

Résumé

Les mitochondries sont des organites présents dans la plupart des cellules eucaryotes (tous les plantes, les animaux, les champignons et protistes) (Henze & Martin, 2003). Elles sont considérées comme les usines d'énergie, car elles génèrent la production de l'adénosine triphosphate (ATP) utilisé comme source d'énergie chimique pour les cellules. Les mitochondries sont semi-autonome, en ce sens qu'elles sont en partie dépendantes de la cellule de se répliquer et de se développer. Elles ont leur propre ADN, ribosomes et peuvent faire leurs propres protéines. Semblables à des bactéries, les mitochondries ont un ADN circulaire (ADN mt) et répliquent par un processus de reproduction appelé fission. Une cellule animale typique aura de l'ordre de 1000 à 2000 mitochondries. Ainsi, la cellule aura un grand nombre de matériaux qui sont capables de produire une grande quantité d'énergie disponible. Cette production d'ATP par les mitochondries est couplée au processus de respiration, qui se produit dans la membrane interne mitochondriale avec une chaîne de transport d'électrons.

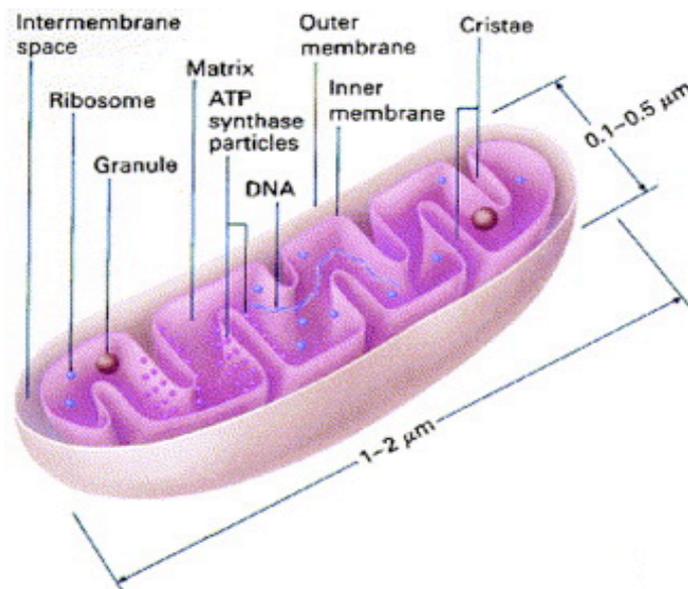


Figure 1. Représentation de la mitochondrie.

La chaîne de transport d'électrons localise dans la membrane mitochondriale interne. Il se compose d'une série de complexes de protéines coopérant pour générer des réactions d'oxydo-réduction, où le transfert d'électrons de couple entre un donneur d'électrons et un accepteur d'électrons (tels que NADH et O₂) pour le transfert des protons H⁺ à travers la membrane, l'établissement d'un gradient électrochimique de protons. Le gradient de protons est utilisé par l'enzyme synthase de l'ATP pour stocker de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate). La figure 2 montre la chaîne de transport d'électrons mitochondriale dans *Saccharomyces cerevisiae*.

La chaîne de transport d'électrons et la synthèse d'ATP sont couplés par le gradient de protons à travers la membrane interne. L'hypothèse chimiosmotique a été proposée en 1961 par Peter D. Mitchell. Les protons se déplacent en arrière à travers la membrane interne à travers l'enzyme synthase de l'ATP (également appelé complexe V). Le flux de protons de nouveau dans la matrice de la mitochondrie par l'intermédiaire de l'ATP synthase fournit de l'énergie pour l'adénosine diphosphate (ADP) à combiner avec du phosphate inorganique afin de former de l'ATP. La force motrice protonique terme (PMF) a été créé à partir du gradient électrochimique pour décrire l'énergie qui est générée par le transfert de protons ou d'électrons à travers une membrane de transduction d'énergie. L'équation du gradient électrochimique de protons peut être simplifié à:

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = F\Delta\psi - 2,3 RT \Delta pH$$

où F est la constante de Faraday (96 485 C mol⁻¹), R est la constante molaire des gaz (8,314 J mol⁻¹ K⁻¹), T est la température en degrés Kelvin, et $\Delta\psi$ est la différence de potentiel transmembranaire électrique en volts.

