
Le chloroplaste et la photosynthèse

A. Organisation générale des chloroplastes

Les organismes photosynthétiques se caractérisent par leur capacité à utiliser l'énergie lumineuse pour synthétiser de la matière organique, au cours d'un processus biochimique appelé photosynthèse. Chez les végétaux, la photosynthèse se déroule au sein d'un organe spécialisé, le chloroplaste (Figure 1).

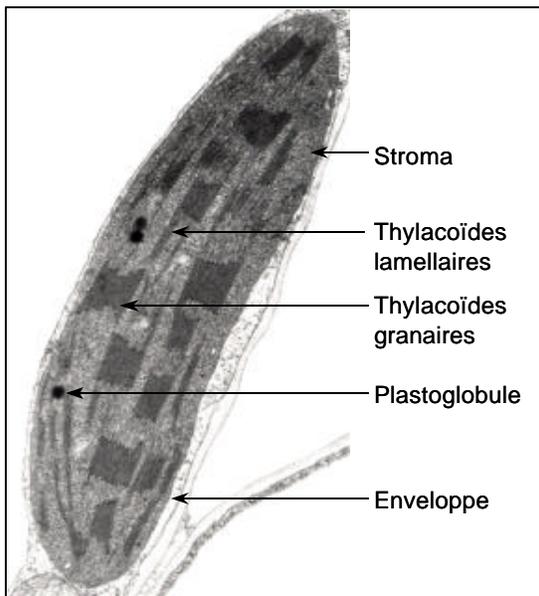


Figure 1. Micrographie par transmission électronique d'un chloroplaste de *Nicotiana tabacum* (5000x). Cliché aimablement fourni par F. Eymery (CEA Cadarache).

granaires, interconnectés par des thylacoïdes lamellaires. Ces membranes contiennent les pigments photosynthétiques responsables de la capture de l'énergie lumineuse, et les protéines nécessaires à sa conversion en énergie chimique. La photosynthèse permet la conversion du

Cet organe est délimité par une double enveloppe, composée d'une membrane externe, perméable aux métabolites de faible poids moléculaire, et d'une membrane interne délimitant une matrice intra-chloroplastique, le stroma. Il est communément admis que le chloroplaste des plantes supérieures dérive d'un hôte procaryotique endosymbiotique, ancêtre de la cyanobactérie (pour une synthèse, voir Whatley, 1993). La capture de l'énergie lumineuse et sa conversion en énergie chimique s'opère au sein des membranes thylacoïdiennes internes au chloroplaste et formant un réseau composé d'empilements de petites vésicules aplaties, les thylacoïdes

CO₂ atmosphérique en carbone organique grâce à l'énergie lumineuse. Le bilan de la photosynthèse est : $6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} \longrightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2$.

La photosynthèse est un phénomène complexe qui peut être décrit en deux phases

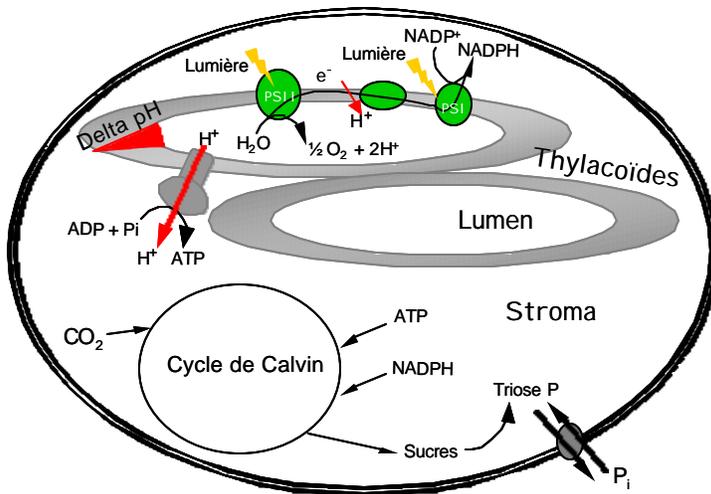


Figure 2. Représentation schématique des processus photosynthétiques au sein du chloroplaste. La phase photochimique se déroule au sein des membranes des thylacoïdes, la phase non photochimique (cycle de Calvin) dans le stroma. PS : photosystème.

(Figure 2). La première phase, appelée phase photochimique, se déroule au sein des membranes thylacoïdiennes et permet la capture de l'énergie lumineuse et sa conversion en énergie chimique, sous forme de liaison phosphoanhydre contenue dans l'ATP et de pouvoir réducteur par la réduction du NADP⁺ en NADPH. La seconde phase, appelée phase non photochimique, se déroule dans

le stroma. Elle correspond à la fixation du CO₂ et à sa transformation en carbone organique grâce à l'utilisation de l'énergie chimique contenue dans l'ATP et le NADPH, au cours du cycle de Calvin.

B. Absorption de l'énergie lumineuse et génération de pouvoir réducteur

L'énergie lumineuse est absorbée par les chlorophylles et les caroténoïdes organisés en antennes collectrices ou LHC (Light Harvesting Complex), puis transférée sous forme d'énergie d'excitation (exciton) vers les centres réactionnels des photosystèmes I et II. Ceux-ci réalisent alors une séparation de charges par délocalisation d'un électron au niveau d'une paire de molécules de chlorophylle (chl*a**). Cet électron est transféré à la chaîne photosynthétique et l'accumulation de charges positives du côté donneur du PS II permet de réaliser la photolyse de l'eau, entraînant une production d'oxygène (Figure 3). Du côté accepteur du PS II, les électrons sont transférés dans une chaîne de transporteurs membranaires constituée des plastoquinones, du complexe cytochrome *b₆/f*, de la plastocyanine (protéine soluble du lumen dont la forme réduite constitue le donneur au PS I).

Le PS I réalise également une séparation de charge entraînant l'oxydation des plastocyanines. Du côté donneur du PS I, les électrons sont transférés à la ferrédoxine, protéine soluble du

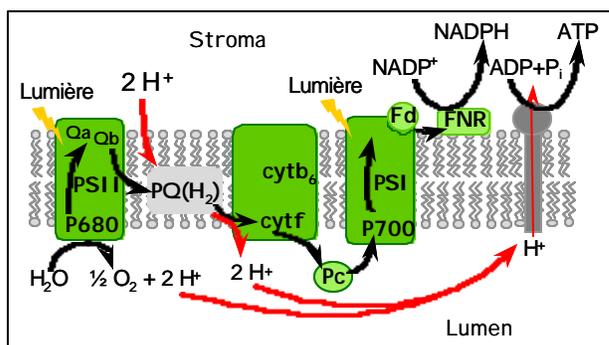


Figure 3. Schéma du transfert photosynthétique d'électrons (schéma en Z) et des translocations de protons. Les transferts d'électrons sont représentés en noir, les translocations de protons en rouge. PS : photosystème, PQ(H₂) : Plastoquinones ou (plastoquinols), Pc : plastocyanine, Fd : ferrédoxine, FNR : ferrédoxine NADP⁺ réductase. Cyt : cytochrome.

stroma. Enfin, la ferrédoxine-NADP réductase réalise la réduction du NADP⁺ à partir de la ferrédoxine réduite au niveau du PS I.

Le transfert d'électrons entre les transporteurs de la chaîne photosynthétique s'effectue dans le sens du potentiel rédox, hormis les deux sauts énergétiques réalisés aux niveaux des photosystèmes I et II, permis par l'énergie lumineuse (pour une synthèse voir Blankenship et Prince, 1985). L'ensemble des réactions qui réalisent le transfert

linéaire des électrons de H₂O vers le NADP⁺ grâce à un couplage entre PSII et PS I constitue le « schéma en Z » de la photosynthèse (Figure 3) (Hill et Bendall, 1960).

