

Effets d'une déprivation en dioxygène sur la chaîne respiratoire mitochondriale

Introduction

La conversion d'énergie est fondamentale pour tout être vivant. Elle se fait généralement par la production d'ATP, dont l'hydrolyse permet d'effectuer de nombreux processus nécessaires mais exigeants en énergie. Pour ce faire, les cellules eucaryotes ont deux possibilités : la fermentation et la respiration. Or, la seconde est bien plus efficace que la première : pour chaque molécule de glucose oxydée la respiration produit jusqu'à 36 molécules d'ATP, alors que la fermentation lactique n'en engendre que 2 (voir **figure 1**).

La respiration ne peut avoir lieu sans la mitochondrie. Cet organite, situé dans chaque cellule eucaryote, est doté d'une double membrane définissant une matrice et un espace inter-membranaire.

Dans le cytoplasme se déroule la glycolyse, engendrant pour chaque molécule de glucose oxydée 4 ATP, 2 NADH et 2 pyruvates. Les deux pyruvates sont emmenés dans la matrice mitochondriale où ils seront convertis en 2 NADH, 4 CO₂ et 2 Acétyl-CoA qui, à travers le cycle de Krebs, engendreront 2 GTP, 2 CO₂, 6 NADH et 2 FADH₂. C'est là qu'intervient la chaîne respiratoire. Elle comporte 4 complexes de protéines, dits complexes I, II, III et IV. Les NADH transmettent un électron au complexe I, qui va à son tour le transmettre aux complexes III et IV ; le complexe IV termine la réaction en transmettant ses électrons à des molécules de dioxygène ($4e^- + O_2 + 4H^+ = 2H_2O$). Le FADH₂, lui, transmet un électron au complexe II, qui comme le complexe I cédera ses électrons au complexe III qui les cédera ensuite au complexe IV. Les complexes I, III et IV se servent de l'énergie produite lorsqu'ils sont oxydés pour faire passer des protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire, créant un gradient allant dans le sens de la matrice. Enfin, l'ATP synthase laisse passer les protons dans le sens de leur gradient, et utilise l'énergie engendrée par ce flux pour transformer l'ADP en ATP. Au total, pour les 8 NADH la chaîne respiratoire produira $8 \times 3 = 24$ ATP et, pour les 2 FADH₂, $2 \times 2 = 4$ ATP. Parmi les 4 ATP produits lors de la glycolyse deux sont hydrolysés pour faire entrer les pyruvates et NADH dans la matrice : au total, pour chaque molécule de glucose, $24 + 8 + 2 = 36$ ATP sont produits (voir **figure 1**).

Notre objectif est de montrer comment l'absence de dioxygène bloque la chaîne respiratoire. Pour cela nous avons mesuré l'évolution du degré de réduction des cytochromes C. Cette protéine a pour rôle le transfert d'électrons du complexe III vers le complexe IV. Lors du fonctionnement normal de la mitochondrie, elle est donc réduite par le complexe III et oxydée par le complexe IV. Or, sous sa forme réduite, cette protéine absorbe la lumière à 550 nm : ainsi, son passage de la forme oxydée à la forme réduite est visible par spectrophotométrie. En présence de dioxygène les deux formes coexistent, les cytochromes C réduits étant par la suite oxydés ; en l'absence de ce gaz, les électrons s'accumulent tout au long de la chaîne respiratoire, faisant qu'à terme tous ses composés dont les cytochromes C sont complètement réduits. D'où le fait qu'une fraction mitochondriale dont la chaîne respiratoire est déprivée en dioxygène ait une absorbance à 550 nm supérieure à une autre ayant accès à ce gaz : plus de cytochromes C réduits signifie plus d'absorbance à 550 nm (voir **figure 2**).

