

**TP**

Culture n°	1	2	3	4	5
Suspension de levures sans réserves (10 g.L <sup>-1</sup> )	0 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Eau distillée	100 mL	90 mL	90 mL	90 mL	90 mL
Oxygénation*	Oui	Non	Non	Oui	Oui
Glucose (10 g.L <sup>-1</sup> ) ajouté au temps t <sub>0</sub>	5 mL	0 mL	5 mL	0 mL	5 mL

\* Les conditions d'oxygénation sont contrôlées par une sonde à dioxygène. L'apport de dioxygène est réalisé grâce à un bulleur, récipient de culture ouvert. L'absence de dioxygène est assurée par l'usage d'eau distillée préalablement bouillie, récipient de culture fermé par un bouchon.

**Résultats des glucotests**

Culture n°	1	2	3	4	5
<b>Références</b>					
Date de première ouverture:					
Glucose - Lire à 10 secondes précises.					
NEGATIF					
CLAIR +					
MOYEN ++					
FONCE +++					
<b>Glucotest (après 1h de culture)</b>	+++	-	++	-	+

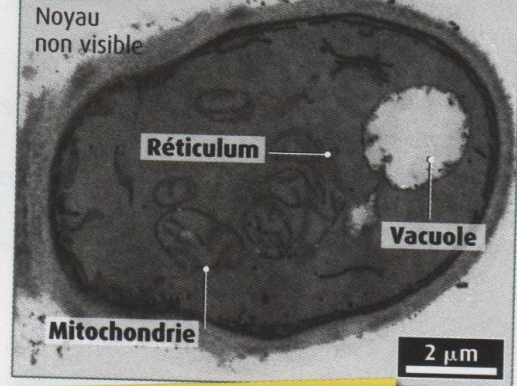
**JE MANIPULE**

- ▶ Obtenir des levures sans réserves intracellulaires: diluer 10 g de levures fraîches dans 1 L d'eau distillée et mettre en préculture bien oxygénée (bulleur) pendant environ 48 h.
- ▶ Préparer 5 erlenmeyers numérotés de 1 à 5 et incuber à 30°C sous agitation, pour une durée de 1 heure.
- ▶ Tester la présence de glucose à t<sub>0</sub> + 1 h à l'aide de bandelettes glucotest, sur un échantillon de chacun des 5 erlenmeyers.

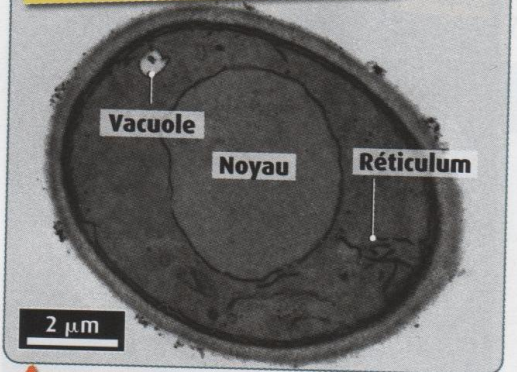
Une comparaison par spectrophotométrie de la densité optique des cultures avant et après incubation montre que les levures des cultures 3 et 5 se sont multipliées rapidement dans l'intervalle, alors que les levures des cultures 2 et 4 ont conservé leur effectif initial.

**1** **Consommation de glucose et croissance d'une population de levures.** La levure de bière est un organisme unicellulaire non photosynthétique, facile à cultiver en laboratoire. On la qualifie d'aérobie facultative car elle peut survivre et se multiplier en présence de dioxygène (**aérobiose**) ou en son absence (**anaérobiose**).

