

## Bioénergétique cellulaire

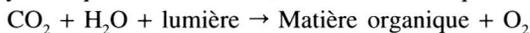
M. Pierre JOLIOT, membre de l'Institut  
(Académie des Sciences), professeur

La première partie du cours de cette année a porté sur l'émergence des concepts dans le domaine de la photosynthèse. C'est dans la deuxième moitié du 18<sup>e</sup> siècle qu'un certain nombre d'expériences fondatrices va conduire à la naissance de la bioénergétique. Ces expériences novatrices sont effectuées dans un cadre conceptuel totalement erroné, l'énergétique à cette époque étant dominée par la théorie du phlogistique, proposée par Stahl dès le début du 18<sup>e</sup> siècle. Ce fluide mystérieux, qui symbolise le feu, est contenu dans les corps combustibles et en est libéré lors de leur combustion.

C'est en 1771 que Priestley, théologien et philosophe non-conformiste, démontre qu'une plante verte, enfermée dans une cloche de verre, est susceptible de régénérer de l'air vicié par la combustion d'une bougie ou par la respiration d'un animal. Il conclut que la plante a émis un air « déphlogistiqué ». Sa découverte soulève l'enthousiasme car elle démontre, comme le souligne Pringle, alors président de la Royal Society, que « les plantes ne poussent pas en vain, mais sont utiles à l'humanité en nettoyant et purifiant l'atmosphère ». Lorsque Priestley, en expérimentateur scrupuleux, tente de répéter cette expérience quelques années plus tard, il rencontre de nombreux échecs, vraisemblablement parce qu'il ne contrôlait pas les conditions d'illumination de la plante. C'est Ingen-Housz, en 1779, qui démontre sans ambiguïté que l'émission d'air « déphlogistiqué » ne se produit qu'à la lumière. Il montre également qu'à l'obscurité, les plantes émettent un air délétère. Elles respirent donc comme les animaux. Quelques années plus tard, Senebier démontre que « l'air fixe » — qui n'est autre que le gaz carbonique — « est la nourriture que les plantes tirent de l'air et la source de l'air pur qu'elles fournissent sous l'effet de la lumière ». C'est à cette époque que Lavoisier élabore les bases de la chimie moderne en rejetant définitivement la théorie du phlogistique.

En 1797, Ingen-Housz présente la première théorie moderne de la photosynthèse, qui intègre les idées révolutionnaires de Lavoisier. L'équation qu'il propose

est encore incomplète et il reviendra à de Saussure, qui en 1804, a le mérite de démontrer que l'eau est l'un des substrats de la réaction photosynthétique. Ainsi, moins de trente ans après la découverte de Priestley, tous les partenaires de la réaction photosynthétique sont identifiés, conduisant à l'équation :



Cette équation conduit tout naturellement à la supposition que l'oxygène provient de la décomposition du gaz carbonique, concept qui sera universellement accepté pendant plus de cent ans. Il est intéressant de souligner qu'en 1787, c'est-à-dire plus de dix ans avant Ingen-Housz et de Saussure, de Fourcroy, collaborateur de Lavoisier, présente dans un petit livre destiné à l'éducation des dames une description incroyablement moderne du fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Il propose que la lumière décompose l'eau en oxygène et hydrogène, ce dernier se fixant dans la plante pour former les composés « huileux ». Il propose également que deux étapes nécessitant la lumière interviennent dans le processus photosynthétique. Les conceptions révolutionnaires formulées par de Fourcroy dans un livre de vulgarisation s'appuyaient probablement sur les travaux les plus récents de Lavoisier qui venait de fonder un autre chapitre de la bioénergétique en démontrant que la respiration fournit l'énergie nécessaire à la survie des animaux, par un processus dont le bilan est analogue à celui de la combustion. Il montre en effet que la respiration implique à la fois la combinaison du carbone et de l'oxygène pour former le gaz carbonique, mais également celle de l'hydrogène et de l'oxygène pour former de l'eau. De Fourcroy suppose donc implicitement que le processus photosynthétique réalise la réaction inverse du processus respiratoire. Il faudra attendre la seconde moitié du vingtième siècle pour que les idées exprimées dans un simple ouvrage de vulgarisation par de Fourcroy soient définitivement admises.

Après l'explosion de découvertes qui caractérise la fin du 18<sup>e</sup> siècle, les progrès réalisés au cours du 19<sup>e</sup> siècle peuvent être considérés comme relativement modestes. Il faut cependant citer Robert Mayer, qui applique au cas de la photosynthèse les principes de la thermodynamique montrant que « les plantes sont capables de convertir l'énergie et non pas de la créer ». En 1881, Engelman réalise une expérience particulièrement élégante en utilisant pour détecter l'oxygène une bactérie qui présente un tropisme positif pour l'oxygène. Il illumine un thalle d'algue verte filamenteuse à l'aide d'un spectroscope et observe que les bactéries s'accumulent au niveau des deux pics d'absorption de la chlorophylle, dans le rouge et le bleu, établissant sans ambiguïté que la lumière utilisée par la réaction photosynthétique est absorbée par le pigment vert des plantes.

La première moitié du 20<sup>e</sup> siècle a été marquée par la mise au point par Warburg d'une technique manométrique permettant de suivre les échanges gazeux entre des cellules ou des organites en suspension dans un tampon et le milieu extérieur. Cette technique permet de mesurer avec précision la vitesse des processus photosynthétiques ou respiratoires en déterminant les vitesses de formation ou de fixation de l'oxygène et du gaz carbonique. À ce titre, elle est

à la base de progrès conceptuels importants. Dans le cas de la photosynthèse, ce sont certainement Emerson et ses collaborateurs qui ont su exploiter le mieux les possibilités de cette nouvelle méthode. On peut maintenant s'étonner que certains résultats obtenus il y a plus d'un demi-siècle à l'aide d'une technique de maniement délicat — et aujourd'hui totalement dépassée — font encore autorité de nos jours. Une étape essentielle est franchie en 1932 lorsque Emerson et Arnold démontrent que la quantité d'oxygène émise par des algues illuminées par un éclair de quelques microsecondes de très forte énergie est plus de deux mille fois inférieure à la quantité de chlorophylle. Ce résultat suggère que la quantité d'oxygène formée est limitée par un catalyseur présent à très faible concentration et conduira à l'émergence du concept de centres réactionnels. En 1936, en s'appuyant sur les théories développées par Francis Perrin, puis par Förster, Gaffron et Wohl proposent une interprétation particulièrement séduisante des expériences d'Emerson et Arnold. Ils supposent que l'énergie est transférée depuis les chlorophylles vers le catalyseur de faible concentration, non pas par la diffusion d'espèces chimiques, mais par le transfert d'excitation électronique entre pigments. Ces auteurs avaient montré que lorsque deux pigments, de propriétés spectrales voisines, sont situés à proximité l'un de l'autre, l'énergie d'excitation formée lors de l'absorption d'un photon par l'un des pigments peut être transférée au pigment voisin en un temps très inférieur aux quelques nanosecondes qui correspondent à la durée de vie de l'état excité. Gaffron propose que le chloroplaste présente des régions dans lesquelles les pigments sont présents à très forte concentration au sein desquelles l'énergie d'excitation peut migrer d'une manière aléatoire jusqu'au moment où elle est piégée au niveau d'un catalyseur faiblement concentré où s'effectue l'étape photochimique primaire. Cette migration d'énergie ne nécessite aucun mouvement moléculaire. La réalité des transferts d'excitation sera établie expérimentalement en 1952 par Duysens, qui montrera que la fluorescence de la chlorophylle, ou de la bactériochlorophylle, peut être sensibilisée indirectement par des pigments de nature chimique très diverse. Duysens montre également que la lumière induit un changement d'absorption d'un pigment chlorophyllien présent à très faible concentration. On sait maintenant que ce pigment représente le donneur d'électron impliqué dans la réaction photochimique primaire se produisant au sein des centres réactionnels.