C. Les composants de la chaîne de transfert d'électrons

Le PS II est constitué d'un centre réactionnel, appelé P₆₈₀ contenant la chlorophylle *a* (chl *a*) et de nombreuses protéines. Parmi celles-ci, les protéines D₁ et D₂, qui consistent le cœur du centre réactionnel, sont codées par les gènes chloroplastiques *psbA* et *psbB* et présentent des structures primaires voisines (Robinson, 1996) (Figure 4). D₁ et D₂ contiennent chacune cinq hélices transmembranaires et forment un hétérodimère (Barber, 1987). Chaque protéine D₁/D₂ contient un résidu tyrosine qui sert de donneur d'électrons à la chlorophylle *a* du P₆₈₀⁺ (Debus et al., 1988). Les protéines D₁ et D₂ sont associées avec une phéophytine et une plastoquinone (Q_A) (Melis, 1991). Le PS II est associé à des antennes collectrices de lumière ou LHCII (Kühlbrandt et Wang 1991 ; Hankamer et al., 1997). La plupart des pigments des LHC sont associés à des protéines dénommées protéines CAB (Chl *a/b* binding protein) et forment les complexes protéine-chlorophylle les plus abondants. L'énergie d'excitation est transmise des LHCII au centre réactionnel, P₆₈₀, par l'intermédiaire des protéines antennes CP₄₇ et CP₄₃ (codées par les gènes *psbC* et *psbD*, Diner et Babcock, 1996).

Le complexe cytochrome *b₆f* présente quatre centres rédox liés par 4 composants protéiques majeurs, une protéine à centre fer-soufre, dite protéine de Rieske, le cytochrome *f*, le cytochrome *b₆* et la sous-unité IV (Lemaire et al., 1986) (Figure 4). Cette dernière est impliquée dans la liaison avec les PQH₂ (Hauska et al., 1996). Le site Q_o situé à proximité de la face du lumen est le site où a lieu l'oxydation des plastoquinols PQH₂, qui s'accompagne de la réduction du centre fer-soufre de la protéine de Rieske (Anderson, 1992; Cramer et al., 1996). Quatre autres sous-unités mineures de 3 à 6 kDa dont le rôle est inconnu sont associées au cytochrome *b₆f*. Enfin, l'hème du cytochrome *f* (hème C), réduit par la protéine de Rieske permet le transfert des électrons vers la plastocyanine (Allred et Staehelin, 1985). Le cytochrome *b₆*, partie la plus hydrophobe du complexe (contenant deux hèmes *b*, *b_{6H}* et *b_{6L}*) est également réduit lors de l'oxydation des plastoquinols au site Q_o. Le cytochrome *b₆f* possède un deuxième site de liaison aux PQs, le site Q_i situé à proximité de la face stromale. Ce site est impliqué dans un transfert cyclique d'électrons au sein du cytochrome *b₆f* appelé cycle Q proton-moteur (voir paragraphe I.D).

La plastocyanine (PC) est une protéine soluble du lumen de 10 kDa codée par le génome nucléaire. Relativement acide et contenant un atome de cuivre, la PC est mobile dans le lumen. Réduite par le cytochrome *f*, elle réduit à son tour le centre réactionnel du PSI (P₇₀₀⁺). Le photosystème I est constitué d'un centre réactionnel (appelé P₇₀₀) et d'antennes collectrices (LHC I) (Knaff, 1988). Le centre réactionnel contient une dizaine de sous-unités polypeptidiques, 40 à 65 molécules de chlorophylle a, une ou deux molécules de β-carotène, deux molécules de vitamine K₁ et trois centres fer-soufre (Nechushtai et al., 1996) (Figure 4). Les LHC I sont des composants protéines-chlorophylles minoritaires représentant 5 à 10% des pigments membranaires des thylacoïdes. Les deux protéines majeures du PSI, Psa A et Psa B sont codées par le génome chloroplastique. Des protéines à centres fer-soufre F_x et F_A/F_B sont liées au centre réactionnel et forment les premiers accepteurs stables du PS I. Les sous-unités Psa C, D, E, H sont impliquées dans l'organisation, la stabilisation du PS I et participent au transfert d'électrons vers la ferrédoxine, premier transporteur d'électrons soluble dans le stroma. La ferrédoxine est une protéine de 11 kDa codée par le génome nucléaire, constituée d'un centre fer-soufre binucléaire.

Enfin, la ferrédoxine NADP⁺ réductase (FNR), protéine hydrophyle de 35 kDa codée par le génome nucléaire, assure la réduction du NADP⁺ à partir de la ferrédoxine réduite. La FNR appartient à une classe importante de flavoenzymes qui utilisent une flavine adénine dinucléotide (FAD) liée de façon non covalente comme seul centre d'oxydoréduction (Karplus et al., 1991).

D. Gradient de protons trans-membranaire et synthèse d'ATP

Un gradient transmembranaire de protons est généré par le transfert photosynthétique d'électrons. En premier lieu, la photolyse de l'eau au niveau du PSII libère dans le lumen deux protons par paire d'électrons transférés à la chaîne ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ + \frac{1}{2}\text{O}_2$). Au cours de leur réduction, les plastoquinones empruntent deux protons côté stroma et les libèrent côté lumen lors de leur oxydation sur le site Q_o du cytochrome b_6/f (Deniau et Rappaport, 2000). Les plastoquinones servent ainsi de transporteur de protons à travers la membrane des

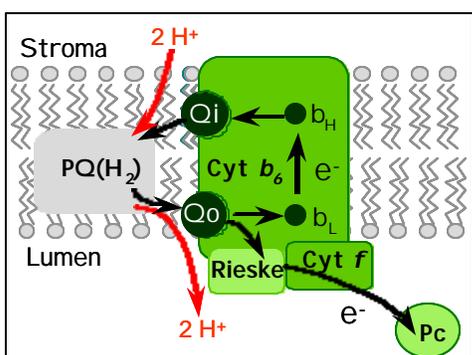


Figure 5. Schéma du transfert cyclique des électrons ou cycle Q proton-moteur au sein du cytochrome b_6/f (d'après Cramer et al., 1996). Les transferts d'électrons sont représentés en noir, les translocations de protons en rouge. Q_o : site d'oxydation des plastoquinols, Q_i : site de réduction des plastoquinones, b_L : hème à bas potentiel du cytochrome b , b_H : hème à haut potentiel du cytochrome b , Cyt f : cytochrome f .

thylacoïdes ($\text{PQ}_{\text{ox}} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \leftrightarrow 2\text{PQH}_2$) (Cox et Olsen, 1982). De plus, deux protons sont transportés du stroma vers le lumen par le cytochrome b_6/f au cours du cycle Q (Figure 5) (Cramer et al., 1996). Ce processus fonctionne sur le même modèle que le cycle Q mitochondrial qui a lieu au niveau du cytochrome b/c (Mitchell, 1975 ; Slater, 1983 ; Tang et Trumpower, 1986). Au site Q, au niveau de la face stromale de la membrane thylacoïdienne, une plastoquinone oxydée sert d'accepteur d'électrons du cytochrome b_6H . Ce transfert produit une semiquinone (anion PQ^-) qui sert d'accepteur pour un second électron provenant également du cytochrome b_6H . La plastoquinol PQH_2 ainsi formée diffuse à travers la membrane et cède ses protons

dans le lumen au site Q. En même temps, deux électrons sont cédés par PQH_2 , l'un au cytochrome b_6L , l'autre à la protéine de Rieske et enfin au cytochrome f de l'espace intermembranaire. La plupart des études mettant en évidence l'existence du cycle Q ont été menées *in vitro* sur des thylacoïdes isolés ou des chloroplastes (Selak et Whitmarsh, 1982 ; Hope et Matthews, 1988 ; Osborne et Geider, 1988). Certains auteurs considèrent ce mécanisme comme obligatoire pour chaque passage d'électrons (Davenport et McCarty, 1984 ; Rich, 1988 ; Kobayashi et al., 1995) et d'autres comme facultatif (Ort, 1986). Certains auteurs ont proposé que le cycle Q était inhibé sous forte lumière (Fowler et Kok, 1976 ; Graan et Hort, 1983 ; Berry et Rumberg, 1999) et d'autres que le cycle Q était actif sous

certaines conditions (Furbacher et al., 1989 ; Berry et Rumberg, 1999). Récemment, l'analyse *in vivo* des cinétiques de relaxation du shift électrochromique des caroténoïdes en réponse aux variations du gradient électrochimique trans-thylacoïdien (Junge, 1977) a conclu au caractère obligatoire du cycle Q (Sacksteder et al., 2000).

