

Une cellule eucaryote qui possède des mitochondries est capable de réaliser la respiration. Cette dernière se traduit par une consommation de glucose et d'O<sub>2</sub>, et un rejet de CO<sub>2</sub>.

### Travail de réflexion (15 minutes) :

**Montrer** que la respiration se produit en plusieurs étapes, et que celles-ci sont couplées à la synthèse d'énergie (ATP).

*En premier lieu, on veut déterminer quel est le substrat utilisé par les mitochondries, ce qui nous permettra déjà de proposer une conclusion partielle. Pour cela, on va isoler des mitochondries.*

### Matériel à votre disposition :

- chou fleur
- PC, interface ExAO, sonde à O<sub>2</sub>, logiciel Datastudio, bioréacteur et agitateur magnétique
- Solution de tampon phosphate à pH = 7,4 et solution de pyruvate de sodium à 20 % tamponnée à pH = 7,4
- Mortier réfrigéré et pilon, bécher, entonnoir et support, gaze, pipette 20 mL et propipette

### Expériences réalisables (45 min) :

#### Isolement des mitochondries.

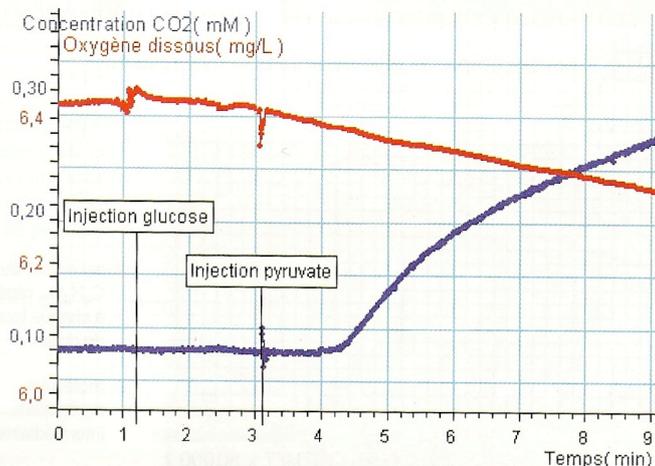
- **Couper** suffisamment de fleurs en petits morceaux dans un verre de montre ;
- Les **mettre** dans le mortier réfrigéré et **ajouter** 10 mL de solution tampon phosphate pH 7,4
- **Broyer** pendant une minute sans sable pour faire éclater les cellules végétales
- **Ajouter** 20 mL de la même solution tampon, puis **broyer** à nouveau 30 s
- **Filtrer** au dessus d'un bécher sur 4 à 5 épaisseur de gaze

On obtient ainsi une suspension (impure) de mitochondries en ayant éliminé un maximum de débris cellulaires.

#### Mesures par ExAO :

- **Verser** xx mL de la suspension de mitochondries dans le bioréacteur (suffisamment pour éviter la présence d'air lorsque le bouchon contenant la sonde O<sub>2</sub> sera placé)
- **Lancer** l'agitation (comme d'habitude, **régler** pour que l'agitateur ne tourne pas trop vite)
- **Introduire** la sonde à O<sub>2</sub> dans le bouchon 2 trous, **placer** le bouchon en vérifiant l'absence de bulles d'air (**rajouter** de la suspension dans le cas contraire).
- **Laisser** la sonde s'équilibrer quelques minutes puis lancer la mesure.
- Au temps t = 1 mn, **injecter** 0,2 mL de glucose 0,1 M
- Au temps t = 2 mn, **injecter** 0,2 mL de pyruvate à 20 g.L<sup>-1</sup> tamponné à pH 7,4 (repères sur le graphique).

**Résultat :** analyse graphique complète et comparaison à l'ExAO sur les levures (cellules entières).



### Rôle des mitochondries dans le processus de respiration cellulaire.

© Spécialité SVT Bordas 2012

### Documents complémentaires : les différentes phases de la respiration.

Quelques informations pour les deux expériences ci-dessous.

Certains traitements permettent d'isoler les différentes fractions de la mitochondrie. Ces dernières sont placées en présence de pyruvate et/ou d'O<sub>2</sub> et la présence de CO<sub>2</sub> est recherchée.