L'élucidation de l'origine de l'oxygène photosynthétique représente une autre étape essentielle dans l'histoire de la photosynthèse. Si l'on excepte les idées révolutionnaires formulées par de Fourcroy, il est généralement admis jusqu'au début du 20<sup>e</sup> siècle que l'oxygène provient de la décomposition du gaz carbonique. Wurmser en 1920, puis Van Niel en 1931, sont les premiers à proposer que l'oxygène provient de la décomposition photochimique de molécules d'eau. Il manquait cependant une démonstration expérimentale permettant d'établir la validité de ce concept. En utilisant un isotope stable de l'oxygène pour marquer, soit l'eau, soit le gaz carbonique, Ruben et ses collaborateurs démontrent en 1941 que la concentration isotopique de l'oxygène émis est strictement corrélée à celle de l'eau et est indépendante de celle du gaz carbonique. Cette expérience

décisive ne suffit pas à convaincre Warburg et ses collaborateurs, qui poursuivront encore longtemps un combat d'arrière-garde tendant à s'opposer à ce nouveau concept.

Jusque dans les années 1950, les seules informations quantitatives sur le processus photosynthétique portaient sur la mesure des échanges gazeux entre les algues ou les chloroplastes et le milieu extérieur. L'appareil photosynthétique restait donc une boîte noire et les modèles interprétatifs proposés présentaient un caractère formel dans lesquels n'entrait aucun composé chimiquement identifié.

La fin des années 1950 voit une révolution d'ordre technologique qui se traduit par la mise en œuvre de techniques spectroscopiques. Ces méthodes rendent possible la mesure des modifications spectrales associées aux changements de l'état d'oxydo-réduction de différents transporteurs d'électrons de la chaîne photosynthétique. En 1956, Duysens démontre que le cytochrome *f* est un constituant de la chaîne photosynthétique, en mettant en évidence les changements induits par la lumière de l'état d'oxydoréduction de ce transporteur. Witt et ses collaborateurs poussent alors à un haut degré de sophistication les méthodes d'analyse spectroscopique, en améliorant leur résolution temporelle. Ils caractérisent sur le plan chimique de nombreux composants de la chaîne photosynthétique, tout en analysant cinétiquement les modifications de leur état d'oxydo-réduction induites par la lumière. Witt et ses collaborateurs démontrent que la réaction photochimique induit, en moins d'une nanoseconde, le transfert d'électron depuis une molécule de chlorophylle vers une quinone. Ces deux transporteurs sont localisés à proximité des faces opposées de la membrane photosynthétique et sont inclus dans un édifice protéique complexe : le centre réactionnel. C'est à la même époque que différents laboratoires proposent simultanément que la réaction photosynthétique oxygénique implique l'intervention de deux étapes photochimiques fonctionnant en série. À la base de ce concept, se trouvent les expériences plus anciennes effectuées en 1939 par Emerson et Lewis. Ces auteurs montrent que la formation d'une molécule d'oxygène requiert au minimum l'absorption de 8 quanta de lumière. La formation d'une molécule d'oxygène impliquant l'extraction de quatre électrons ou de quatre atomes d'hydrogène à partir de deux molécules d'eau, il semblait logique de supposer que cette réaction ne nécessitait l'absorption que de quatre quanta. En s'appuyant sur l'analyse spectroscopique des processus de transferts d'électron, les résultats d'Emerson et Lewis ont pu être interprétés en admettant l'intervention de deux réactions photochimiques fonctionnant en série. Cette hypothèse implique que le transfert d'un électron depuis l'eau jusqu'au gaz carbonique nécessite l'absorption de deux quanta, soit 8 quanta par molécule d'oxygène formée. Les centres réactionnels de type II participent directement au processus de décomposition de l'eau alors que les centres réactionnels de type I induisent la réduction d'un accepteur d'électron de bas potentiel, le dinucléotide-adénine-diphosphate. Ce transporteur permet ultérieurement la réduction du gaz carbonique qui s'opère au niveau d'un cycle métabolique très complexe caractérisé quelques années auparavant par Benson et Calvin.

Les progrès sur le plan expérimental et conceptuel réalisé à la fin des années 50 mettent en évidence le rôle central joué par les processus de transfert d'électron qui se produisent au sein de protéines. Il restait à mieux comprendre le mécanisme par lequel la lumière permet la décomposition de l'eau et la libération de l'oxygène. La réaction photochimique II permet la formation d'espèces radicalaires oxydées dont le potentiel de demi réduction est supérieur à celui du couple oxygène/eau, dont la valeur est proche de +0,8 volts. D'autre part, conformément à la stœchiométrie du processus de décomposition de l'eau, quatre de ces espèces radicalaires doivent coopérer pour permettre la formation d'oxygène. Ma contribution dans ce domaine de recherche a tout d'abord porté sur le développement de nouvelles méthodes électrochimiques de détection de l'oxygène photosynthétique de haute sensibilité. J'ai pu ainsi montrer que l'illumination d'algues adaptées à l'obscurité par un éclair unique de courte durée ne provoque aucune émission d'oxygène. Lors de l'illumination par une série d'éclairs, la quantité d'oxygène émise oscille avec une périodicité égale à quatre. Les centres photochimiques peuvent donc exister sous quatre états stables différents. Chaque éclair induit un changement d'état des centres, qui se comportent comme une mémoire à quatre états. Je démontrerais ainsi que les transporteurs d'électron impliqués dans la décomposition de l'eau étaient le siège de processus d'accumulation de charges. Kok et ses collaborateurs ont alors proposé un mécanisme, maintenant universellement accepté, suivant lequel la décomposition de l'eau implique, au niveau des donneurs d'électron appartenant à un même centre photochimique, l'accumulation séquentielle de quatre charges positives ou de quatre radicaux oxydants. Dans ce modèle, les espèces oxydantes hautement réactives formées lors de la réaction photochimique sont stockées et stabilisées dans un environnement protéique, et donc protégées du milieu extérieur. L'ensemble des réactions conduisant à la formation d'oxygène n'implique donc aucun mouvement moléculaire et se déroule dans des conditions proches de l'état solide.

