

Une cellule eucaryote qui possède des mitochondries est capable de réaliser la respiration. Cette dernière se traduit par une consommation de glucose et d'O₂, et un rejet de CO₂.

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 O₂, 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.

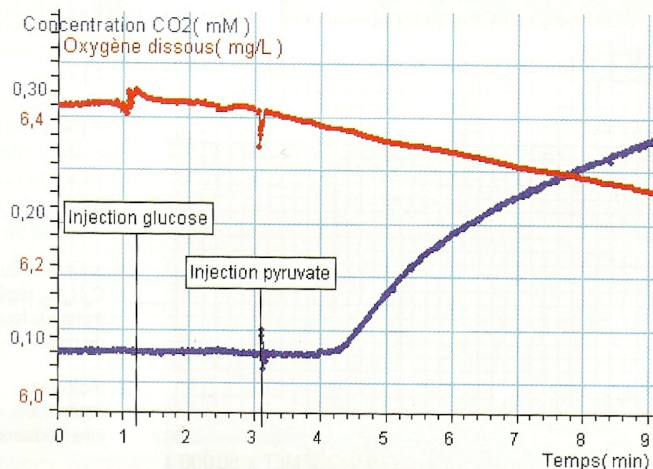
- **Couper** suffisamment de fleurs en petits morceaux dans un verre de montre ;
- Les **mettre** dans le mortier réfrigéré et **ajouter** 10 mL de solution tampon phosphate pH 7,4
- **Broyer** pendant une minute sans sable pour faire éclater les cellules végétales
- **Ajouter** 20 mL de la même solution 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 O₂ sera placé)
- **Lancer** l'agitation (comme d'habitude, **régler** pour que l'agitateur ne tourne pas trop vite)
- **Introduire** la sonde à O₂ 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⁻¹ 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'O₂ et la présence de CO₂ est recherchée.

Certains composés absorbent différemment les longueurs d'onde selon qu'ils sont à l'état oxydé ou réduit. Ainsi, R'H₂ absorbe les longueurs d'onde à 350 nm alors que R' ne les absorbe pas.

La réduction de composés R' en R'H₂ est recherchée en incubant différentes substances impliquées dans la respiration et en suivant l'absorbance à 350 nm.

L'oxydation du pyruvate en CO₂ est due à un ensemble de réactions d'oxydoréduction formant une suite cyclique de réactions appelées cycle de Krebs.

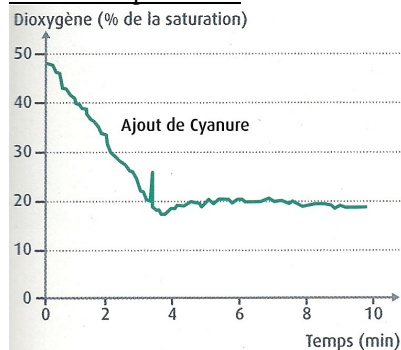
Structure étudiée	Ajout de pyruvate	Ajout de pyruvate et de O ₂
Membrane externe	Pas de CO ₂ produit	Pas de CO ₂ produit
Membrane interne	Pas de CO ₂ produit	Pas de CO ₂ produit
Matrice	Dégagement de CO ₂	Dégagement de CO ₂

Étude du dégagement de CO₂ par les différentes fractions mitochondriales. © Spécialité SVT Nathan 2012

Solutions testées	Absorbance à 350 nm
Composé oxydé R'	0
Composé réduit R'H ₂	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.

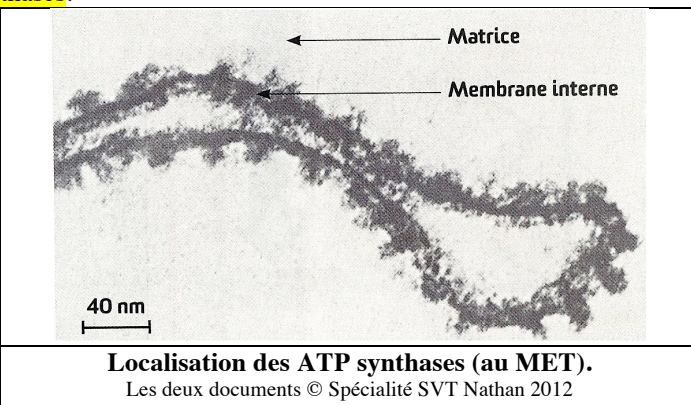
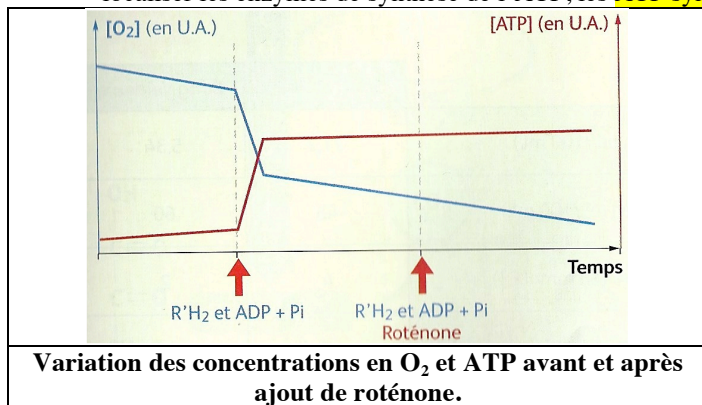
Action du cyanure sur la consommation d'O₂. ©

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'O₂ par des levures est analysé.

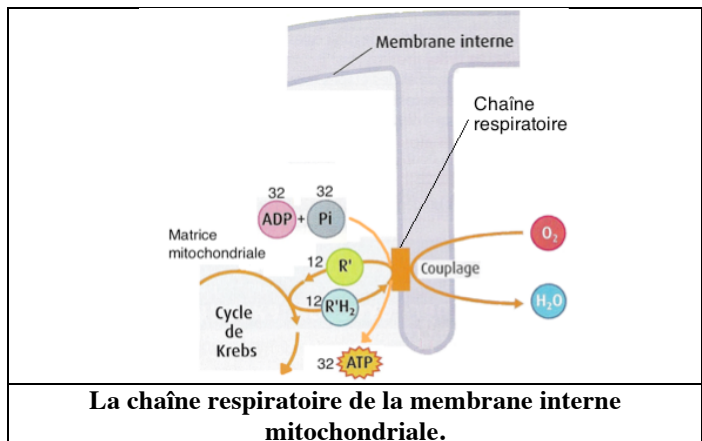
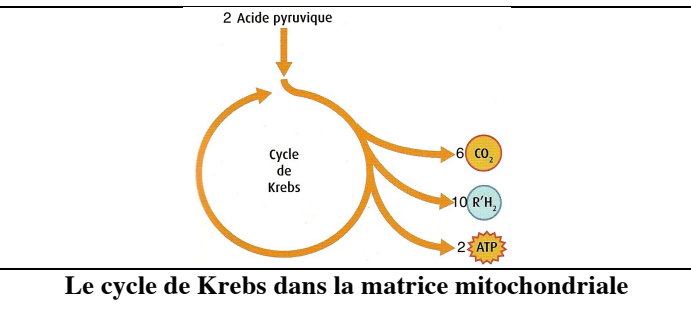
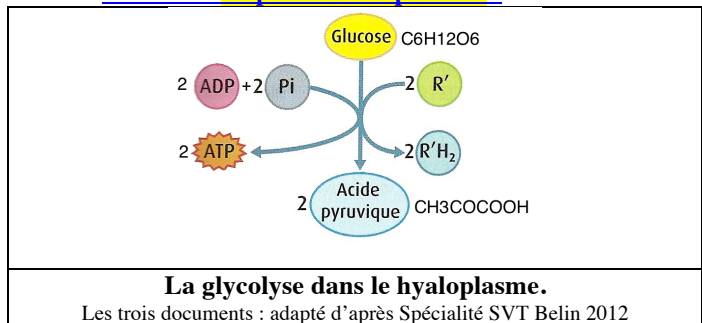
Des suspensions de mitochondries sont placées avec des composés réduits R'H₂ et en présence ou non de roténone, un inhibiteur des complexes d'oxydoréduction. La production d'ATP et la consommation d'O₂ sont suivies au cours de l'expérience.

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⁻¹ utilisable, que le CO₂ ne contient plus d'énergie chimique utilisable et que la synthèse d'une mole d'ATP consomme environ 30 kJ.mol⁻¹, **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.