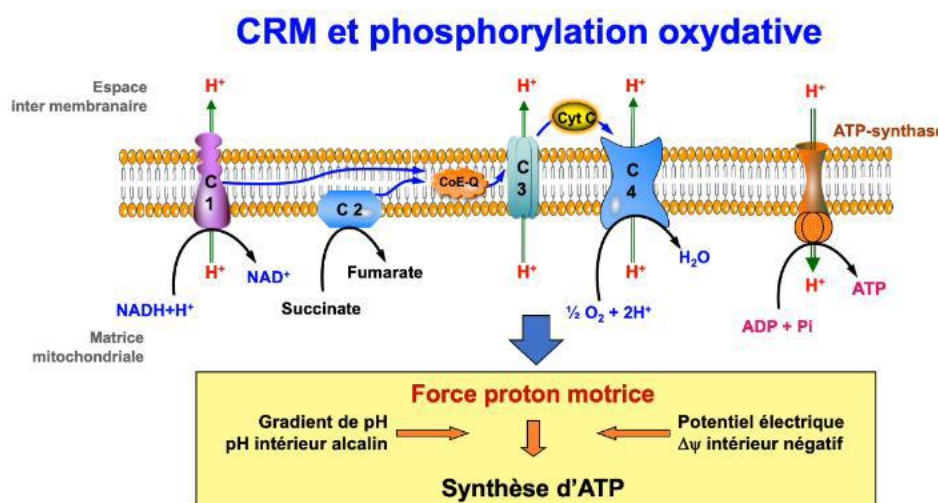


L'ATP SYNTHASE

I- Gradient électrochimique

Au niveau de la CRM, le transfert d'électrons à partir du NADH^+ vers l'oxygène se fait par des étapes successives à travers les 4 complexes de la chaîne.

Ces 4 complexes permettent le transfert d'électrons vers des accepteurs, comme le **CoEQ** pour le transfert en provenance des complexes **I et II** ou le **CytC** pour les électrons en provenance du complexe **III** jusqu'à l'accepteur final qui est l'**oxygène**.



Au niveau du complexe I, III et IV, l'énergie de ce transfert d'électrons permet le transfert de protons de la matrice mitochondriale vers l'EIM. *Le complexe II ne permet PAS le transfert de protons.*

L'accumulation de ces protons dans l'EIM va générer un **gradient de protons** qui va avoir 2 conséquences :

- Il affecte le **Ph** et donc ça va générer un **gradient chimique** entre l'EIM et la matrice mitochondriale
- D'autre part ça va modifier le **potentiel électrique** avec accumulation de charges **positives** au niveau de l'EIM

Donc ce gradient de protons va générer une **force proton motrice** qui est due à la différence de **Ph et de charge électrique** entre l'EIM et la matrice mitochondriale

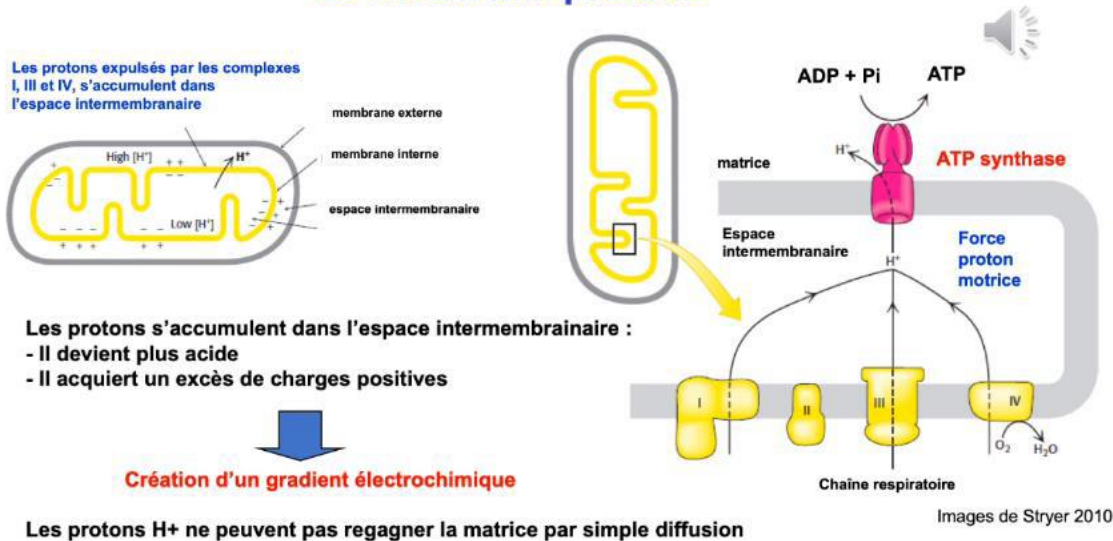
➔ C'est cette **force proton motrice** qui est **exploitée par l'ATP synthase** pour produire de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate

Les protons expulsés lors des échanges de protons au niveau du complexe I, III, IV de la CRM vont **s'accumuler dans l'EIM**. Cette accumulation va entraîner une modification au niveau de l'EIM, qui va devenir **plus acides** et va acquérir un **excès de charges positives** par rapport à la matrice mitochondriale.

Cela va générer un **gradient électrochimique** et ce gradient est exploité par l'ATP synthase pour **produire de l'ATP**.

En effet, les protons, ne vont **PAS** regagner la matrice par simple diffusion mais vont **passer à travers un complexe enzymatique** : l'ATP synthase, pour permettre la synthèse d'ATP.

Le circuit des protons

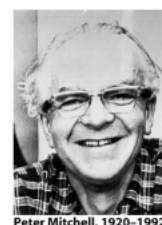


II- Théorie de Mitchell

La théorie de Mitchell ou chimiosmotique, permet d'expliquer comment l'**énergie libre** qui est générée par le **transport d'électrons** à travers la CRM est utilisée pour produire de l'**ATP** à partir d'ADP et du phosphate inorganique (P_i).

Couplage oxydation / phosphorylation

Théorie de Mitchell - Théorie chimiosmotique (1961)



- organisation vectorielle du transport d'électrons et de l'ATPase
- compartiments fermés

L'événement primaire conservant l'énergie est le mouvement des protons à travers la membrane

Le transport d'électrons est couplé à la **phosphorylation de l'ADP** par le **pompage de protons** à travers la **MIM qui est imperméable** (de la matrice vers l'EIM) au niveau du complexe I, III, IV de la CRM.

Ce processus crée :

- Un gradient de **charges** avec plus de charges **positives** dans l'EIM
- Un **Ph basique** au niveau de la **matrice**.

Il se crée donc un potentiel **électrochimique** et l'énergie générée par ce gradient de protons sert pour coupler **l'oxydation et la phosphorylation** et donc pour générer de l'**ATP**.

Selon la théorie chimiosmotique de Mitchell, **l'oxydation de substrat hydrogéné** (NADHH+ et FADH₂) par la CRM **génère des protons** qui sont transloqués dans l'EIM.

Il en résulte un **gradient électrochimique** qui est utilisé pour faire **fonctionner l'ATP synthase** qui est responsable de la synthèse de l'ATP.

Cette hypothèse postule que :

- La MIM soit imperméable aux H⁺ SAUF au niveau du complexe V de la CRM (Complexe V = ATP synthase)
- Il existe au niveau de la MIM une alternance entre transporteurs d'H et transporteurs d'électrons
- Quand un transporteur de protons est oxydé par un transporteur d'électrons, les H⁺ sont rejetés dans l'EIM
- Les H₂ pris en charge par la CRM proviennent de donneurs d'hydrogène NADHH+, FADH₂ et des protons de la matrice.

Lors de la CRM et de l'accumulation de protons dans l'EIM :

→ Il y a la génération d'un **gradient de Ph** entre l'EIM et la **matrice mitochondriale** avec accumulation de protons et donc un **Ph plus basique** (supérieur) au niveau de la **matrice**

→ Il y a également, un **gradient électrique** de part et d'autre de la MIM avec une accumulation de **charges +** dans l'EIM

Ce gradient électrochimique va dépendre :

- De la différence de potentiel électrique
- De la différence de Ph de part et d'autre de la MIM.