La dernière révolution conceptuelle qui a marqué notre compréhension du processus photosynthétique — et d'une manière plus générale de l'ensemble de la bioénergétique — est l'œuvre de Mitchell qui, en 1960, propose la théorie chemiosmotique. On savait depuis plusieurs années que les transferts d'électron dans les chaînes respiratoires induisaient la synthèse d'adénosine triphosphate ou ATP, vecteur universel de l'énergie chez les êtres vivants. En 1954, Arnon et ses collaborateurs montrent que les chloroplastes isolés à partir de plantes supérieures sont susceptibles de synthétiser de l'ATP à la lumière. À cette époque, les seuls mécanismes permettant la synthèse d'ATP faisaient partie intégrante des grands cycles métaboliques tels que, par exemple, la fermentation ou le cycle de Krebs. Pendant de nombreuses années, les biochimistes ont tenté en vain d'identifier les sites où s'effectuait le couplage entre processus de transfert d'électron et synthèse d'ATP. Mitchell propose alors une théorie révolutionnaire dans laquelle il suppose que le couplage fait intervenir une membrane formant un sac fermé, étanche aux ions et dans laquelle sont implantées des protéines transmembranaires incluant les transporteurs d'électrons. Un pompage de proton transmem-

branaire est associé aux transferts d'électrons se produisant dans les chaînes photosynthétiques ou respiratoires. Ce processus de pompage de proton conduit à une accumulation d'énergie sous la forme d'un gradient de concentration de protons et d'un potentiel électrique transmembranaire. Sous l'effet des forces électrique et osmotique ainsi créées, les protons traversent la membrane en sens inverse au niveau d'un second type de pompe, l'ATP-synthase où s'effectue la synthèse d'ATP. Le gradient électrochimique de protons représente une forme d'énergie délocalisée sur l'ensemble de la membrane et le couplage chemiosmotique ne nécessite aucun contact direct entre les pompes à proton associées à la chaîne de transfert d'électron et les ATP-synthases. La théorie chemiosmotique provoque un véritable séisme dans la communauté scientifique, peu disposée à accepter un mode de couplage n'impliquant pas d'interactions à courte distance et ne présentant aucun des caractères de spécificité que partagent toutes les réactions enzymatiques connues. Dans le cas de l'appareil photosynthétique, il ne faut que quelques années pour que la validité de la théorie chemiosmotique soit clairement démontrée, l'ensemble de ces prédictions étant vérifié par l'expérience. Cette théorie mettra cependant plus de dix ans à s'imposer à l'ensemble de la communauté scientifique.

La mise en place des principaux concepts fondateurs de la bioénergétique, suivie de peu par les progrès spectaculaires de la biologie structurale, permettra dans les années 1970, d'aborder, au niveau moléculaire, l'analyse des mécanismes réactionnels impliqués dans les processus photosynthétiques et respiratoires.

La dernière partie du cours a été consacrée à parcourir certains aspects des recherches que j'ai poursuivies pendant près de 50 ans à l'Institut de Biologie Physico-chimique. La ligne de recherche à laquelle j'ai consacré l'essentiel de mes travaux a porté sur l'élucidation des relations entre organisation supramoléculaire et fonctionnement de l'appareil photosynthétique. J'ai toujours tenté de déduire des informations structurales à une échelle supramoléculaire à partir d'une analyse fonctionnelle, démarche inverse de celle la plus souvent poursuivie, qui procède au contraire de la structure vers la fonction. Lorsque l'on s'intéresse aux structures complexes, caractéristiques des systèmes enzymatiques intégrés, on ne dispose d'aucune technique permettant d'atteindre une résolution spatiale comparable à celle atteinte par les méthodes cristallographiques. Les édifices supramoléculaires mettent le plus souvent en jeu de faibles forces de liaison et sont facilement dissociés lors de la préparation d'échantillons. Il devient alors indispensable d'avoir accès à des informations structurales, mêmes imprécises, sur des objets biologiques intacts, c'est-à-dire *in vivo*. J'ai ainsi consacré une part importante de mon activité scientifique à développer de nombreuses méthodes biophysiques originales présentant une sensibilité suffisante pour analyser, *in vivo*, les propriétés fonctionnelles de l'appareil photosynthétique. Cet effort d'ordre technologique m'a permis de faire progresser nos connaissances quant à l'organisation supramoléculaire de ce système enzymatique intégré particulièrement complexe.

## SÉMINAIRES

Roberto BASSI (Vérone, Italie) : « Stress signal transduction by xanthophylls in higher plant chloroplasts ».

Stanislaw KARPINSKI (Umea, Suède) : « Photosynthetic control of cell death and biotic stress defenses in *Arabidopsis thaliana* leaves ».

Rafael PICOREL (Zaragoza, Espagne) : « PSII and adaptation to environmental stress ».

Imre VASS (Szeged, Hongrie) : « Light-induced stress in the photosynthetic apparatus ».

Jim BARBER (London, Grande Bretagne) : « Discovery of a new type of antenna system in oxyphotobacteria ».

Rienk VAN GRONDELLE (Amsterdam, Pays-Bas) : « Early events in plant light-harvesting ».

Yiannis DELIGIANNAKIS (Agrinio, Grèce) : « Pulsed EPR Study of Quinone-Aminoacid Interactions in New Biomimetic Materials ».

Stenbjörn STYRING (Lund, Suède) : « EPR studies of natural and artificial photosynthesis ».

Eva-Mari ARO (Turku, Finlande) : « Synthesis, assembly and turnover of photosystem II subunits ».

Andrea MELANDRI (Bologne, Italie) : « The distribution of ATP synthase in chromatophore populations and problems related to the analysis of ionic fluxes through site-specific mutant of the ATP synthase ».

Colin ROBINSON (Warwick, Grande Bretagne) : « Distinct pathways for the targeting of thylakoid membrane proteins ».

Henrik SCHELLER (Copenhague, Danemark) : « Molecular dissection of photosystem I function ».

Sacha BAGINSKY (Zurich, Suisse) : « From protein to function : the chloroplast proteome network ».

Zach ADAM (Rehovot, Israël) : « Few enzymes, many genes — On the diversity of chloroplast proteases ».

Jean-David ROCHAIX (Genève, Suisse) : « Genetic dissection of state transition in *Chlamydomonas reinhardtii* ».

Bruno ROBERT (CEA Saclay) : « Mécanismes de modulation des propriétés physico-chimiques des chlorophylles par les protéines ».

Fabrice RAPPAPORT (CNRS/IBPC Paris) : « Aspects moléculaires et supramoléculaires des transferts d'électrons dans la chaîne photosynthétique ».

Gilles PELTIER (CEA Cadarache) : « Voies alternatives de transfert d'électrons au cours de la photosynthèse oxygénique ».

Pierre SÉTIF (CEA Saclay) : « Le complexe de transfert d'électron photosystème I/ferrédoxine au vu de la structure cristallographique du photosystème I et de nouvelles données fonctionnelles ».

André VERMEGLIO (CEA Cadarache) : « De la biogenèse du photosystème bactérien à leur fonctionnement en passant par leur organisation supramoléculaire ».

Jacques JOYARD (CEA Grenoble) : « La protéomique comme outil d'analyse fonctionnelle de l'enveloppe des chloroplastes ».

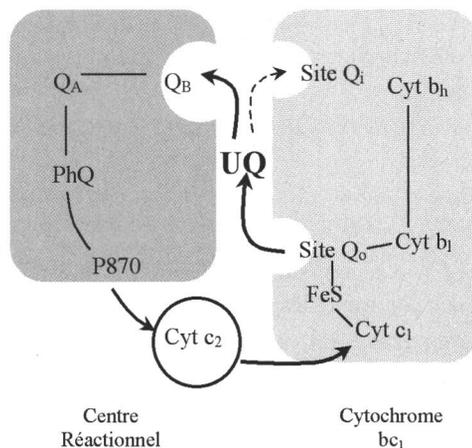
Francis-André WOLLMAN (IBPC Paris) : « *Chlamydomonas* : Un modèle adéquat de la physiologie du chloroplaste et de la photosynthèse ? ».

Francis HARAUX (CEA Saclay) : « L'ATP synthase à protons : mécanisme rotatif et cliquets moléculaires ».

Pierre SEBBAN (CNRS/CGM Gif-sur-Yvette) : « Délocalisation et interdépendance des phénomènes fonctionnels et énergétiques dans les centres réactionnels bactériens ».

