

NOBEL 97

PRIX NOBEL DE CHIMIE 1997*Paul D. Boyer, John E. Walker, Jens C. Skou***Une nanomachine pour des kilos d'ATP : l'ATPase à protons***Francis Haraux*

Le prix Nobel de Chimie 1997 a couronné les travaux sur le mécanisme d'action des enzymes qui participent à la conversion du composé « riche en énergie », l'ATP : Paul D. Boyer et John E. Walker se partagent la moitié du prix pour l'élucidation des mécanismes de la synthèse de l'ATP, Jens C. Skou reçoit l'autre moitié pour sa découverte princeps d'une enzyme de transport ionique, la Na^+, K^+ -ATPase. Paul D. Boyer est Américain, né en 1918 dans l'Utah. Biochimiste de formation, il est professeur (*emeritus*) de Biochimie à l'Université de Californie à Los Angeles. John E. Walker est Britannique, né en 1941 à Halifax. Chercheur statutaire du *Medical Research Council*, il travaille depuis 1982 au Laboratoire de biologie moléculaire de Cambridge (GB). Jens C. Skou est né en 1918 au Danemark. Médecin de formation, il devint successivement professeur de Physiologie puis de Biophysique à l'Université d'Aarhus.

Deux des trois lauréats du prix Nobel de chimie 1997 (Paul D. Boyer et John E. Walker) ont été récompensés pour leurs travaux sur l'ATPase à protons ou ATP-synthase. Ce convertisseur d'énergie universel est une pièce centrale de l'économie cellulaire. La quantité d'ADP qu'il recycle en ATP en une journée serait, chez l'homme, de l'ordre de grandeur de sa masse corporelle. L'ATP-synthase est une protéine complexe de 550 kDa qui couple un flux transmembranaire de protons à une synthèse d'ATP dans les chloroplastes, les mitochondries et les bactéries.

Elle est composée d'un canal membranaire à protons F_0 et d'une partie catalytique extrinsèque F_1 fixant les nucléotides et du magnésium. Le mécanisme de couplage fait probablement intervenir la rotation de la sous-unité centrale de la partie F_1 (*figure 1*). Pour comprendre l'importance des travaux qui sont consacrés à ce complexe enzymatique, il faut revenir presque quarante ans en arrière.

Analyse fonctionnelle de l'ATP synthase *in situ* ou isolée

En 1961, P. Mitchell, sur des bases expérimentales très restreintes, énonce sa fameuse théorie chimiosmotique [1] selon laquelle l'intermédiaire entre le transfert d'électrons et la synthèse d'ATP dans la membrane interne des mitochondries n'est autre qu'une différence transmembranaire de pH et de potentiel électrique entretenue par la chaîne respiratoire : le concept de « force motrice » est né. Un argument décisif viendra non pas du monde mitochondrial, mais du monde chloroplastique, lorsque l'équipe de Jagendorf montrera qu'une force motrice appliquée à des thylakoïdes par saut de pH et potentiel de diffusion (en l'absence de tout transfert d'électrons photosynthétique) suffit à déclencher une synthèse d'ATP [2]. P. Mitchell obtiendra le prix Nobel de chimie en 1978. Le complexe soluble F_1 de mitochondries a été isolé au début des années 1960 [3]. Depuis, le complexe entier F_0F_1 et sa partie soluble

F_1 (capable uniquement d'hydrolyser l'ATP) ont pu être isolés de membranes mitochondriales, chloroplastiques et bactériennes. Deux théories s'affronteront alors : d'une part, la théorie du « proton substrat », selon laquelle les protons interviennent directement dans la réaction de synthèse d'ATP, et pour laquelle des mécanismes chimiquement explicites ont été proposés [4] ; d'autre part, la théorie du « changement d'affinité » [5], appuyée par divers arguments enzymologiques, selon laquelle le flux de protons induit des changements de conformation de la protéine stockant l'énergie sous une forme restituable pour la synthèse d'ATP. L'idée centrale était que l'étape consommatrice d'énergie n'était pas la synthèse d'ATP en elle-même au site catalytique, mais le relargage d'ATP de ce site, et peut-être aussi la fixation d'ADP et de phosphate. La théorie du changement d'affinité fut confirmée par l'observation d'une synthèse d'ATP catalysée par du complexe F_1 isolé, donc en l'absence totale d'énergie, l'ATP restant cependant fixé au site catalytique, faute de force motrice [6]. Les autres aspects de la théorie – dont la formulation n'a guère varié en vingt ans – concernent le nombre de sites catalytiques, leur fonctionnement coopératif et leur localisation (*Tableau 1*). Ils sont eux aussi fondés sur des arguments enzymologiques et biochimiques. Certains d'entre eux font encore l'objet de controverses, après des centaines de publications étalées sur plus de vingt ans, émanant de dizaines de laboratoires, relatant des expériences faites