L'énergie contenue dans le gradient de protons transmembranaire, appelée force proton-motrice, est utilisée pour la synthèse d'ATP, grâce à un complexe protéique, l'ATP synthase, qui utilise l'ADP et le phosphate inorganique (Pi) (Hammes, 1983). Ce complexe protéique est présent chez tous les êtres vivants, dans la membrane plasmique des procaryotes et dans les membranes mitochondriales et thylacoïdiennes des eucaryotes photosynthétiques. L'ATP synthase utilise le flux de protons pour générer une liaison phosphoanhydride à haute énergie entre ADP et Pi. L'ATP synthase est un complexe multi-enzymatique qui contient deux parties : les facteurs de couplage CF₁ et CF₀ (Futai et al., 1989 ; Mc Carty, 1996) (Figure 4). CF₁ est une protéine hydrophile constituée de 9 sous-unités ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) (Boekema et Lübben, 1996). Extrinsèque à la membrane, elle réalise le couplage entre synthèse d'ATP et flux de protons. CF₀, qui constitue la partie intrinsèque du complexe, est un multimère comprenant 4 motifs polypeptidiques hydrophobes présents en multiples copies. Ce complexe constitue un canal à protons et assure l'ancrage de CF₁ à la membrane. Il a été initialement proposé que le fonctionnement des ATP synthases nécessite le passage de trois protons dans le canal de l'ATP synthase pour aboutir à la synthèse d'une molécule d'ATP (Portis et McCarty, 1976 ; Hangarter et Good, 1982). Des valeurs de 4 protons par molécule d'ATP ont également été proposées par certains auteurs (Rumberg et al., 1990 ; Kobayashi et al., 1995 ; Van Walraven et al., 1996) et semblent faire l'objet d'un consensus (pour une revue, voir Haraux et Kouchkovsky, 1998).

Ainsi, au cours du transfert photosynthétique d'électrons selon le schéma en « Z », une force proton-motrice est constituée. Dans l'hypothèse où le cycle Q serait absent, le transfert linéaire de deux électrons de H₂O à NADP⁺ conduirait à la libération de 4 H⁺ dans le lumen des thylacoïdes. Dans ces conditions, le rapport entre ATP et NADPH produits lors du transfert linéaire d'électrons serait de 1. Dans l'hypothèse où le cycle Q serait un mécanisme obligatoire, ce rapport atteindrait une valeur de 1,5.

E. Organisation des membranes thylacoïdiennes

La membrane thylacoïdienne des plantes supérieures est divisée en deux domaines caractérisés par des compositions biochimiques différentes : les lamelles du stroma (thylacoïdes non empilés) et les grana (thylacoïdes empilés) (Staehein et al., 1976; Albertsson et al., 1991) (Figure 1). Dans les zones granaires, les liaisons intermembranaires impliquent des cations divalents tels que le Mg^{2+} et sont facilitées par l'association des LHCII (Allen et Forsberg, 2001). La matrice lipidique de ces deux domaines présente des différences de fluidité et de composition protéique (Ford et al., 1982; Anderson et Anderson, 1980). Ainsi, la plus grande partie des PSII est présente dans les empilements granaires, tandis que la majorité des PSI et des ATP synthases se situent dans les lamelles (Figure 6) (Allred et Staehein, 1985; Anderson, 1989). Le complexe *b₆f* est distribué de manière plus uniforme entre les deux types membranaires. La liaison entre les deux photosystèmes est permise par la diffusion latérale des

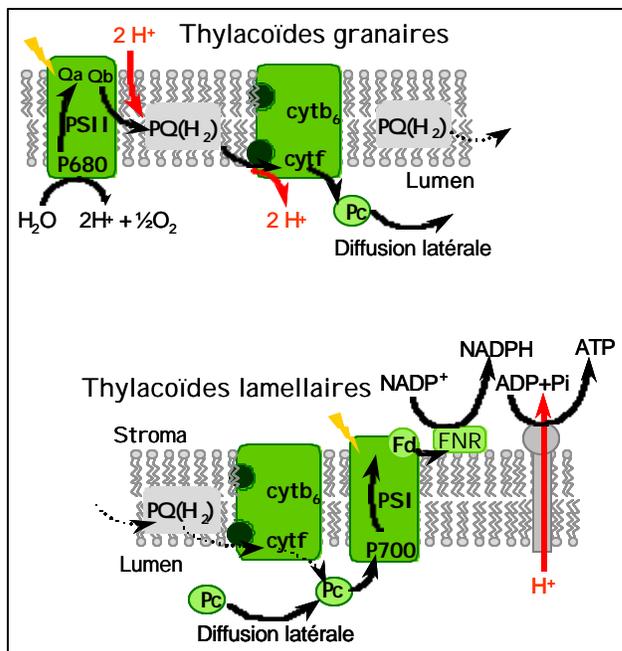


Figure 6. Schéma représentant l'organisation fonctionnelle des complexes protéiques photosynthétiques au sein des thylacoïdes granaires et lamellaires (d'après Allen et Forsberg, 2001). la liaison entre PS II et PS I est assurée majoritairement par la diffusion des plastocyanines réduites au sein du lumen. PS : photosystème, $PQ(H_2)$: Plastoquinones ou (plastoquinols), Pc : plastocyanine, Fd : ferrédoxine, FNR : ferrédoxine NADP⁺ réductase.

permise par la diffusion latérale des plastocyanines soluble dans le lumen et, dans une moindre mesure, par la diffusion du pool de plastoquinols. Une partie des LHCII du PS II sont mobiles, se détachent du PS II et migrent latéralement dans la membrane vers le PS I. Cette migration, appelée « changement d'état » permet une redistribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes (Fork et Satoh, 1986; Simpson et Knoetzel, 1996). La mobilité et la diffusion des LHCII à travers les membranes dépend de leur état de phosphorylation (Fork et Satoh, 1986; Allen, 1992) et résulte de l'activité d'une kinase. L'activité de cette kinase dépend du niveau d'oxydo-réduction de la chaîne de transfert

d'électrons entre les deux photosystèmes et particulièrement le pool de PQ et le cyt *b₆/f*. Il a été rapporté que le complexe cytochrome *b₆/f* soit préférentiellement localisé dans les thylacoïdes lamellaires lors des transitions d'état (Vallon et al., 1991). La séparation physique des photosystèmes et la mobilité des antennes collectrices permettent de contrôler les flux d'électrons en redistribuant l'énergie entre les deux photosystèmes (Anderson, 1992; Trissl et Wilhelm, 1993).

F. Assimilation photosynthétique du CO₂

Le cycle photosynthétique de réduction du carbone ou cycle de Calvin a lieu dans le stroma et permet la synthèse de carbohydrates à partir du CO₂ et de l'énergie chimique (ATP et NADPH) produite lors du transfert photosynthétique d'électrons (Figure 7). L'enzyme clé de ce cycle, la Rubisco (Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase oxygénase), lie une molécule de CO₂ au ribulose 1,5 bisphosphate (RuBP) pour former deux molécules d'acide 3 phosphoglycérique (3-PGA). Cette enzyme est la protéine la plus abondante chez les végétaux

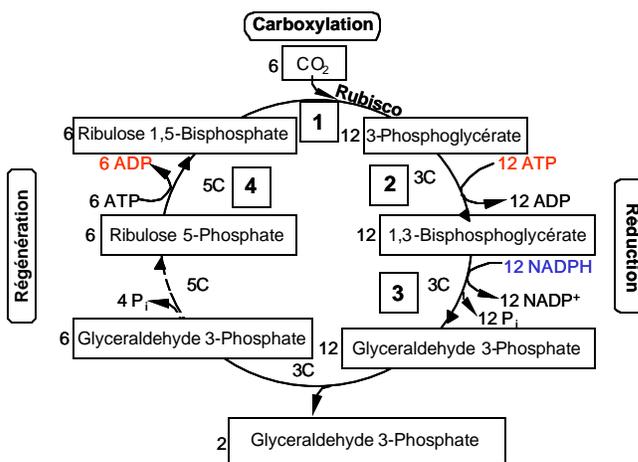


Figure 7. Cycle de Calvin ou cycle photosynthétique de réduction du carbone chez les plantes de type C₃. 1: Rubisco (RuBP carboxylase oxygénase) 2: 3-phosphoglycérate kinase, 3: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, 4: phosphoribulokinase.

supérieurs (environ 40% des protéines solubles de la feuille). Elle contient deux types de protomères, une grosse sous-unité catalytique codée par le génome chloroplastique et une petite sous-unité régulatrice codée par le genome nucléaire. Le 3-PGA formé est transformé en glycéraldéhyde 3-phosphate lors de deux réactions de phosphorylation et de réduction nécessitant de l'ATP et du NADPH. Les réactions suivantes permettent la régénération du RuBP, substrat de la Rubisco. Les trioses phosphates

formés sont utilisés pour la synthèse chloroplastique d'amidon ou exportés vers le cytosol. Au cours de ce dernier processus, le glycéraldéhyde 3-phosphate est isomérisé en dihydroxyacétone phosphate, transporté du chloroplaste vers le cytosol en échange d'un ion phosphate, et sert de précurseur à la synthèse du saccharose.

Au cours du cycle de Calvin, 18 molécules d'ATP sont hydrolysées et 12 molécules de NADPH sont oxydées. Le fonctionnement de ce cycle nécessite donc un rapport ATP/NADPH de 1,5 (Osmond, 1981).

G. Photorespiration

La Rubisco possède la particularité de fixer de manière compétitive le CO_2 et l' O_2 (Andrews et al., 1975). Ainsi, selon que son activité est de type carboxylase ou oxygénase, la Rubisco initie respectivement le cycle de Calvin ou le cycle photorespiratoire (Figure 8). La

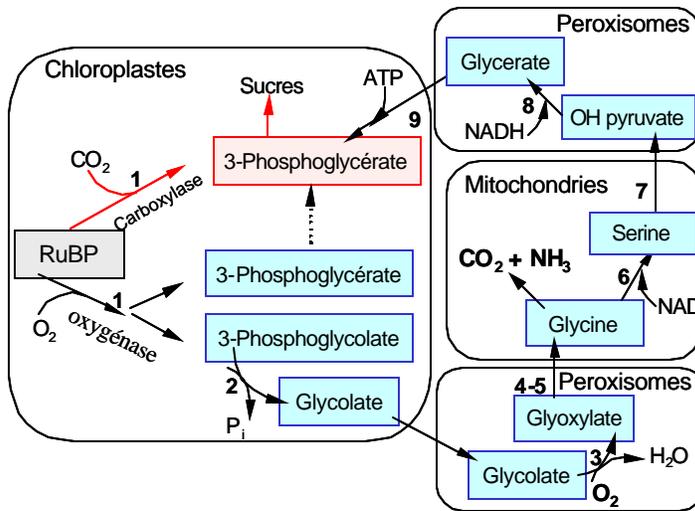


Figure 8. Cycle photorespiratoire, ou cycle photosynthétique d'oxydation du carbone (d'après Osmond, 1981). RuBP : ribulose 1,5-bisphosphate, 1 : Rubisco, 2 : phosphoglycolate phosphatase, 3 : glycolate oxydase, 4 : sérine-glyoxylate aminotransférase, 5 : glutamate-glyoxylate aminotransférase, 6 : sérine hydroxyméthyl transférase, 7 : glutamate-hydroxypyruvate aminotransférase, 8 : glycérate déshydrogénase, 9 : glycérate kinase. Les étapes du cycle photorespiratoire sont représentées en bleu, celles du cycle de Calvin en rouge.

photorespiration tient son nom du fait que ce processus consomme de l' O_2 et aboutit à un rejet de CO_2 à la lumière.

L'oxygénation du RuBP conduit à la formation d'une molécule de 3-PGA (disponible pour le cycle de Calvin) et d'une molécule de phosphoglycolate. Le phosphoglycolate est

déphosphorylé en glycolate dans le chloroplaste, oxydé en glyoxylate dans les peroxysomes et donne lieu à la formation de glycine suite à une réaction de transamination. Au sein des mitochondries, deux

molécules de glycine sont décarboxylées et donnent lieu à la formation d'une molécule de sérine, d'une molécule de NH_4^+ et d'une molécule de CO_2 (Tolbert, 1982). L'ammonium (NH_4^+), dont l'accumulation est toxique pour la cellule végétale, est ensuite recyclé par le cycle GS/GOGAT (Glutamine synthase/Glutamate synthase) au sein des chloroplastes. Après transport de la mitochondrie vers les peroxysomes, la sérine est convertie en hydroxypyruvate, qui est à son tour réduit en glycérate par l'hydroxypyruvate réductase. Le

glycérate est alors phosphorylé par la glycérate kinase dans le chloroplaste, et le phosphoglycérate qui en résulte est converti en RuBP par le cycle de Calvin. Les réactions chimiques de la voie photorespiratoire impliquent une coordination étroite entre les métabolismes des chloroplastes, des mitochondries et des peroxisomes, organites souvent proches les uns aux autres dans les cellules photosynthétiques des végétaux supérieurs (Figure 9).

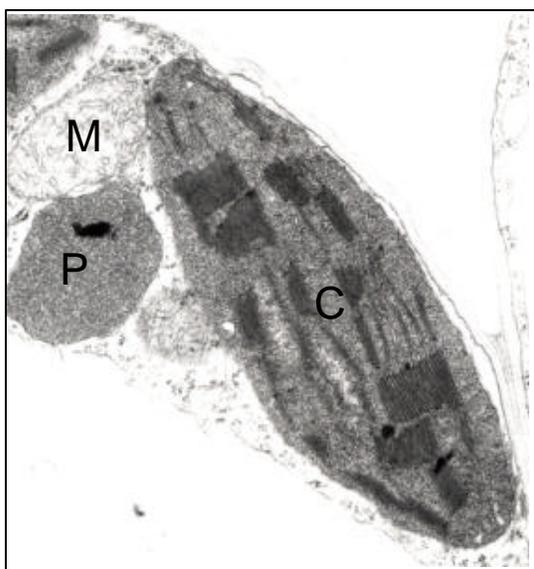


Figure 9. Micrographie par transmission électronique d'une cellule de *Nicotiana tabacum* (5000x) soulignant la promiscuité entre chloroplaste (C), mitochondrie (M) et peroxysome (P). Cliché aimablement fourni par F. Eymery (CEA Cadarache).

Bien que l'affinité de la Rubisco pour le CO_2 soit nettement plus forte que pour l' O_2 , la forte teneur en oxygène de l'atmosphère (21%) comparée au CO_2 (0,035%), rend cette réaction non négligeable chez les végétaux supérieurs. En conditions naturelles, le taux de rejet de CO_2 par la photorespiration avoisinerait 25% à 50% du taux net d'assimilation du CO_2 (Gerbaud et André, 1979 ; Husic et al., 1987 ; Sharkey, 1988). La photorespiration est favorisée en situation de stress hydrique, la fermeture stomatique provoquant une baisse de la teneur interne en CO_2 et favorisant la photorespiration. Cette dernière aboutit à une perte d'énergie et de carbone mais pourrait jouer un rôle physiologique important en drainant l'excès de

pouvoir réducteur, lorsque l'apport en CO_2 est limitant, ce qui permettrait d'éviter la formation de formes toxiques de l'oxygène et limiterait les dommages subis par l'appareil photosynthétique (Kozaki et Takeba, 1996).

La photorespiration augmente le coût énergétique de la fixation du CO_2 . D'une part, le recyclage du NH_3 et la conversion du glycérate en 3-PGA sont des étapes qui nécessitent un apport énergétique sous forme d'ATP (Osmond, 1981). D'autre part, la conversion de la molécule de 3-phosphoglycérate issue du cycle photorespiratoire en RuBP, molécule disponible pour le cycle de Calvin, nécessite également de l'ATP. Ainsi, les rendements maximum de la photosynthèse sont obtenus en l'absence de photorespiration, comme par exemple sous de faibles teneurs en O_2 ou de fortes concentrations en CO_2 (CO_2 350 ppm ; O_2 1%). Dans ces conditions, la fixation d'une molécule de CO_2 nécessite 3 molécules d'ATP et 2 de NADPH ce qui correspond à un rapport ATP/NADPH de 1,5. Les coûts maximum de

fixation de CO_2 , sont obtenus au point de compensation en CO_2 , point pour lequel le bilan des échanges gazeux est nul, les réactions produisant du CO_2 (respiration et photorespiration) égalant les réactions consommant du CO_2 (photosynthèse). Dans ces conditions, la fixation d'une molécule de CO_2 nécessite 10 molécules d'ATP et 6 de NADPH, correspondant à un rapport ATP/NADPH de 1,66. L'assimilation du carbone requiert donc un ratio ATP/NADPH variant entre 1,5 et 1,66 selon l'activité photorespiratoire tandis que le transfert linéaire d'électrons permet la génération d'un ratio ATP/NADPH théorique variant entre 1 et 1,5 en fonction de l'efficacité du cycle Q. Dans ces conditions, et même si l'on considère que le cycle Q est constitutif, le transfert linéaire d'électrons selon le schéma en « Z » est insuffisant pour subvenir aux besoins énergétiques de la fixation du carbone.

H. Respiration et photosynthèse

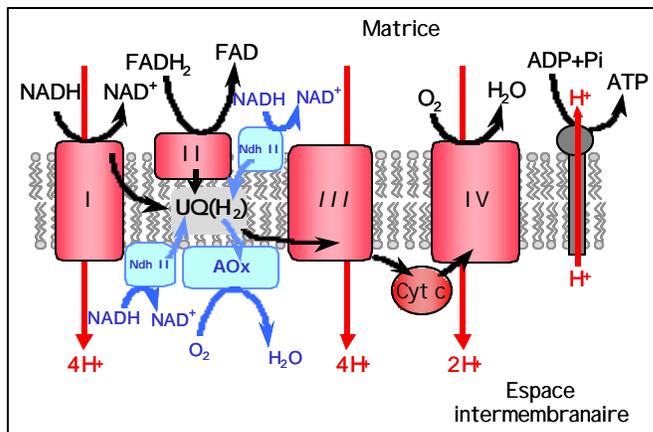


Figure 10. Représentation schématique du transfert d'électrons et des translocations de protons au sein de la membrane interne des mitochondries au cours de la respiration des plantes supérieures (d'après Vanlerberghe et McIntosh, 1997). Les transferts d'électrons sont représentés en noir, les translocations de protons en rouge. Les complexes protéiques communs à tous les organismes eucaryotes sont représentés en rouge, les éléments alternatifs, propres aux organismes végétaux, en bleu. UQ(H₂) : ubiquinone/(ubiquinol), Complexe I : NADH déshydrogénase, complexe II : succinate déshydrogénase, complexe III : cytochrome *bc*₁ oxydoréductase, complexe IV : cytochrome *c* oxydase, Ndh II : NADH déshydrogénase de type II non électrogénique, AOx : oxydase alternative.

IV). Au cours de ce transfert respiratoire d'électrons un gradient de protons est généré entre la

Dans la matrice des mitochondries, le cycle de Krebs réalise l'oxydation complète des molécules organiques en CO_2 , aboutissant à la réduction du NAD^+ et du FAD. Le pouvoir réducteur ainsi formé est réoxydé par une chaîne de transporteurs d'électrons, faisant intervenir des complexes protéiques localisés au sein de la membrane interne des mitochondries. La première étape de ce transfert est assurée par le complexe NADH déshydrogénase (complexe I) qui oxyde le NADH (Figure 10). Les électrons transitent ensuite à travers le pool d'ubiquinone, le cytochrome *bc*₁ (complexe III) et le complexe cytochrome *c* oxydase (complexe

matrice et l'espace intermembranaire grâce à l'activité électrogénique des complexes I, III et IV, aboutissant à la synthèse d'ATP, via les ATPases qui utilisent la force proton-motrice ainsi générée. Les mitochondries végétales présentent également des voies de transferts alternatifs d'électrons (Douce et Neuburger, 1989) dont plusieurs types de NAD(P)H-ubiquinone réductases non électrogéniques qui permettent de réduire le pool d'ubiquinone à partir du NADH. Elles contiennent aussi une oxydase alternative (Vanlerberghe et McIntosh, 1997) qui permet de court-circuiter le transfert des électrons du pool d'ubiquinone directement vers l'oxygène moléculaire.

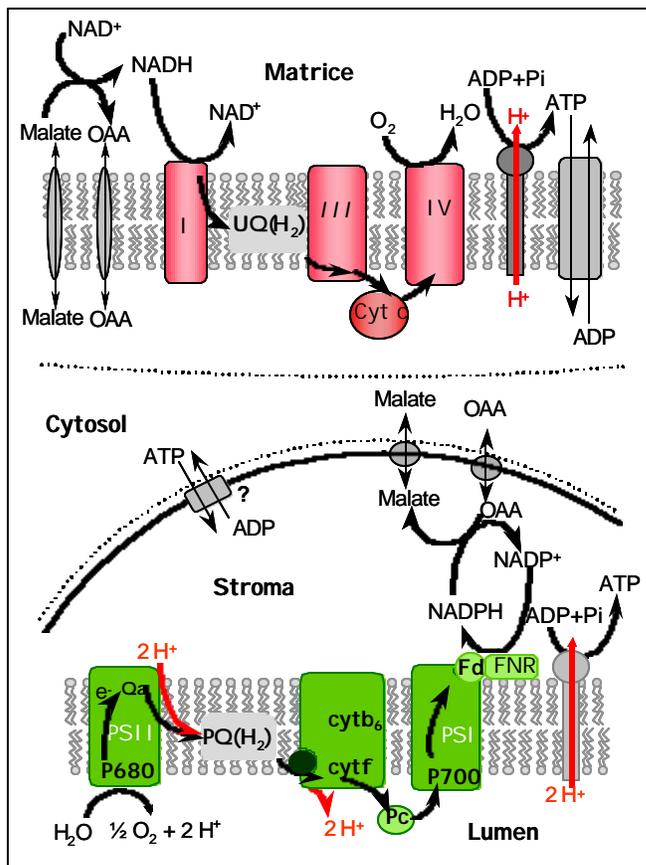


Figure 11. Schéma représentant certaines interactions redox et énergétiques entre mitochondrie et chloroplaste (d'après Hoefnagel et al., 1998). La membrane externe du chloroplaste et de la mitochondrie, perméable, est représentée en pointillés. L'activité d'import du translocateur ATP/ADP de l'enveloppe chloroplastique est faible sur des chloroplastes matures. OAA : oxaloacetate.