ÉTUDE DE L'ORGANISATION DE LA CHAÎNE DE TRANSFERT DES ÉLECTRONS EN PHOTOSYNTÈSE BACTÉRIENNE (*P. Joliot et A. Joliot, en collaboration avec A. Verméglio*)

La membrane photosynthétique bactérienne comporte deux complexes transmembranaires, d'une part, le centre réactionnel où s'effectue la séparation primaire des charges créées par la réaction photochimique et d'autre part, le complexe cytochrome (cyt)  $bc_1$ , comprenant deux cyt  $b$ , le cyt  $c_1$  et une protéine de Rieske (FeS). Ce complexe cyt  $bc_1$ , comme le complexe cyt  $b_6f$  en photosynthèse chlorophyllienne, joue un rôle de relais en catalysant l'oxydation d'une ubiquinone UQ, molécule liposoluble, et la réduction d'un cyt  $c_2$  hydrosoluble (schéma 1).



L'analyse thermodynamique et cinétique des processus de transfert d'électrons sur la bactérie pourpre *Rhodobacter sphaeroides* avait permis à P. Joliot, A. Joliot et A. Verméglio de démontrer que les différents complexes protéiques de la chaîne photosynthétique sont associés pour former un « supercomplexe » comprenant 2 centres réactionnels, 1 complexe cyt  $bc_1$  et 1 molécule de cyt  $c_2$ .

Les mêmes auteurs se sont intéressés à déterminer l'avantage sélectif que présenterait une telle organisation de la chaîne photosynthétique, comparé au cas d'autres bactéries photosynthétiques où les composants de la chaîne sont répartis de façon aléatoire dans les membranes. En premier lieu, il est important de souligner que l'organisation en supercomplexes n'est présente qu'au sein des vésicules intracytoplasmiques (chromatophores) et non au niveau de la membrane cytoplasmique. L'apparition de ces chromatophores est favorisée quand les bactéries sont cultivées en anaérobiose, c'est-à-dire dans les conditions où la lumière est l'unique source d'énergie.

Comme le montre le schéma 1, la majorité des transferts d'électrons s'opère à l'état solide au sein des 2 complexes transmembranaires (centre réactionnel et cyt  $bc_1$ ). Les seuls mouvements moléculaires impliqués concernent le cyt  $c_2$ , qui assure le transfert d'électrons entre le complexe cyt  $bc_1$  et le donneur primaire  $P_{870}$ , et l'ubiquinone, qui assure le transfert d'électrons entre le site  $Q_o$  du complexe cyt  $bc_1$  et le site  $Q_B$  du centre réactionnel. Il est généralement admis que le cyt  $c_2$  diffuse librement dans la phase aqueuse alors que les quinones diffusent dans la phase lipidique de la membrane. Il avait été précédemment établi que le cyt  $c_2$  reste piégé à l'intérieur du supercomplexe. L'absence de processus de diffusion à longue distance se traduit par une augmentation importante de la constante de vitesse du transfert d'électrons entre le cytochrome  $c_1$ , transporteur inclus dans le complexe cyt  $bc_1$  et le donneur primaire des centres réactionnels  $P_{870}$ .

L'étude cinétique des processus de transfert d'électrons au sein des supercomplexes a été reprise en conditions d'anaérobiose stricte à l'aide de la technique spectrophotométrique à basse température décrite dans un précédent rapport. Cette technique permet de suivre sur le même échantillon la formation du potentiel de membrane associé au transfert transmembranaire d'électrons et les variations du rendement de la fluorescence. Il a ainsi été possible de mesurer la vitesse de transfert de l'ubiquinone UQ depuis le site  $Q_o$  appartenant au complexe cyt  $bc_1$  vers le site  $Q_B$  du centre réactionnel. Cette réaction permet la réoxydation de l'accepteur primaire d'électrons  $Q_A$ , assurant ainsi la régénération de la forme active des centres réactionnels. L'état redox de  $Q_A$  a été caractérisé par mesure du rendement de fluorescence (la forme oxydée  $Q_A$  est un « quencheur » de fluorescence) et par mesure spectroscopique du potentiel de membrane induit par un éclair saturant de courte durée. En condition anaérobiose, le pool de quinone est majoritairement réduit et les seules quinones oxydées disponibles sont produites au site  $Q_o$ . L'analyse cinétique de la réoxydation de  $Q_A$  montre que le transfert d'ubiquinone du site  $Q_o$  au site  $Q_B$  est un processus extrêmement rapide

(< quelques millisecondes). Une telle vitesse de transfert est incompatible avec un processus impliquant une libre diffusion de la quinone produite au site  $Q_o$  dans l'ensemble de la membrane. Ces résultats conduisent à supposer que l'ubiquinone reste piégée dans le supercomplexe. Au contraire, lorsque l'ubiquinone est présente à faible concentration dans la membrane et en l'absence de production de UQ au site  $Q_o$ , la réoxydation de l'accepteur  $Q_A$  se produit dans un domaine de plusieurs centaines de ms. L'organisation en supercomplexe permet ainsi d'accélérer de deux ordres de grandeur la vitesse de fonctionnement de la chaîne de transfert d'électrons. Cette forme d'organisation structurale en super-complexes représente ainsi une réponse adaptative efficace aux conditions d'anaérobiose stricte.

#### MODULATION DE LA DIRECTIONNALITÉ DU TRANSFERT D'ÉLECTRON DANS LE PS I

(*M.-G. Lucas, M. Guergova-Kuras, F. Rappaport*, en collaboration avec *K. Redding* (Université d'Alabama))

Tous les centres réactionnels photosynthétiques, siège de la réaction primaire de conversion de l'énergie excitonique en différence de potentiel électrochimique, présentent une remarquable symétrie structurale. En particulier, les différents cofacteurs intervenant dans la séquence de réactions de transfert d'électron, sont disposés selon deux voies, suivant une symétrie axiale, branchées en parallèle à partir du donneur primaire d'électron. Il est possible de distinguer deux grandes familles de centres réactionnels sur la base de la nature chimique de l'accepteur terminal d'électron. Dans les centres de type II, les études biophysiques ont montré que cette symétrie structurale n'est pas respectée au niveau fonctionnel : une seule des deux voies est active pour le transfert d'électron. Au contraire, dans les centres de type I (comme le photosystème I) les deux voies sont actives. Cette découverte récente renouvelle considérablement le champ d'étude des réactions de transfert d'électron dans les systèmes biologiques en ouvrant la possibilité de caractériser les paramètres physico-chimiques gouvernant l'efficacité relative de deux voies de transfert d'électron branchées en parallèle. La mutagenèse dirigée s'est avérée un outil de choix pour modifier de façon extrêmement ponctuelle les propriétés physico-chimiques (force des liaisons hydrogènes avec la protéine, potentiel redox, environnement électrostatique etc.) des cofacteurs impliqués dans des réactions de transfert d'électron. La combinaison de cette approche et de techniques spectroscopiques, développées au laboratoire, alliant haute résolution temporelle (5 ns) et extrême sensibilité (rapport signal sur bruit de  $10^6$ ) doit permettre de disséquer les étapes successives de transfert d'électron dans le photosystème I et d'identifier les paramètres contrôlant l'efficacité relative des deux branches.

