

BIOÉNERGÉTIQUE

Bernard GUÉRIN



17, avenue du Hoggar
Parc d'Activité de Courtabœuf, BP 112
91944 Les Ulis Cedex A, France



Grenoble Sciences

Grenoble Sciences poursuit un triple objectif :

- réaliser des ouvrages correspondant à un projet clairement défini, sans contrainte de mode ou de programme,
- garantir les qualités scientifique et pédagogique des ouvrages retenus,
- proposer des ouvrages à un prix accessible au public le plus large possible.

Chaque projet est sélectionné au niveau de Grenoble Sciences avec le concours de referees anonymes. Puis les auteurs travaillent pendant une année (en moyenne) avec les membres d'un comité de lecture interactif, dont les noms apparaissent au début de l'ouvrage. Celui-ci est ensuite publié chez l'éditeur le plus adapté.

(Contact : Tél. : (33)4 76 51 46 95 - E-mail : Grenoble.Sciences@ujf-grenoble.fr)

Deux collections existent chez EDP Sciences :

- la *Collection Grenoble Sciences*, connue pour son originalité de projets et sa qualité
- *Grenoble Sciences - Rencontres Scientifiques*, collection présentant des thèmes de recherche d'actualité, traités par des scientifiques de premier plan issus de disciplines différentes.

Directeur scientifique de Grenoble Sciences

Jean BORNAREL, professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1

Comité de lecture pour "Bioénergétique"

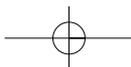
- Pierre VIGNAIS, professeur émérite à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1
- Valdur SAKS, professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1
- Docteur Jacqueline A. HOERTER, chargée de recherche INSERM (U-446),
Faculté de Pharmacie, Université de Paris-Sud

Grenoble Sciences reçoit le soutien
du **Ministère de la Jeunesse, de l'Éducation nationale et de la Recherche**,
de la **Région Rhône-Alpes**, du **Conseil général de l'Isère**
et de la **Ville de Grenoble**.

Réalisation et mise en pages : **Centre technique Grenoble Sciences**
Illustration de couverture : **Alice Giraud**

ISBN 2-86883-740-9

© EDP Sciences, 2004



EXTRAITS



fois les consommations de O_2 , par une méthode manométrique, et de phosphate, par dosage colorimétrique. La méthode manométrique utilisée était celle mise au point par O. WARBURG qui consistait à mesurer des variations de pression à volume constant (loi de MARIOTTE : $PV = n RT$) correspondant à la quantité de dioxygène consommé dans des conditions où le gaz carbonique dégagé était piégé dans une solution alcaline. Le rapport du nombre de moles de phosphate consommé par atome d'oxygène pour un temps donné est appelé P/O : il est égal à environ 3 pour un substrat respiratoire réduisant le NAD^+ , et environ 2 pour un substrat donnant ses électrons directement à une flavine. Ces valeurs ne sont pas obligatoirement des nombres entiers et il n'y a d'ailleurs pas de raison théorique pour qu'il en soit ainsi (ce problème est discuté plus en détail au § 8.5.2). Depuis ces premières mesures les techniques ont évolué. La consommation d'oxygène est suivie en continu par une méthode polarographique : à l'aide d'une électrode spécifique à l'oxygène convenablement polarisée (entre 0,6 et 0,8 V pour l'électrode de CLARK) ; le courant électrique enregistré est proportionnel à la concentration en dioxygène dissous dans le milieu. L'ATP formée, instable en milieu acide, est généralement piégée sous forme de glucose-6P en ajoutant dans le milieu du glucose, de l'hexokinase et du Mg^{2+} . Après élimination des protéines en milieu acide, centrifugation de l'échantillon et neutralisation du surnageant, le glucose-6P, en présence de $NADP^+$ et de glucose-6P déshydrogénase, donne du NADPH qui peut être dosé par spectrophotométrie ou fluorimétrie. L'ATP peut aussi être dosée par luminescence en utilisant le système luciférine/luciférase du ver luisant.

8.1.2. MESURES POLAROGRAPHIQUES ET EFFET DES INHIBITEURS

La série d'expériences décrites ci-dessous et représentées dans la figure 8.1 permet de dessiner les grandes lignes de la structure fonctionnelle du système. Il est important de remarquer que ces expériences sont effectuées sur des mitochondries isolées et dans des conditions qui ne reflètent pas les conditions cellulaires. Notamment les substrats sont ajoutés en quantité non-limitante, ce qui permet d'expliquer certains états en termes de proche équilibre thermodynamique. Le but de ces expériences est de comprendre les mécanismes des oxydations phosphorylantes et non pas leur régulation cellulaire.