Méthodes

Pour étudier les mitochondries il est nécessaire de les purifier à partir des cellules les contenant. Ici nous avons prélevé de la chair de pommes de terres (épluchée, car les cellules de peau sont mortes donc ne contiennent pas de mitochondries fonctionnelles). Une fois la chair obtenue nous l'avons mixée en

présence d'un tampon de broyage. Ce dernier permet de lyser les cellules sans détruire les mitochondries : d'une concentration en saccharose égale à celle de la mitochondrie mais inférieure à celle du cytoplasme, il crée un gradient faisant éclater la membrane plasmique, libérant ainsi lesdits organites. Nous avons filtré le liquide obtenu afin d'éviter d'inclure des débris non-mixés. Nous avons ensuite isolé les mitochondries grâce à 4 centrifugations différentielles (voir **figure 3**) :

- dans les 2 premières (2 centrifugations de 15 minutes à 4 500 rpm), nous avons éliminé les culots, composés d'éléments plus lourds que les mitochondries (noyaux, débris de membranes, etc) et avons gardé le surnageant, contenant les mitochondries et les éléments plus légers que les mitochondries
- dans les 2 suivantes (2 centrifugations de 20 minutes à 10 000 rpm), nous avons éliminé le surnageant, composé d'éléments plus légers que les mitochondries.

Enfin, tout au long de nos manipulations nous avons fait en sorte de réduire l'activité des protéases, enzymes susceptibles de dégrader les protéines présentes dans la solution. D'abord, en maintenant le plus possible les solutions dans la glace, pour ralentir leur activité ; ensuite, en effectuant les centrifugations à basse température. Nous avons également inclus dans le tampon de broyage des cystéines et des protéines BSA, dans le but de détourner l'activité des protéases (elles s'attaqueront à ces composés plutôt qu'aux protéines de la chaîne respiratoire).

Une fois les mitochondries isolées, nous les avons suspendues dans deux cuves de spectrophotométrie. L'objectif est de fournir tous les éléments nécessaires à la chaîne respiratoire, de dépriver les mitochondries d'une des cuves de dioxygène et de pouvoir observer la réduction des cytochromes C.

Dans chaque cuve nous avons utilisé du succinate de sodium pour fournir en électrons la chaîne respiratoire. Ce composé est capable de réduire le complexe II, qui transmettra ses électrons aux complexes III et IV comme cela se serait passé avec du FADH_2 . Également, du tampon phosphate maintenant un pH physiologique et permettant l'activité de la chaîne respiratoire, et du cytochrome C oxydé (peu visible à 550 nm). Nous avons fait le blanc avec une solution incluant tous ces éléments à l'exception du succinate, ainsi que de la fraction mitochondriale, pour ne pas que le spectrophotomètre prenne en compte l'absorbance de la fraction mitochondriale sans que la chaîne respiratoire ne fonctionne. Dans une des cuves destinée à la mesure de la réduction du cytochrome C, nous nous avons mis du cyanure : ce poison empêche la cytochrome-oxydase de fournir le complexe IV dioxygène, en s'y fixant à la place dudit gaz. Nous avons mis la fraction mitochondriale dans les cuves de spectrophotométrie juste avant la mesure, pour éviter que la chaîne respiratoire ne réduise trop de cytochrome C avant nos mesures.

Résultats et discussion

Suite aux mesures de l'absorbance dans nos cuves, nous avons obtenu les courbes exposées dans la **figure 4**. La courbe rouge correspond au cas où la fraction mitochondriale est mise en présence de cyanure ; la courbe bleue, au cas où elle a accès à du dioxygène.

La courbe bleue, d'abord, subit un léger déclin tout au long de la mesure. Lors d'une première phase (entre 0 et 2 minutes après la mesure), l'absorbance de la solution passe de 0,08 à 0,055 ; lors d'une seconde phase, elle reste quasiment stable, la légère baisse d'absorbance s'expliquant par la sédimentation d'une partie des cytochromes C réduits (ils sont plus lourds que l'eau donc ont tendance à précipiter vers le fond). La courbe rouge, elle, montre une très forte augmentation de l'absorbance de la solution : en deux minutes, elle passe de 0,15 à 0,8. Passé cette phase, on observe un léger déclin de cette absorbance, qui là encore s'explique par la sédimentation d'une partie des cytochromes C réduits.

Ces résultats correspondent bien à nos attentes. Quand les mitochondries sont déprivées en dioxygène, le complexe IV ne peut plus fonctionner : les électrons s'y accumulent, le réduisant complètement. Si il n'y a plus de complexe IV oxydé, il ne peut plus y avoir de réduction du cytochrome C : l'activité succinate-cytochrome-C-réductase n'a plus lieu. Ainsi les cytochromes C oxydés ajoutés dans la cuve sont complètement réduits par le complexe III, qui une fois que les cytochromes C sont complètement réduits ne peut plus être oxydés... Ainsi, tous les composants de la chaîne respiratoire seront réduits, bloquant les

réactions d'oxydo-réduction nécessaires à la création du gradient de protons servant à la formation d'ATP.

