

Chapitre II Respiration et fermentations cellulaires

- I - Les cellules respirent



■ DISPOSITIF ET PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

- Des levures sont cultivées depuis 24 h dans un **milieu minéral**, oxygéné grâce à un bulleur.
- Le matériel à utiliser est constitué d'un dispositif d'ExAO, avec sondes mesurant les concentrations en dioxygène et dioxyde de carbone dans le milieu. On dispose également d'une solution de glucose que l'on peut injecter à tout moment dans le milieu.

Les levures (*photographie ci-contre*) sont des organismes unicellulaires appartenant au groupe des **mycètes** (champignons). Ce sont des cellules non chlorophylliennes, qui vivent grâce aux échanges réalisés avec le milieu dans lequel elles se trouvent.

On se propose de mettre en évidence, à l'échelle cellulaire, les échanges gazeux caractéristiques de la respiration. On cherche également à montrer que ces échanges gazeux sont dépendants de la mise à disposition des cellules d'un nutriment organique.

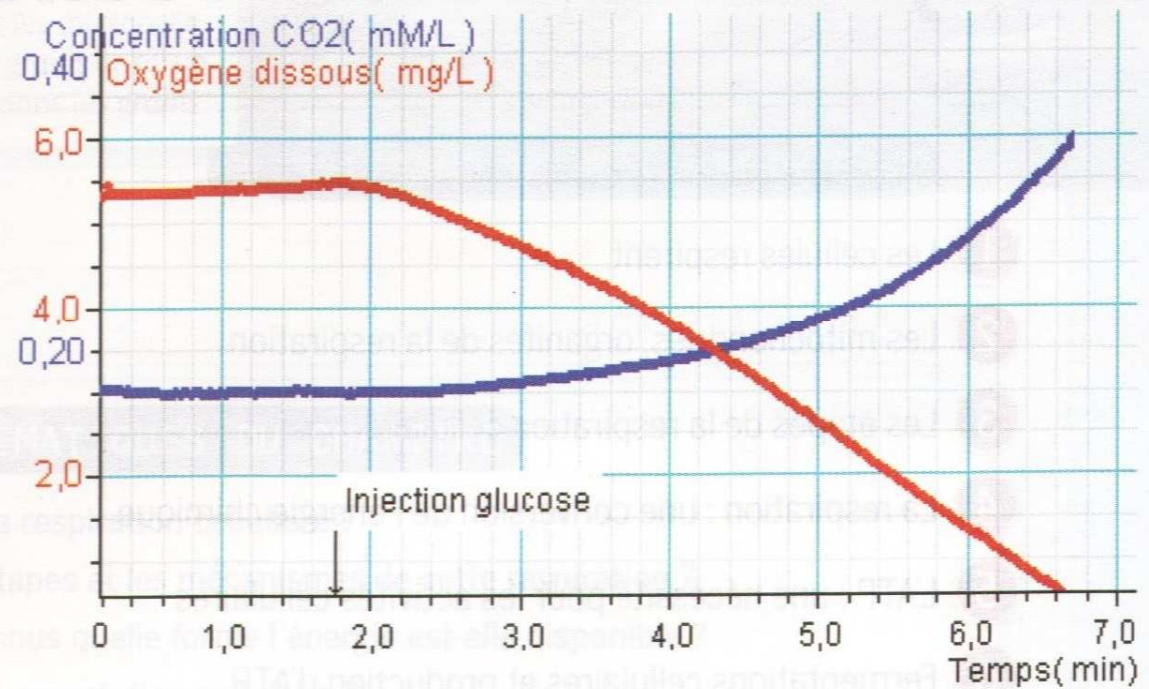


■ EXEMPLE DE RÉSULTAT OBTENU

Le graphique ci-contre montre l'évolution, au cours du temps, des concentrations en dioxygène et en dioxyde de carbone du milieu dans lequel sont cultivées des levures.

Le milieu est agité en permanence mais l'enceinte contenant la suspension de levures est fermée, de telle sorte qu'il n'y a plus d'échanges entre le milieu de culture et l'air ambiant.

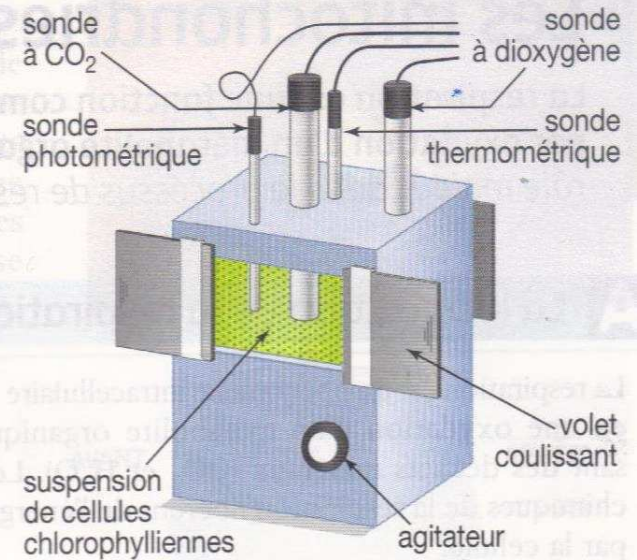
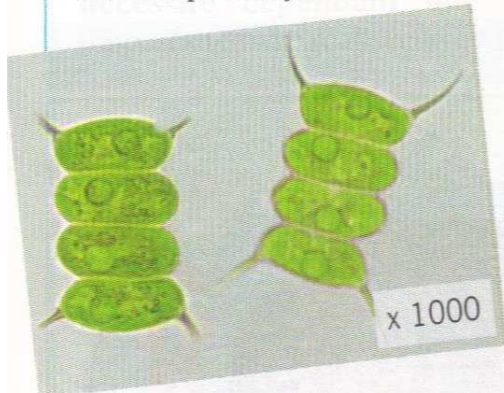
Après 1 min 45 s de mesure, on a injecté dans le milieu 0,2 mL d'une solution de glucose à 20 %.



■ DISPOSITIF ET PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Une étude similaire peut être réalisée avec des cellules **chlorophylliennes**.

Cependant, il est ici nécessaire d'effectuer des mesures à la lumière d'une part, à l'obscurité d'autre part, pour s'affranchir alors des échanges gazeux liés à la photosynthèse.



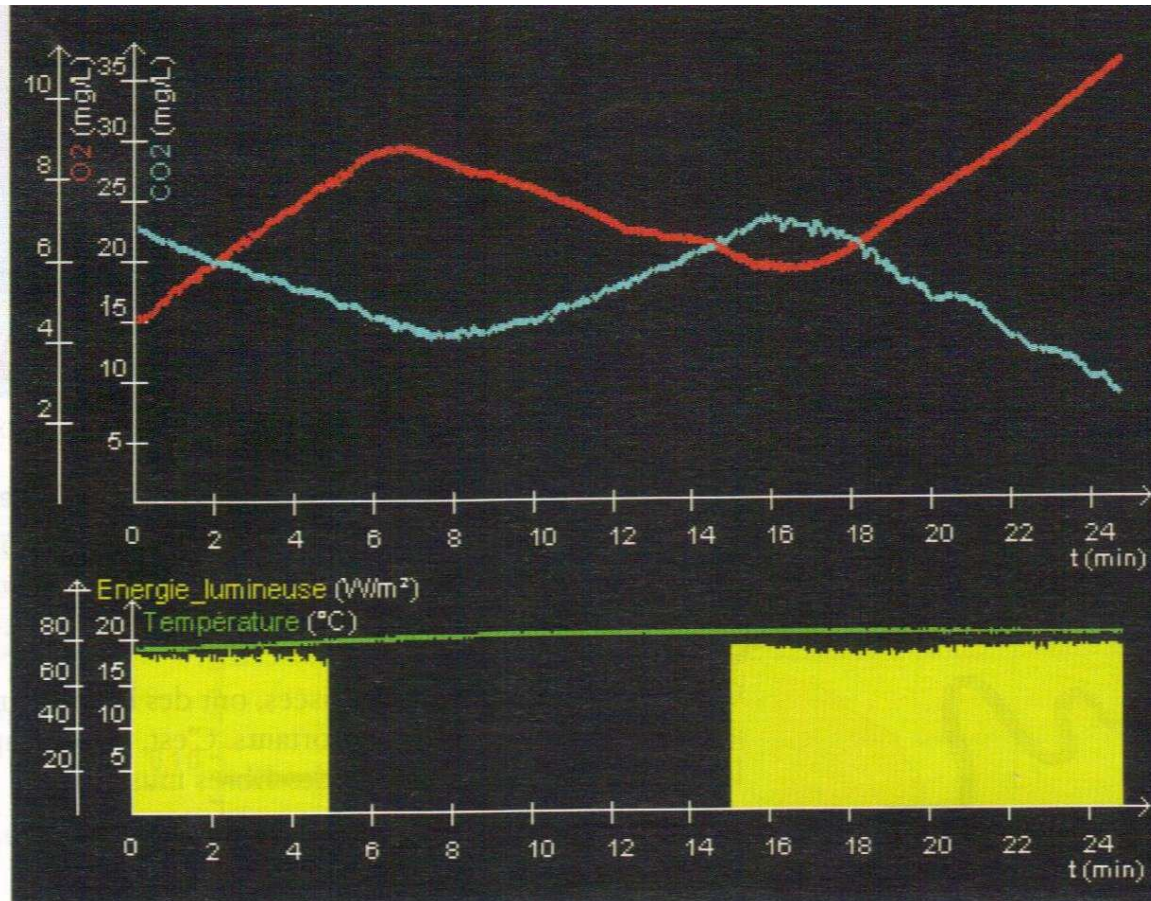
Les échanges gazeux entre les cellules chlorophylliennes et leur milieu

■ EXEMPLE DE RÉSULTAT

Le graphique ci-contre a été obtenu en plaçant dans le bioréacteur une suspension de cellules chlorophylliennes de *Scenedesmus* (photographie ci-dessus) et en mesurant divers paramètres :

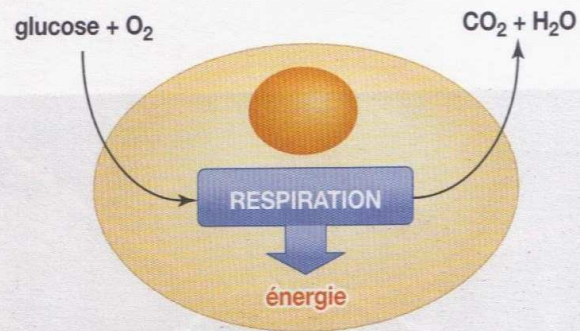
- concentration en dioxygène ;
- concentration en dioxyde de carbone ;
- intensité lumineuse ;
- température.