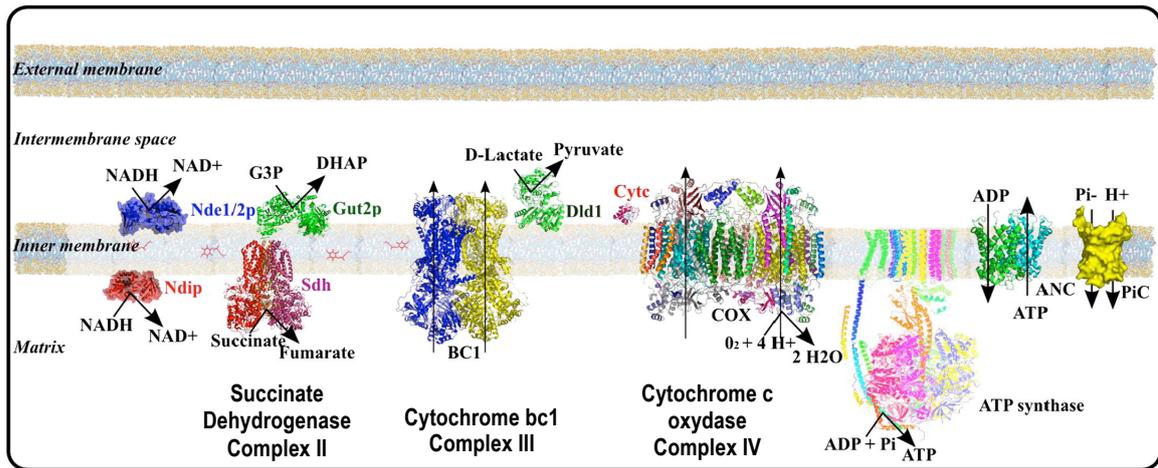


Figure 2. Représentation de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale chez les *S. cerevisiae* (Rigoulet et al, 2010).

ATP synthase est une enzyme essentielle dans tous les types de cellules, y compris les procaryotes, les eucaryotes, les plantes et les animaux. Elle catalyse la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique entraînée par le gradient de protons généré par la chaîne de transport d'électrons. L'ATP est la forme la plus couramment utilisée de l'énergie des cellules de la plupart des organismes afin de réaliser la plupart des fonctions cellulaires. ATP synthase est un grand complexe de protéine assis dans la membrane interne de la mitochondrie avec une section de membrane intégré Fo et une section soluble F1-ATPase en regard de la matrice. Donc, il est appelé foF1 ATP synthase. Lorsque ni la chaîne respiratoire ni protéines photosynthétiques peuvent générer la pmf, l'ATP synthase fonctionne comme une pompe à protons au détriment de l'hydrolyse d'ATP. La réaction globale est la suivante, où n représente le nombre de protons pompée à travers l'ATP synthase. Ce nombre varie de différents organismes.



Cependant, dans la plupart des cas, l'activité d'hydrolyse de l'ATP est un danger potentiel pour une cellule vivante. Donc l'ATP synthase dispose de plusieurs mécanismes réglementaires visant à prévenir le gaspillage de l'ATP futile, comme l'inhibition IF1.

Afin de mieux comprendre le mécanisme catalytique de cette grande protéine complexe ATP synthase, il est nécessaire d'étudier sa structure. La structure globale commune partagée par les différents ATP synthases est composé de deux complexes liés: le noyau catalytique soluble F1 et le canal de proton membranaire Fo. Etant donné que l'enzyme fonctionne avec un mécanisme de rotation, on peut également distinguer la partie mobile en tant que rotor, et la partie fixe que le stator.

