

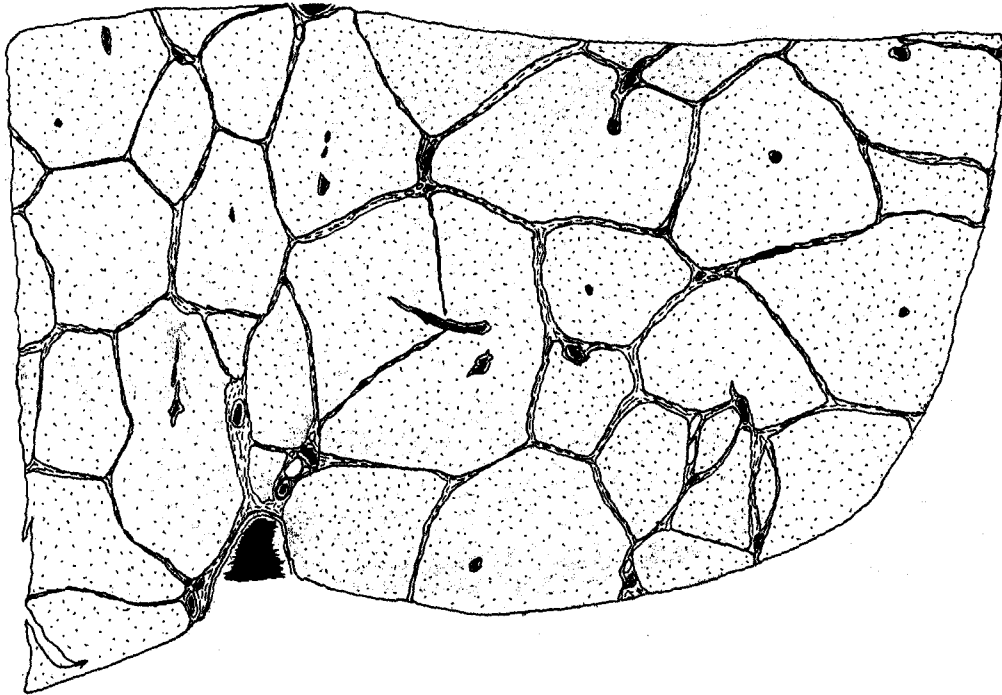
Etude d'une cellule animale : l'hépatocyte**Histologie (9 points)**

1. Donner la définition du grossissement d'un microscope.

Vous disposez d'un morceau de papier millimétré. Le placer sur la platine du microscope. Evaluer le diamètre du champ du microscope, en précisant le grossissement auquel vous travaillez.

A partir de cette mesure, calculer le diamètre du champ du microscope pour les autres grossissements. Vous donnerez les résultats sous forme de tableau récapitulatif et détaillerez le calcul dans l'un des cas.

2. A partir de l'observation de la coupe histologique de foie à votre disposition, légender le croquis ci-dessous et proposer un titre précis pour celui-ci. Vous indiquerez en particulier les différents tissus observés.



Réaliser un dessin de détail des hépatocytes, légendé et titré avec précision. Indiquer notamment le grossissement du microscope auquel vous avez effectué votre observation.

3. A l'aide des résultats obtenus dans la question 1, indiquer l'agrandissement du dessin réalisé dans la question 2 :

- sous forme de facteur multiplicateur
- sous forme de barre d'échelle.

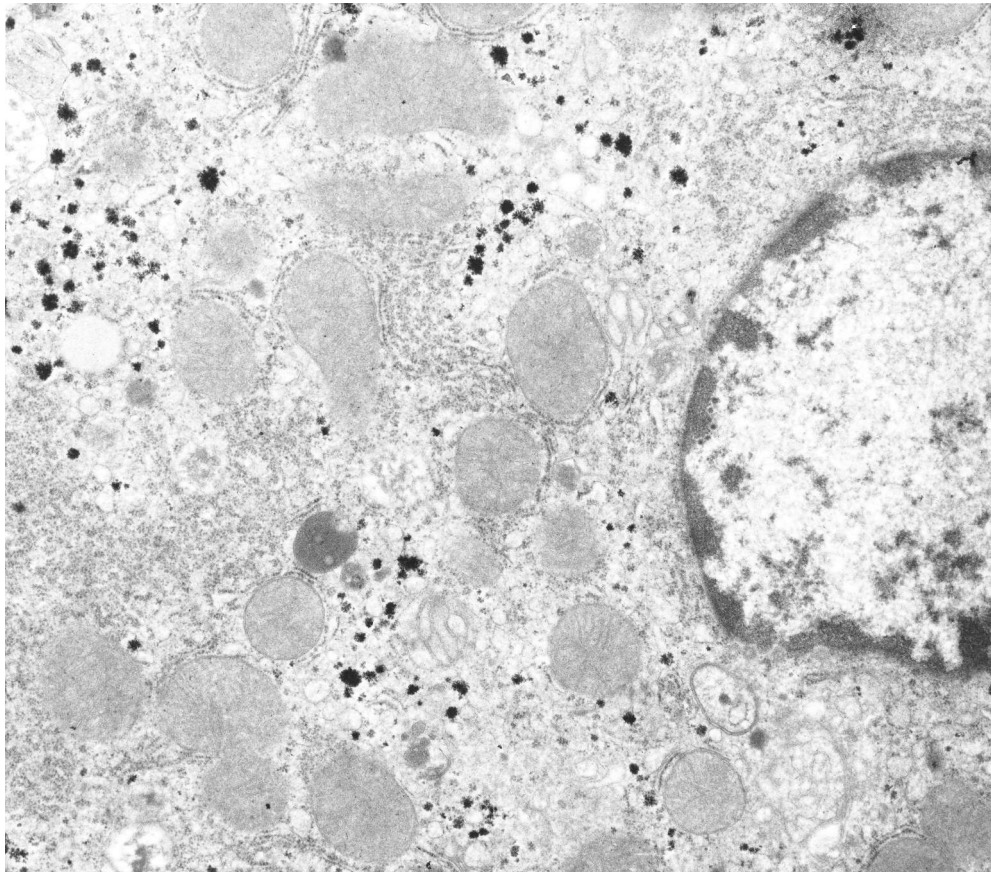
Calculer, en expliquant la méthode employée :