- De $t = 0$ à $t = 5$ min et de $t = 15$ min à $t = 25$ min, la suspension est éclairée.
- De $t = 5$ min à $t = 15$ min, la suspension est à l'obscurité (fermeture des volets placés devant le bioréacteur).

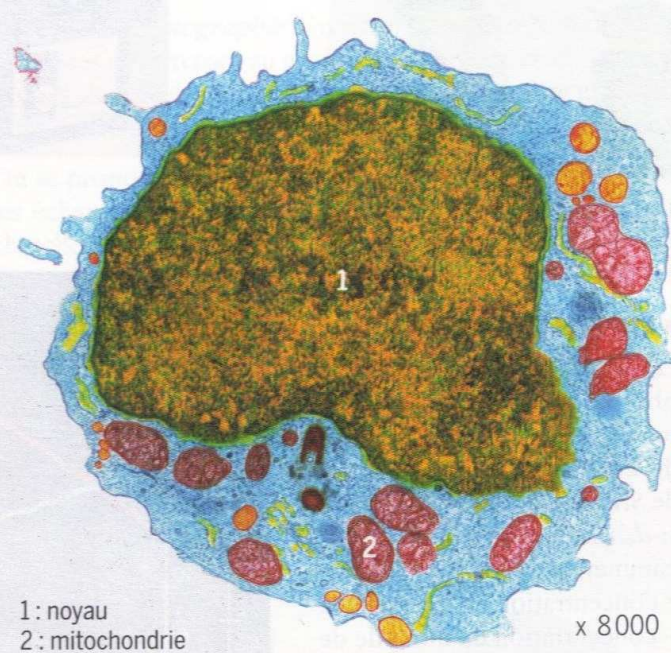


- II - Les mitochondries, organites de la respiration

La respiration est un phénomène intracellulaire qui consiste en une oxydation d'un métabolite organique, produisant des déchets minéraux (CO_2 et H_2O). Les réactions chimiques de la respiration libèrent de l'énergie utilisable par la cellule.



Dans toute cellule **eucaryote** (donc aussi bien chez les animaux que chez les plantes ou les **mycètes**), on peut observer au microscope électronique des **mitochondries**, petits organites plus ou moins nombreux noyés dans le cytoplasme.

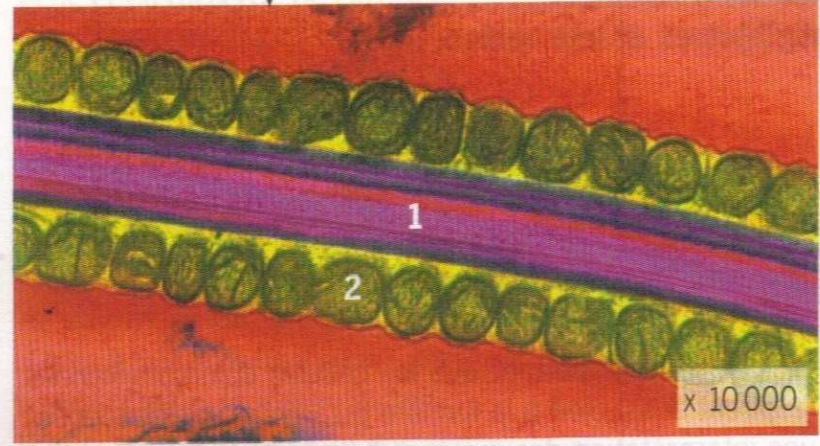
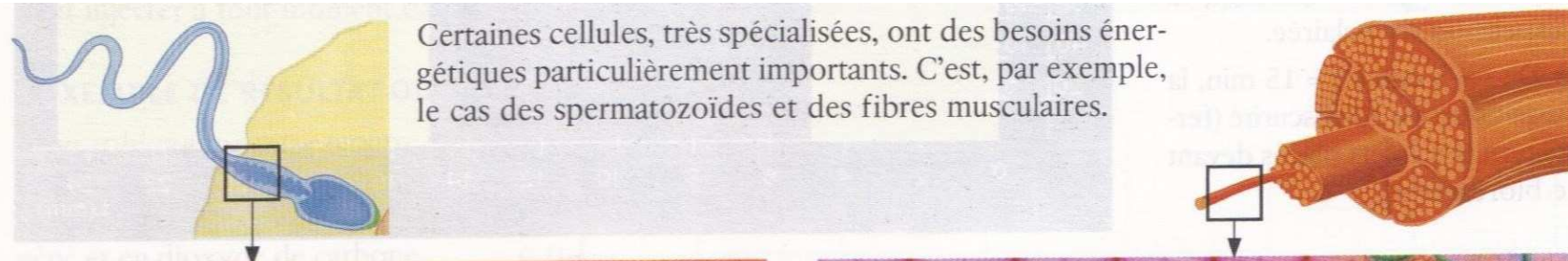


1: noyau
2: mitochondrie

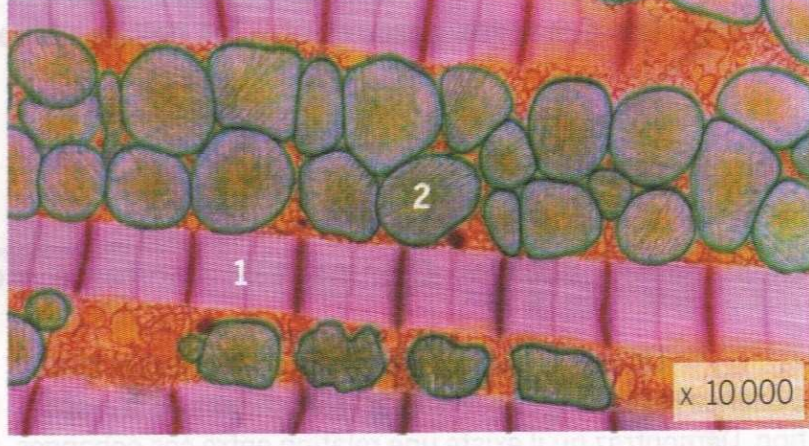
Lymphocyte humain observé au **MET**

Doc. 1 La respiration : une oxydation de métabolites organiques.

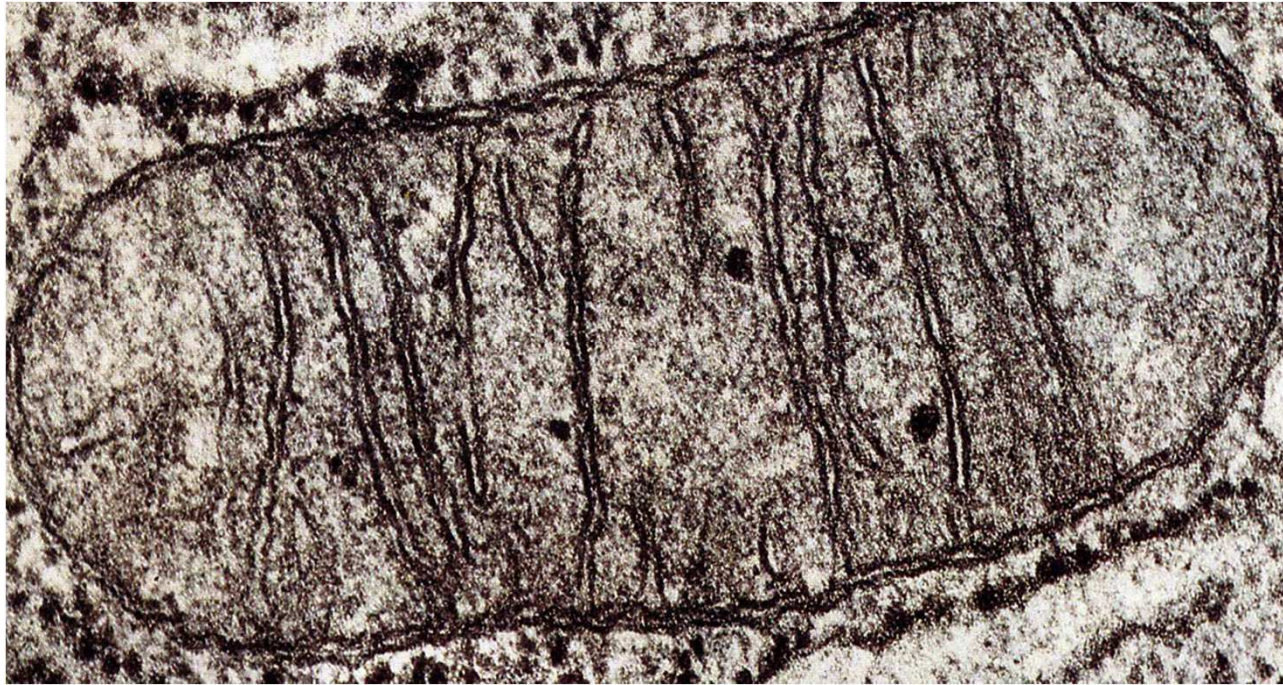
Des cellules aux besoins énergétiques particulièrement importants



a Portion du cytoplasme d'un spermatozoïde
1 : fibrilles flexibles du flagelle
2 : mitochondrie



b Portion du cytoplasme d'une fibre musculaire
1 : élément contractile de la fibre musculaire
2 : mitochondrie



