



MITOCHONDRIES : Généralités

DES 5 décembre 2014

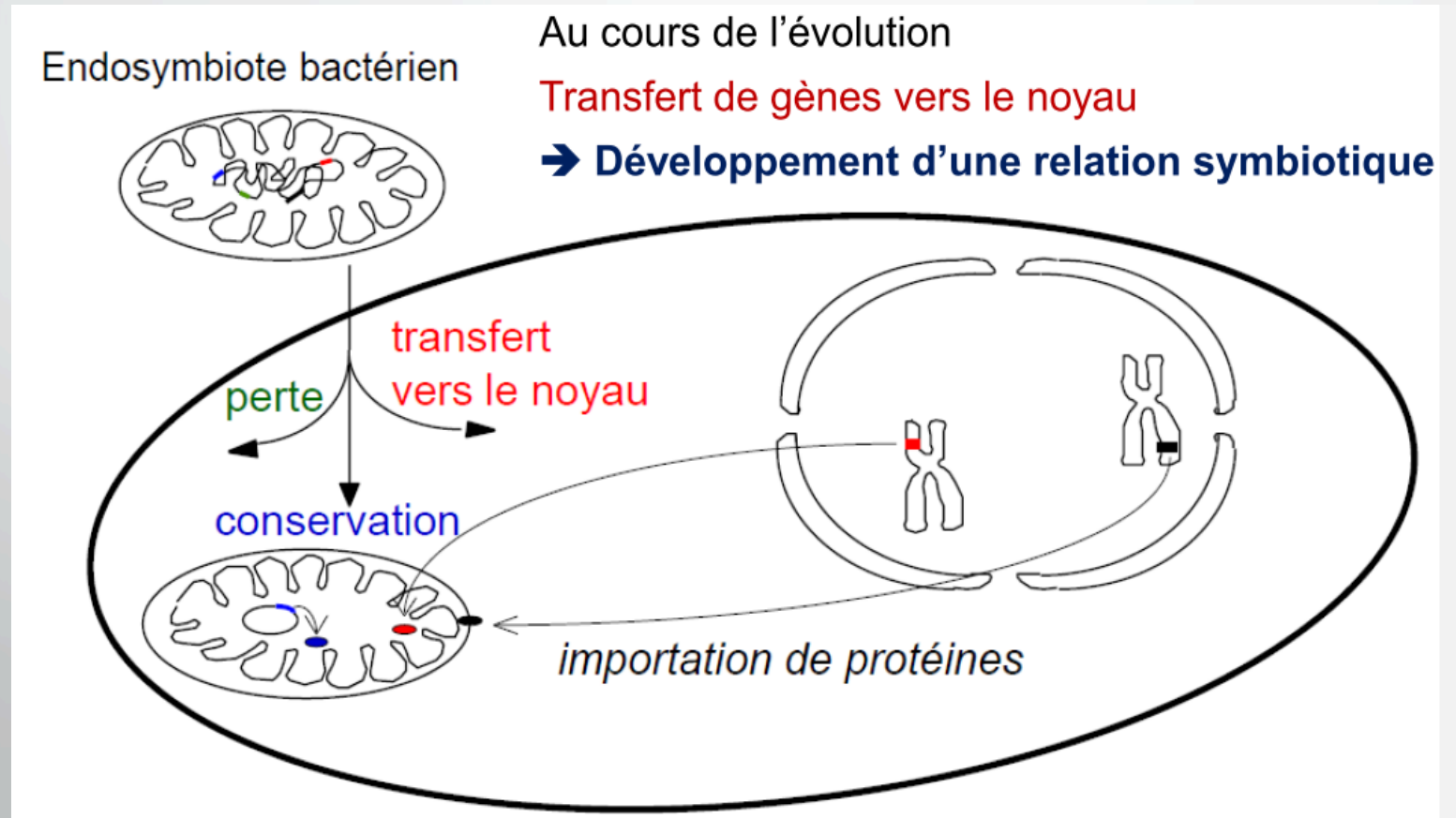
Virginie GUILLET-PICHON

PLAN

- Introduction
- Structure, dynamique mitochondriale
- Métabolisme énergétique mitochondrial
- Génétique
- Manifestations cliniques et diagnostic

Théorie de l'origine procaryotique des mitochondries

- Les mitochondries ont probablement évoluées à partir de bactéries procaryotes aérobies qui ont été internalisées par des cellules eucaryotes primitives



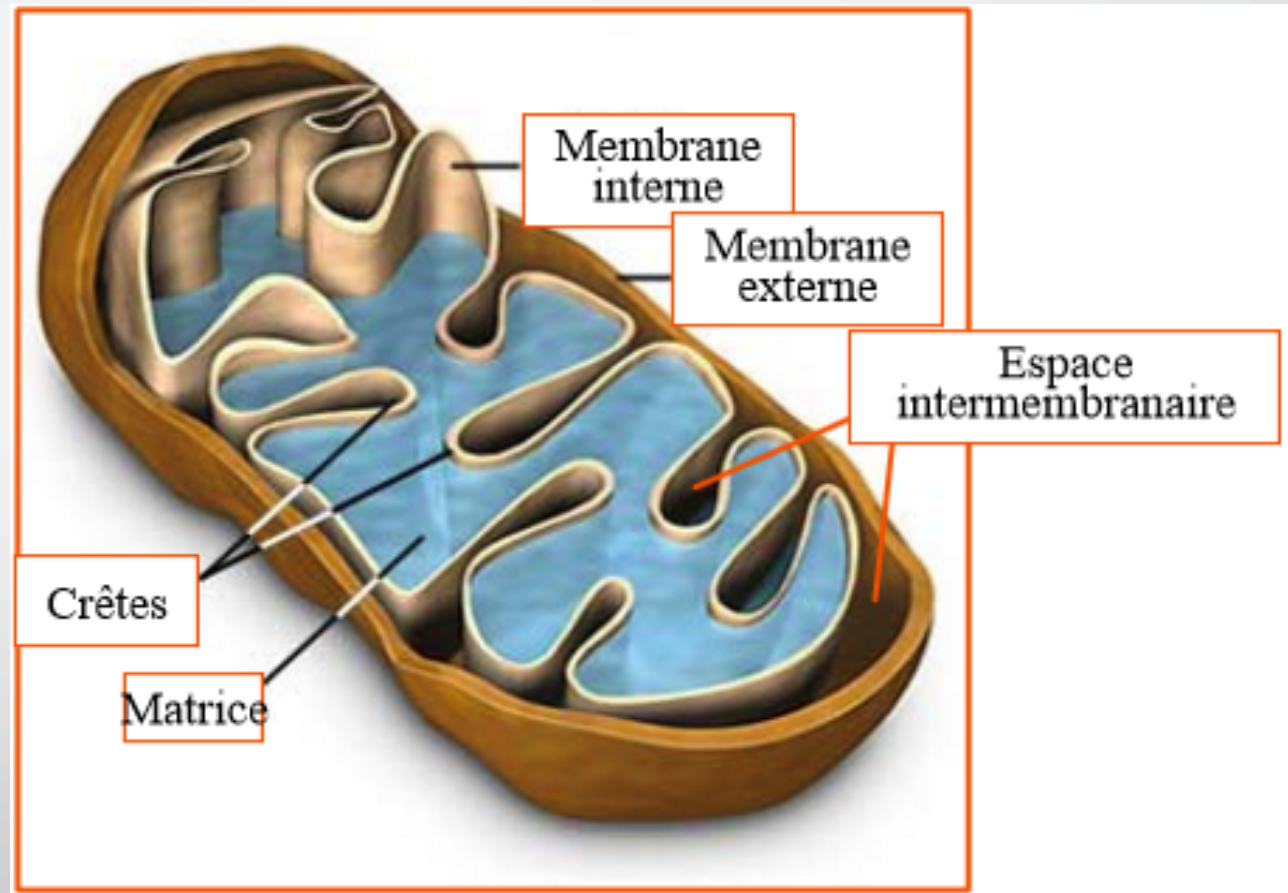
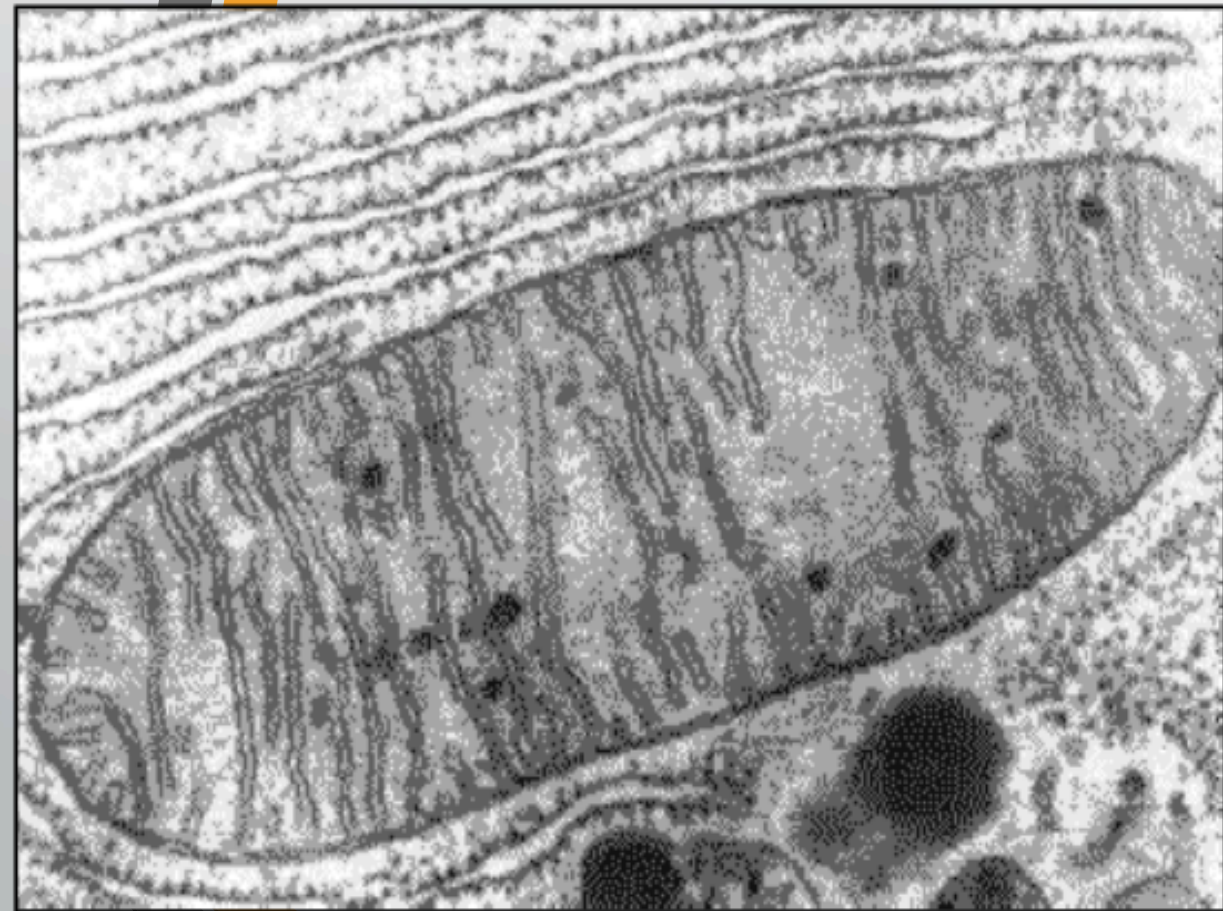
Arguments en faveur de la théorie endosymbiotique

