

fication du mécanisme catalytique de l'ATPase chloroplastique par une toxine naturelle spécifique [21], et la régulation de l'activité du complexe  $F_0F_1$  dans les chloroplastes et les mitochondries. Cette remarquable machine moléculaire qu'est l'ATP-synthase est loin d'avoir révélé tous les aspects de sa structure et de son mécanisme ■

1. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961; 1: 144-8.
2. Jagendorf AT, Uribe E. ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; 55: 170-7.
3. Pullman ME, Penefsky HS, Datta A, Racker E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 1960; 235: 3322-9.
4. Mitchell P. A chemiosmotic molecular mechanism for proton-translocating adenosine triphosphatases. *FEBS Lett* 1974; 43: 189-94.
5. Boyer PD, Cross RL, Momsen W. A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 2837-9.
6. Feldman R, Sigman DS. The synthesis of bound ATP by soluble chloroplast factor  $F_1$ . *J Biol Chem* 1982; 257: 2676-83.

7. Boyer P. The binding change mechanism for ATP synthase. Some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1140: 215-50.
8. Mitchell P. Bacterial flagellar motors and osmoelectric molecular rotation by an axially transmembrane well and turnstile hypothesis. *FEBS Lett* 1984; 182: 287-94.
9. Mitchell P. Molecular mechanics of proton-motive  $F_0F_1$  ATPases. Rolling well and turnstile hypothesis. *FEBS Lett* 1985; 182: 1-7.
10. Laubinger W, Dimroth P. Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump. *Biochemistry* 1988; 27: 7531-7.
11. Boekema EJ, Berden JA, van Heel MG. Structure of mitochondrial  $F_1$ -ATPase studied by electron microscopy and image processing. *Biochim Biophys Acta* 1986; 851: 353-60.
12. Walker JE, Fearnley IM, Gay NJ, Gibson BW, Northrop FD, Pwell SJ, Runswick MJ, Saraste M, Tybulewicz, VLJ. Primary structure and subunit stoichiometry of  $F_1$ -ATPase from bovine mitochondria. *J Mol Biol* 1985; 184: 677-701.
13. Abrahams JP, Leslie AGW, Lutter R, Walker JE. Structure at 2.8 Å resolution of  $F_1$ -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 1994; 370: 621-8.
14. Duncan TM, Bulygin VV, Zhou Y, Hutcheon ML, Cross RL. Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli*  $F_1$ -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10964-8.
15. Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinoshita K. Direct observation of the rotation of  $F_1$ -ATPase. *Nature* 1997; 386: 299-302.
16. Musier KM, Hammes GG. Rotation of nucleotide sites is not required for the enzymatic activity

- of chloroplast coupling factor 1. *Biochemistry* 1987; 26: 5982-8.
17. Singh S, Turina P, Bustamante CJ, Keller DJ, Capaldi R. Topographical structure of membrane-bound *Escherichia coli*  $F_0F_1$  ATP synthase in aqueous buffer. *FEBS Lett* 1996; 397: 30-4.
  18. Valerio M, Haraux F. Catalytic and activating protons follow different pathways in the  $H^+$ -ATPase of potato tuber mitochondria. *FEBS Lett* 1993; 336: 83-6.
  19. Walker J. The regulation of catalysis in ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol* 1994; 4: 912-8.
  20. Buy C, Matsui T, Andrianambinitsoa A, Sigalat C, Girault G, Zimmermann JL. Binding sites for Mg(II) in  $H^+$ -ATPase from *Bacillus PS3* and in the  $\alpha_3\beta_3\gamma$  subcomplex studied by one-dimensional ESEEM and two-dimensional HYSCORE spectroscopy of oxovanadium(IV) complexes: a possible role for  $\beta$ -His-324. *Biochemistry* 1996; 35: 14281-93.
  21. Pinet E, Cavelier F, Verducci J, Girault G, Dubart L, Haraux F, Sigalat C, André F. Synthesis, NMR structure, and properties of MeSer<sup>1</sup>-Tentoxin, a new cyclic tetrapeptide which interacts specifically with chloroplast  $F_1$   $H^+$ -ATPase. Differentiation of inhibitory and stimulating effects. *Biochemistry* 1996; 35: 12804-11.

#### Francis Haraux

Section de bioénergétique, DBCM, bâtiment 532, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