Mitochondrie observée au MET (x 45000)

Schéma d'une mitochondrie

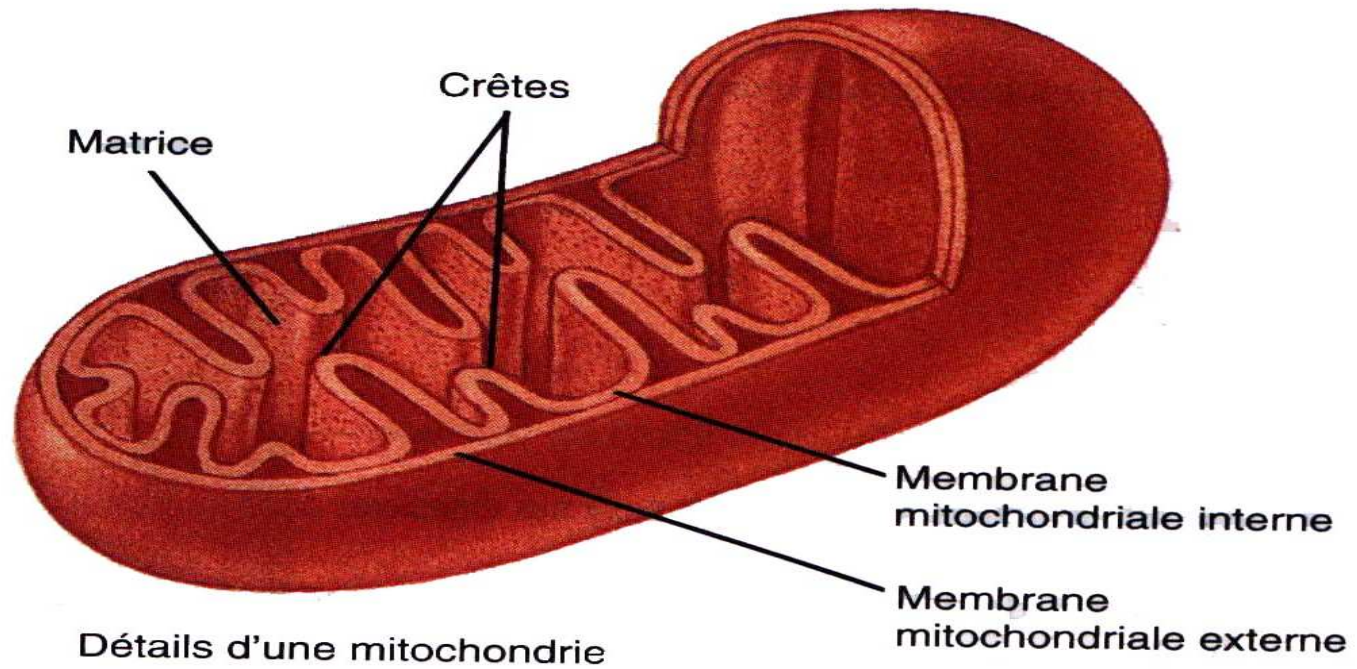
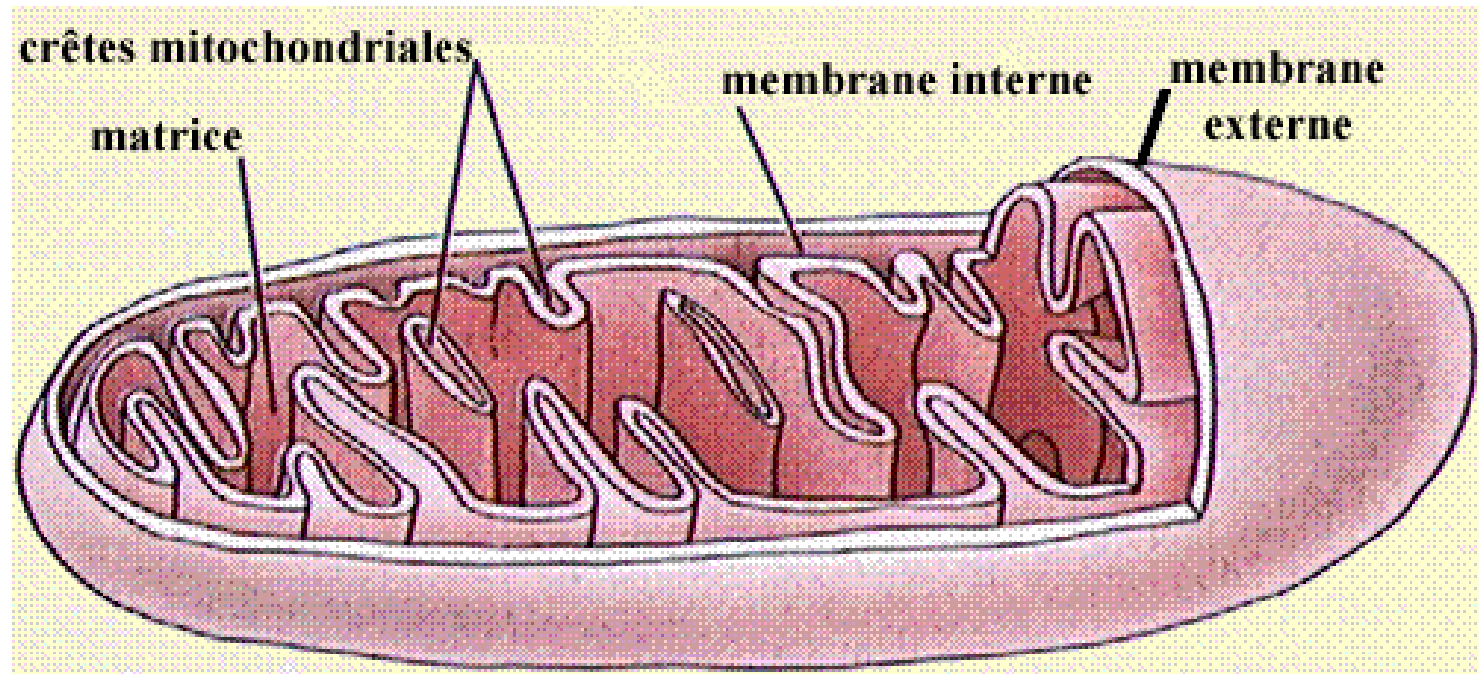


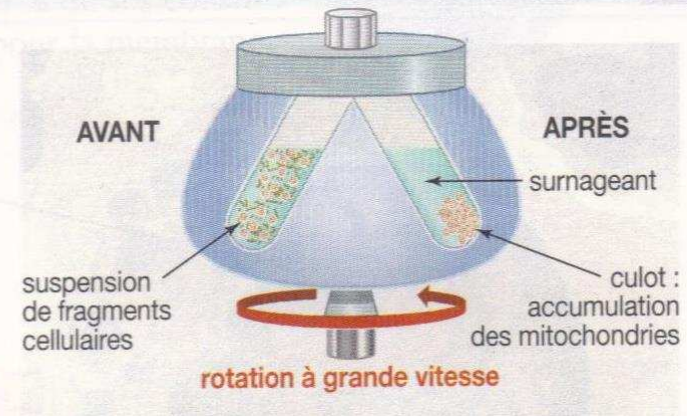
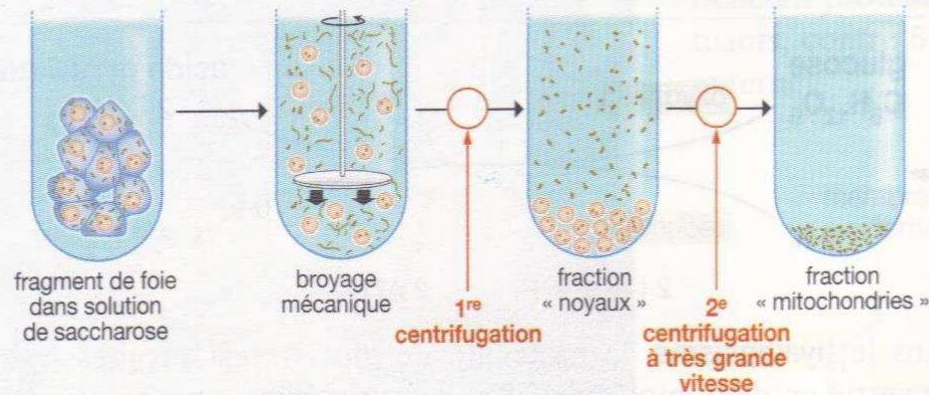
Schéma d'une mitochondrie



Préparation d'une suspension riche en mitochondries

Pour étudier le rôle des mitochondries, il est nécessaire de les isoler. Pour cela, on utilise des cellules particulièrement riches en mitochondries, par exemple des cellules du foie.

