

OXYGRAPHIE – MUSCLE (30°C)

Réactifs nécessaires (pour une chambre d'oxygraphie de 0,5 ml) :

- **suspension de mitochondries de muscle** : calculer le volume nécessaire pour avoir 0,1 mg de protéines dans la chambre à chaque mesure (soit une concentration finale dans la chambre de **0,2mg/ml**).

- **milieu de respiration** (prévoir 15 ml) : mettre directement dans la chambre d'oxygraphie : 0,5 ml de tampon de respiration + 5µl de BSA délipidée à 15 % + 5 µl de Pi à 1 M.

└ Pour la préparation du tampon respiration, voir le document "**Solutions mitochondries (Foie - Muscle)**".

- **substrats respiratoires :**

- Glutamate 0,5 M/Malate 0,25 M
- Succinate 0,5 M
- Malate 0,25 M
- Octanoyl-Carnitine 50 mM
- Palmitoyl-Carnitine 20 mM
- Proline 1M
- Glycérol-3-Phosphate 1 M
- Ascorbate 0,2 M
- TMPD 25 mM/Ascorbate 10 mM
- ADP 0,1 M et ADP 0,05 M

- **inhibiteurs :**

- Roténone 2 mM
- Oligomycine 0,5 mg/ml
- Antimycine A 1 mM
- 2,4 DiNitroPhénol (DNP) 50 mM

Tous les substrats et inhibiteurs sont à stocker à -20°C. Le jour de l'expérimentation, les conserver dans la glace, à l'exception du DNP.

Le milieu de respiration est maintenu à 30°C, dans le bain-marie.

1/ Mesure de l'activité de la chaîne respiratoire en présence de substrats du complexe I :

Mettre dans la chambre :

- 0,5 ml de milieu de respiration + 5 µl de BSA 15 % + 5 µl de Pi à 1 M
- les mitochondries (cf = 0,2 mg/ml)
- 5,8 µl de Glutamate 0,5 M/Malate 0,25 M (cf = Glutamate 5,5 mM/
Malate 2,5 mM)
- puis passer au point 6

2/ Mesure de l'activité de la chaîne respiratoire en présence de substrats du complexe II :

Mettre dans la chambre :

- 0,5 ml de milieu de respiration + 5 µl de BSA 15 % + 5 µl de Pi à 1 M
- les mitochondries (cf = 0,2 mg/ml)
- 5,2 µl de Succinate 0,5 M (cf = 5,5 mM)
- 0,75 µl de roténone 2 mM (cf = 2,5 µM) pour inhiber le complexe I
- puis passer au point 6

3/ Mesure de l'activité de la chaîne respiratoire en présence de substrats des complexes I et II :

Mettre dans la chambre :

- 0,5 ml de milieu de respiration + 5 µl de BSA 15 % + 5 µl de Pi à 1 M
- les mitochondries (cf = 0,2 mg/ml)
- 5,8 µl de Glutamate 0,5 M/Malate 0,25 M (cf = Glutamate 5,5 mM/
Malate 2,5 mM)
- 5,2 µl de Succinate 0,5 M (cf = 5,5 mM)
- Ne pas mettre de roténone !!** (sinon, on inhibe le complexe I)
- puis passer au point 6

4/ Mesure de l'activité de la chaîne respiratoire en présence de substrats lipidiques à chaîne courte (Octanoyl-carnitine) des complexes I et II :

Mettre dans la chambre :

- 0,5 ml de milieu de respiration + 10 µl de BSA 15 % + 5 µl de Pi à 1 M
- les mitochondries (cf = 0,2 mg/ml)
- 5,3 µl de Malate 0,25 M (cf = 1 mM)
- Attendre 1 min
- 1,2 µl d'Octanoyl-Carnitine 50 mM (cf = 100 µM)
- Ne pas mettre de roténone !!** (sinon, on inhibe le complexe I)
- puis passer au point 6

5/ Mesure de l'activité de la chaîne respiratoire en présence de substrats lipidiques à chaîne longue (Palmitoyl-Carnitine) des complexes I et II :

Mettre dans la chambre :

- 0,5 ml de milieu de respiration + 5 µl de BSA 15 % + 5 µl de Pi à 1 M
- les mitochondries (cf = 0,2 mg/ml)
- 5,3 µl de Malate 0,25 M (cf = 1 mM)
- Attendre 1 min
- 1,5 µl de Palmitoyl-Carnitine 20 mM (cf = 55 µM)

Ne pas mettre de roténone !! (sinon, on inhibe le complexe I)

- puis passer au point 6

6/ Mode opératoire pour une mesure :

Pour chaque mesure :

- Enregistrer la consommation d'oxygène pendant 3 à 4 min en présence du substrat seul
- Ajouter 5,3 µl d'ADP 0,1 M (cf = 1 mM)
- Enregistrer la consommation d'oxygène pendant un temps suffisant pour permettre la mesure d'une pente
- Ajouter 0,5 µl d'Oligomycine 0,5 mg/ml (inhibiteur de l'ATP synthase)
- Enregistrer la consommation d'oxygène pendant un temps suffisant pour permettre la mesure d'une pente
- Ajouter 0,8 µl de DNP 50 mM (cf = 75 µM, permet d'avoir une idée de la respiration maximale avec un substrat donné)

Variante : pour le cas où l'on veuille mesurer le rapport ADP/O

- Ajouter 3,2 µl d'ADP 0,05 M (cf = 300 µM) au lieu de 5,3 µl et attendre que celui-ci soit totalement consommé (retour à l'état 4, voir schéma)
- Enregistrer la consommation d'oxygène pendant un temps suffisant pour permettre la mesure d'une pente
- Ajouter l'Oligomycine et poursuivre comme ci-dessus

7/ Mesure de l'activité de la cytochrome oxydase :

Mettre dans la chambre :

- 0,5 ml de milieu de respiration + 5 µl de BSA 15 % + 5 µl de Pi à 1 M
- les mitochondries (cf = 0,2 mg/ml)
- Ajouter 0,8 µl d'Antimycine A 1 mM (cf = 1,5 µM)
- Attendre 1 min
- Ajouter 6,65 µl d'Ascorbate 0,2 M (cf = 2,5 mM)
- Attendre 1 min
- Ajouter 10,5 µl de TMPD 25 mM/Ascorbate 10 mM (cf TMPD = 0,5 mM)
- Ajouter 0,8 µl de DNP 50 mM (cf = 75 µM)
- Enregistrer la consommation d'oxygène pendant un temps suffisant pour permettre la mesure d'une pente.

8/ Mesure de l'activité de la Glycérol-3-Phosphate deshydrogénase mitochondriale :

Mettre dans la chambre :

- 0,5 ml de milieu de respiration + 5 µl de BSA 15 % + 5 µl de Pi à 1 M
- les mitochondries (correspondant à une **quantité de 1 mg**)
- 0,75 µl de roténone 2 mM (cf = 2,5 µM)
- Ajouter 2,6 µl de Glycérol-3-Phosphate 1 M (cf = 5 mM)
- Enregistrer la consommation d'oxygène pendant un temps suffisant pour permettre la mesure d'une pente.
- Ajouter 0,8 µl d'Antimycine A 1mM (cf = 1,5 µM)
- Enregistrer la consommation d'oxygène pendant un temps suffisant pour permettre la mesure d'une pente.

Le calcul de l'activité de la glycérol-3-phosphate deshydrogénase mitochondriale se fait par la mesure de la différence :
JO₂ en absence d'Antimycine A – JO₂ en présence d'Antimycine A

