

La production d'oxygène par les plantes

GOVINDJEE et William COLEMAN

Grâce à un cycle biochimique à quatre temps, les plantes et certaines bactéries absorbent l'énergie solaire et décomposent les molécules d'eau en oxygène gazeux, en protons et en électrons.

On imagine difficilement que des organismes simples ont vécu sans oxygène pendant des millions d'années. Pour ces organismes anaérobies primitifs, l'oxygène était même un poison, car il extrayait les électrons essentiels de certaines biomolécules. Pourquoi de nombreuses cellules anaérobies auraient-elles alors produit, par photosynthèse, l'oxygène que nous respirons aujourd'hui dans l'atmosphère? Et comment la photosynthèse conduit-elle à la libération d'oxygène? On l'a longtemps ignoré, mais on élucide aujourd'hui les mécanismes détaillés de cette synthèse.

Par la photosynthèse, les cellules, absorbant l'énergie solaire, transforment le gaz carbonique en glucides. La production d'oxygène est superflue : les premiers organismes anaérobies effectuaient la photosynthèse sans produire d'oxygène, et certains organismes actuels fonctionnent encore ainsi.

La production d'oxygène, par les végétaux et leurs ancêtres, s'est imposée pour des raisons métaboliques. Le Soleil communique aux organismes terrestres l'énergie dont ils ont presque tous besoin, mais les cellules ne peuvent ni stocker ni utiliser directement la lumière : celle-ci doit être transformée en énergie chimique, plus facilement utilisable. Or la plupart des réactions énergétiques, dans les cellules, équivalent à des transferts d'électrons entre molécules.

Où les cellules trouvent-elles les électrons dont elles ont besoin pour vivre? Généralement les bactéries photo-

synthétiques qui ne produisent pas d'oxygène extraient ces électrons d'acides organiques ou de composés minéraux simples, qu'elles «oxydent». Cependant ces molécules sont relativement rares, et de telles bactéries ne survivent aujourd'hui que dans des sources sulfureuses, au fond de lacs volcaniques ou dans les environnements où ces molécules sont suffisamment abondantes.

Il y a quelque trois milliards d'années, certaines cellules photosynthétiques commencèrent à coloniser les environnements les plus variés, parce qu'elles étaient devenues capables d'extraire des électrons d'une substance omniprésente, l'eau. Plus précisément, elles commencèrent à décomposer les molécules d'eau (H_2O) en électrons, en protons (ions H^+ ou noyaux d'hydrogène) et en oxygène moléculaire (O_2). Les électrons et les protons étaient des espèces chimiques utiles, et l'oxygène n'était qu'un sous-produit de la réaction. Initialement la production d'oxygène n'avait pas d'intérêt propre, mais elle permit la colonisation de nouveaux environnements.

La production d'électrons à partir de l'eau ne fut pas une mince affaire, car les molécules d'eau cèdent difficilement leurs électrons. Or les premières bactéries photosynthétiques ne formaient, à partir de la lumière solaire, qu'un oxydant (ou molécule acceptrice d'électrons) faible. Le remplacement de celui-ci par un oxydant beaucoup plus puissant fut insuffisant, car l'énergie d'un photon (un «grain» de lumière)

visible est inférieure à l'énergie de dissociation d'une molécule d'eau. Les cellules ont alors dû utiliser l'énergie de quatre photons pour dissocier deux molécules d'eau et libérer quatre protons et quatre électrons. Une nouvelle difficulté apparut : l'appareil photochimique ne peut fournir qu'un électron à la fois.

Le problème fut résolu quand l'Évolution forgea le cycle d'oxydation de l'eau, une succession d'étapes où les électrons, transférés un à un dans chaque réaction intermédiaire, sont stabilisés. Les études des dernières années nous ont fait progresser dans la compréhension du cycle d'oxydation de l'eau, et elles ont révélé son rôle dans la photosynthèse.

Le photosystème II

Chez les plantes supérieures, les réactions primaires de la photosynthèse ont lieu dans les membranes de vésicules appelées thylacoïdes, elles-mêmes présentes dans des organites cellulaires spécialisés, les chloroplastes ; la membrane des thylacoïdes renferme de nombreuses protéines qui participent à la photosynthèse. L'oxygène ne se forme que dans le complexe de protéines et de pigments nommé le photosystème II, qui existe dans tous les organismes photosynthétiques producteurs d'oxygène : les cyanobactéries, les algues et les autres plantes contenant des pigments chlorophylliens.

Le photosystème II joue essentiellement le rôle d'un minuscule condensateur : il stocke l'énergie en séparant et en stabilisant les charges positives et négatives, de part et d'autre de la membrane des thylacoïdes. Plus précisément, les pigments spécialisés du photosystème II, qui absorbent un photon, utilisent efficacement cette énergie lumineuse pour créer et séparer des charges électriques.

La séparation des charges, à partir de l'énergie lumineuse, résulte d'un

ensemble complexe de réactions assurées par des protéines et des polypeptides. Ces derniers sont des molécules composées d'acides aminés enchaînés bout à bout dans un ordre précis ; ils comportent souvent plusieurs centaines d'acides aminés. Les protéines, d'autre part, sont composées de un ou de plusieurs polypeptides repliés les uns sur les autres de façon précise.

Dans le photosystème II, le transfert d'électrons s'effectue sur le «centre réactionnel», composé des deux grands polypeptides *D1* et *D2*, et d'une protéine plus petite, le cytochrome *b₅₅₉*. Les polypeptides *D1* et *D2* stabilisent les pigments et les transporteurs d'électrons du centre réactionnel. Un polypeptide de masse moléculaire égale à 33 000 et deux autres polypeptides de masses moléculaires égales à 17 000 et 23 000 sont fixés sur *D1* et *D2*, sur la face interne de la membrane des thylacoïdes. D'autres petits polypeptides sont associés au photosystème II, mais leur fonction est encore inconnue. Plusieurs ions organiques ou minéraux – manganèse, chlorure, calcium, fer et bicarbonate – catalysent le transfert des électrons, stabilisent la structure des protéines ou règlent l'activité du photosystème. Enfin plusieurs centaines de molécules de chlorophylle captent l'énergie solaire et la canalisent vers le centre réactionnel.

