

Première partie (20 points)

1.1. Etude de la germination du Haricot (10 points)

1.1.1

Trois stades de développement (to = réhydratation) sont proposés.

Réactif fourni : solution iodo-iodurée (Lugol)

- Réaliser (et traiter) les coupes dans les parties susceptibles de donner des informations sur l'état des composés de réserves et leur évolution au cours de la germination.
- Placer les coupes montées entre lame et lamelle sur la platine du microscope.

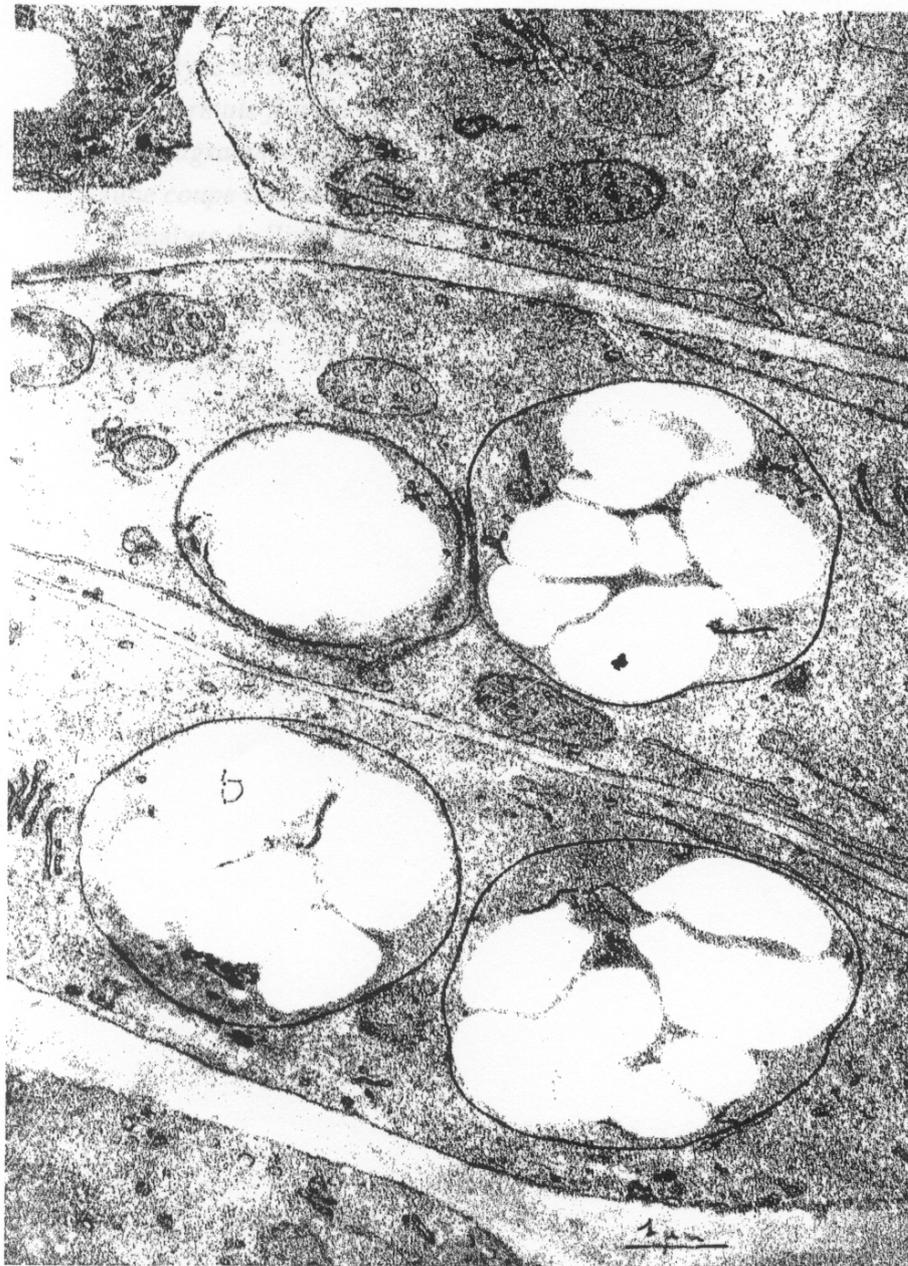
Appeler l'examineur

- Dessiner les cellules dont l'évolution vous semble la plus significative. Légender aussi précisément que possible.