Chez les végétaux supérieurs, la respiration et la photosynthèse ayant des bilans d'échanges gazeux antagonistes, il est difficile d'avoir une mesure précise de l'activité respiratoire lorsque la photosynthèse est active. La non-linéarité du rendement photosynthétique observée à faibles intensités lumineuses (appelée « effet Kok ») a été interprétée par une inhibition progressive de la respiration à la lumière (Kok, 1949 ; Sharp et al., 1984). La mesure de l'activité respiratoire à la lumière par l'incorporation de molécules radiomarquées intermédiaires du cycle du citrate a montré que celui-ci ainsi que la glycolyse sont des processus actifs à la lumière, même si leurs niveaux respectifs sont réduits (Graham, 1980). D'autres auteurs ont proposé que la respiration ne soit pas

(Peltier et Thibault, 1985 ; Weger et al., 1989) ou seulement partiellement inhibée (Bate et al., 1988 ; Calvin et al., 1980) à la lumière.

Malgré l'absence de transporteurs spécifiques, le NADH peut être transporté grâce à l'activité de certains antiports tel que celui de l'oxaloacetate/malate (Heineke et al., 1991 ; Flügge, 1998). Ainsi, grâce à cet échange de métabolite et de pouvoir réducteur, les chloroplastes et les mitochondries sont en étroite relation avec le cytosol, ce qui permet un équilibre rédox entre compartiments (Krömer, 1995 ; Hoefnagel, 1998) (Figure 11). Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, lorsque la respiration mitochondriale est inhibée avec de l'antimycine A et du SHAM à l'obscurité, le rapport NADPH/NADP⁺ augmente dans les chloroplastes (Gans et Rebeillé, 1990) (Figure 11). Chez les végétaux supérieurs, Krömer et al. (1988) et Krömer et Heldt (1991) ont observé que l'oligomycine, un inhibiteur puissant des ATPases mitochondriales, réduisait les capacités photosynthétiques mesurées sur des protoplastes alors que celle-ci était inefficace sur des chloroplastes isolés. Ces auteurs proposent que les chloroplastes, excédentaires en NADPH (par rapport à l'ATP), exportent du pouvoir réducteur vers les mitochondries qui effectueraient sa conversion en ATP. Ce mécanisme participerait ainsi au ré-équilibrage du ratio ATP/NADPH au cours de la photosynthèse. Un mécanisme similaire a été proposé pour expliquer la croissance photoautotrophe de souches révertantes de *Chlamydomonas* dont l'ATPase chloroplastique est inopérante (Lemaire et al., 1988). L'ATP pourrait être importé au sein du chloroplaste via le translocateur ATP/ADP ou à travers la navette dihydroxyacetone phosphate/ 3-PGA (Hoefnagel et al., 1998).

II. Transferts d'électrons alternatifs au schéma en « Z »

En dehors des réactions de transfert linéaire d'électrons impliquées dans le schéma classique du trajet en « Z » de la photosynthèse, d'autres voies de transfert d'électrons ont été décrites dans les chloroplastes des algues unicellulaires et des plantes supérieures.

A. Réaction de Mehler

Au cours de la photosynthèse, l'oxygène moléculaire peut être utilisé par le PS I comme accepteur final d'électrons de la chaîne photosynthétique, conduisant à la formation d'anion superoxyde au cours de réactions appelées réactions de Mehler (Mehler, 1951 ; Mehler et

Brown, 1952). Les formes actives de l'oxygène ainsi générées sont détoxifiées par une suite de réactions enzymatiques faisant intervenir la superoxyde dismutase (SOD) et le cycle ascorbate-glutathion. Les radicaux superoxyde sont transformés en peroxyde d'hydrogène

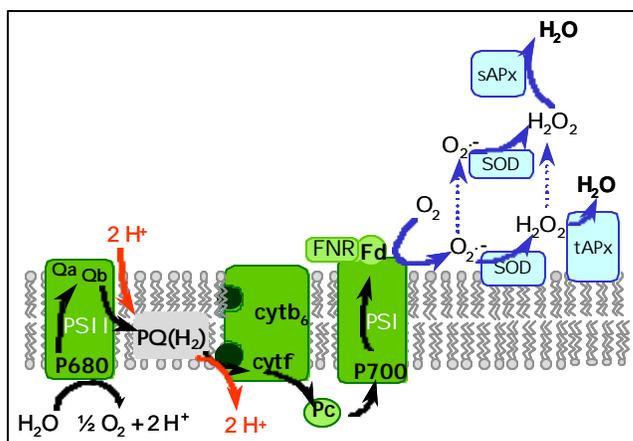


Figure 12. Schéma représentant le transfert pseudocyclique d'électrons et les réactions de photoréduction directe de l'oxygène (d'après Asada, 1999). Les transferts d'électrons linéaires sont représentés en noir, les translocations de protons en rouge. Les transferts alternatifs correspondant à la détoxification des formes actives de l'oxygène sont représentés en bleu. SOD : superoxyde dismutase, tAPx : ascorbate peroxydase ancrée dans la membrane des thylacoïdes, sAPx : ascorbate peroxydase du stroma.

(H₂O₂) par la SOD. Le H₂O₂ est ensuite réduit en H₂O par l'ascorbate peroxydase (APx). La régénération de l'ascorbate se fait soit via la ferrédoxine et une monodéhydroascorbate réductase NADP-dépendante, soit par l'intermédiaire d'une déhydroascorbate réductase et de la glutathion réductase (Foyer et Haliwell, 1976 ; Miyake et Asada, 1994). Cette séquence de réactions enzymatiques qui produit de l'oxygène au niveau du PS II et en consomme au niveau du PSI conduit à un bilan nul pour les échanges nets d'O₂. Cependant, ce transfert

d'électrons permet l'établissement d'un gradient de protons et la synthèse d'ATP. Pour cette raison, l'ensemble de ces réactions est également appelé photophosphorylation pseudocyclique (Asada, 1999) (Figure 12).

Les réactions de Mehler ont été mises en évidence sur des chloroplastes isolés (Mehler, 1951; Asada, 1999), mais leur importance réelle au sein des feuilles intactes reste controversée (Badger, 1985; Badger et al., 2000). Chez les plantes C₃, des données intéressantes proviennent de l'utilisation de plantes de tabac transgéniques antisens pour l'ARNm de la petite sous-unité de la Rubisco. Chez des plantes dont la teneur en Rubisco est réduite de 90%, la relation entre le transport des électrons et l'assimilation du CO₂ reste parfaitement linéaire quelle que soit l'intensité lumineuse (Ruuska et al., 2000). La baisse des activités carboxylase et oxygénase de la Rubisco n'entraîne pas une réorientation des électrons vers d'autres accepteurs terminaux d'électrons tels que l'O₂ au cours des réactions de Mehler (Ruuska et al., 2000; Badger, 2000). Il a toutefois été proposé que le transfert pseudocyclique intervienne lors d'un stress hydrique (Asada, 1999 ; Polle, 1996 ; Flexas et al., 1999), et puisse intervenir dans la dissipation de l'énergie lumineuse, minimisant les

dommages que pourraient occasionner cette situation (Asada, 2000). Cependant, d'après Badger et al., (2000) , les réactions de Mehler ne semblent pas représenter un flux important d'électrons chez les plantes C₃, la photorespiration étant vraisemblablement responsable de la grande majorité de la prise d'O₂ mesurée à la lumière.