Les cellules subissent d'abord un broyage mécanique modéré afin de libérer les constituants sans trop les léser. Le broyat est ensuite centrifugé : la rotation à grande vitesse des tubes contenant les extraits cellulaires permet de séparer les constituants cellulaires et d'obtenir une fraction riche en mitochondries. L'isolement réel des mitochondries nécessite cependant une centrifugation à très grande vitesse (imparfaitement réalisée avec une centrifugeuse de lycée).



Mise en évidence du rôle des mitochondries dans le processus de respiration cellulaire

■ UNE HYPOTHÈSE À ÉPROUVER

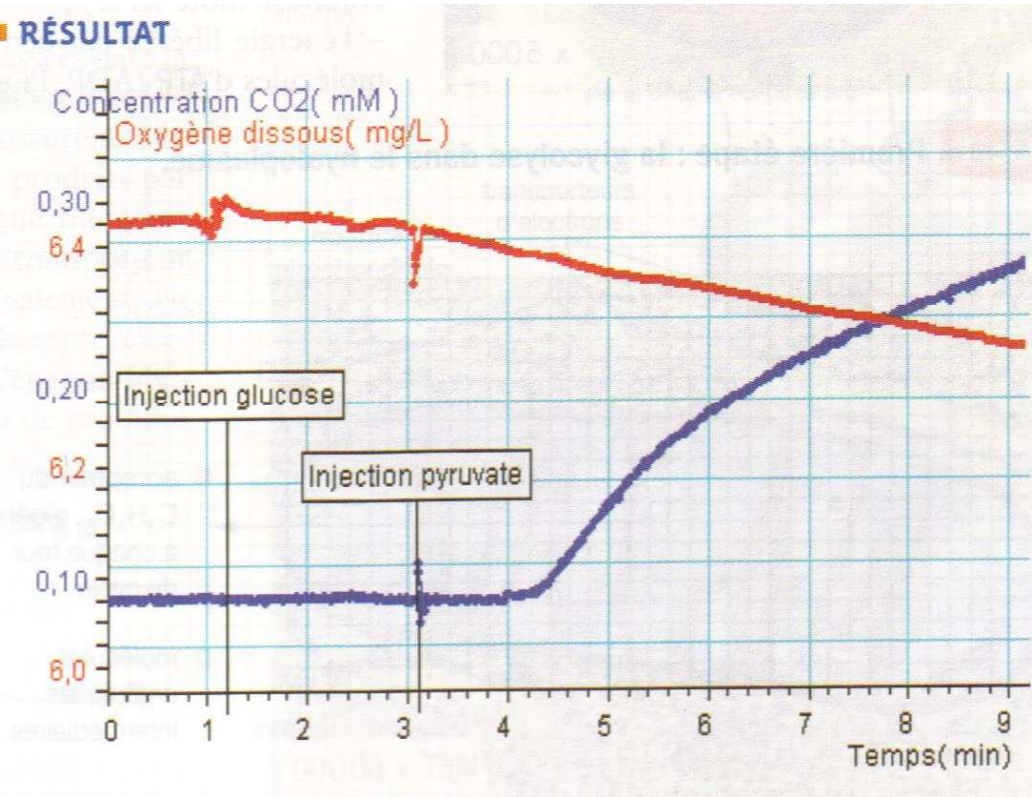
Différentes études et observations suggèrent que la respiration se déroule dans les mitochondries mais qu'une première étape se produit dans le cytoplasme, en dehors des mitochondries.

Cette première étape consisterait en une scission (et une déshydrogénation) du glucose ($C_6H_{12}O_6$) en deux molécules d'acide pyruvique ($C_3H_4O_3$).

Pour éprouver cette hypothèse, on prépare un extrait contenant des mitochondries isolées et on mesure les concentrations en dioxygène et en dioxyde de carbone de cette suspension.

Remarque : Le pyruvate est la forme ionique de l'acide pyruvique.

■ RÉSULTAT



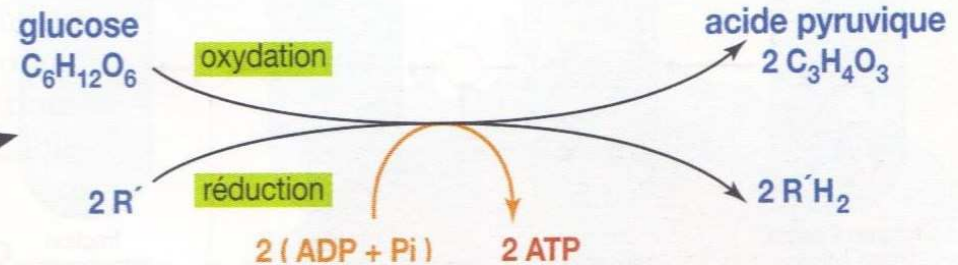
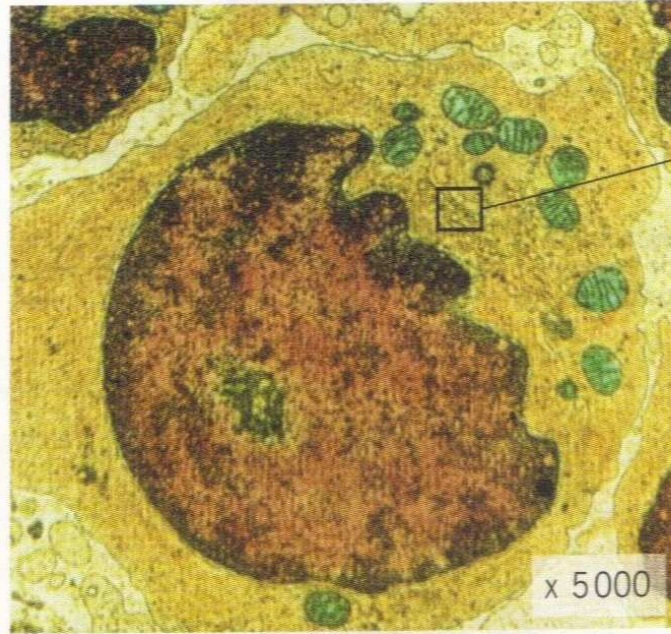
Conclusion

Les mitochondries sont donc bien les organites dans lesquels s'effectue l'essentiel de la respiration cellulaire.

Cependant, les mitochondries ne peuvent utiliser directement le glucose : il faut au préalable que celui-ci soit transformé en acide pyruvique.

Les mitochondries consomment alors du dioxygène pour oxyder l'acide pyruvique et rejettent du dioxyde de carbone, déchet de cette activité respiratoire.

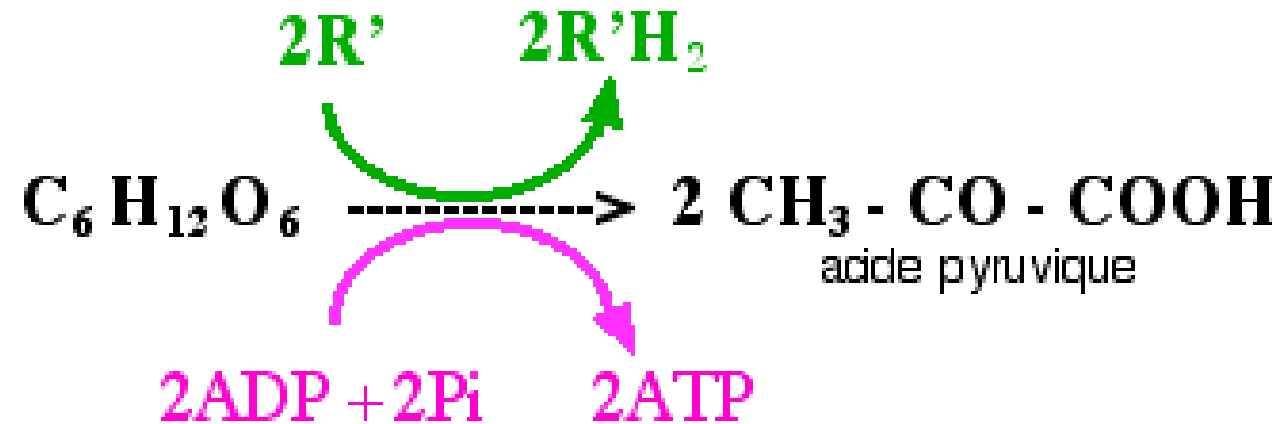
Première étape : la glycolyse dans le hyaloplasme



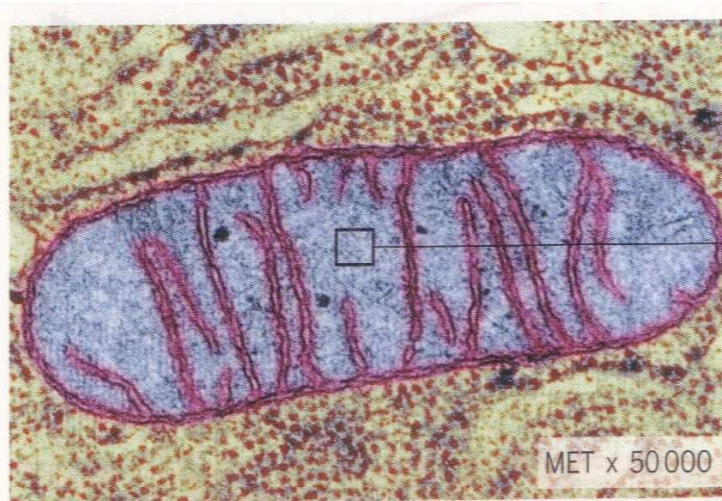
Dans le **hyaloplasme**, la molécule de glucose est progressivement convertie en deux molécules d'acide pyruvique : cette succession de réactions chimiques s'appelle la **glycolyse**. Globalement, deux événements importants se produisent :

- le glucose est oxydé en acide pyruvique grâce à la réduction d'un composé (noté ici R') ;
- l'énergie libérée par cette oxydation permet la synthèse de deux molécules d'**ATP** (ADP, Pi et ATP sont présentés *page 40*).

1ère étape : la glycolyse dans le cytoplasme de la cellule

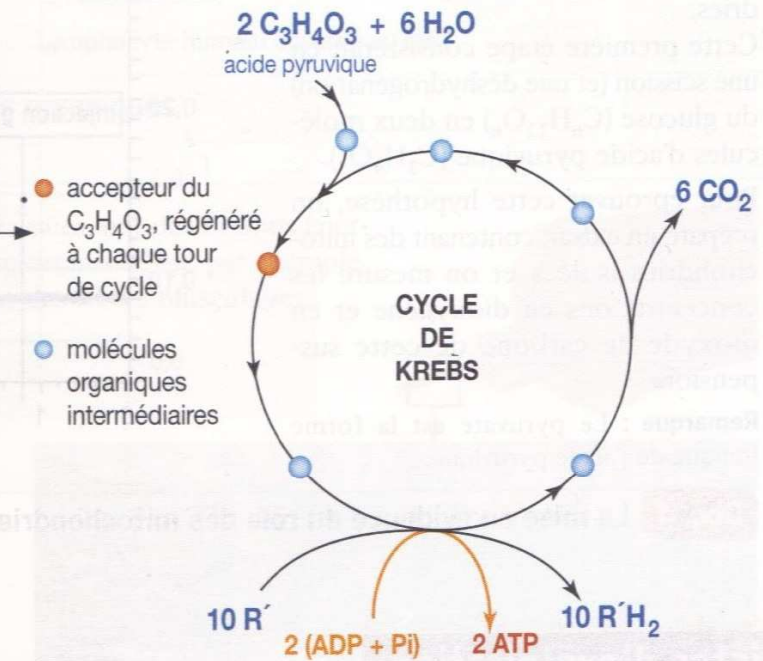


Deuxième étape : le cycle de Krebs dans la matrice des mitochondries



Les mitochondries sont des organites en forme de bâtonnets allongés, de 1 à 2 μm de long. Le compartiment interne d'une mitochondrie, la **matrice**, est un gel contenant divers éléments dont de nombreuses substances dissoutes.

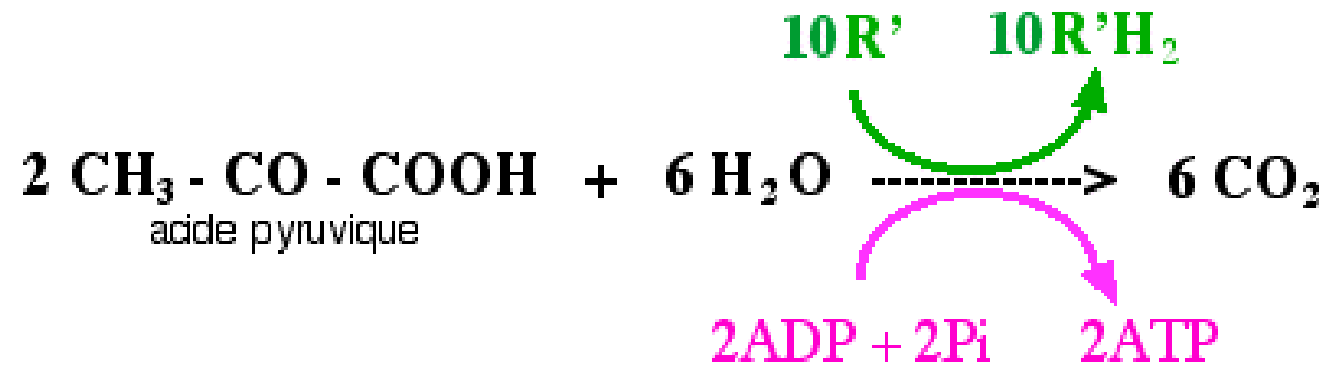
Dans la matrice mitochondriale, l'acide pyruvique est totalement dégradé au cours d'une succession complexe de réactions chimiques que l'on nomme **cycle de Krebs**.



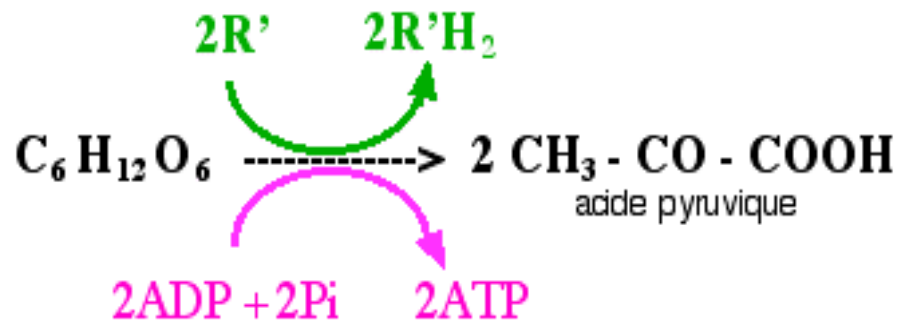
Les réactions du cycle de Krebs produisent du dioxyde de carbone, déchet minéral qui sera rejeté, et des composés qui, ayant pris en charge les atomes d'hydrogène initialement présents dans l'acide pyruvique, se trouvent à l'état réduit ($\text{R}'\text{H}_2$).

Au cours de ces réactions, deux nouvelles molécules d'ATP sont produites (pour une molécule de glucose au départ).

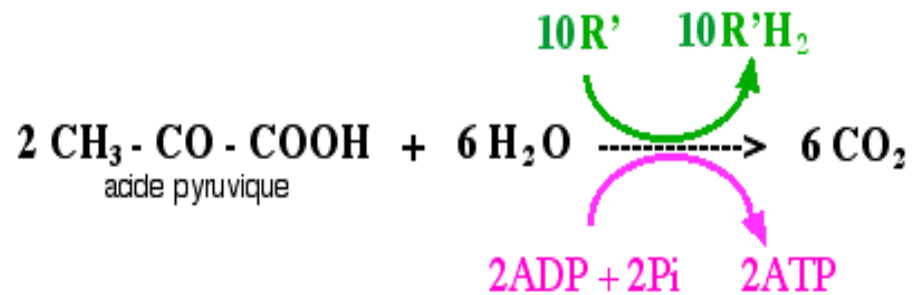
2ème étape : le cycle de Krebs
dans la matrice des mitochondries



Équations bilan : 1ère et 2ème étapes



1ère étape

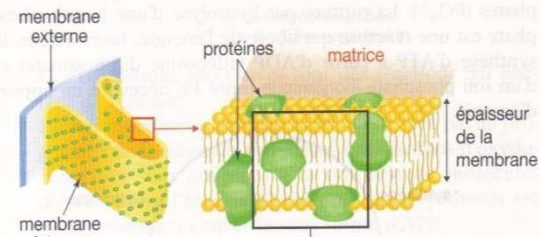
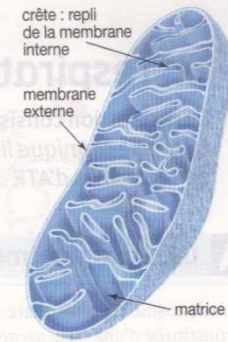


2ème étape

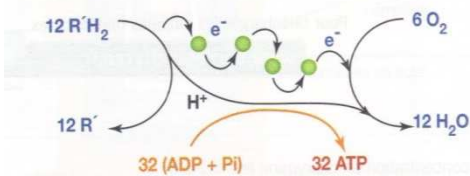
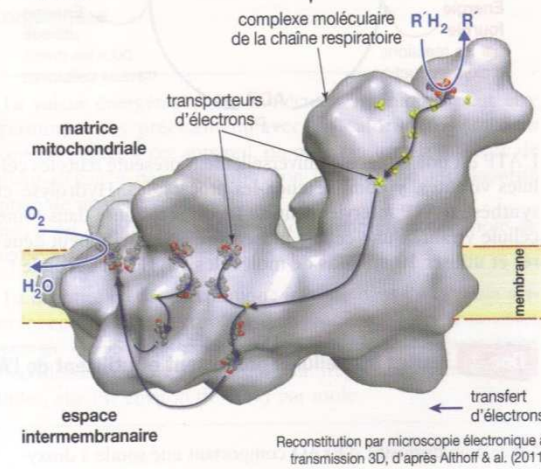
Troisième étape : les réactions de la chaîne respiratoire dans les crêtes mitochondriales



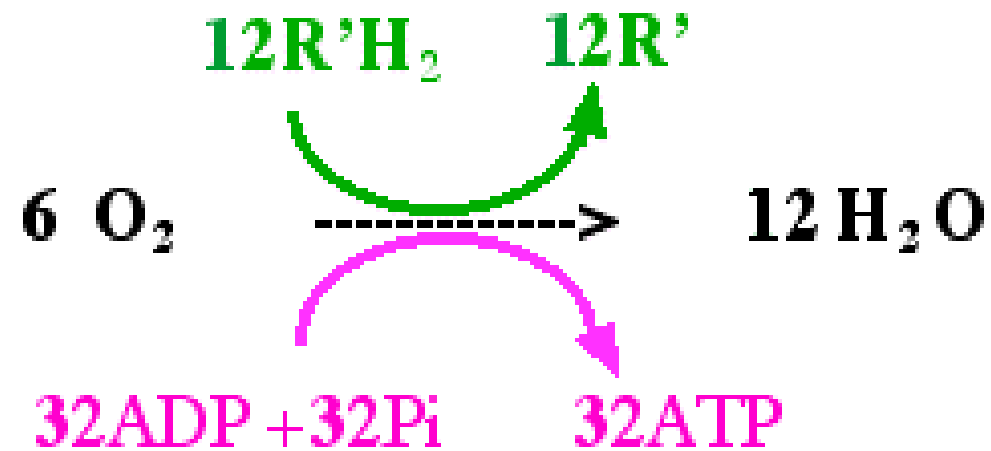
L'observation au microscope électronique à fort grossissement montre qu'une mitochondrie possède deux membranes. Alors que la membrane externe est une simple enveloppe, la membrane interne présente une structure complexe avec de très nombreux replis, appelés **crêtes mitochondriales**. La surface en contact avec la matrice est ainsi démultipliée. En outre, la membrane interne est très riche en protéines (80 % de ses constituants, contre 50 % pour la membrane externe).