## L'identification de la première ATPase de type P, responsable d'un transport actif d'ions, l'ATPase $Na^+/K^+$

Marc le Maire

Le professeur Skou vient d'être particulièrement honoré par l'Académie royale des Sciences de Suède puisqu'il s'est vu décerner la moitié du prix Nobel de chimie. Son étonnement a été grand : il s'était cru oublié. Parfois, il faut vivre vieux pour recevoir le prix Nobel (P.D. Boyer lui aussi a 79 ans)! Mais cela montre que les scientifiques n'ont pas la mémoire courte : la mise en évidence de l'enzyme de transport du  $Na^+$  et de  $K^+$  est une remarquable découverte. Il y a juste 40 ans, paraissait l'article de Jens C. Skou qui signalait sa découverte d'une enzyme membranaire utilisant de l'ATP et stimulée par la présence simultanée de  $Na^+$ , de  $K^+$  et de  $Mg^{2+}$  dans le milieu [1]. Dans cet article historique, Jens C. Skou suggérait explicitement qu'il s'agissait de l'enzyme responsable du transport actif de  $Na^+$  du cytoplasme hors de la cellule. Par la suite, on a compris que l'ATPase  $Na^+/K^+$  transporte aus-

si le  $K^+$  dans la cellule et contrôle ainsi son équilibre ionique. Depuis 1957, Jens C. Skou n'a cessé de contribuer à la connaissance de cette protéine et a fondé sur ce sujet une école danoise réputée. De nos jours, plusieurs dizaines d'ATPases de ce type sont connues, provenant de cellules eucaryotes et procaryotes, toutes homologues et caractérisées par la formation, à partir d'ATP, d'un dérivé covalent aspartyl-phosphate [2]. Cette phosphorylation transitoire de l'ATPase est intimement liée au processus de transport de cations,  $Na^+$  et  $K^+$  mais aussi, pour les autres ATPases, de  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , etc. De nombreuses études se poursuivent à ce jour sur différents membres de cette famille, et les avancées pour l'un des transporteurs sont rapidement analysées sur les protéines homologues (pour exemples, voir [3, 4]). Malgré la quantité importante de données ainsi cumulées, plusieurs

aspects essentiels du mécanisme de transport restent à découvrir. En particulier, on ignore encore le mécanisme exact par lequel les cations sont transportés à travers la membrane et comment s'effectue l'interaction entre les sites de liaison des ions et le site catalytique de phosphorylation par l'ATP conduisant au transport des ions contre leur gradient électrochimique [2]. Plutôt que de faire le point sur les connaissances actuelles, il m'a semblé intéressant de situer brièvement le contexte historique de la découverte de Jens C. Skou, en me fondant principalement sur sa propre relation des faits [5, 6]. Enfin, je dirai quelques mots sur sa personnalité puisque nous avons la chance de collaborer avec son département. En 1945, Jens C. Skou est un docteur en médecine de 27 ans qui se destine à devenir chirurgien. En 1947, il décide d'arrêter temporairement ses études cli-

niques pour écrire une thèse sur le mécanisme d'action des anesthésiques locaux. La thèse, publiée en 1954, ne manquait pas d'intérêt, même si le mécanisme exact d'action des anesthésiques locaux n'est pas encore entièrement élucidé à ce jour. Jens C. Skou avait remarqué qu'il existe une corrélation entre l'efficacité d'un anesthésique et sa capacité de pénétrer une couche monomoléculaire de lipide et, pour une aire donnée, d'augmenter la pression de surface. En 1953, il est donc à la recherche d'une enzyme membranaire « modèle » pour pouvoir tester l'effet de la pression de surface. L'idée était de préparer en monocouche un mélange d'enzyme et de lipides et de voir si la pénétration d'anesthésiques locaux dans les lipides influençait l'activité de l'enzyme. Il faut se rappeler qu'à cette époque prévalaient les conceptions de Danielli et Davson sur la nature des membranes biologiques. Selon ces auteurs, les protéines membranaires étaient étalées de part et d'autre de la bicouche lipidique mais ne traversaient jamais les membranes [7]. Jens C. Skou pensait donc que les anesthésiques bloquaient l'ouverture d'un canal sodium indirectement, *via* un effet sur les lipides. Pour étayer son hypothèse, n'importe quelle enzyme membranaire suffisamment pure et active aurait pu lui convenir. En visite au Laboratoire de biologie marine de Woodshole (MA, USA) en 1953, il apprend que B. Libet avait montré l'existence d'une ATPase dans les membranes de l'axone géant de calmar. De retour à Aarhus, il décide de rechercher cette ATPase dans les membranes de nerf, mais, n'ayant pas accès aux axones géants, il utilise la fraction membranaire d'un broyat de nerfs de crabe. Dès le début des expériences, il est clair que ces membranes contiennent une  $Mg^{2+}$ -ATPase, activée faiblement par le sodium mais pas par le potassium : les effets combinés du  $Na^+$  et du  $K^+$  ne sont cependant pas étudiés. Pendant longtemps, les mesures d'activité enzymatique ne sont pas reproductibles. La raison, comprise seulement par la suite, en est simple : l'ATP est vendu à cette époque sous forme de sel de baryum qu'il est nécessaire de convertir au laboratoire en sel monovalent. Jens C. Skou le convertit parfois en sel de sodium, parfois en sel de potassium, sans se rendre compte de l'importance du contre-ion de l'ATP. En outre, les cel-

lules sont homogénéisées parfois avec du KCl, parfois avec du saccharose. En août 1955, l'expérience décisive est effectuée : l'activité d'une enzyme préparée en saccharose et mise en présence de  $Mg^{2+}$  et de  $Na^+$  est nettement plus élevée lorsqu'elle est testée avec le sel potassique d'ATP qu'avec du sel sodique d'ATP. Tout s'éclaire : la présence d'une faible concentration de  $K^+$  augmente considérablement l'activité de l'enzyme lorsque le  $Na^+$  et le  $Mg^{2+}$  sont présents dans le milieu.