- Pas de noyau mais 2 à 10 molécules d'ADN circulaire
- Homologie de séquence avec l'ADN de certaines bactéries
- Parenté entre mitoribosome et ribosome bactérien : sensibilité à certains antibiotiques (chloramphénicol)
- Composition biochimique de la membrane interne : absence de cholestérol et présence de cardiolipine

Fonctions Mitochondriales

- **Synthèse d'ATP** : OXPHOS
- **Production de ROS** : électrons célibataires s'échappant de la chaîne respiratoire et transférés prématurément à l'oxygène (anion superoxyde)
- **Thermogénèse**
- **Synthèse des hormones stéroïdes**
- **Homéostasie calcique**
- **Mort cellulaire programmée (apoptose)**
- **Autres** : Production de précurseurs des acides aminés non essentiels / Synthèse de phospholipides (avec le réticulum) / Synthèse de l'hème (avec le cytosol)

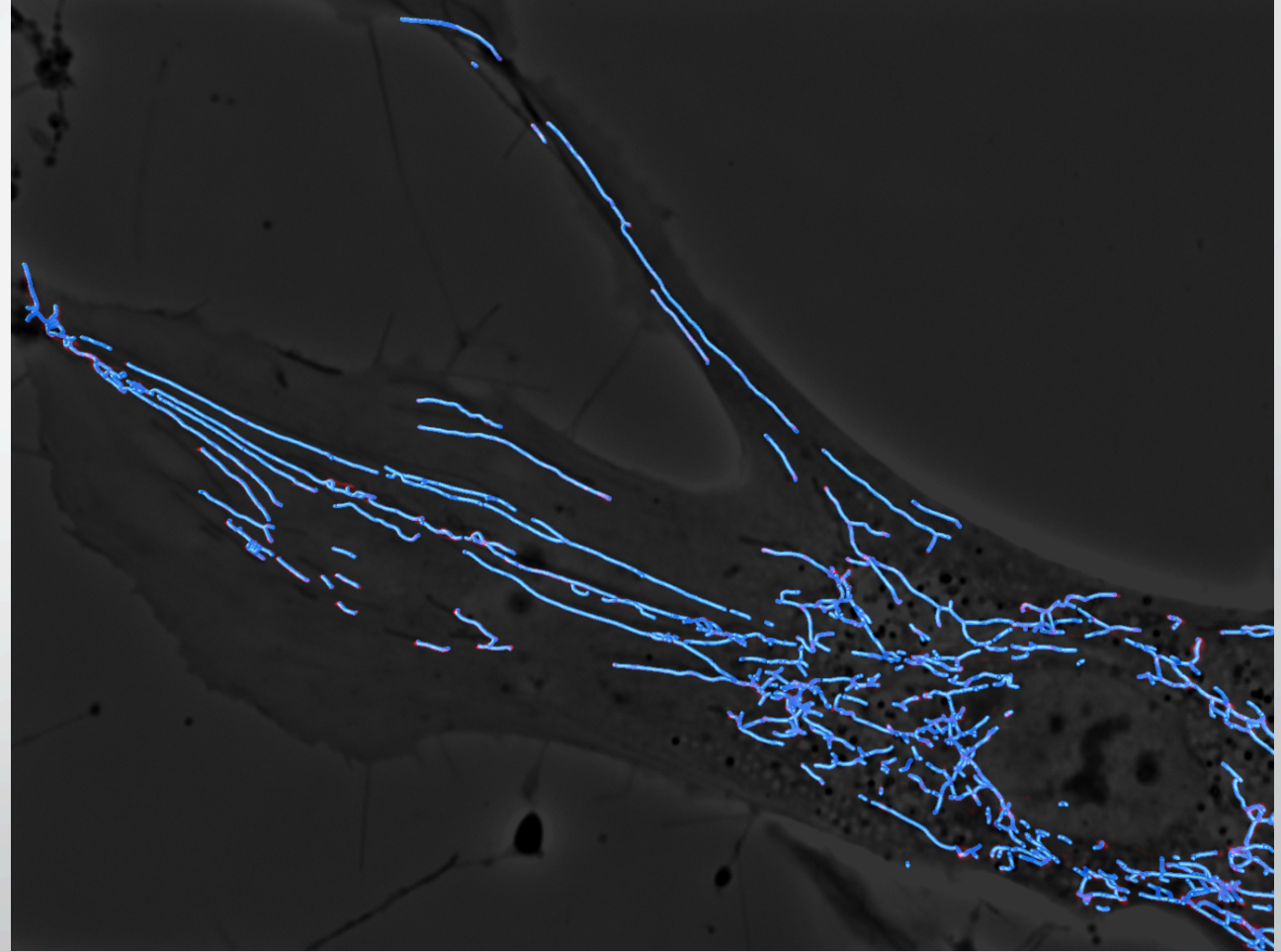
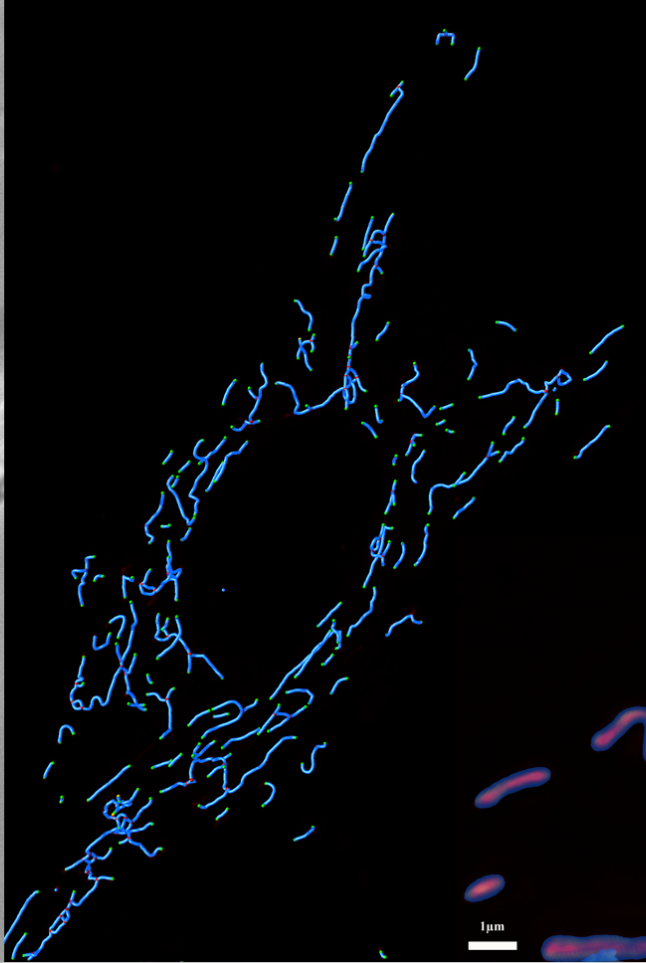
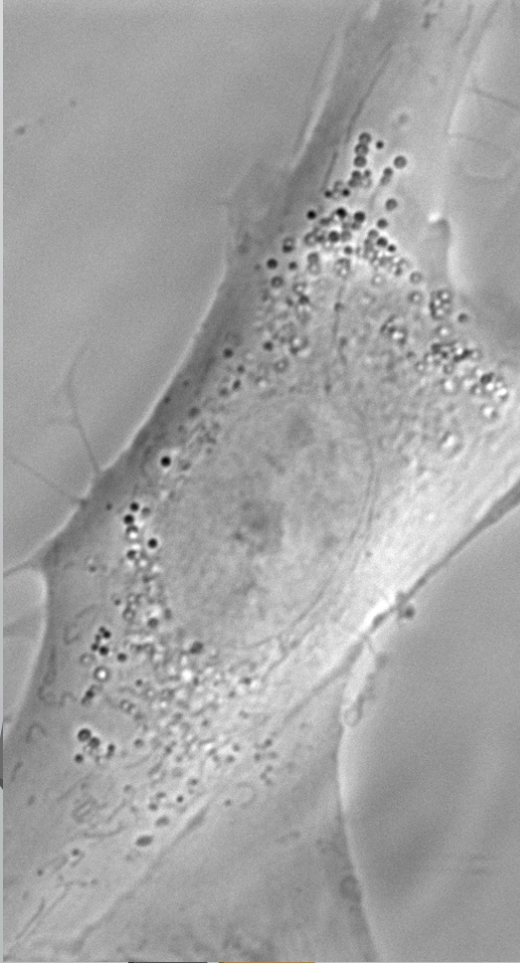
Structure Mitochondriale



