

Bioénergétique cellulaire

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

Cette année, le cours a porté sur l'étude des mécanismes par lesquels certaines protéines transmembranaires pompent des protons d'une face à l'autre des membranes formant des vésicules fermées. Comme l'a proposé Mitchell, ces pompes jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des appareils membranaires convertisseurs d'énergie (bactéries, mitochondries, chloroplastes). Les pompes membranaires convertissent, d'une manière réversible, différentes formes d'énergie (lumineuse ou chimique) en énergies osmotique et électrique par formation d'un gradient de protons.

La première partie du cours a été consacrée à une analyse théorique du fonctionnement des différents modèles de pompes à protons. Ces pompes ioniques membranaires possèdent un certain nombre de propriétés communes. Elles doivent comporter des sites susceptibles de fixer ou de libérer des ions, sites pouvant être mis en communication avec l'une ou l'autre des faces de la membrane. Dans le cas des pompes à protons, il s'agit de sites protonables qui peuvent être soit des résidus d'acides aminés (acide dicarboxylique par exemple), soit des transporteurs d'électrons dont la forme réduite fixe des ions hydrogène. Les pompes ioniques étant par définition électrogéniques, la protéine comporte obligatoirement une structure spécialisée permettant aux charges positives ou négatives de traverser la membrane. Les pompes ioniques doivent d'autre part posséder des propriétés structurales vectorielles qui permettent d'orienter le flux ionique.

Un certain nombre de pompes à protons jouant un rôle essentiel dans les processus photosynthétique et respiratoire fonctionnent suivant le modèle de la boucle électrogénique imaginé en 1960 par Mitchell. Le caractère paradoxal de ce mécanisme réside dans le fait que ces pompes ne permettent pas aux ions hydrogène de traverser la membrane. Le processus de pompage de protons est réalisé en faisant circuler un flux de molécules non chargées,

porteuses d'atomes d'hydrogène, d'une face à l'autre de la membrane et, à contre-courant un flux d'électrons cheminant dans la membrane à travers une chaîne de transfert d'électrons. Le bilan global d'un tel processus se traduit par la disparition d'ions hydrogène sur une face de la membrane et la libération d'ions hydrogène sur l'autre face, les charges et les atomes neutres d'hydrogène ayant traversé la membrane au cours de deux processus indépendants et séparés dans le temps. Les transferts d'électrons s'effectuent par une suite de sauts discrets le long d'une chaîne de transporteurs d'électrons immobilisés dans la protéine transmembranaire. Au contraire, le mouvement des molécules électriquement neutres (eau ou hydroquinones) se produit à l'extérieur de la protéine, ces molécules diffusant librement dans la phase lipidique que constitue la membrane. Le plus souvent, les protons sont fixés ou libérés au niveau de groupes protonables situés à proximité des deux faces de la membrane. Ces sites protonables peuvent cependant être localisés à l'intérieur de la membrane, auquel cas la protéine-pompe comporte une structure particulière (canal à protons) permettant l'échange de protons entre ces sites et les phases aqueuses situées de part et d'autre de la membrane. Les boucles électrogéniques représentent donc un dispositif essentiellement statique n'impliquant pas de changements de conformation de la protéine.

Dans une seconde catégorie de pompes à protons, la membrane est traversée par un flux ionique, ce qui implique obligatoirement l'existence d'un canal à protons permettant à ceux-ci de traverser la zone hydrophobe de la membrane. Ces protéines comportent également un ou plusieurs sites protonables dont le pK peut être modulé par une modification de la charge électrique dans l'environnement de ces groupes. Ces sites protonables échangent des ions hydrogène avec la phase aqueuse par l'intermédiaire des canaux à protons transmembranaires. Dans le cas de pompes couplées à un processus d'oxydo-réduction, le pK des groupes protonables est modulé par les changements d'état d'oxydo-réduction des transporteurs d'électrons implantés à proximité. Dans d'autres cas (ATPase, bactériorhodopsine), c'est un changement de conformation de la protéine qui modifie la position relative des groupes chargés et des sites protonables. Les changements alternatifs des valeurs des pK du ou des groupes protonables permettent à ceux-ci de fixer des protons à partir d'un milieu de pH élevé et de les relâcher dans un milieu de faible pH. Les protéines-pompes doivent obligatoirement comporter un dispositif structural mobile jouant le rôle de la valve d'une pompe hydraulique, dispositif qui oriente le flux de protons dans un sens bien déterminé.

La seconde partie du cours a été consacrée à illustrer les considérations théoriques précédentes en analysant les propriétés structurales et fonctionnelles de différentes pompes à protons jouant un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique de bactéries ou de cellules eucaryotes.

Bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine est une protéine transmembranaire implantée dans la membrane d'une bactérie *Halobacterium halobium*. Cette protéine réalise un couplage direct entre un transfert de protons et une réaction photochimique correspondant à l'isomérisation d'une molécule rétinale. La bactériorhodopsine est certainement l'une des protéines membranaires les mieux connues. Elle ne comporte qu'une seule chaîne polypeptidique dont la séquence en acides aminés a été entièrement élucidée. Ces protéines forment naturellement dans la membrane bactérienne des réseaux cristallins à 2 dimensions qui en font un objet privilégié pour la mise en œuvre de méthodes structurales telles que la microscopie électronique, la diffraction des neutrons et la diffraction des rayons X.