- la longueur moyenne des hépatocytes
- le diamètre moyen du noyau des hépatocytes.

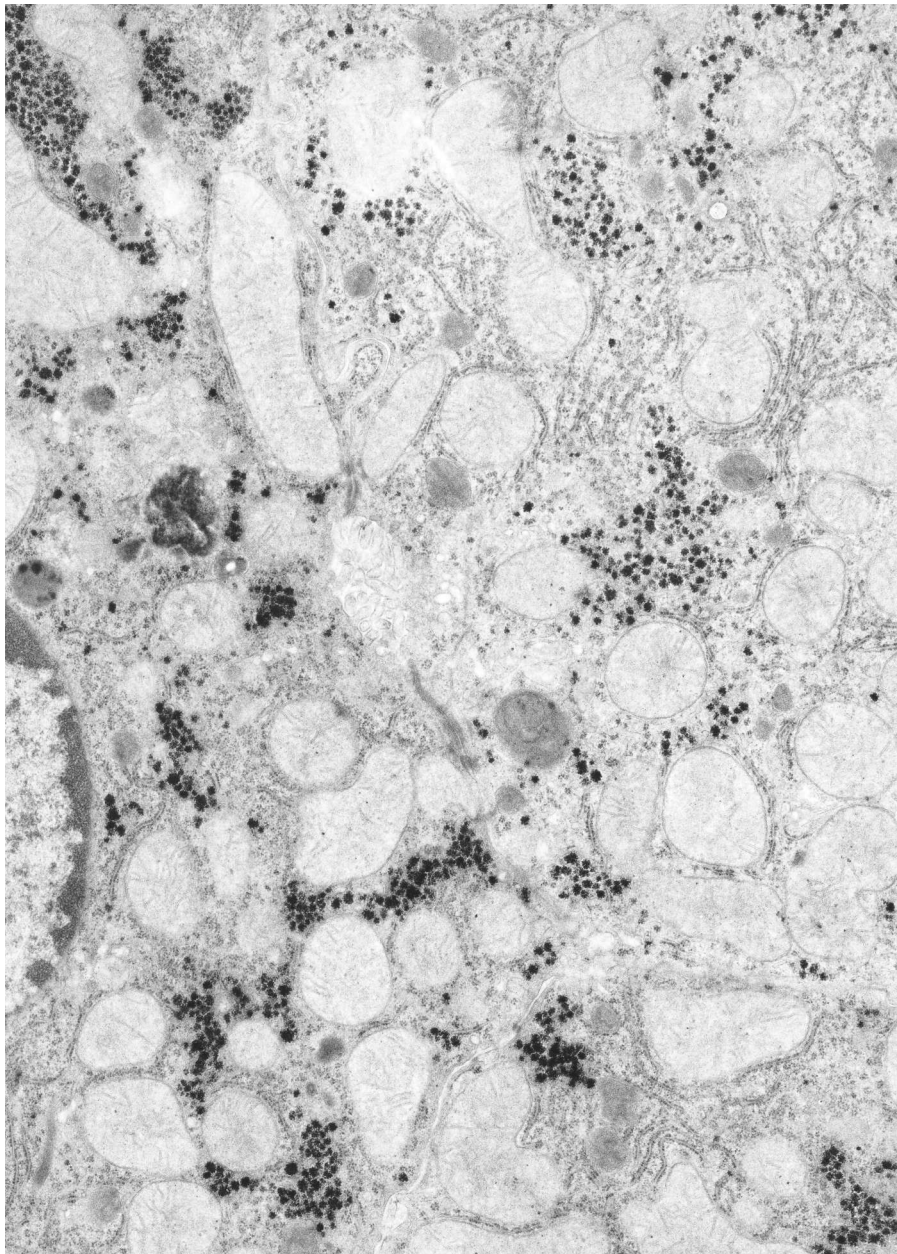
Cytologie (6 points)

1. *Légender soigneusement la micrographie électronique d'hépatocyte proposée.
Indiquer l'échelle de celle-ci sous forme de barre.
Dans un bref commentaire, signaler les caractéristiques marquantes de cette cellule.*

Micrographie n°1 (grossissement x12000)



Micrographie n°2 (grossissement x12000)



2. A partir des indications fournies, calculer :

- la longueur de l'hépatocyte
- le diamètre de son noyau
- la longueur et le diamètre de ses mitochondries.