- L'énergie qui est liée à ces gradients est suffisante pour permettre la synthèse d'ATP.
- Lorsqu'il y a le transfert d'1 proton, il y a un bilan de 21Kj (*21,5Kj sur la diapo*) d'énergie qui se dégage
- L'énergie nécessaire pour synthétiser un ATP est d'environ 46KJ.

Cela signifie qu'il suffise que **3 protons retournent vers la matrice mitochondriale à partir de de l'EIM en traversant l'ATP synthase pour permettre la synthèse d'une molécule d'ATP.**

Lorsqu'une molécule de **NADHH+** est réoxydée au niveau de la CRM, cela va entraîner le transfert de **10 protons** dans l'EIM. Lorsqu'un **FADH₂** (qui intervient dans le complexe II de la CRM) est réoxydé, cela va entraîner le transfert de **6 protons** dans l'EIM.

Si on tient compte du fait que le passage de **3 protons** de l'EIM dans la matrice mitochondriale à travers l'ATP synthase permet la synthèse d'une molécule d'ATP :

- ✚ Chaque molécule de **NADH⁺** réoxydée au niveau de la CRM, correspond la production de 3ATP.
- ✚ Chaque molécule de **FADH₂** réoxydée au niveau de la CRM, il y a la synthèse de **2ATP**.

Le passage de 3 H⁺ de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale permet la synthèse d'une molécule d'ATP



1 NADH,H⁺ réoxydé: 3 ATP synthétisés
1 FADH₂ réoxydé: 2 ATP synthétisés

III- Structure de l'ATP synthase

L'ATP synthase est l'enzyme **responsable de la synthèse d'ATP** à partir d'ADP et de phosphate. Cette enzyme exploite le **gradient électrochimique** qui s'est formé lors du passage des **protons au cours de la CRM**.

Ce complexe de l'ATP synthase est composé de **2 domaines** :

- Un domaine **F₀ totalement transmembranaire**
- Un domaine **F₁** qui est totalement **extra-membranaire**, associé à F₀ et baigne dans la **matrice mitochondriale**.

Chacun de ces domaines possède une fonction bien définie, en effet :

- **F₀** est un **canal à protons** c'est à travers cette partie du complexe de l'ATP synthase que les **protons** peuvent revenir de l'EIM vers la matrice mitochondriale
- **F₁** porte l'**activité catalytique** qui permet la **synthèse d'ATP** lorsque **F₁ est ASSOCIE** à F₀
- Lorsque **F₁ est dissocié** de F₀ et donc est **soluble** dans la matrice, dans ce cas, il exprime une **activité ATPasique** (d'hydrolyse de l'ATP).

Nous allons seulement nous intéresser au rôle de **F₁ dans la synthèse** de l'ATP (*lorsqu'il est associé à F₀*).

L'ATP synthase est composée de **2 domaines** :

- F₀ est un canal qui va permettre aux protons de revenir de l'EIM vers la matrice mitochondriale
- F₀ fonctionne à l'inverse des complexes de la CRM.
- F₁ est composé de 2 types de protéines : **α et β** qui sont associées entre elles dans une structure semblable à celle d'un **quartier d'orange**.

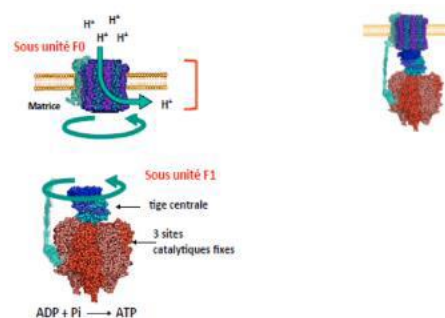
Ces protéines vont travailler ensemble sous forme de **complexe : $\alpha - \beta$** pour permettre la **synthèse d'ATP** à partir de l'ADP et du Pi.

- ➔ Ce sont les protons qui **passent à travers F₀** qui vont fournir **l'énergie** qui est nécessaire à la **synthèse de l'ATP**.

IV-Fonctionnement de l'ATP synthase

La sous-unité (su) F₀ de l'ATP synthase qui est ancrée au niveau de la MIM, est un canal à protons et permet donc le passage de protons qui sont accumulés dans l'EIM vers la matrice mitochondriale.