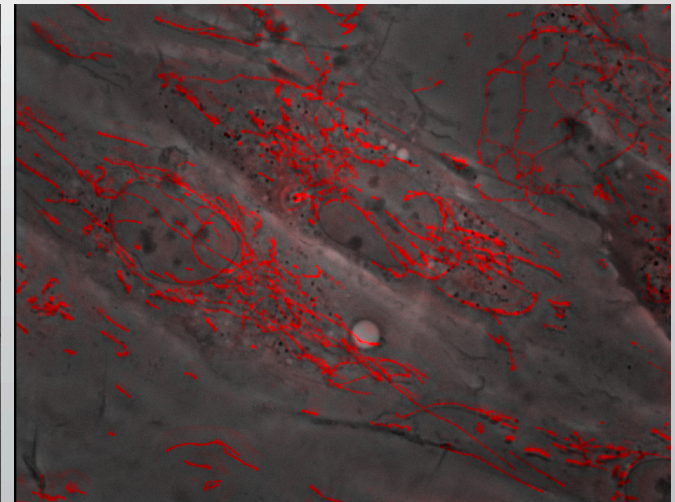
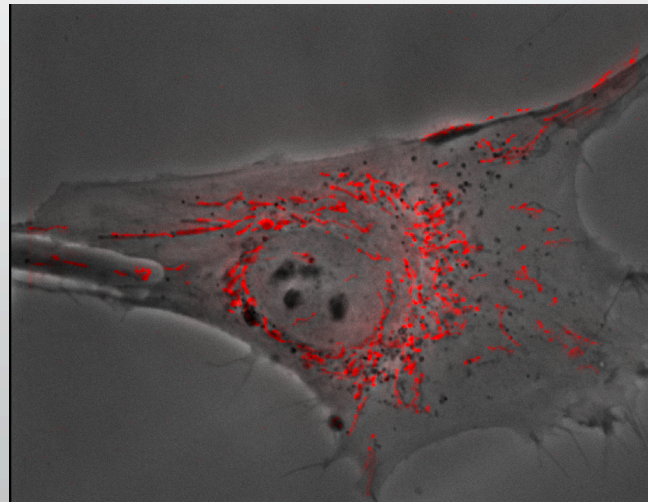
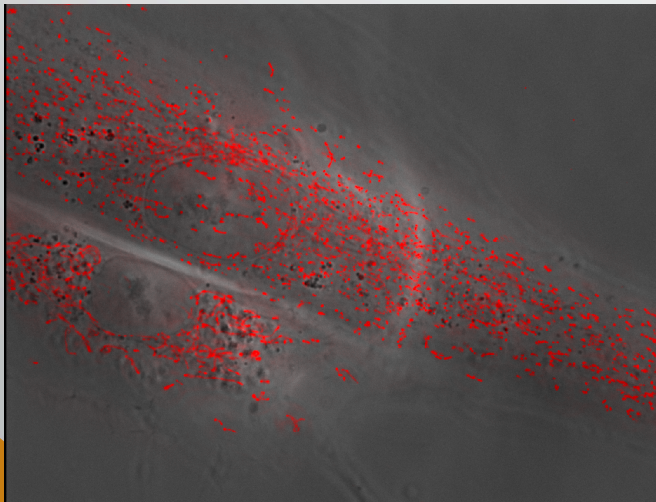
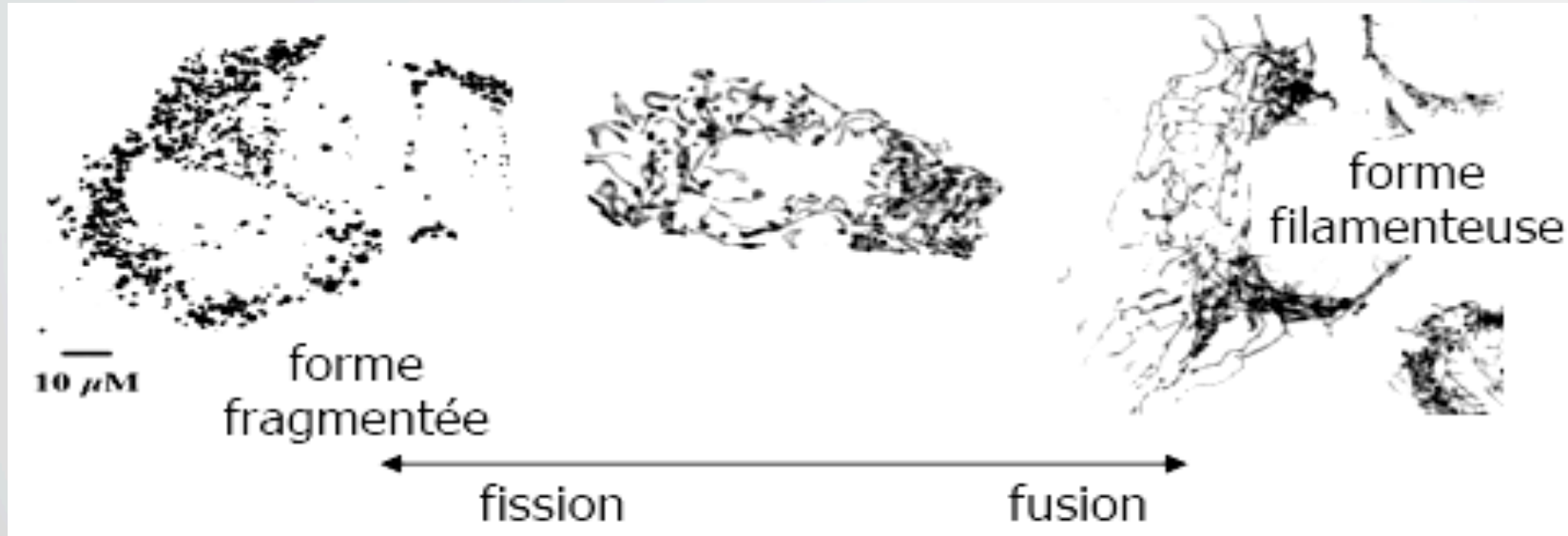
Structure Mitochondriale

