

COURS 03 - LA MITOCHONDRIE

Introduction

Chez les eucaryotes, la mitochondrie est le compartiment cellulaire est le siège principal de la synthèse d'ATP, respiration cellulaire et production énergétique.

- Les complexes enzymatiques permettant l'oxydation du pyruvate (glucose) par la pyruvate déshydrogénase en AcetylCoA
- L'acetylCoA est oxydé dans le cycle de l'acide citrique de NADH et FADH₂
- La chaîne de phosphorylation oxydative et enfin l'ATP synthétase. Ces complexes sont présents dans la membrane interne de la mitochondrie.
- Isolement d'un univers enzymatique dans des membranes qui elles même structurent les activités enzymatiques.

Elle présente d'importantes autres activités enzymatiques:

- Cytochrome P450 responsable du métabolisme de drogue et cholestérol
- Des perméases pour le cholestérol qui sont aussi des sites récepteur périphériques pour les benzodiazépines
- La synthèse de phospholipides exportés et membranaires qui seront exportés vers le RE et l'extérieur.
- Participent à la synthèse d'AA
- Contrôle de la concentration de Ca⁺⁺
- Participation aux mécanismes de mort cellulaire

Respiration aérobie et mitochondrie

L'énergie cellulaire provient de l'oxydation de nutriments. L'oxygène capteur d'électron est très toxique (pour l'ADN, l'ARN, mitochondrie....).

En absence d'oxygène seule une quantité limitée d'énergie peut être extraite des substances comestibles et cette combustion produit des substances telles que l'acide lactique et l'éthanol. Les cellules ayant un trouble mitochondrial dégénèrent.

Chez les eucaryotes l'utilisation de l'oxygène pour l'extraction de l'énergie est localisée dans la mitochondrie.

L'oxydation se produit en plusieurs étapes. Trois produits sont générés dans le cytosole et sont utilisés par la mitochondrie pour produire de l'ATP:

- le pyruvate produit de dégradation des AA et sucres.
- Les électrons provenant du NADH cytosolique sont transportés par des molécules navettes
- Les acides gras à chaînes courtes produits par les peroxysomes

Ces molécules traversent les membranes externes et la membrane interne par des perméases de type actif

I. Energie cellulaire

Les réactions de synthèse et certaines étapes de dégradation nécessitent de l'énergie, réaction endergoniques (exemple du protéasome)

La cellule doit produire par des réactions exergoniques et stocker cette énergie sous une forme réversible, diffusible et économique sans interférer avec les mécanismes de synthèse et de dégradation.

L'énergie des eucaryotes (hors plantes) provient de l'oxydation de composé organique.

La production d'électrons va permettre le fonctionnement des pompes à protons qui feront aussi marcher l'ATP synthétase.

Les réactions de synthèse et de dégradation de l'ATP sont couplées respectivement et aux réactions de biosynthèses, de transport actifs de contraction de fibres musculaires, de production de chaleur.

COURS 03 - LA MITOCHONDRIE

Energie d'utilisation:

- Biosynthèse de macromolécule
- Contraction musculaires
- Transport actif d'ions
- Thermogenèse

Production d'énergie:

- Dégradation de sucres
- Dégradation de lipides
- Dégradation de protéines

Présence du cycle de l'acide citrique dans l'intérieur des mitochondries et de la chaîne de transport d'électrons dans la membrane mitochondriale.

II. Les Phosphorylations oxydatives

Les lois de la thermodynamique s'appliquent aux réactions biologiques et donc aux réactions d'oxydation.

Les mécanismes biochimiques vont produire de l'énergie.

Passage des électrons du NADH+H au FAD.

Particularité des oxydo-réductions biologiques

- Spontanément il n'y a pas d'oxydation même si ces réactions sont thermodynamiquement possibles
- Les enzymes (protéine et groupement prosthétique) arrachent l'hydrogène aux substrats
- Il n'y a pas de réaction directe de l'hydrogène avec l'O₂ la libération d'énergie se fait par paliers.

Groupement prosthétique des réactions d'oxydoréductions.

- **Les coenzymes pyrimidiques**
NAD et NADP. Deux atomes d'hydrogènes sont enlevés au substrat et deux électrons sont transférés.
- **Les coenzymes flaviniques**
FAD et FADH₂ deux hydrogènes fixés en para. Deux électrons sont transférés
- **Les cytochromes**
Groupement prosthétique est l'hème Fe³⁺ et Fe²⁺. Présence de liaison thio-ether avec les cystéines -CH₂-S-CHE-
- L'ubiquinone ou Coenzyme Q est liposoluble et présent dans les membranes
Deux électrons transportés.
- Fe lié à des protéines dans les liaisons Fe-S
 - FeS 1Fe coordonné à quatre cystéines FeS
 - Fe₂S₂: 2 Fe coordonnés à deux sulfures (Fe-S) et quatre cystéines
 - Fe₄S₄: 4 Fe coordonnés à quatre sulfures aux sommets d'un cube et quatre cystéines.

Les réactions exergoniques vont cheminer entre les potentiels croissant de redox.

III. Mitochondrie et production d'ATP

L'énergie libérée par l'oxydation des nutriments sert à générer un gradient ionique et d'autre de la membrane interne. L'ATP est produit à partir de l'énergie libérée (gradient ionique) phosphorylation oxydative.

COURS 03 - LA MITOCHONDRIE

1. Présence de chaînes d'oxydo-réduction

On range les agent oxydant et couple redox en fonction de leur affinité pour les électrons.

La valeur du potentiel d'oxydoréduction mesurée par rapport à une concentration en H⁺ à pH 7.

2. Production d'une force proto-motrice

Le transfert de protons est occasionné par l'énergie libérée par le passage des électrons du NADH et du FADH₂ à l'oxygène moléculaire.

Ce transfert de protons à travers le membrane interne produit un potentiel (electrogène).

- La différence de concentration crée un gradient de pH
- La répartition des charges crée un voltage d'où la notion de gradient électro chimique. La force qui en résulte est

$$\Delta P = \Psi - 2,3 \frac{RT}{F} \Delta pH \quad \text{ou à } 25^{\circ}\text{C} \quad \Delta P = \Psi - 59 \Delta pH$$

La contribution de la fore proto-motrice, due au potentiel en rapport avec le gradient de pH dépend de la perméabilité de la membrane interne (Cl⁻)

La respiration active de mitochondries génère une force proto-ionique d'environ 220mV dont 20% provient de la différence de concentration en protons (limitée par le pH cytosolique).

Ce potentiel transmembranire est démontré par la fixation de colorants liposolubles chargé positivement qui se répartissent de part et d'autre des membranes en fonction du potentiel électrique.

Le 2,4 dinotrophénol abolit le gradient et découple la production d'ATP.

IV. La mitochondrie définit un espace enfermé par deux doubles embranes lipidiques

1. Observation au microscope électronique

- Structure ovale sensible à la pression osmotique.
- Nombre et aspect varient: 1500 soit 15-20% du volume cellulaire, les mitochondries sont fréquemment associé à des gouttelettes contenant des acides gras.
- Leur nombre et leur volume est plus important dans les cellules musculaires. Dans le spermatozoïde les mitochondries sont localisées à l'arrière du noyau, pièce intermédiaire.
- Les mitochondries sont associés à l'endroit qui a le plus besoin d'énergie.

Les complexes sont enchassés dans la membrane interne et l'espace matriciel. L'espace matriciel contient son ADN.

- Membrane externe, 3500 particules intramembranaire/μm² perméables nonglycosylées.
- Espaces intermembranaire apparaît limité mais peut devenir plus étendu lorsque la respiration est active.
- Membrane interne formant des replis ou crêtes et tapissé de particules: les complexes ATP synthétase leur nombre et importance sont variable et reflètent des degrés différents d'activité. Présence d'accolements, lieu de passage cytosol-espace matriciel, 6 000/μm².
- La matrice mitochondriale contenant des ribosomes et des granules. La matrice présente la consistance d'un gel (100-500 mg/ml de protéines hydrosolubles...le blanc d'oeuf a une concentration de 50mg/ml)

COURS 03 - LA MITOCHONDRIE

2. Composition chimique

A. Préparation des différents constituant

- Par utilisation de détergent:
 - Séparation de la membrane externe par la digitonine ou par choc osmotique puis par centrifugation
 - Membrane interne par détergeant générant des vésicules inversées.

B. Contenu protéique acide nucléique de l'espace matriciel

Cet espace contient des ribosomes et de l'ADN circulaire double-brin codant pour des éléments constitutif de la mitochondrie. Filament et granules denses dont des précipité de phosphate de calcium.

L'espace matriciel contient les complexes enzymatiques du cycle de Krebs: Pyruvate deshydrogénase. Elle est constitué de

- 8 dihydrolypoyl transacetylase
- 12 " deshydrogénase
- 24 pyruvate decarboxylase

C. Composition lipidique et protéique des deux membranes

La composition diffère d'un compartiment à l'autre.

- La membrane externe:
 - Rapport protéine/lipide = 1 (proche de la composition de la membrane du réticulum)
 - Perméable et contient des perméase.
 - Contient des complexes enzymatique permettent l'oxydation de l'adrénaline du tryptophane et l'allongement des acides gras.
- L'espace intermembranaire est de meme composition que le cytosol.
- La membrane interne:
 - Elle a 3x plus de protéine que la membrane externe.
 - Plus riche en cardiolipine (1/5 de sa composition) homologue aux lipides des membranes plasmiques des bacteries
 - Très imperméable et les membranes ont besoin de canaux spéciaux.

V. Le métabolisme oxydatif de la mitochondrie

- La glycolyse donne du Pyruvate et du NADH.
- Les électrons du NADH formé dans le cytosol par la glycolyse sont utilisé pour réduire un métabolite de faible poid.
- L'oxydation aerobie du pyruvate dans l'espace matriciel donne du Pyruvate CoA qui sera oxydé et formera 3 éléments: NADH, FADH2 et GTP.
- Les électrons tranferé dans les chaines de transporteurs d'électrons localisé dans la membrane interne ont un recepteur final qui est l'O2, qui sera réduit en H2O.
- Le retour des protons à travers la membrane permettra la formation d'ATP.

La membrane interne a 4 complexes transmembranaire:

- NADH+H sera oxydé sur le site I
- FADH2 sur le site III

Le potentiel redox augmente au fil des sites.

COURS 03 - LA MITOCHONDRIE

1. Complexe NADH Q reductase

- Complexe transmembranaire monomérique de 106 Daltons, 22 chaînes peptidiques nucléaires, 6 codés par l'ADN mitochondrial.
- Oxyde le NADH en transférant deux électrons à la FMN puis complexe FeS
- Electrons diffusé à l'Ubiquinone

2. Complexe Succinate UQ Oxydoreductase

- 4 Chaînes dont 2 polypeptidiques formant la succinate deshydrogénase
- Permet le transport d'électrons de faible énergie
- Ne permet pas de pompage de protons

3. Cytochrome C reductase

- Dimère de 500 000 daltons: 9 chaînes peptidiques nucléaire, 1 mitochondriale.
- 3 Hèmes et un Fe-S
- Electrons sont transportés de l'ubiquinone par l'intermédiaire du Cytochrome C au 4ième complexe
- La variation du potentiel est de 0,270 V
- Un proton est pompé de l'espace matriciel
- Inhibiteur: **antimycine**

4. Cytochrome C Oxydase

- Complexe dimérique de 300 000 Da
- Deux cytochrome et deux Cu
- Cyanide (CN), Azyde (Ng), CO inhibent le transfert d'électrons

Le complexe I III et IV pompent les protons, ils sont inhibé par le DNP.

VI. Fonctionnement de la chaîne respiratoire

Elle entraîne:

- Chute progressive du potentiel redox sans nécessiter d'énergie
- Création d'un gradient électro-chimique de proton, pH et créer une force protonique et potentiel de membrane.

Arrêt de la synthèse d'ATP entraîne:

- Augmentation de concentration d'O₂
- Disparition du gradient du proton
- Baisse de transport membranaire
- Production de radicaux libres toxiques

VII.Énergie du gradient électrochimique de proton permet production d'ATP

Structure F1: structure globulaire à site catalytique

Structure F0: structure canal de transport de proton

Fonctionnement: le proton qui passe de l'espace matriciel à l'espace intermembranaire consomme de l'ATP, l'inverse produit de l'ATP.

Le rapport ATP/ADP > 1 pour un fonctionnement normal de la mitochondrie.

COURS 03 - LA MITOCHONDRIE

VIII. Bilan

Existence d'énergie sous forme d'ATP

- Oxydation du glucose en pyruvate : 2 ATP et 2 NADH
- Conversion pyruvate en Acetyl CoA: 2 NADH
- Krebs: 6 NADH et 2 FADH
- Chaîne respiratoire: 28 ATP

IX. Photosynthèse

L'énergie lumineuse est capté par le chlorophylle: la synthèse de glucide est faite à partir de CO et H₂O, ainsi que la synthèse de NADH et ATP.

Les photons transfèrent leur énergie au complexe II. L'absorbition d'énergie du photon permet de faire de l'énergie.

Chez les bactéries: ce rôle est rempli par la membrane plasmique

Chez les eucaryotes: par la membrane mitochondriale interne

Chez les thylacoïde: espace thylacoïde organise les complexe de photosynthèse à l'intérieur des chloroplaste.

X. L'ADN mitochondrial

1. L'ADN circulaire double brin

Chez l'homme, l'ADN est circulaire contient environ 16 000 bp, 3,4 Å entre deux plateaux.

5-10 copies identiques sont présentes par mitochondrie forme un système génétique complet: origine de réplication de transcription.

L'ADN matriciel code pour un certain nombre d'ARN qui restera dans l'espace matriciel. La membrane interne de la mitochondrie est essentiellement étanche et les éléments qui sont rentré ne pourront pas sortir.

La mitochondrie contient plusieurs copies (~10aine) de l'ADN mitochondriale, toutes présentes dans l'espace matriciel.

A une origine de réplication et origine de transcriptions.

2. Les deux brins codent pour un nombre limité de protéines

Toute la séquence est codante et les deux brins sont transcrits. Le génome mitochondrial humain ne contient pas d'introns:

- Treize sous unités différentes du métabolisme oxydatif
- 22 ARN de transfert (au lieu de 31): dégénérescence par rapport aux AA en troisième position
- Deux ARNr
- Très faible redondance
- Très forte densité de l'information génétique.

Mixité de protéines venant du noyaux et des protéines venant de l'ADN mitochondrial.

Le brin lourd code pour un grand nombre de protéine.

Le brin léger code pour un nombre plus faible de protéine, il code surtout pour les ADN de transfert.

COURS 03 - LA MITOCHONDRIE

Les mécanismes de transcription et de synthèse de protéines **sont différents**: la transcription et de la synthèse de protéine dans la mitochondrie sont inhibées par des **inhibiteur bactériens**:

- ➔ Le noyau est inhibé par l'alpha amanitine
- ➔ La mitochondrie, la transcription est inhibé par l'acrydine ou l'ethydium.

La traduction des protéine de noyau est inhibé par **cycloheximide** alors que la traduction des protéines des la mitochondrie est inhibé par....

Le brins lourd H code pour:

- Cytochrome b
- 6 SU de la NADH reductase
- 3 SU de la cytochrome oxydase
- ARNr
- ARNt
- 90% codant

Le brin léger code essentiellement pour les ARNt

- 90% non codant

3. Source d'erreur

Le génome mitochondrial est transmis par la mère hérédité cytoplasmique non mendélienne maternelle.

Un petit nombre de mitochondries est transmis aux cellules filles (d'où une évolution de l'hétérogénéité éventuelle de la population d'ADN mitochondriaux).

Réduction de la complexité des mitochondrie dans les cellules, ceci va générer a partir du moment ou il y a une erreur de réplication, il y aura une hétérogénéité de l'ADN mitochondriale.

Si il y a une grande délétion de 100-200 bp, cet ADN plus court va se répliquer plus souvent que l'ADN normal pour long. Du coup il y aura un basculement vers l'ADN délété. Au cours de la vie de la cellule, il y aura une hétérogénéité de l'ADN mitochondrialien.

Homoplasmie: ADN mitochondriaux présentent les même séquences

Hétéroplasmie: ADN mitochondriaux dans une même mitochondrie présentent des séquences différentes. Ceci évolue dans le temps

4. Mélanges muté/normal

Dans les mitochondries on peut observer un mélange de génomes mutés et sauvage (hétéroplasmie 5-10x100)

Le mélange peut être modifié lors de la division cellulaire: évolution vers l'homoplasmie (sauvage ou mutée) ou persistance d'une hétéroplasmie instable ou stable

Les cellules qui auront une déficience en ADNmt auront besoin d'un apport plus grand en énergie. Expression différentes des mutations de l'ADNmt en raison de la différence de la dépendance des tissus en énergie mitochondrial: le système nerveux central est préférentiellement touché, puis les muscles.

COURS 03 - LA MITOCHONDRIE

XI. Croissance et division des mitochondries

La taille et le nombre de mitochondries est fonction du type cellulaire et de l'activité biologique (cellule musculaire).

Les mitochondries s'arrondissent, les tubules grandissent, et le volume augmente dans les cellules musculaires: il y a production de membrane et de protéines en fonction des besoins.

Ces phénomènes se passent durant l'interphase: il y a synthèse de tout ce qu'il faut. Au cours de la métaphase/telophase, il y a distribution des mt entre les deux cellules filles. La division des mitochondries n'est pas associée à la division cellulaire

1. Synthèse et transports de protéines

L'ADN mitochondrial ne code que pour peu de protéines. Il est donc nécessaire d'importer des chaînes peptidiques codées par l'ADN nucléaire.

L'assemblage des sous-unités protéiques codées dans le noyau avec les sous-unités codées par l'ADN mitochondrial a lieu dans l'espace matriciel ou la membrane interne. Leurs synthèses, transport et assemblages sont coordonnés à l'intérieur de la mitochondrie.

Après multiplication des différents éléments il y a des divisions mitochondriales pendant l'interphase.

Les protéines synthétisées dans le cytosol seront adressées à partir du cytosol, seront repliées dans la mitochondrie.

Les protéines qui vont s'associer aux ARNt vont former les ribosomes, des protéines vont intervenir dans la transcription du génome mitochondrial, d'autres protéines vont intervenir dans les réactions chimiques dans la membrane interne.

Les protéines codées par l'ADN nucléaire contiennent **une séquence signal amphiphile** de 20 à 80 AA. Elle sera excisée dans l'espace matriciel, au contraire des protéines qui sont destinées aux noyaux.

Cette protéine entre dans l'espace matriciel **au niveau de juxtaposition des membranes externe et internes**, ce transport nécessite la séquence signal et le déroulement de la structure secondaire. Il y a donc repliement à nouveau dans l'espace matriciel.

Les protéines codées par l'ADNmt sont synthétisées et dégradées dans l'espace matriciel. Leur synthèse est bloquée par des antibiotiques tels que le chloramphénicol, l'erythromycine et la tétracycline.

2. Transport des lipides mitochondriaux

Leur synthèse est localisée dans le RE. Ils sont transférés par étape dans la membrane externe puis interne (fusion).

Les lipides sont l'objet de modifications tels que la cardiolipine ou le biphosphatidyl-glycérol (quatre chaînes d'acides gras).

3. Acide nucléique ADN et ARNs

Il n'y a ni importation ni exportation de matière génétique au travers des membranes mitochondriales, tout est assemblé dans la matrice mitochondriale.