L'addition d'un substrat respiratoire à une suspension de mitochondries dans un milieu isoosmotique (0,25-0,3 M en saccharose) et contenant du phosphate induit une faible respiration. Cette vitesse est fortement stimulée par addition d'ADP et, si l'ajout est suffisamment petit, la respiration redevient faible après conversion de l'ADP en ATP. Il est possible de stimuler de nouveau la respiration par un nouvel ajout d'ADP jusqu'à ce que le dioxygène dissous dans le milieu soit épuisé (figure 8.1a). Cette observation suggère que respiration et synthèse d'ATP sont deux phénomènes couplés.



En absence d'ADP ajouté, la faible vitesse de respiration correspond à une perte d'énergie inhérente au système dont la nature sera discutée ultérieurement. L'addition d'ADP déplace la réaction de la gauche vers la droite jusqu'à l'obtention d'un nouvel état stationnaire qui peut *a priori* être considéré comme un équilibre entre le potentiel

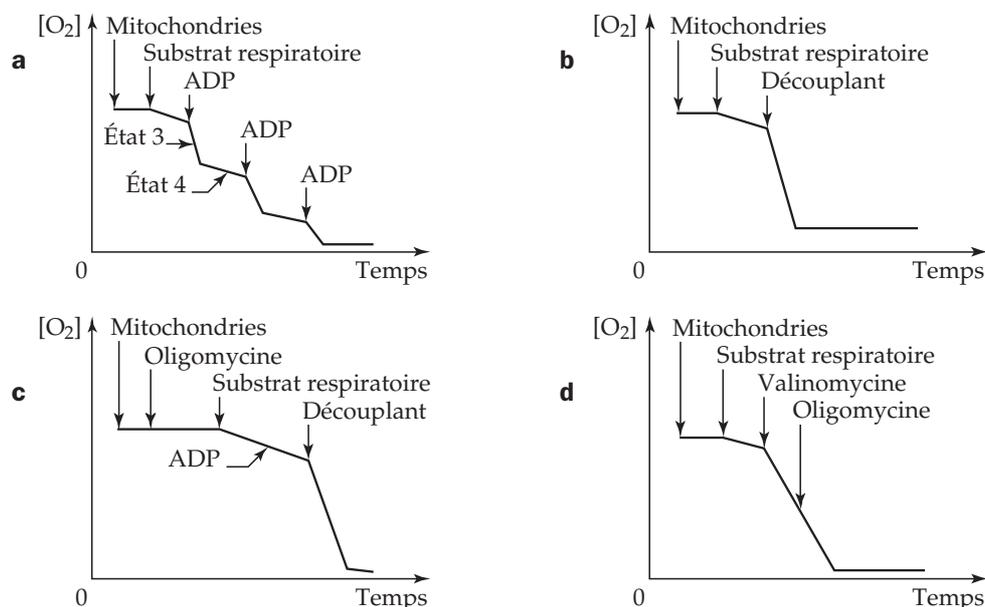




phosphate et le potentiel redox (correspondant aux parties de la chaîne impliquées responsables de la transduction d'énergie, cf. § 8.4) bien qu'en fait la situation soit plus complexe et fasse intervenir des régulations. La vitesse de respiration stimulée par l'ADP est appelée *respiration à l'état 3* et le retour à une respiration faible, *respiration à l'état 4*. Ces états, définis par Britton CHANCE, correspondent à des états stationnaires. Le rapport des vitesses état 3/état 4 est appelé **contrôle respiratoire** et est une mesure de la qualité des mitochondries isolées dans les conditions où les concentrations en substrats respiratoires sont saturantes.

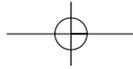
L'addition de certaines drogues peut modifier ces vitesses de respiration. Par exemple l'ajout de 2,4-dinitrophénol (2,4-DNP), de carbonyl-cyanide-m-chloro-phénylhydrazone (CCCP), ou de son dérivé fluoré (FCCP) stimulent la respiration et inhibent la synthèse d'ATP (figure 8.1b). Ces drogues sont appelées des **découplants** car, comme dans le débrayage d'une voiture, elles libèrent le système moteur du reste de la machine. La réaction d'oxydation ainsi libérée, fortement exergonique, est stimulée et fonctionne à sa vitesse maximum. Cet effet des découplants suggère qu'ils dissipent un état énergétique intermédiaire entre l'énergie redox et le potentiel phosphate.

L'expérience reportée sur la figure 8.1c montre que l'oligomycine prévient la stimulation de la respiration par ajout d'ADP mais est sans effet sur l'action des découplants, indiquant ainsi qu'elle inhibe l'utilisation de l'énergie pour la synthèse de l'ATP sans toutefois la dissiper. Par la suite il a été montré, à l'aide de mutants de levure, que cet inhibiteur se fixe sur le secteur membranaire Fo de l'ATP synthase et inhibe le canal à protons de ce complexe.



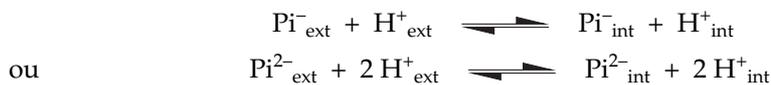
8.1 – Schémas de mesures de la respiration de mitochondries isolées par polarographie





- ▶ l'état stationnaire de concentration en un métabolite est fonction de plusieurs flux (entrée, sortie, consommation ou production interne);
- ▶ dans les exemples présentés (notamment pour le phosphate), le calcul est basé sur une symétrie entre les constantes cinétiques d'entrée et de sortie du substrat transporté, ce qui peut ne pas être le cas en présence d'énergie respiratoire. Une diminution de la valeur des constantes de sortie par la respiration peut donner lieu à une sur-concentration en produit transporté (cela ne contredit pas les lois de la thermodynamique dans la mesure où l'énergie nécessaire est apportée par la respiration).

Transport du phosphate - Les expériences de gonflement ont suggéré que le phosphate était transporté avec un proton de manière électroneutre. Des expériences effectuées en l'absence d'énergie respiratoire et à différents pH externes montrent que dans ces conditions le Pi s'équilibre avec le ΔpH selon la réaction :



ce qui donne la relation :

$$\log [\text{Pi}]_{\text{int}} / [\text{Pi}]_{\text{ext}} = a \Delta pH + \text{constante}$$

où le coefficient a représente le degré de dissociation de l'anion phosphate. (PALMIERI *et al.*, 1970). Des expériences effectuées avec des protéoliposomes contenant le transporteur de phosphate préalablement isolé aboutissent à la même conclusion. Ces expériences démontrent l'existence d'un cotransport Pi-H⁺ mais ne préjugent pas des concentrations en Pi lors du fonctionnement des oxydations phosphorylantes, comme nous l'avons signalé précédemment.

Le transport du phosphate est inhibé compétitivement par l'anion arséniate et par tout les acides faibles utilisant le ΔpH comme l'acétate ou le propionate. Ce dernier a souvent été utilisé pour moduler la valeur du ΔpH . Le transporteur est inactivé par les réactifs des thiols (mercuriels, maleimides...) à de relativement faibles concentrations chez les mitochondries de mammifères, ce qui a permis l'identification de la molécule.

Transport des adénines nucléotides - La translocase est le transporteur assurant l'échange électrogénique entre l'ATP et l'ADP de la matrice mitochondriale et du cytosol selon la réaction :



Il a été montré sur des mitochondries isolées que le transporteur assure l'équilibre entre les pools de nucléotides adényliques interne et externe et la différence de potentiel électrique de part et d'autre de la membrane interne. Une relation simple peut être établie en écrivant qu'à l'équilibre on obtient la relation :

$$\mu_{\text{ATP}_{\text{ext}}} + \mu_{\text{ADP}_{\text{int}}} - \mu_{\text{ATP}_{\text{int}}} - \mu_{\text{ADP}_{\text{ext}}} = 0$$

en posant $\mu_{\text{AT(D)P}} = \mu_{\text{AT(D)P}}^0 + RT \ln[\text{AT(D)P}] + n F \Psi$

on obtient

$$RT \ln [\text{ATP}]_{\text{ext}} / [\text{ADP}]_{\text{ext}} \times [\text{ADP}]_{\text{int}} / [\text{ATP}]_{\text{int}} = - F \Delta \Psi_{i-e}$$



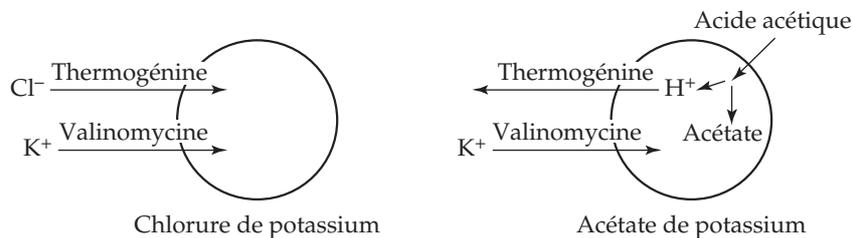


Comme $\Delta\Psi_{i-e}$ est négatif, le rapport $[ATP]/[ADP]$ est plus fort à l'extérieur qu'à l'intérieur de la mitochondrie. Ainsi, en tenant compte des concentrations en phosphate plus élevées à l'intérieur, **le potentiel phosphate est plus fort dans le cytoplasme que dans la matrice mitochondriale**. En d'autres termes, la synthèse d'un ATP dans le cytosol par la mitochondrie nécessite plus d'énergie que celle formée dans la matrice. Cette différence est due au fonctionnement du transporteur électrogénique et à l'accumulation de P_i .

La translocase est le transporteur le plus abondant dans la membrane interne. Il existe chez l'homme trois isoformes de cette protéine dont la distribution possède une certaine spécificité tissulaire : ANT1, ANT2 et ANT3.

Deux types d'inhibiteurs ont été utilisés pour étudier le mécanisme du transport : l'atractylate (ou son dérivé le carboxyatractylate) et l'acide bongkrélique. Pour résumer une importante littérature sur le sujet, on considère que le transporteur existe sous deux formes : l'une où le site de fixation des nucléotides est dirigé vers l'extérieur (conformation c pour cytosol) et l'autre dirigé vers l'intérieur (conformation m pour matrice). L'atractylate se fixe sur la forme c qu'il stabilise ; l'acide bongkrélique se fixe sur la forme m qu'il stabilise. Le transport consiste en un changement de conformation entre ces deux formes qui ne peut être induit que par les substrats. Ces résultats sont le fruit de nombreuses études (équipes de KLINGENBERG à Munich et de VIGNAIS à Grenoble) utilisant des méthodes chimiques ou physico-chimiques.

Protéine découplante - Contrairement aux mitochondries de foie, par exemple, les mitochondries isolées de tissu adipeux brun (cf. chapitre 9) gonflent dans une solution isoosmotique de KCl après addition de valinomycine. De même un gonflement est induit en acétate de potassium par la seule addition de cet ionophore alors que, comme nous l'avons vu pour d'autres types de mitochondries, un découplant doit être ajouté en plus de la valinomycine pour induire ce transport. Ces deux types de gonflement sont inhibés par les purines di- ou triphosphate et par la sérum albumine qui se combine avec les acides gras libres. Il a été postulé puis montré qu'une protéine, la thermogénine, était capable de catalyser l'entrée de Cl^- ou de H^+ dans les mitochondries dans le sens de leur potentiel électrochimique.



8.14 – Rôle de la thermogénine (UCP) dans le mécanisme de gonflement des mitochondries en chlorure et en acétate de potassium

Les mitochondries isolées de tissu adipeux brun, incubées en l'absence de nucléotides, sont incapables de maintenir une force protonmotrice, ce qui indique un découplage par lequel l'énergie d'oxydoréduction est transformée en chaleur. Par contre la





constitués par le cytochrome b, avec deux groupes prosthétique le b_{566} et le b_{562} , une [2Fe-2S] protéine (la protéine de RIESKE) et le cytochrome c1.

- ▶▶ Le complexe 4 ou cytochrome c oxydase catalyse le transfert des électrons du cytochrome c à l'oxygène moléculaire. Ce complexe contient 4 centres redox : deux ions cuivre Cu_A et Cu_B et deux hèmes a et a3.
- ▶▶ Le complexe 5 correspond à l'ATP synthase dont on a classiquement distingué deux parties, l'une solubilisable ou F1 et l'autre membranaire ou F0. F1 porte trois sites catalytiques ; F0 constitue le canal à protons qui, chez les eucaryotes, est inhibé par l'oligomycine. Les travaux sur le mécanisme de la réaction (qui ont valu le prix Nobel 1997 à l'américain BOYER et au britannique WALKER) montrent que l'énergie protonique est convertie par le complexe en énergie cinétique (rotation de certains éléments du complexe) induisant des changements conformationnels (énergie de conformation) et la libération dans le milieu d'ATP (énergie chimique). C'est pourquoi on distingue actuellement deux parties dans l'ATPase, un stator et un rotor.

La structure et le mécanisme de ces différents complexes sont exposés au paragraphe 8.9 en fin de chapitre.

- ▶▶ D'autres enzymes, en général contenant un FAD, se branchent au niveau de l'ubiquinone, comme noté sur la figure 8.21. L'équipement enzymatique peut varier selon le tissu ou l'organisme. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, par exemple, une lactico-déshydrogénase cède ses électrons directement au cytochrome c.

8.5. LOCALISATION DES SITES DE COUPLAGE ET ÉNERGÉTIQUE

Nous avons vu que la chaîne respiratoire pouvait être considérée comme une pompe à protons, créant ainsi un $\Delta\mu H^+$ servant de force à la synthèse de l'ATP. Le problème a été de déterminer quels étaient les complexes capables de coupler les réactions redox au mouvement des protons.

8.5.1. DÉTERMINATION EXPÉRIMENTALE DES SITES

Le résultat d'une respiration couplée peut être mesuré soit par la création d'un $\Delta\mu H^+$, soit par la synthèse de l'ATP. Nous utiliserons cette dernière méthode pour localiser les sites. Le principe consiste à isoler fonctionnellement un complexe respiratoire et à mesurer le rapport $ATP/2e^-$, c'est-à-dire la quantité d'ATP formé lorsque le complexe est traversé par deux électrons. Pour ce faire des mitochondries de mammifères sont incubées en présence d'ADP, de phosphate et, selon le complexe étudié, de différents donneur et accepteur d'électrons. Le complexe est isolé fonctionnellement en utilisant les inhibiteurs adéquats (cf. figure 8.21).

- ▶ Le complexe 1 est isolé de la suite de la chaîne par l'antimycine ; le donneur d'électrons est le malate plus pyruvate par exemple (il est nécessaire d'ajouter le pyruvate, source d'acétyl-CoA afin de ne pas bloquer l'oxydation du malate par accumulation d'oxaloacétate) ; l'accepteur est une quinone sous sa forme oxydée,





peu hydrophobe (à courte chaîne isoprénoïde) et en quantité suffisante pour accepter les électrons venant du substrat *via* les quinones endogènes. L'ATP/2e⁻ mesuré par le rapport entre la vitesse de synthèse de l'ATP et celle de réduction des quinones exogènes est trouvé généralement supérieur à 1.

- ▶ L'activité du complexe 2 est mesurée en présence de roténone, d'antimycine, de succinate et de la même quinone que celle utilisée dans l'expérience précédente. On ne constate aucune synthèse d'ATP.
- ▶ L'activité du complexe 3 est mesurée en présence de cyanure et de roténone. Puisque le complexe 2 n'est pas couplé, le donneur d'électrons peut être le succinate ; du cytochrome c oxydé exogène ou du ferricyanure peuvent être utilisés comme accepteur d'électron. Un ATP/2e⁻ inférieur à 1 a été déterminé.
- ▶ L'accepteur d'électrons naturel du complexe 4 est le dioxygène ; le donneur d'électrons sera le cytochrome c réduit par l'ascorbate en présence de TMPD (triméthylphénylènediamide), un médiateur redox artificiel. L'expérience est effectuée en présence d'antimycine. L'ATP/O est d'environ 1.

En conclusion trois complexes sur quatre sont couplés à la synthèse de l'ATP et peuvent donc être considérés comme des transducteurs d'énergie. La somme des ATP synthétisés au niveau de chaque complexe donne un ATP/O global d'environ 3 (cf. paragraphe suivant). Il est aussi possible de tester la capacité de ces complexes à former une différence de potentiel électrique en suivant par exemple la fluorescence de la rhodamine.

8.5.2. ENERGÉTIQUE DE LA CHAÎNE ET STœCHIOMÉTRIE

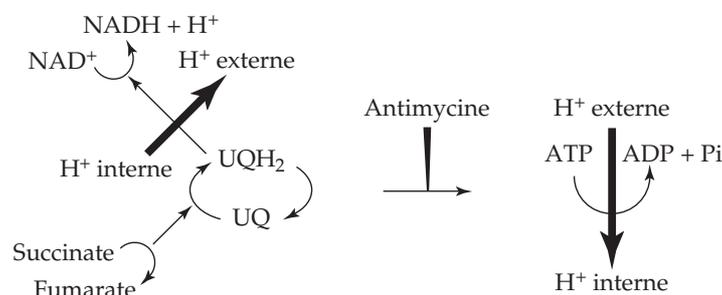
Si l'on admet que la synthèse d'un ATP nécessite l'entrée de 3 protons (valeur sous-évaluée, cf. la fin de ce paragraphe) la valeur minimum du $\Delta\mu\text{H}^+$ maintenue par la chaîne doit satisfaire à la relation : $3 \Delta\mu\text{H}^+ + \Delta G_{\text{P}} = 0$, conditions de l'équilibre. Prenons l'exemple numérique suivant : pour un ΔG_{P} intra-mitochondrial de 51 kJoules.mole⁻¹, le $\Delta\mu\text{H}^+$ doit être au maximum égal à -17 kJoules.mole⁻¹ soit un $\Delta\mu\text{H}^+ / F$ de -0,176 V. Le retour à l'état 4 des mitochondries après addition d'ADP correspond à un $\Delta\mu\text{H}^+$ supérieur à -0,2 V, valeur suffisante pour maintenir ce potentiel phosphate. Dans ces conditions, la chute du potentiel redox permettant la synthèse d'un ATP lors du transfert de 2 électrons doit être au minimum de $3(17\,000)/2F = 0,264$ V pour un couplage parfait, ce qui est possible si l'on admet, avec certains auteurs, une chute de potentiel d'oxydoréduction de l'ordre de 0,3 V par site de couplage. Ce type de raisonnement que nous trouvons encore dans certains manuels est actuellement dépassé car d'une part les stœchiométries des pompes ont été réévaluées et sont différentes selon le complexe considéré, et d'autre part les stœchiométries réelles sont variables en fonction des états stationnaires considérés et dépendent des systèmes ou mécanismes dissipateurs de l'énergie.

L'étude du rendement des oxydations phosphorylantes (P/2e⁻) et celle de la stœchiométrie des pompes (H⁺/2e⁻, H⁺/ATP) ont fait l'objet de nombreux travaux expérimentaux et théoriques. Plusieurs motifs ont présidé à ces recherches qui sont





du NAD^+ que l'on peut suivre par spectrophotométrie à 340 nm. Cette réduction est inhibée par l'oligomycine, les découplants et la roténone. L'interprétation de ces résultats est la suivante : la réduction des quinones par le succinate et l'établissement d'un $\Delta\mu\text{H}^+$ par le fonctionnement inverse de l'ATP synthase permettent le flux inverse des électrons couplé à l'entrée des protons au niveau du complexe 1 ; c'est l'entrée des protons par ce complexe qui est l'élément moteur à la remontée des électrons des quinones au NAD^+ . Il est alors normal que ce processus soit inhibé par l'oligomycine car l'ATP synthase, fonctionnant dans le sens de l'hydrolyse de l'ATP, crée le $\Delta\mu\text{H}^+$ nécessaire au fonctionnement inverse de la chaîne respiratoire ; il est aussi inhibé par la roténone car le flux des électrons s'établit des quinones au NAD^+ *via* le complexe 1.



8.24 – Flux inverse des électrons sur des particules mitochondriales

La réduction du NAD^+ par le succinate peut être obtenue en utilisant le $\Delta\mu\text{H}^+$ créé par une voie différente de celle de l'ATP synthase. Comme pour l'expérience précédente les subparticules sont incubées en présence de NAD^+ , d'antimycine, de succinate ; on ajoute de l'oligomycine pour bloquer l'ATP synthase. La réduction du NAD^+ est induite par ajout d'ascorbate plus TMPD, substrat du complexe 4 dont le fonctionnement génère un $\Delta\mu\text{H}^+$. Il est important de noter que dans cette expérience les électrons ne remontent pas directement du cytochrome c au NAD^+ car de l'antimycine est ajoutée dans le milieu, mais du succinate au NAD^+ en utilisant le $\Delta\mu\text{H}^+$ créé par l'oxydation du cytochrome c par l'oxygène moléculaire.

Les études sur le flux inverse montrent que les systèmes transducteurs peuvent être réversibles même si, dans les conditions physiologiques, l'ensemble des oxydations phosphorylantes est unidirectionnel. Le sens du flux ne signifie pas que la vitesse retour de certaines étapes de la chaîne, notamment celles couplées au transfert des électrons, soit nulle. Comme nous l'avons déjà vu, la réversibilité de la chaîne couplée explique en partie le degré de réduction des transporteurs d'électrons dans les différents états stationnaires.

8.8. CONTRÔLE DES OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES

L'adaptation du flux de synthèse de l'ATP aux besoins de la cellule ou de l'organisme est fondamentale dans la mesure où il n'y a pas ou très peu de réserve en liaisons chimiques à haut potentiel de transfert. La cellule n'est pas un accumulateur mais un



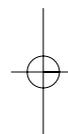
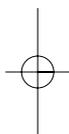


transducteur traversé par un flux continu d'énergie. Par contre, elle peut stocker des combustibles comme le glycogène ou les lipides dont la vitesse d'utilisation conditionne la vitesse de respiration.

Les expériences sur le contrôle respiratoire des mitochondries isolées avaient suggéré à certains chercheurs que la respiration était contrôlée essentiellement par le potentiel phosphate, dans la mesure où les transducteurs travaillaient près de l'équilibre. Selon cette interprétation le travail fourni lors du passage de deux électrons à travers un site de couplage, (n fois le $\Delta\mu\text{H}^+$, n représentant le rapport $\text{H}^+ / 2\text{e}^-$) serait égal (au signe près) à celui consommé pour la synthèse d'ATP (n' fois le potentiel phosphate, n' étant le rapport $\text{ATP} / 2\text{e}^-$ au site considéré). Les oxydations phosphorylantes seraient cependant globalement irréversibles de par le caractère très exergonique de la réduction du dioxygène en eau. Cependant cette manière de voir est simplificatrice car elle repose sur des expériences effectuées *in vitro* dans des conditions de saturation en substrats autres que l'ADP. D'autre part elle ne prend en compte ni les systèmes de transport des métabolites ni les éventuelles régulations cinétiques.

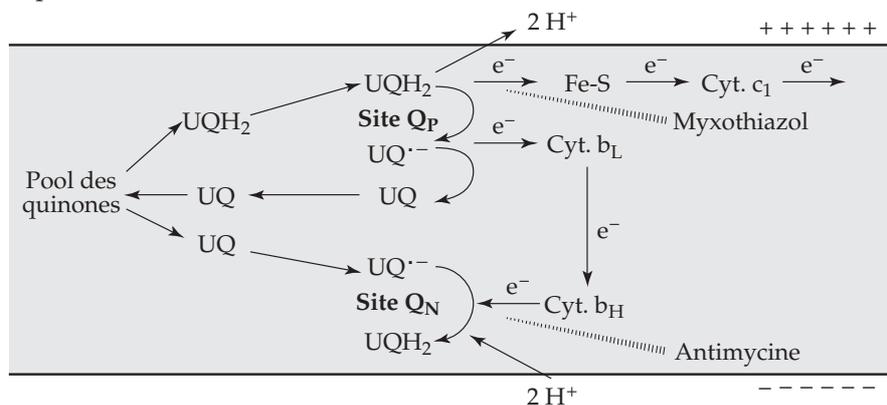
L'application de la théorie du contrôle du métabolisme aux mitochondries isolées a clairement établi que plusieurs réactions interviennent dans le contrôle de la respiration ou de la synthèse de l'ATP et que sa distribution entre les différentes étapes est fonction de l'état stationnaire considéré. Dans un travail devenu classique TAGER et son groupe ont étudié la distribution du contrôle dans des mitochondries isolées de foie dans des états stationnaires différents correspondant à des vitesses croissantes de synthèse d'ATP ; ils ont notamment observé une augmentation du contrôle porté par le transporteur ATP/ADP et au contraire une diminution de celui dû à la cytochrome c oxydase. Les étapes contrôlantes dépendent aussi du type de mitochondries. Le transporteur de phosphate peut être fortement contrôlant dans les mitochondries de levure alors qu'une telle situation n'a pas été constatée dans les mitochondries de mammifères étudiées. L'analyse du contrôle permet d'éviter de fausses interprétations. Ainsi on a trouvé dans la littérature des travaux qui concluaient que des mitochondries n'étaient pas couplées car leur respiration n'était pas stimulée par l'ADP ; en fait il n'en est rien, elles sont capables de synthétiser l'ATP mais le contrôle porte essentiellement sur l'approvisionnement de la chaîne respiratoire en électrons (cf. chapitre 5). En résumé, on peut conclure que l'application de la théorie du contrôle à l'étude des mitochondries a permis de mettre en évidence une variété de situations, soit pour un même type de mitochondries placées dans des situations différentes, soit entre plusieurs types d'organelles. D'une façon générale plus un système est sollicité par les conditions appliquées, ou parce que son activité est intrinsèquement faible, plus il est contrôlant. Cette approche a été notamment utile à l'étude des pathologies mitochondriales.

In situ, l'alimentation de la chaîne en électrons semble être un élément important dans le contrôle de la respiration cellulaire et, effectivement, l'activité de certaines déshydrogénases est cinétiquement modulée par les concentrations en ADP ou en Ca^{2+} . D'autre part, comme nous l'avons vu, il existe plusieurs mécanismes permettant une





Une deuxième molécule de UQH_2 est oxydée au site Q_P selon le même mécanisme et un électron va réduire UQ^- en UQH_2 au site Q_N . La réaction de réduction est suivie d'une protonation.



8.27 – Cycle des quinones (suite) point d'action des inhibiteurs

La base de ce schéma implique une différence fondamentale entre les centres Q_N et Q_P dans la mesure où seul UQ^-_N est fortement liée à la protéine de sorte à rendre le potentiel d'oxydoréduction du couple quinone/semiquinone suffisamment positif. Cela a été expérimentalement mesuré par RPE.

Au total, ce cycle conduit à l'oxydation d'un UQH_2 en UQ , à l'excrétion de 4 protons sur la face P et à la consommation de 2 protons sur la face N.

