélevés dans le stroma. Dans ce modèle, les réactions électrogéniques, traduites par la génération d'un potentiel électrique transmembranaire, sont essentiellement associées au transfert d'électrons entre deux cytochromes b implantés en position transmembranaire. Nous avons montré que ce modèle ne rend pas compte de nombreux faits expérimentaux. Les contradictions entre ces données expérimentales et le modèle du « Q-cycle » ont été exposées en détail dans les précédents rapports. P. Joliot et A. Joliot ont été conduits à proposer l'intervention d'un processus électrogénique supplémentaire non prévu par l'hypothèse du « Q-

cycle ». L'oxydation de la plastoquinone se produisant au site Q_o , localisé à proximité de la face luménale du complexe serait associée à un mouvement transmembranaire de protons impliquant un mécanisme analogue à celui proposé par Wikström dans le cas de la cytochrome oxydase. Contrairement au « Q-cycle », ce mécanisme implique l'intervention d'un canal à protons transmembranaire reliant le site Q_o à la face stromale de la membrane.

L'intervention d'une pompe à protons au niveau du complexe a récemment été confirmée par l'étude des phases électrogéniques sur des mutants photosynthétiques de *Chlamydomonas* ne comportant pas d'ATPase membranaire F0 F1. L'amplitude des phases électrogéniques associées aux transferts de protons se produisant au niveau du complexe cyt b_6f est plus élevée dans les mutants sans ATPase que dans les souches sauvages, tout particulièrement lors de l'illumination par des éclairs saturants. Ce résultat suggère qu'une fraction des protons pompés par le complexe cytochrome b_6f est immédiatement perdue en raison d'une fuite se produisant au niveau du canal à protons de l'ATPase (F0). Cette fuite de protons conduirait à une sous-estimation systématique du nombre de protons pompés au niveau du complexe cyt b_6f , tout particulièrement dans le cas de l'illumination par des éclairs de forte énergie. L'étude des cinétiques des phases électrogéniques, effectuées sur des mutants dépourvus d'ATPase ou sur des souches sauvages dont l'ATPase a été inhibée de manière spécifique par de faibles concentrations de DCCD, permet donc une mesure précise de l'efficacité des pompes à protons associées au fonctionnement du complexe cyt b_6f , qui est égale à 1.5 protons pompés à travers la membrane par électron transféré au photosystème I. Le pompage d'un seul proton serait associé à un mécanisme de type « Q cycle », alors que 0.5 protons seraient pompés par un mécanisme impliquant un mouvement de proton à travers un canal transmembranaire. Ces résultats démontrent que le processus de pompage de protons reste efficace dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire lorsque la pompe fonctionne contre un gradient électrochimique de protons. Le mécanisme additionnel de pompage de protons est donc susceptible de contribuer efficacement à l'accumulation d'énergie électrique et osmotique transmembranaire à l'origine de la synthèse d'ATP.

CONSÉQUENCES FONCTIONNELLES DE LA LOCALISATION MEMBRANAIRE DU CYTOCHROME b_6f

(F. Rappaport, P. Joliot & A. Ramgobeen)

On distingue deux domaines dans la membrane du thylacoïde : le domaine granulaire constitué d'empilements membranaires et le domaine lamellaire. Il se trouve que les photosystèmes II sont situés exclusivement dans les domaines granulaires, alors que les photosystèmes I, eux, sont localisés dans les domaines lamellaires. Le complexe cytochrome b_6f , qui permet l'oxydation des plastoquinols réduits par le PSII et la réduction de la plastocyanine oxydée par le PSI, joue donc un rôle pivot dans le transfert d'électrons entre ces deux domaines.

