PHOSPHORYLATIONS CELLULAIRES

Chapitre 4

Pr C.ZINSOU

OBJECTIFS

De l'enseignant :

- Décrire les deux grands processus qui sont à l'origine de la production de l'énergie à l'intérieur de la cellule vivante
- Décrire les grands complexes protéiques responsables du transport des électrons depuis les cofacteurs réduits riches en énergie jusqu'à l'oxygène dans la phosphorylation oxydative, et ceux responsables transport des électrons dans la photophosphorylation cyclique ou acyclique,
- Montrer comment la circulation des électrons génère au niveau de ces groupes transporteurs de l'énergie électrochimique grâce à la création de gradient de densité de protons (Théorie chimio-osmotique de Mitchell).
- Expliquer le processus de la formation de l'ATP, avec les différentes possibilités d'action des découplants et des inhibiteurs.
- Montrer comment l'utilisation des navettes permet le transport aisé des électrons de NADH,H+ du cytosol vers la matrice mitochondriale pour alimenter la phosphorylation oxydative.
- Elaborer un comparatif entre les deux processus pour souligner les similitudes et les différences.

De l'étudiant :

- Connaître parfaitement les groupes transporteurs des électrons, les mécanismes de création de gradient de densité de protons et les sites de formations de l'ATP.
- Bien comprendre le mécanisme de formation de l'ATP en portant une attention particulière aux compartiments, complexes et protéines impliqués ainsi que le nombre d'ATP formé selon l'origine des électrons transportés.
- Comprendre comment les navettes reposent sur l'interconversion alcool secondaire/cétone.
- Se servir du comparatif comme mémento en cas de besoin ou pour les révisions.

PLAN

OBJECTIFS
1 - INTRODUCTION - DEFINITION
2 - FORMATION DE L'ATP A PARTIR DES PHOSPHODERIVES PAR TRANSFERT DE Pi SUR ADP
2.1 - LE 3-PHOSPHOGLYCEROYL-1-PHOSPHATE (PGP)
2.2 - LE PHOSPHENOLPYRUVATE (PEP)
3 - PHOSPHORYLATION OXYDATIVE
3.1- INTRODUCTION - LOCALISATION
3.2 - VARIATION D'ENERGIE LIBRE D'OXYDATION DE $NADH,H^+$ ET DE $FADH_2$
3.3 - LES GROUPES TRANSPORTEURS DES ELECTRONS
3.3.1 - COMPLEXE I - $NADH,H^+$ - COQ REDUCTASE (FP_1)
3.3.2 - COMPLEXE II - SUCCINATE - COQ REDUCTASE (FP_2).
3.3.3 - COMPLEXE III - $COQH_2$ - CYTOCHROME C REDUCTASE
3.3.4 - COMPLEXE IV - CYTOCHROME C OXYDASE
3.3.5 - ORGANISATION DU TRANSPORT DES ELECTRONS DANS LA CHAINE RESPIRATOIRE
3.4 - CREATION DE GRADIENT DE DENSITE DE PROTONS
3.4.1 - GRADIENT DE DENSITE DE PROTONS
3.4.2 – CALCUL DE L'ENERGIE LIBEREE POUR LA PRODUCTION DE L'ATP
3.5 - MECANISME DE LA SYNTHESE DE L'ATP - Théorie de Mitchell
3.6 – INHIBITION DE LA SYNTHESE DE L'ATP
3.6.1 - OLIGOMYCINE :
3.6.2 - LES DECOUPLANTS
3.7 – TRANSPORT DE MOLECULES A TRAVERS LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE INTERNE
3.7.1 – SYSTEME ADP/ATP TRANSLOCASE
3.7.2 – REOXYDATION DES $NADH,H^+$ CYTOSOLIQUES – ROLE DES NAVETTES
3.8 – DEFICIENCES HERITEES LIEES A LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE
4 - PHOTOPHOSPHORYLATION
4.1 - DEFINITION - LOCALISATION
4.2 - LES GROUPES TRANSPORTEURS D'ELECTRONS
4.2.1 - PHOTOSYSTEME II OU PSII.
4.2.2 - LE PHOTOSYSTEME I (PSI)
4.2.3 – COMPLEXE III : COMPLEXE INTERMEDIAIRE OU COMPLEXE BF
4.2.4 - ORGANISATION DU TRANSPORT DES ELECTRONS
4.3 - CREATION DE GRADIENT DE DENSITE DE PROTONS
4.4 - MECANISME DE LA SYNTHESE DE L'ATP : THEORIE DE MITCHELL