La molécule de bactériorhodopsine est formée de 7 hélices α transmembranaires, le rétinale étant associé à une lysine localisée approximativement au milieu de la membrane. L'illumination de la bactériorhodopsine par un éclair de courte durée induit une séquence de réactions dont chaque étape a pu être caractérisée par des mesures spectroscopiques. L'événement primaire qui se produit dans le domaine de la nanoseconde est une isomérisation du rétinale qui induit un changement de conformation de la protéine. Ce changement de conformation modifie le pK des groupes protonables provoquant une libération de protons sur une face de la membrane suivie d'une fixation des protons prélevés sur l'autre face de la membrane. La mise en œuvre de techniques spectroscopiques telles que l'effet Raman stimulé ou l'absorption dans l'infrarouge et dans l'ultraviolet a permis de déterminer les résidus d'acides aminés dont les propriétés sont perturbées lors du changement de conformation photoinduit de la protéine. Le mécanisme par lequel les protons sont transférés à travers la membrane reste un sujet de controverse. Il semble cependant probable qu'un certain nombre d'acides dicarboxyliques (glutamique, aspartique) joueraient un rôle essentiel dans ces mouvements de protons. Les groupes protonables de ces acides aminés représenteraient des étapes dans le cheminement du proton à travers la protéine.

Cytochrome-oxydase

La cytochrome-oxydase est un complexe formé de nombreux polypeptides qui jouent un rôle-clé dans le processus respiratoire. La cytochrome-oxydase catalyse en effet l'oxydation d'un cytochrome c soluble et la réduction de l'oxygène en eau. Il s'agit d'un édifice protéique très complexe puisqu'il ne comporte pas moins de 8 polypeptides, porteurs de 4 transporteurs d'électrons. Un groupe de 2 transporteurs, le cytochrome a et un atome de cuivre est impliqué dans l'oxydation du cytochrome c soluble alors que le second groupe de transporteurs, le cytochrome a₃ et un second atome de cuivre est impliqué dans le processus de réduction de l'oxygène en eau.

Un pompage de protons se traduisant par l'alcalinisation de la phase aqueuse interne des mitochondries (matrice) est associé au transfert d'électrons à travers la molécule de cytochrome-oxydase. Cependant, une longue controverse s'est développée ces dernières années concernant le rendement du processus de pompage des protons. Tous les auteurs s'accordent pour admettre que les protons impliqués dans le processus de réduction de l'eau sont prélevés dans l'espace intérieur délimité par la membrane (cytoplasme dans le cas des bactéries, matrice dans le cas des mitochondries). Dans la mesure où le cytochrome c qui apporte les électrons nécessaires est situé sur la face externe de ces mêmes membranes, la pompe fonctionne suivant le mécanisme de la boucle électrogénique. Les informations structurales disponibles quant à la localisation du cytochrome a₃ et du cuivre 2 où s'effectue la réduction de l'oxygène, s'accordent cependant pour placer ces deux transporteurs relativement proches de la face externe de la membrane. Les protons nécessaires à la réduction de l'eau doivent donc traverser la protéine sur des distances de plusieurs dizaines d'Å, ce qui suppose l'existence d'une structure spécialisée. L'analyse des variations de pH sur la face externe de la membrane a conduit Wikström et ses collaborateurs à proposer que la cytochrome-oxydase comporte une seconde pompe à protons couplée au changement d'oxydo-réduction du cytochrome a. Le fonctionnement de cette pompe s'accompagnerait du prélèvement d'un proton sur la face interne qui serait ensuite libéré sur la face externe par un processus appartenant à la deuxième classe de mécanismes que nous avons envisagés dans l'exposé théorique. De nombreux arguments expérimentaux sont venus récemment conforter cette hypothèse. L'un des polypeptides (sous-unité III) formant la cytochrome-oxydase semble impliqué d'une manière très spécifique dans le transport de protons entre la face interne et le polypeptide auquel est associé le cytochrome a. Cette sous-unité fixe d'une manière spécifique certains inhibiteurs qui bloquent la pompe à protons correspondante, diminuant d'un facteur 2 le rapport entre le nombre de protons pompés et le nombre d'électrons transférés. Il est intéressant de constater qu'une quantité d'énergie redox considérable est libérée lors des étapes de transfert d'électrons intervenant entre le cytochrome a et l'oxygène. La mise en œuvre de deux processus indépendants de pompe à protons couplés à ces étapes de transfert d'électrons améliore donc le rendement de conversion de l'énergie redox en énergies osmotique et électrique.