En ce qui concerne la localisation membranaire du complexe b_6f , des données d'immunocytochimie laissent à penser que l'on peut distinguer deux situations : i) la situation « linéaire » où les deux photosystèmes fonctionnent à des vitesses similaires ; dans ce cas, le complexe b_6f est équiréparti entre les deux domaines ; ii) la situation où seul le photosystème I peut fonctionner (par exemple en anaérobiose où les accepteurs d'électrons du PSII sont réduits du fait du métabolisme cellulaire) ; dans ce cas, le complexe b_6f est majoritairement présent dans les régions lamellaires. Des résultats préliminaires suggèrent que cette migration latérale, observée par immunocytochimie, peut être corrélée à la vitesse d'oxydation du cytochrome f du complexe b_6f . Ainsi, en comparant ces vitesses dans différentes souches mutantes pour lesquelles la migration latérale est inhibée et où le complexe b_6f est localisé dans l'un ou l'autre des domaines membranaires, nous avons constaté que plus la distance entre le PSI et le b_6f est faible, plus la vitesse d'oxydation du cytochrome f est grande. Ceci suggère que la diffusion de la plastocyanine du PSI au complexe b_6f limite l'oxydation du cytochrome f . Une analyse cinétique approfondie de ces résultats peut permettre d'affiner la détermination de la distribution latérale du complexe b_6f et donc de mieux cerner les paramètres la déterminant. Par exemple, sachant que la phosphorylation du complexe b_6f est à l'origine de sa ségrégation, on peut penser qu'il s'agit en fait d'une exclusion électrostatique des régions granaires et que la distribution dans les régions lamellaires est aléatoire. Inversement, l'hypothèse d'une association privilégiée entre PSI et complexe b_6f peut être envisagée (supercomplexes).

COUPLAGE ENTRE TRANSFERT D'ÉLECTRON ET TRANSFERT DE PROTON LORS
DES VARIATIONS D'ÉTATS REDOX DE LA TYROSINE D₁161 DU PHOTOSYSTÈME II
(*F. Rappaport en collaboration avec B. Diner, Du Pont de Nemours, USA*)

La tyrosine D₁161 du photosystème II sert de transporteur d'électron intermédiaire entre le pigment chlorophyllien photooxydé P₆₈₀ et le centre métallique à quatre atomes de manganèse où s'effectue la décomposition d'eau en oxygène. Des techniques de résonances magnétiques ont montré que cette tyrosine est neutre à l'état oxydé, ce qui impose qu'elle est déprotonée. L'état de protonation de la forme réduite est cependant controversé. Dans l'hypothèse où elle serait protonée, son oxydation impliquerait alors sa déprotonation et sa reréduction sa reprotonation. C'est dans ce cadre qu'un mécanisme moléculaire de décomposition de l'eau a été proposé : la réduction de cette tyrosine permettrait d'arracher non seulement les électrons, mais également les protons des molécules d'eau. Nous avons tenté de tester une des hypothèses fondatrices de ce modèle, en déterminant l'état de protonation de cette tyrosine. Pour ce faire, des cultures de cyanobactéries ont été conduites en présence d'une tyrosine fluorée qui semble avoir été incorporée. La constante d'acidité de cet acide aminé modifié est inférieure d'une unité pH à celui d'une tyrosine. Dans l'hypothèse d'une protonation à l'état réduit, on s'attend donc à ce que la dépendance en fonction du pH

des cinétiques d'oxydation ou de réduction de cette tyrosine reflète cette modification de pK. Nous avons observé que l'oxydation de la tyrosine est nettement accélérée à haut pH suggérant qu'en effet la tyrosine est protonée à l'état réduit et que sa déprotonation préalable facilite son oxydation. Cependant, dans les régions de pH où elle serait protonée, la substitution d'une tyrosine par une tyrosine fluorée est sans conséquence, alors que les cinétiques d'oxydation sont fortement dépendantes du pH. Ces résultats montrent que cette modulation par le pH est insensible au pK_a de la tyrosine.