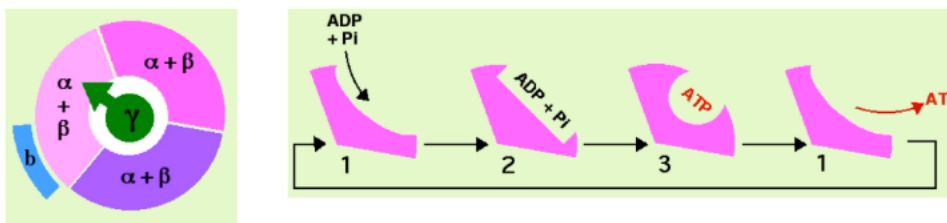
Sous l'effet du passage des protons qui **reviennent dans la matrice**, les su « c » de ce canal F₀ peuvent **tourner**. Cette rotation va entraîner **la tige centrale de la partie F₁** à tourner également et à provoquer des changements de conformation des **3su catalytiques** qui composent la partie F₁ et qui va donc permettre la synthèse et la **libération de l'ATP**.



La su F₁ de l'ATP synthase qui est responsable de la synthèse et de la libération de l'ATP est constituée :

- De su : α – β qui sont alternées comme les quartiers d'une orange
- D'une tige centrale γ qui va bouger suite à la rotation qui est imposée par le passage des protons au niveau de F₀

Le mouvement de cette tige centrale γ va entraîner des changements de conformation successifs sur les su : α – β .



Ces Su α – β présentent 3 types de conformation :

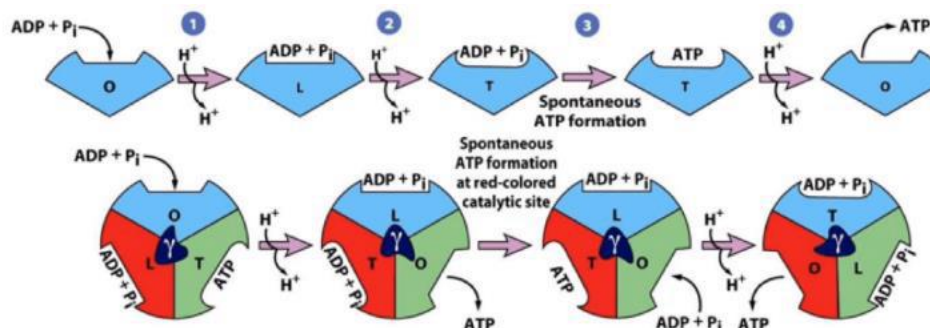
- Conformation « O » : ouverte (open)
- Conformation « L » relâchée (loose) ; fixe ADP et Pi
- Conformation « T » haute affinité (tight) pour ATP

Ces conformations vont se modifier en fonction de la **phase de production d'ATP**.

- ✚ Dans la conformation « O », l'ADP et le phosphate qui rentre dans la mitochondrie vont se **fixer** au niveau de la **su α - β** ce qui va entraîner un changement de conformation vers la conformation **relâchée**.
- ✚ Il y a ensuite la synthèse d'ATP et ainsi une modification de la conformation vers une conformation « T », **haute affinité pour l'ATP**.
- ✚ In fine, **l'ATP est libéré** et la su α - β va retrouver sa conformation **ouverte** pour redémarrer un **nouveau cycle** de synthèse de molécules d'ATP.

On observe dans ce schéma :

- Le passage de proton à **travers F0**
- Entraînant la **rotation** de la **tige γ** de la su F1
- Les **su α - β** de la su F1, vont **changer de conformation**
- Ceci va permettre la **fixation de l'ADP et du phosphate**, la **synthèse d'ATP** et la **libération d'ATP**.



Cette **rotation** qui est imposée par la tige γ va entraîner un changement conformationnel successif sur les 3 parties de la **su β** du complexe F1, qui va, au fur et à mesure passer d'une conformation « o » à « L » et de « L » à « T ».