**Levure cultivée en présence d'O<sub>2</sub>**

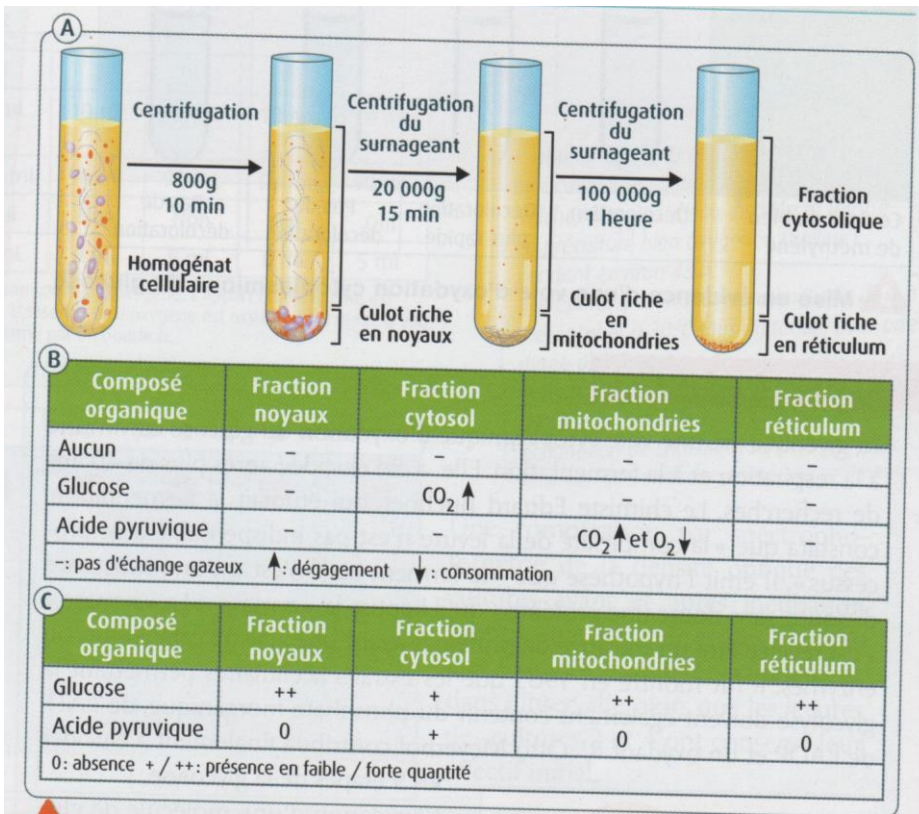


**Levure cultivée en absence d'O<sub>2</sub>**



**1** **Organisation de levures cultivées en aérobie ou en anaérobiose (MET x 10'000).**

Comme toutes les cellules eucaryotes, une cellule de levure contient différents types de compartiments délimités par une membrane. On compare le développement des compartiments pour des levures d'une même souche cultivées en présence ou en absence de dioxygène.



## 2 Une expérience pour localiser la respiration au niveau cellulaire.

Des levures sont lysées et les différents compartiments cellulaires sont séparés *in vitro* par plusieurs étapes de centrifugation (A). Les échanges gazeux sont mesurés en aérobiose, en absence ou en présence de glucose ou d'acide pyruvique, sur les différentes fractions obtenues. Les résultats sont présentés dans le tableau (B). Les taux de glucose et d'acide pyruvique sont mesurés au bout de 12h dans les fractions incubées dans un milieu initialement glucosé et sans acide pyruvique. Les résultats sont présentés dans le tableau (C).

Belin Edition 2012

Des analyses biochimiques ont été réalisées dans les différentes parties de la mitochondrie.

Structure étudiée	Composition chimique remarquable	Protéines catalysant des réactions particulières
Membrane externe	Protéines (62 %) Lipides (38 %)	Protéines similaires à celles de la membrane plasmique
Membrane interne	Protéines (80 %) Lipides (20 %)	ATP synthase (production d'ATP) Complexes d'oxydoréduction
Matrice	Présence de pyruvate, d'ATP, d'ADP et de Pi Des composés oxydés (R') ou réduits (R'H <sub>2</sub> )	Enzymes d'oxydation de molécules carbonées (production de CO <sub>2</sub> ) Complexes d'oxydoréduction (déshydrogénases)

**b** Composition biochimique des différentes structures mitochondriales.

Nathan Edition 2012

### La glycolyse, première étape de dégradation du glucose

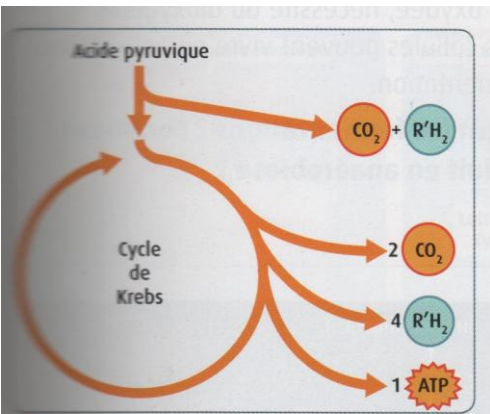
Expérience	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
Cubes de navets	Navet non ébouillanté	Navet non ébouillanté	Navet ébouillanté	Navet ébouillanté
Glucose (2,5 g)	Pas de glucose	Glucose	Pas de glucose	Glucose
Résultats				
Couleur du bleu de méthylène	Décoloration	Décoloration plus rapide	Pas de décoloration	Pas de décoloration

**JE MANIPULE**

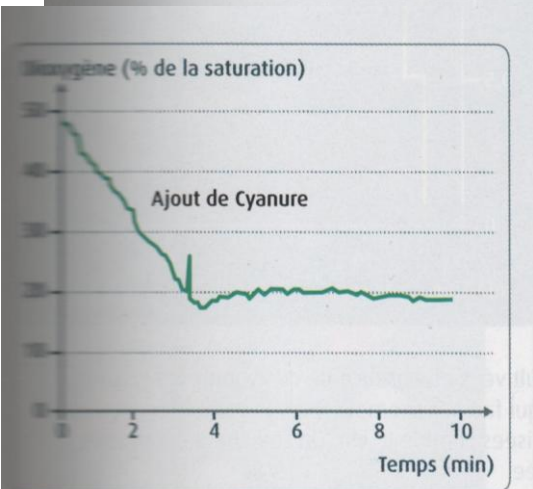
- ▶ Préparer 4 tubes à essais contenant chacun 10 mL d'eau distillée.
- ▶ Découper des cubes de navet de 2 mm de côté et en déposer rapidement 10 dans chaque tube à essais. La découpe permet de libérer dans l'eau des molécules cytoplasmiques solubles.
- ▶ Plonger les tubes 3 et 4 dans l'eau bouillante pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines.
- ▶ Ajouter du glucose dans les tubes 2 et 4.
- ▶ Filtrer puis ajouter dans chaque tube du bleu de méthylène pour obtenir une coloration bleue très pâle. Le bleu de méthylène est un indicateur d'oxydoréduction: à l'état oxydé il est bleu, tandis qu'à l'état réduit il est incolore.

**Mise en évidence d'une voie d'oxydation cytoplasmique du glucose.**

Belin Edition 2012



**Le cycle de Krebs.** Hans A. Krebs (prix Nobel en 1953) a montré que l'acide pyruvique issu de la glycolyse est oxydé totalement dans la matrice mitochondriale. Cette oxydation libère 2 molécules de CO<sub>2</sub> par acide pyruvique pris en charge. Elle est couplée à la formation de 4 composés réduits R'H<sub>2</sub> et d'une molécule d'ATP. Les réactions, cycliques, sont catalysées par des enzymes solubles ou faisant partie de la membrane interne de la mitochondrie.



**La consommation d'O<sub>2</sub>.** 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.

- 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**.

**Mesures de l'absorbance à 350 nm de différentes solutions.**

Structure étudiée	Ajout de pyruvate	Ajout de pyruvate et de dioxygène
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>

**a** Étude du dégagement de CO<sub>2</sub> par les différentes fractions mitochondriales.

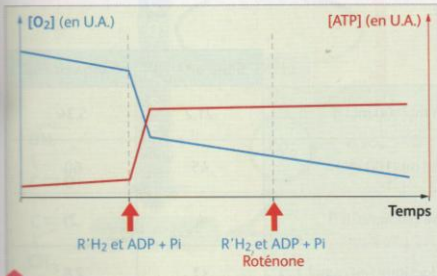
Solutions testées	Absorbance à 350 nm
Composé oxydé R'	0
Composé réduit R'H <sub>2</sub>	0,35
Protéines de la matrice + R'	0
Protéines de la matrice + glucose + R'	0
Protéines de la matrice + pyruvate + R'	0,25

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

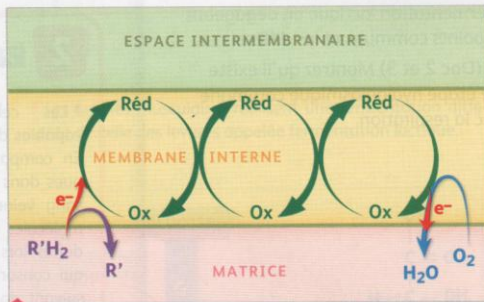
Des suspensions de mitochondries sont placées avec des composés réduits  $R'H_2$  et en présence ou non de roténone, un inhibiteur des complexes d'oxydoréduction. La production d'ATP et la consommation d' $O_2$  sont suivies au cours de l'expérience.

Le dioxygène est un composé qui peut être réduit en  $H_2O$ .