P R I X N O B E L 1 9 9 7

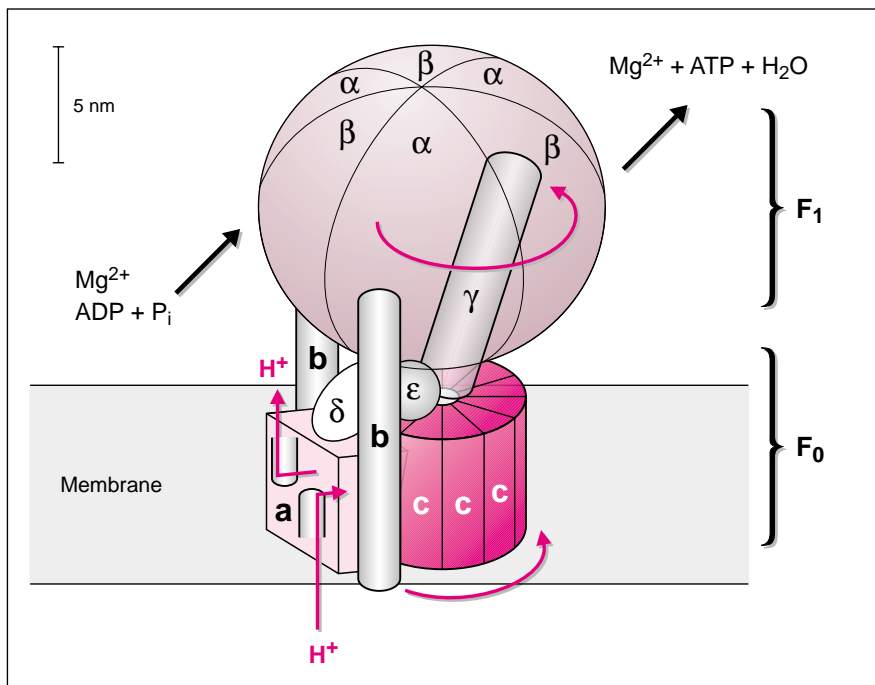


Figure 1. **Structure et mécanisme possible de l'ATP-synthase.** Dans la partie F_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$), les sous-unités α et β sont arrangées en couronne, la sous-unité γ étant située au centre de cette structure. La partie F_0 fonctionnerait comme un moteur rotatif à protons, le rotor étant constitué par les sous-unités c , disposées en une couronne de 9 à 12 monomères. Chaque sous-unité c contient un résidu carboxylique situé au milieu de la membrane, qui reçoit les protons venant du bas du schéma et les rejette vers le haut. Le mouvement de rotation (flèches) serait transmis à la sous-unité γ de la partie F_1 . Les interactions de γ avec les sites catalytiques situés sur β détermineraient leur état d'occupation: ATP, ADP.Pi ou site vide, induisant la synthèse d'ATP. Les sites catalytiques fonctionneraient donc de façon séquentielle et équivalente. Actuellement, seule la structure de la partie $\alpha_3\beta_3\gamma$ est connue avec précision, la sous-unité γ n'étant d'ailleurs pas entièrement résolue. δ et ϵ sont invisibles, et la structure de la partie F_0 ($ab_{1-2}c_{9-12}$) est hypothétique. La partie F_0 de l'enzyme mitochondrial contient des sous-unités supplémentaires, non représentées.

aussi bien sur des systèmes membranaires que sur de l'ATPase isolée, et utilisant, les dernières années, une quantité notable de mutants. Une mise au point a été tentée par Boyer lui-même en 1993 [7]. Dans le milieu des années 1980 était apparue l'idée d'une rotation physique des sous-unités, développée à la fois par Mitchell et Boyer. On imaginait déjà un moteur rotatif à protons au niveau de F_0 , dont un modèle théorique avait été développé pour le flagelle bactérien [8], mais la rotation des sous-unités de F_1 [9] était différente de celle actuellement proposée. Par ailleurs, un coup très dur fut porté à la théorie du « proton substrat » lorsque l'on découvrit des ATP-synthases bacté-

riennes homologues de l'ATPase à protons, mais fonctionnant avec des ions sodium [10].