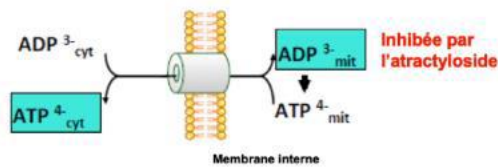
Lorsque la molécule d'ATP a été synthétisée et libérée, cette **su β** va **retrouver sa forme « o »** et va pouvoir accepter à nouveau de **l'ADP et du phosphate** pour redémarrer la synthèse d'un nouvel ATP.

V- Transport de l'ADP et du Pi

L'ADP qui est nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase, **ne diffuse pas** à travers la **MIM**. Il a donc besoin d'un système de **transport actif** pour être transporté du cytosol vers l'intérieur de la mitochondrie.

Ce transport s'effectue grâce à un transporteur appelé **ATP translocase** qui va effectuer un système d'**antiport**, cad va échanger un **ATP contre un ADP** :

- L'ATP qui est **produit dans la mitochondrie** par l'**ATP synthase** va quitter grâce à ce transporteur, la mitochondrie, aller dans le cytosol où il sera utilisé par la cellule
- En échange, l'ADP qui se trouve dans le cytosol va pénétrer au niveau de la mitochondrie pour subir la réaction de **fusion** avec le phosphate et donner lieu à une molécule d'ATP.

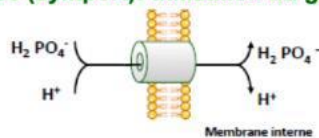
ATP translocase (antiport): échange d'un ADP avec un ATP

Ce transporteur, l'ATP translocase, est inhibé par l'Atractyloside.

Un autre type de transporteur, qui fonctionne cette fois-ci comme **symport**, est la **phosphate translocase** :

→ Ce transporteur va permettre le transfert de **groupements phosphates** du cytosol vers la MIM, toujours pour que ce phosphate contribue à la synthèse d'ATP.

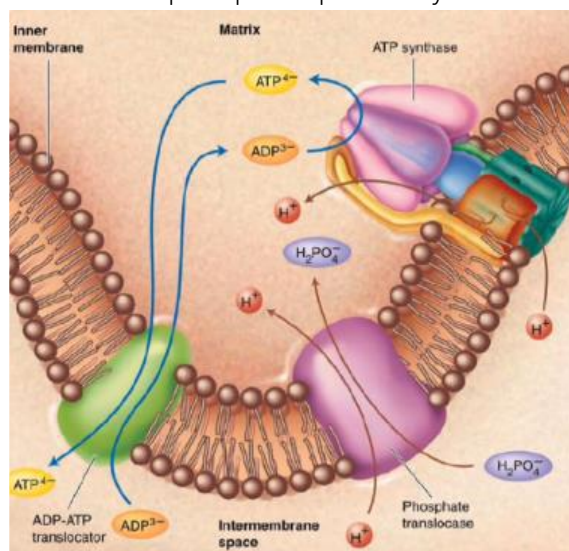
→ Ce transport se fait dans la **même direction que les protons**.

Pi: phosphate translocase (symport): utilisation du gradient de protons

Cette photo ci-dessous repositionne des éléments qui sont nécessaires à la **synthèse de l'ATP au niveau de la mitochondrie** :

→ On y retrouve l'**ATP synthase** avec sa partie intra membranaire F0 et sa partie catalytique F1 baignant dans la matrice mitochondriale.

→ En proximité on y retrouve les **deux transporteurs** qui sont nécessaires pour que la mitochondrie puisse disposer d'ADP et de phosphate pour la synthèse d'ATP.



Ces transporteurs sont :

- D'une part la **phosphate translocase**, qui permet l'entrée en même temps de **phosphate et de protons** du cytosol vers la mitochondrie
- D'autre part l'**ATP translocase** qui permet le transport en directions **opposées de l'ATP** qui est généré dans la mitochondrie vers le cytosol et de l'**ADP** qui est nécessaire à la synthèse de l'ATP (du cytosol vers la mitochondrie).

VI-Régulation de la phosphorylation oxydative

La production et la synthèse d'ATP est un système à **flux tendu** car l'ATP n'est **pas stocké** par la cellule et donc sa synthèse est en fonction des **besoins de la cellule**. Pour fonctionner, la phosphorylation oxydative a besoin de l'apport en **NADH⁺**, en **oxygène**, en **ADP** et en **phosphate** pour la production d'ATP.