Les travaux précédemment menés au laboratoire ont permis d'étayer le modèle bidirectionnel. La séquence de réaction de transfert d'électron est la suivante : la capture d'un photon permet de peupler l'état excité d'un dimère de chloro-

phylle  $P_{700}$ . Cet état excité est oxydé par une chlorophylle (noté  $A_0$ ), elle-même réoxydée par une phylloquinone (PhyQ). Enfin, l'électron est transféré par une série de centre FeS jusqu'à un accepteur soluble : la ferrédoxine. Il se trouve que la réoxydation des phylloquinones est biphasique. Pierre Joliot et Anne Joliot avaient proposé que chacune des deux phases cinétiques correspondait à la réoxydation de l'une des deux phylloquinones. L'étude de mutants ponctuels du photosystème I d'un tryptophane en interaction avec l'une ou l'autre des deux phylloquinones a permis de confirmer ce modèle. De plus, en attribuant à chacune des deux phylloquinones une constante de vitesse spécifique de sa réoxydation, cette étude a permis la caractérisation d'un marqueur de l'efficacité relative des deux voies de transfert d'électron. Sur la base de ces résultats, nous avons, en collaboration avec Kevin Redding, entrepris l'étude de mutants ponctuels du photosystème I à des positions situées en amont des phylloquinones de façon à identifier la ou les étapes contrôlant la bidirectionnalité. Nos résultats montrent d'une part qu'il est en effet possible de moduler l'efficacité relative des deux voies de transfert d'électron, et d'autre part qu'un des paramètres déterminant est le potentiel redox de  $A_0$ .

#### COMMUTATION ENTRE MODES DE TRANSFERT D'ÉLECTRON LINÉAIRE ET CYCLIQUE LORS DE LA MIGRATION LATÉRALE DES ANTENNES (*G. Finazzi, F. Rappaport*)

On distingue deux domaines dans la membrane du thylakoïde : le domaine granulaire constitué d'empilements membranaires et le domaine lamellaire. Il se trouve que le photosystème II (PS II) est situé exclusivement dans le domaine granulaire, alors que le photosystème I (PS I) est localisé dans les domaines lamellaires. Ce simple constat soulève la question de la connexion entre ces deux complexes. Le cytochrome  $b_6f$  qui permet l'oxydation des plastoquinols réduits par le PS II et la réduction de la plastocyanine oxydée par le PS I joue certainement un rôle pivot dans le transfert d'électron entre ces deux domaines. Des études conduites sur des algues unicellulaires (*Chlamydomonas reinhardtii*) suggèrent que le complexe  $b_6f$  est susceptible de migrer latéralement dans la membrane du thylakoïde. On distingue donc deux situations : i) la situation « linéaire » où les deux photosystèmes fonctionnent à des vitesses similaires car soumis à un flux lumineux identique, dans ce cas le complexe  $b_6f$  est équiréparti ; ii) la situation cyclique où seul le PS I fonctionne, dans ce cas le complexe  $b_6f$  est majoritairement présent dans les régions lamellaires, en association privilégiée avec le PS I. Ces deux modes de fonctionnement diffèrent fondamentalement par leurs conséquences métaboliques : la photosynthèse linéaire autorise l'accumulation d'ATP et de pouvoir réducteur et, par conséquent, la synthèse de biomasse. Elle permet donc l'injection d'énergie dans le cycle de la biosphère. La photosynthèse cyclique ne permet, elle, que la seule synthèse d'ATP au bénéfice principal de l'organisme photosynthétique. La transition de l'un à l'autre de ces deux modes de fonctionnement apparaît donc comme un mode de régulation métabolique essentiel. Ces deux modes de transfert d'électron diffèrent, entre

autres, par le devenir des équivalents réducteurs produits par le PS I. Dans le cas linéaire, ils alimentent le cycle de Calvin, dans l'autre ils sont « réinjectés » dans le cytochrome  $b_6f$ . Selon toute vraisemblance, cette dernière configuration suppose une association particulière entre le PS I et le cytochrome  $b_6f$  médiée par les protéines solubles réduites par le PS I. Les protéines antennes LHCI peuvent également voir leur distribution latérale changer selon les conditions physiologiques (on parle de transition d'état). En aérobiose, elles sont majoritairement associées au PS II alors qu'en aérobiose elles « alimentent » le PS I. Des résultats récents obtenus par Giovanni Finazzi avaient permis de montrer qu'en anaérobiose, le PS II est essentiellement inactif. Pour autant, le cytochrome f n'est que partiellement oxydé lors d'une illumination continue. Ce résultat montre l'existence d'une autre source d'électron que la photochimie réalisée par le PS II, permettant de maintenir le cytochrome f dans un état semi oxydé. Nous avons pu montrer que cette source est vraisemblablement le PS I impliqué dans un mode de transfert d'électron cyclique. De plus, la commutation entre transfert linéaire et cyclique ferait intervenir la migration latérale des antennes plutôt que le cytochrome  $b_6f$ . En effet, la comparaison de l'activité des différents complexes de la chaîne photosynthétique dans des souches mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii* dans lesquelles ces différentes migrations sont inhibées a permis d'établir une forte corrélation entre migration latérale des antennes et mise en place du mode de transfert d'électron cyclique.

#### L'ORIGINE DE L'AMORTISSEMENT DES OSCILLATIONS PÉRIODE 4

DANS LE FONCTIONNEMENT DU SYSTÈME DE DÉCOMPOSITION DE L'EAU

(A. Cuni, J. Lavergne (CEA de Cadarache), R. Sayre (Université d'Ohio) & F. Rappaport)

Le fonctionnement du système de décomposition de l'eau en oxygène tel qu'il a été décrit par Kok fait intervenir 5 états d'oxydation (états  $S_{1,0-4}$ ). La réaction photochimique primaire permet l'incrémentation du nombre d'oxydation du centre catalytique, autorisant ainsi l'accumulation des quatre équivalents oxydés nécessaires à la décomposition de deux molécules d'eau en oxygène. Ce n'est donc qu'après quatre actes photochimiques qu'a lieu l'oxydation de l'eau. Lors d'une illumination par une séquence d'éclairs courts et saturants, on observe que ce fonctionnement périodique subit un amortissement. Cet amortissement traduit la probabilité  $\alpha$  pour un centre PS II de ne pas incrémenter les états S lorsque soumis à un éclair court et saturant. Ce paramètre  $\alpha$ , les « ratés », implique que deux processus entrent en compétition après la séparation de charges photochimiques : la stabilisation de cet état (permettant d'incrémenter les états S) d'une part, et la recombinaison de charges d'autre part. Il s'agit d'identifier les étapes où cette compétition est la plus critique. Nous avons montré que les ratés augmentent en présence d'un champ électrique transmembranaire. Ceci suggère que la ou les étapes à l'origine des ratés fait intervenir des transferts d'électrons participant à l'établissement du champ électrique transmembranaire. Par ailleurs,

nous avons étudié les ratés sur des mutants de PS II de *Chlamydomonas reinhardtii*, dans lesquels le résidu 130 du polypeptide D<sub>1</sub> impliqué dans une liaison hydrogène avec la phéophytine a été substitué. Cette mutation, conformément aux résultats précédemment obtenus chez *Synechocystis*, modifie le potentiel redox de la phéophytine et résulte en un ralentissement significatif de la vitesse de recombinaison de charges entre P<sup>+</sup> et Q<sub>A</sub><sup>-</sup>. Paradoxalement, plus la vitesse de recombinaison P<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup> est lente, plus les ratés sont importants. Ceci suggère que l'étape déterminant les ratés concerne un état du centre PS II précédant la formation de P<sup>+</sup>Q<sub>A</sub><sup>-</sup>. On peut proposer, sur cette base, que la recombinaison P<sup>+</sup>Pheo<sup>-</sup> soit essentiellement responsable des ratés. Cependant, la vitesse de cette réaction est de l'ordre d'un dizaine de ns. On s'attendrait alors que les ratés augmentent si l'on utilise des éclairs plus courts (5ns à mi-hauteur) plutôt que plus longs (quelques μs) que la durée de vie de P<sup>+</sup>Pheo<sup>-</sup>. Il n'en est rien, bien au contraire. Cela conduit à proposer que la recombinaison produit transitoirement un état photochimiquement incompetent, dont la durée de vie est supérieure à quelques μs. Un bon candidat est l'état P<sup>T</sup> que l'on sait pouvoir être formé par recombinaison de charge de l'état P<sup>+</sup>Pheo<sup>-</sup> triplet.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DE POMPAGE DES PROTONS COUPLÉE AUX VARIATIONS REDOX CHEZ L'ALGUE VERTE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* (G. Finazzi)

La dépendance en fonction du pH de l'activité catalytique du cytochrome *b<sub>6</sub>f* a été mesurée sur cellules entières de l'algue verte *Chlamydomonas* dans une gamme 5-8. Aux pH acides, les réactions se produisant sur le côté lumenal du complexe (réduction du cytochrome *b<sub>6</sub>* et *f*) sont ralenties. La vitesse et l'amplitude de la réaction électrogénique lente (phase b), reflétant entre autres le transfert d'électron transmembranaire dans le complexe *b<sub>6</sub>f*, sont également modifiées. Pour autant, une mesure directe de ce transfert, par la cinétique d'oxydation du cytochrome *b<sub>6</sub>*, ne révèle aucune sensibilité au pH. Ceci suggère qu'une fraction substantielle de l'électrogénicité associée à la catalyse du cytochrome *b<sub>6</sub>f* n'est pas due au seul transfert d'électron entre les hèmes *b<sub>6</sub>*, mais également à un mouvement de charge, déclenché par l'oxydation du plastoquinol sur le côté lumenal du complexe. Ce résultat confirme le modèle d'une pompe à proton couplée aux variations redox du cycle catalytique du complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f*.

La dépendance en fonction du pH de l'activité du cytochrome *b<sub>6</sub>f* a été également mesurée dans deux souches mutantes, où le glutamique 78 de la séquence PEWY de la sous-unité IV (très conservée évolutivement dans les complexes *bc<sub>1</sub>* ou *b<sub>6</sub>f*) a été substitué par un résidu basique (E78K) ou polaire (E78Q). La comparaison des deux souches avec le type sauvage a indiqué que le résidu E78 joue un rôle essentiel dans l'oxydation du plastoquinol à pH acide, alors qu'il n'est pas requis pour une activité efficace à pH neutre. Sa participation dans la modulation de l'activité de pompage de proton couplée aux variations redox a été également montrée.

RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES CHLOROPLASTIQUES  
ET BIOGENÈSE DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE :

LE CONTRÔLE PAR ÉPISTASIE DE SYNTHÈSE (*Y. Choquet, D. Drapier, J. Girard-Bascou, R. Kuras, L. Minai, B. Rimbaud, K. Wostrickoff, F.-A. Wollman*)

Les complexes de la membrane photosynthétique des chloroplastes sont des édifices macromoléculaires multimériques, d'origine génétique mixte. Ils comportent des sous-unités codées par le génome de l'organite associées en proportion stœchiométrique à des sous-unités codées par le génome nucléaire. La biogenèse des complexes photosynthétiques requiert donc la coopération des génomes nucléaires et de l'organite. Comprendre quels mécanismes assurent la coopération de ces deux génomes et la production stœchiométrique de sous-unités codées par des compartiments génétiques différents en vue de leur assemblage au sein d'un complexe fonctionnel est une question majeure dans l'étude de la biogenèse des organites.

L'analyse de mutants photosynthétiques, réalisée principalement chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, a montré que l'accumulation des sous-unités d'un même complexe est un phénomène concerté. En l'absence de l'un quelconque des polypeptides d'un complexe, l'accumulation stationnaire de l'ensemble de ses sous-unités est réduite. Le plus souvent, cette accumulation concertée résulte d'une dégradation protéolytique rapide des polypeptides non assemblés reconnus comme cibles par les protéases du chloroplaste : par exemple, les taux de synthèse de la sous-unité IV et du cytochrome  $b_6$ , sous-unités du complexe cytochrome  $b_6f$ , ne sont pas affectés dans des mutants déficients pour l'expression d'une autre sous-unité du complexe, mais leur demi-vie est alors extrêmement réduite par rapport à la souche sauvage.

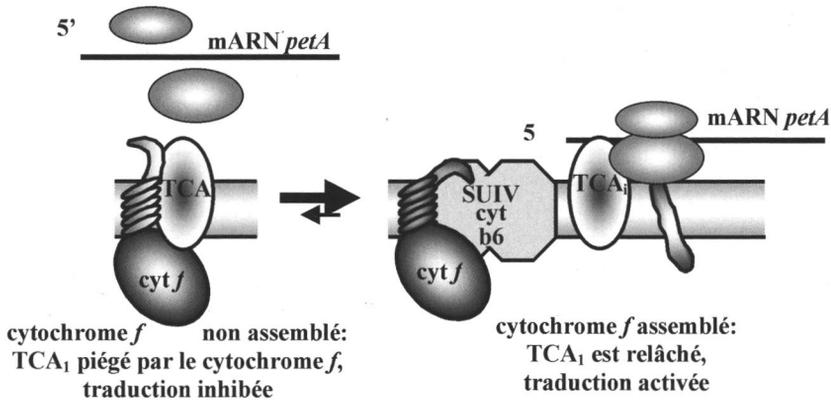
Toutefois, certaines protéines de la membrane photosynthétique, toutes codées par le génome chloroplastique, se comportent différemment. Leur taux de synthèse et non pas leur stabilité est réduit lorsqu'elle ne peuvent s'assembler au sein d'un complexe. Ce phénomène, mis en évidence dans le laboratoire, est appelé **Contrôle par Épistasie de Synthèse** ou processus **CES**. Les polypeptides **CES** dépendent donc de la présence de certaines sous-unités dites protéines « dominantes », requises pour l'assemblage du complexe, pour être traduits de façon conséquente.

*L'exemple du cytochrome  $f$ , sous-unité CES du complexe cytochrome  $b_6f$*

Nous avons étudié le rôle du processus **CES** au cours de la biogenèse du cytochrome  $f$ , sous-unité **CES** du complexe cytochrome  $b_6f$ . En absence d'autres sous-unités dominantes du complexe comme la sous-unité IV ou le cytochrome  $b_6$ , son taux de synthèse est réduit à 10 % du taux de synthèse observé dans le sauvage, mais le cytochrome  $f$ , synthétisé dans ces souches mutantes, s'insère de façon stable dans la membrane du thylakoïde où il s'accumule : le cytochrome  $f$  non assemblé n'est pas une cible pour les protéases chloroplastiques.

La synthèse de la protéine *CES* cytochrome *f* est donc contrôlée par l'assemblage du complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f*. Au niveau moléculaire nous avons montré que le processus *CES* repose sur une **autorégulation de l'initiation** de la traduction du messager du gène *petA*, codant le cytochrome *f* (figure 1).