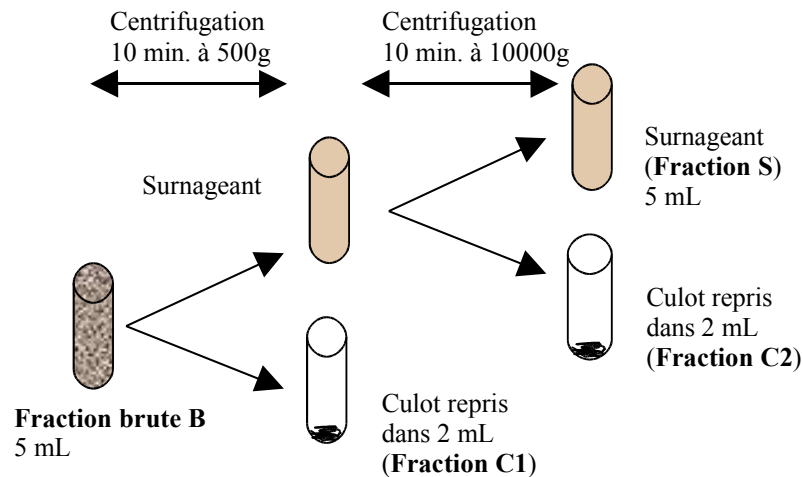
Comparer les valeurs obtenues avec celles de la question 3 de l'étude histologique précédente. Si des différences apparaissent, quelles hypothèses pouvez-vous avancer pour les expliquer ?

Biochimie (25 points)**Evaluation d'un protocole de purification de mitochondries de foie de volaille**Préparation des fractions :

Vous disposez de fractions préparées selon le protocole suivant ci-dessous.

Un extrait brut de foie de volaille a été réalisé par homogénéisation mécanique dans du tampon TEA.

5 mL d'extrait brut ont été centrifugés à 500 g pendant 10 minutes et le culot repris dans 2 mL de tampon TEA (fraction C1). Le surnageant a été centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes et le culot repris dans 2 mL de tampon TEA (fraction C2). Le protocole est résumé dans le schéma suivant :



Vous disposez de fractions aliquotes de l'extrait brut (B), des fractions C1 et C2, ainsi que du surnageant obtenu après la deuxième centrifugation (S).

1. Observation microscopique des fractions B, C1 et C2**1.1. Coloration spécifique des acides nucléiques au colorant de Giemsa**

Réaliser un frottis de chacune des fractions B, C1 et C2 (rappel de la technique ci-après) et le colorer selon le protocole suivant :

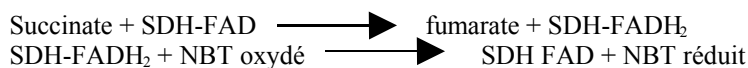
- Recouvrir la lame avec quelques gouttes d'éthanol 100%. Laisser agir 2 minutes.
- Eliminer le surplus d'éthanol et laisser sécher à l'air libre.
- Mettre 100 μ L de colorant de Giemsa dans 2 mL d'eau neutre. En recouvrir le frottis et laisser agir 5 minutes.
- Rincer la lame sous un jet doux d'eau neutre.
- Observer au microscope *puis appeler un examinateur*.

Technique de réalisation d'un frottis :

- Déposer 10 μ L d'une fraction à 1 cm de l'extrémité d'une lame posée horizontalement.
- Placer le bord d'une lamelle en contact avec la lame entre la goutte et l'extrémité de la lame.
- Faire glisser la lamelle inclinée à 45°, vers la goutte, jusqu'à la toucher.
- Laisser le liquide s'étendre par capillarité le long de l'arête de la lamelle.
- Tirer la lamelle d'un mouvement rapide et régulier sans trop appuyer en maintenant la même inclinaison : toute la goutte doit être étalée avant d'atteindre le bout de la lame.

2. Mesure de l'activité SDH des échantillons

Le marqueur choisi pour suivre l'enrichissement en mitochondries au cours du fractionnement est l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase (SDH), une enzyme à groupement prosthétique FAD liée à la membrane interne mitochondriale. Un accepteur artificiel d'électrons, le nitro bleu de tétrazolium (NBT) est utilisé pour détecter l'oxydation du succinate en fumarate. Le NBT oxydé est de couleur jaune et la forme réduite d'une couleur bleue qui présente un maximum d'absorption à 600 nm.



Réactifs et matériel :

- Succinate de sodium 100 mM
- Malonate 1 M
- NBT (Nitro Bleu de Tétrazolium) 0,5% dans le tampon TEA
- Tampon TEA (Triéthanolamine 15 mM, pH 7,5, saccharose 0,25 M, $MgCl_2$ 3 mM, NaCl 10 mM)
- