

**ÉLÉMENTS DE BIOLOGIE  
À L'USAGE D'AUTRES DISCIPLINES  
DE LA STRUCTURE AUX FONCTIONS**

Sous la direction de

**Philippe TRACQUI et Jacques DEMONGEOT**



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 "Éléments de biologie"*

- ◆ Georgia BARLOVATZ-MEIMON, Professeur à l'Université de Paris 12
- ◆ Antoine DELON, Professeur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble
- ◆ Michel THELLIER, Professeur à l'Université de Rouen
- ◆ Paulette VIGNAIS, Directeur de recherche au CEA de Grenoble
- ◆ Pierre VIGNAIS, Professeur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble

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**.

Illustration de couverture : **Alice GIRAUD**

d'après un schéma de **Gérard KLEIN** (figure 9, chapitre I) et une photo d'**Alain DUPERRAY**

(Cytosquelette d'une cellule endothéliale prise en microscopie de fluorescence :  
les noyaux sont colorés en bleu, les filaments d'actine en rouge et les microtubules en vert).

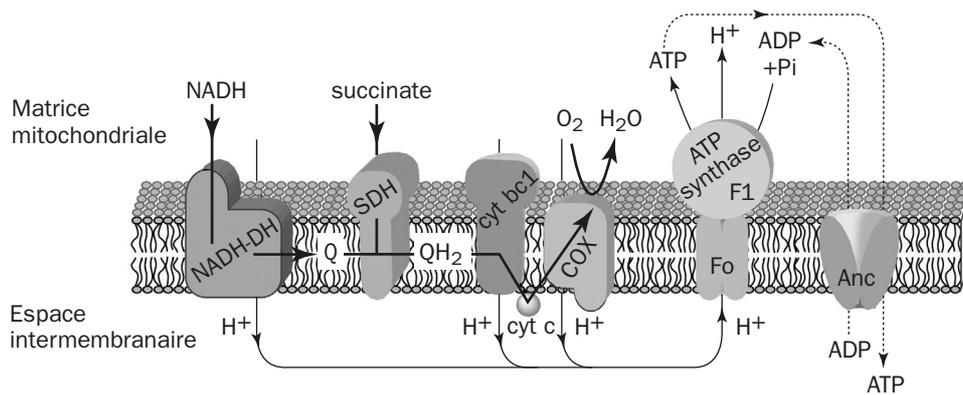
**ISBN 2-86883-587-2**

© EDP Sciences, 2003

# **EXTRAITS**

que toutes les **protéines** de la chaîne respiratoire et de l'**ATP synthase** associées au système de l'oxydation phosphorylante (figure 8).

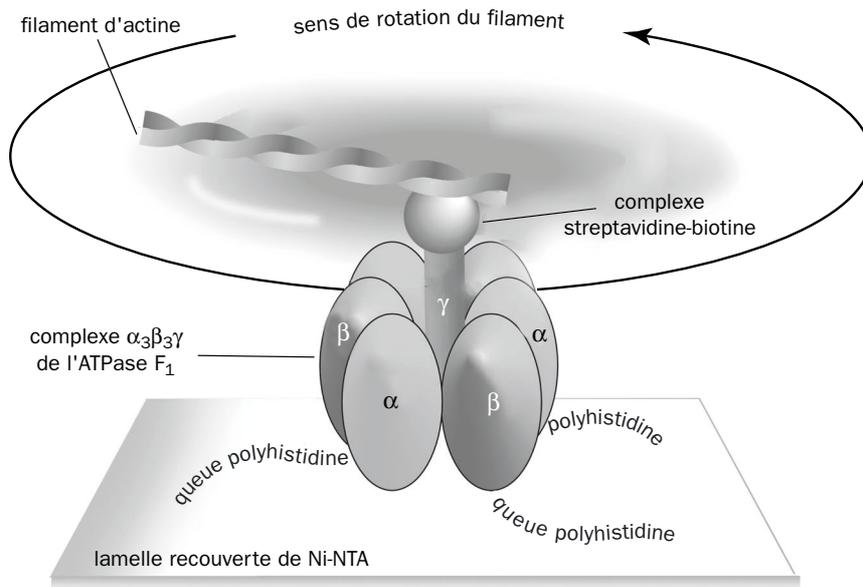
Les transporteurs mitochondriaux de molécules anioniques se répartissent en deux catégories : électroneutres ou électrogéniques. Les échangeurs électroneutres de type antiport : phosphate inorganique ( $\text{Pi}/\text{OH}^-$ ,  $\text{Pi}/\text{malate}$ ,  $\text{malate}/\text{citrate}$ ,  $\text{malate}/\alpha$ -cétooglutarate ou  $\text{pyruvate}/\text{OH}^-$  fonctionnent de façon réversible et symétrique. Les transporteurs électrogéniques sont asymétriques, irréversibles et ils requièrent pour fonctionner la présence d'un potentiel de membrane. Le mieux caractérisé est le translocateur  $\text{ADP}/\text{ATP}$  [FIORE *et al.*, 1998]. C'est la protéine majoritaire de la membrane interne mitochondriale et sa masse moléculaire est voisine de 30 kDa. A pH 7, l'ATP et l'ADP ont respectivement 4 et 3 charges négatives. Dans une situation physiologique normale, le transport de l'ADP du cytosol contre de l'ATP de la matrice mitochondriale se produit sans compensation de charge. L'excès de charges négatives du côté cytosolique de la membrane interne crée un potentiel de membrane qui contrecarre le transport si la chaîne respiratoire n'apporte pas de protons. Ainsi, sont garanties des conditions qui imposent l'importation d'ADP dans la mitochondrie et l'exportation d'ATP vers le cytosol (figure 8). Dans le processus de l'oxydation phosphorylante, la cascade de réactions d'oxydo-réduction dans la chaîne respiratoire est couplée à la synthèse d'ATP catalysée par une enzyme complexe : la F1-Fo ATPase.



**Figure 8 - Schéma de l'organisation des complexes enzymatiques de l'oxydation phosphorylante dans la membrane interne mitochondriale**

La chaîne respiratoire mitochondriale est formée par la NADH déshydrogénase, la succinate déshydrogénase, le cytochrome bc1, le cytochrome c et la cytochrome oxydase. L'ubiquinone, oxydée ou réduite (Q ou  $\text{QH}_2$ ), est une petite molécule soluble et très mobile dans le cœur de la membrane phospholipidique. Le trajet redox en direction de l'oxygène (symbolisé en traits gras) s'accompagne d'une translocation de protons depuis la matrice vers l'espace intermembranaire (traits continus). L'ATP synthase utilise le gradient de protons pour former de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi). Le translocateur des adénines nucléotides (Anc) catalyse l'échange  $\text{ADP}/\text{ATP}$  et alimente l'ATP synthase en ADP tout en exportant l'ATP néo-synthétisé vers l'espace intermembranaire et le cytosol.

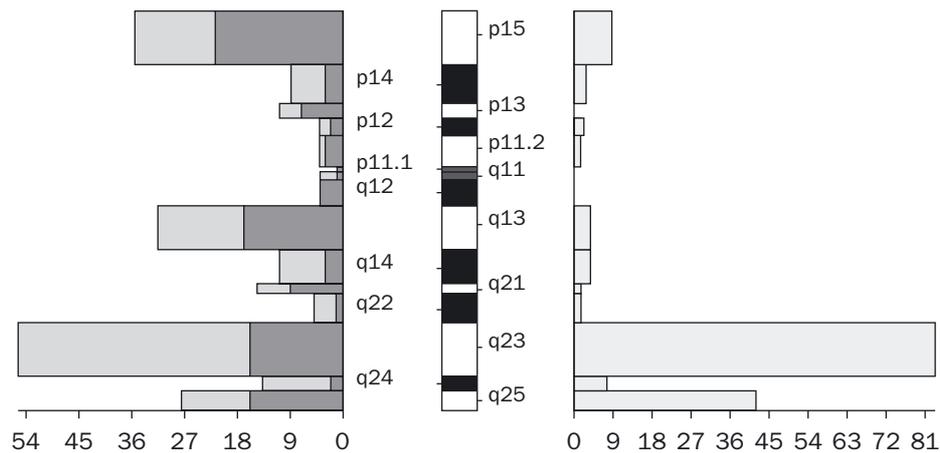
L'une des avancées les plus importantes en biologie dans la deuxième moitié du XX<sup>e</sup> siècle a été la compréhension du couplage énergétique entre la respiration cellulaire et la synthèse de l'ATP. Le mécanisme chimiosmotique, formulé dans les années 1960 par le biochimiste britannique Peter MITCHELL<sup>4</sup>, explique que l'énergie d'oxydo-réduction libérée lors du cheminement des électrons dans la chaîne respiratoire allant du **NADH** à l'oxygène sert, grâce à un transfert vectoriel de protons, à établir une force proton-motrice comprenant deux composantes interchangeables : potentiel de membrane et gradient de pH [MITCHELL & MOYLE, 1967 ; MITCHELL, 1979]. Dans la mitochondrie, le mouvement des protons a lieu depuis la matrice mitochondriale vers le **cytosol**. Le retour des protons par le secteur membranaire Fo de l'ATP synthase, est couplé à la formation d'ATP à partir d'ADP et de Pi qui est catalysée par le secteur F1.



**Figure 9 - Un système expérimental pour observer la rotation de l'ATPase-F1**

L'enzyme isolée est ancrée à la surface d'une lamelle de verre couverte de nickel (Ni-NTA : Ni<sup>2+</sup>-nitriloacétate) par l'intermédiaire d'extensions polyhistidine introduites à l'extrémité N-terminale des trois sous-unités β. Un long filament d'**actine** polymérisée, rendu fluorescent par la fixation d'un réactif chimique pour être visible par microscopie optique, est attaché par un couple streptavidine-biotine à l'extrémité de l'axe central de la sous-unité γ. L'addition d'ATP fait tourner le filament d'actine. La comparaison entre l'énergie libre d'hydrolyse de l'ATP et l'énergie de rotation montre que le moteur fonctionne avec une efficacité presque parfaite. Un tel dispositif préfigure des nanomachines du futur où l'enzyme ferait tourner une petite barre métallique, telle une pale d'hélicoptère.

4. Les découvertes en bioénergétique sur les principes de transfert d'énergie et les mécanismes enzymatiques de la synthèse d'ATP ont déjà valu à la discipline deux prix NOBEL de Chimie. Le premier a été attribué à Peter MITCHELL en 1978 et le second partagé par Paul BOYER et John WALKER en 1997.



**Figure 20 - Histogramme de localisation des points de cassures dues à des translocations, le long du chromosome 11, calculées dans la base de données HCFForum®**

Pour revenir au premier paragraphe historique de ce chapitre, on pourra par exemple, comme l'avait suggéré LAMARCK, étudier *l'influence des habitudes des corps vivants comme cause qui modifie leur organisation*: un mode d'étude de ce problème fondamental est par exemple le calcul de la corrélation entre la localisation des points de cassure physiologique (par **crossing-over**) ou pathologique (par exemple par translocation, figure 20) du **génome** et les lieux d'expression ubiquitaire des gènes, par exemple sous des contraintes environnementales (comme l'expression des gènes des enzymes de la glycolyse dans des conditions d'anaérobiose). On découvrira sans doute que la ségrégation obéit ainsi à des lois plus complexes que celles de MENDEL et MORGAN, et que les conditions de stockage et de décompaction du génome (existence d'un référentiel nucléaire tri-dimensionnel constant conduisant à des proximités fixées entre chromosomes, existence de zones fragiles du génome, dues à une transcription constante au cours du cycle cellulaire...) ont une influence importante sur la transmission et sur l'évolution du matériel génétique.

## RÉFÉRENCES

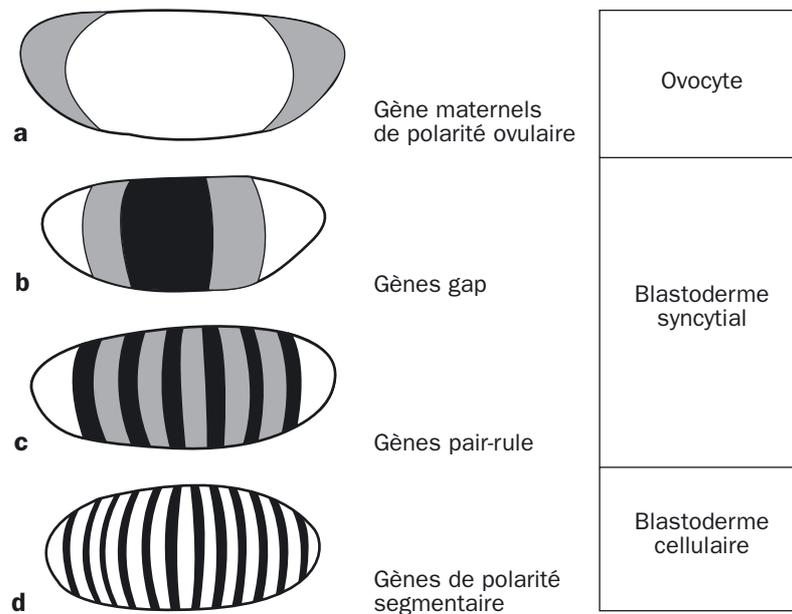
- G.W. BEADLE & E.L. TATUM – Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *PNAS* **27**, 499-506 (1941).
- C. BERNARD - *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*. Flammarion, Paris (1865, réédition A. LE VASSEUR, 1884).
- G.M. DE BUFFON - *Histoire Naturelle*. Paris (1745).
- O. COHEN, C. CANS, M.A. MERMET, J. DEMONGEOT & P. JALBERT - Viability thresholds for partial trisomies and monosomies. A study of 1,159 viable unbalanced reciprocal translocations. *Human Genetics* **93**, 188-194 (1994).

La mise en place de ces deux axes de polarité embryonnaire est donc, chez la drosophile, sous la dépendance stricte de l'organisme maternel par l'intermédiaire des mécanismes décrits ci-dessus. Dans le cas de la polarité antéro-postérieure, c'est l'ovogenèse qui génère l'asymétrie fondamentale de répartition des cellules nourricières et de l'ovocyte ainsi polarisé. Dans le cas de la polarité dorso-ventrale, c'est l'asymétrie de comportement des cellules folliculaires, en l'occurrence la sécrétion de SPATZLE uniquement par les cellules folliculaires ventrales, qui génère la polarité dorso-ventrale.

### 3.2. LES GÈNES DE SEGMENTATION

Environ 25 gènes, tous zygotiques, ont été impliqués dans ce mécanisme. On les classe en 3 catégories principales :

- ✓ les gènes gap, appelés aussi gènes cardinaux,
- ✓ les gènes pair-rule ou gènes de parité de segment,
- ✓ les gènes de polarité segmentaire. Ces gènes s'expriment dans des zones de plus en plus restreintes. Nous n'en étudierons que quelques uns, en nombre suffisant néanmoins pour bien comprendre leur mode de fonctionnement (figure 7).

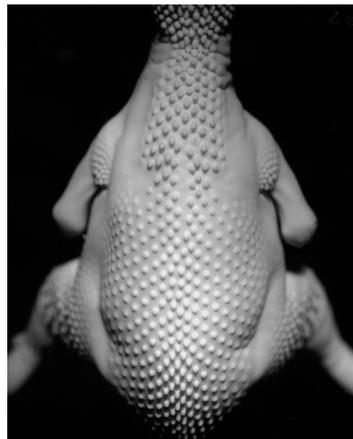


**Figure 7 - Succession dans le temps de l'expression des gènes**

Les bandes représentent schématiquement la distribution des protéines codées par ces gènes : **a** - gènes maternels qui déterminent les principaux axes de polarité de l'embryon et activent la transcription des gènes zygotiques, **b** - gènes gap qui définissent de larges territoires et activent la transcription des **c** - gènes pair-rule, qui sont exprimés sous la forme de bandes alternées ; **d** - les gènes de polarité segmentaire permettent l'achèvement de la segmentation définitive.

différentes voies de **mécanotransduction** (voir chapitre V). En particulier, les modifications spatialement contrôlées de la migration cellulaire induisent la formation d'agrégats cellulaires impliqués par exemple dans la morphogenèse des membres ou des phanères<sup>41</sup> (condensation cartilagineuse, formation de placodes<sup>42</sup>...).

Le cadre conceptuel proposé par J.D. MURRAY et G. OSTER dans les années 1980<sup>39</sup> a permis d'étudier théoriquement ces processus. Nous en donnons une illustration ci-dessous avec le modèle mécano-cellulaire proposé par CRUYWAGEN *et al.* (1997)<sup>43</sup> pour décrire la formation de condensations cellulaires au niveau de la peau (figure AIV.4) par le jeu des interactions derme-épiderme<sup>44</sup>.



**Figure AIV.4**  
**Vue dorsale d'un embryon de poulet de 11 jours**  
**montrant la répartition des bourgeons plumaires selon**  
**un champ cutané hexagonal extrêmement organisé**  
 Taille réelle : environ 20 × 25 mm  
 (cliché D. DHOUAILLY, CNRS UMR 5538,  
 Institut Albert Bonniot - La Tronche,  
 reproduit avec son aimable autorisation)

Le modèle proposé par les auteurs s'écrit :

$$\begin{cases} \nabla \cdot (\nabla \theta) = \psi \\ \psi - \nabla \cdot (\beta \nabla \psi) = \rho \theta - \nabla \cdot \left( \nabla \left[ \frac{\tau \cdot n^2}{1 + c \cdot n^2} \right] \right) \\ \frac{\partial n}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla n) + \nabla \cdot (\alpha n \nabla \theta) \end{cases}$$

avec les conditions aux limites de type flux nul :

$$(\eta \cdot \nabla) \psi = 0 ; (\eta \cdot \nabla) \theta = 0 ; (\eta \cdot \nabla) n = 0$$

41. Ce terme désigne les productions épidermiques à forte teneur en kératine comme les plumes des oiseaux, les écailles des reptiles, les poils des mammifères...