8.9.3.3. Bases expérimentales du modèle

Un certain nombre de données expérimentales favorisent le modèle cyclique par rapport à un modèle linéaire. Nous en citerons trois.

- ▶ Ce modèle est en accord avec les données thermodynamiques comprenant notamment l'existence d'une semiquinone fortement liée à l'apoprotéine b sur la face N.
- ▶ En présence d'antimycine, une sur-oxydation de la préparation mitochondriale induit une plus grande réduction du cytochrome b. Ce fait ne peut pas s'expliquer par un modèle linéaire. Par contre dans le modèle cyclique on comprend qu'en forçant la réduction de la protéine de RIESKE et du cytochrome c_1 , on stimule la réduction de la quinone au site N et de ce fait le cytochrome b.
- ▶ Le modèle cyclique rend compte de la production d'ion superoxyde en présence d'antimycine. En effet dans ces conditions il y a accumulation de la forme semiquinonique au site N comme décrit ci-dessus. En accord avec cette interprétation, ce phénomène est inhibé par le myxothiazol.

8.9.4. COMPLEXE 4 OU CYTOCHROME C OXYDASE

Les oxydases forment une famille de métalloenzymes catalysant la réduction complète du dioxygène par quatre électrons pour former deux molécules d'eau. Ces enzymes peuvent être classées en deux groupes selon la nature des donneurs d'électron, qui *in*

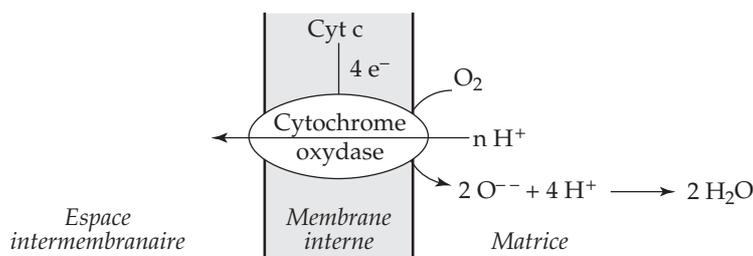




in vivo sont soit un cytochrome (cytochrome *c* oxydase mitochondriale des eucaryotes) soit un quinol (quinol oxydase de la membrane plasmique des bactéries).

Ces oxydases sont capables d'établir un $\Delta\mu\text{H}^+$ de part et d'autre de la membrane de deux manières (figure 8.28).

- ▶ En puisant 4 H^+ de la matrice mitochondriale (ou de la face cytotique des procaryotes) pour former 2 molécules d'eau à partir de O_2 réduit (protons réactionnels).
- ▶ En couplant la réaction redox à un transfert transmembranaire de protons. Cette translocation de protons de la matrice vers l'extérieur, mise en évidence par WIKSTRÖM, est la preuve que l'oxydase fonctionne comme une pompe à protons et non pas comme une boucle d'oxydoréduction car le complexe ne contient pas de centre redox protonable de type flavinique ou quinonique. La réaction globale est la suivante :



8.28 – Les deux modes de consommation de H^+ dans la matrice par translocation et par neutralisation du dioxygène réduit

8.9.4.1. Structure de la cytochrome *c* oxydase

La structure de la cytochrome *c* oxydase de *Paracoccus denitrificans* a été déterminée par l'analyse des images de diffraction aux rayons X de cristaux du complexe, à une résolution de 2,8 Å, par le groupe de HARTMUT MICHEL. Cette bactérie est particulièrement intéressante car elle possède comme les eucaryotes une cytochrome *c* oxydase, mais celle-ci ne comporte que trois sous-unités, les unités que l'on retrouve chez les eucaryotes. La partie intégrée dans la membrane a une forme trapézoïdale. La largeur est de 90 Å du côté cytoplasmique et de 75 Å sur la face périplasmique. La hauteur de trapèze est de 55 Å. Le domaine globulaire de la sous-unité II dirigé vers le périplasma amène la hauteur de l'ensemble à 90 Å. Le complexe forme 22 hélices transmembranaires. La partie centrale est constituée par la sous-unité I.

Toutes les oxydases contiennent les éléments Fe, Cu, Zn et Mg. Seuls les ions Fe et Cu sont impliqués dans les réactions d'oxydoréduction (figure 8.29). Bien que le nombre de chaînes polypeptidiques soit variable d'un organisme à l'autre (de 1 à 13), l'élément fonctionnel est constitué de trois centres redox liés à une même chaîne ou sous-unité I :

- ▶ un hème de faible spin : cyt *a* (ou cyt *b* pour la quinol oxydase) où le fer est coordonné à la protéine par 2 histidines (5^e et 6^e liaisons de coordination de l'ion) ;