Lorsqu'on est dans une situation de repos :

- ✚ Le rapport entre concentration en ATP et concentration en ADP et de Phosphate est **élevé**
- ✚ Il y a une **forte** concentration d'ATP et une **faible** concentration en ADP et phosphate

Au repos:

Le rapport $\frac{[ATP]}{[ADP][Pi]}$ est élevé

Forte [ATP]
faible [ADP] et [Pi]

→ la phosphorylation oxydative tourne au ralenti

→ La phosphorylation oxydative, donc la production d'ATP, tourne au ralenti.

Lorsqu'on est à l'effort :

- ✚ Le rapport concentration d'ATP sur la concentration d'ADP et de phosphate **diminue**.
- ✚ La concentration d'ATP **chute** à cause de sa **consommation**
- ✚ La cellule a besoin de produire, de **synthétiser** des nouveaux ATP

→ La vitesse de la phosphorylation oxydative **augmente**.

Lors d'un effort :

Le rapport $\frac{[ATP]}{[ADP][Pi]}$ diminue

[ATP] chute à cause de
la consommation

→ la vitesse de la phosphorylation oxydative s'accélère

On a vu au paravent l'existence d'**inhibiteurs** de transporteurs d'électrons, lorsque la CRM est bloquée par action d'un inhibiteur, **les transporteurs situés :**

- En **amont** du pont de blocage sont tous dans une forme réduite
- Ceux situés **en aval** de ce blocage sont sous forme oxydée
- La **roténone** va bloquer le complexe I de la CRM, en bloquant le transfert d'électrons entre les protéines **FeS** et le **CoEQ**.
- L'**Antimycine A** va bloquer le transfert d'électrons entre le **Cyt b** et **Cyt C** du complexe III
- Le **cyanure** et le **monoxyde de carbone** vont inhiber la cytochrome oxydase donc le transfert d'électrons sur l'**oxygène** au niveau du complexe IV

Il y a également des **inhibiteurs spécifiques** de l'ATP synthase et l'ATP translocase :

- L'**oligomycine** qui va bloquer le flux de protons au niveau de la **su F0** de l'ATP synthase
- L'**Atractyloside** qui va se fixer à l'ATP translocase côté face **externe** et inhibe ainsi le transport de l'ADP et de l'ATP.

In fine, il existe des **découpleurs**, des produits qui sont capables de réaliser comme des trous au niveau de la MIM :

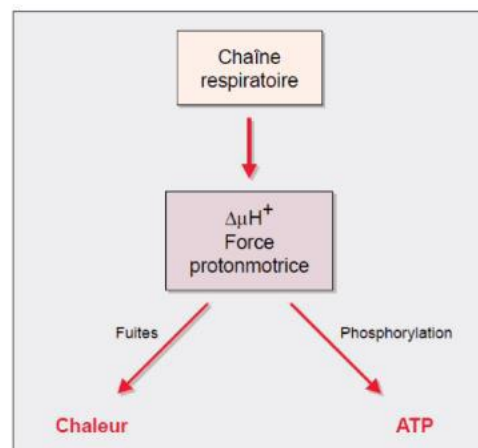
→ Les protons vont **revenir** dans la matrice mitochondriale mais **sans que ce passage** soit utilisé pour générer de l'ATP.

→ Parmi ces découpleurs on peut citer le **2,4 dinitrophénol**.

On a vu que lors de la CRM, il y a une force proton motrice qui se génère au niveau de l'EIM grâce à l'accumulation de protons dans cet espace, qui va entraîner une variation de Ph, une variation de charge électrique par rapport à la matrice mitochondriale.

→ Cette force proton motrice est exploitée par l'ATP synthase pour générer de l'ATP.

Il peut y avoir des situations dans lesquelles les protons vont revenir dans la matrice mitochondriale **sans qu'il y ai génération d'ATP** mais plutôt qu'il y est **génération de chaleur** (par ex pour le maintien de la thermogénèse).