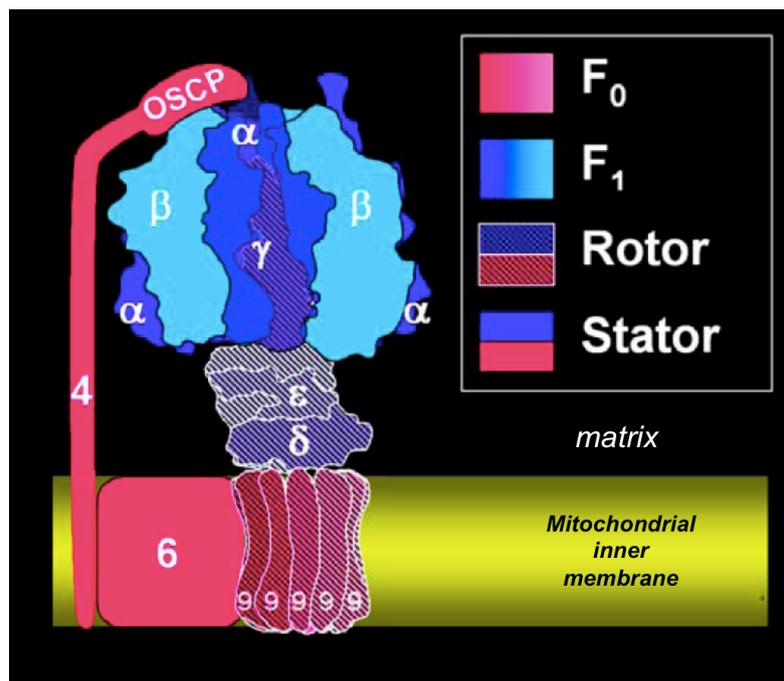


Figure 3. Représentation simplifiée de la structure de FoF1 ATP synthase (selon la thèse de Vincent Corvest, 2006).

L'activité de rotation de l'enzyme est initiée par la force protomotrice qui déclenche la rotation du rotor membranaire par la translocation de protons. Ce mouvement de rotation va alors transmettre à l'axe central asymétrique, qui se déforme séquentiellement les trois sites catalytiques situés dans les trois paires de sous-unités $\alpha\beta$. Le changement de conformation des sites catalytiques réalise la synthèse de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. La transformation de l'énergie chimiosmotique en énergie mécanique est le point clé de la synthèse d'ATP, ce qui rend la sous-unité 9 essentiel par sa contribution de couplage énergétique entre Fo et secteurs de F1.

ATP synthase a un mode de fonctionnement qui est inhabituel pour des enzymes en raison de la complexité structurale et du mécanisme réactionnel, et cela nécessite beaucoup de temps et des études approfondies pour établir. Le modèle "Binding Change Mechanism" (Boyer, 1993) a démontré le mécanisme de l'ATP synthase. Selon le mécanisme de changement d'affinité de Boyer pour la synthèse de l'ATP, les trois sites catalytiques de l'enzyme se fixent ADP et phosphate dans l'ordre, puis subissent un changement de conformation de manière à faire un ATP étroitement liés. Les sites, puis changer à nouveau conformation de libérer l'ATP. A tout instant de la catalyse, les trois sites subissant des changements conformationnels séquentiels ont trois états différents de conformation (O : Open, T: Tight, L : en vrac). Ces changements conformationnels sont atteints par la catalyse de rotation entraîné par le noyau interne de rotation de l'enzyme, qui est à son tour entraîné par les protons traversent la membrane mitochondriale.

La plupart des études in vitro de la catalyse de l'ATP synthase de la tendance à la direction inverse, l'hydrolyse de l'ATP. Depuis la purification des mitochondries ainsi que isolé F1 -ATPase a été bien développé, les essais de l'hydrolyse d'ATP expériences avec ces matériaux sont plus faciles à établir. Par exemple, avec purifié isolé F1 -ATPase, on peut manipuler des expériences fonctionnelles plus précises et d'obtenir des résultats plus précis, sans ingérence d'impuretés. De plus, expérimentalement, avec des liposomes, il est difficile de créer un gradient de protons artificielle qui est nécessaire à l'enzyme de catalyser la synthèse d'ATP.

Comme mentionné ci-dessus, la synthèse de l'ATP est la fonction principale de l'enzyme dans la plupart des organismes. Cependant, dans de nombreuses espèces, en particulier celles de nombreuses bactéries (principalement anaérobie), la réaction inverse de l'hydrolyse d'ATP est d'une importance vitale. De toute évidence, l'activité d'hydrolyse de l'ATP est surtout un danger potentiel pour une cellule vivante, si l'ATP synthase a plusieurs mécanismes de régulation pour éviter le gaspillage de l'ATP futile.

Plusieurs mécanismes de régulation sont connus pour supprimer l'activité d'ATPase. 1) l'inhibition non compétitive par MgADP, une caractéristique partagée par foF1 de bactéries, les chloroplastes et les

mitochondries. 2) Inhibition de la sous-unité ϵ dans les chloroplastes et les bactéries. 3) L'inhibition lors de l'oxydation de deux cystéines dans des sous-unités γ à FoF1 chloroplaste. 4) Inhibition des enzymes mitochondriales par une protéine régulatrice IF1,, qui est le sujet principal de ce travail.