1.1.2

Etude d'un cliché (microscopie électronique à transmission) montrant un stade d'évolution caractéristique de cellules végétales (les coupes ultrafines ont été réalisées dans un matériel traité selon les techniques classiques).

- *Légender le document. De quels types cellulaires (appartenant aux stades de germination proposés) pouvez-vous rapprocher ce document ?*



1.1.3

Rédiger une conclusion générale succincte.

1.2. Eléments d'analyse florale (10 points)

L'analyse sera traduite uniquement par :

- une *formule florale*
- un *diagramme floral*
- une *coupe longitudinale*.

L'analyse de l'inflorescence et l'identification du végétal ne sont pas attendues.

Deuxième partie (20 points)**Manipulation et étude histologiques**

Le test histochimique de Feulgen Rossenbeck est une manipulation visant à mettre en évidence l'A.D.N. (acide désoxyribonucléique) sur des coupes histologiques.

Il comporte deux temps :

- une hydrolyse acide partielle de l'A.D.N. qui décroche les bases puriques et libère une forme aldéhydique du désoxyribose
- une détection des fonctions aldéhydes formées par le réactif de Schiff qui vire au rose-violet en leur présence.

En complément du test histochimique, une contre-coloration peut être mise en œuvre afin d'améliorer la lisibilité des coupes.

Enfin, dans le but de conserver les préparations, une déshydratation et un montage sous lamelle dans de la résine doivent être effectués.

Consignes générales :

- Porter des gants.
- Prendre garde à ne jamais laisser sécher les coupes durant les manipulations.
- La manipulation des lames de verre doit être réalisée à l'aide de pinces. Saisir les lames par l'extrémité dépolie en prenant soin de ne pas toucher les coupes.
- Les lames de verre possèdent une plage dépolie portant les inscriptions permettant de les identifier. Les coupes sont collées sur les lames sur la même face que l'inscription.
- Eviter de mettre en contact les faces des lames portant les coupes avec un support quel qu'il soit (autre lame, paillasse, papier absorbant...) pour éviter de décoller les coupes.
- Les lames doivent être incubées successivement dans divers bains, correspondant aux piluliers mis à votre disposition. A chaque fois :
 - . plonger la lame dans le pilulier, bord dépoli vers le haut
 - . au terme de l'incubation, sortir la lame, essorer sa tranche sur du papier absorbant pour limiter la contamination du bain suivant
 - . plonger la lame dans le bain suivant etc.
- La plupart des solutions employées contiennent des solvants volatils, fermer les piluliers après y avoir plongé les lames, pour la durée des incubations.
- Si deux lames doivent être incubées dans un même pilulier, veiller à les placer de sorte que les faces portant les coupes soient tournées vers l'extérieur.
- Certains piluliers contiennent un prisme ; placer les lames dans les compartiments ménagés par le prisme, la face portant la coupe tournée vers l'extérieur.

Protocole :

Test :

1. incuber la lame dans HCl 1N pendant 8 minutes à 60°C, pour cela placer le pilulier au bain-marie
2. incuber la lame dans le réactif de Schiff pendant 60 minutes
3. rincer la lame à l'eau courante pendant 10 minutes, pour cela placer le pilulier dans le dispositif prévu à cet effet, sans le fermer

Contre-coloration :

4. incuber la lame dans une solution de picro-indigo-carmin pendant 1 minute

Déshydratation :

5. incuber la lame dans un premier bain d'éthanol 100 (100₁) pendant 2 minutes
6. incuber la lame dans un second bain d'éthanol 100 (100₂) pendant 2 minutes
7. incuber la lame dans le bain de méthylcyclohexane pendant 2 minutes

Montage :

8. placer la lame à plat sur la paillasse, la face portant la coupe étant orientée vers le haut
9. à l'aide de la baguette de verre insérée dans le bouchon du flacon, prélever une goutte de résine dans le flacon et la déposer sur la coupe
10. déposer délicatement une lamelle de verre sur la coupe.

Ne pas déplacer la lamelle après l'avoir déposée, ne pas essayer d'éliminer un éventuel excédent de résine.

L'interprétation du test histochimique de Feulgen-Rossenbeck nécessite la vérification de la spécificité de la réaction sur laquelle il est basé. D'après le principe du test énoncé, expliquer comment la spécificité de la manipulation peut être vérifiée.

Vous disposez de deux lames portant des coupes réalisées dans un organe W, prêtes à l'emploi.
Relever les inscriptions (lettre et nombre) portées par chacune d'entre elles.

Préciser le traitement que chaque lame doit subir afin que le test puisse être interprété.

Au terme de la manipulation, observer les préparations. Ne pas utiliser l'objectif x 100 du microscope.

Donner les couleurs observées pour les noyaux, les cytoplasmes, le matériel extra-cellulaire (précisez le cas échéant si votre vision des couleurs est altérée).

Interpréter le résultat du test histochimique pratiqué.

Réaliser un croquis de la coupe d'organe W observée. Annoter avec précision ce croquis, en identifiant notamment les tissus observés.

Choisir une plage intéressante de la coupe d'organe W et la situer sur le croquis. Proposer un dessin de détail soigneusement annoté de cette plage.

Conclure quant à la nature de l'organe W, de manière justifiée.

Troisième partie (20 points)**Comparaison des pigments de deux végétaux**

Au début du XX^{ème} siècle, Mikhaïl Semenovitch TSWETT, botaniste russe, fit des études très complètes sur les pigments végétaux et inventa pour les séparer la technique connue sous le nom de chromatographie. En utilisant cette technique, il a montré que les plantes vertes contiennent deux types de chlorophylles nommées a et b qui diffèrent par leur spectres d'absorption. Nous nous proposons ici d'utiliser ce type de technique pour comparer les pigments présents dans un couple de végétaux : épinard et chou rouge.

L'extrait d'épinard est fourni ; l'extrait de chou rouge est à réaliser au cours du TP.

3.1. Dosage des chlorophylles

- Préparer 10 mL d'un mélange acétone (30 %) / éthanol (70 %) dans un tube de 15 mL bouché.
 - Peser 2 g de chou rouge.
 - Broyer au mortier dans 5 mL du mélange acétone/éthanol. Transférer le liquide dans un tube de 15 mL bouché.
 - Reprendre les résidus dans 5 mL d'acétone pur et broyer à nouveau. Ajouter le tout au tube de 15 mL.
 - Bien boucher le tube et l'agiter fortement. Laisser décanter sur la paillasse.
 - Récupérer 2 fois 2 mL du surnageant dans deux microtubes. Clarifier par centrifugation (1 minute, vitesse maximale).
 - Transférer les surnageants, qui constituent l'extrait brut, dans un tube bouché propre.
- A l'aide d'un spectrophotomètre, mesurer l'absorbance de l'extrait brut de chou à 645 nm et 663 nm contre un blanc adéquat. Faire également ces mesures pour l'extrait brut d'épinard qui vous est fourni, après dilution au 1/10 dans le mélange acétone/éthanol.

Compte rendu :

a. *Estimer la quantité de chlorophylle présente par unité de masse de matériel.*

Vous exploiterez pour cela les formules approchées mises au point par Arnon (1949) pour une solution de chlorophylle dans un solvant non aqueux :

$$\text{Chlorophylle totale } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = 20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663})$$

$$\text{Chlorophylle a } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = 12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645})$$

$$\text{Chlorophylle b } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = 22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663})$$

où A_n désigne l'absorbance de la solution de chlorophylle à la longueur d'onde n.

b. Dans les mêmes conditions de solvant, les coefficients d'absorption molaire d'une solution de chlorophylle pure sont estimés à :

$$75 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} \text{ à } 663 \text{ nm pour la chlorophylle a (M = 879)}$$

$$47 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} \text{ à } 645 \text{ nm pour la chlorophylle b (M = 893)}.$$

Vos résultats sont-ils compatibles avec ces données ? Si non, quel(s) phénomène(s) pourraient expliquer les différences ?