- 4 compartiments :
 - Membrane externe : bicouche lipidique de composition proche de la membrane plasmique (50-60% protéines, 50-40% lipides). Riche en porines (passage passif de petites molécules)
 - Espace intermembranaire : contient des protons (rôle dans les OXPHOS), des molécules de cytochrome c (OXPHOS, apoptose)
 - Membrane interne : bicouche lipidique différente de la mb externe (80% protéines, 20% lipides), riche en cardiolipines
Replis complexes dans la matrice : **crêtes**
Riche en transporteurs (transport actif) et en complexes protéiques enzymatiques (chaîne respiratoire)
 - Matrice : ADN mt, composants nécessaires pour la transcription et traduction (ARNt, ARNm, mitoribosomes), nombreux complexes enzymatiques (beta-oxydation des acides gras, cycle de Krebs)

Le réseau Mitochondrial

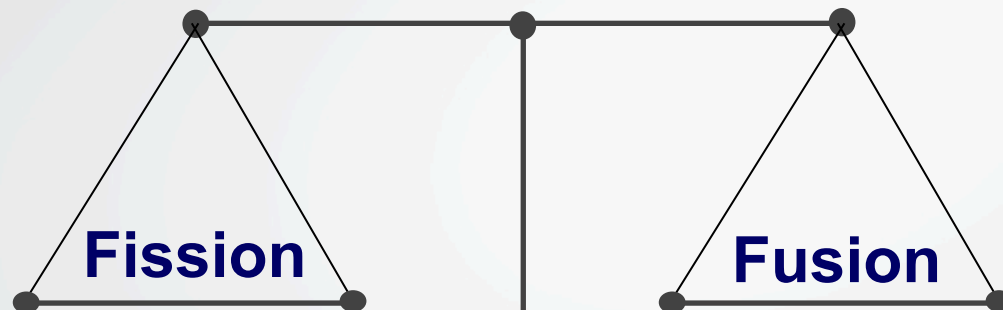


Le réseau mitochondrial



Structure du réseau mitochondrial

Equilibre dynamique



Smirnova et al., 2001

Drp1

James et al., 2003

hFis1

Niemann et al., 2005

GDAP1

Réseau fragmenté



Cipolat et al., 2004

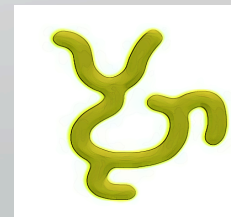
Opa1

Santel et Fuller, 2001

Mitofusine 1

Mitofusine 2

Réseau filamenteux



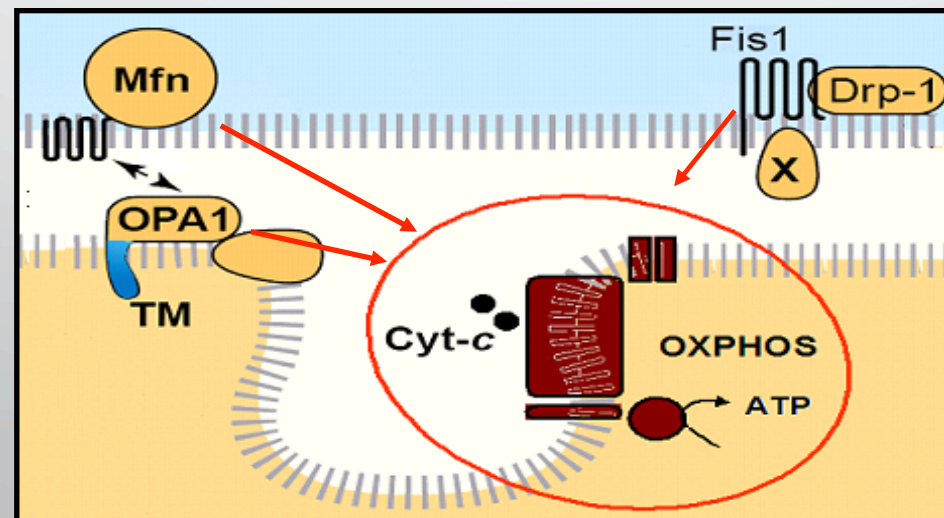
Fusion vs Fission

Fusion

- Mitofusines : Mfn1 et Mfn2
 - Membrane externe
 - interaction en Trans
- OPA1
 - Membrane interne (crêtes ++)
- ...

Fission

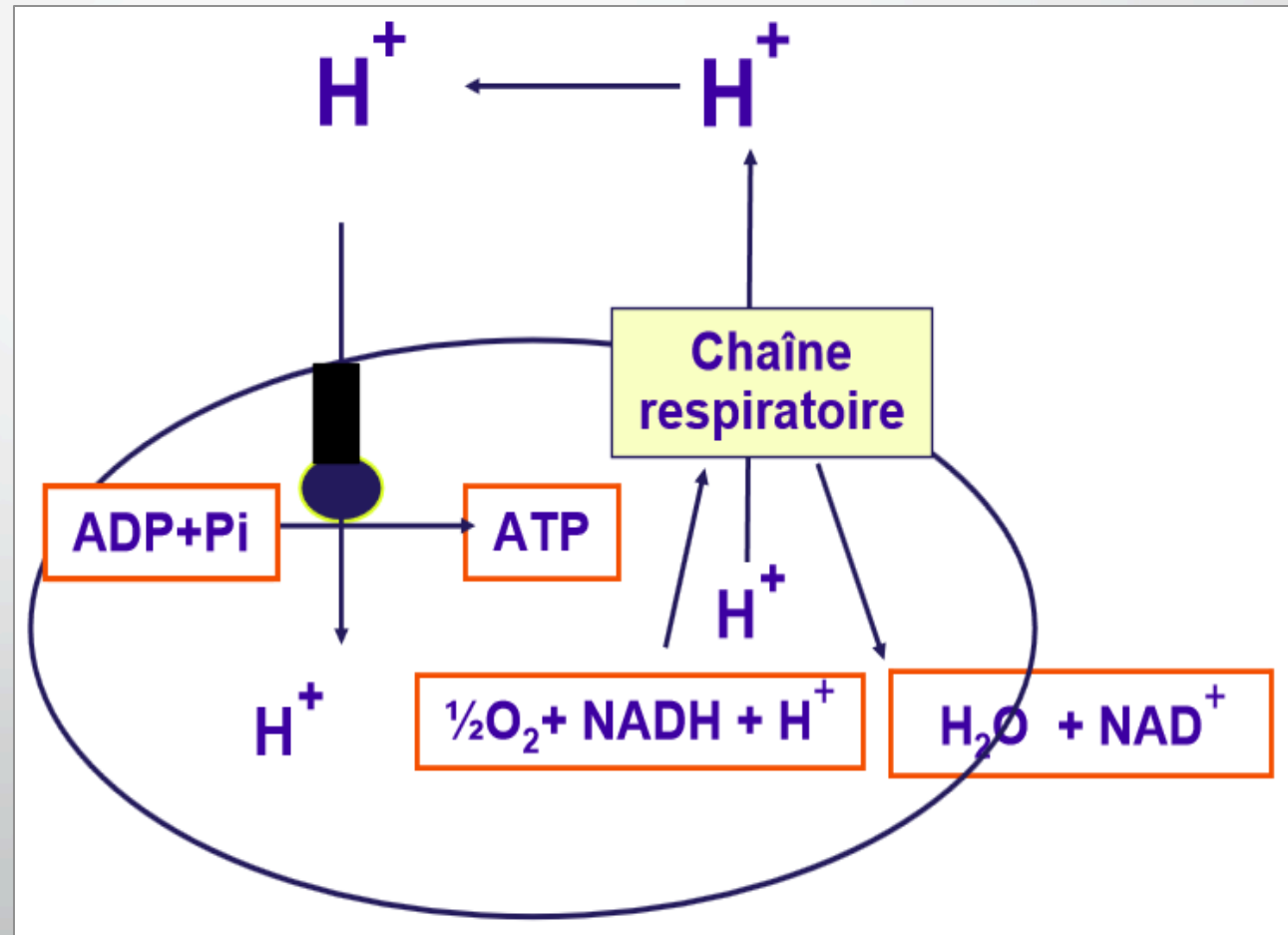
- Drp1
 - Cytosolique
 - recrutée aux sites de fission par hFis1
- hFis1
 - Membrane externe



