

L2 SVT / L2 Chimie parcours Chimie-Biologie

UE de Biochimie métabolique (S3)

ETUDE DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE

Equipe enseignante et technique :

D. Papy

E. Miambi

C. Morin

L. Garrigue-Antar

M-C. Bourin

I. Ouidja

S. Simon

N. Dubois

D. Singabrava

B. Even

S. Chantepie

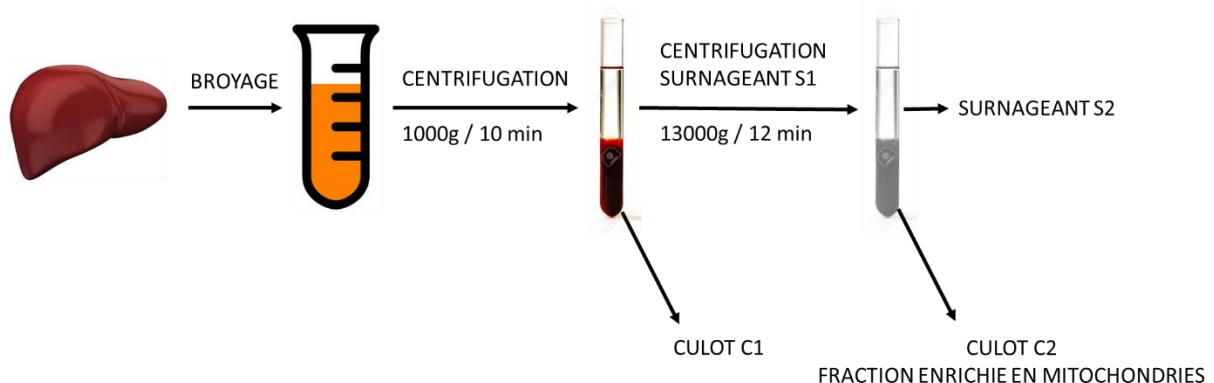
E. Jospin

TP - Etude du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM)

OBJECTIF : Au cours de ce TP, vous allez mettre en évidence quelques aspects du fonctionnement de la CRM. Vous mettrez en évidence le transfert d'électrons dans la chaîne grâce à un réactif de laboratoire, le DCPIP. Vous devrez notamment déterminer les conséquences de l'ajout de métabolites cellulaires sur l'activité de la CRM, et vous étudierez le mécanisme d'action d'un poison cellulaire, le malonate.

- Préparation d'une fraction enrichie en mitochondries

Matériel de départ : foie de rat. Le tissu est broyé, puis l'homogénat est centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu, noté S1, est centrifugé à 13000 g pendant 12 minutes. Le protocole de cette préparation est schématisé comme suit :



Q1 : Que contient le culot C1 obtenu lors de cette étape de centrifugation? Que contient le surnageant S1 ?

Q2 : Que contient le surnageant S2 ?

Le culot C2 obtenu contient une fraction enrichie en mitochondries. On souhaite faire éclater les mitochondries. Pour cela, on dispose de trois tampons : un tampon hypotonique, un tampon isotonique et un tampon hypertonique.

Q3 : Quel tampon utiliserez-vous pour faire éclater les mitochondries ? Justifier votre réponse.

Dans ces conditions, les mitochondries éclatent, libérant leurs enzymes dans le milieu et rendant les membranes internes accessibles. C'est cette fraction enrichie en mitochondries qui vous est distribuée.

Vous devez impérativement conserver les mitochondries dans la glace !!

Q4 : Pour les expériences de ce TP, pourquoi ne pourrait-on pas utiliser de mitochondries intactes ? Dans nos conditions expérimentales, pourrait-on observer de la synthèse d'ATP ? Pourquoi ?

- Molécules utilisées pendant ce TP

Référez-vous aux annexes 1 et 2.

Q5 : Que devient le $FADH_2$ formé par la réaction catalysée par la succinate DH ? (voir annexe 1)

Q6 : Que devient le NADH formé par les réactions rédox catalysées par les DH à NADH ? (voir annexe 1)

Q7 : Connaissant le potentiel rédox du DCPIP et les potentiels rédox des différents complexes de la CRM (cf. annexe 2), prévoir à quel niveau de la CRM le DCPIP peut capter des électrons. (voir annexe 1)

- Conditions réactionnelles

Vous disposez pour cette étude des différentes molécules présentées en annexe, d'une aliquote de la préparation de mitochondries décrite plus haut ainsi que de milieu réactionnel. Comme pour toute expérience scientifique, vous devez proposer deux témoins : un témoin positif et un témoin négatif. *NB : Le DCPIP est le réactif qui nous permettra de déterminer si la CRM est active ou non dans les différentes conditions expérimentales.*

Q8 : Que devez-vous mettre dans le témoin positif et le témoin négatif ? Notez la coloration obtenue dans ces deux cuves, et conclure sur l'état obtenu pour le DCPIP. Vous indiquerez également l'absorbance à 600 nm obtenue dans chacun des cas.

