

Thèse - Denis Saint MARCOUX

Résumé

Les cytochromes c sont des hémoprotéines impliquées dans de nombreux processus biologiques et notamment dans le transfert d'électrons au sein des membranes transductrices d'énergie. La biogenèse des cytochromes c requiert la fixation covalente du cofacteur hémique qui, *in vivo*, est assistée par des ensembles de protéines formant au moins trois systèmes distincts suivant les organismes ou les compartiments subcellulaires étudiés. Bien caractérisées, ces voies de biogenèse sont constituées de protéines impliquées dans la prise en charge de l'hème et de l'apocytochrome, dans la formation de la liaison thioéther au niveau d'un motif canonique de la chaîne polypeptidique, ainsi que dans la fourniture du pouvoir réducteur nécessaire à la réalisation correcte de la réaction. Les cytochromes c, et en conséquence leurs voies de biogenèse, sont généralement situés du côté positif des membranes biologiques.

Le complexe cytochrome b₆f transfère des électrons d'un transporteur liposuble à un transporteur hydrosoluble entre les deux photosystèmes, tout en construisant un gradient transmembranaire de protons par leur translocation depuis le côté négatif vers le côté positif de la membrane photosynthétique. L'une de ses sous-unités, le cytochrome b₆ contient trois cofacteurs hémiques dont un hème de type c', l'hème ci. La liaison de cet hème sur une unique cystéine conservée et sa localisation à la surface stromale, i.e. du côté négatif, de la membrane confère au cytochrome b₆ un statut atypique de cytochrome de type c.

Chez *Chlamydomonas*, la biogenèse du cytochrome b₆ requiert un ensemble de protéines nommées CCB, spécifiquement impliquées dans la liaison covalente de l'hème ci. Par une approche génétique mise en œuvre sur des mutants non photosynthétiques définissant quatre loci indépendants, j'ai contribué à identifier les gènes et à caractériser les quatre protéines CCB connues à ce jour. Cette voie de biogenèse est ubiquitaire au sein des organismes pratiquant la photosynthèse oxygénique et définit ainsi le système IV de biogenèse des cytochromes c. La voie CCB est composée de protéines nouvelles, transmembranaires et ne contenant aucun domaine de fonction préalablement connu.

Pour comprendre l'implication du système IV dans la biogenèse du cytochrome b₆, j'ai caractérisé les interactions entre les cinq protéines mises en jeu. L'apocytochrome b₆ est tout d'abord partiellement replié suite à l'insertion supposée spontanée de ces deux hèmes b. La protéine est ensuite prise en charge par CCB1, puis probablement transférée à CCB3 qui recrute un hétérodimère stable formé des deux protéines homologues CCB2 et CCB4. Ces trois derniers composants du système IV constituent probablement le complexe de liaison de l'hème ci sur le cytochrome.

Ce travail a mis au jour une nouvelle voie indispensable à la biogenèse du cytochrome b₆, une protéine centrale pour la photosynthèse oxygénique.

Summary

Cytochromes c are heme proteins involved in numerous biological processes, notably in electron transfer that occurs in energy transducing membranes.

Cytochrome c biogenesis requires covalent attachment of the heme that, in vivo, is assisted by several groups of proteins classified in three different systems depending of the organism or the subcellular compartment under study. These biogenesis pathways are well characterized and include proteins involved in heme and apocytochrome chaperoning, thioether bond formation occurring on an apocytochrome typical motif and reducing power provision necessary for the binding process. Cytochromes c, and consequently their biogenesis pathways, are present essentially on the positive side of the membranes.

Cytochrome b6f complex transfers electrons from a lipid soluble transporter to a water soluble protein transporter between the two photosystems while building up a transmembrane proton gradient by translocating protons from the negative side to the positive side of the photosynthetic membrane. Cytochrome b6, one of the eight subunits of the complex is an atypical c-type cytochrome. It contains three hemes, two b-types and one c'-type, the heme ci. The latter is covalently attached to a unique cysteine localized on the stromal face, i.e. the negative side, of the complex.

In *Chlamydomonas*, cytochrome b6 biogenesis requires a set of specialized proteins, named CCB, to ensure the covalent binding of heme ci. By a genetic approach based on non photosynthetic mutants defining four nuclear loci, I have contributed to identify the genes and to characterize the four CCB proteins currently known. This biogenesis pathway is ubiquitous among oxygenic photosynthesis and thus, defines system IV for cytochrome c biogenesis. The CCB pathway is composed of novel, transmembrane proteins with no domain of previously known function.

In order to understand the role of system IV in cytochrome b6 biogenesis, I have characterized the interactions between the four CCB and their substrat. Cytochrome b6 is first partially folded by the spontaneous insertion of the two b-type hemes. The protein is then chaperoned by CCB1, probably transferred to CCB3, which recruits the stable heterodimer formed by CCB2 and CCB4. These latter three proteins represent probably the heme ci ligation complex of the system IV.

This study has revealed a new pathway, essential for the cytochrome b6 biogenesis, a key protein in the oxygenic photosynthesis.