Complexes cytochrome b/f et b/c

Le complexe cyt b/f ou b/c est un élément commun à la plupart des appareils membranaires convertisseurs d'énergie (bactéries, bactéries photosynthétiques, mitochondries, chloroplastes). Il catalyse l'oxydation d'une dihydroquinone en solution dans la phase lipidique de la membrane (plasto-

quinone ou ubiquinone) et la réduction de protéines solubles (plastocyanine ou cytochrome c). Ce complexe comporte 2 chaînes de transporteurs d'électrons fonctionnant en parallèle. Une première chaîne est formée de transporteurs de potentiels redox élevés (~ 400 mV) comportant un centre fer-soufre et une molécule de cytochrome. Une seconde chaîne de transporteurs dont le potentiel redox est inférieur à 0 mV comporte 2 molécules de cytochrome b. L'oxydation de la dihydroquinone qui porte deux atomes d'hydrogène s'effectue par une réaction concertée au cours de laquelle un premier électron est transféré à la chaîne haut-potentiel alors que le second électron est transféré à la chaîne bas-potentiel. Cette oxydation de la quinone s'accompagne de la libération de protons sur la face externe dans le cas des membranes bactériennes et mitochondriales ou internes dans le cas des membranes du thylakoïde. Le mécanisme par lequel les molécules de cytochrome b réduites sont réoxydées reste un sujet de controverse. Une première classe de modèles dérivant de l'hypothèse du cycle Q proposée initialement par Mitchell suppose l'intervention de mécanisme du type boucle électrogénique. La réoxydation du cytochrome b s'effectuerait par réduction d'une quinone fixée sur un site proche de la face opposée de celle où s'effectue le processus d'oxydation des quinols déjà décrit. Cette réduction d'une molécule de quinone s'accompagnerait de la fixation de protons prélevés dans l'espace intérieur dans le cas des bactéries ou des mitochondries ou de l'espace extérieur dans le cas des chloroplastes. Une seconde classe de modèle, le cycle b, proposé initialement par Wikström suppose l'intervention d'une véritable pompe à protons couplée au changement d'oxydo-réduction d'un transporteur d'électrons qui pourrait être soit le cytochrome b, soit la plastoquinone elle-même. Ce modèle implique donc l'existence de canaux à protons transmembranaires et d'un dispositif de porte permettant d'orienter correctement le flux de protons. Des résultats récents obtenus dans notre laboratoire suggèrent que ces 2 types de mécanisme coexisteraient à l'intérieur du même complexe.

P.J.

SÉMINAIRES

M^{me} A. PULLMAN (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris), « Apport de la théorie à la compréhension des canaux membranaires ».

M. Y. HENRY (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris), « Les hémoprotéines — approches spectrale et magnétique ».

M. J. CARTAUD (Institut Jacques Monod, Paris), « Etude structurale de quelques protéines membranaires ».

M. J. ZACCAI (Institut Max Von Laue - Paul Langevin, Grenoble), « La diffraction des neutrons : application à l'étude d'une protéine membranaire, la bactériorhodopsine ».

M. J.L. POPOT (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris), « Reconstitution de la membrane pourpre cristalline à partir de fragments purifiés de bactériorhodopsine ».

P^r G. HAUSKA (Université de Regensburg, Allemagne), « Structure and mechanism of the proton pumping cytochrome b6/f complex ».

P^r A. AZZI (Université de Berne, Suisse), « Structure and function of the proton pumping cytochrome c oxidase ».

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

Au cours de l'année 1984, les recherches se sont poursuivies autour de deux thèmes principaux : structure et fonction de l'appareil photosynthétique, génétique et biologique moléculaire du chloroplaste. J'insisterai plus particulièrement sur un nombre limité des thèmes de recherche dont l'étude est développée dans notre laboratoire.

I. — ÉTUDE DU PHOTOSYSTÈME II

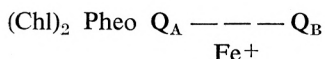
L'analyse des propriétés structurales et fonctionnelles du système photochimique II, complexe protéique impliqué dans le mécanisme de formation d'oxygène, représente l'un des thèmes de recherche majeurs dont l'étude est poursuivie dans notre laboratoire.

A. — *Structure des centres réactionnels du système photochimique II (comparaison avec les centres réactionnels bactériens)*

(B. DINER, C. DE VITRY)

De nombreuses analogies structurales et fonctionnelles existent entre les centres réactionnels du Photosystème II et ceux des bactéries photosynthétiques pourpres. Dans les deux cas une fraction importante de l'énergie lumineuse absorbée est transformée en énergie redox, ce qui se traduit par l'apparition en 200 picosecondes d'une chlorophylle dimérique oxydée (donneur primaire) et d'une semiquinone (accepteur quinonique primaire réduit).

Les deux types de centres comportent une chaîne de transporteurs disposés en série comme l'indique le schéma suivant :



(Chl)₂ : chlorophylle dimérique, donneur primaire ; Phéo : phéophytine ; Q_A : quinone primaire ; Q_B : quinone secondaire.