B. Transfert cyclique des électrons autour du PS I

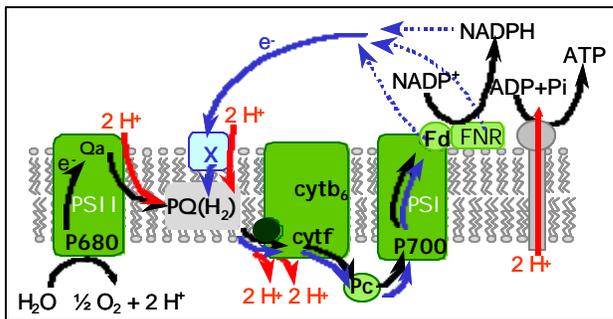


Figure 13. Schéma représentant le transfert cyclique des électrons autour du PS I. Les transferts d'électrons linéaires sont représentés en noir, les translocations de protons en rouge. Les transferts alternatifs d'électrons reliés au transfert cyclique autour du PS I sont représentés en bleu.

En l'absence de PS II, une synthèse d'ATP est possible grâce à un transfert cyclique d'électrons autour du PS I au cours duquel les électrons situés coté accepteurs du PS I (ferrédoxine, FNR ou NADPH) sont redirigés vers les transporteurs situés entre les deux photosystèmes, tels que le pool de PQ ou le cytochrome *b₆f* (Huber et Edwards, 1976; Malkin et Chain, 1980). Ce mécanisme s'accompagne d'un transfert

de protons du stroma vers le lumen des thylacoïdes permettant ainsi l'établissement de la synthèse d'ATP par le jeu des photophosphorylations cycliques (Arnon, 1955). Initialement, ces mécanismes ont été étudiés *in vitro* en suivant l'ATP formé sur des thylacoïdes isolés (Arnon et Chain, 1975; Bedell et Govindjee, 1973) ou les variations de pH du lumen sur des chloroplastes intacts avec un traceur fluorescent tel que l'acridine (Heber et al., 1978). Sur des thylacoïdes isolés, ces réactions nécessitent généralement l'ajout de ferrédoxine réduite (Arnon et al., 1967; Arnon et Chain, 1975; Malkin et Chain, 1980; Moss et Bendall, 1984). Le transfert cyclique des électrons autour du PS I, de la même manière que le transfert linéaire des électrons, est inhibé par le DBMIB, un analogue des quinones qui agit au niveau du site Q_B du cytochrome *b₆f* (Trebst, 1974; Cleland et Bendall, 1992). L'oxydation du pool de PQ par le complexe cytochrome *b₆f* apparaît donc comme une étape obligatoire du transfert cyclique, le retour des électrons en provenance du côté accepteur du PS I se faisant préférentiellement au niveau du pool de PQ (Figure 13).

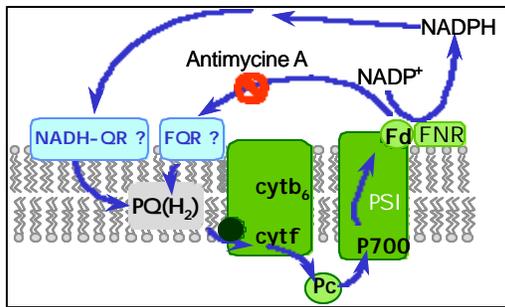


Figure 14. Représentation schématique des différentes voies de transfert cyclique des électrons autour du PS I proposées *in vitro* sur des chloroplastes ou *in vivo* chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (d'après Ravenel et al., 1994). FQR : ferrédoxine PQ oxydoréductase ; NADH-QR : NADH PQ oxidoréductase.

Le transfert cyclique est inhibé par l'antimycine A (Tagawa et al., 1963 ; Arnon et al., 1967) alors que cet antibiotique n'affecte ni le cytochrome *b₆f* ni le transfert linéaire (Hauska et al., 1983). La nature moléculaire des transporteurs d'électrons impliqués dans le transfert cyclique et sensibles à l'antimycine n'est pas élucidée. La ferrédoxine réduite étant capable de réduire la chaîne de transfert d'électrons (Tagawa et al., 1963 ; Arnon et Chain, 1979 ; Kimata-Arigo et al., 2000) et il a été suggéré qu'une activité ferrédoxine plastoquinone réductase (FQR) soit

impliquée dans la réduction du pool de PQ (Moss et Bendall, 1984). Cette enzyme, qui n'est caractérisée ni au niveau biochimique ni au niveau moléculaire, pourrait constituer le site d'action de l'antimycine A (Cleland et Bendall, 1992). Etant donné le fort pouvoir inhibiteur de l'antimycine A sur le transfert cyclique des électrons, Bendall et Manasse (1995) ont suggéré que la voie de réduction impliquant la FQR pourrait constituer la voie principale de transfert cyclique. Cependant, différents auteurs ont suggéré l'existence d'autres voies de transfert cyclique autour du PS I (Figure 14). Ainsi, Hosler et Yocum (1985) ont décrit des conditions expérimentales au cours desquelles le transfert cyclique étudié sur des thylacoïdes isolés était insensible à l'antimycine A et ont proposé que, sous certaines conditions, une autre voie de réduction du pool de PQ puisse prendre en charge l'activité cyclique. La FNR pourrait être impliquée dans la voie insensible à l'antimycine A (Hosler et Yocum, 1985 ; Cleland et Bendall, 1992 ; Scheller, 1996). D'autres voies de réduction non photochimique des plastoquinones, impliquant notamment des activités de type NAD(P)H PQ oxydoréductases, ont été décrites. Ainsi, sur des membranes de thylacoïdes de *Chlamydomonas reinhardtii*, le NADH peut céder ses électrons à la chaîne photosynthétique (Godde et Trebst, 1980). De plus, un apport exogène de NADH ou de NADPH sur des thylacoïdes d'épinards ou de pomme de terre permet la réduction non photochimique des PQ (Mills et al., 1979 ; Endo et al., 1997 ; Cornéille et al., 1998). L'existence de plusieurs voies de transfert cyclique des électrons autour du PS I pourrait conférer une certaine flexibilité à ce mécanisme. Ainsi, Hosler et Yocum (1987) ont conclu que la contribution respective des deux voies dépendait des conditions rédox. L'existence de deux voies de transfert cyclique, dont l'une sensible à

l'antimycine A, a été également proposée *in vivo*, chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Ravenel et al., 1994).

Le transfert cyclique des électrons, qui permet une synthèse d'ATP sans générer de pouvoir réducteur, pourrait participer au ré-équilibrage du ratio ATP/NADPH au sein des chloroplastes et ainsi permettre l'optimisation du cycle de Calvin. L'effet inhibiteur de l'antimycine A sur la fixation du CO₂ mesurée sur des chloroplastes (Woo, 1983) ou sur des protoplastes (Furbank et Horton, 1987) a été interprété par une participation des photophosphorylations cycliques à l'assimilation du CO₂.

In vivo, les variations d'absorption à 545 nm sont corrélées aux variations du gradient de pH entre le lumen et le stroma (Heber, 1978) et ont été utilisées pour évaluer l'activité du transfert cyclique des électrons autour du PSI. Par ailleurs, des mesures de fluorescence de la chlorophylle, soit en conditions anaérobies (Harris et Heber, 1993), soit après une période d'éclairement ont été utilisées pour mettre en évidence la réduction non-photochimique du pool de PQ (Groom et al., 1993 ; Feild et al., 1998 ; Farineau, 2000). De même, des mesure de cinétique de re-réduction du P₇₀₀⁺, après son oxydation avec un éclairage en rouge lointain, permettent d'estimer l'entrée des électrons dans la chaîne de transfert d'électrons à partir du pouvoir réducteur stromal (Schreiber et al., 1988). Ces mesures ont été considérées par certains auteurs comme rendant compte de l'activité cyclique autour du PS I (Schreiber et al., 1988; Asada et al., 1993).