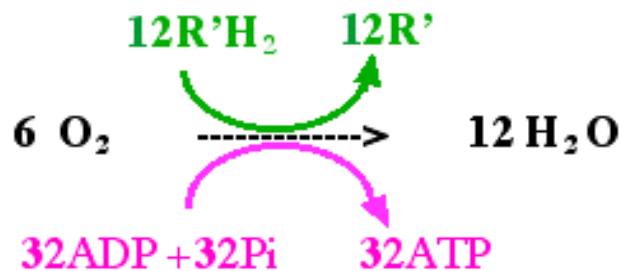
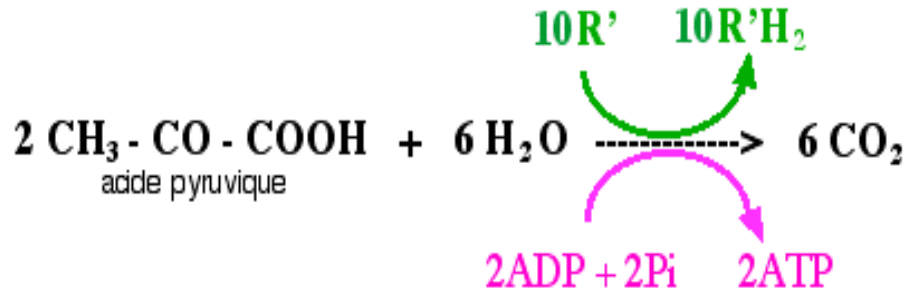
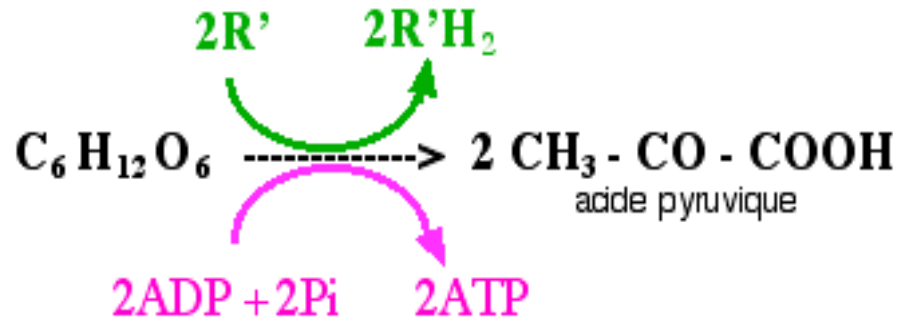
Un ensemble complexe de molécules enchâssées dans la membrane interne constitue la **chaîne respiratoire** (modèle moléculaire ci-contre). Ces molécules assurent une ré-oxydation des composés réduits $R'H_2$ produits par la glycolyse et le cycle de Krebs. Chaque transporteur de la chaîne accepte les électrons du transporteur précédent et les transmet au suivant. Finalement, en bout de chaîne, c'est le dioxygène qui accepte électrons et protons pour former de l'eau. L'énergie libérée par ces oxydations successives permet de produire 32 molécules d'ATP à partir de 12 $R'H_2$.



3ème étape : les réactions de la chaîne respiratoire
dans les crêtes mitochondriales



Bilan de la respiration cellulaire



la respiration cellulaire produit ainsi 36 molécules d'ATP par molécule de glucose oxydé

Les différentes étapes de la respiration cellulaire sont dépendantes les unes des autres :

- L'étape de la glycolyse est un préalable à la réalisation du cycle de Krebs. En effet, le glucose est le métabolite le plus abondant disponible pour la cellule mais il ne pénètre pas dans la mitochondrie : il doit au préalable être transformé en acide pyruvique qui peut entrer dans la mitochondrie et « alimenter » le cycle de Krebs.
- Le cycle de Krebs (et dans une moindre mesure la glycolyse) produisent de grandes quantités de transporteurs réduits $R'H_2$.
- La chaîne respiratoire régénère les transporteurs d'H à l'état oxydé, ce qui permet l'entretien du cycle de Krebs et de la glycolyse.

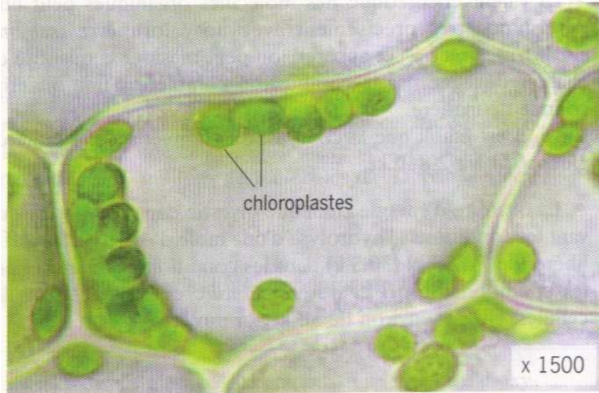
- Le CO_2 rejeté au cours de la respiration provient des réactions de décarboxylations et de déshydrogénations réalisées au cours du cycle de Krebs.
Le CO_2 est « ce qui reste » des métabolites organiques et qui ne sera pas ultérieurement utilisé : il est donc rejeté.
- Le O_2 intervient au cours des réactions d'oxydation des transporteurs réduits $\text{R}'\text{H}_2$ réalisées par la chaîne respiratoire : c'est l'accepteur final des électrons et des H. Sans O_2 , l'ensemble des réactions de la respiration serait rapidement bloqué en amont.
- De l'ATP est produit au cours de chacune des trois grandes étapes de la respiration. Cependant, ce sont les réactions d'oxydation des transporteurs réduits $\text{R}'\text{H}_2$ réalisées par la chaîne respiratoire qui produisent la plus grande quantité d'ATP.

Bilan global de la respiration



Le glucose est totalement dégradé car la totalité du C qu'il contenait est rejetée sous forme minérale (CO₂).

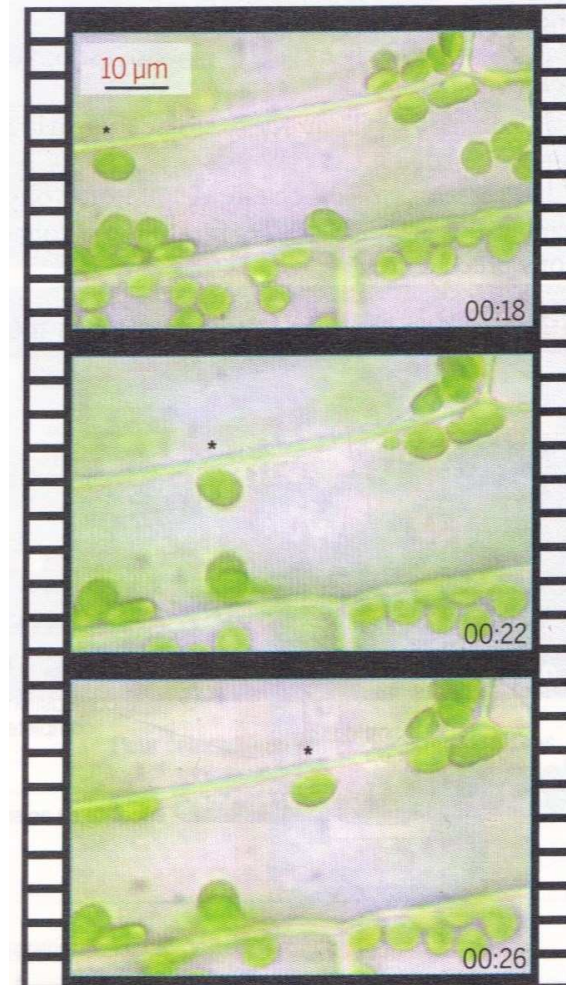
- IV - L'ATP : une nécessité pour les activités cellulaires



■ LA NÉCESSITÉ DE L'ATP

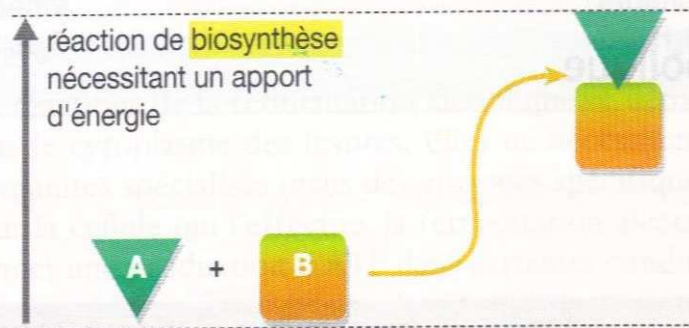
Pour déterminer si la cyclose nécessite de l'ATP, on utilise une solution inhibitrice de la synthèse d'ATP. Un tel « poison » cellulaire peut être obtenu à partir d'un extrait de feuille de laurier cerise : celui-ci contient en effet des ions cyanure (CN^-), qui stoppent le fonctionnement de la chaîne respiratoire (voir page 40).

