

## Dosage des complexes I + III (NADH cytochrome C oxydo-réductase)

### Principe :

- Les complexes I et III de la chaîne respiratoire permettent l'oxydation du NADH en NAD<sup>+</sup>, et transfèrent les électrons au cytochrome c. Cette activité est évaluée par l'augmentation de l'absorbance du cytochrome c réduit à 550 nm.
- L'activité parallèle, non respiratoire, d'oxydation du NADH est insensible à la roténone, inhibiteur spécifique du complexe I. Elle est mesurée par un dosage parallèle en présence de roténone. La partie spécifique, respiratoire, de l'activité NADH cytochrome c oxydo-réductase est mesurée par la différence entre l'activité totale et celle résistante à la roténone.
- L'oxydation du cytochrome c réduit par le complexe IV est inhibée par le cyanure de potassium (KCN).

### En pratique :

- 6 déterminations (5 patients et 1 contrôle) peuvent être effectuées au cours d'une même série, soit 12 dosages.
- Composition du milieu de réaction :
  - 200 µM NADH
  - 100 µM cytochrome c
  - 50 mM K Phosphate pH 7,5
  - 1,0 mg/ml d'albumine bovine
  - 1 mM KCN
  - Tissu : 40 µg de protéines (surnageant post-nucléaire (foie ou muscle) ou suspension cellulaire) ou 4 µg de mitochondries isolées
  - Inhibition par 12,5 µM roténone.

- Préparation du milieu de réaction :

1) Dans un tube de 50 ml, préparer le mélange pour effectuer 7 dosages soit 14 cuves :

Réactifs	Quantité globale	Quantité/échantillon
500 mM K Phosphate pH 7,5	1540 µL	220 µL
50 mg/ml BSA	308 µL	44 µL
10 mM KCN	1540 µL	220 µL
1 mM cytochrome c	1540 µL	220 µL
H <sub>2</sub> O	8624 µL	1232 µL

2) Dans une cuvette de 2 ml, mettre **1936 µL du milieu de réaction et ajouter 44 µL d'homogénat tissulaire** (préparé à une concentration finale de protéines de 2 mg/ml) **ou de mitochondries de cœur de bœuf** (diluées à 0.2 mg/mL soit 1/200). Mélanger.

3) Transférer **900 µL** du mélange dans chacune de 2 cuves de 1 ml qui seront analysées en parallèle.

4) Ajouter **5 µl de 2,5 mM roténone dans l'une des cuves de 1 mL**, mélanger.

- Réaction :

1) Lecture au spectrophotomètre, 37°C, longueur d'onde 550 nm. Calibration initiale de la lecture sur l'air.

2) Incuber les cuves à **37°C, durant 5 min**, dans le spectrophotomètre thermostaté

3) Démarrer la réaction avec **100 µl de 2 mM NADH gardé à température ambiante**.

4) Lecture toutes les **15 secondes durant 3 minutes**,

Les 2 cuvettes correspondant au même échantillon sont lues en même temps. On peut lire 4 cuvettes en même temps. Si la croissance est trop rapide (non linéaire), refaire le dosage avec moins de tissu.

- Calcul :

1) L'activité spécifique est calculée et rendue en nanomoles/min/mg de protéines.

2) Le coefficient d'extinction utilisé pour le cytochrome c est  **$\epsilon = 18,5$**

3) Le facteur de correction est donc 1351,4 pour 40 µg de protéines dans l'essai (homogénat) et 13514 pour 4 µg de protéines dans l'essai (mitochondries isolées).