Le choix des nerfs de crabes comme source d'enzyme se révèle être un choix heureux. Avec un tissu de mammifère, la majeure partie de l'activité ATPasique est cachée du fait de la formation, lors de l'homogénéisation des cellules, de vésicules closes. Les vésicules, dans ce cas, doivent être préalablement ouvertes (par exemple par des détergents) si l'on souhaite voir l'effet combiné des ions  $Na^+$  et  $K^+$  qui se fixent sur l'enzyme de part et d'autre de la membrane. En revanche, dans le cas des membranes de nerf de crabe, les membranes restent sous forme de fragments de bicouche sans se refermer en vésicules closes.

Au départ, Jens C. Skou pense avoir découvert le canal sodium dont on supposait l'existence depuis de nombreuses années. Mais l'existence d'un simple canal n'était pas compatible avec une consommation d'ATP. Un article de Hodgkin et Keynes, utilisant des cations radioactifs et démontrant l'importance de l'ATP intracellulaire dans le flux sortant de  $Na^+$  des axones [8], le conforte dans l'idée que la protéine qu'il étudie est responsable du transport actif de  $Na^+$ . La publication est soumise en 1956 après discussion avec Mogens Schou (incidemment, il s'agit du médecin qui a démontré l'intérêt du lithium dans le traitement de la psychose maniaco-dépressive). Mogens Schou lui conseille de mettre les mots « pompe à sodium » dans le titre mais Jens C. Skou décline la suggestion, craignant que cela soit trop provocant. L'article paraît en 1957. C'est son premier article sur l'ATPase  $Na^+/K^+$ . Dès 1958, Jens C. Skou est invité dans des laboratoires prestigieux et dans les congrès ; il réalise alors que ce qui n'était qu'un projet de second plan pour lui (les anesthésiques étant le sujet principal) est en fait assez important. Cela le décide à continuer à faire de la recherche et il abandonne l'idée d'être chirurgien... Il a alors 40 ans.

Jens C. Skou est à l'image de ce premier article de 1957 : précis, peu bavard, intelligent, pas prétentieux. Dans l'article de 1989 où il parle des circonstances de sa découverte [5], il dit en substance que, s'il n'avait pas identifié la pompe, quelqu'un d'autre dans le domaine l'aurait fait rapidement, et il s'excuse d'avoir à l'époque si mal connu la littérature et d'avoir oublié de citer des références importantes. Il y a un an ou deux, Jens C. Skou réalisait encore des expériences ; mais il se consacre maintenant surtout à la modélisation de la cinétique de l'enzyme. A 79 ans, Jens C. Skou est toujours présent presque quotidiennement au département de biophysique de l'Université de Aarhus (Danemark) qu'il a fondé en 1977. C'est un très petit département qui ne compte qu'un seul professeur, J.V. Møller, qui a pris sa succession en 1990, et une demi douzaine de professeurs associés, tous très connus dans le domaine des ATPases : F. Cornelius, M. Esman, B. Juul, I. Klodos, J. Nørby et L. Plesner ■

1. Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 1957 ; 23 : 394-401.
2. Møller JV, Juul B, le Maire M. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1996 ; 1286 : 1-51.
3. Swarts HGP, Klaassen CHW, de Boer M, Franssen JAM, De Pont JJHMH. Role of negatively charge residues in the fifth and sixth transmembrane domains of the catalytic subunit of gastric  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 29764-72.
4. Falson P, Menguy T, Corre F, Bouneau L, Gomez de Gracia A, Soulié S, Centeno F, Møller JV, Champeil P, le Maire, M. The cytoplasmic loop between putative transmembrane segments 6 and 7 in sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase binds  $Ca^{2+}$  and is functionally important. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 17258-62.
5. Skou JC. The identification of the sodium pump as the membrane-bound  $Na^+ K^+$  ATPase : a commentary. *Biochim Biophys Acta* 1989 ; 1000 : 435-8.
6. Skou JC, Esman M. The  $Na^+ K^+$  ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 1992 ; 24 : 249-61.
7. Tanford C. *Ben Franklin stilled the waves*. Durham, North Carolina : Duke University Press, 1989.
8. Hodgkin AL, Keynes RD. Active transport of cations in giant axons from *sepio* and *loligo*. *J Physiol* 1955 ; 128 : 28-60.

#### Marc le Maire

Directeur de recherche au Cnrs. Section de biophysique des protéines et des membranes, Département de biologie cellulaire et moléculaire CEA et Cnrs Ura 2096, CEA-Saclay 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

#### Remerciements

L'auteur remercie Philippe Champeil, Pierre Falson, Marc Lutz, Jesper Møller pour leurs critiques et leurs conseils (pas toujours suivis !) pendant la préparation du manuscrit de cet article.