1 - INTRODUCTION - DEFINITION

Le premier Principe de la thermodynamique dit : " l'énergie ne peut ni être créée ni être détruite, elle ne peut qu'être transformée ". Par opposition aux êtres inanimés, les êtres vivants sont capables de transformer l'énergie en ses différentes composantes, énergie chimique (ATP), travail, chaleur, etc., ce qui leur permet entre autres d'édifier et de maintenir une structure organisée au cours de leur évolution. La seule source universelle d'énergie pour la cellule est l'ATP. Pour former l'ATP la cellule dispose de deux sources :

- le catabolisme des glucides, des lipides et accessoirement des acides aminés et des protéines. La cellule va récupérer une partie de l'énergie des liaisons entre les différents atomes des composés dégradés.
- la lumière. Seules les organismes chlorophylliens sont capables d'exploiter cette source d'énergie et de la convertir en ATP.

Les organismes vivants sont le siège de réactions chimiques au cours desquelles varie l'énergie libre susceptible d'être utilisée pour la formation de l'ATP. En fait il existe trois modalités de formation d'ATP dans la cellule :

- L'ATP est formé par transfert de groupement phosphate et d'énergie à partir d'un phosphodérivé riche en énergie.
- L'ATP est formé à l'issue d'un ensemble de processus de dégradations pendant lesquels les glucides, lipides (parfois les protéines) sont oxydés en CO_2 avec production de cofacteurs réduits riches en énergie ($NADH,H^+$ et $FADH_2$). Ces derniers alimentent le transport des électrons dans la chaîne respiratoire, à laquelle est couplée la formation de l'ATP. Il s'agit de la **phosphorylation oxydative**.
- L'ATP peut être formé chez les végétaux chlorophylliens, couplé au transport des électrons dans la photosynthèse. Les électrons transportés proviennent de la photolyse de l'eau. Ce processus est appelé conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique (ATP). Il s'agit de la **photophosphorylation** ou **phosphorylation photosynthétique**.

2 - FORMATION DE L'ATP A PARTIR DES PHOSPHODERIVES PAR TRANSFERT DE Pi SUR ADP

Nous citerons seulement deux exemples. Ils constituent les deux réactions sur lesquelles est basée la production de l'énergie dans la glycolyse.

2.1 - LE 3-PHOSPHOGLYCEROYL-1-PHOSPHATE (PGP)

Il est formé par oxydation du 3-phosphoglycéraldéhyde. Le groupement phosphate fixé sur la fonction carboxylique est très riche en énergie. Son hydrolyse délivre une variation d'énergie libre ($\Delta G°'$) égale à -11,8 kcal/mol alors que la formation de l'ATP ne nécessite que +7.3 kcal/mol. La réaction est catalysée par la ***3-phosphoglycérate kinase*** :

3- è glycéroyl 1- è + ADP $\longleftrightarrow$ 3- è glycérate + ATP

2.2 - LE PHOSPHENOLPYRUVATE (PEP)

Ce phosphodérivé riche en énergie est formé dans la glycolyse par départ d'une molécule d'eau sur le 2- è glycérate. Le PEP est le phosphodérivé le plus riche en énergie

formé par la cellule avec une $\Delta G°'$ d'hydrolyse égale à -14,8 kcal/mol. La réaction de transfert de l'énergie et du groupement phosphate est catalysée par la ***pyruvate kinase*** :

Phosphoénolpyruvate + ADP $\longrightarrow$ Pyruvate + ATP

3 - PHOSPHORYLATION OXYDATIVE

3.1- INTRODUCTION - LOCALISATION

En suivant la logique de la production de l'énergie à partir du glucose en présence d'oxygène nous arrivons après l'oxydation des 6 carbones au bilan suivant :

Glucose + 2 ADP + 2 GDP + 4 Pi + 10 NAD^+ +2 FAD	$\longrightarrow$	6 CO_2 + 2 ATP + 2 GTP + 10 $NADH,H^+$ + 2 $FADH_2$.