IF1 est un inhibiteur endogène mitochondrial naturel, qui a été découvert en 1963 par Pullman et Monroy des mitochondries cardiaques des bovins. Jusqu'à aujourd'hui, les homologues de IF1 ont été caractérisés des mitochondries de levure, du rat, du coeur de chèvre et des plantes. Sa séquence inhibitrice de base est bien conservée. Comme un inhibiteur de l'ATPase, IF1 empêche efficacement l'enzyme à partir de l'hydrolyse d'ATP en se liant à la F1-ATPase.

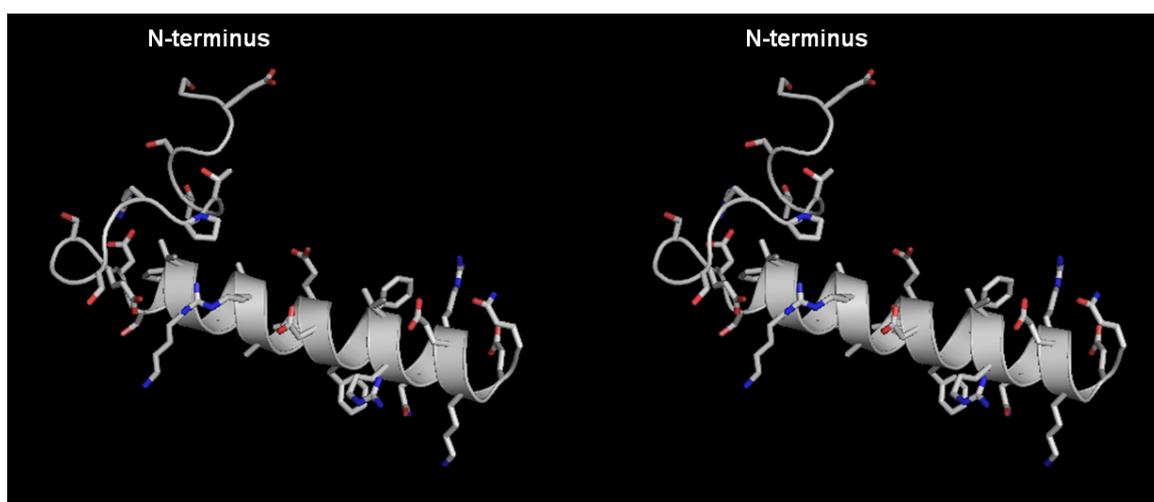


Figure 4. La structure cristalline de l'IF1 de la levure résolue avec le complexe MF1 (Robinson et al, 2013).

Chez la levure, IF1 est une protéine plus petite de 63 acides aminés, qui est codée par l'ADN nucléaire. La structure cristalline d'IF1 de la levure lié à MF1 a été récemment résolu avec seulement 1 à 36 résidus visibles (figure 4). L'étude précédente a montré que l'IF1 dispose également de deux états oligomères, monomère ou dimère (Cabezón et al, 2002). Le monomère d'IF1 de levure fonctionne comme un inhibiteur efficace de l'ATPase selon l'étude d'oligomérisation d'IF1 de levure Tiona ANDRIANAIVOMANANJAONA ainsi que la structure cristalline de l'ATPase inhibée par l'IF1 (Robinson et al, 2013). Mais le dimère d'IF1 de la levure n'est pas encore caractérisé. En outre, la partie N-terminale de la levure IF1 est signalée à stabiliser le complexe inhibé

IF1-MF1, mais ne joue aucun rôle dans l'étape de reconnaissance de la protéine (Andrianaivomananjaona et al, 2011).

L'inhibition de la mitochondrie FoF1 ATPase par son IF1 inhibiteur endogène est appelée uni-directionnel, pour la raison que IF1 est capable d'inhiber essentiellement l'activité ATP d'hydrolyse de l'enzyme mais pas la synthèse d'ATP (Schwerzmann & Pedersen, 1986).

Lorsque le pmf travers la membrane interne mitochondriale diminue, ATPase commence à hydrolyser l'ATP où IF1 se lie au domaine de F1-ATPase et inhibe l'hydrolyse de l'ATP. Dès que la membrane interne mitochondriale se remis sous tension et le gradient de protons est reconstruit à travers la membrane, l'enzyme redémarre à nouveau la synthèse de l'ATP. A ce moment, IF1 est rejeté à partir de l'enzyme, de sorte que l'activité de synthèse de l'ATP n'est pas affectée par IF1 (voir figure 5).

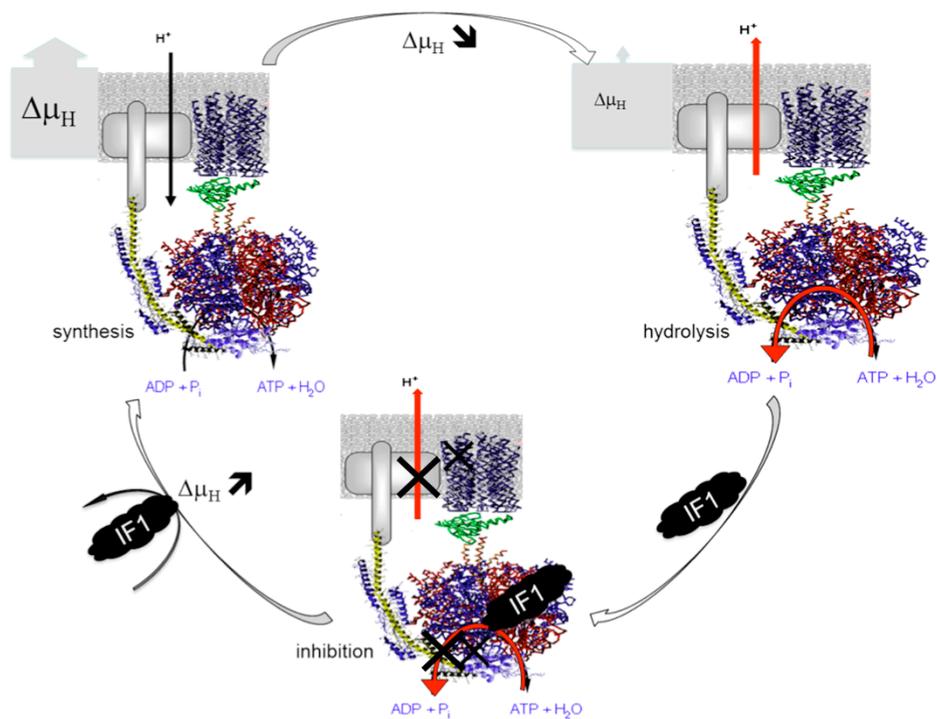


Figure 5. Représentation de l'inhibition de l'ATPase mitochondrial par IF1.

Dans ce travail, notre intérêt central est la régulation de l'ATP synthase mitochondriale par son inhibiteur endogène IF1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Pour comprendre le système de régulation de IF1, nous avons

étudié de nombreuses structures cristales de l'ATP synthase. En effet, ils permettent la visualisation directe de l'ATP synthases ainsi que leur interaction avec IF1 (dans certains organismes). Mais nous ne pouvons visualiser que le dead-end complexe protéique car la fixation d'IF1 à l'ATP synthase est une procédure dynamique.

Dans notre laboratoire, les travaux en cours ainsi que certains travaux antérieurs ont effectué la connexion de plusieurs techniques, telles que les analyses la structure, la mutagenèse, cinétique enzymatique et ainsi de suite, pour étudier comment IF1 se fixe à l'ATPase mitochondrial de levure et ainsi empêche efficacement l'hydrolyse de l'ATP.