Les centres réactionnels bactériens sont formés par trois polypeptides appelés H, L et M dont les poids moléculaires sont respectivement de l'ordre de 36, 32 et 28 kilodaltons. Les gènes codant pour ces polypeptides ont été récemment clonés et séquencés, ce qui a permis de déterminer leur structure primaire. Seuls les polypeptides L et M portent les composants redox. Dans un travail antérieur, B. Diner et C. de Vitry ont étudié le mode d'action de certains inhibiteurs qui bloquent le transfert d'électrons entre les quinones Q_A et Q_B. Les inhibiteurs tels que l'atrazine agissent en empêchant la fixation de la quinone Q_B sur le centre réactionnel. En associant à l'un de ces inhibiteurs un groupe photoactivable (azido-atrazine), B. Diner et C. de Vitry ont montré que le site de fixation de l'inhibiteur se trouve principalement sur la sous-unité L. L'existence d'une compétition entre Q_B et l'inhibiteur suggère que la quinone Q_B se fixe également sur la sous-unité L. Récemment, deux polypeptides intrinsèques D1 et D2 associés au Photosystème II et dont les poids moléculaires sont proches de ceux des polypeptides L et M ont été identifiés chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* ainsi que chez les plantes supérieures. Un marquage de photoaffinité avec l'azido-atrazine a permis d'établir que le site de fixation de l'inhibiteur était la protéine D1 qui, de ce point de vue, jouerait un rôle homologue à celui de la protéine L chez les bactéries. Cette conclusion est en accord avec des résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire en collaboration avec le Professeur Rochaix qui avaient permis d'établir que les mutants résistant aux inhibiteurs comportaient un acide aminé substitué appartenant au polypeptide D1. Des homologies importantes concernant une quinzaine de résidus situés au voisinage du résidu 200 existent entre les séquences d'acides aminés des polypeptides D1 et L. L'ensemble de ces résultats suggère donc que D1 et L jouent des rôles analogues dans les deux types de centres réactionnels.

B. Diner et C. de Vitry ont isolé récemment un complexe photoactif du Photosystème II comportant quatre polypeptides, D1, D2, CP3 (qui portent des molécules de chlorophylle) et le cytochrome b559. La région de la structure primaire qui présente de larges homologies entre les protéines D1 et L présente également des homologies avec les séquences de D2 et M. Dans la mesure où il a été démontré que l'ensemble des transporteurs redox des centres bactériens était associé aux polypeptides L et M, il est alors raisonnable de penser qu'il en est de même dans les centres photochimiques II

pour les polypeptides D1 et D2, qui représenteraient alors le cœur du centre photochimique II. Le polypeptide CP3 ne serait alors qu'un élément de l'antenne chlorophyllienne étroitement lié au centre photochimique.

B. — *Identification de l'accepteur secondaire Q400 et rôle du fer associé aux accepteurs quinoniques primaire et secondaire*

Ikegami et Katoh ont mis en évidence la présence d'un transporteur (Q400) qui, dans des conditions fortement oxydantes (> 400 mV), est susceptible d'accepter des électrons du système photochimique II. La réduction de cet accepteur n'est pas affectée par les inhibiteurs qui bloquent le transfert d'électrons entre les accepteurs Q_A et Q_B . Le demi-temps de transfert des électrons entre l'accepteur primaire Q_A^- et l'accepteur Q400 serait de l'ordre de 5 microsecondes (Bowes et Crofts). En collaboration avec V. Pétrouléas (Centre de Recherches Nucléaires Demokritos, Athènes), B. Diner a pu montrer par spectroscopie RPE et par spectroscopie Mossbauer que, comme dans le cas des centres bactériens, un atome de fer était associé aux accepteurs quinoniques primaire et secondaire Q_A et Q_B . L'oxydation de cet atome de fer ferreux en fer ferrique a été observée dans les conditions expérimentales utilisées pour former l'accepteur Q400. Une illumination à 200 °K à une longueur d'onde excitant la réaction photochimique II permet la réduction du fer ferrique en fer ferreux. L'analyse des spectres RPE et Mossbauer en fonction du potentiel redox et les données cinétiques concernant la réduction de Q400 suggèrent donc que l'apparition de l'accepteur Q400 est liée à l'oxydation de l'atome de fer associé aux accepteurs quinoniques Q_A et Q_B .

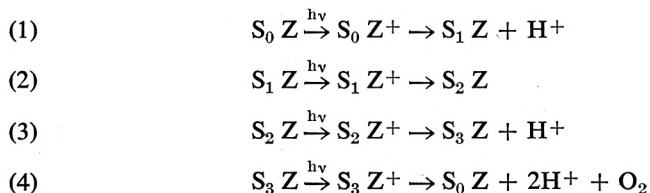
La structure des centres réactionnels bactériens obtenus par diffraction de rayons X (Deisenhefer et Michel) suggère qu'un atome de fer est localisé à égale distance de Q_A et Q_B , la distance entre le fer et les quinones étant égale à 7 Å. Une telle hypothèse est en accord avec les spectres RPE qui montrent que le couplage magnétique avec le fer est du même ordre pour les quinones primaire et secondaire. Le potentiel redox très positif nécessaire pour effectuer la transition fer ferreux-fer ferrique ne permet pas au fer de jouer le rôle d'un transporteur d'électrons dans des conditions normales. Il semble plus probable que la présence du fer facilite le transfert d'électrons entre les deux quinones par un mécanisme qu'il serait nécessaire de préciser.

