

Bioénergétique cellulaire

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

Cette année, le cours a porté sur l'étude structurale et fonctionnelle des centres réactionnels où s'effectue la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Cette étude concerne les différents types de centres réactionnels appartenant à des organismes procaryotes ou eucaryotes. Je rappellerai tout d'abord que les appareils photosynthétiques sont essentiellement formés par une chaîne de transfert d'électrons comportant de nombreux transporteurs dont la plupart sont associés à des édifices protéiques multi-moléculaires. Ces protéines sont généralement implantées dans des membranes formant une vésicule fermée. Dans le cas des bactéries photosynthétiques, il s'agit de la membrane bactérienne elle-même, alors que dans le cas des algues et des plantes supérieures, les membranes photosynthétiques sont incluses dans un organite spécialisé, le chloroplaste.

La première partie du cours a porté sur l'étude comparée des différents types de centres photochimiques bactériens ou chloroplastiques. Il existe une grande variété de centres photochimiques bactériens. Cette variété s'oppose au cas des algues vertes et des plantes supérieures qui comportent deux types de centres photochimiques dont les caractéristiques structurales et fonctionnelles sont remarquablement constantes.

L'acte primaire de la photosynthèse consiste en l'absorption de photons par des pigments ne présentant pas de propriétés photochimiques, pigments dont le rôle essentiel est de collecter l'énergie lumineuse. L'énergie absorbée par les pigments de cette antenne collectrice est convertie en énergie d'excitation électronique qui est transférée très rapidement ($\sim 0,1$ picoseconde) à un pigment voisin. L'énergie d'excitation circule librement et rapidement parmi les pigments formant l'antenne collectrice. Cette énergie d'excitation est finalement piégée au niveau d'une molécule de chlorophylle ou de bactériochlorophylle particulière, qui constitue le donneur primaire d'électrons du centre photochimique. Lorsque cette molécule est portée dans un état excité, elle est susceptible de céder un électron à un accepteur situé à proximité. Le

couple donneur-accepteur, qui représente le cœur du centre réactionnel, est toujours formé par des pigments de type chlorophyllien. Les différents types de centres réactionnels se distinguent au contraire par la nature des chaînes de transfert d'électrons auxiliaires qui assurent l'alimentation en électrons du donneur primaire ou l'évacuation des électrons parvenant à l'accepteur primaire. L'ensemble des centres réactionnels est organisé suivant un schéma structural commun. Les donneurs et accepteurs secondaires sont toujours situés sur des faces opposées de la membrane. La réaction photochimique induit donc un transfert d'électrons d'une face à l'autre de la membrane, et par suite la formation quasi instantanée (moins de 1 nanoseconde) d'un potentiel de membrane.

Nous distinguerons deux classes de centres bactériens qui se caractérisent par la nature de la chaîne d'électrons associée au couple donneur-accepteur primaire.

Dans le cas des bactéries pourpres et des bactéries vertes aérobies, l'accepteur primaire est associé à deux molécules de quinones dont l'une est fixée de manière irréversible aux centres réactionnels. Les électrons sont transférés aux donneurs primaires d'électrons à partir de molécules de cytochromes qui, suivant les cas, sont associées irréversiblement ou réversiblement aux centres réactionnels. Sur le plan thermodynamique, le transfert d'un électron depuis le donneur primaire jusqu'à la quinone secondaire s'accompagne d'un gain en énergie de 400 meV. Le rendement du processus exprimé par rapport à l'énergie du photon incident est donc relativement médiocre (~ 25 %). Ces centres réactionnels sont généralement impliqués dans des processus de transferts cycliques d'électrons qui permettent l'accumulation d'énergie sous forme d'un gradient électrochimique d'ions hydrogène apparaissant entre les deux faces de la membrane.

Les centres réactionnels des bactéries vertes anaérobies comportent une chaîne d'accepteurs d'électrons formée d'au moins 3 protéines fer-soufre. Le potentiel de ces accepteurs d'électrons est suffisamment négatif pour permettre la réduction de la nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD), plaque tournante du métabolisme bactérien. L'énergie stockée lors du transfert d'électrons depuis le donneur primaire jusqu'à la première protéine fer-soufre est sensiblement plus élevée (~ 700 meV) que dans le cas des bactéries pourpres. Le rendement est alors de l'ordre de 40 %.

Le développement de la photosynthèse oxygénique représente une étape essentielle dans l'évolution. Les algues et plantes supérieures sont en effet capables de décomposer l'eau en réduisant le gaz carbonique, réaction qui joue un rôle essentiel dans le maintien d'un équilibre au sein de la biosphère. Cette réaction nécessite l'intervention de deux étapes photochimiques. Les chaînes de transfert d'électrons des algues et plantes supérieures comportent donc deux types de centres réactionnels, le photosystème I et le photosystème

II. Le photosystème II est directement associé au processus de décomposition de l'eau et de formation d'oxygène. Les catalyseurs impliqués dans ces réactions n'ont pas d'équivalents chez les bactéries photosynthétiques. Au contraire, le cœur du centre photochimique ainsi que la chaîne d'accepteurs d'électrons qui lui est associée présentent des analogies étroites avec les centres réactionnels des bactéries pourpres.

Le photosystème I reçoit des électrons provenant du photosystème II et permet la réduction du NADP^+ . Le photosystème I présente de fortes analogies avec les centres réactionnels bactériens des bactéries vertes anaérobies. Sur le plan de l'évolution, la photosynthèse oxygénique a emprunté des éléments appartenant à deux classes de bactéries photosynthétiques relativement éloignées sur le plan phylogénétique. Le processus ayant conduit à l'apparition de la photosynthèse oxygénique pose donc des problèmes passionnants quant à la théorie de l'évolution.

La seconde partie du cours a porté sur l'analyse théorique des processus de transfert d'électrons se produisant à l'intérieur d'édifices multi-moléculaires tels que les centres réactionnels. Compte tenu des vitesses très élevées des réactions de transfert d'électrons et de l'immobilisation des transporteurs au sein des complexes protéiques, les transferts d'électrons ne peuvent s'effectuer que par effet tunnel. Il est ainsi possible aux électrons de traverser les barrières d'énergie très élevées que constituent les domaines hydrophobes séparant les différents transporteurs. La faible masse de l'électron comparée à celle des noyaux explique que les transferts d'électrons s'effectuent beaucoup plus rapidement que les relaxations nucléaires. En d'autres termes, on peut considérer que le transfert d'un donneur à un accepteur d'électrons s'effectue sans modifications significatives des configurations nucléaires de ces deux molécules. Si nous considérons le couple donneur (D) et accepteur (A), le transfert d'électrons $\text{DA}^+ \rightarrow \text{D}^+\text{A}$ ne se produit que pour une configuration nucléaire particulière pour laquelle l'énergie des états D^+ et D^+A est égale.

Les processus de transfert d'électrons se produisant dans les complexes protéiques transmembranaires ont été analysés sur le plan théorique par plusieurs physiciens du solide (Hopfield, Jortner, Marcus). Bien que les résultats obtenus soient encore d'ordre qualitatif, ces travaux ont permis de définir les paramètres physiques essentiels qui contrôlent la vitesse des processus de transfert d'électrons. Parmi ces paramètres, il faut citer la distance séparant le donneur de l'accepteur et les propriétés diélectriques du milieu intermédiaire. Dans le cas de la réaction photochimique primaire qui s'effectue en quelques picosecondes, les distances séparant le donneur et l'accepteur ne peuvent dépasser une dizaine d'Å.

Il est intéressant de constater que de nombreuses réactions de transfert d'électrons se produisant dans des complexes protéiques présentent des coefficients de température négatifs. En effet, la vitesse de réaction diminue lorsque

la température augmente. L'analyse théorique des processus de transfert d'électrons a permis de proposer une interprétation de ces phénomènes apparemment paradoxaux. On peut espérer que les informations structurales très précises obtenues récemment grâce à l'analyse par diffraction de rayons X de centres réactionnels cristallisés fourniront aux physiciens les bases quantitatives permettant de développer l'analyse théorique des processus de transfert d'électrons se produisant dans les molécules d'intérêt biologique.

La troisième partie du cours a porté sur une analyse détaillée des propriétés des centres réactionnels des bactéries pourpres et du photosystème II. J'ai précédemment souligné que ces deux types de centres réactionnels présentent de fortes analogies, tout particulièrement au niveau de la chaîne des accepteurs d'électrons. Les centres réactionnels de *Rhodospseudomonas viridis* ont été récemment cristallisés par Deisenhofer et Michel. La structure de cette protéine membranaire analysée par diffraction des rayons X est maintenant connue avec une résolution inférieure à 3 Å. Le squelette polypeptidique ainsi que la position exacte des transporteurs est parfaitement connue. Ce centre réactionnel représente donc maintenant une référence essentielle, et il est possible, en mettant en œuvre un arsenal de méthodes spectroscopiques (optique et hertzienne) d'opérer des comparaisons quantitatives avec d'autres centres réactionnels (bactériens ou chloroplastiques) dont la structure n'a pu encore être déterminée. Il est cependant remarquable que les caractéristiques structurales essentielles des centres réactionnels ont pu être établies sur la base de données structurales et fonctionnelles peu précises bien avant que les données obtenues par diffraction de rayons X soient disponibles. L'analyse structurale des cristaux de centres réactionnels a montré que ceux-ci comportent deux chaînes de transfert d'électrons transmembranaires associées au même donneur primaire. Ces deux chaînes sont disposées d'une manière pratiquement symétrique par rapport à un axe perpendiculaire au plan de la membrane. Elles sont associées à deux polypeptides transmembranaires qui constituent le cœur du centre photochimique. Il semble bien qu'une seule de ces deux chaînes est fonctionnelle, ce qui suggère que des dissymétries structurales mineures peuvent avoir des conséquences essentielles sur la vitesse des réactions de transfert d'électrons.

Caractéristiques du donneur primaire

L'oxydation du donneur primaire observée lors de l'illumination des centres réactionnels bactériens se traduit par la décoloration d'une bactériochlorophylle absorbant à grandes longueurs d'onde. Le transfert de l'énergie d'excitation depuis l'antenne collectrice vers les centres photochimiques présente donc un certain caractère d'irréversibilité, ce qui favorise la conduction de l'énergie vers les centres. Très tôt, plusieurs auteurs avaient tenté d'expliquer le caractère anormal de la position de la bande d'absorption des donneurs d'électrons en supposant qu'il s'agissait d'un dimère comportant deux chloro-

phylles en très forte interaction. Dans ce cas, la théorie prévoit que l'excitation électronique va se partager entre les deux molécules dont les propriétés d'absorption vont être fortement modifiées par rapport à celles du monomère. On prévoit l'apparition de deux bandes d'absorption excitonique qui sont situées en position symétrique par rapport à la bande d'absorption du monomère. Les mesures de dichroïsme linéaire sont venues conforter cette hypothèse. L'analyse des propriétés de la forme oxydée du donneur d'électrons par résonance paramagnétique électronique (RPE) ainsi que par double résonance électronique et nucléaire (ENDOR) fournissent des arguments décisifs en faveur de l'hypothèse du dimère. Les spectres RPE montrent que la charge positive apparaissant lors de l'oxydation du donneur s'échange rapidement entre deux molécules de chlorophylles disposées à faible distance l'une de l'autre. La connaissance précise de la structure des centres réactionnels de *Rhodospseudomonas viridis* a permis de confirmer définitivement l'hypothèse d'un dimère de chlorophylle. Il est probable que les donneurs d'électrons de la totalité des centres réactionnels bactériens ou chloroplastiques sont constitués de dimères de chlorophylle ou de bactériochlorophylle.

Accepteurs primaires d'électrons

Les premières indications concernant la nature de l'accepteur primaire d'électrons ont été obtenues en illuminant en forte lumière des centres réactionnels placés dans des conditions très réductrices. On observe des modifications spectrales qui ont été attribuées à la réduction de l'accepteur primaire et qui correspondent à l'apparition de la forme réduite d'une bactériophéophytine. La mise au point de techniques permettant la mesure des variations d'absorption avec des résolutions de l'ordre de la picoseconde a permis d'établir définitivement cette hypothèse. Le spectre de la forme oxydée de la chlorophylle et de la forme réduite de la bactériophéophytine apparaît en quelques picosecondes. Le spectre de la phéophytine réduite disparaît ensuite en quelques centaines de picosecondes, temps nécessaire pour que l'électron soit transféré de la bactériophéophytine à l'accepteur secondaire (quinone). La séparation de charges primaires s'accompagne également de la modification des propriétés spectrales d'une molécule de bactériochlorophylle localisée à proximité du donneur et de l'accepteur primaires. Plusieurs auteurs ont alors supposé que cette molécule de bactériochlorophylle était directement impliquée dans le processus de transfert d'électrons. Les données spectroscopiques les plus récentes suggèrent cependant que les modifications spectrales observées traduisent simplement un effet électrochromique local. La présence d'une charge positive sur le donneur d'électrons et d'une charge négative sur l'accepteur bactériophéophytine perturberait les propriétés électroniques de la molécule de bactériochlorophylle située à proximité. Cette molécule pourrait cependant jouer un rôle indirect dans le processus de transfert d'électrons en abaissant le niveau de la barrière d'énergie séparant le donneur de l'accep-

teur. Des études comparables ont été effectuées sur les centres réactionnels du photosystème II. Les mesures spectroscopiques sont alors rendues beaucoup plus difficiles car les centres réactionnels du photosystème II ne peuvent comme les centres bactériens être débarrassés de la totalité de l'antenne chlorophyllienne collectrice de lumière. L'intervention d'une molécule de phéophytine comme accepteur primaire d'électrons a pu cependant être établie sans ambiguïté.

Réactions de recombinaison de charges

L'illumination de centres réactionnels dont l'accepteur secondaire (quinone) a été préalablement réduit induit une séparation de charges primaires suivie d'une recombinaison rapide se produisant en quelques nanosecondes. Cette recombinaison de charges peut conduire à la formation d'un état excité du donneur d'électrons de type triplet. Le rendement élevé de la formation de cet état triplet suggère que le couplage existant entre la forme oxydée du donneur et la forme réduite de l'accepteur primaire est relativement faible. Cette conclusion est apparemment contradictoire avec la grande rapidité de la séparation de charges qui implique un très fort couplage entre donneur et accepteur primaire. Il est probable que la séparation de charges est suivie de relaxation nucléaire s'apparentant à des changements de conformation. Ces relaxations qui se produisent dans les domaines de temps de l'ordre de la centaine de picosecondes se traduiraient par une diminution progressive du couplage entre donneur et accepteur.

Accepteurs secondaires

Les mesures spectroscopiques effectuées dans l'ultraviolet ont permis d'établir que les accepteurs secondaires et tertiaires des centres réactionnels des bactéries pourpres et du photosystème II étaient constitués par 2 molécules de quinones respectivement ubiquinone et plastoquinone. Une seule de ces deux quinones (Q_A) est fixée d'une manière irréversible aux centres réactionnels. La seconde quinone (Q_B) peut s'échanger librement avec des molécules d'ubiquinone ou de plastoquinone en solution dans la phase lipidique des membranes bactériennes ou chloroplastiques. La mesure des variations de potentiel de membrane accompagnant la réaction photochimique indique que ces molécules de quinones se trouvent à proximité de la face de la membrane opposée à celle où est localisé le donneur primaire. L'analyse des spectres de résonance paramagnétique électronique montre que les deux molécules de quinones sont en étroite interaction. En effet, cet atome de fer induit des perturbations identiques des spectres de résonance paramagnétique électronique des formes semiquinone des accepteurs secondaires et tertiaires ($Q_A Q_B$). On peut donc conclure que cet atome de fer est situé à égale distance des deux molécules de quinones. La connaissance de la structure des centres

réactionnels de *R. viridis* est venue confirmer cette hypothèse. Le rôle joué par cet atome de fer reste encore mal connu. Bien qu'il ne soit pas directement impliqué dans le processus de transfert d'électrons, il pourrait, comme dans le cas de la bactériochlorophylle située entre donneurs et accepteurs primaires, jouer un rôle en abaissant la barrière d'énergie séparant les molécules Q_A et Q_B .

La réduction de la quinone Q_B en dihydroquinone implique le transfert séquentiel des deux électrons et la fixation de deux protons prélevés dans la phase aqueuse située à proximité de cet accepteur. L'illumination d'un matériel adapté à l'obscurité (quinones Q_A et Q_B) induit le transfert d'un électron à la quinone Q_B qui est portée dans un état semiquinone de longue durée de vie (Q_B^-). Cette forme semiquinone présente une très forte affinité pour le centre réactionnel. Lors d'un deuxième éclair, un second électron est transféré à travers la chaîne des accepteurs d'électrons à la quinone Q_B qui est alors portée dans l'état doublement réduit Q_B^{2-} . Après une protonation, la forme Q_BH_2 est libérée dans la phase lipidique de la membrane. Une nouvelle quinone oxydée peut alors se fixer sur le centre réactionnel. Ce processus conduit à des oscillations binaires en fonction du nombre d'éclairs, la dihydroquinone étant formée après chaque éclair de rang pair. L'accepteur d'électrons Q_B se comporte comme une mémoire à deux positions qui est responsable de propriétés numériques remarquables pour une molécule biologique.

P. J.

SÉMINAIRES

M. André VERMEGLIO (A.R.B.S., C.E.N., Cadarache), « La structure des centres réactionnels de *Rhodospseudomonas viridis* : comparaison des données obtenues en lumière polarisée et par cristallographie ».

M. Ismaël MOYA (Laboratoire de Photosynthèse, Gif-sur-Yvette), « Fluorescence des systèmes chlorophylliens. Modulation des composantes de fluorescence par l'état des centres réactionnels ».

M. Jacques BRETON (Département de Biologie, C.E.N., Saclay), « Etude par spectroscopie femtoseconde des transferts de l'énergie d'excitation et des transferts d'électrons dans les centres réactionnels des bactéries pourpres ».

M. Bruce DINER (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris), « Etude des accepteurs d'électrons du Système photochimique II ».

M. Alfred William RUTHERFORD (Département de Biologie, C.E.N., Saclay), « Etude de la structure des centres Photosystème II. Application de la résonance paramagnétique électronique ».

M. Pierre SETIF (Département de Biologie, C.E.N., Saclay), « Transfert d'électrons dans les centres photochimiques I ».

M^{me} Anne-Lise ETIENNE (Laboratoire de Photosynthèse, Gif-sur-Yvette), « Etude spectrale* et cinétique de la forme radicalaire des donneurs secondaires du Photosystème II par résonance paramagnétique électronique ».

P^r Jean-David ROCHAIX (Département de Biologie Moléculaire, Université de Genève), « Génétique Moléculaire de la photosynthèse ».

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

Les recherches poursuivies au cours de l'année 1985 ont porté, comme les années précédentes, sur l'étude de la structure et du fonctionnement des chaînes de transfert d'électrons de l'appareil photosynthétique.

Une nouvelle ligne de recherche portant sur l'analyse structurale de la bactériorhodopsine a été développée par Jean-Luc Popot, maître-assistant au Collège de France.

I. — ÉTUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DES CENTRES RÉACTIONNELS PHOTOSYNTHÉTIQUES DES BACTÉRIES ET DU PHOTOSYSTÈME II

(B. DINER, C. DE VITRY)

Le centre réactionnel est un complexe protéique qui comporte les donneurs et des accepteurs d'électrons réalisant la photoréaction primaire. Les centres réactionnels photosynthétiques des bactéries pourpres (isolés de *Rhodospseudomonas sphaeroides*) et du Photosystème II (extraits de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*) présentent de fortes analogies structurales et fonctionnelles. Les deux types de centres comportent un dimère de chlorophylle ou de bactériochlorophylle comme donneur primaire associé à une molécule de phéophytine comme accepteur primaire. Les électrons sont alors transférés à deux quinones Q_A et Q_B couplées magnétiquement à un Fe²⁺.

Les centres réactionnels bactériens sont formés par trois polypeptides H, L et M, présents dans une stoechiométrie de 1:1:1 dont les poids moléculaires sont respectivement de l'ordre de 36, 32 et 28 kD. Les polypeptides L et M portent les co-facteurs suivants : 4 bactériochlorophylles, 2 bactériophéophytines, 2 ubiquinones - 10 et 1 Fe²⁺.

Contrairement au centre réactionnel bactérien, le nombre minimum de polypeptides et de pigments permettant la réaction photochimique primaire dans les centres du Photosystème II n'a pas été déterminé. A cette fin, le protocole décrit initialement par B. Diner et F.A. Wollman pour la préparation de particules photoactives du Système II a été modifié en ajoutant une étape de fractionnement par des traitements dissociants (agents chaotropiques et détergents). Les particules ainsi isolées comportent 5 polypeptides intrinsèques dont les poids moléculaires sont compris entre 10 kD et 50 kD. Les centres réactionnels comporteraient environ 52 chlorophylles a, 8 chlorophylles b, 2 phéophytines a, 8 carotènes et 2 xanthophylles (en collaboration avec Y. Lemoine du Laboratoire de Botanique de l'École Normale Supérieure). Le poids moléculaire total des particules Photosystème II pour un monomère est environ de 240 kD (180 kD de protéines et 60 kD de pigments). Parmi les polypeptides constituant le centre, les polypeptides D₁ et D₂ présentent des analogies marquées sur le plan de la structure primaire avec les polypeptides L et M des centres bactériens, en particulier la position des histidines impliquées dans la fixation du fer non hémique est identique pour les deux catégories de centres réactionnels. La possibilité de marquer les polypeptides D₁ par l'azido-atrazine, inhibiteur du transfert d'électrons, suggère que ce polypeptide serait homologue du polypeptide L des centres bactériens et serait impliqué dans la fixation de l'accepteur quinonique secondaire.

Mécanisme de transfert d'électrons entre les quinones primaire et secondaire (Q_A, Q_B)

Bruce Diner, en collaboration avec Vasili Petrouleas (Nuclear Research Center, Demokritos, Athènes), a établi que le complexe quinone-fer Q_A-Fe⁺, accepteur d'électrons du Photosystème II peut être oxydé chimiquement pour former Q_A-Fe³⁺. Les signaux de résonance paramagnétique électronique associés à la forme oxydée ont été identifiés (g = 8, 6,2 et 5,5) et le potentiel normal du couple Fe²⁺, Fe³⁺ déterminé. Cette titration a également été effectuée par spectroscopie Mössbauer qui permet de détecter la forme réduite Fe²⁺. Les titrations redox obtenues par ces deux méthodes donnent des résultats concordants (E_{m7,5} = 370 mV) et indiquent une dépendance du pH de - 60 mV par unité de pH. Ces observations indiquent donc qu'un proton est libéré lors de l'oxydation du Fe²⁺ en Fe³⁺.

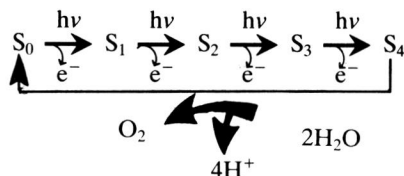
B. Diner a mesuré d'autre part la photoréduction de la quinone Q_A induite par un éclair de courte durée en fonction du potentiel redox. La quantité de quinone réduite diminue lorsque la proportion de fer oxydé augmente. On peut en conclure que Fe³⁺ joue le rôle d'un accepteur susceptible de recevoir des électrons de l'accepteur primaire Q_A. Ces propriétés permettent d'identifier le Fe³⁺ à l'accepteur d'électrons Q₄₀₀ dont la nature chimique n'avait pu encore être précisée (Ikegami et Katoh, Bowes, Crofts et Itah).

La localisation du fer entre les deux quinones Q_A et Q_B suggère que cet atome participe (directement ou indirectement) aux transferts d'électrons entre ces deux accepteurs.

II. — ÉTUDE DES MÉCANISMES DE TRANSFERT D'ÉLECTRONS ET DE LIBÉRATION DE PROTONS DANS LE SYSTÈME DE DÉGAGEMENT D'OXYGÈNE

(J. LAVERGNE)

On sait que la réaction globale d'oxydation de deux molécules d'eau, dont les produits sont une molécule d'oxygène et quatre protons, implique l'accumulation de quatre équivalents oxydés sur le côté donneur du centre Système II. C'est ce que décrit le schéma classique dû à B. Kok :



Le détail de ces réactions est encore très imparfaitement élucidé. On ne sait pas, par exemple, si les deux molécules d'eau sont oxydées lors de l'étape finale, dans une réaction concertée à quatre équivalents, ou si des étapes intermédiaires d'oxydation du substrat H_2O interviennent. On sait d'autre part que lors du cycle des états S, un ou plusieurs atomes de manganèse sont oxydés.

Les réactions d'oxydation du manganèse ont été suivies en mesurant les changements d'absorption dans l'ultraviolet qui sont attribués aux transitions au sein d'un complexe plurinucléaire multivalent. La relation stoechiométrique entre ce signal spectroscopique et le cycle des états S est l'objet d'une controverse dans la littérature. B. Velthuys a supposé que la transition Mn (III)-Mn (IV) se produit exclusivement lors de l'étape S_1-S_2 . La réduction du manganèse se produirait lors de l'étape S_1-S_0 . Dans cette hypothèse, l'eau serait progressivement oxydée lors des étapes S_0-S_1 , S_2-S_3 et S_3-S_0 . Plus récemment, Dekker et Van Gorkom ont proposé que trois atomes de manganèse étaient oxydés séquentiellement lors des étapes S_0-S_1 , S_1-S_2 et S_2-S_3 . Ces trois atomes de manganèse seraient réduits lors de la dernière étape par une réaction concertée $2\text{H}_2\text{O} + 4 (+) \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+$. Il est apparu que les arguments expérimentaux présentés par Dekker et Van Gorkom ne permettent pas de trancher définitivement en faveur de cette dernière hypothèse. J. Lavergne a repris ces expériences sur un double mutant de l'algue *C. sorokiniana*,

déficient en centres PSI et en pigments d'antenne, en recherchant des conditions où les deux modèles conduisent à des prédictions nettement différentes. C'est le cas lorsqu'on modifie, par une préillumination de 1 ou 3 éclairs suivie d'une désactivation de quelques minutes à l'obscurité, la répartition initiale entre les états S_0 et S_1 , stables à l'obscurité. C'est aussi le cas lorsqu'on modifie la probabilité de « double photoréaction » en jouant sur la durée et l'intensité de l'éclair actinique. Les résultats obtenus indiquent nettement que l'oxydation de manganèse est de beaucoup plus faible amplitude pour les transitions S_0 - S_1 et S_2 - S_3 que pour la transition S_1 - S_2 . On confirme donc la stoechiométrie initialement avancée par Velthuys. Toutefois, la possibilité de stoechiométries non entières reste ouverte.

III. — ORGANISATION MOLÉCULAIRE DU COMPLEXE CYTOCHROME *b/f* DE L'ALGUE VERTE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

(C. LEMAIRE, F.A. WOLLMAN, J. GIRARD-BASCOU et P. BENNOUN)

Le complexe *b/f* a été purifié par différents groupes à partir des thylakoïdes de plantes supérieures. Un travail équivalent devait être fait sur *C. reinhardtii* pour au moins trois raisons :

— le rôle central du complexe *b/f* dans les mécanismes de transfert d'électrons impose que les études spectroscopiques qui lui sont consacrées sur des algues entières soient corrélées à une connaissance approfondie du complexe isolé à partir du même organisme ;

— une altération des propriétés fonctionnelles du complexe *in vivo* est accessible par la génétique des mutants de *C. reinhardtii*. Leur caractérisation nécessite d'avoir préalablement identifié convenablement les sous-unités qui constituent le complexe *b/f* ;

— le recours à une algue unicellulaire permet, par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la traduction cytoplasmique ou chloroplastique, d'attribuer plus aisément les gènes de structure des différentes sous-unités aux génomes nucléaires ou chloroplastiques.

La caractérisation du complexe *b/f* a été entreprise en utilisant plusieurs mutants de *C. reinhardtii* présentant une altération de ce complexe. Une analyse biochimique comparative de ces mutants et d'un complexe *b/f* purifié a permis d'identifier les sous-unités polypeptidiques formant le complexe. En utilisant une révélation spécifique des hèmes d'une part et des anticorps d'autre part, des polypeptides de 38, 25, 19 et 17,5 kD ont pu être attribués aux quatre sous-unités, déjà identifiées dans les complexes extraits des plantes supérieures et correspondant au cytochrome *f*, à la protéine de Rieske et à la

sous-unité 4. L'analyse de nombreux mutants par des techniques d'électrophorèse très résolutive (adjonction d'urée dans le gel) a permis à F.A. Wollman et C. Lemaire d'identifier une cinquième sous-unité, de 15 kD.

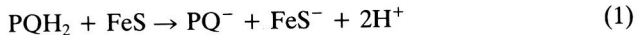
C. Lemaire, J. Girard-Bascou et F.A. Wollman ont ensuite étudié, par une méthode indirecte, le mode d'assemblage du complexe dans la membrane du thylakoïde. A cette fin, les profils polypeptidiques des thylakoïdes des différents mutants ont été comparés après un marquage court des cellules entières en présence d'acétate ^{14}C . Par autoradiographie on révèle alors l'ensemble des polypeptides intégrés dans la membrane pendant le temps du pulse (60') qu'ils soient accumulés ou dégradés au cours d'un laps de temps plus long. On sait depuis plusieurs années par ce type d'expériences que la plupart des mutants de *C. reinhardtii*, dépourvus de l'un quelconque des complexes protéiques de l'appareil photosynthétique sont néanmoins capables de synthétiser les sous-unités polypeptidiques de ce complexe. Cela signifie que, dans la plupart des cas, ce sont des étapes de régulation de l'accumulation des sous-unités ou de l'assemblage d'un complexe qui sont affectées par la mutation. Il arrive parfois que l'une des chaînes polypeptidiques soit totalement absente de la membrane ou encore qu'un groupe de sous-unités soit absent. Dans le premier cas, il peut s'agir d'un mutant dans le gène de structure de la sous-unité manquante tandis que le deuxième cas indique l'absence d'un facteur nécessaire à l'insertion d'un groupe de polypeptides dans la membrane du thylakoïde. Pour ce qui concerne le complexe b/f, nous avons observé que l'absence totale de protéine de Rieske, sous-unité d'origine nucléaire, n'empêche nullement les autres sous-unités, qui sont d'origine chloroplastique, de s'insérer, de s'accumuler et de s'assembler dans la membrane. A l'inverse, la protéine de Rieske, bien que transmembranaire ne peut s'insérer dans la membrane qu'en présence d'un complexe, déjà constitué, des autres sous-unités.

IV. — ÉTUDE DES MÉCANISMES DE TRANSFERT D'ÉLECTRONS ET DE POMPAGE DE PROTONS INTERVENANT AU NIVEAU DU COMPLEXE CYTOCHROME b/f

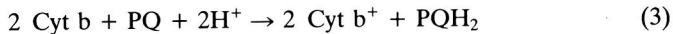
(P. JOLIOT, A. JOLIOT)

Le complexe transmembranaire cytochrome b/f réalise l'oxydation d'une molécule liposoluble (plastquinol) et la réduction d'une molécule hydrosoluble (plastocyanine). Les processus de transfert d'électrons et de pompage de protons se produisant au niveau du complexe cytochrome b/f ont été analysés lorsque les chloroplastes sont placés dans des conditions très réductrices. Je rappellerai tout d'abord que les modèles les plus généralement admis dérivent de l'hypothèse du Q cycle proposée en 1966 par Mitchell. Comme l'indique le schéma 1, le complexe cytochrome b/f comporte une boucle électrogénique

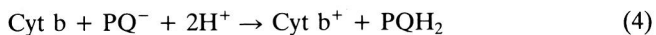
transmembranaire assurant le transfert d'électrons entre deux sites situés respectivement à proximité des faces interne et externe de la membrane. Le site interne Z est susceptible de fixer une molécule de plastoquinol alors que le site externe C fixe préférentiellement les molécules de plastoquinone. Les études structurales récentes ont apporté des arguments nouveaux en faveur de ce modèle théorique en démontrant en particulier que les deux molécules de cytochrome b sont localisées respectivement à proximité des faces interne et externe de la membrane. Les données expérimentales obtenues lorsque des chloroplastes placés dans des conditions modérément réductrices sont illuminés par un éclair de courte durée peuvent être interprétées de manière satisfaisante par les modèles dérivés du cycle Q. L'acte initial correspond au transfert d'une charge positive depuis le Photosystème I vers la protéine fer-soufre du complexe cytochrome b/f. La molécule de plastoquinol fixée au site Z cède séquentiellement un électron à la protéine fer-soufre et un second électron à l'une des deux molécules de cytochrome b qui se trouve sous forme oxydée.



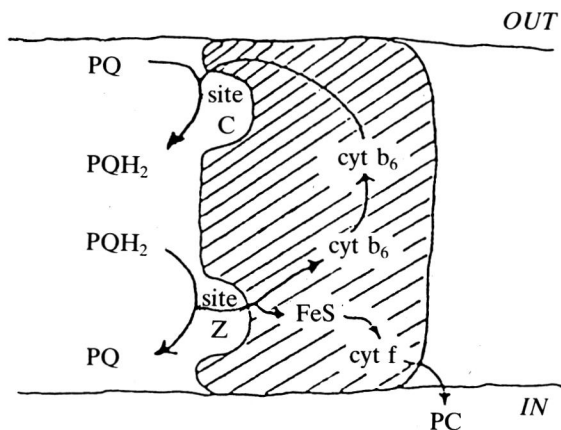
Les deux molécules de cytochrome b transfèrent alors leur électron à une molécule de plastoquinone située au site C, suivant la réaction :



A cette réaction d'oxydation du plastoquinol est obligatoirement associée une augmentation du potentiel électrique transmembranaire liée à la circulation d'électrons depuis la face interne vers la face externe de la membrane. D'autre part, l'ensemble du processus s'accompagne d'une libération de protons sur la face interne (réaction 1) et d'une fixation de protons sur la face externe (réaction 3). Ce modèle rend compte des processus de transfert d'électrons sur des algues *Chlorella sorokiniana* placées dans des conditions très réductrices mais illuminées par des éclairs répétitifs séparés par des intervalles d'obscurité de quelques secondes. L'addition d'inhibiteurs tels que le NQNO qui se fixe sur le site C en compétition avec la plastoquinone se traduit par un ralentissement important de la vitesse d'oxydation du cytochrome b (réaction 3) sans aucune inhibition de la réaction 2 (réduction du cytochrome b). Une situation tout à fait différente est observée lorsque les algues sont illuminées par un éclair isolé intervenant après une longue période d'adaptation à l'obscurité (plus de 10 minutes). Dans ces conditions, les deux molécules de cytochrome b sont alors à l'état réduit. L'éclair induit alors la formation d'une molécule de semiquinone au site Z suivant la réaction 1. Le cytochrome b réduit transfère un électron à cette molécule de semiquinone qui est réduite en hydroquinone suivant la réaction 4.



Le résultat le plus surprenant est que cette oxydation du cytochrome b s'accompagne d'une phase électrogénique importante équivalente au transfert de 1,5 charges positives depuis l'extérieur vers l'intérieur de la membrane. Ce résultat est paradoxal dans la mesure où la réduction d'une semiquinone par le cytochrome b intervenant au site Z devrait au contraire s'accompagner d'une phase électrogénique de sens opposé traduisant le transfert d'un électron depuis un transporteur situé à l'intérieur de la membrane vers un transporteur situé à la surface interne de la membrane. De plus, à l'inverse de ce qui avait été observé dans le cas d'éclairs répétitifs, la phase électrogénique et l'oxydation du cytochrome b ne sont pas modifiées par l'addition d'inhibiteurs tel que NQNO. Il est clair que les modèles dérivés du « Q cycle » ne peuvent rendre compte des phénomènes observés dans ces conditions. Une hypothèse simple consiste à supposer que les deux protons impliqués dans la réaction 4 lors de la réduction de la semiquinone en hydroquinone sont prélevés sur la face externe de la membrane, ce qui implique l'existence d'un canal à protons transmembranaire. Les résultats obtenus suggèrent que les processus de transfert d'électrons se produisant dans le complexe cytochrome b/f peuvent conduire au pompage d'ions hydrogène depuis la face externe vers la face interne par deux mécanismes indépendants dont la mise en jeu respective dépend des conditions expérimentales.



V. — STRUCTURE DE LA BACTÉRIORHODOPSINE

[Jean-Luc POPOT, en collaboration avec le laboratoire de D. M. Engelman (Université Yale) et avec G. Zaccai (Institut Laue-Langevin)]

La bactériorhodopsine (BR) est une protéine membranaire intégrale de la membrane plasmique de l'archaebactérie *Halobacterium halobium*. Elle comprend un cofacteur, le rétinale, et fonctionne comme pompe à protons entraînée par la lumière. Grâce notamment à sa petite taille, à son abondance et à son organisation dans le plan de la membrane en réseau bidimensionnel (« membrane pourpre »), la BR est un excellent système modèle pour l'étude des protéines membranaires polytopiques (dont la chaîne traverse plusieurs fois la bicouche lipidique). L'absence de cristaux tridimensionnels de bonne qualité a cependant limité jusqu'à présent la résolution à laquelle sa structure est connue.

Etude structurale par diffraction des rayons X et des neutrons

La BR comprend très vraisemblablement sept α -hélices transmembranaires, qui représentent environ les 3/4 de la masse protéique. L'analyse de la séquence permet d'identifier sept segments comme les plus susceptibles de former ces sept hélices. La faible résolution à laquelle la structure est présentement connue ($\sim 6,5$ Å) ne permet pas de déterminer quel segment de séquence correspond à chaque hélice, et donc de connaître la disposition spatiale des groupes chimiques responsables du pompage des protons. Le travail entrepris vise à identifier la position dans la structure de certains des segments de la séquence.

Deux fragments chymotryptiques, comprenant respectivement 2 et 5 hélices transmembranaires, ont été isolés à partir de membrane pourpre native ou entièrement deutérée. Une nouvelle méthode de renaturation de la BR à partir de ces deux fragments a été développée, permettant à la protéine de reformer un réseau bidimensionnel. Deux échantillons (50-80 mg) de BR renaturée ont été préparés. Dans l'échantillon témoin, les deux fragments provenaient de membrane pourpre native. Dans l'échantillon expérimental, le petit fragment (2 hélices) provenait de la culture deutérée, le grand fragment (5 hélices) d'une culture hydrogénée. La position et l'intensité des réflexions résultant de la diffraction des rayons X indiquent que la structure reconstituée ne peut se distinguer de la structure native dans les limites de résolution de cette méthode. L'étude spectroscopique (spectre visible et dichroïsme circulaire) confirme la renaturation du chromophore.

L'étude par diffraction des neutrons a été effectuée à l'Institut Laue-Langevin de Grenoble en collaboration avec G. Zaccai. L'échantillon témoin

ne diffère pas de la membrane pourpre native. L'échantillon hydride, en revanche, montre des variations d'intensité relative des réflexions considérables, atteignant des facteurs de deux ou plus pour la moitié des réflexions.

En raison de la nature des données collectées (diagrammes de poudre) et de l'impossibilité de phaser les réflexions, l'analyse repose sur la construction de modèles structuraux et la comparaison des prédictions qui en découlent avec les observations expérimentales. Elle permet d'identifier avec certitude la position dans la structure de l'un des deux segments transmembranaires compris dans le fragment C-2, et de restreindre à deux positions possibles l'emplacement du second. Ces attributions à elles seules réduiraient d'un ordre de grandeur le nombre de modèles structuraux possibles (7 !, soit 5 040).

Des expériences sont en cours afin d'étendre ces résultats grâce à l'étude d'échantillons hybrides obtenus par recombinaison de fragments spécifiquement deutérés dans certaines classes d'acides animés.