Les cinq composants du photosystème II

Le photosystème II des plantes vertes est si complexe que les biochimistes ont d'abord étudié des photosystèmes équivalents, mais plus simples, comme ceux des bactéries photosynthétiques. Par des techniques complexes de cristallisation et d'études aux rayons X, les chimistes allemands Johann Deisenhofer, Robert Huber et Harmut Michel ont déterminé la structure du centre photosynthétique de la bactérie *Rhodospseudomonas viridis* ; ce travail leur a valu le prix Nobel de chimie, en 1988.

Les complexes photosynthétiques des bactéries et des végétaux sont très différents : les bactéries photosynthétiques ne produisent généralement pas d'oxygène et c'est un pigment particulier, la bactériochlorophylle, qui capte la lumière. La bactériochlorophylle absorbe la lumière à une longueur d'onde bien plus élevée que la chlorophylle, et son pouvoir oxydant est donc inférieur ; toutefois les complexes photosynthétiques des bactéries transforment l'énergie lumineuse en des différences notables de concentrations en ions, de part et d'autre de la membrane des thylacoïdes

Dans le photosystème II, le système de transport des électrons est formé de

cinq composants (voir la figure 2) : un pigment chlorophyllien, qui agit comme donneur primaire d'électrons quand un photon l'excite ; un composé Z, donneur secondaire d'électrons, qui «réduit» la chlorophylle, c'est-à-dire lui rend un électron ; la phéophytine, pigment qui accepte l'électron provenant de la chlorophylle ; la plastoquinone *Q_A*, qui accepte l'électron de la phéophytine, et enfin la quinone *Q_B*, qui accepte des électrons de la plastoquinone *Q_A*.

Le pigment chlorophyllien du centre réactionnel semble comporter une «paire spéciale» de chlorophylles, qui ressemblent chimiquement aux pigments chlorophylliens photocollecteurs, mais ont une fonction différente. On le désigne par *P680*, car il absorbe surtout la lumière à une longueur d'onde de 680 nanomètres (lumière rouge).

En 1988, l'équipe de Bridgette Barry et Richard Debus, à l'Université du Michigan, et l'équipe de Willem Vermaas, de l'Université de l'Arizona, ont découvert que le composé Z est un acide aminé (une tyrosine) du polypeptide *D1*. Ils ont également montré que la plastoquinone *Q_A* est fortement liée au photosystème II, mais que la quinone *Q_B* diffuse librement entre les complexes protéiques de la membrane des thylacoïdes quand elle a accepté deux électrons.

1. LES BULLES D'OXYGÈNE qui se forment sur les feuilles de cette plante aquatique trahissent la photosynthèse. L'oxygène gazeux (O_2) est produit à partir de deux molécules d'eau (H_2O) lors d'une réaction photo-induite qui forme également quatre protons (H^+) et quatre électrons. Les bactéries photosynthétiques qui ne produisent pas d'oxygène ne dissocient pas les molécules d'eau ; elles trouvent dans d'autres molécules les électrons essentiels à leur photosynthèse.

Les transferts d'électrons

Au cours de la photosynthèse, les pigments de l'antenne chlorophyllienne absorbent un photon et canalisent son énergie vers *P680*, dans le centre réactionnel. Ce dernier transforme l'énergie du photon en énergie potentielle, associée à une séparation de charges électriques : un électron du *P680* passe rapidement à une molécule voisine de phéophytine (voir la figure 3) : la phé-

phytine porte alors une charge négative, et *P680* une charge positive. La séparation des charges augmente quand, successivement, la phéophytine transmet son électron excédentaire à la plastoquinone *Q_A*, la tyrosine *Z* donne un électron à *P680⁺*, et la plastoquinone *Q_A* transmet l'électron qu'elle a reçu à la quinone *Q_B*. Ces transferts de charges sont très rapides : le transfert initial d'un électron entre le *P680* activé et la phéophytine dure moins de 10^{-12} seconde.

Par étapes successives, les charges positive et négative se séparent ainsi progressivement. Le cycle du transfert des électrons s'achève lorsque tous les composants du photosystème II redeviennent électriquement neutres, prêts à recommencer un nouveau cycle. Comment la quinone *Q_B* élimine-t-elle sa charge négative, et comment la tyrosine *Z⁺* récupère-t-elle l'électron qu'elle a perdu?

À la face externe de la membrane photosynthétique, la régénération de la

LA THÉORIE DE LA PHOTOSYNTHÈSE

Dès 1940, l'évolution des techniques, notamment l'utilisation de l'isotope 14 du carbone et celle de la chromatographie de partage sur papier ont permis de mieux comprendre le mécanisme de la photosynthèse, synthèse de composés organiques à partir du gaz carbonique de l'air, au moyen de l'énergie lumineuse.

Aux XVII^e et XVIII^e siècles, on commence à comprendre que les plantes tirent l'essentiel de leur substance non pas du sol, mais de l'eau, de l'air et de la lumière solaire. En 1771, le chimiste anglais Joseph Priestley est le premier à reconnaître le rôle de l'oxygène dans la respiration des végétaux ; en 1779, le médecin hollandais Johannes Ingenhousz étudie la chimie du carbone et montre que les plantes ne fixent cet élément, qu'elles tirent du dioxyde de carbone de l'air, qu'en présence de lumière ; seules les feuilles et les tiges vertes ont cette propriété. En 1796, Ingenhousz présente un schéma de la photosynthèse : le gaz carbonique réagirait avec l'eau en présence de lumière et la réaction libérerait de l'oxygène et de la matière organique.

Cette description globale était correcte, mais il fallut attendre 1845, pour que le physicien allemand Julius von Mayer énonce que les plantes vertes réalisent leurs synthèses par conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. En 1864, le chimiste et agronome français Jean-Baptiste Boussingault, un des fondateurs de la chimie agricole, montre le rôle essentiel de l'azote dans les mécanismes physiologiques animaux et végétaux, et il en ébauche le cycle ; il s'intéresse aussi à la transformation du gaz carbonique et établit que le volume de gaz consommé est égal au volume d'oxygène libéré pendant le même temps. Il en déduit que le

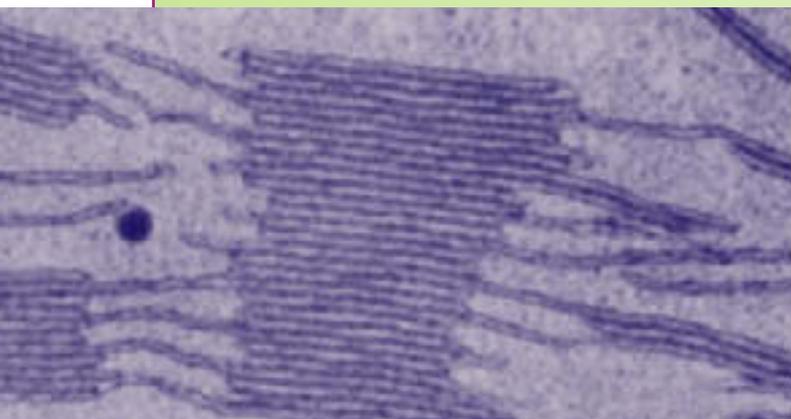
produit organique formé est un glucide ; en effet, des feuilles exposées à la lumière fabriquent de l'amidon. Après ces découvertes essentielles, les recherches sur la photosynthèse n'ont plus progressé pendant plusieurs décennies.

Au début du XX^e siècle, on concevait la photosynthèse comme un phénomène singulier propre aux cellules chlorophylliennes. L'action de la chlorophylle semblait directement responsable de la réduction du gaz carbonique, et la photosynthèse était considérée comme la réaction photochimique de fixation et d'assimilation du gaz carbonique. Dès 1905, les expériences du physiologiste anglais F. Blackman sur la cinétique de la photosynthèse et les facteurs limitants comme la lumière, la température ou la concentration en gaz carbonique, montrèrent qu'il fallait distinguer une phase obscure liée à la température et une phase claire ou photochimique indépendante de la température.

En 1929, C. Van Niel rapproche le mécanisme de photosynthèse des plantes vertes et celui des bactéries sulfureuses : le gaz carbonique réagirait sur un composé hydrogéné en libérant de l'eau dans le cas des plantes et de l'hydrogène sulfuré dans le cas de ces bactéries. Il fait l'hypothèse que l'eau subit une réaction de photolyse (ou photodécomposition) dans toutes les photosynthèses, où le gaz carbonique serait réduit et l'eau, oxydée. Chez les plantes vertes, l'eau serait à la fois donneur de l'hydrogène nécessaire à la réduction du CO_2 et source d'oxygène. Dans le cas des bactéries, la photolyse de l'eau ne s'accompagnerait pas de dégagement d'oxygène.

L'hypothèse de la photolyse de l'eau et de l'unicité du mécanisme photochimique chez les bactéries, les algues et les plantes supérieures, a eu une influence déterminante sur l'évolution des recherches en ce domaine. En 1937, Robin Hill isole des organites, les chloroplastes dont on découvrira que ce sont des grains de chlorophylle qui assurent la photosynthèse chez les végétaux verts. Ces structures sont photographiées pour la première fois au microscope électronique en 1940 par Kausche et Ruska lequel inventa avec Knoll ce type de microscope. Hill montre que des suspensions de chloroplastes isolés émettent de l'oxygène à la lumière, à condition qu'on leur ajoute un oxydant.

En 1940, Melvin Calvin utilise le carbone 14 pour suivre le métabolisme du carbone. C'est de cette façon qu'au cours des années qui ont suivi, il a établi le « cycle de Calvin », ou cycle du carbone dans les végétaux. Il utilisait du dioxyde de carbone marqué au carbone 14, qui était incorporé dans les végétaux ; il identifiait, par chromatographie, les intermédiaires chimiques stables qui contenaient l'isotope 14 du carbone, et qu'il pouvait ensuite doser. Le cycle de Calvin permet de retracer comment le dioxyde de carbone atmosphérique est incorporé dans des molécules biologiques de plus en plus complexes, quel est le cheminement du carbone et sa vitesse d'assimilation, et quelles sont les enzymes responsables des diverses synthèses.