Pour la suite, pour chaque cuve réalisée, vous introduirez les différents éléments suivants dans cet ordre :

- 1) DCPIP
- 2) Milieu réactionnel
- 3) **SI NECESSAIRE, le malonate (seulement pour les expériences 3 et 4b)**
- 4) La préparation de mitochondries
- 5) Le (ou les) donneurs d'électrons.

Vous introduirez la cuve dans le spectrophotomètre dès que le mélange est finalisé et vous procéderez à l'acquisition de l'absorbance en fonction du temps avec le logiciel Datalyse. A chaque fois, vous déterminerez la pente de la partie linéaire de la courbe.

Expérience n°1

Dans une cuve spectrophotométrique, introduisez dans l'ordre :

- 100µL de DCPIP
- 390µL de milieu réactionnel

Introduire la cuve dans le spectrophotomètre, et noter la valeur de DO que vous appellerez DO initiale.

Ressortir la cuve du spectrophotomètre, et ajouter 10 µL de la préparation de mitochondrie. Homogénéiser par retournement, puis replacer la cuve dans le spectrophotomètre. Procéder à l'acquisition avec le logiciel Datalyse. Comme pour toutes les autres manipulations du TP, vous réglerez la longueur d'onde à 600 nm, l'intervalle de mesure à 1 seconde et le nombre maximal de mesure à 500. Lorsque vous obtenez un alignement des points qui vous semble satisfaisant, arrêtez la mesure et envoyez les données sur une feuille de calcul Excel pour analyse ultérieure. (Créez un dossier sur le bureau de l'ordinateur et enregistrez tous les fichiers dans ce dossier avec un titre informatif).

Q9 : Comment varie l'absorbance de la cuve au cours du temps ? Noter la valeur de DO initiale et la valeur de DO finale. Que vous indique ce résultat ? Déterminer le temps au bout duquel l'absorbance se stabilise (on le notera t_{stab}). Pourquoi l'absorbance finit-elle par se stabiliser ?

Expérience n°2

Préparez la même cuve que précédemment, en introduisant

- 1) **100 µL** de DCPIP
- 2) **380 µL** de milieu réactionnel
- 3) **10 µL** de préparation de mitochondrie

et attendez que le temps de stabilisation t_{stab} déterminé précédemment soit passé. Une fois que c'est le cas, ajoutez **10µL de succinate**. Homogénéisez et introduisez **immédiatement** dans le spectrophotomètre. Lancez l'acquisition comme décrit précédemment.

A la fin de la mesure, ressortez la cuve avec précaution du spectrophotomètre, et notez la répartition de couleur obtenue dans la cuve.

Q10 : Comment varie l'absorbance en fonction du temps dans cette condition expérimentale ? Qu'est-ce que ce résultat vous apprend sur le fonctionnement de la CRM en présence de succinate ? Déterminez dans Excel la pente de la courbe $A = f(t)$ obtenue dans sa partie linéaire. Reportez cette pente dans le tableau dédié de la feuille de réponse. Quelle est la signification de cette valeur ?

Expérience n°3

Préparez une nouvelle cuve avec **100 µL de DCPIP + 370 µL de milieu réactionnel + 10 µL de mitochondries**. Une fois le temps de stabilisation dépassé, ajoutez **10 µL de malonate (en respectant les conditions de sécurité)**. Homogénéisez la cuve et attendez une minute supplémentaire. Ajoutez enfin **10 µL de succinate**, homogénéisez puis lancez l'acquisition. Après une minute, ajoutez de nouveau **10 µL de succinate en laissant la cuve dans le spectrophotomètre et en laissant l'acquisition se dérouler**. Après une minute, **renouvelez cette opération**. Concernant le succinate, vous en aurez donc mis 3 x 10 µL.

Q11 : Comparez les résultats obtenus pour les premiers 10 µL de succinate de cette expérience avec les résultats de l'expérience n°2. Déduisez-en l'effet du malonate sur la CRM. Que se passe-t'il lorsque vous ajoutez de plus en plus de succinate. Quelle information supplémentaire cela vous donne-t'il sur le malonate et son effet sur la CRM ?