- Une estimation de la vitesse du déplacement
À partir d'une séquence vidéo, il est possible de repérer un chloroplaste et d'estimer sa vitesse de déplacement (temps indiqué en s.).

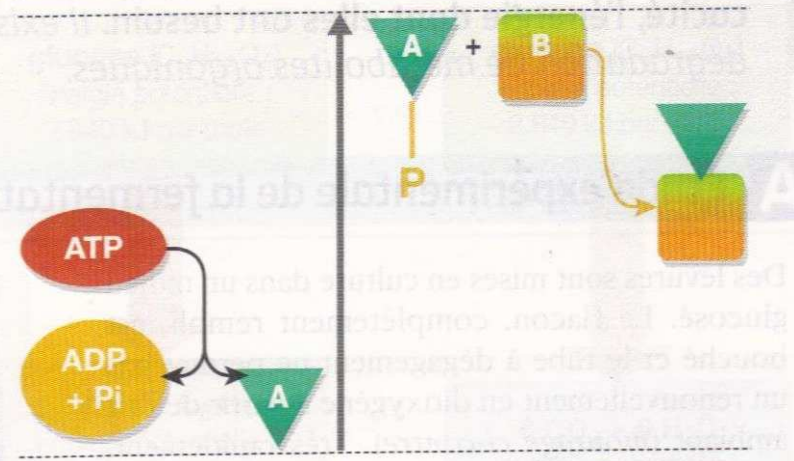


L'ATP permet un travail chimique

La synthèse des molécules complexes constitutives des cellules à partir de molécules simples (par exemple la **polymérisation** des nucléotides en ADN ou ARN, la synthèse des protéines à partir des acides aminés, la constitution des glucides de réserves), sont des réactions non spontanées qui exigent un apport d'énergie. En effet, le « niveau d'énergie » du produit final est supérieur à celui des réactifs de départ.



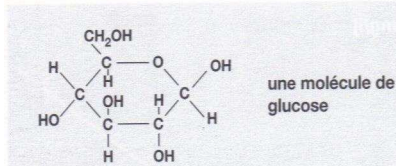
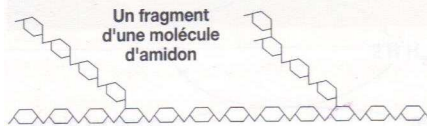
Pour réaliser un tel travail chimique, toute réaction de biosynthèse est couplée à une hydrolyse de l'ATP qui transfère un groupement phosphate à l'un des réactifs : son niveau d'énergie est alors plus élevé et la réaction peut se produire spontanément.



Mise en évidence expérimentale

L'amidon et le **glycogène** sont deux polymères du glucose qui constituent les réserves glucidiques des cellules (l'amidon dans les cellules végétales, le glycogène dans les cellules des animaux et des mycètes).

La synthèse d'amidon à partir de glucose se produit, par exemple, dans les cellules des tubercules de pomme de terre. Cette synthèse nécessite une **enzyme** spécifique, l'amylosynthétase, que l'on peut extraire de ces tubercules.

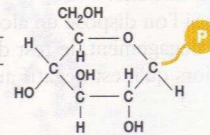


■ PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Préparer trois tubes à essai contenant respectivement :

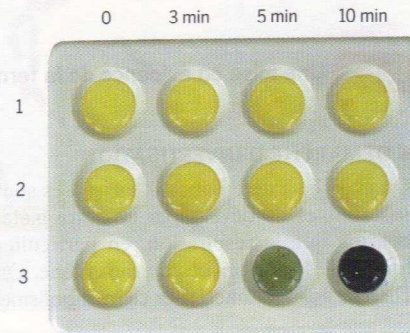
- **Tube 1** : 2 mL de glucose + 1 mL d'amylosynthétase + 1 mL d'eau distillée.
- **Tube 2** : 2 mL glucose + 1 mL d'ions phosphate + 1 mL d' amylosynthétase.
- **Tube 3** : 2 mL de glucose 1-P + 1 mL d'amylosynthétase + 1 mL d'eau distillée.

Le glucose 1-P est une molécule de glucose à laquelle a été transféré un groupement phosphate sur le carbone 1.



■ RÉSULTATS

Contrôler la présence ou l'absence d'amidon. Pour cela, effectuer au départ puis régulièrement après 3, puis 5 et 10 minutes, des tests à **l'eau iodée** en prélevant une ou deux gouttes de chaque tube.



Tube 1 : synthèse d'amidon non spontanée même en présence d'enzyme

Tube 2 : synthèse impossible même en ajoutant des ions phosphate

Tube 3 : ions phosphate « fixés » au glucose → synthèse d'amidon

Conclusion : cette synthèse d'amidon nécessite de l'énergie. Grâce au transfert d'un groupement phosphate, réalisé par couplage avec une hydrolyse d'ATP, le glucose 1-P possède un niveau d'énergie suffisant pour réaliser la réaction de biosynthèse de l'amidon.

Conclusion : le rôle de la respiration cellulaire est de produire de l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP ainsi produit, fournit l'énergie nécessaire aux diverses activités cellulaires comme la réalisation de mouvements ou les réactions de biosynthèse.

- V - Fermentations cellulaires et production d'ATP

Des levures sont mises en culture dans un milieu glucosé. Le flacon, complètement rempli, est bouché et le tube à dégagement ne permet pas un renouvellement en dioxygène à partir de l'air ambiant (*montage ci-contre*). Très rapidement, le dioxygène présent initialement est épuisé et la suspension de levures fermente : on observe effectivement un bouillonnement (fermenter vient du latin *fervere* qui veut dire bouillir).

Quelques observations

- Il est possible de recueillir dans l'éprouvette le gaz dégagé par la culture de levures. Un test à l'**eau de chaux** montre qu'il contient du dioxyde de carbone.
- Si l'on dispose un alcootest à la place du tube à dégagement, le test donne un résultat positif, alors qu'il est négatif au début de l'expérience.



Mise en évidence de la fermentation alcoolique

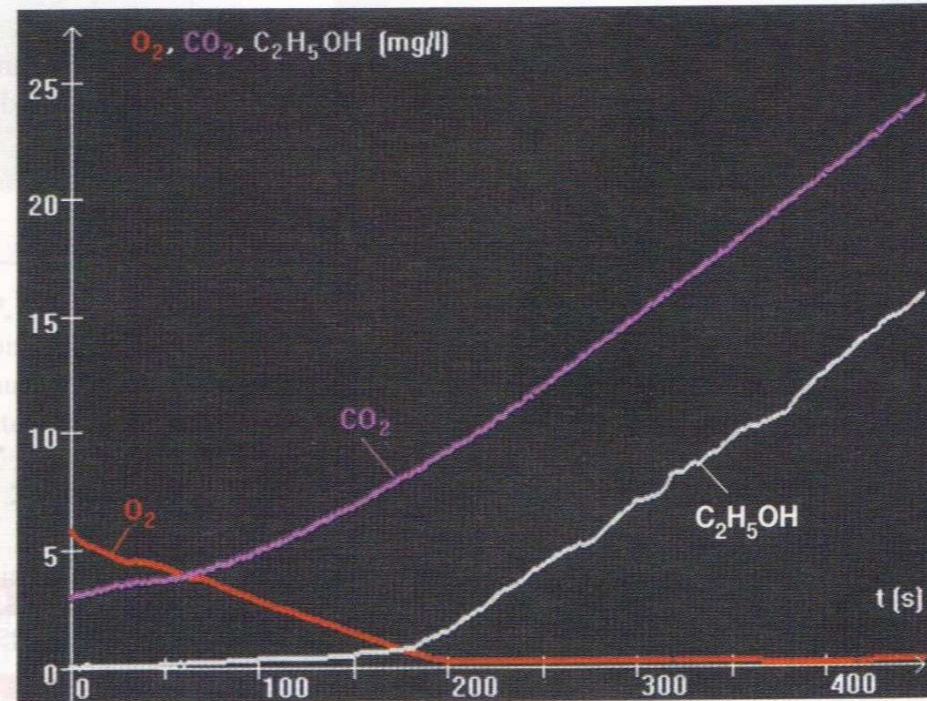
■ DÉMARCHE D'INVESTIGATION

On cherche à déterminer si les levures sont susceptibles de développer un autre **métabolisme** que la respiration, en particulier lorsqu'elles sont privées de dioxygène. On cherche aussi à caractériser ce métabolisme.

■ DISPOSITIF ET PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

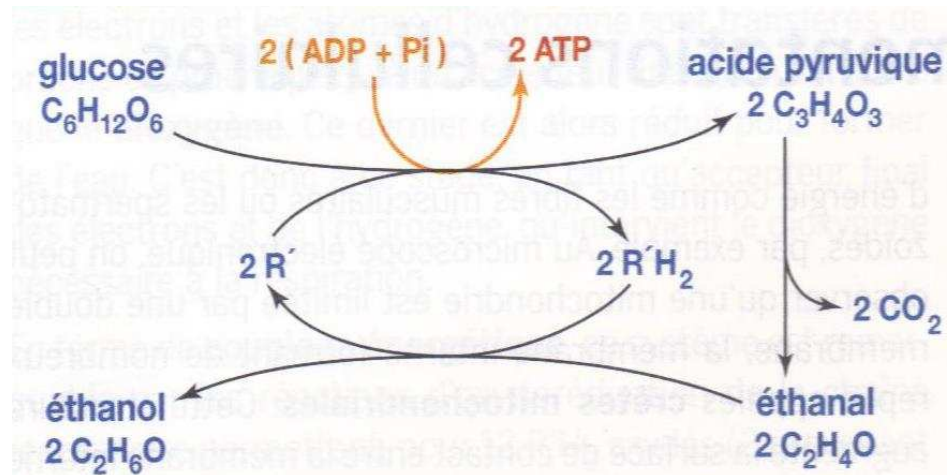
- Utiliser un montage semblable à celui présenté *page 34* mais ajouter une troisième sonde mesurant la concentration en éthanol dans le milieu.
- Avant de démarrer la mesure, introduire dans la suspension 0,2 mL de solution glucosée à 200 g/L.
- Effectuer les mesures sur une période de temps suffisamment longue (supérieure à 5 minutes).

■ RÉSULTAT



Les levures peuvent utiliser 2 voies métaboliques différentes

Bilan de la fermentation alcoolique



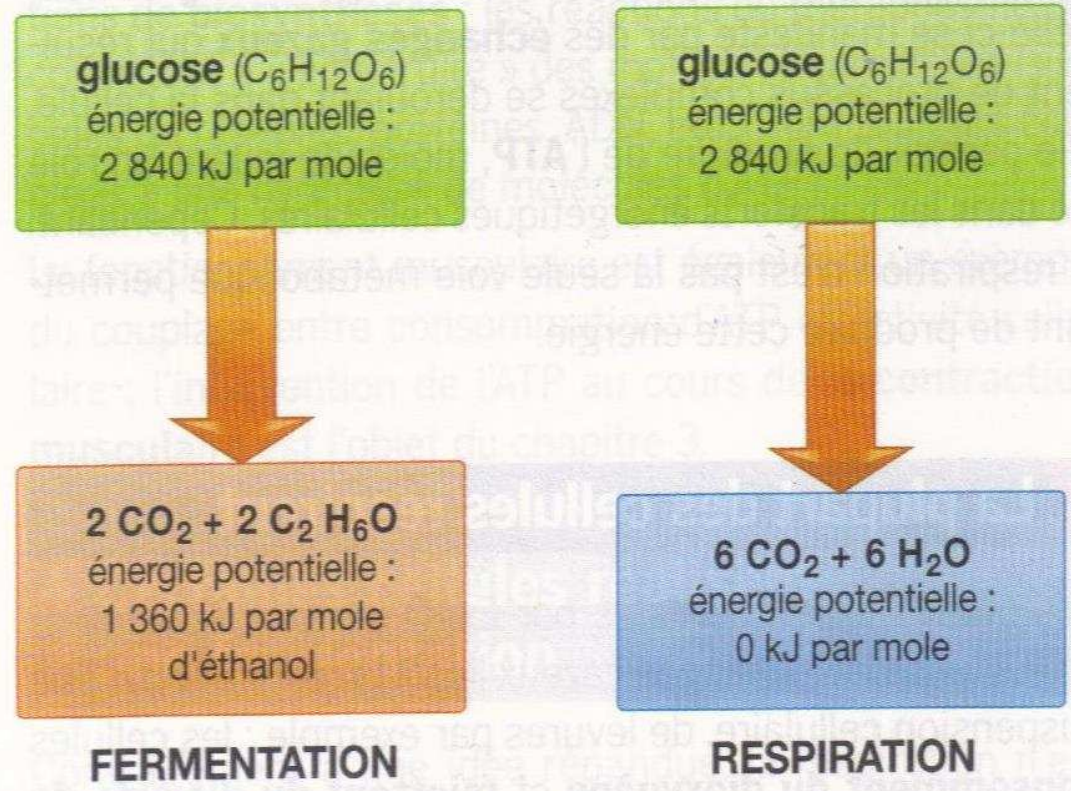
Les réactions de la fermentation alcoolique se déroulent dans le cytoplasme des levures. Elles ne nécessitent pas d'organites spécialisés (mais des enzymes spécifiques).

Pour la cellule qui l'effectue, la fermentation alcoolique permet une production d'ATP dans certaines conditions, par exemple en **anaérobiose**, c'est-à-dire dans un milieu dépourvu de dioxygène.

Par fermentation, la dégradation du métabolite organique est incomplète : il y a production d'un composé secondaire organique, ici l'éthanol.

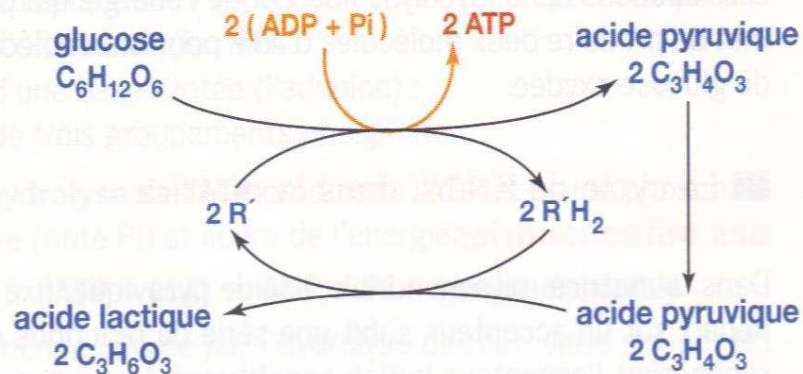
Comparaison entre fermentation et respiration

Respiration et fermentation sont deux façons différentes de produire de l'énergie (ATP) à partir d'un même métabolite organique. Leur rendement est cependant bien différent : alors que la respiration produit 36 ATP par mole de glucose consommé, la fermentation n'en produit que deux.

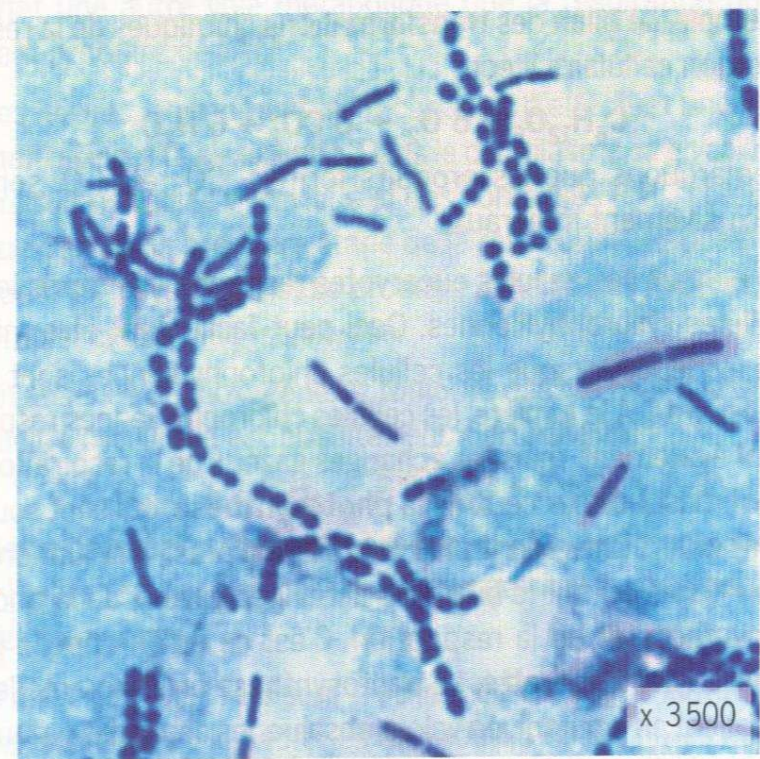


La fermentation lactique

Certaines cellules, les **bactéries lactiques** mais aussi les cellules musculaires (*voir page 57*) sont capables de réaliser une fermentation dite lactique. Dans ce cas, la dégradation du glucose produit de l'acide lactique.



Pour vivre, les bactéries du yaourt, observées ici au microscope optique après coloration au bleu de méthylène, utilisent le **lactose** du lait et produisent par fermentation de l'acide lactique (responsable d'une modification de la consistance et de la saveur du lait).



Caractéristiques \ Métabolisme	Respiration	Fermentation	
		Alcoolique	Lactique
Réactifs	Matière organique O ₂	Matière organique	
Déchets métaboliques	CO ₂	CO ₂ + éthanol	Acide lactique
Lieu de production des composés réduits R'H ₂	Hyaloplasme (glycolyse) Matrice mitochondriale (cycle de Krebs)	Hyaloplasme (glycolyse)	
Lieu d'oxydation des composés réduits R'H ₂	Membrane interne des mitochondries (chaîne respiratoire)	Hyaloplasme	
Molécules d'ATP produit par l'oxydation d'une molécule de glucose	36 ATP	2 ATP	
Rendement énergétique	$\frac{36 \times 30,5}{2840} \times 100 = 38,6 \%$	$\frac{2 \times 30,5}{2840} \times 100 = 2,1 \%$	

7 Comparaison de la respiration et de la fermentation.