

<b>TD 11 : chaines membranaires de transports d'électrons</b>
---

**Document 1 : sensibilité des mitochondries isolées à l'ATP et à diverses toxines**

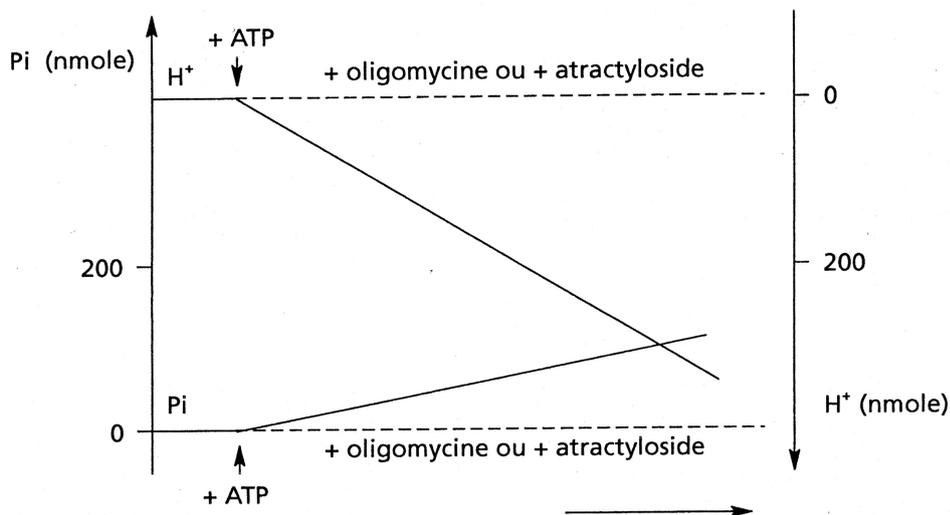
Une suspension mitochondriale est placée en présence de roténone (inhibiteur de la chaîne respiratoire).

A un instant donné on ajoute de l'ATP à la suspension, éventuellement on ajoute aussi de l'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase) ou de l'atractyloside (inhibiteur du transporteur ADP/ATP).

On mesure la concentration en protons du milieu de suspension ; on mesure aussi la concentration en phosphate inorganique (Pi) dans ce même milieu.

Afin d'affiner l'étude des courbes on donne les valeurs numériques suivantes :

- l'énergie libérée lors du passage d'un proton d'un compartiment mitochondrial à l'autre est de  $-17 \text{ kJ/mol}$  à l'état stationnaire
- le  $\Delta G$  de la synthèse de l'ATP est dans les conditions de la suspension  $50 \text{ kJ/mol}$ .



## Document 2 : étude de l'ATP synthase d'E.coli

Chez E.coli l'ATP synthase est située sur la membrane plasmique.

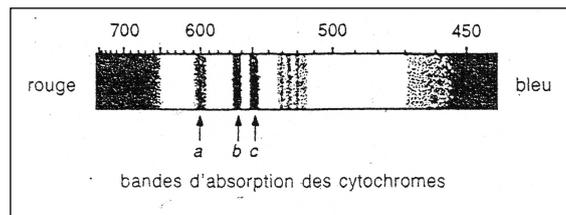
On construit des protéoliposomes contenant l'ATP synthase de coli tel que le fragment F0 est localisé dans la membrane artificielle et le fragment F1 dépasse dans le milieu extérieur. Ces protéoliposomes sont ensuite préparés selon deux protocoles différents :

	Expérience 1	Expérience 2
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> <li>- préparation à pH 5 dans 0.6 mM KCl</li> <li>- remise en suspension à pH 8 dans 100 mM KCl</li> <li>- addition de valinomycine (ionophore, capable de transporter l'ion potassium dans le sens du gradient à travers la membrane)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- préparation et mise en suspension dans 0.2 M KCl</li> <li>- addition d'aminocridine : c'est une base faible, capable de traverser une bicouche lipidique, fluorescente à faible concentration mais dont la fluorescence diminue quand la concentration augmente (par suite de l'agrégation des molécules d'aminocridine entre elles).</li> </ul>
	A t=0, ajout de ADP et Pi	A t=0 ajout d'ATP
Résultats	<p>Mesure de la concentration d'ATP dans le milieu au cours du temps</p>	<p>Mesure de la fluorescence due à l'aminocridine en fonction du temps</p> <p>On note aussi l'apparition d'ADP et Pi dans le milieu</p>

#### Document 4: étude des cytochromes de la membrane mitochondriale interne

En 1925 David Keilin utilisa un spectrophotomètre simple pour observer les bandes d'absorption caractéristiques des cytochromes appartenant à la chaîne respiratoire.