Expérience n°4

Préparez deux nouvelles cuves selon la même procédure, mais avec du NADH au lieu du succinate :

Cuve a :

- 100 μL de DCPIP + 370 μL de milieu réactionnel + 10 μL de mitochondries.
- Attendez t_{stab} .
- Ajoutez 10 μL de NADH et lancez **immédiatement** l'acquisition.

Cuve b :

- 100 μL de DCPIP + 360 μL de milieu réactionnel + 10 μL de mitochondries.
- Attendez t_{stab} et ajoutez 10 μL de malonate.
- Homogénéisez, attendez une minute et ajoutez 10 μL de NADH
- Lancez **immédiatement** l'acquisition.
- Après environ 1 minute, ajouter de nouveau 10 μL de malonate.

Q12 : Quel est l'effet du NADH sur la CRM ? Le malonate a-t-il un effet dans cette expérience ? Qu'en déduisez vous concernant le site d'action du malonate dans la CRM (quel complexe ?) ?

Expérience n°5

Préparez la cuve suivante :

- 100 μL de DCPIP + 380 μL de milieu réactionnel + 10 μL de mitochondries.
- Attendez t_{stab} .
- Introduisez dans la cuve 10 μL de succinate. Homogénéisez et lancez l'acquisition.
- Laissez le système évoluer pendant environ 30 secondes, puis introduisez 10 μL de NADH.
- Laissez le système évoluer pendant deux minutes supplémentaires.

Q13 : Déterminez les pentes obtenues pour le succinate seul (expérience n°2), pour le NADH seul (expérience n°4a) et pour l'effet combiné des deux molécules (expérience n°5). Que constatez vous ?

Expérience n°6

Préparez la cuve suivante :

- 100 μL de DCPIP + 380 μL de milieu réactionnel + 10 μL de mitochondries.
- Attendez t_{stab} .
- Introduisez dans la cuve 10 μL de pyruvate. Homogénéisez et lancez l'acquisition.

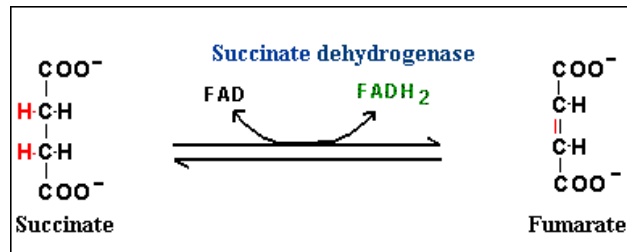
Q14 : Connaissant le devenir du pyruvate dans la mitochondrie, le résultat observé correspond-il à ce qu'on pouvait attendre ? Proposez au moins une hypothèse permettant d'expliquer le résultat de l'expérience n°6.

Q15 : BILAN : A la lumière de ces différents résultats et de vos connaissances, expliquez (i) comment le succinate et le NADH peuvent avoir un effet sur l'état d'oxydation du DCPIP (rappelez pour cela les grands principes de fonctionnement de la CRM) et (ii) quel est l'effet du malonate sur la CRM (mécanisme et site de fixation).

ANNEXE 1 : Molécules utilisées pendant ce TP

① Le succinate

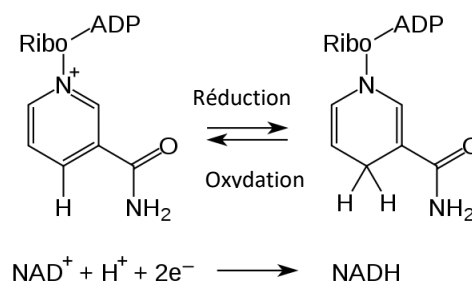
C'est un métabolite du cycle de Krebs. Au cours de ce cycle, le succinate est oxydé en fumarate par une succinate deshydrogénase dont le coenzyme rédox est le couple FAD/FADH₂.



Q4 : Que devient le FADH₂ formé par cette réaction ?

② Le NADH

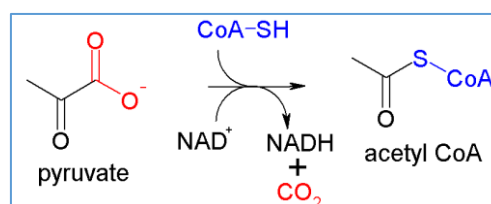
Le NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) est un coenzyme de nombreuses deshydrogénases du cytoplasme et de la matrice mitochondriale. Le coenzyme sous forme oxydée (NAD⁺) fixe réversiblement un proton H⁺ et deux électrons sur le noyau nicotinamide pour donner la forme réduite du couple (NADH).