Cette régulation a pour cible l'extrémité 5' non traduite du gène *petA* (*petA* 5'NT). L'extrémité Carboxy-terminale du cytochrome *f* **non assemblé** comporte un motif répresseur protéique, capable, lorsqu'il s'accumule, d'inhiber la traduction du messager du gène *petA*. La caractérisation de ce motif répresseur, comportant des résidus enfouis dans la membrane, indique que son interaction avec l'extrémité 5' NT du gène *petA* est indirecte : elle ferait intervenir le produit du gène nucléaire *TCA1*, un facteur spécifiquement requis pour la traduction du messager du gène chloroplastique *petA*, identifié au laboratoire. Le facteur *TCA1*, piégé par le motif répresseur porté par le cytochrome *f* non assemblé, ne serait pas disponible pour activer la traduction. Au cours de l'assemblage du cytochrome *f* au sein du complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f*, il serait relâché, son site de fixation étant masqué par les autres sous-unités, et deviendrait disponible pour la traduction du messager du gène *petA*.



### Généralité du processus *CES*

Les études menées sur des mutants photosynthétiques de *C. reinhardtii* ont montré l'existence d'au moins une sous-unité *CES* dans chaque complexe majeur de la membrane photosynthétique (photosystèmes I et II, complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f* et ATP synthétase).

Par exemple, le taux de traduction de la sous-unité  $\alpha$  du complexe ATP synthétase est très réduit dans les souches mutantes incapables d'exprimer la sous-unité  $\beta$ , qui est donc dominante par rapport à  $\alpha$ .

Au sein du complexe photosystème I, l'apoprotéine du CPI, PsaA, est une sous-unité *CES*, dont la synthèse n'est pratiquement plus détectable dans des

mutants déficients pour l'expression de l'autre apoprotéine du CPI, PsaB. De plus, dans des souches déficientes pour l'expression des sous-unités PsaA ou PsaB, la traduction de PsaC, autre sous-unité du complexe photosystème I codée par le génome chloroplastique, est réduite.

Dans des mutants où la protéine D1 du cœur du photosystème II est absente, la protéine CP47 de l'antenne interne du photosystème est synthétisée en quantité très réduite tandis que l'absence de la protéine « cœur » D2 entraîne une synthèse réduite des polypeptides D1 et CP47.

Nous avons montré que le mécanisme moléculaire que nous avons décrit pour le contrôle par épistasie de la synthèse de l'expression du cytochrome *f* pouvait être transposé aux autres protéines *CES* du chloroplaste. La réduction de la synthèse de la sous-unité  $\alpha$  du complexe ATP synthétase, des sous-unités PsaA et PsaC du photosystème I et des polypeptides D1 et CP47 du photosystème II en absence des sous-unités dominantes correspondantes, résulte pour chaque protéine d'une régulation de l'initiation de la traduction gouvernée par l'extrémité 5' non traduite de son messenger. Lorsqu'elles ne sont pas assemblées, les sous-unités *CES* des photosystèmes I et II exercent un rétrocontrôle négatif sur l'initiation de leur propre traduction, probablement via un signal protéique répresseur, masqué au cours de l'assemblage du complexe. Ce mécanisme de contrôle de l'expression des protéines chloroplastiques par auto régulation de l'initiation de la traduction semble donc assez général. Par ailleurs, des sous-unités *CES* pourraient également être présentes dans les chloroplastes des végétaux supérieurs et dans la mitochondrie de levure.

#### *Processus CES et assemblage des complexes photosynthétiques*

La biogenèse du photosystème I implique donc une « cascade épistatique », où la présence de la sous-unité dominante PsaB gouverne l'expression de la sous-unité *CES* PsaA, elle-même requise pour la traduction de la sous-unité PsaC. Une « cascade épistatique » intervient également dans la biogenèse du photosystème II, la présence de la sous-unité D2 étant nécessaire pour la synthèse du polypeptide D1, qui, à son tour, est requis pour la synthèse du polypeptide CP47. L'expression des polypeptides d'un même complexe est donc hiérarchisée.

L'assemblage des édifices multimériques complexes que sont les complexes photosystèmes I et II se fait de façon séquentielle et ordonnée par adjonction successive de sous-unités à des précomplexes intermédiaires. Il est frappant de constater combien la hiérarchie épistatique des synthèses ( $D2 > D1 > CP47$  ;  $PsaB > PsaA > PsaC$ ) reflète l'ordre de ces étapes d'assemblage séquentiel. Le processus *CES* pourrait représenter un moyen pour faciliter la succession de ces différentes étapes et les favoriser par rapport au processus en compétition de dégradation des sous-unités non assemblées.

QUELLES SONT LES ÉTAPES LIMITANTES DANS L'EXPRESSION  
DU GÉNOME CHLOROPLASTIQUE ? RELATIONS ENTRE NOMBRE DE COPIES DU GÉNOME,  
TRANSCRIPTION, TAUX D'ACCUMULATION ET TAUX DE TRADUCTION DES ARNm  
DANS LE CHLOROPLASTE DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*  
(S. Eberhard, D. Drapier et F.-A. Wollman)

Les chloroplastes dérivent de cyanobactéries ayant été intégrées dans une cellule eucaryote par endosymbiose. De ce fait, ces organites possèdent leur propre génome, bien que de nombreux gènes aient été transférés du plaste vers le génome nucléaire au cours de l'évolution. Les différents complexes protéiques multimériques composant la chaîne photosynthétique thylakoidale sont quant à eux composés en partie de sous-unités codées par le génome chloroplastique et en partie de sous-unités codées par le génome nucléaire, les partenaires s'assemblant la plupart du temps dans une stœchiométrie 1:1. Le génome chloroplastique étant fortement polyploïde (jusqu'à 100 copies d'un génome circulaire), alors que le génome nucléaire est haploïde chez *Chlamydomonas reinhardtii*, se pose le problème de la production en quantités stœchiométriques des sous-unités codées par le chloroplaste, afin d'éviter l'accumulation de sous-unités non assemblées, *a priori* imaginable du fait de ce déséquilibre génique important.

Notre travail vise, entre autres, à établir clairement dans le chloroplaste de *Chlamydomonas reinhardtii* les relations quantitatives entre le nombre de copies du génome, le taux de transcription, le taux d'accumulation des ARNm et leur taux de traduction. Dans un premier temps, nous avons montré que le nombre de copies du génome chloroplastique n'était pas un facteur limitant pour son expression. Effectivement, une réduction importante du nombre de copies de ce génome à l'aide d'une drogue (la 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine) s'accompagne d'une baisse drastique du taux de transcription chloroplastique, mais reste néanmoins sans effets majeurs sur les taux d'accumulation d'ARNm chloroplastiques codant pour des sous-unités des différents complexes photosynthétiques. Cela suggère que ces taux d'accumulations sont imposés à un niveau post-transcriptionnel par des facteurs régulateurs codés par le noyau et présents en quantité limitante, et non par le taux de transcription dans le chloroplaste. De plus, pour les deux seuls gènes pour lesquels nous avons observé une baisse de la quantité d'ARNm accumulée après une réduction du génome chloroplastique (sur 10 gènes analysés), cette baisse n'était pas corrélée à une baisse de leur taux de traduction respectifs, ceux-ci restant invariants au cours de l'expérience. Ce résultat suggère quant à lui, que le taux de transcrits accumulés dans le chloroplaste n'est pas limitant pour leur taux de traduction, au moins pour ces deux gènes. Afin de voir si ce résultat pouvait être généralisé à d'autres gènes, nous avons dans un deuxième temps étudié les relations entre les taux d'accumulation des ARNm chloroplastiques et leurs taux de traduction. Pour ce faire, nous avons utilisé la rifampicine qui permet d'inhiber totalement la transcription chloroplastique, mais qui est sans effets sur la transcription nucléaire et mitochondriale. Après plusieurs heures de traitement, les taux d'accumulations de différents ARNm chloroplas-