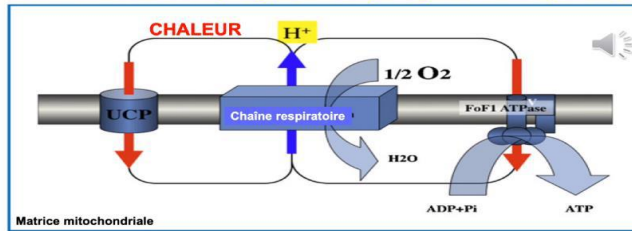


Dans la MIM, il existe une multitude de **transporteurs** qui assurent l'entrée et la sortie de substrats essentiels au métabolisme oxydatif et énergétique de la mitochondrie.

Parmi ces transporteurs, les protéines découplantes (**UCPs**) ont des fonctions assez singulières :

- ✚ En **facilitant le retour des protons** dans la **matrice mitochondriale**, UCP, notamment UCP1, découple le fonctionnement de la chaîne respiratoire de la synthèse d'ATP.
- ✚ L'énergie issue de l'oxydation des substrats n'est plus **convertie** sous forme d'ATP mais elle est **dissipée sous forme de chaleur**.
- ✚ En effet dans les mitochondries de tous les tissus, les complexes I, III, IV de la CRM, établissent un gradient de protons, donc l'utilisation de l'ATP synthase active la phosphorylation de l'ADP.
- ✚ Ce circuit de protons explique le **couplage entre la respiration et la synthèse de l'ATP**.

Protéines de découplage Uncoupling Proteins (UCPs)



Dans les mitochondries des adipocytes bruns :

- La respiration est exceptionnellement rapide et non limitée par l'ADP ou sa phosphorylation.
- Un transporteur spécifique des protons : UCP1 **shunt** l'ATP synthase.
- Dans ces conditions : **UCP abaisse le potentiel membranaire** et le gradient électrochimique des protons
- Ceci active fortement la respiration, donc l'énergie n'est plus utilisée pour phosphoryler l'ADP mais elle est **dissipée sous forme de chaleur**.

Cette photo ci-dessous illustre l'expression d'UCP, une des protéines de **découplage**, au niveau du **tissu adipeux** (TA), réalisé par immunohistochimie avec les anticorps spécifiques.

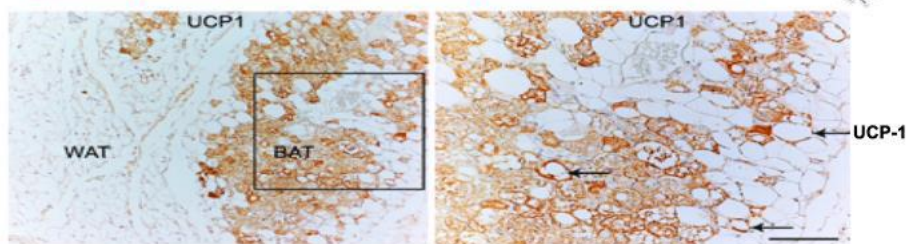
Le TA brun indiqué ici comme « BAT », est un TA qui est **très riche en mitochondries** et ces mitochondries sont **riches en UCP1**, d'où le marquage en **blanc** que nous pouvons observer.

L'expression d'UCP1 au niveau du TA brun est **très importante** parce que ce tissu est impliqué dans le contrôle de la **thermogénèse**.

La **thermogénèse** est réalisée grâce à l'activité **découplante** d'UCP1.

Détection de l'expression d'UCP1 dans le tissu adipeux par immuno-histochimie

Le tissu adipeux brun est riche en mitochondries, elles mêmes riches en UCP-1



De C. Zingaretti, FASEB Journal 2009

WAT : white adipose tissue – tissu adipeux blanc

BAT : brown adipose tissue – **tissu adipeux brun**

Conclusion : Le complexe de l'ATP synthase est constitué de 2 domaines :

- **F0** : totalement transmembranaire, c'est un canal à protons et permet le retour des protons de l'EIM vers la matrice mitochondriale. Il est inhibé par l'oligomycine.
- **F1** : totalement extra-membranaire, associé à F0 et baigne dans la matrice mitochondriale, porte l'activité catalytique qui permet la synthèse de l'ATP.

La synthèse d'ATP est un système à « flux tendu ». L'ATP est synthétisée en fonction des besoins de la cellule.