Production d'ATP : les OXPHOS

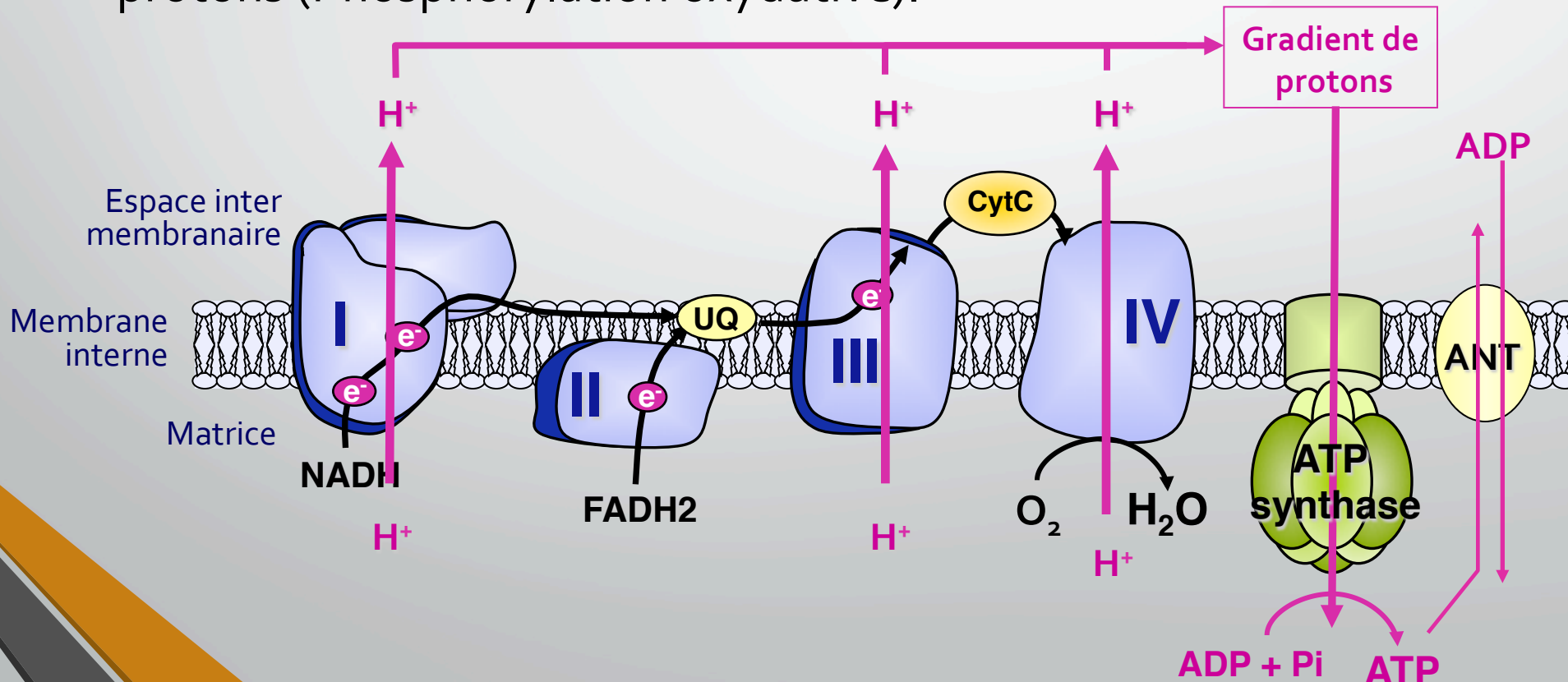
- Le Modèle de Mitchell (1961)

Le couplage entre les réactions d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP est effectué par l'intermédiaire d'un **gradient de protons**

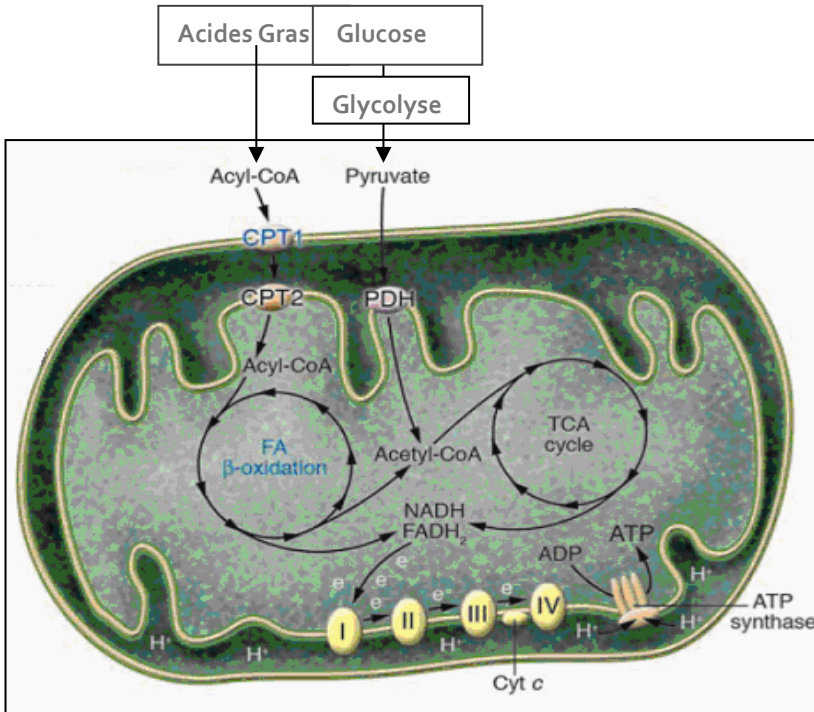


La chaîne respiratoire

- Ensemble de complexes protéiques responsables de la phosphorylation oxydative
Le transfert des électrons le long des complexes de la chaîne respiratoire permet le pompage des protons au travers de la membrane interne
- La synthèse d'ATP est couplée au transfert des électrons par le gradient de protons (Phosphorylation oxydative).



Origine des substrats des OXPHOS : cofacteurs réduits $NADH, H^+$ et $FADH_2$



catabolisme des molécules énergétiques (réactions de déshydrogénations)

Molécules énergétiques	GLUCIDES	LIPIDES	PROTEINES	
Réaction	Glycolyse Glucose ↓ Pyruvate	Décarboxylation oxydative Pyruvate ↓ Acétyl CoA	Cycle de Krebs A partir de l'acétyl CoA	β oxydation des ac. gras Acyl-CoA ↓ Acétyl CoA
Localisation	Cytoplasme	Mitochondrie	Mitochondrie	Mitochondrie
Cofacteurs réduits produits	$NADH, H^+$	$NADH, H^+$ $FADH_2$	$NADH, H^+$ $FADH_2$	AA ↓ Intermédiaires du cycle de Krebs → mitochondrie

Nécessite un « transfert » dans la mitoch.

Produits *in situ* dans la mitochondrie directement utilisables pour la phosphorylation oxydative

Relation structure - fonction énergétique mitochondriale

- **Mitochondries :**
 - Rôle central dans le **métabolisme énergétique cellulaire**
 - **Réseau dynamique** : fission ↔ fusion
- **Importance du contrôle de la morphologie mitochondriale dans le maintien des fonctions mitochondriales et cellulaires** : Mutations des gènes OPA1, MFN2, GDAP1 → neuropathies héréditaires