42. Les placodes sont des épaissements délimités de cellules de l'épiderme, associés à la mise en place de condensations régulières de cellules dermiques.

43. G.C. CRUYWAGEN, P. MAINI & J.D. MURRAY - Biological pattern formation on two-dimensional spatial domains : a nonlinear bifurcation analysis. *SIAM J. Appl. Math.* **57**, 1485-1509 (1997).

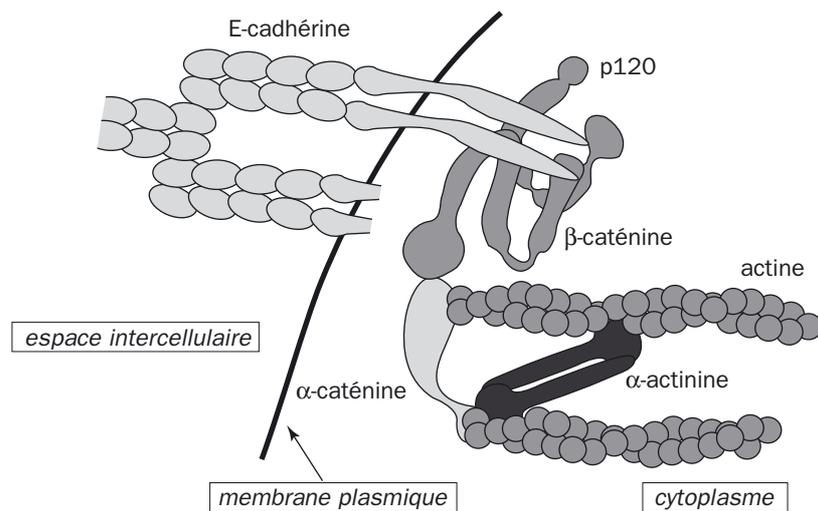
44. Dans le cas de la genèse d'une plume, le scénario décrit une induction depuis l'épithélium de signaux permettant aux cellules dermiques de migrer et de se condenser. Ces condensations induisent la localisation des placodes de l'épiderme. La placode épidermique induit la prolifération des cellules dermiques de la condensation et le soulèvement du bourgeon plumaire.

endothéliales, qui reconnaissent les intégrines leucocytaires de type  $\beta_2$  (figure 2). La molécule PECAM-1 (Platelet Endothelial CAM) a, elle, la particularité de pouvoir établir des liaisons homophiliques (figure 2b), mais aussi des interactions hétérophiliques avec des intégrines.

#### 1.4. LES CADHÉRINES

Les cadhérines sont des protéines adhésives calcium-dépendantes qui établissent des interactions cellulaires homophiliques (figure 2d). Les études cristallographiques ont montré que les molécules de cadhérine d'une même cellule s'orientent parallèlement pour constituer des **dimères** qui s'associent à leur tour d'une façon antiparallèle pour assurer le contact entre les cellules voisines. Les cadhérines constituent une famille de récepteurs dont l'étude est en pleine expansion et qui est impliquée dans l'organisation structurale et fonctionnelle de tissus variés.

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires, formées d'une seule chaîne polypeptidique (120-140 kDa de poids moléculaire) et localisées au niveau de **jonctions** dites **adhérentes**. Les cadhérines classiques sont constituées d'une région cytoplasmique hautement conservée<sup>7</sup> et d'un domaine extracellulaire composé de cinq répétitions structurales.



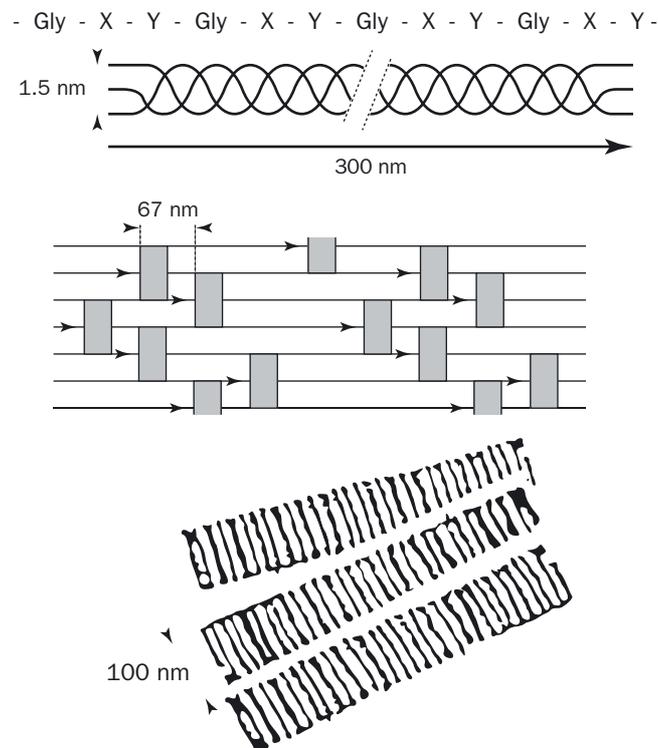
**Figure 3**

##### **Association d'une cadhérine, la E-cadhérine, avec les caténines et le cytosquelette**

Les domaines extracellulaires de deux molécules de cadhérines situées sur deux cellules adjacentes (la cellule de gauche n'est pas représentée, seul un fragment de cadhérine est illustré) s'associent par une liaison de type homophile. Le domaine cytoplasmique interagit avec la  $\beta$ -caténine et p120. Ces molécules reconnaissent l' $\alpha$ -caténine, qui est reliée au **cytosquelette** d'actine.

7. Cette conservation peut s'expliquer par l'interaction des différentes cadhérines aux mêmes caténines.

l'ordre des fibrilles peut être aléatoire ; il peut, entre deux plans successifs, suivre deux directions alternées selon des angles proches de  $90^\circ$  ; il peut également varier régulièrement de direction, d'un plan au suivant, selon des angles variables (voir § 4.1).



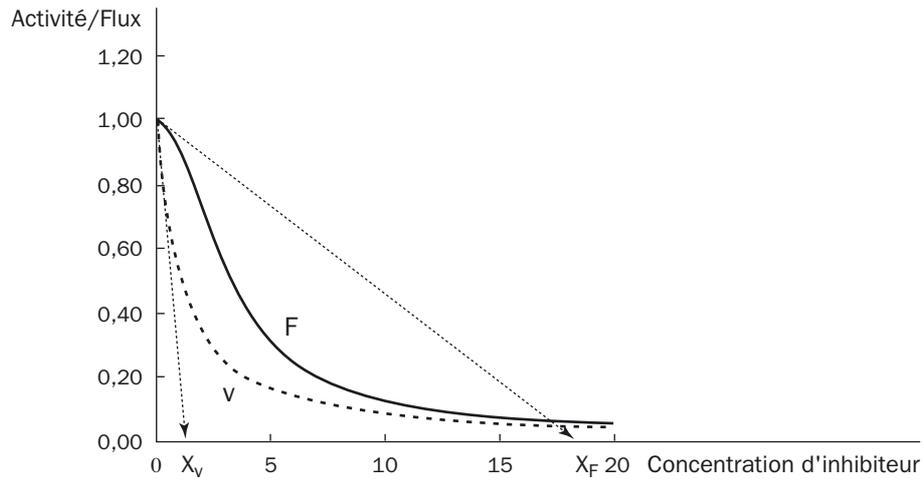
**Figure 1 - Hiérarchies structurales du collagène de type I**

La protéine est constituée par trois chaînes  $\alpha$ , dont un acide aminé sur trois est une glycine. Ces chaînes s'enroulent pour former une triple hélice de collagène de 300 nm de long. Les molécules de collagène s'assemblent spontanément dans l'espace extracellulaire, en fibrilles. Elles sont caractérisées en ultrastructure par la présence d'une striation périodique transversale.

Le collagène est renouvelé en permanence dans les tissus. Il est dégradé par les **collagénases**, sécrétées par les fibroblastes présents dans la MEC mais aussi par les **macrophages** et les polynucléaires d'origine sanguine.

## 2.2. LES FIBRES ÉLASTIQUES

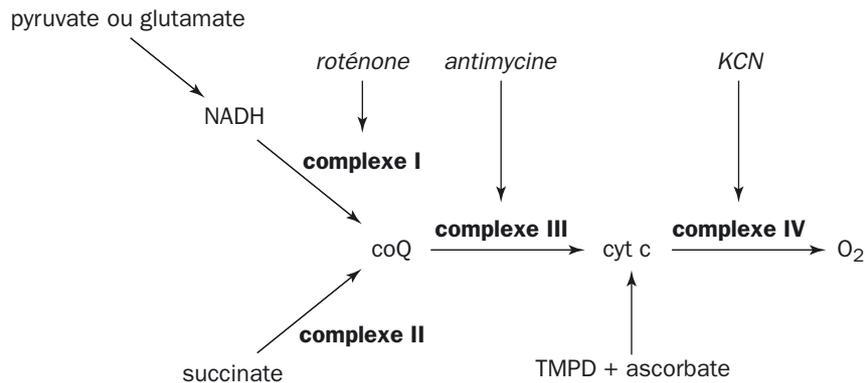
Ces fibres, visibles en microscopie photonique, sont abondantes dans les tissus dont la taille et la forme varient, comme la peau, les poumons, les vaisseaux sanguins. Elles permettent aux tissus de retrouver leur forme après un étirement transitoire.



**Figure 10 - Détermination d'un coefficient de contrôle par la méthode des inhibiteurs**

$$C_i^F = \frac{\text{pente}(F)}{\text{pente}(V)} = \frac{X_V}{X_F}$$

Comme beaucoup de nos exemples se rapportent à la détermination des coefficients de contrôle des oxydations phosphorylantes mitochondriales, nous en donnons un schéma dans la figure 11. Le sens du flux est du **NADH** ou du succinate vers l'oxygène selon le substrat respiratoire fourni aux mitochondries <sup>14</sup>.



**Figure 11 - Chaîne respiratoire mitochondriale**

Le TMPD (tétraméthyl p-phénylènediamine) est un donneur d'électrons pour le cytochrome c. Les inhibiteurs spécifiques des différents complexes sont indiqués en italique.

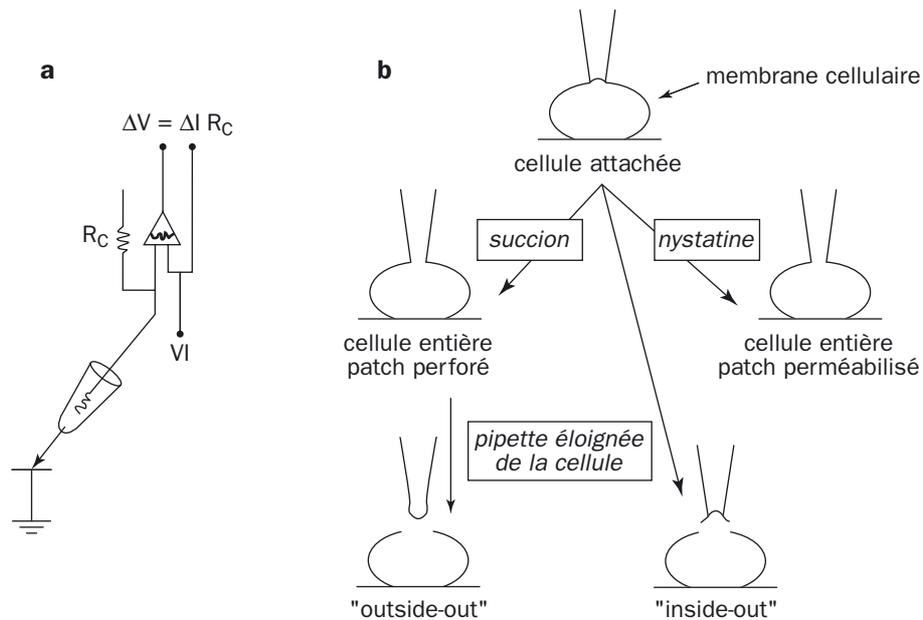
On se reportera au chapitre I, figure 8 pour une présentation plus détaillée de la bioénergétique mitochondriale.

14. Le succinate ( $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) est un métabolite du cycle de KREBS qui intervient aussi comme substrat (réduit) du complexe II de la chaîne respiratoire.



**Figure 10 - Microélectrode de patch-clamp (diamètre de pointe inférieur à  $1 \mu\text{m}$ ) au contact de la membrane d'une cellule nerveuse**  
(d'après NEHER & SAKMANN, 1992)

Les configurations patch excisé « *inside-out* » ou « *outside-out* » permettent de jouer très facilement sur la composition ionique des faces externes et internes de la membrane ainsi que d'imposer à volonté le potentiel sur l'une de ces deux faces. Ces différentes configurations sont schématisées sur la figure 11.

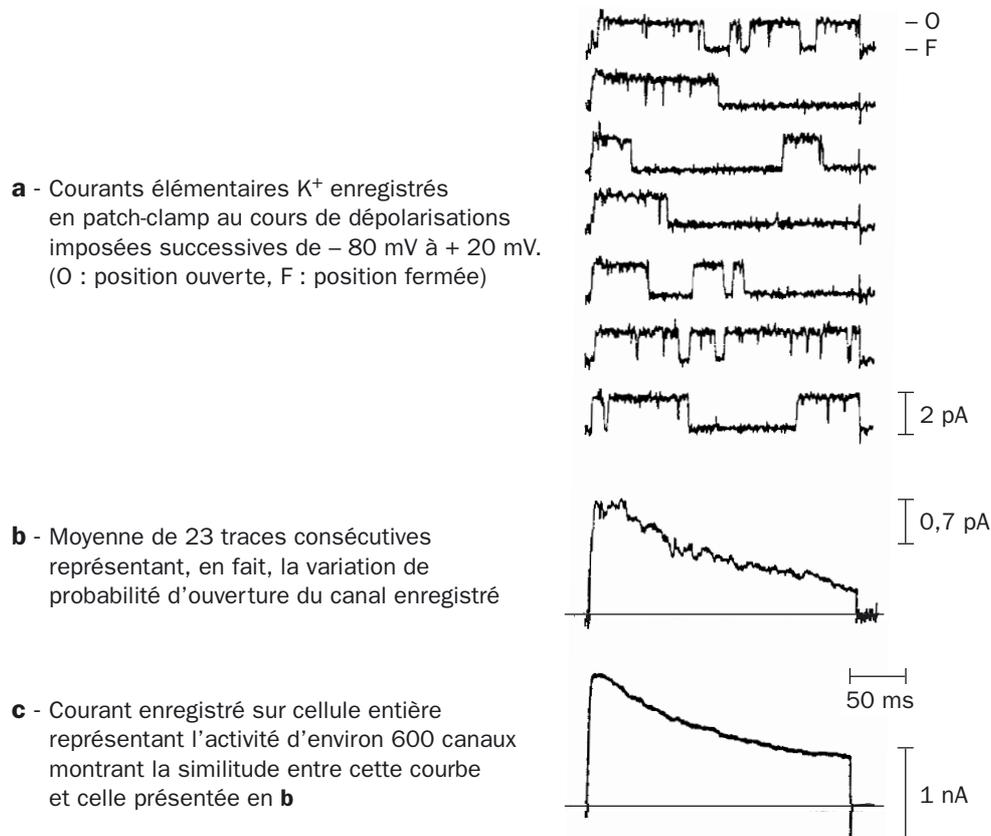


**Figure 11 - Différentes configurations utilisées en patch-clamp**  
(d'après HAMILL *et al.*, 1981)

**a** - principe d'enregistrement. Tout comme dans le voltage-clamp, un amplificateur à contre réaction est utilisé pour annuler le potentiel imposé  $V_i$  et le potentiel du patch membranaire. La différence de potentiel mesurée  $DV$  est proportionnelle au courant traversant la membrane.  
**b** - différentes configurations « cellule attachée », « cellule entière » (ou *whole-cell* en anglais) par perforation physique ou perméabilisation de la membrane par un agent chimique dont on veut étudier les effets et les configurations particulières dites « *outside-out* » ou « *inside-out* ».

Lorsqu'on examine les courants élémentaires enregistrés au niveau d'un canal unique, on s'aperçoit qu'il s'agit d'impulsions rectangulaires d'amplitude constante mais de variabilité plus ou moins importante en fréquence et durée (figure 12). Ces courants sont de l'ordre du picoampère en intensité et de la milliseconde en durée, soit une charge de  $10^{-15}$  coulomb représentant environ  $10^4$  charges unitaires ( $10^{-19}$  coulomb).

Il est certain que l'allure de ces signaux, émis au niveau d'un canal unique, apparaissent assez différents de ceux enregistrés au niveau de la membrane par HODGKIN et HUXLEY. Cependant, si on considère la somme de tous ces signaux, on obtient une courbe moyenne de courant identique à la courbe globale enregistrée au niveau membranaire. Ceci démontre de façon tout à fait remarquable que, si la théorie d'HODGKIN et HUXLEY énoncée il y a maintenant plus d'un demi-siècle ne s'applique pas au comportement du canal ionique élémentaire, elle demeure, par contre, parfaitement représentative du comportement global de l'ensemble des canaux présents au niveau de la membrane cellulaire (figure 12).



**Figure 12** (d'après DUBOIS, 1999, modifié à partir de GANFOMINA, 1991)