

Thèse : Audrey LE BAS

« Etude par mutagenèse dirigée de l'environnement de deux cofacteurs du cytochrome b₆f : l'hème ci et la chlorophylle »

Résumé : Lors de la photosynthèse oxygénique, le complexe membranaire cytochrome b₆f transfère les électrons entre les deux photosystèmes, par l'intermédiaire de transporteurs liposoluble plastoquinone et hydrosoluble plastocyanine. La structure cristallographique du complexe b₆f a révélé la présence d'un groupe d'oxydo-réduction supplémentaire, Thème Ci et a permis de positionner les molécules de chlorophylle et p-carotène. Néanmoins, leur absence dans l'homologue mitochondrial cytochrome b₆f soulève la question de leur rôle au sein du complexe. Une étude par mutagenèse dirigée de leur environnement a donc été entreprise, au sein de l'algue verte unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii*. Les complexes mutants ont été analysés par biochimie, spectroscopie in vivo et in vitro et cristallographie aux rayons X. La mutation F40L de la sous-unité IV élargie la poche du site Qi : Thème Ci devient plus accessible à l'oxygène provoquant la destruction de Thème en conditions réductrices. Néanmoins, elle ne permet pas de stabiliser la fixation d'une plastoquinone. Le mutant A140F, du site de liaison du cycle chlorine de la chlorophylle, a permis d'obtenir pour la première fois un complexe b₆f assemblé ne possédant pas ce pigment. L'activité de transfert d'électrons fortement diminuée est corrélée à des changements structuraux du site Qo, retrouvés dans les structures cristallographiques des cytochromes b₆f et bc₁ en présence de différents inhibiteurs. Ces mouvements semblent donc être un mécanisme important de contrôle de l'oxydation du substrat afin d'éviter les court-circuits et la production d'espèces réactives de l'oxygène

· « Study of the environment of two cytochrome b₆f cofactors by site-directed mutagenesis : haem ci and chlorophyll »

Résumé : In oxygenic photosynthesis, the membrane protein cytochrome b₆f complex transfers electrons between the two photosystems, through a liposoluble transporter, plastoquinone and a soluble carrier plastocyanine. The X-ray structure of cytochrome b₆f has revealed the presence of a supplementary redox group, haem ci, and located a chlorophyll and a p-caroten inside the complex. However, the absence of these cofactors in the mitochondrial homologous protein, cytochrome bc₁ raises the question of their role. A site-directed mutagenesis study of their environment was achieved in unicellular green algae, *Chlamydomonas reinhardtii*, to assess their fonction. Mutated complexes were analysed by biochemistry, in vivo and in vitro spectroscopy and x-ray crystallography. The mutation F40L in subunit IV opens the access of the Qi site to haem ci for oxygen which destroys the haem under reducing conditions but it does no help to stabilise a plastoquinone in the Qi site. Mutation A140F, in the chlorine ring binding pocket, is the first assembled cytochrome b₆f that does not have its chlorophyll pigment. The strong reduction in the electron transfer activity is correlated to structural changes found in the Qo site of cytochromes b₆f and bc₁ upon ligand binding. It suggests that those movements are an important mechanism, which controls substrate oxydation in the Qo site and avoids short-circuit and formation of reactive oxygen species.