Des chloroplastes – les organes de la photosynthèse – observés au microscope électronique ($\times 70\ 000$) : les réactions de la photosynthèse ont lieu dans les membranes de ces vésicules allongées, les thylacoïdes

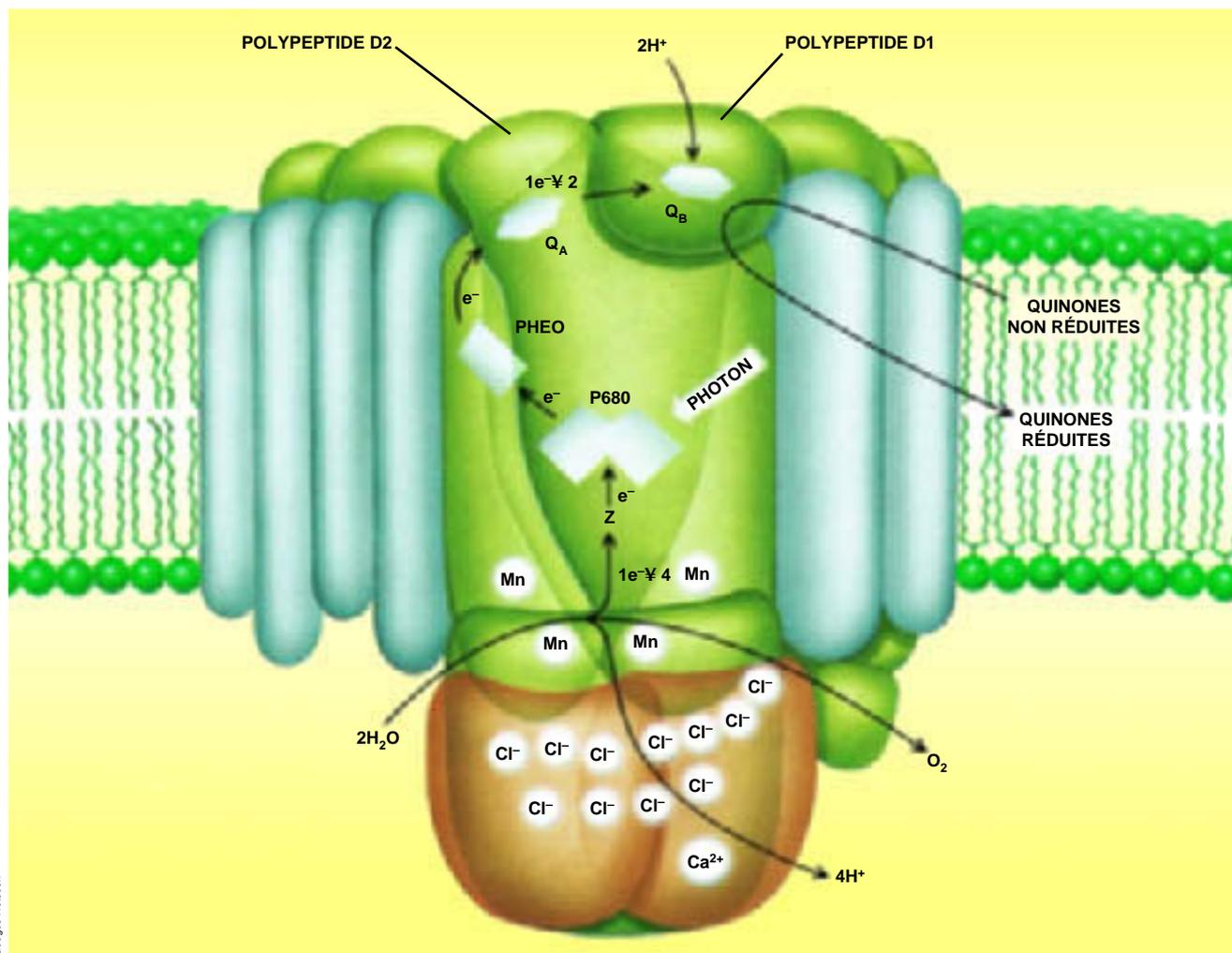
quinone Q_B est simple : quand celle-ci a acquis deux électrons, après deux cycles, elle capte deux protons et quitte le photosystème II, remplacée par une quinone Q_B neutre. Les électrons et les protons de la quinone Q_B doublement réduite passent alors à un autre complexe photosynthétique. Les protons libérés sur la face interne de la membrane thylacoïde servent notamment à synthétiser l'adénosine triphosphate, une molécule qui stocke l'éner-

gie indispensable au métabolisme cellulaire.

À la face interne de la membrane, la tyrosine Z^+ se régénère (se réduit à nouveau) beaucoup plus difficilement : elle doit prendre un électron à une substance oxydable, présente dans l'environnement de la cellule, comme les ions organiques (tels que l'ion acétate, l'ion malate et l'ion succinate) et des composés minéraux simples (tels que les ions sulfures et thiosulfates). Ces ions sont

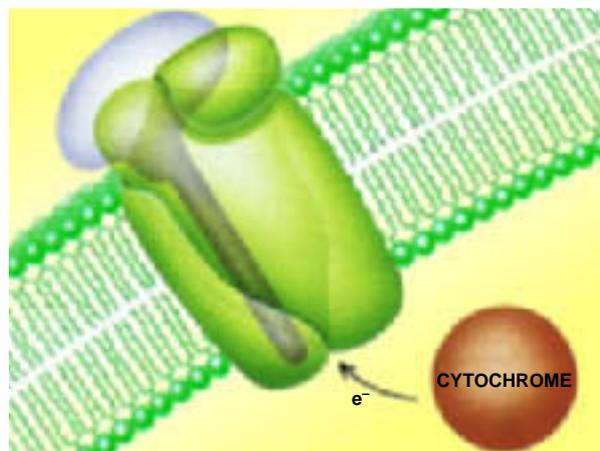
également ceux qui procurent des électrons aux bactéries photosynthétiques ne produisant pas d'oxygène, mais chez ces bactéries, la tyrosine Z n'existe pas : elle est remplacée par un cytochrome qui transporte un électron vers la paire spéciale de chlorophylles oxydées, dans le centre réactionnel.