Au niveau moléculaire, nous avons étudié de nombreux résidus dans les sous-unités α , β et γ de l'ATPase, qui sont probablement impliqués dans le processus de fixation d'IF1. Les résidus cibles sont généralement classés en quatre groupes, A, B, C et D. La mutagenèse a été effectuée pour modifier ces résidus, d'une part dans leur homologue non mitochondrial pour étudier IF1 mitochondrial spécificité de l'ATPase, de l'autre part dans la glycine à affaiblir l'interaction de la protéine ainsi déterminer la voie de reconnaissance d'IF1. Et bien sûr, la mutagenèse a été combinée à l'approche cinétique afin d'étudier l'effet de mutations et d'analyser par conséquent, les rôles joués par chaque résidu pendant la reconnaissance d'IF1 et de verrouillage dans l'ATPase. L'Approche cinétique a été effectuée sur les particules submitochondriales (SMP) pour déterminer les paramètres cinétiques de K_i (constante d'inhibition), k_{on} (constante de vitesse d'association) et k_{off} (constante de vitesse de dissociation) de chaque mutant de ATPase. Effets des mutations révèle la fonction des résidues. Groupe A ne joue aucun rôle important dans la liaison IF1. Le groupe B est cruciale pour la reconnaissance de IF1. Groupe C participe principalement à stabiliser le complexe inhibé. Groupe D a une fonction similaire à celle du groupe C, ce qui contribue à stabiliser le complexe inhibé. Ces résultats révèlent les fonctions importantes de ces régions au cours de la reconnaissance, le verrouillage et la stabilisation d'inhibiteur. Avec tous les résultats, nous avons finalement réussi à proposer un modèle de reconnaissance-verrouillage-inhibition pour la régulation de ATPase mitochondriale de la levure par IF1.

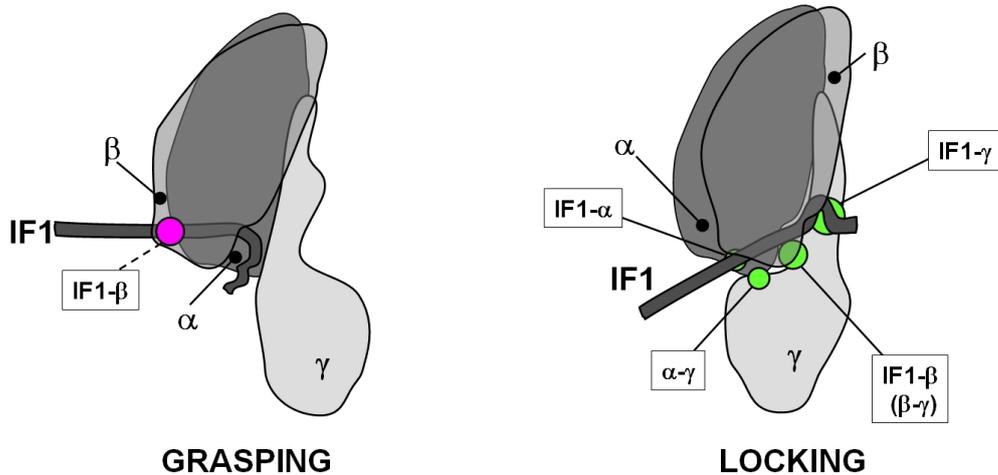


Figure 6. Modèle de reconnaissance et verrouillage d'IF1 par l'ATPase mitochondriale de la levure.

1) La partie médiane IF1 est reconnue par l'extrémité C-terminale de la sous-unité β de l'ATPase (en particulier, E471, A474), qui appartient à l'une des trois interfaces catalytiques $\alpha\beta$. Dans le même temps, le motif α GSDLDAST contribue peu à la reconnaissance IF1.

2) Après la fixation d'IF1, l'ATPase éprouve toujours une fraction de tour et l'interface catalytique qui vient de fixer l'IF1 se ferme et devient $(\alpha\beta)$ DP. IF1 est alors verrouillé.

3) IF1 verrouillage implique α DP-GSDLDAST et β DP-DELSEQD, qui forment une paire de pinces qui encage IF1. Considérant que l'extrémité C-terminale de β devient beaucoup moins importante que le début. En outre, d'autres résidus de la sous-unité α (groupe A) en face de la partie médiane d'IF1 contribuent modestement à IF1 verrouillage en limitant ses mouvements à l'intérieur de la $(\alpha\beta)$ crevasse DP.

4) Les interactions entre les sous-unités α , γ et β , γ (α -GSDLDAST et pied de γ , β -DELSEQD et pied de γ) assurent la rigidité de la pince mentionnés à l'étape 3.

5) Une autre contribution provient de la partie N-terminale de IF1, qui a été montré à jouer un rôle essentiel dans la stabilisation du complexe inhibé. en interagissant avec l'axe central de γ et parties internes de α et β unités (Andrianaivomananjaona et al, 2011; Ichikawa et al, 2001).

Même si le problème n'est pas encore résolu à 100%, notre travail permet de comprendre de se rapprocher de la réalité. Il ya encore d'autres aspects concernant la régulation d'ATPase par IF1 qui restent à élucider.