En comparaison, l'absorbance de la solution ne contenant pas de cyanure reste relativement stable : les cytochromes C oxydés étant dans la solution sont partiellement réduits par le complexe III, puis oxydés à nouveau par le complexe IV.

Lors de l'expérience, mes camarades et moi avons mal mélangé le contenu de la solution sans cyanure, engendrant une trop forte absorbance (la fraction mitochondriale était bien plus concentrée au centre du tube) ; nous l'avons sorti pour mieux la mélanger en agitant le tube, et l'avons remis rapidement dans la cuve pour éviter une dégradation des protéines de la chaîne respiratoire par les protéases. C'est sans doute de là que vient la phase de déclin de l'absorbance lors des deux premières minutes, les éléments étant encore concentrés au centre quand la mesure a commencé. Cela explique également qu'on n'observe pas d'augmentation de l'absorbance au début de la mesure, les protéines mitochondriales ayant déjà eu le temps de réduire les cytochromes C.

Un autre élément surprenant de nos résultats est la rapidité de l'oxydation des cytochromes C dans la solution contenant du cyanure, d'autres binômes ayant vu leur absorbance atteindre son maximum en 4 minutes : c'est peut être le signe que nous avons obtenu une forte concentration en mitochondries, qui pourraient réduire plus vite le même nombre de cytochromes.

Un point important est la durée de la réaction. En l'absence de dioxygène la chaîne respiratoire est bloquée en quelques minutes : si la mitochondrie n'est pas alimentée en dioxygène, en quelques minutes elle se retrouvera dans l'incapacité de produire de l'ATP car sans cet accepteur final des électrons, les électrons s'accumulent tout au long de la chaîne respiratoire, rendant impossible les réaction d'oxydo-réduction permettant aux complexes I, III et IV de créer le gradient de protons nécessaire à la formation d'ATP.

Pour les cellules aérobies facultatives, comme les nôtres, le dioxygène a pour principale fonction le maintien de la chaîne respiratoire. Certaines cellules eucaryotes, comme les levures ou nos cellules musculaires, peuvent s'en passer et produire leur ATP via la fermentation.

Dès lors, comment expliquer que nous sommes incapables de vivre sans dioxygène plus de quelques minutes ? Si nos cellules pouvaient se passer de la respiration alors il nous serait peut être possible de rester en apnée plusieurs heures, à supposer que nous tolérons suffisamment l'acide lactique, les arrêts cardiaques ne demanderaient pas une prise en charge aussi rapide que dans la réalité et le cyanure ne serait peut être pas un poison mortel.

La raison pour laquelle le dioxygène nous est indispensable, est sûrement le fait que certaines cellules de notre organisme doivent consommer de très grandes quantités d'ATP pour survivre, ce qui implique de respirer en permanence. Si de telles cellules sont vitales pour l'organisme, alors si elles ne sont pas alimentées en dioxygène leur mort surviendrait en quelques minutes en raison d'un manque d'ATP, et l'organisme s'éteindrait peu après. Les neurones sont probablement dans ce cas de figure : alors qu'ils ne représentent que 2% de la masse corporelle, ils consomment jusqu'à 20% de son énergie (source : <http://www.pnas.org/content/99/16/10237>). Ce qui explique que, lors d'un arrêt cardiaque de plusieurs minutes, les conséquences sur le cerveau peuvent être graves : sans circulation sanguine pour l'alimenter en oxygène, ses cellules ne peuvent plus pratiquer la respiration.

Conclusion

Ainsi, la mitochondrie est essentielle à bien des égards, et ses dysfonctionnements sont à l'origine d'un grand nombre de pathologies. Elle explique pourquoi la respiration nous est si importante, et permet aux eucaryotes une utilisation plus efficace des ressources alimentaires.

L'étude de cet organite est donc essentielle. Mais nos connaissances actuelles de la mitochondrie sont incomplètes : elle comporte de nombreux éléments mystérieux. Par exemple certains cristaux de substances minérales, dont le rôle est inconnu ; ou encore, la façon dont elle s'est développée au sein des cellules eucaryotes.