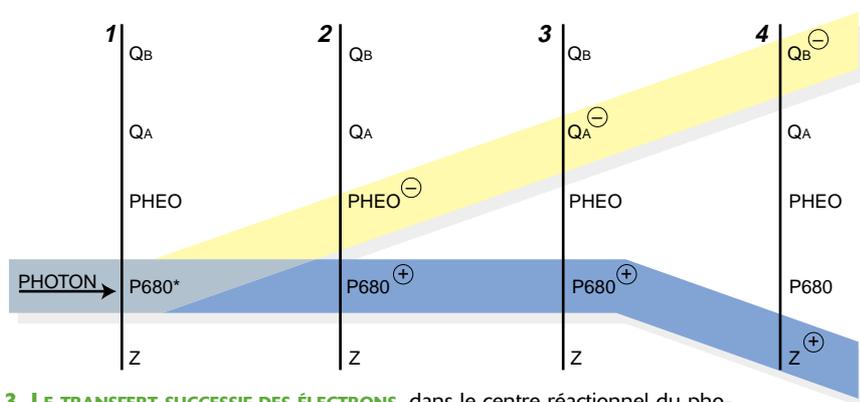
L'eau, bien plus abondante que tous les ions, représente une source d'électrons plus riche. Cependant $P680^+$ n'est pas capable d'arracher des électrons aux



Georges Reitsch

2. LE PHOTOSYSTÈME II est un complexe de pigments et de protéines, dans la membrane de vésicules appelées thylacoïdes. Ces dernières sont présentes dans les chloroplastes, qui piègent l'énergie lumineuse et produisent l'oxygène. Quand un photon est absorbé par deux molécules de chlorophylle ($P680$), un transfert d'électrons se propage dans le photosystème II (*ci-dessus*). Ce transfert fait intervenir de nombreuses autres molécules, comme la phéophytine (PHEO), les quinones Q_A et Q_B , des atomes de manganèse (Mn) dans divers états d'oxydation, des ions calcium (Ca^{2+}) et des ions chlorure (Cl^-). Sur ce modèle simplifié, on a omis de représenter certaines molécules de pigment. Du côté interne de la membrane des thylacoïdes, deux molécules d'eau sont dissociées en quatre électrons – qui réduisent la tyrosine Z – une molécule d'oxygène (O_2), et quatre protons (H^+) – qui participent à la synthèse d'adénosine triphosphate. Chez les bactéries photosynthétiques qui ne produisent pas d'oxygène (*à droite*), le photosystème, plus simple, n'oxyde pas l'eau : les électrons, qui proviennent d'autres sources que l'eau, lui sont transmis par un cytochrome.





3. LE TRANSFERT SUCCESSIF DES ÉLECTRONS, dans le centre réactionnel du photosystème II, transforme une partie de l'énergie lumineuse en énergie potentielle : des charges positives sont séparées des charges négatives. Quand *P680* absorbe un photon, il passe dans un état excité *P680** (1), puis il cède un électron à une molécule de phéophytine et se charge positivement, formant un ion *P680+* (2). L'électron de la phéophytine est alors transmis à une première molécule de quinone, *QA* (3). Enfin le *P680* arrache un électron à une autre molécule de quinone, *QB* (4). Le cycle des électrons s'achève quand la tyrosine *Z* capte un électron fourni par le cycle d'oxydation de l'eau, et quand la quinone doublement réduite *QB* est remplacée par une quinone non réduite.

molécules d'eau, car son pouvoir oxydant est trop faible : la réaction d'oxydation de l'eau libère simultanément quatre électrons, tandis que *P680+* ne peut accepter qu'un seul électron à la fois. Cette observation fit supposer, il y a quelques dizaines d'années, qu'un site catalytique, à proximité de la tyrosine *Z* et de *P680*, devait prolonger la réaction d'oxydation de l'eau : ce site devait s'associer à deux molécules d'eau de façon à les stabiliser pendant toute la réaction d'oxydation, au cours de laquelle les électrons seraient évacués un à un. La recherche de ce site catalytique aboutit finalement à la découverte du cycle d'oxydation de l'eau.

Un cycle à quatre temps

En 1969, Pierre Joliot, à l'Institut de biologie physicochimique (IBPC) de Paris avait montré que la production d'oxygène par photosynthèse présentait une périodicité d'ordre quatre. À l'aide d'une électrode de platine détectant des traces d'oxygène, P. Joliot mesurait la quantité d'oxygène que produisaient des membranes stimulées par une série d'éclairs : après le premier éclair, aucun dégagement d'oxygène n'apparaissait ; après le second éclair, l'oxygène était encore indétectable, mais après le troisième éclair, l'oxygène se dégageait massivement ; pour les éclairs suivants, le dégagement oscillait avec une périodicité d'ordre quatre, jusqu'à ce que les différences s'amortissent progressivement (voir la figure 4).

En 1970, Bessel Kok, des Laboratoires Martin Marietta, à Baltimore, a proposé une hypothèse simple pour expliquer les résultats de P. Joliot. Selon cette hypothèse du «cycle d'oxydation de l'eau», le complexe producteur d'oxygène du photosystème II peut se présenter sous cinq formes transitoires, les états *S* ; chacun de ces états aurait un rôle spécifique dans un mécanisme cyclique à quatre temps.

Dans l'obscurité, le complexe serait dans l'état *S*₀ ou dans l'état *S*₁. L'état prédominant (le plus stable) serait l'état *S*₁, plus oxydé que l'état *S*₀ : le complexe de molécules correspondant à *S*₁ posséderait un électron de moins que celui de *S*₀.

Après un premier éclair lumineux, *P680* est oxydé en *P680+*. Selon B. Kok, la neutralisation du *P680+* provoque surtout la transition de l'état *S*₁ à l'état *S*₂ (ou de l'état *S*₀ à l'état *S*₁, pour les complexes mineurs qui sont dans l'état *S*₀). Un deuxième éclair, qui ionise encore *P680*, provoque surtout la transition de l'état *S*₂ à l'état *S*₃, et un troisième éclair assure le saut entre *S*₃ et *S*₄, plus oxydé que *S*₃. Quand le complexe est dans l'état *S*₄, il a fourni quatre électrons et peut dissocier les molécules d'eau. En captant quatre électrons à deux molécules d'eau, il libère de l'oxygène gazeux et revient dans l'état *S*₀.

L'évolution du complexe n'est pas toujours aussi régulière ; parfois le passage de *S*₁ à *S*₂ n'a pas lieu, parce que le photosystème ne parvient pas à utiliser efficacement le photon ; parfois aussi le photosystème effectue deux séparations

de charges lors d'un éclair trop long, et le complexe saute alors directement de l'état *S*₁ à l'état *S*₃ – via *S*₂.

L'hypothèse de B. Kok expliquait bien les découvertes de P. Joliot : dans l'obscurité, le complexe producteur d'oxygène se trouve principalement dans l'état *S*₁, de sorte que les deux premiers éclairs assurent la transition de *S*₁ à *S*₂, puis à *S*₃ ; seul le troisième éclair, qui provoque la transition de *S*₃ à *S*₄, puis la retombée en *S*₀, déclenche la libération d'oxygène. Au quatrième éclair, seuls les cycles qui étaient initialement dans l'état *S*₀ libèrent de l'oxygène.

Les «ratés» qui se produisent lorsque quelques complexes ne passent pas à l'état d'oxydation supérieur ou, au contraire, effectuent deux transitions d'un seul coup expliquent pourquoi la libération d'oxygène se régularise progressivement : ils désynchronisent les transitions et, après un grand nombre d'éclairs, les nombres de complexes dans les états *S*₀, *S*₁, *S*₂ et *S*₃ s'égalisent. Le phénomène est analogue à celui que l'on observe quand on place plusieurs vieilles horloges dans une pièce : elles sonnent d'abord de façon synchrone et intense, mais leur désynchronisation progressive échelonne les carillons ; au bout d'un certain temps, toute la pièce résonne d'un carillon permanent et atténué.

À quelles réalités chimiques correspondaient les cinq états ? Quelles étaient les transformations de l'eau ? L'étude de ces deux questions allait être longue. Les chimistes supposèrent d'emblée que la mystérieuse entité qui présentait cinq états était un atome métallique, car les atomes des métaux de transition (tels que le manganèse, le fer ou le cuivre), associés à des protéines, catalysent aisément des réactions d'oxydo-réduction ; ils peuvent soit donner, soit accepter des électrons.

Le rôle du manganèse

Le manganèse (Mn) est probablement le dernier élément de l'accumulateur de charges : depuis longtemps, on sait que le photosystème II ne produit de l'oxygène que s'il contient quatre atomes de manganèse par molécule de *P680*. En outre, le manganèse catalyse des réactions de transfert d'électrons dans plusieurs autres enzymes, et il présente plusieurs degrés d'oxydation relativement stables, compris entre +2 et +7 (les ions manganèse peuvent céder de deux à sept électrons à d'autres atomes). Quand le manganèse est associé à une grosse molécule, telle qu'une protéine,

ces différents états oxydés sont généralement notés Mn(II), Mn(III), etc.

Les protéines contenant des métaux sont souvent étudiées par des techniques de spectroscopie, parce qu'elles absorbent des rayonnements électromagnétiques de longueurs d'onde caractéristiques ; l'analyse des spectres d'absorption révèle la nature chimique du métal associé à la protéine et renseigne sur son environnement moléculaire. Les composés biologiques contenant du manganèse se prêtent très bien aux études spectroscopiques, car ils sont souvent «paramagnétiques» : l'atome de manganèse contient des électrons non appariés, qui se comportent comme de minuscules barreaux aimantés et qui interagissent fortement avec des champs magnétiques.

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est l'une des techniques d'analyse les plus sensibles : elle révèle comment la structure électronique du manganèse est modifiée après l'absorption de la lumière par le photosystème II. D'autre part, la résonance magnétique nucléaire (RMN) indique le comportement des protons de la solution aqueuse au contact du manganèse ; on en déduit certaines propriétés des atomes de manganèse du photosystème.

Enfin la spectroscopie des rayons x est également utilisée lors de l'étude des degrés d'oxydation et de l'environnement physique du manganèse dans le photosystème II, et la spectroscopie optique précise la composition chimique des états S (les complexes du manganèse absorbent les ultraviolets de façon très caractéristique).

Malgré l'abondance des techniques de spectroscopie, deux difficultés ont handicapé l'étude des membranes photosynthétiques : d'une part, les composants du photosystème II sont nombreux et leurs spectres se chevauchent souvent ; d'autre part, ni la structure ni la nature chimique des molécules du photosystème II ne sont précisément connues, de sorte que l'interprétation des spectres est toujours ambiguë. Le modèle que nous imaginons aujourd'hui reste à confirmer.

Les degrés d'oxydation du manganèse

Au cours des transitions entre les différents états S, les atomes de manganèse sont modifiés. Leur degré d'oxydation varie bien avec une périodicité d'ordre quatre, mais il n'augmente pas beaucoup au cours du cycle : s'il croît lors du pas-

sage de S_0 à S_1 , puis de S_1 à S_2 , il ne varie apparemment pas lors de la transition de S_2 à S_3 . On a ainsi supposé que la charge positive acquise par le complexe, lors de la transition de S_2 à S_3 , était portée par un autre composé que le manganèse. Des travaux effectués en 1986 semblent indiquer que l'histidine, un acide aminé d'une des protéines du complexe, porte une charge positive.

Plus précisément, l'état S_0 semble correspondre au Mn(II), l'état S_1 au Mn(III) et l'état S_2 au Mn(IV). Le Mn(II) et le Mn(III) semblent être tous deux des états stables, conformément à l'hypothèse de B. Kok ; en revanche, le Mn(IV), associé à l'état S_2 , est un intermédiaire relativement instable. Horst Witt, de l'Université technique de Berlin Ouest, a supposé qu'un ion Mn(II) se transformerait en un ion Mn(III), lors de la transition de S_0 à S_1 . Les seules transformations observées lors des transitions suivantes sont entre Mn(III) et Mn(IV).