C. — *Mécanisme de l'émission d'oxygène et transferts d'électrons intervenant au niveau des donneurs du système photochimique II*

(J. LAVERGNE)

J. Lavergne a poursuivi l'étude spectroscopique des réactions intervenant autour du Photosystème II sur un double mutant de *C. Sorokiniana*. Il a en

particulier étudié les signaux associés au côté donneur dans les régions bleue et ultra-violet du spectre. On admet généralement que la chlorophylle P_{680} , donneur primaire du Photosystème II, est associée à un donneur secondaire Z et à l'appareil enzymatique permettant la décomposition de l'eau et la formation d'oxygène. Le schéma suivant fait apparaître les 4 états d'oxydation d'un donneur d'électrons S et les réactions de libération de protons qui sont directement ou indirectement associées au processus de décomposition de l'eau.



Les changements d'absorption associés aux changements d'état d'oxydation de S ont été identifiés dans la région bleue et ultraviolet du spectre. B. Velthuys a suggéré que ce signal apparaissait lors de la réaction (2), restait inchangé dans la réaction (3), était détruit dans l'étape (4) et restait inchangé par la transition (1). Il a supposé qu'un transporteur chargé positivement, L^+ , de longue durée de vie était présent dans les états S_1 et S_2 des centres réactionnels. On voit que si l'on tient compte du cycle de libération des H^+ , l'état redox de L définit la charge nette accumulée par le système : 0 dans les états S_0 , S_1 (état L) et + 1 en S_2 , S_3 (état L^+). Le spectre ultraviolet de L/L^+ semble compatible avec celui d'une transition $MnIII \rightarrow MnIV$. En opposition avec le modèle de B. Velthuys (séquence 0, 1, 0, — 1), Van Gorkom et ses collaborateurs ont récemment proposé une séquence 1, 1, 1, — 3 pour la formation de L^+ qui traduirait l'oxydation successive de 3 $MnIII$ différents lors des étapes (1) à (3). J. Lavergne a recherché des conditions expérimentales permettant de discriminer nettement les prédictions de ces deux modèles. C'est notamment le cas lorsque l'on fait varier la proportion initiale des états stables S_0 , S_1 en préilluminant le système par un ou plusieurs éclairs suivis de quelques minutes d'obscurité. L'ensemble des résultats est en accord avec les prédictions du modèle 0, 1, 0, — 1 suggérant qu'une seule transition du Mn intervient dans le cycle du système de dégagement d'oxygène.

J. Lavergne a d'autre part étudié des changements d'absorption liés à l'oxydation du donneur Z. La partie bleue de ce spectre manifeste une dépendance marquée vis-à-vis des états S : l'amplitude d'un pic vers 440 nm est environ deux fois plus petite dans les états S_2 ou S_3 comparée aux états S_0 ou S_1 . Ce pic est vraisemblablement dû à une influence électrochromique de Z^+ sur son environnement chlorophyllien (perturbation des bandes d'absorption par un champ électrique).

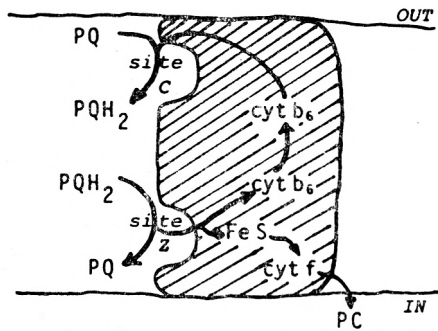
Deux interprétations peuvent être proposées pour rendre compte de ce phénomène. 1) Il existe deux types de donneurs secondaires Z. L'un de ces donneurs est impliqué dans les transferts d'électrons vers les états S_0 et S_1 , l'autre donneur dans les transferts d'électrons vers les états S_2 et S_3 . 2) L'état d'oxydation de S modifie les interactions électrochromiques entre Z et son environnement. J. Lavergne a entrepris l'étude des variations spectrales induites dans la région UV du spectre lors d'une série d'éclairs saturants. Les variations spectrales dans cette région sont en effet caractéristiques de l'espèce chimique impliquée (probablement un cation semiquinone du type QH_2^+). Il serait ainsi possible de déterminer s'il existe deux molécules du donneur Z distinctes sur le plan chimique.

II. — ÉTUDE DES TRANSFERTS D'ÉLECTRONS ENTRE LES DEUX PHOTOSYSTÈMES. MÉCANISME DE TRANSFERT D'ÉLECTRONS ET DE POMPAGE DE PROTONS INTERVENANT AU NIVEAU DU COMPLEXE CYTOCHROME b/f

(P. JOLIOT, A. JOLIOT)