Rappel : la loi de Beer-Lambert s'exprime sous la forme : $A = \epsilon E C$

Avec

A = Absorbance

ϵ = coefficient d'absorption molaire

E = longueur d'absorption

C = concentration de la substance absorbante.

3.2. Séparation des pigmentsPréparation des échantillons

Pour chaque extrait brut :

- Prélever 1 mL d'extrait brut et le mettre dans un tube de 15 mL bouché.
- Ajouter 1 mL d'éther de pétrole.
- Ajouter 1 mL d'une solution aqueuse neutralisée de NaCl à 10%.
- Agiter fortement pendant 15 secondes environ.
- Laisser décanter.

Compte-rendu :

c. *Comparer le comportement des deux extraits au cours de la décantation. Conclure.*

Chromatographie en couche mince sur support de silice :

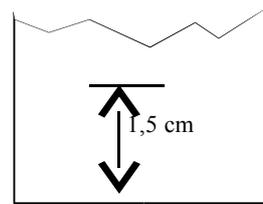
Pour cette partie, vous n'analyserez que l'extrait d'épinard.

- Récupérer environ 500 μL de la phase supérieure, et les stocker dans un microtube.

Un support de chromatographie en couche mince est à votre disposition. La migration sera faite dans le sens de sa plus grande dimension. Ne pas toucher la partie blanche (couche de silice) avec les doigts.

- Déposer un échantillon sous forme d'une ligne de dépôt.

Déposer 5 gouttes adjacentes de 5 μL , en soufflant doucement sur le support entre chaque goutte pour le sécher. Ces 5 gouttes doivent former une ligne située à environ 1,5 cm de la base du support. Pour obtenir un dépôt suffisamment dense, répéter cette opération 4 fois sur les mêmes emplacements.



Une cuve de migration est préparée pour vous sous la hotte. Elle contient un fond de 0,5 cm (environ 10 ml) de solvant de chromatographie fortement apolaire (mélange 20 % 1-propanol / 80 % Hexane), et est fermée par un film plastique, de façon à saturer l'atmosphère de la cuve en solvant.

- Placer le support dans la cuve de migration de façon à ce que l'extrémité du support de chromatographie plonge dans le solvant sans que les dépôts ne trempent dans celui-ci. Bien refermer la cuve avec le film plastique.
- Laisser migrer environ 1/4 d'heure à l'obscurité.
- Lorsque le solvant atteint presque le sommet du support, arrêter la migration.

Compte-rendu :

Après la chromatographie, on repère deux bandes vertes denses : elles correspondent aux chlorophylles a et b. D'un point de vue biochimique, la seule différence entre ces molécules est la présence d'un groupement $-\text{CH}_3$ dans la chlorophylle a, remplacé par un groupement $-\text{CHO}$ dans la chlorophylle b. Par ailleurs, les carotènes sont une famille de pigments plus apolaires que les chlorophylles ; au contraire, les xanthophylles sont plus polaires.

d. Schématiser le chromatogramme obtenu et préciser en le justifiant la famille de chaque pigment identifiable

e. Quel solvant de chromatographie pourriez-vous utiliser pour analyser les pigments contenus dans l'extrait brut de chou rouge ?

3.3. Analyse spectrophotométrique d'une chlorophylle

- Une fois le support chromatographique sec, prélever une bande de chlorophylle en grattant délicatement le support à l'aide d'une pointe de scalpel propre.
- Transvaser la poudre obtenue dans un microtube
- Ajouter un volume de 600 μL d'acétone, clarifier par centrifugation (1 minute, V max).
- Demander que le spectre d'absorption soit réalisé.

Compte-rendu :

Une galerie de spectres est à votre disposition.

f. En précisant les critères utilisés, identifier le pigment prélevé.