Olichon et al., 2003

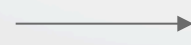
↘ OPA1



↘ $\Delta\Psi_m$

Bach et al., 2003

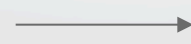
↘ MFN2



↘ $\Delta\Psi_m$ / ↘ complexes I, II, III et V

Pich et al., 2005

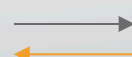
↘ Drp1



↘ respiration / ↘ synthèse ATP

Benard et al., 2007

Structure du réseau



Métabolisme énergétique

Réseau fragmenté



↘ activité des complexes de la CR

Cellules ρ^0

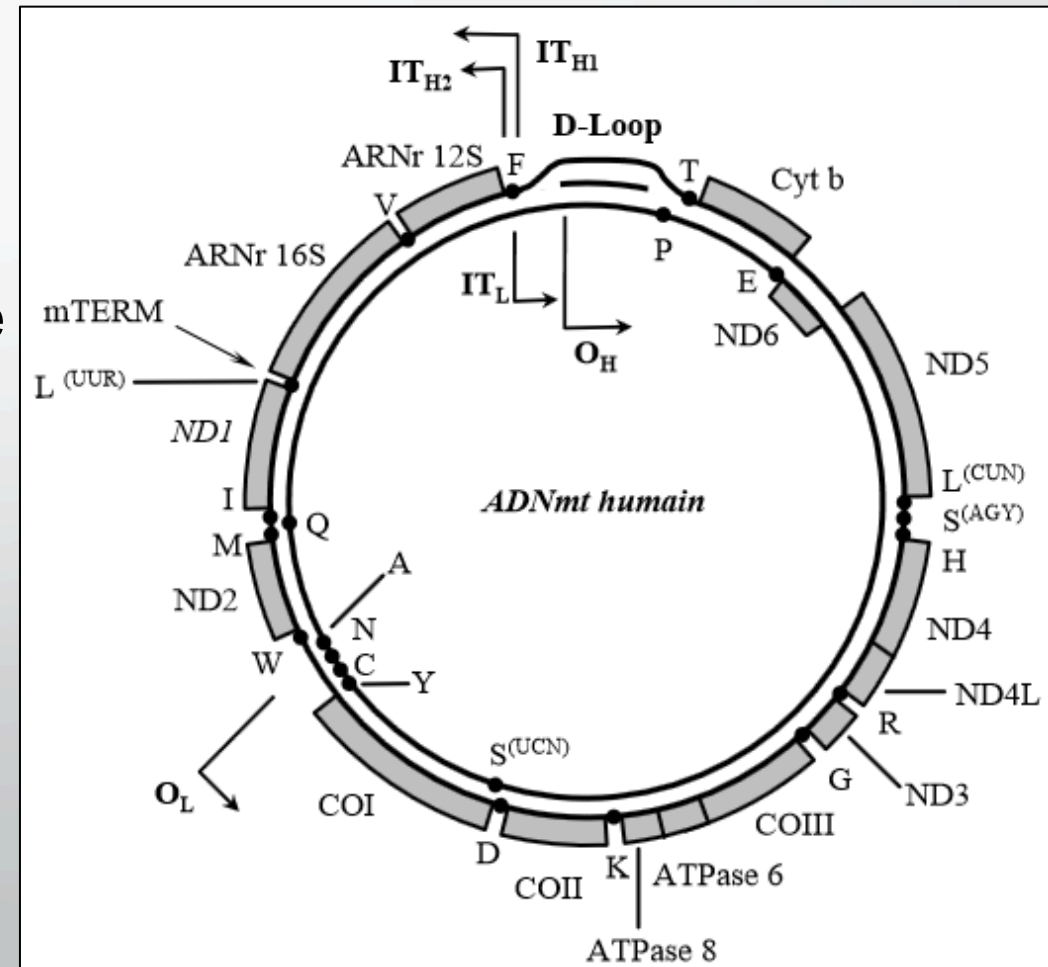
↘ ou ↗ $\Delta\Psi_m$

Benard et al., 2007

De Vos et al., 2005

Génétique mitochondriale: Le génome mitochondrial

- Les mitochondries possèdent leur propre génome (ADNmt)
 - Molécule circulaire de 16,569 pnb
 - Pas de partie non codante
- ADNmt contient 37 gènes codant pour :
 - 13 sous-unités de la chN respiratoire
 - 22 ARN transfert
 - 2 ARN ribosomiaux
- 2-10 copies d'ADN / mitochondrie
- 10^2 - 10^6 mitochondries / cellule soit plus de 1000 copies d'ADNmt / cellule

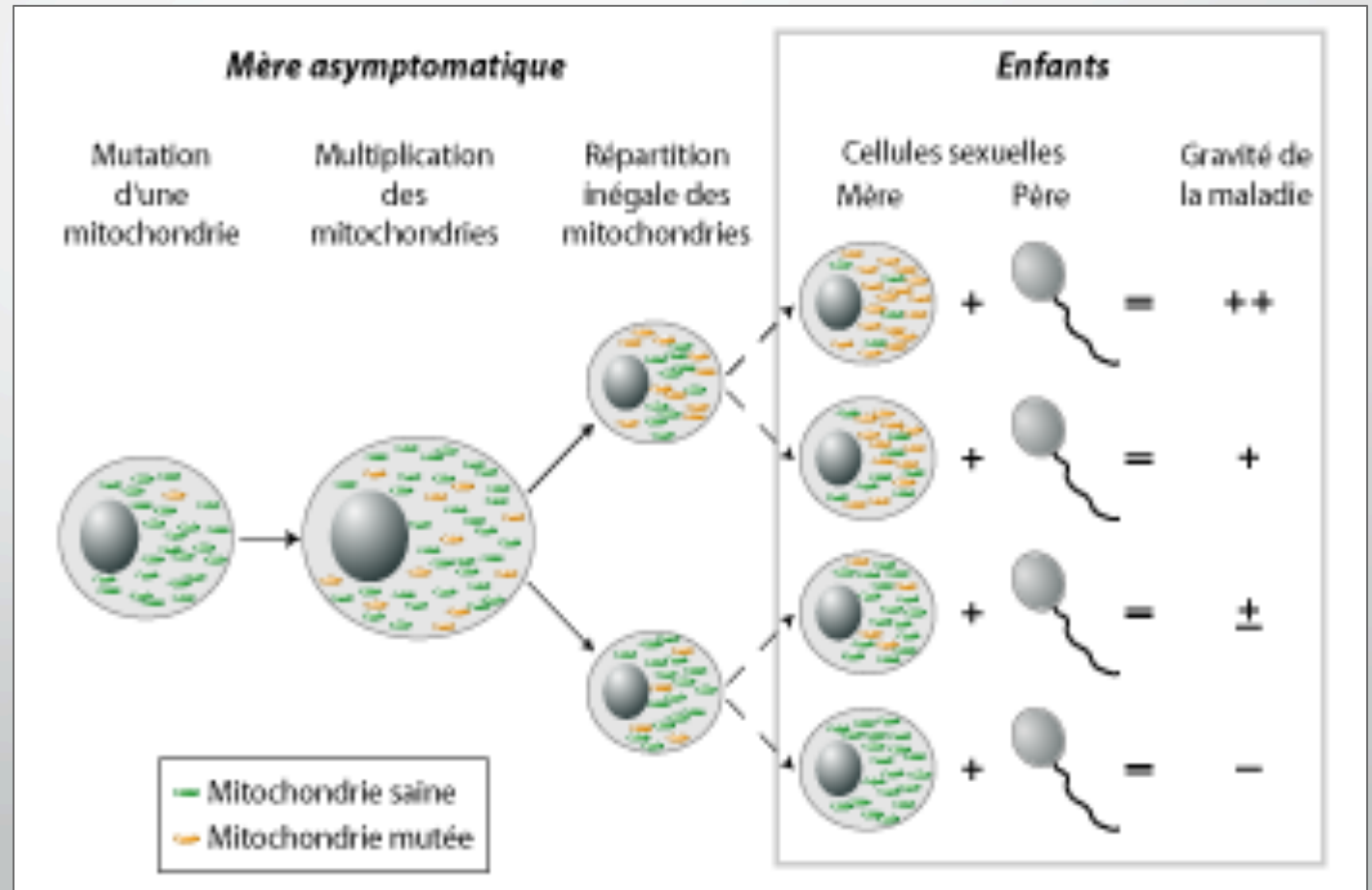


Génétique mitochondriale

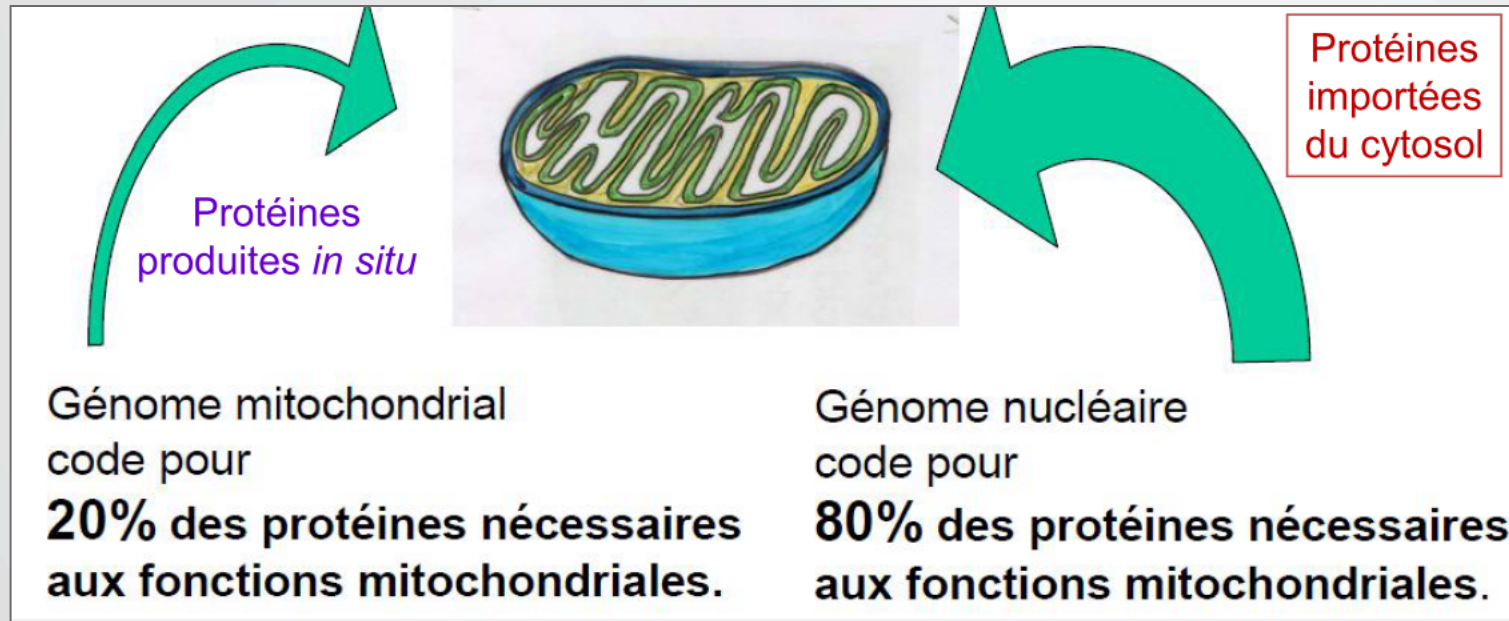
- l'ANDmt est d'origine maternelle
- Mute 10-20x plus que ADN nucléaire
- Mutations ponctuelles de l'ADNmt : transmission maternelle
- Délétions : cas sporadiques
- concept de l'homo-/hétéroplasmie : *expression va dépendre +/- du taux d'hétéroplasmie*

Concept d'hétéroplasmie

- Les mutations de l'ADNmt sont en général hétéroplasmiques
= **coexistence de molécules normales et mutées** dans une même cellule
- proportion variable : entre mitochondries, entre cellules, entre tissus
- Détermine le phénotype
= **Effet seuil**
 - Modification du phénotype au-delà d'une valeur critique d'ADNmt muté
 - Valeur du seuil variable selon les tissus ou les cellules



Double origine des protéines mitochondriales



	Sous-unités codées par	
	ADN mt	ADN nucl.
Complexe I	7	>30
Complexe II	0	4
Complexe III	1	10
Complexe IV	3	10
Complexe V (ATPase)	2	9

Origine des pathologies mitochondriales

- **Une mutation de l'ADNmt :**

Qui affecte le gène d'une sous unité d'un complexe des oxphos.