Les expériences de RPE à basse température, effectuées par Charles Dismukes et Yona Siderer, de l'Université Princeton, font penser que les états S_2 et S_3 correspondraient à des complexes qui comporteraient jusqu'à quatre atomes de manganèse. L'état S_2 , par exemple, correspondrait à un groupe de valence mixte comportant un atome de Mn(III) et un atome de Mn(IV), ou trois atomes de Mn(III) et un atome de Mn(IV).

Manifestement les degrés d'oxydation du manganèse associés au photosystème II changent avec les divers états S, mais les configurations chimiques et

électroniques exactes de ces états sont aujourd'hui encore incertaines.

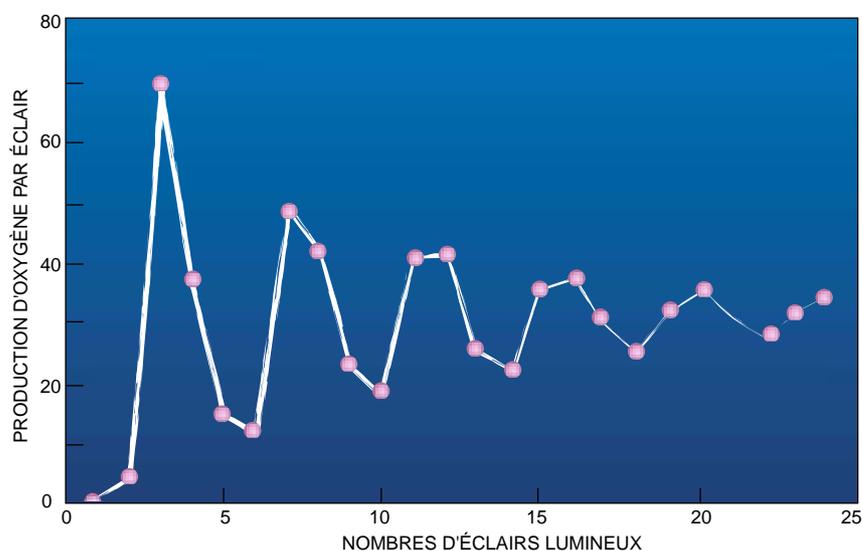
Apparemment le manganèse n'est pas directement lié à l'un des petits polypeptides extrinsèques du photosystème II ; il semble l'être aux polypeptides *D1* ou *D2*. Ceux-ci comportent probablement quatre sites de fixation du manganèse situés sur la face interne de la membrane des thylacoïdes, à l'interface entre *D1*, *D2* et le polypeptide de masse moléculaire égale à 33 000.

Enfin des études de spectroscopie des rayons x ont précisé l'arrangement des atomes de manganèse. Dans l'état S_1 , deux atomes de manganèse semblent appartenir à un complexe binucléaire, où ils sont distants de 0,27 nanomètre (0,27 millionième de millimètre) ; deux autres atomes de manganèse semblent plus éloignés que dans la paire précédente. On peut imaginer que ces quatre atomes occuperaient les quatre coins d'un trapèze.

Les protons libérés

Toutes ces études indiquent comment les atomes de manganèse catalysent le transfert d'électrons des molécules d'eau à $P680^+$. Cependant la réaction de dissociation de l'eau produit également quatre protons : ceux-ci sont-ils libérés d'un seul coup, lorsque l'oxygène se dégage, ou un par un, comme les électrons ?

Les chimistes ont étudié cette question en détectant les échanges de protons après de brefs éclairs : la libération de protons, qui augmente l'acidité du milieu



4. LA QUANTITÉ D'OXYGÈNE dégagee par des membranes photosynthétiques exposées à de brefs éclairs lumineux est périodique. Elle est maximale tous les quatre éclairs, après le troisième éclair, mais les oscillations s'amortissent progressivement. Ces oscillations amorties résultent du cycle d'oxydation de l'eau, représenté sur la figure 5.

environnant, est décelable à l'aide d'électrodes et de colorants très sensibles à l'acidité. Frederick Fowler, des Laboratoires Martin Marietta, puis Satham Saphon et Anthony Crofts, de l'Université de Bristol, ont ainsi découvert que les quatre protons sont libérés successivement : la transition de S_0 à S_1 libère un premier proton, la transition de S_1 à S_2 ne relâche aucun proton, la transition de S_2 à S_3 libère un deuxième proton, et la transition de S_3 à S_4 puis le retour de S_4 à S_0 libèrent les deux derniers protons.

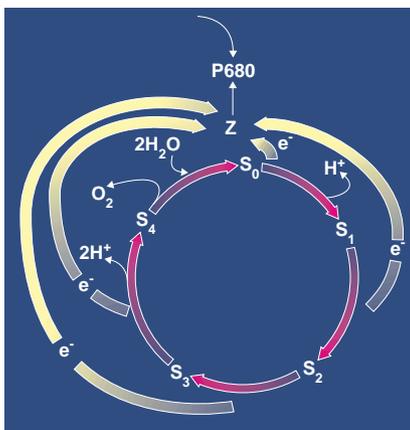
L'étude des protons libérés est importante, mais on cherche encore à savoir si les protons proviennent directement des molécules d'eau ou d'autres molécules, comme les polypeptides associés aux atomes de manganèse : s'ils proviennent directement de l'eau, les molécules d'eau doivent être modifiées avant l'état S_4 ; au contraire, s'ils proviennent des polypeptides – qui captent ensuite des protons de l'eau – c'est que les molécules d'eau ne sont oxydées que lors de la transition finale de S_4 en S_0 .