Q5 : Que devient le NADH formé par les réactions rédox catalysées par les DH à NAD ?

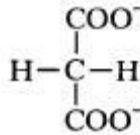
③ Le pyruvate

C'est un métabolite de la glycolyse obtenu grâce à la dernière réaction de la voie catalysée par la pyruvate kinase. En conditions aérobies, le pyruvate pénètre ensuite dans la glycolyse où il est décarboxylé pour donner de l'acétyl-CoA (réaction catalysée par la pyruvate DH).



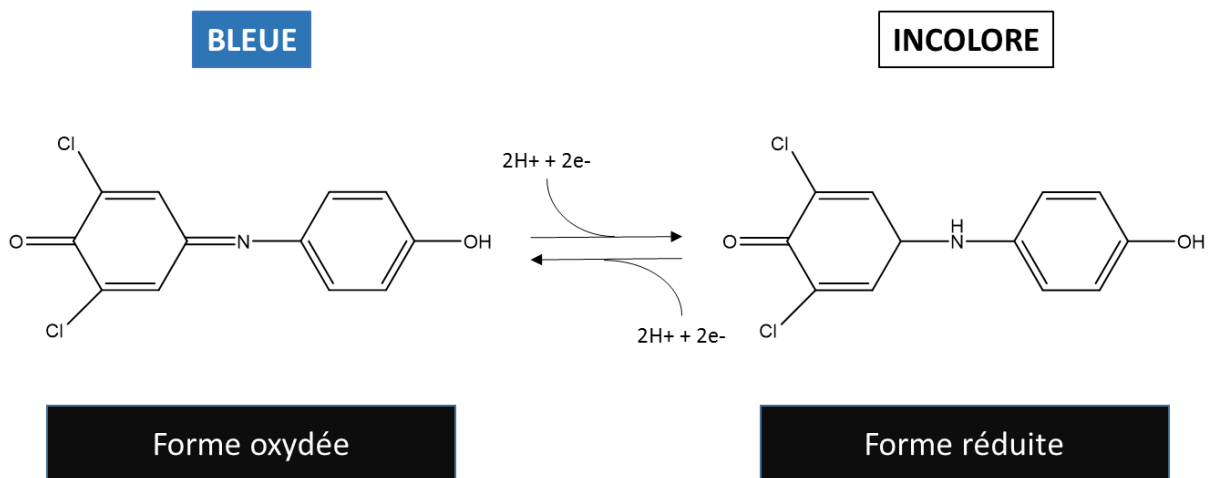
③ Le malonate

Le malonate (ou acide propanedioïque) a été découvert et identifié en 1858 à partir de produits d'oxydation de jus de pomme. Cette molécule et ses dérivés sont utilisés dans un certain nombre de synthèses chimiques industrielles, comme la synthèse des barbituriques (molécules sédatives, anesthésiques, anti-convulsivantes...). Le malonate est également un poison cellulaire qui affecte le cycle de Krebs et la CRM.



④ Le DCPIP (2,6-dichlorophénol indophénol)

C'est un **réactif de laboratoire** qui peut agir comme un accepteur d'électrons, il peut donc exister à l'état réduit ou oxydé. Le DCPIP à l'état oxydé est de couleur bleue, il présente une forte absorbance à 600 nm et peut capter des électrons et des hydrogènes. A l'état réduit, le DCPIP est incolore (et donc n'absorbe pas la lumière). Le potentiel rédox du couple est $E^\circ = +0,22\text{V}$.



Q6 : Connaissant le potentiel rédox du DCPIP et les potentiels rédox des différents complexes de la CRM (cf. annexe 2), prévoir à quel niveau de la CRM le DCPIP peut capter des électrons.

⑤ Le disulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

C'est un réducteur chimique puissant. Il réduit donc toute molécule rédox mise à son contact.

ANNEXE 2 : Potentiels rédox des couples de la CRM

Les composants de la chaîne respiratoire ont des potentiels rédox croissants, donc le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire est un processus exergonique (donc spontané).

Couple rédox	E° (V)
NAD ⁺ /NADH	-0,32
FAD/FADH ₂	-0,2
Complexe I	-0,30
Complexe II	0
Ubiquinone	0,05
Complexe III	0,08 → 0,22
Cytochrome c	0,22
Complexe IV	0,29 → 0,35
O ₂ /H ₂ O	0,82