Etude des modalités de repliement de la chaîne polypeptidique

Parce que très peu de structures de protéines membranaires sont connues, les forces qui les stabilisent et les voies possibles de leur repliement lors de la biosynthèse restent largement du domaine de la spéculation. Une attitude courante consiste à faire l'hypothèse que les segments de séquence qui traversent la bicouche lipidique y adoptent la conformation énergétiquement la plus favorable, et que la protéine se structure essentiellement par assemblage d'hélices préformées. La structure finale, où les interactions protéine-protéine peuvent être prédominantes, pourrait être prédite à partir de la considération des interactions protéine-lipides autour de chaque segment considéré isolément. Si cette conception est justifiée, il devrait être possible d'induire le repliement séparé sous une forme stable de fragments d'une protéine membranaire intégrale, et de leur permettre dans une seconde étape d'interagir pour reconstituer la structure complète. La méthode de renaturation développée permet de « renaturer » séparément les deux fragments chymotryptiques de la BR dans des vésicules lipidiques distinctes. Le mélange des vésicules et l'addition de rétinol ne se traduisent par aucun changement du spectre d'absorption. La congélation/décongélation du mélange, en revanche, entraîne la fusion des vésicules et l'apparition du spectre typique de la bactériorhodopsine. Cette expérience montre que les fragments isolés adoptent une structure stable leur permettant d'interagir pour régénérer la protéine.

Ces premières observations suggèrent que la renaturation de la BR à partir de ses fragments chymotryptiques comporte au moins trois étapes distinctes : 1) repliement de chaque fragment sous forme d' α -hélices transmembranaires de structure semblable, mais non identique, à celle adoptée par les mêmes fragments dans la molécule native ; 2) réassociation des fragments suivie (ou

précédée) d'un réarrangement conformationnel ; 3) liaison du rétinol suivie (ou précédée) d'une nouvelle transconformation. L'ampleur et, si possible, la nature des réarrangements associés à l'assemblage des fragments et à la liaison du rétinol sont en cours d'examen.

La structure native de la BR peut donc être régénérée par l'association d'éléments ayant atteint par eux-mêmes une conformation stable. Cette conclusion est compatible avec l'idée que, lors de la biosynthèse, l'insertion séquentielle d'éléments qui se replient indépendamment les uns des autres pourrait suffire à dicter la structure finale de la molécule.

LISTE DES PUBLICATIONS

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

J. LAVERGNE. *Absorption changes in photosystem II : recent developments* (*Physiol. Vég.*, 1985, 4, 411-423).

P. DELEPELAIRE and F.A. WOLLMAN. *Correlations between fluorescence and phosphorylation in thylakoid membranes of Chlamydomonas reinhardtii in vivo : a kinetic analysis* (*Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 809, 277-283).

P. BENNOUN, M. SPIERER-HERZ, J. ERICKSON, J. GIRARD-BASCOU, Y. PIERRE, M. DELOSME and J.D. ROCHAIX. *Characterization of photosystem II of Chlamydomonas reinhardtii lacking the psbA gene* (*Plant Molecular Biology*, 1986, 6, 151-160).

C. DE VITRY, C. CARLES and B.A. DINER. *Quantitation of plastoquinone-9 in Photosystem II reaction center particles : chemical identification of the primary quinone electron acceptor Q_A* (*F.E.B.S. Letters*, 1986, 2, 203-206).

A. ROUSSELET and F.A. WOLLMAN. *Protein rotational immobility in thylakoid membranes of different polypeptides composition in the WT and mutant strains of C. reinhardtii* (*Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 246, 321-331).

F.A. WOLLMAN. *Photosystem I proteins* (*Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 19, Eds L.A. Staehelin and C.J. Arntzen, Springer-Verlag, 487-495).

B.A. DINER. *Photosystems I and II : structure, proteins, and Cofactors*. (*Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 19, Eds L.A. Staehelin and C.J. Arntzen, Springer-Verlag, 422-436).

P. JOLIOT and A. JOLIOT. *Cytochrome b_6/f complex-Quinol interactions*. (*Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 19, Eds L.A. Staehelin and C.J. Arntzen, Springer-Verlag, 528-538).

J. LAVERGNE. *Stoichiometry of the redox changes of manganese during the photosynthetic water oxidation cycle* (*Photochem. Photobiol.*, 1986, 43, 311-317).

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 (Biosynthesis of the Photosynthetic Apparatus : Molecular Biology, Development and Regulation, 1986, 285-294).*

P. JOLIOT and A. JOLIOT. *Proton pumping and electron transfer in the cytochrome b_f complex of algae* (*Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 849, 211-222).

P. JOLIOT and A. JOLIOT. *Mechanism of proton-pumping in the cytochrome b_f complex* (*Photosynthesis Research*, 1986, 9, 113-124).

J.M. ERICKSON, J.D. ROCHAIX, P. DELEPELAIRE. *Analysis of Genes encoding two Photosystem II proteins of the 30-34 kD size class* (*Molecular Biology of the Photosynthetic apparatus 1985 Cold Spring Harbor Laboratory*, 53-65).

PARTICIPATION À DES CONGRÈS ET COLLOQUES

A. JOLIOT. Société de Chimie Biologique, Groupe Thématique « Bioénergétique et Membranes », Besançon, 10-12 juillet 1985.

B. DINER. Gordon Conference « Physico-Chemical Aspects of Photosynthesis », New Hampshire (U.S.A.), 29 juillet-2 août 1985.

P. JOLIOT. F.E.B.S. Advanced-course « Isolation and characterization of membrane proteins : Biochemical and biophysical aspects », Brisighella, Italie, 8-21 septembre 1985.

B. DINER, P. JOLIOT, A. JOLIOT, J. LAVERGNE. Symposium « Quinones in the photosynthetic membranes », Saint-Lambert-des-Bois, 9-11 octobre 1985.