Les transferts d'électrons entre les systèmes photochimiques I et II impliquent deux transporteurs mobiles, la plastoquinone et la plastocyanine et un complexe transmembranaire, le complexe cytochrome b/f qui comporte trois hèmes (cytochrome f et deux cytochromes b) et une protéine fer-soufre. Le transfert d'électrons depuis le système photochimique II jusqu'au complexe cytochrome b/f est assuré par la plastoquinone qui diffuse librement dans la phase lipidique de la membrane alors que le transfert d'électrons entre le complexe cytochrome b/f et le Photosystème I (chlorophylle P700) est assuré par la plastocyanine qui diffuse dans la phase aqueuse située à l'intérieur du thylakoïde. S'il est maintenant bien établi qu'un transfert d'ions hydrogène d'une face à l'autre de la membrane est associé au transfert d'électrons se produisant dans le complexe cytochrome b/f, le mécanisme du couplage entre le transfert d'électrons et ce transfert de protons reste actuellement un sujet de controverse. Quel que soit le mécanisme envisagé, le fonctionnement d'une pompe à protons implique obligatoirement que des charges puissent traverser la membrane : il peut s'agir soit d'électrons qui sont transportés de la face interne vers la face externe, soit d'ions hydrogène qui sont transportés depuis la face externe vers la face interne. Ces deux possibilités de transfert d'électrons ou d'ions hydrogène définissent les deux classes de modèles envisagées pour rendre compte du fonctionnement du complexe cytochrome b/f. Une hypothèse commune à tous ces modèles est le processus de réduction concertée du centre fer-soufre et du cytochrome b par une molécule de plastoquinone réduite (plastoquinol). Un premier électron de la molécule de plastoquinol est transféré à la protéine

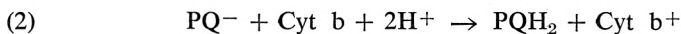
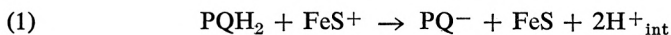
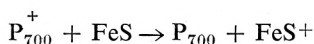
fer-soufre formant ainsi une semiquinone qui transfère un second électron au cytochrome b. Ces deux réactions s'effectuent séquentiellement à proximité de la face interne de la membrane et s'accompagnent de la libération de deux protons dans la phase aqueuse interne du thylakoïde. Nous avons pu analyser les caractéristiques cinétiques de ces réactions de transfert d'électrons en suivant par voie spectroscopique les changements d'état d'oxydoréduction des intermédiaires de la chaîne haut potentiel (FeS → cytochrome f → plastocyanine → chlorophylle P700) et de la chaîne bas potentiel (2 molécules de cytochrome b). Le demi-temps de réduction du cytochrome b est de l'ordre de 3 ms en conditions réductrices et de l'ordre de 10 ms en conditions plus oxydantes. Les hypothèses divergent ensuite quant au mécanisme de réoxydation du cytochrome b et de transfert de charges transmembranaires. Les modèles les plus couramment admis dérivent tous de l'hypothèse du cycle Q proposée en 1966 par Mitchell.



SCHEMA 1

Dans ces modèles, le complexe cytochrome b/f comporte une boucle électrogénique qui permet l'oxydation d'une molécule de plastoquinol à un site Z proche de la face interne de la membrane, et la réduction d'une molécule de plastoquinone à un site C localisé près de la face externe. Le transfert d'électrons entre les sites Z et C s'effectue à travers une chaîne de transporteurs comportant les deux cytochromes b. D'autres modèles ont été proposés, en particulier par Wikström et Krab (b cycle), dans lesquels le complexe cytochrome b/f ne comporterait qu'un site susceptible de fixer le plastoquinol. Ces modèles impliquent généralement l'existence d'une véritable pompe à protons couplée à un ou à plusieurs transporteurs d'électrons, et suppose donc l'existence de canaux transmembranaires perméables aux protons. L'ensemble des résultats que nous avons obtenus sur des chloroplastes d'épinard ou des algues, en conditions relativement oxydantes, c'est-

à-dire lorsqu'une fraction importante du cytochrome b est à l'état oxydé, sont en accord avec le modèle du Q cycle. Nous avons alors abordé l'étude des processus des transferts d'électrons en conditions réductrices sur des souches de l'algue verte *Chlorella sorokiniana* dépourvues du complexe Photosystème II. Ces conditions provoquent en quelques minutes la réduction des 2 molécules du cytochrome b incluses dans le complexe cyt b/f. L'illumination par un éclair induit une phase électrogénique lente de grande amplitude (1,4 charges transférées à travers la membrane par charge positive formée par la réaction photochimique), ainsi que l'oxydation d'une molécule de cytochrome b. Les réactions de transfert d'électrons sont alors les suivantes :



A priori, aucune de ces réactions ne peut être associée à un transfert d'électrons se produisant de la face interne vers la face externe (voir schéma 1). L'interprétation la plus simple qui dérive du modèle du b cycle proposé il y a plusieurs années par Wikström et Krab consiste à supposer que les protons impliqués dans la réaction 2 sont prélevés à l'extérieur de la membrane et parviennent au site Z par l'intermédiaire d'un canal à protons. Les expériences menées en conditions oxydantes ou réductrices conduisent donc à des conclusions contradictoires. Nous envisageons actuellement que le complexe cyt b6/f soit susceptible de pomper des protons par deux types de mécanisme entièrement différents.

III. — GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DU CHLOROPLASTE

A. — Analyse des produits de synthèse chloroplastique

(P. BENNOUN, Y. PIERRE, J. GIRARD-BASCOU, A. MASSON)

La membrane photosynthétique est constituée de différents complexes fonctionnels (centres photochimiques I et II, ATPases, etc.). Chacun de ces complexes est composé de plusieurs sous-unités polypeptidiques, un même complexe associant le plus souvent des produits de synthèse cytoplasmique et chloroplastique. Les mutations conduisant à la perte d'une fonction particulière de la chaîne photosynthétique se traduisent généralement par l'absence d'incorporation dans la membrane du complexe fonctionnel correspondant, qu'il s'agisse de mutations nucléaires ou chloroplastiques. Il semble que l'intégrité et la présence de la totalité des composants d'un complexe fonctionnel soient nécessaires à son incorporation dans la membrane photo-

synthétique. L'analyse des polypeptides membranaires des thylakoïdes d'un groupe de mutants, par exemple dépourvus d'activité Système II, révélera l'absence de la majeure partie des polypeptides associés aux centres Système II. Ce type d'analyse apporte donc peu d'information sur l'effet d'une mutation particulière. Une nouvelle méthode a été mise au point afin d'obtenir des informations sur les produits de synthèse chloroplastique. Les cellules sont marquées pendant un temps court en présence d'inhibiteur de la traduction cytoplasmique puis solubilisées par un détergent (sodium dodécyl sulfate); on sépare alors sur un gel de polyacrylamide l'ensemble de leurs protéines. Lorsqu'on effectue l'autoradiogramme d'un tel gel, on observe qu'à l'exception majeure de la grande sous-unité de la carboxylase, les protéines marquées sont les protéines membranaires des thylakoïdes synthétisées dans le chloroplaste. Ce résultat met en évidence les deux points suivants : 1) les protéines solubles synthétisées dans le chloroplaste sont peu abondantes par rapport aux protéines membranaires des thylakoïdes ou synthétisées plus lentement ; 2) les produits mitochondriaux sont également minoritaires ou synthétisés moins rapidement. On dispose ainsi d'une méthode très simple, n'utilisant que quelques millilitres d'une culture d'algues, pour visualiser les produits de synthèse chloroplastique normalement présents dans la membrane photosynthétique.

L'analyse des produits de synthèse chloroplastique des mutants de photosynthèse isolés dans le groupe de P. Bennoun permettra de mieux comprendre les différentes étapes impliquées dans la régulation de la transcription et de la traduction d'un gène chloroplastique codant pour un polypeptide membranaire des thylakoïdes, ainsi que dans l'insertion de ce polypeptide dans un complexe stable. Les résultats récents obtenus dans notre laboratoire indiquent que des étapes essentielles interviennent au niveau de la traduction. P. Bennoun et Y. Pierre chercheront en particulier à définir le rôle de la lumière dans ces différents processus, ainsi que le contrôle qu'exercent certains gènes nucléaires sur la synthèse de produits chloroplastiques spécifiques.

B. — *Génétique moléculaire du chloroplaste*

(P. BENNOUN, J. GIRARD-BASCOU, A. MASSON, M. DELOSME)

Le génôme chloroplastique reste mal connu : sur la centaine de gènes qu'il contient, seul un petit nombre d'entre eux a été étudié. P. Bennoun et ses collaborateurs se sont plus particulièrement intéressés aux gènes contrôlant la synthèse de protéines membranaires des thylakoïdes. De tels gènes ont été récemment localisés sur la carte physique du génôme chloroplastique. L'analyse des mutants susceptibles de présenter des modifications au niveau de ces gènes sera développée. La connaissance précise des distances phy-

siques existant entre différentes mutations va permettre de préciser les relations entre cartes génétique et physique dans différentes régions du génôme chloroplastique.

L'ATPase chloroplastique comporte plusieurs sous-unités codées dans le chloroplaste dont la sous-unité β du facteur de couplage CF1. Un mutant chloroplastique a été isolé, chez lequel le gène de la sous-unité β est délété ; le problème s'est alors posé de savoir s'il était possible de restaurer partiellement chez ce mutant l'activité photosynthétique. P. Bennoun a effectivement réussi à isoler de tels « supprimeurs ». Parmi les interprétations possibles pouvant rendre compte de ces « supprimeurs », on peut imaginer les hypothèses suivantes :

1) Le gène de la sous-unité β mitochondriale qui est nucléaire pourrait être muté dans sa séquence « signal » de telle sorte que son produit puisse se diriger non seulement vers le compartiment mitochondrial mais aussi vers le compartiment chloroplastique.

2) Il existerait un gène nucléaire « silencieux » homologue du gène β chloroplastique. Une mutation serait à même de « réveiller » l'activité de ce gène.

La nature des « supprimeurs » obtenus est actuellement en cours d'étude.

LISTE DES PUBLICATIONS

J.M. BRIANTAIS, C. VERNOTTE, J. OLIVE and F.A. WOLLMAN. *Kinetics of cation-induced changes of Photosystem II fluorescence and of lateral distribution of the two photosystems in the thylakoid membranes of pea chloroplasts* (*Biochim. Biophys. Acta*, 766, 1-8, 1984).