COUPLAGE ENTRE TRANSFERT D'ÉLECTRON ET TRANSFERT DE PROTON
DANS LE MÉCANISME D'OXYDATION DE L'EAU PHOTOSYNTHÉTIQUE

(F. Rappaport en collaboration avec J. Lavergne, CEA Cadarache)

Selon les données dont on dispose sur les potentiels d'oxydoréduction des différents cofacteurs impliqués dans l'oxydation de l'eau photosynthétique, la réaction enzymatique de décomposition de deux molécules en oxygène gazeux est faiblement exergonique. Dans le cadre d'une revue, Fabrice Rappaport et Jérôme Lavergne ont examiné, aux vues des données récentes, les contraintes énergétiques inhérentes au processus d'oxydation de l'eau. De cette analyse, il ressort que l'oxydation du donneur secondaire d'électron qu'est la tyrosine 161 du polypeptide D_1 doit être précédée par sa déprotonation (formation transitoire d'un état tyrosinate). Une histidine est sans doute impliquée dans la formation de ce tyrosinate par l'établissement d'une liaison hydrogène. Pour autant, le pK_a de cet accepteur de proton est soumis à deux exigences mécanistiques contradictoires : il doit être suffisamment faible pour interdire sa protonation aux pH physiologiques et suffisamment élevé pour que sa protonation ne constitue pas une réaction trop endergonique. L'énergie de la liaison hydrogène apparaît toutefois suffisante pour diminuer la probabilité de protonation de cet accepteur. De plus, l'interaction électrostatique entre les noyaux tyrosinate et imidazolium permet de stabiliser l'état tyrosinate.

PUBLICATIONS

F. RAPPAPORT, G. FINAZZI, Y. PIERRE & P. BENNOUN. « A new electrochemical gradient generator in thylakoid membranes of green algae ». *Biochemistry*, 1999, **38**, 2040-2047.

P. BENNOUN & M. DELOSME. « Chloroplast suppressors that act on a mitochondrial mutation in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Mol. Gen Genet*, 1999, **262**, 85-89.

A. VERMÉGLIO & P. JOLIOT. « The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides* ». *Trends in Microbiology*, 1999, **7**, 435-440.

C. de VITRY, G. FINAZZI, F. BAYMANN & T. KALLAS. « Analysis of the nucleus-encoded and chloroplast-targeted Rieske protein by classic and site-directed mutagenesis of *Chlamydomonas* ». *Plant Cell*, 1999, **11**, 2031-2044.

M.M. FLEISCHMANN, S. RAVANEL, R. DELOSME, J. OLIVE, F. ZITO, F.A. WOLLMAN & J.D. ROCHAIX. « Isolation and characterization of phototrophic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in state transition ». *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 30987-30994.

R.A. MONDE, F. ZITO, J. OLIVE, F.A. WOLLMAN & D.B. STERN. « Post-transcriptional defects in tobacco chloroplast mutants lacking the cytochrome b_6 f complex ». *Plant. J.*, 2000, **21**, 61-72.

W. MAJERAN, F.A. WOLLMAN & O. VALLON. « Evidence for a role of ClpP in the degradation of the chloroplast cytochrome b_6 f complex ». *Plant Cell*, 2000, **12**, 137-149.

C. DENIAU & F. RAPPAPORT. « New insights on the proton pump associated with cytochrome b_6 f turnovers from the study of H/D substitution effects on the electrogenicity and electron transfer reactions ». *Biochemistry*, 2000, **39**, 3304-3310.

F.E. VAISTIJ, M. GOLDSCHMIDT-CLERMONT, K. WOSTRIKOFF & J.-D. ROCHAIX. « Stability determinants in the chloroplast psbB/T/H mRNAs of *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Plant Journal*, 2000, **21**, 469-482.

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*. In press.

P. HAMEL, J. OLIVE, Y. PIERRE, F.-A. WOLLMAN & C. de VITRY. « A new subunit of cytochrome b_6 f complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition ». *J. Biol. Chem.* In press.

Y. CHOQUET & O. VALLON. « Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins ». *Biochimie*. In press.