Les ions chlorure

Quelle que soit l'origine des protons, les transitions de S_0 à S_4 s'accompagnent de l'augmentation de la charge électrique positive. Un ion négatif pourrait stabiliser cette charge positive : c'est peut-être pourquoi le cycle d'oxydation de l'eau n'a lieu qu'en présence d'ions chlorure, chargés négativement.

Par résonance magnétique nucléaire, nous avons suivi la fixation des ions chlorure sur les membranes photosynthétiques. On savait que les ions chlorure s'associent rapidement et de façon réversible avec des membranes chloroplastiques isolées. En 1983, nous avons proposé qu'un ion chlorure se fixait sur le photosystème II quand celui-ci acquérait une charge positive, et que l'ion chlorure était relâché quand le cycle d'oxydation de l'eau libérait des protons.

Christopher Preston et R. Pace, de l'Université de Canberra, ont observé que les ions chlorure semblent plus fortement couplés au photosystème II dans les états S_2 et S_3 que dans les états S_0 et S_1 : cette observation confirmait que la charge positive augmente de l'état S_0 à l'état S_4 . En outre, M. Klein et ses collègues de l'Université de Berkeley ont proposé, à partir de résultats en spectroscopie des rayons X que, dans les états S inférieurs, les ions chlorure ne se fixaient pas directement sur les atomes de manganèse.



5. LE CYCLE D'OXYDATION DE L'EAU est un mécanisme en quatre étapes qui fournit quatre électrons aux molécules de chlorophylle de $P680$, dans le photosystème II. Le complexe producteur d'oxygène peut exister sous cinq états d'oxydation croissante : S_0 , S_1 , S_2 , S_3 et S_4 . Chaque fois que $P680$ absorbe un photon, le complexe passe dans l'état d'oxydation supérieur et libère un électron. Lorsque le quatrième photon est absorbé, le complexe atteint l'état S_4 (si l'on part de S_0). S_4 est instable et retourne spontanément à l'état S_0 ; cette transition s'accompagne de la libération d'une molécule d'oxygène (O_2).

Peter Homann et ses collègues de l'Université de Floride ont supposé que les ions chlorure se fixaient sur les acides aminés positifs des protéines du photosystème II. Puis, avec H. Gutowsky, nous avons suivi la fixation des ions chlorure sur le photosystème II de l'épinard : certains semblaient se fixer à proximité du manganèse – peut-être sur les polypeptides $D1$ et $D2$ – et d'autres sur le polypeptide de masse moléculaire égale à 33 000.

Toutes ces observations suggèrent que, dans le cycle d'oxydation de l'eau, les ions chlorure favorisent la libération des protons à partir de l'eau : soit ils augmentent directement l'efficacité des réactions d'oxydation de l'eau, soit ils stabilisent les ions man-

ganèse les plus chargés des états S supérieurs. Enfin les ions chlorure pourraient organiser les protéines du photosystème II en un système stable.

Des ions calcium (Ca^{2+}) interviennent également lors de l'oxydation de l'eau et du fonctionnement du centre réactionnel. Les ions calcium semblent agir comme deux des polypeptides situés sur la face interne du photosystème II, qui participent à la production d'oxygène. La suppression des ions calcium semble bloquer la transition de S_3 en S_0 .

Les ions calcium semblent ainsi jouer un rôle structurel ou régulateur. Dans de nombreux autres systèmes biologiques, les ions calcium servent à activer ou à inhiber les protéines ; parfois ils en stabilisent la structure tridimensionnelle. De même, dans le photosystème II, les ions calcium pourraient communiquer une conformation fonctionnelle aux polypeptides du cycle d'oxydation de l'eau.

Le mécanisme complexe qui produit de l'oxygène, lors de la photosynthèse, n'est qu'une petite partie du système photosynthétique. Cette partie est commune aux différentes espèces photosynthétiques, mais des particularités importantes sont apparues au cours de l'Évolution : en comparant les réactions photosynthétiques chez ces différentes espèces, nous découvrirons peut-être à quel moment de l'Évolution le saut essentiel de la production d'oxygène s'est produit.

Comme le photosystème II des cyanobactéries ressemble beaucoup à celui des plantes, on pense que les cyanobactéries sont les ancêtres directs des plantes, ou leurs très proches parents. À l'opposé, le centre réactionnel des cyanobactéries diffère notablement de celui de nombreuses autres bactéries photosynthétiques, qui semblent ainsi appartenir à une autre lignée évolutive. Les études de biologie moléculaire, de spectroscopie et de cristallographie aux rayons X, feront découvrir l'histoire évolutive de la vie.

GOVINDJEE et William COLEMAN sont respectivement professeur de biophysique et de biologie végétale à l'Université d'Urbana-Champaign, Illinois, et chercheur au Département de chimie de l'Institut de technologie du Massachusetts.

GOVINDJEE et Michael R. WASIELEWSKI, *Photosystème II : From a Femtosecond to a Millisecond*, in *Photosynthesis*, sous la direction de Winslow R. Briggs, Alan R. Liss, Inc., 1989. Harmut MICHEL et Johann DEISENHOFER, *Relevance of the Photosynthetic Reaction*

Center from Purple Bacterla to the Structure of Photosystem II, in *Biochemistry*, vol. 27, n°1, pp. 1-7, 12 janvier 1988.

Gary W. BRUDVIG, Warren F. BECK et Jolio C. de PAULA, *Mechanism of Photosynthetic Water Oxidation*, in *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, vol. 18, Annual Reviews, Inc., 1989.

A.W. RUTHERFORD, *Photosystème II, the Water-Splitting Enzyme*, in *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 14, pp. 227-232, juin 1989.

Douglas YOUNG et Barry MARRS, *La photosynthèse*, in *Pour la Science*, n°118, août 1987.