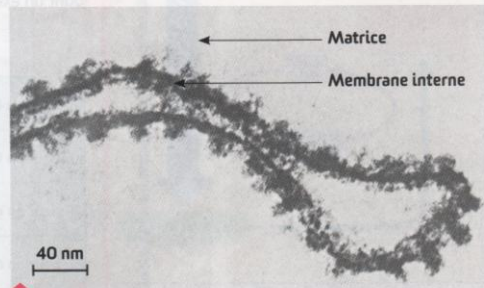
Une observation microscopique de la membrane interne des mitochondries permet de localiser les enzymes de synthèse de l'ATP, les ATP synthases.



Variation des concentrations d' $O_2$  et d'ATP avant et après ajout de roténone.



Les réactions d'oxydoréduction au sein de la chaîne respiratoire.



Localisation des ATP synthases (MET).

Nathan Edition 2012

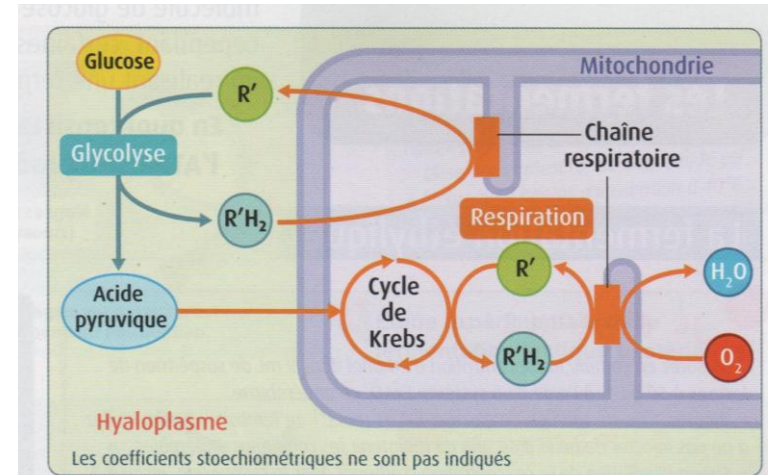
$R'H_2$ formé	Respiration	Fermentation lactique ou alcoolique
Lors de la glycolyse	2 $R'H_2$	2 $R'H_2$
Lors du cycle de Krebs	10 $R'H_2$	
<b>Total</b>	12 $R'H_2$	2 $R'H_2$

Bilan en  $R'H_2$  de la respiration et des fermentations.

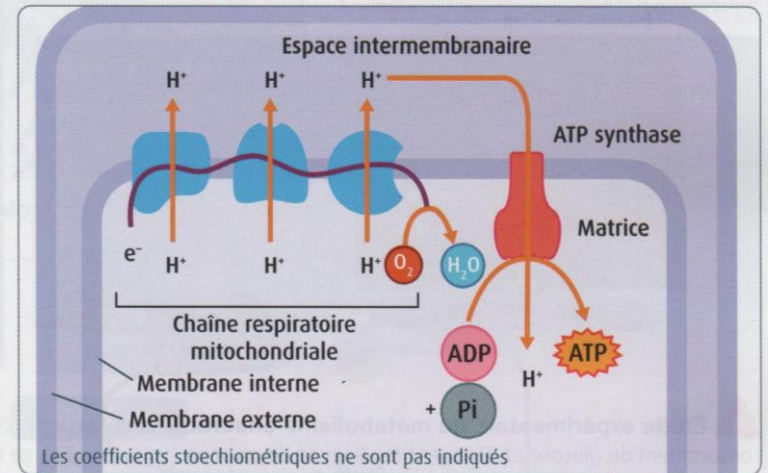
ATP formé	Respiration	Fermentation alcoolique ou lactique
Lors de l'oxydation du glucose	localisation	cytoplasme, matrice mitochondriale
	quantité	4
Lors de la réoxydation des $R'H_2$	localisation	ATP-synthases mitochondriales
	quantité	34
<b>Total</b>	38	2

Bilan en ATP de la respiration et des fermentations.

Belin Edition 2012



**5 La régénération de l'oxydant  $R'$ .** Les composés  $R'H_2$  produits dans le cytoplasme (glycolyse) et la matrice (cycle de Krebs) sont oxydés en délivrant leurs électrons à des accepteurs situés dans la membrane interne des mitochondries, formant la chaîne respiratoire. Les  $R'$  sont ainsi régénérés.



**7 La synthèse d'ATP.** L'énergie du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire permet d'expulser des protons dans l'espace intermembranaire. Ces protons rejoignent la matrice en actionnant une ATP-synthase similaire à celle de la membrane des thylacoïdes, ce qui permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP et Pi. En plus des 2 ATP produits pendant la glycolyse, la respiration permet ainsi de produire 36 ATP par molécule de glucose.

Belin Edition 2012