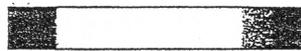
Le spectrophotomètre fait passer une lumière très intense à travers l'échantillon étudié puis à travers un prisme. Si les molécules de l'échantillon absorbent la lumière à des longueurs d'onde particulières des bandes sombres interrompent les couleurs de l'arc-en-ciel. Keilin découvrit que tous les tissus animaux présentent le spectre d'absorption suivant :



Les différentes stabilités à la chaleur des 3 bandes d'absorption et leurs différentes intensités selon les tissus conduisent Keilin à conclure que ce spectre est dû à 3 composants qu'il nomma : cytochromes a, b et c.

Afin de comprendre le rôle des 3 cytochromes et leur ordre d'intervention dans la chaîne mitochondriale, Keilin effectua les observations suivantes

A- tissu animal en condition aérobie



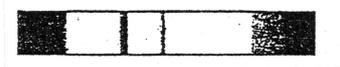
B- tissu animal en condition anaérobie



C- tissu animal en condition aérobie, en présence de KCN



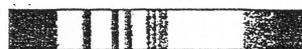
D- tissu animal en condition aérobie, en présence d'uréthane



E- cytochrome c isolé en présence de dioxygène



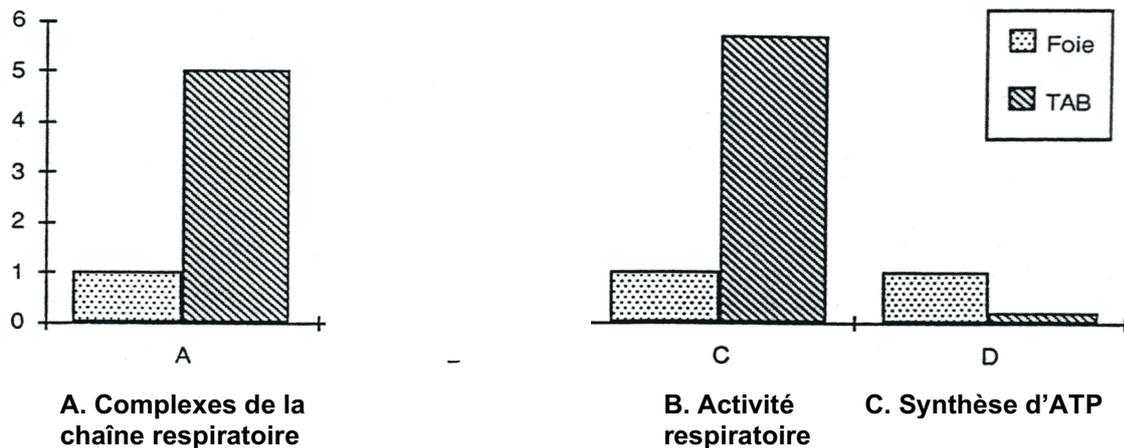
F- tissu animal en condition aérobie, en présence d'un excès de glucose



## Document 5 : le tissu adipeux brun

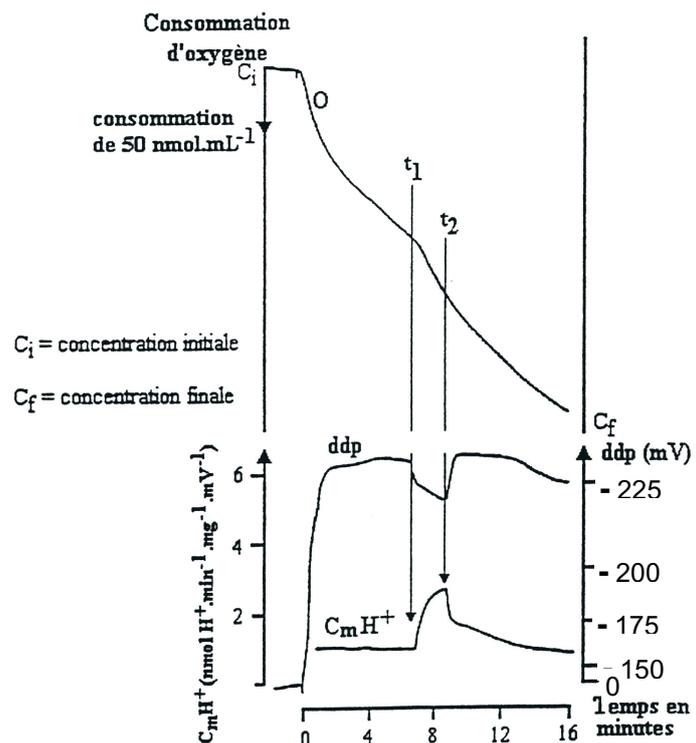
### Document 5.1 : Comparaison de différents paramètres des mitochondries du foie et du tissu adipeux brun

On évalue les quantités relatives de différentes molécules mitochondriales de la membrane interne (les masses des différentes protéines sont rapportés à la masse des protéines mitochondriales). Ces paramètres sont exprimés indépendamment les uns des autres, en unités arbitraires ainsi que l'activité respiratoire.