Qui affecte un gène d'ARNt ou d'ARNr.

- **Une mutation d'un gène nucléaire :**

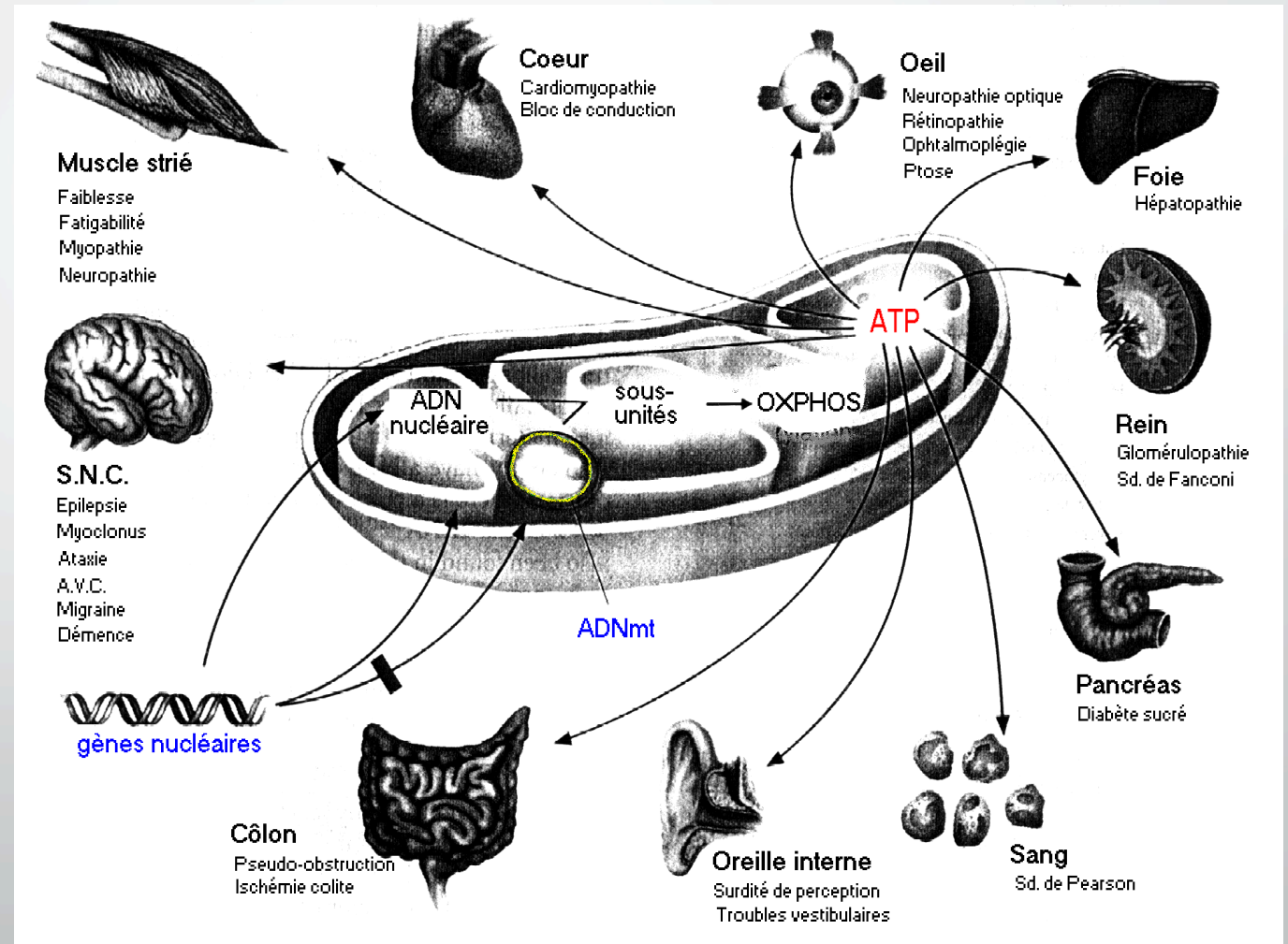
Qui affecte une protéine dirigée vers les mitochondries. (sous unités d'un complexe des oxphos, protéines d'assemblages, protéines de la machinerie de replication (ADN pol γ), protéine de fission ou fusion, protéine de la maintenance de l'ADNmt)

- **Une altération du fonctionnement mitochondrial :**

Due à un dysfonctionnement cellulaire : accumulation de fer mitochondrial et génération de ROS

Les maladies mitochondriales

- Maladie multi-systémique ou a expression tissu spécifique
 - Mutation ADNmt
 - Héritéité mendélienne
 - Sporadique ou transmis



Diagnostic

- 1) exploration métabolique in vivo : permet un premier dépistage des déficits de la chaîne respiratoire
- 2) exploration biochimique des protéines de la chaîne respiratoire ou de facteurs de contrôle du système OXPHOS
- 3) diagnostic moléculaire : nécessitant une approche des deux génomes, mitochondrial et nucléaire

Exploration in vivo : cycle redox

- Un déficit enzymatique entraîne une modification des équilibres d'oxydoréduction cytoplasmiques et mitochondriaux
→ Accumulation d'équivalents réduits (NADH, FADH)
- Dans la mitochondrie : transformation de l'acétoacétate en 3-hydroxybutyrate.
↗ **du rapport 3-hydroxybutyrate/acétoacétate.**
- Dans le cytoplasme : transformation du pyruvate en lactate
↗ **du rapport lactate/pyruvate**

L'existence d'une hyperlactacidémie persistante et d'une perturbation des équilibres redox représente une indication formelle d'une exploration enzymologique de la chaîne respiratoire