Comme nous pouvons le constater, seules 4 liaisons phosphates, riches en énergie, sont directement formées, ce qui représente seulement 10,5 % de l'énergie totale susceptible d'être libérée par le glucose. Mais son oxydation complète en CO_2, dans la cellule, s'accompagne de la formation de 10 $NADH,H^+$ et de 2 $FADH_2$. Ces derniers alimentent le transport d'électrons dans les mitochondries des hétérotrophes et des autotrophes, à travers des séquences de réactions d'oxydoréductions respiratoires, jusqu'à l'oxygène, accepteur final. Ce processus est responsable de la formation de la majeure partie de l'ATP. La synthèse d'ATP, couplée à ce transport d'électrons, est appelée **Phosphorylation oxydative.** Tous les êtres vivants, pouvant vivre en présence d'oxygène, possèdent la capacité de produire de l'ATP par phosphorylation oxydative.

La phosphorylation oxydative se déroule dans les mitochondries possédant :

- une membrane externe, semi-perméable
- une membrane interne, présentant des invaginations appelées crêtes, intrinsèquement imperméable aux ions et aux petites molécules. Ces derniers ne peuvent la traverser que s'ils disposent de transporteur spécifique. Elle renferme les différents complexes impliqués dans le transport d'électrons et la synthèse de l'ATP.
- un espace intermembranaire
- un milieu intérieur, appelé matrice, entouré par la membrane interne.

Chaque membrane ou compartiment possède ses enzymes ou ses complexes spécifiques, voir tableau 39, résumant la distribution des enzymes dans la mitochondrie.

3.2 - VARIATION D'ENERGIE LIBRE D'OXYDATION DE $NADH,H^+$ ET DE $FADH_2$

Les deux principaux coenzymes, donneurs d'électrons dans la chaîne respiratoire, sont le $NADH,H^+$ et le $FADH_2$. Les électrons sont transportés jusqu'à l'oxygène. L'énergie libre d'oxydation de $NADH,H^+$ et de $FADH_2$ peut être calculée à partir de la formule liant $\Delta E°'$ et $\Delta G'^o$. Les réactions globales d'échange des électrons entre les couples rédox sont :

$NADH,H^+ + ½\ O_2$ ¾® $NAD^+ + H_2O$ $\quad \Delta E°'' = +1,14$ V $\quad \Delta G'^o =$ - 52 kcal/mol

$FADH_2 + ½\ O_2$ ¾® $FAD + H_2O$ $\quad \Delta E°'' = +0,88$ V $\quad \Delta G'^o =$ - 40 kcal/mol

L'énergie libérée par l'oxydation de ces cofacteurs réduits est disponible au niveau de la cellule pour la production de l'ATP mais la cellule ne peut supporter de brusques

variations de potentiel ni d'énergie libre de telle ampleur, qui conduiraient à sa destruction. Pour s'en protéger la cellule met en œuvre une séquence de groupes de transporteurs. Les électrons sont alors transportés par étape à travers une série de complexes multi-enzymatiques. La variation de potentiel ou d'énergie se fait donc par fractions et par paliers depuis le cofacteur réduit jusqu'à l'oxygène.

3.3 - LES GROUPES TRANSPORTEURS DES ELECTRONS

On distingue 4 groupes qui sont des complexes multi-enzymatiques, voir figure 40 :

- Ø Complexe I - $NADH,H^+$ - CoQ Réductase (FP_1)
- Ø Complexe II - Succinate - CoQ Réductase (FP_2).
- Ø Complexe III – $CoQH_2$ - Cytochrome c réductase
- Ø Complexe IV - Cytochrome c oxydase

3.3.1 - COMPLEXE I - $NADH,H^+$ - COQ RÉDUCTASE (FP_1)

C'est un complexe multi-enzymatique qui transporte les électrons de $NADH,H^+$ au coenzyme Q appelé encore Ubiquinone à travers une séquence où apparaissent des protéines Fer-Soufre (FeS): La circulation des électrons est spontanée et se fait dans le sens d'une augmentation du potentiel.