Données structurales

Sans être aussi foisonnantes, les recherches structurales allaient également bon train. Tout d'abord, la microscopie électronique couplée à l'analyse d'images [11] révéla un arrangement hexagonal des six grosses sous-unités (α et β), ce qui était relativement attendu (figure 1). Une masse centrale fut attribuée à l'ensemble $\gamma\delta\epsilon$. Plus intéressant, cet ensemble $\gamma\delta\epsilon$ interagissait de façon privilégiée avec un couple de grosses sous-unités supposé être une paire $\alpha\beta$.

Toute la question était déjà de savoir si cette asymétrie était permanente où résultait d'un arrêt sur image, la masse centrale interagissant alors successivement avec les trois paires $\alpha\beta$. Finalement, après avoir séquencé les cinq sous-unités de la partie F_1 de l'ATP-synthase de mitochondrie de cœur de bœuf [12], le groupe de Walker obtint par radiocristallographie la structure de la majeure partie de cette entité avec une résolution de 2,8 Å [13]. La grande affaire fut d'avoir réussi à peupler de façon homogène les sites nucléotidiques, chaque complexe portant un analogue non hydrolysable de l'ATP sur les trois sites α et sur un site β , le deuxième site β étant occupé par un ADP et le troisième étant vide*. La position des sous-unités variait significativement selon le nucléotide fixé. L'asymétrie des interactions entre γ et les sous-unités majeures était confirmée, les zones de contact entre les sous-unités précisées.

Le modèle rotatif actuel (figure 1)

Ce que l'on voit de la structure de la partie F_1 est donc compatible avec le modèle rotatif de Boyer. Ce sont, en fait, les interactions avec γ qui modifieraient l'affinité des sites catalytiques (présupposés situés sur β) pour les substrats, les forçant à adopter successivement les trois configurations observées, la phosphorylation de l'ADP se produisant soit spontanément, soit par déformation du site catalytique. La sous-unité γ serait entraînée par un moteur rotatif à protons, situé dans la partie F_0 . En fait, la rotation de la sous-unité γ durant le cycle catalytique n'a pu être mise en évidence que sur la partie soluble F_1 de l'ATP-synthase, qui ne fonctionne qu'en hydrolyse d'ATP. Par des expériences de pontage réversible entre une cystéine de β et une cystéine de γ , il a été montré que la sous-unité γ interagissait successivement et pendant un temps égal avec les trois sous-unités β lors du cycle catalytique de la partie F_1 d'une ATP-synthase bactérienne [14]. Enfin,

* Plus précisément, les six sites nucléotidiques sont situés aux interfaces $\alpha\beta$, mais avec une prédominance de α pour trois d'entre eux et une prédominance de β pour les trois autres.

Tableau I

LE MODÈLE DOMINANT DU FONCTIONNEMENT DE L'ATP-SYNTASE (BOYER)

1. Parmi les six sites nucléotidiques, trois sont catalytiques et trois non catalytiques.
2. Les sites catalytiques sont situés sur β et les sites non catalytiques sur α .
3. Les sites catalytiques sont coopératifs et équivalents.
4. L'énergie du gradient de protons sert essentiellement à augmenter l'affinité des sites catalytiques pour l'ADP et le phosphate et à diminuer l'affinité pour l'ATP. La synthèse d'ATP au site catalytique est isoénergétique.

une expérience très raffinée a consisté à greffer un filament d'actine fluorescent à la base de la sous-unité γ , la partie supérieure de la couronne $\alpha_3\beta_3$ étant par ailleurs fixée sur un support. Une rotation du filament d'actine induite par l'ATP a pu alors être observée [15]. Elle ne concernait environ qu'une ATPase sur soixante-dix et s'arrêtait au bout d'un certain temps, mais elle s'effectuait dans le sens prévu par les données cristallographiques (ce qui peut être une coïncidence), et elle était sensible à l'ajout d'inhibiteur. Tout cela ne concerne que le sous-complexe F_1 et l'hydrolyse d'ATP. Bien que l'on suppose que la sous-unité γ tourne en sens inverse lors de la synthèse d'ATP, personne n'a pu encore mettre en évidence cette rotation dans le complexe entier F_0F_1 . Le modèle rotatif prévoit une stœchiométrie stricte entre le nombre de protons traversant la partie F_0 et le nombre de molécules d'ATP synthétisées. Le nombre de protons transportés par tour est égal au nombre de copies de la sous-unité c , estimé entre 9 et 12. Le nombre de molécules d'ATP synthétisées est égal au nombre de sites catalytiques, c'est-à-dire trois. On prévoit donc une stœchiométrie H^+/ATP égale à 3 ou 4. C'est à peu près la fourchette obtenue lors d'expériences de bioénergétique qui sont, il faut le signaler, extrêmement délicates.