Explorations biochimiques

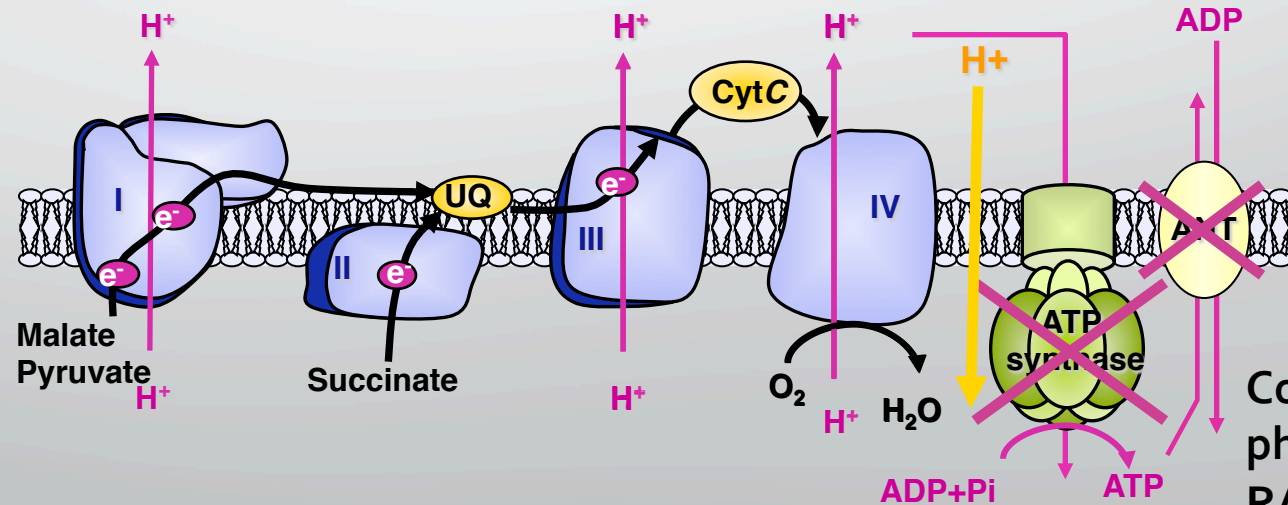
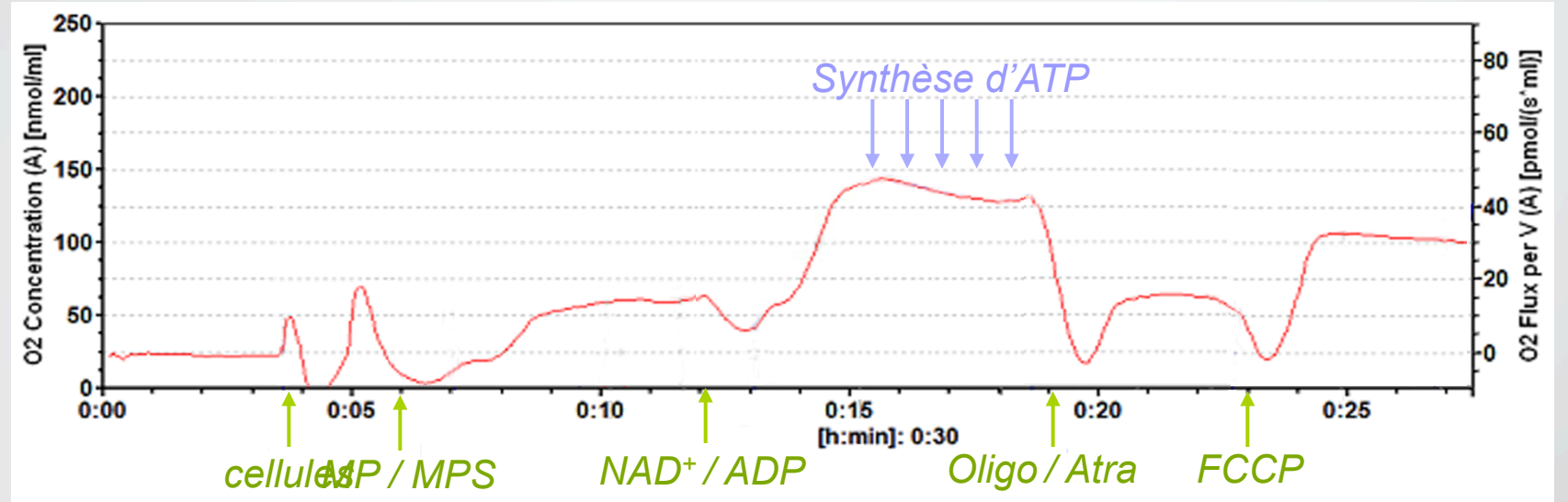
L'activité de la chaîne respiratoire est estimée par deux techniques :

- la polarographie : permet de mesurer la **consommation d'oxygène par des fractions enrichies en mitochondries ou cellules perméabilisées**. Matériel frais
- la spectrophotométrie : permet de mesurer **les activités des complexes de la chaîne respiratoire seuls ou par groupe** en utilisant des donneurs ou des accepteurs d'électrons spécifiques. Homogénats congelés

Etudes Spectrophotométriques

- Homogénat de différents tissus (muscle, coeur, foie, cellules,)
- Permet de localiser un défaut au niveau d'un des complexes de la chaîne respiratoire
 - Complexe I : NADH-coenzyme Q réductase
 - Complexe II : Succinate-déshydrogénase (SDH)
 - Complexe III : Ubiquinol-cytochrome c réductase –
 - Complexe I + III : NADH cytochrome c réductase
 - Complexe II + III : Succinate- cytochrome c réductase
 - Complexe IV : cytochrome c oxydase
 - C.S. : Citrate synthétase

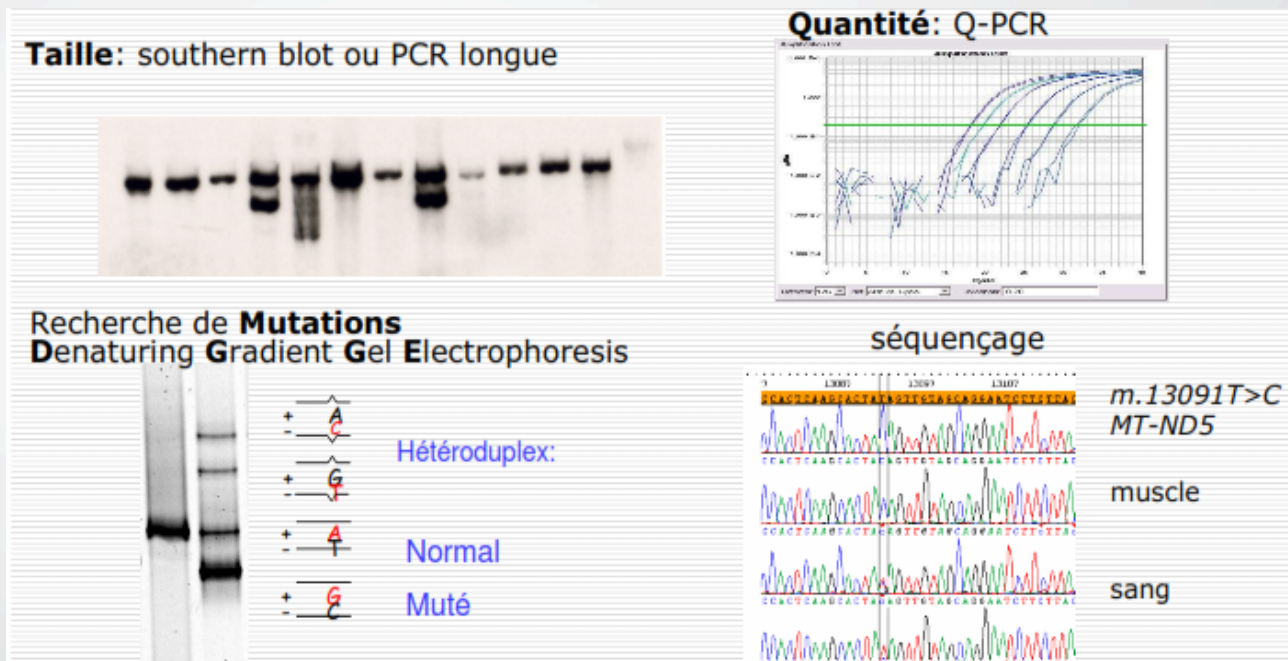
Polarographie



Diagnostic moléculaire

ADNmt extrait du muscles, sang, fibroblastes...

- Recherche de **délétion**
(Southern blot, PCR longue)
- Recherche de **déplétion**
(Southern blot, PCR Quantitative)
- Recherche de **mutation ponctuelle**
(séquençage, SSCP, DGGE, DHPLC...)
- **Screening de tout l'ADNmt**



- Méthode Surveyor : utilise une endonucléase qui reconnaît et clive les mésappariements de l'ADN double brin. Permet ainsi d'identifier les mutations hétéroplasmiques
- Puce de reséquençage Affymetrix (GeneChip Mitochondrial Resequencing 2.0 Array) : permet d'identifier les mutations homoplasmiques de l'ADNmt

Clinique et examens paracliniques évocateurs de pathologies mitochondriales :

Biologie :

- élévation du lactate et du rapport L/P, hyperlactatorachie
- élévation des dérivés du cycle de Krebs

- bilan métabolique sans argument pour une autre pathologie métabolique
IRM cérébrale : hypersignaux des NGC, pseudo-strokes, pic de lactates à la spectro IRM

Prélèvement sanguin

- Recherche d'une délétion de l'ADNmt (syndrome de Pearson) ou des mutations responsables de l'atrophie optique de Leber
- Recherche des mutations fréquentes mais la rentabilité est faible

Biopsie tissulaire

Muscle, foie, rein, fibroblastes...

Analyse moléculaire

Recherche des mutations les plus fréquentes

3243 : MELAS
8344 : MERRF
8993 : NARP

Délétion de l'ADNmt

Délétion unique (syndrome de Keams-Sayre, PEO)

Déplétion de l'ADNmt

Délétions multiples

Analyse des gènes nucléaires d'instabilité de l'ADNmt selon le tableau clinique : *POLG1*, *POLG2*, *ANTI*, *PEO1*, *DGUOK*, *MPV17*, *TK2*, *RRM2B*, *SUCLG1*, *SUCLA2*, *TP*... sur prélèvement sanguin

Enzymologie

Déficits combinés ou multiples de la CR

Déficit isolé de la CR : complexe I, II, III, IV ou V

Analyse des gènes mitochondriaux (tissu) ou nucléaires (sang) correspondant aux sous-unités du complexe déficitaire et/ou à la clinique, ou étude exhaustive de l'ADNmt par Surveyor ou séquençage

Histologie

Surcharge lipidique, RRF, fibres COX négatives



Merci de votre attention