Certains composés absorbent différemment les longueurs d'onde selon qu'ils sont à l'état oxydé ou réduit. Ainsi, R'H<sub>2</sub> absorbe les longueurs d'onde à 350 nm alors que R' ne les absorbe pas.

La réduction de composés R' en R'H<sub>2</sub> est recherchée en incubant différentes substances impliquées dans la respiration et en suivant l'absorbance à 350 nm.

L'oxydation du pyruvate en CO<sub>2</sub> est due à un ensemble de réactions d'oxydoréduction formant une suite cyclique de réactions appelées cycle de Krebs.

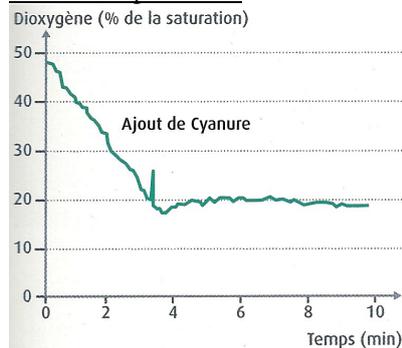
Structure étudiée	Ajout de pyruvate	Ajout de pyruvate et de O <sub>2</sub>
Membrane externe	Pas de CO <sub>2</sub> produit	Pas de CO <sub>2</sub> produit
Membrane interne	Pas de CO <sub>2</sub> produit	Pas de CO <sub>2</sub> produit
Matrice	Dégagement de CO <sub>2</sub>	Dégagement de CO <sub>2</sub>

Étude du dégagement de CO<sub>2</sub> par les différentes fractions mitochondriales. © Spécialité SVT Nathan 2012

Solutions testées	Absorbance à 350 nm
Composé oxydé R'	0
Composé réduit R'H <sub>2</sub>	0,35
Protéines de la matrice + R'	0
Protéines de la matrice + glucose + R'	0
Protéines de la matrice + pyruvate + R'	0,25

Mesures de l'absorbance à 350 nm de différentes solutions. © Spécialité SVT Nathan 2012

D'autres expériences.



La membrane interne des mitochondries contient des complexes d'oxydoréduction formant une chaîne respiratoire.

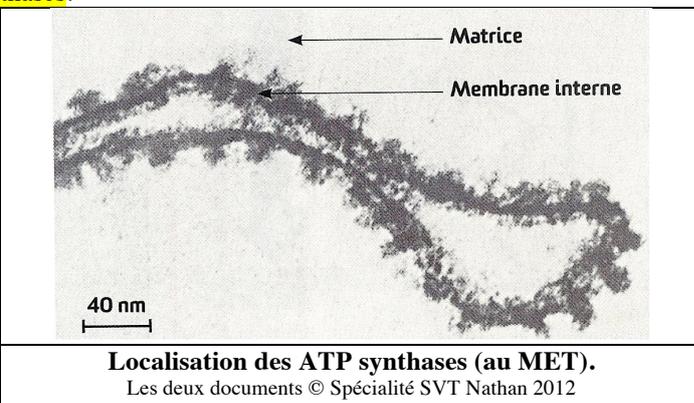
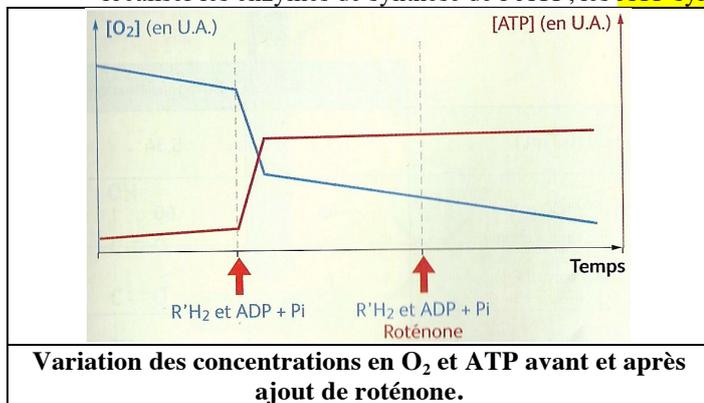
**Action du cyanure sur la consommation d'O<sub>2</sub>.**

Spécialité SVT Belin 2012

Le cyanure est un poison qui bloque le transfert des électrons au sein de la chaîne respiratoire. Son effet sur la consommation d'O<sub>2</sub> par des levures est analysé.