### Document 5.2 : Dégradation des acides gras et conséquences sur l'activité mitochondriale du tissu adipeux brun

Des mitochondries de tissu adipeux brun sont extraites puis placées au temps 0 dans un milieu contenant du dioxygène, des substrats respiratoires, mais ne contenant pas d'acides gras. Entre  $t_1$  et  $t_2$ , on ajoute dans le milieu du palmitate : de la chaleur est produite. Au cours de cette expérience, on mesure la consommation d'oxygène (courbe O), la différence de potentiel trans-membranaire de la membrane interne (courbe ddp), la conductance aux protons de la membrane interne (courbe  $c_mH^+$ ).



### Document 5.3 : Etude d'une protéine candidate, la thermogénine ou UCP1

On a isolé une protéine uniquement exprimée dans les mitochondries du tissu adipeux brun : la thermogénine ou UCP1 (*uncoupling protein 1*). Les premières études *in vitro* ont conduit à l'impliquer dans la thermogénèse réalisée par le tissu adipeux brun. Afin de confirmer son rôle, on réalise une souris pour laquelle le gène *UCP1* a été invalidé de façon à ne plus exprimer la protéine UCP1.

Le potentiel de membrane mitochondrial ainsi que la consommation de dioxygène sont évalués dans les mitochondries issues de foie de souris sauvages ( $UCP1^{+/+}$ ), de tissu adipeux brun de souris sauvages ( $UCP1^{+/+}$ ) et de tissu adipeux brun de souris mutantes pour UCP1 ( $UCP1^{-/-}$ ).

Mitochondries		Valeur du potentiel de membrane mitochondrial	Consommation de dioxygène (en unités arbitraires)
Souche de souris	Organe		
$UCP1^{+/+}$	TAB	$- 33 \pm 8$	350
$UCP1^{-/-}$	TAB	$- 195 \pm 6$	150
$UCP1^{+/+}$	foie	$- 184 \pm 3$	100

Les résultats sont la moyenne de 5 préparations.

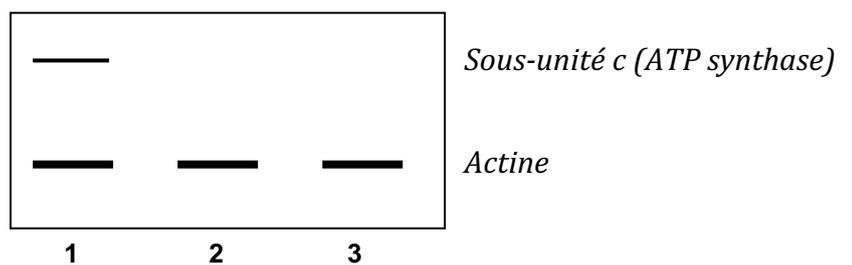
### Document 4.4 : Expression de la sous-unité c de l'ATP synthase dans différents tissus

Des extraits de foie ou de tissu adipeux brun sont broyés puis les ARNm sont extraits. Ils sont séparés par électrophorèse puis transférés sur une membrane de polyacrylamide (northern-blot). La membrane est hybridée avec une sonde spécifique de l'ARNm de la sous-unité c de l'ATP synthase. La même membrane est hybridée avec une sonde dirigée contre l'ARNm codant l'actine

1 : ARNm issus du foie de souris  $UCP1^{+/+}$

2 : ARNm issus de TAB de souris  $UCP1^{+/+}$

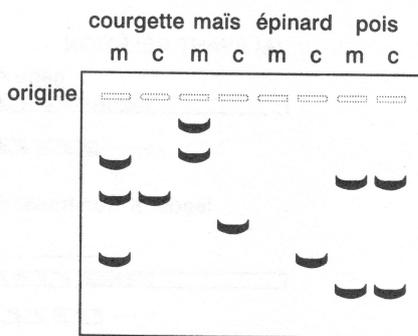
3 : ARNm issus de TAB de souris  $UCP1^{-/-}$



### Document 6 : ADN des organites semi-autonomes

L'ADN chloroplastique des végétaux supérieurs est remarquablement constant, en ce qui concerne sa taille (120-180 kb) et la disposition de sa séquence. En revanche les ADN mitochondriaux des mêmes plantes sont assez variables : leur taille varie de 218 kb à 2 400 kb. Afin d'expliquer la variabilité des génomes mitochondriaux des plantes supérieures on réalise l'expérience suivante.

On prépare des suspensions d'ADN de mitochondries et de chloroplastes de courgette, maïs, épinard et pois. On observe qu'il est difficile de préparer des ADN mitochondriaux sans contamination par les chloroplastes.



On effectue une digestion par une enzyme de restriction des différents ADN. Les fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse, puis transférés sur film et hybridés avec une sonde.

La sonde est un ADNc de la séquence codant pour la sous-unité L de la ribulose diphosphate carboxylase d'Épinard, rendu simple brin et marqué à la fluorescéine sur son extrémité 5' ; ce gène est un gène typiquement chloroplastique.