$NADH,H^+$ ® FMN ® Fe-S ® CoQ.

L'enzyme principale de ce complexe I est la ***$NADH,H^+$ déshydrogénase*** à FMN. C'est une flavoprotéine appelée FP1, de masse moléculaire de 250 000 daltons. Cette enzyme est inhibée par l'Amytal, la roténone et la ptéricidine. L'un de ces composés inhibe le transport des élections dans le complexe I.

3.3.2 - COMPLEXE II - SUCCINATE - COQ REDUCTASE (FP_2).

Ce complexe enzymatique transporte les électrons du succinate jusqu'au coenzyme Q. L'enzyme principale du complexe est la ***succinate déshydroogénase*** à FAD. C'est la flavoprotéine FP_2. Ici encore les protéines FeS interviennent pour donner la séquence suivante :

Succinate .® **FAD** ® **(Fe-S)** ® **CoQ**.

D'autres complexes de moindre importance, non impliqués dans la chaîne respiratoire, transportent aussi des électrons jusqu'au niveau du coenzyme Q pour alimenter le transport des électrons. Les plus importants sont les suivants :

- **Complexe Acyl-CoA déshydrogénase (FP_3).** Enzyme de la β-oxydation des acides gras
  $R\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}SCoA$ ® FAD ® (Fe-S) ® CoQ.

- Glycérol 3-phosphate déshydrogénase (FP_4) mitochondriale à FAD. C'est aussi une flavoprotéine.
Glycérol 3- è ® FAD ® (Fe-S) ® CoQ
et le cyt c1 par l'ANTIMYCINE A.

ESPACE

malate et de l'oxaloacétate est catalysée par la ***malate déshydrogénase***. Les réactions dans le cytosol et dans la matrice sont illustrées sur la figure 3-3.

3.8 – DEFICIENCES HERITEES LIEES A LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE

A l'attention des étudiants de PCEM1

La mitochondrie contient environ 100 protéines. Treize des protéines, engagées dans le transport des électrons et dans la synthèse de l'ATP, sont synthétisées dans la mitochondrie à partir de l'ADN mitochondrial. Les autres sont synthétisées dans le cytosol et importées dans la mitochondrie. Les défauts rencontrés dans la phosphorylation

- une membrane interne continue, moins perméable et entourant un vaste espace central appelé STROMA. La membrane interne du chloroplaste contient un certain nombre de transporteurs de molécules chimiques notamment l'ATP, les acides dicarboxyliques. C'est le site d'interaction entre le chloroplaste et le cytoplasme. Contrairement à la membrane interne des mitochondries, elle n'est pas repliée en crêtes et ne contient pas les complexes d

comporte comme une **pompe à protons**, entraîne la formation d'un gradient de densité de protons. Ces derniers sont pompés du stroma vers l'intérieur du thylakoïde. Ce gradient sera indispensable à la synthèse de l'ATP. Le transport des électrons dans ce complexe se fait dans le sens d'une augmentation du potentiel, ce qui entraîne entre PQ et le cytochrome f une libération d'énergie qui peut être estimée comme suit :

$\Delta G'° = - 46 (+ 0.365 - 0) = -$ **16.8 kcal/mol**.

4.2.4 - ORGANISATION DU TRANSPORT DES ELECTRONS

Il existe deux types de transport d'électrons:

- Le transport acyclique ou non cyclique

Le flux d'électrons met en jeu les deux photosystèmes et le complexe intermédiaire. Les électrons arrachés à l'eau sont acheminés jusqu'au $NADP^+$; le flux d'électrons est non cyclique. Il lui est associé une synthèse d'ATP, appelée **Photophosphorylation acyclique,** et la production d'oxygène (figure 4).

- **Le transport cyclique**

Le second flux d'électrons met en jeu uniquement le photosystème I et une partie du complexe intermédiaire. Les électrons éjectés du PSI, activé par la lumière, reviennent au PSI à travers le cyt.b_6, le cyt.f et la plastocyanine. La synthèse d'ATP qui y est liée est appelée Photophosphorylation cyclique. Son fonctionnement n'entraîne ni formation de $NADPH,H^+$ ni dégagement d'oxygène (figure 4).

4.3 - CREATION DE GRADIENT DE DENSITE DE PROTONS

L'analogie entre les propriétés membranaires de la membrane mitochondriale interne et celles des thylakoïdes laissait présager des fonctionnements similaires à savoir que la synthèse de l'ATP est couplée au transport des électrons. Ce couplage est assuré par la création de gradient de densité de protons, découverte par Jagendorff en 1966. Dans le chloroplaste on observe que :

- les centres réactionnels, les centres collecteurs d'énergie lumineuse, les protéines impliquées dans le transport des électrons et l'ATP synthétase sont localisés dans la membrane thylakoïde.
- La photophosphorylation ne peut se faire que si la membrane thylakoïde est intacte.
- la membrane thylakoïde est imperméable aux protons.
- La phosphorylation peut être découplée par des agents chimiques qui inhibent la synthèse de l'ATP.
- la synthèse de l'ATP est assurée par un complexe CFo-CF1 analogue à celui rencontré dans la membrane mitochondriale interne.

L'écoulement des électrons le long du flux non cyclique ou cyclique crée un gradient de densité de protons à travers la membrane des thylakoïdes au niveau du complexe bf qui fonctionne comme une pompe à protons. Les protons sont pompés du stroma vers l'intérieur du thylakoïde qui devient ainsi plus acide.

Dans la membrane chloroplastique nous avons vu qu'il existait une ségrégation entre PSI et PSII au point de vue localisation. PSI et l'ATPsynthétase sont localisés dans les zones non accolées de la membrane. PSII est situé dans les zones accolées des granums. Le cyt b_6 et le cyt f sont uniformément répartis. On conçoit que le transport des électrons entre les 2 photosystèmes soit assuré par les éléments mobiles à savoir la

plastoquinone et la plastocyanine. C'est au cours de ce transport que les protons sont pompés du stroma vers l'intérieur de la membrane thylakoïde.

4.4 - MECANISME DE LA SYNTHESE DE L'ATP : THEORIE DE MITCHELL

- Ø La formation de l'ATP exige le transport des électrons, activé par la lumière.
- Ø Elle nécessite la création d'un gradient de densité de protons entre le stroma et l'intérieur du thylakoïde.
- Ø L'ensemble enzymatique qui assure la synthèse de l'ATP est appelé complexe CF1-CFo. CFo est appelé le canal protonique. Il est responsable du reflux des protons de l'espace intrathylakoide vers le stroma qui active la synthèse de l'ATP et libère l'énergie nécessaire.
- Ø L'enzyme qui assure la synthèse de l'ATP (ATP synthétase) est contenue dans le complexe CF1. Ce complexe est enfermé dans les sphères qui font saillie à la face externe des membranes thylakoïdes (Voir figure 49). Dans les mitochondries l'enzyme, jouant le rôle similaire, est enfermée dans des protubérances sphériques qui font saillie sur la face matricielle de la membrane mitochondriale interne.

Le transfert d'électrons acyclique ou cyclique produit au niveau du complexe bf un vaste gradient de protons à travers la membrane des thylakoïdes. L'espace intrathylakoïde devient nettement acide avec un pH de l'ordre de 4. Le gradient transmembranaire induit un ΔpH de l'ordre de 3.5. Environ 3 moles de protons s'écoulent entre le complexe CF1-CFo donnant un $\Delta G'°$ de -14.4 kcal/mol, suffisant pour la formation d'une mole d'ATP. Aucun ATP n'est formé si le gradient créé est inférieur à 2 unités pH.

Comme le complexe enzymatique de synthèse de l'ATP se trouve sur la face stromale des thylakoïdes, l'ATP formé et le $NADPH,H^+$ résultant du transport acyclique d'électrons sont libérés directement dans le stroma où se trouvent toutes les enzymes nécessaires à leur utilisation pour la transformation du CO_2 en glucides dans le Cycle de Calvin.

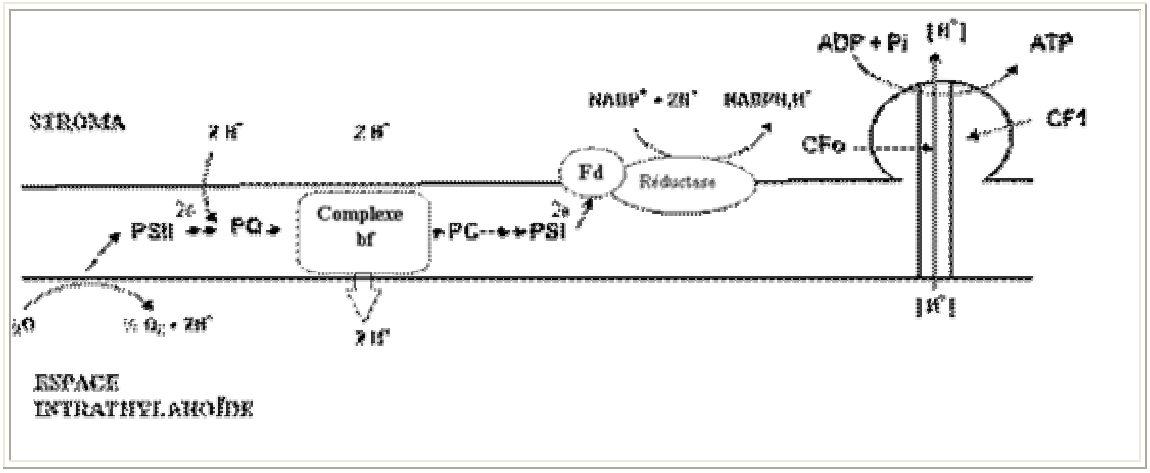

Figure 5 - Mécanisme de formation du gradient de densité de protons et de l'ATP dans les chloroplastes couplée au transport des électrons.

Tableau 6 - PHOSPHORYLATIONS CELLULAIRES
CE QU'IL FAUT RETENIR

Energétique des processus	Séquences de réactions spontanées (exergoniques)	- Activation photo-dépendante de PSI et PSII (réactions endergoniques). - Autres séquences de réactions spontanées
Transport d'électrons		
- Localisation.	Membrane interne	Membrane thylakoïde
- Donneur d'électrons et de protons	$NADH,H^+$, $FADH_2$ ou autres composés	H_2O (photolyse)
-	- CI : $NADH,H^+$-CoQ Réductase	- PS II : organisé autour du P_{680}
Composition des Complexes transporteur	-CII : Succinate-CoQ Réductase	- PS I : organisé autour du P_{700}
	- CIII : $CoQH_2$-Cyt c Réductase	- Complexe bf
	- CIV : Cyt c Oxydase	
Organisation	Les électrons circulent linéairement de $NADH,H^+$ ou de $FADH_2$ jusqu'à l'oxygène	- Transport acyclique : Les électrons circulent de H_2O jusqu'au $NADP^+$ (Coopération de PSII, PSI et complexe bf) - Transport cyclique : Les élections partent de P_{700} et retournent à P_{700}
Synthèse de l'ATP		
- Création de gradient de densité de protons	1 **pompe à protons** au niveau des complexes CI, CII et CIII. Les protons sont pompés de la matrice vers l'espace intermembranaire à travers la membrane mitochondriale interne	1 **pompe à protons** au niveau du complexe bf. Les protons sont pompés du stroma vers l'intérieur du thylakoïde à travers la membrane thylakoïde
- Complexes protéiques	- Fo (Canal protonique) assure le reflux des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice.	- CFo (Canal protonique) assure le reflux des protons de l'intérieur du thylakoïde vers le stroma.
	- Complexe F1 (ATP synthétase)	Complexe CFI (ATP synthétase)
Produits du processus	- 3 ATP à partir de $NADH,H^+$ - 2 ATP à partir de $FADH_2$	- transport acyclique : 1 ATP, $NADPH,H^+$ et ½ O_2 . - Transport cyclique : 1 ATP
Devenir de l'ATP formé	ATP transporté hors de la mitochondrie par l'ADP-ATP translocase pour couvrir les besoins de la cellule	ATP et $NADPH,H^+$ sont consommés dans le stroma : Voies de carboxylation, Cycle de Calvin et autres biogenèses.
Organismes vivants	Hétérotrophes et Autotrophes (organismes chlorophylliens)	Autotrophes (végétaux, algues et microorganismes chlorophylliens)