La technique de spectrométrie photoacoustique permet une estimation de l'activité cyclique par la mesure du stockage photochimique d'énergie. Les variations d'émission de chaleur en réponse à un éclairage modulé, modifient la pression de l'air de la couche limite entourant l'échantillon foliaire et forment une onde acoustique mesurée à l'aide d'un microphone (Lasser-Ross et al., 1980). L'excitation sélective du PS I par un éclairage rouge lointain permet de mesurer le stockage photochimique qui rend compte de l'activité de transfert cyclique. Par cette technique, différents auteurs ont souligné les très faibles activités de transfert cyclique mesurées chez les plantes C₃ (Herbert et al., 1990; Malkin et al., 1992; Havaux et al., 1991; Havaux, 1992) si on les compare aux plantes C₄ (Herbert et al., 1990; Havaux, 1992; Asada et al., 1993), aux algues unicellulaires (Maxwell et Biggins, 1976; Ravenel et al., 1994) ou aux cyanobactéries (Mi et al., 1992). Au sein des cellules de la gaine périvasculaire des plantes C₄, le PSII est très peu abondant (Woo et al., 1970) et l'assimilation du carbone est dépendante de l'activité du transfert cyclique autour du PSI pour la fourniture en ATP (Legood et al., 1981). Chez les cyanobactéries, il a été suggéré que l'activité de transfert cyclique serve à l'énergisation de la membrane permettant l'import de

certaines ions tel que bicarbonate (pour une revue, voir Fork et Herbert, 1993) et soit stimulée lors de stress salin (Jeanjean et al., 1993).

Il est généralement considéré que l'activité cyclique des plantes C_3 est faible et qu'elle joue un rôle mineur dans l'assimilation du CO_2 (Bendall et Manasse, 1995 ; Fork et Herbert, 1993). L'activité cyclique pourrait être toutefois stimulée en conditions de stress et permettre une protection du PSII grâce à un contrôle de son activité par le pH du lumen (Heber et Walker, 1992 ; Heber et al., 1995 ; Cornic et al., 2000). Certains auteurs ont proposé que l'activité de photophosphorylation cyclique soit régulée par l'état rédox de la chaîne de transfert d'électrons (Arnon et Chain, 1975, 1979) ou au niveau du pool de NADPH (Takahama et Heber, 1981 ; Hosler et Yocum, 1987). L'activité du transfert cyclique serait inhibée lorsque la chaîne de transfert d'électrons est totalement réduite (Ziem-Hanck et Heber, 1980) ou totalement oxydée (Arnon et Chain, 1979). Il a été proposé que l'oxygène moléculaire intervienne dans ces processus en interagissant au niveau des accepteurs du PSI (Arnon et Chain, 1975 ; Heber et al., 1978) ou entre les deux photosystèmes (Harris et Heber 1993).

Bien que les études menées *in vitro* aient permis de caractériser plusieurs voies de transfert cyclique autour du PSI, la nature moléculaire des transporteurs d'électrons impliqués dans la réduction du pool de PQ reste à déterminer. *In vivo*, l'existence d'un transfert cyclique chez les plantes de type C_3 ainsi que le rôle physiologique de ce processus restent à établir

C. Chlororespiration

L'existence d'une interaction entre le pool de PQ et l'oxygène moléculaire a été proposée pour expliquer les effets de l'anaérobiose (Diner et Mauzerall, 1973) ou d'inhibiteurs d'oxydases respiratoires (Bennoun, 1982) sur l'état rédox du pool de PQ à l'obscurité chez des algues unicellulaires telles que *Chlamydomonas reinhardtii*. Le terme de « chlororespiration » a été utilisé pour décrire l'activité d'une chaîne de transfert d'électrons respiratoire hypothétique qui existerait au sein de la membrane thylacoïdienne des chloroplastes (Bennoun, 1982). D'après le modèle initialement proposé, la chlororespiration ferait intervenir une étape de réduction non photochimique du pool de PQ et une étape d'oxydation non photochimique du pool de PQ utilisant l'oxygène moléculaire comme accepteur final d'électrons (Figure 15). En parallèle, un gradient électrochimique serait généré de part et d'autre de la membrane thylacoïdienne. Chez les plantes supérieures, certains auteurs ont rapporté les effets d'inhibiteurs d'oxydases respiratoires, tels que le cyanure et le monoxyde de carbone, sur l'état rédox des transporteurs d'électrons entre les deux

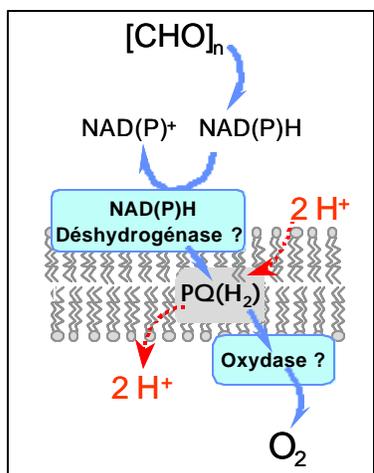


Figure 15. Représentation schématique des interactions possibles entre le pool de PQ et une chaîne respiratoire hypothétique au sein des thylacoïdes (d'après Bennoun, 1982).

photosystèmes, et ont conclu à l'existence de la chlororespiration (Garab et al. 1989 ; Feild et al. 1998). Toutefois, l'interprétation de l'ensemble de ces expériences, réalisées sur des organismes intacts, était basée sur l'hypothèse implicite que le chloroplaste et la mitochondrie ne sont pas en interaction rédox. La découverte d'une communication rédox entre les deux organites (voir paragraphe I.H) permettrait d'expliquer ces effets par une inhibition de la respiration mitochondriale. Ainsi, il a été rapporté que l'inhibition de la respiration mitochondriale chez *Chlamydomonas reinhardtii* aboutit à une augmentation de la concentration en NADPH dans le stroma des chloroplastes et favoriserait la réduction non photochimique du pool de PQ (Gans et Rebeillé, 1990). L'utilisation de

souches de *Chlamydomonas reinhardtii* mutantes dont le cytochrome *bc₁* mitochondrial est insensible au myxothiazol a permis de démontrer que l'effet de ce composé sur le niveau d'oxydation des PQ est lié à une inhibition de la respiration mitochondriale (Bennoun, 1994).

Il a été montré, par ailleurs, que des flashes lumineux inhibent transitoirement une prise d'oxygène de type respiratoire chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Peltier et al., 1987). Ce phénomène étant insensible à l'inhibition de la respiration mitochondriale, il a été attribué à une interaction électronique entre chaînes de transfert d'électrons photosynthétique et chlororespiratoire. Ces auteurs ont observé que le PSI inhibe transitoirement l'activité chlororespiratoire, tandis que le PSII la stimule.

Après sa réduction, notamment en réponse à une forte illumination, le pool de PQ est réoxydé par une voie non photochimique qui fait intervenir l'O₂ (Harris et Heber 1993). Il a été proposé que le cytochrome *b₅₅₉* (Kruk et Strzalka, 1999) ou une hydroquinone peroxydase (Casano et al., 2000) soient impliqués dans ce processus.

Différentes fonctions ont été attribuées à la chlororespiration parmi lesquelles la production d'ATP et l'énergétisation de la membrane thylacoïdienne à l'obscurité (Bennoun, 1982), la réoxydation du pouvoir réducteur généré par la dégradation de l'amidon (Gfeller et Gibbs, 1985 ; Singh et al., 1992) ou encore l'adaptation à des conditions environnementales extrêmes (Peltier et Schmitt, 1991 ; Lajko et al., 1997). Cependant, en l'absence d'identification d'une oxydase chloroplastique, l'existence d'une activité chlororespiratoire a été largement controversée (Bennoun, 1994 ; Bennoun, 1998 ; Nixon, 2000).