On voit donc que si ce modèle rotatif est exact, l'ATP-synthase est une enzyme au mécanisme peu banal: elle transforme une énergie électrochimique (force protomotrice) en énergie mécanique (rotation), puis en énergie chimique (potentiel chi-

mique de l'ATP). Sur le plan pédagogique, ce mécanisme est une illustration remarquable des rapports entre la mécanique microscopique et la thermodynamique. Un grand nombre de sous-unités c démultiplie le mouvement, conduisant à une rotation peu rapide*, mais capable de lutter contre une force importante. La thermodynamique et la cinétique ne disent pas autre chose, en énonçant qu'une stœchiométrie H^+/ATP élevée permet de synthétiser de l'ATP contre un potentiel chimique élevé, mais à une vitesse limitée.

Problèmes non résolus et perspectives

Bien qu'étant une hypothèse extrêmement séduisante, le mécanisme de couplage rotatif ne doit pas être considéré comme définitivement acquis. Il en va de même pour ses corollaires énoncés dans le *Tableau I*. En fait, pour un grand nombre d'expériences citées comme appuyant ce modèle, il est possible de trouver des explications alternatives. Plus que de preuve, on doit donc parler d'un faisceau de présomptions. Par exemple, si des expériences de pontage inter-sous-unités ont récemment conclu à la réalité de la rotation, l'enthousiasme actuel a un peu trop tendance à faire passer sous silence d'autres expériences de pontage, apparemment bien faites, qui avaient précédemment conclu à l'absence de mouvement relatif de β et γ [16].

Parmi les enjeux futurs, outre la validation ou non du modèle rotatif, on

* La vitesse de rotation atteindrait quand même 130 tours par seconde à force protomotrice saturante.

peut mentionner la détermination de la structure de la partie F_0 et le rôle de ses différentes sous-unités. Une structure en couronne, composée selon toute évidence des sous-unités c , a récemment été révélée par microscopie de force atomique [17]. Le cas des ATP synthases mitochondriales est à cet égard particulièrement complexe, car leur partie F_0 comprend des sous-unités additionnelles dont certaines n'ont été identifiées que récemment. Le trajet des protons dans la partie F_0 est évidemment, pour le moment, du domaine de la spéculation [18]. Du côté F_1 , il faut maintenant préciser les interactions entre substrats et sites catalytiques, ainsi qu'entre sous-unités, en essayant notamment d'avoir une vision plus dynamique que l'«arrêt sur image» qu'est supposée être la structure cristallographique. Le rôle des sites nucléotidiques non catalytiques reste par ailleurs très controversé. Enfin, un axe de recherche qui devrait se développer est l'étude de la régulation. En effet, l'ATP-synthase se désactive en l'absence de force protomotrice, ce qui permet vraisemblablement d'éviter une hydrolyse inutile d'ATP en cas d'arrêt de la chaîne respiratoire ou photosynthétique. L'activation par la force protomotrice se traduit, au niveau de F_1 , par des changements structuraux probablement différents de ceux liés au cycle catalytique, et qui pourraient être d'une grande ampleur. J. Walker reconnaît d'ailleurs lui-même que la structure qui a été déterminée dans son laboratoire est probablement celle d'une forme inactivée de l'ATPase [19]. La régulation de l'ATPase à protons est un phénomène complexe qui fait par ailleurs intervenir des facteurs spécifiques: sous-unité ϵ et domaine particulier de la sous-unité γ dans le cas du F_0F_1 chloroplastique, sous-unité inhibitrice dissociable dans le cas du F_0F_1 mitochondrial. Bien qu'ayant énormément progressé ces dernières années, notre connaissance des ATP-synthases reste incomplète. Dans notre laboratoire, nous nous intéressons plus particulièrement à plusieurs problèmes: l'interaction du magnésium ou d'un analogue avec les sites nucléotidiques [20], la modi-

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_1F_0 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 HYSORE spectroscopy of oxovanadium(IV) complexes: a possible role for β -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 MeSer¹-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 barium 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 JJHMM. 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 *sepia* 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.