P. TAPIE, S. ACKER, C.J. ARNTZEN, Y. CHOQUET, P. DELEPELAIRE, B. DINER, F.A. WOLLMAN and J. BRETON. *Orientation of absorbing and fluorescing dipoles in various Photosystem I and Photosystem II particles* (in : *Advances in Photosynthesis Research*. W. Junk Publisher, The Hague, 1, 693-696, 1984).

J.P. WOESSNER, A. MASSON, E.H. HARRIS, P. BENNOUN, N.W. GILLHAM and J. BOYNTON. *Molecular and genetic analysis of the chloroplast ATPase of Chlamydomonas* (*Plant. Mol. Biol.*, 3, 177-190, 1984).

J.D. ROCHAIX, J. ERICKSON, M. SCHNEIDER, J.M. VALLET, M. DRON, A. MASSON and P. BENNOUN. *Studies with the chloroplast genome of Chlamydomonas reinhardtii* (In : *Biosynthesis of the photosynthetic apparatus*. Eds Thornber, Staehelin and Hallick, Alan Liss Publishers, pp. 285-294, 1984).

M. LACAMBRA, U. LARSEN, J. OLIVE, P. BENNOUN and F.A. WOLLMAN. *Mutants of Chlorella sorokiniana : a new material for photosynthesis studies. I. Characterization of the thylakoid membranes of wild-type and mutant strains (Photobiochem. Photobiophys., 8, 191-205, 1984).*

J. LAVERGNE, R. DELOSME, U. LARSEN and P. BENNOUN. *Mutants of Chlorella sorokiniana : a new material for photosynthesis studies. II. Improved spectroscopic analysis of electron transfer in mutants strains (Photobiochem. Photobiophys., 8, 207-219, 1984).*

M. PICARD-BENNOUN and P. BENNOUN. *Change in cytoplasmic ribosomes properties during gametogenesis in the alga Chlamydomonas reinhardtii (Current Genetics, 9, 239-243, 1985).*

P. DELEPELAIRE. *Contribution à l'étude fonctionnelle de l'appareil photosynthétique : les protéines de la membrane du thylakoïde chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii (Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles. Université Pierre et Marie Curie, 1984).*

C. DE VITRY, F.A. WOLLMAN and P. DELEPELAIRE. *Function of the polypeptides of the Photosystem II reaction center in Chlamydomonas reinhardtii (Biochim. Biophys. Acta, 767, 415-422, 1984).*

P. TAPIE, Y. CHOQUET, J. BRETON, P. DELEPELAIRE and F.A. WOLLMAN. *Orientation of Photosystem I-pigments. Investigation by low-temperature linear dichroism and polarized fluorescence emission (Biochim. Biophys. Acta, 767, 57-69, 1984).*

P. JOLIOT and A. JOLIOT. *Slow electrogenic phase and intersystem electron transfer in algae (Biochim. Biophys. Acta, 806, 398-409, 1985).*

O. VALLON, F.A. WOLLMAN and J. OLIVE. *Distribution of intrinsic and extrinsic subunits of the PSII protein complex between appressed and non-appressed regions of the thylakoid membrane : an immunocytochemical study (F.E.B.S. Lett., 183, n° 2, 245-250, 1985).*

PARTICIPATION A DES CONGRÈS ET COLLOQUES

B. DINER, P. JOLIOT, F.A. WOLLMAN. Gordon Conference, « Biochemical Aspect of Photosynthesis ». Meridan, Etats-Unis, 20-24 août 1984.

C. DE VITRY. Société de Chimie Biologique, XI^e Forum des Jeunes Chercheurs. Grenoble, 4-7 septembre 1984.

F.A. WOLLMAN. Société Française de Biophysique, « Organisation des Systèmes Biologiques ». Orsay, 5-7 novembre 1984.

P. JOLIOT. Journées du Gabim, « Interface Terre-Mer. Matériel particulaire < 500 μ . Aspect méthodologique biochimique ». Concarneau, 12-14 novembre 1984.

J. LAVERGNE, F.A. WOLLMAN. Société Française de Physiologie Végétale, « Photosynthèse ». Paris, 24 novembre 1984.

B. DINER, P. JOLIOT, C. DE VITRY. « Bioconversion directe de l'Energie Solaire et Photochimie ». Sophia-Antipolis-Valbonne, 31 janvier-1^{er} février 1985.

R. DELOSME, B. DINER, P. JOLIOT, A. JOLIOT, J. LAVERGNE, C. DE VITRY. Colloque de la Société Française de Biophysique, « Transferts d'électrons dans les systèmes biologiques et leurs modèles : Relation entre dynamique et structure des assemblages ». Gif-sur-Yvette, 25-26 avril 1985.

P. JOLIOT. F.E.B.S. Meeting, « Metal ions, Proteins and Membranes ». Algarve, Portugal, 21-26 avril 1985.

P. JOLIOT. Colloque M.R.T., « Mobilité des Chercheurs ». Marseille, 22 mars 1985.