tiques se sont dramatiquement affaiblis, conformément à ce que l'on pouvait attendre en inhibant la transcription de ce génome. De fait, nous n'avons observé aucune corrélation entre les taux d'accumulations résiduels des différents ARNm et leur taux de traduction. Dans la grande majorité des cas, une baisse très importante du taux d'ARNm accumulé n'était pas accompagné par des changements significatifs dans les taux de traduction correspondants. Ce résultat suggère, comme pour les manipulations précédemment décrites, que les étapes majeures de régulation de l'expression du génome chloroplastique se situent à un niveau post-transcriptionnel et traductionnel. Ainsi, ce n'est pas le taux d'accumulation des différents ARNm chloroplastiques qui impose leur taux de traduction, mais la présence de facteurs protéiques codés par le noyau et qui interviennent dans l'activation traductionnelle d'un sous-ensemble des ARNm chloroplastiques disponibles. Nous avons par ailleurs montré que les conditions de culture de *Chlamydomonas reinhardtii* avaient un effet majeur sur la stabilité des ARNm chloroplastiques et sur leur taux d'activation traductionnelle. Ainsi, les transcrits chloroplastiques se sont avérés être significativement moins stables en conditions phototrophes de culture (avec comme unique source d'énergie et de carbone de la lumière et du CO<sub>2</sub>(g)) que dans des conditions mixotrophes (présence d'acétate dans le milieu de culture qui peut être directement utilisé par *Chlamydomonas* comme source de carbone réduit). De plus, pour une quantité comparable d'ARNm disponible dans les deux conditions de culture, nous avons observé des différences au niveau du taux de traduction de plusieurs ARNm, reflétant l'activité différentielle des facteurs régulateurs d'origine nucléaire en fonction du métabolisme carboné de *Chlamydomonas*.

Pour tenter d'étendre ces résultats à l'ensemble des gènes chloroplastiques (i.e. stabilité des ARNm dans différentes conditions de culture et recherche de mutants affectés dans leur métabolisme), une collaboration est en cours avec le laboratoire de David B. Stern (Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, New-York State, USA). Nous avons reproduit les résultats publiés à l'aide d'une approche génomique, utilisant des micropuces à ADN. L'analyse approfondie de l'ensemble des résultats obtenus sur la souche sauvage et plusieurs mutants devraient permettre d'apporter des informations sur le métabolisme des ARNm chloroplastiques.

P. J.

#### PUBLICATIONS

P. BENNOUN. « Chlororespiration and the process of carotenoid biosynthesis ». *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, **1506**, 133-142.

B.A. SCHLODDER, E. NIXON, P.J. COLEMAN, W.J. F. RAPPAPORT, J. LAVERGNE, W.F.J. VERMAAS & D.A. CHISHOLM. « Site-directed Mutations at D1-His198 and D2-His197 of Photosystem II in *Synechocystis* 6803 : Sites of primary charge

separation and cation and triplet stabilization ». *Biochemistry*, 2001, **40**, 9265-9280.

W. MAJERAN, J. OLIVE, D. DRAPIER, O. VALLON & F.-A. WOLLMAN. « The light sensitivity synthase mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Plant Physiol.* 2001, **126**, 421-433.

M. SCHRODA, O. VALLON, J.P. WHITELEGGE, C.F. BECK & F.-A. WOLLMAN. « The chloroplastic GrpE homolog of *Chlamydomonas* : two isoforms generated by differential splicing ». *Plant Cell*, 2001, **13**, 2823-2839.

I. MOYA, M. SILVESTRI, O. VALLON, G. CINQUE & R. BASSI. « Time-resolved fluorescence analysis of the photosystem II antenna proteins in detergent micelles and liposomes ». *Biochemistry*, 2001, **40**, 12552-12561.

J.A. RAVEN & J. GIRARD-BASCOU. « Algal model systems and the elucidation of photosynthetic metabolism ». *J. Physiol.* 2001, **37**, 943-950.

K. WOSTRIKOFF, Y. CHOQUET, F.-A. WOLLMAN, & J. GIRARD-BASCOU. « TCA1, a single nuclear encoded translational activator specific for *petA* mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast ». *Genetics*, 2001, **159**, 119-132.

F.-A. WOLLMAN. « State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus ». *EMBO Journal*, 2001, **20**, 3623-3630.

B.A. DINER, E. SCHLODER, P.J. NIXON, W.J. COLEMAN, F. RAPPAPORT, J. LAVERGNE, W.F.J. VERMAAS and D.A. CHISHOLM. « Site-directed mutations at D1-His198 and D2-His197 of Photosystem II in *Synechocystis* PCC 6803 : Sites of primary charge separation and cation and triplet stabilization ». *Biochemistry*, 2001, **40**, 9265-9280.

V. BORISOV, U. LIEBL, F. RAPPAPORT, J.L. MARTIN, J. ZHANG, R.B. GENNIS, A.A. KONSTANTINOV & M. VOS. « Interactions between heme d and heme b595 in quinol oxidase bd from *Escherichia coli* : a photoselection study using femto-second spectroscopy ». *Biochemistry*, 2002, **41**, 1654-1662.

G. FINAZZI, F. RAPPAPORT, A. FURIA, M. FLEISCHMANN, J.-D. ROCHAIX, F. ZITO and G. FORTI. « Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *EMBO Report*, 2002, **3**, 280-285.

F. ZITO, J. VINH, J.-L. POPOT & G. FINAZZI. « Chimeric Fusions of Subunit IV and PetL in the  $b_f$  complex of *Chlamydomonas reinhardtii* ». *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 12446-12455.

F.-A. WOLLMAN & R. KURAS. « La transformation des chloroplastes ». *Biofutur*, Avril 2002, 41-45.

B.A. DINER & F. RAPPAPORT. « Structure, Dynamics and Energetics of the primary photochemistry of Photosystem II of oxygenic photosynthesis ». *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 2002, **53**, 551-580.

G. FINAZZI. « Redox-coupled proton pumping activity in cytochrome  $b_6f$ , as evidenced by the pH dependence of electron transfer in whole cells of *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Biochemistry*, 2002, **41**, 7475-82.

F. RAPPAPORT, M. GUERGOVA-KURAS, P. NIXON, B.A. DINER & J. LAVERGNE. « Kinetics and pathways of charge recombination in Photosystem II ». *Biochemistry*, 2002, **41**, 8518-27.

S. EBERHARD, D. DRAPIER & F.-A. WOLLMAN. « Searching limiting steps in the expression of chloroplast-encoded proteins : relations between gene copy number, transcription, transcript abundance and translation rate in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Plant J.* 2002, sous presse.

D. DRAPIER, J. GIRARD-BASCOU, D.B. STERN & F.-A. WOLLMAN. « A dominant nuclear mutation in *Chlamydomonas* identifies a factor controlling chloroplast mRNA stability by acting on the coding region of the atpA transcript ». *Plant J.* 2002, **31**, 687-697.

P. JOLIOT & A. JOLIOT. « Cyclic electron transfer in plant leaf ». *PNAS* 2002, **99**, 10209-214.