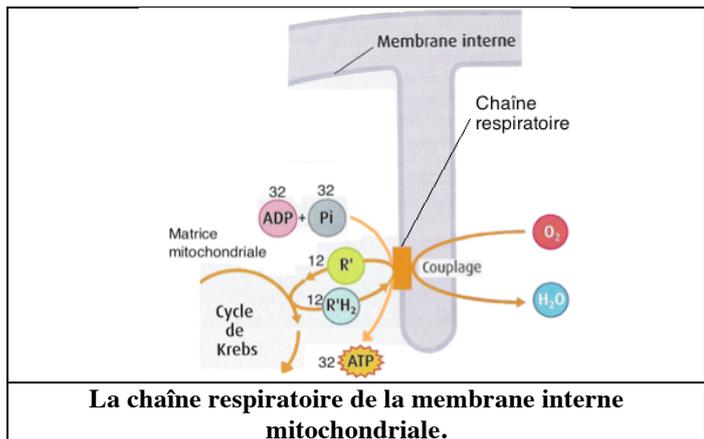
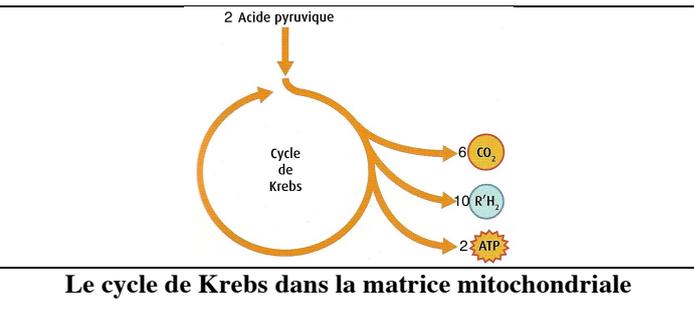
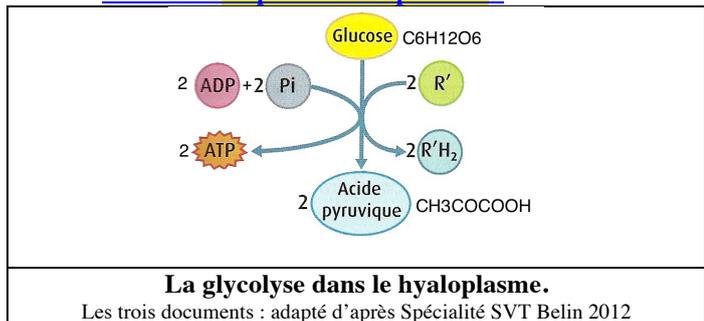
Des suspensions de mitochondries sont placées avec des composés réduits R'H<sub>2</sub> et en présence ou non de roténone, un inhibiteur des complexes d'oxydoréduction. La production d'ATP et la consommation d'O<sub>2</sub> sont suivies au cours de l'expérience.

Par ailleurs une observation microscopique de la membrane interne des mitochondries permet de localiser les enzymes de synthèse de l'ATP, les ATP synthases.



**Production :** analyser chaque expérience. **Montrer**, au fur et à mesure, en quoi elle répond à la problématique.

**Bilan : les étapes de la respiration :**



**Calcul du rendement de la respiration :**  
 Calcul du rendement :  
 Sachant que l'oxydation complète du glucose libère 2840 kJ.mol<sup>-1</sup> utilisable, que le CO<sub>2</sub> ne contient plus d'énergie chimique utilisable et que la synthèse d'une mole d'ATP consomme environ 30 kJ.mol<sup>-1</sup>, **calculer** le rendement énergétique de la respiration.  
**Proposer** un schéma de synthèse montrant, dans le cadre d'une cellule eucaryote, les différentes étapes de la respiration cellulaire. En prenant en compte la glycolyse, **calculer** le nombre de molécules d'ATP formées lors de la dégradation d'une molécule de glucose par respiration.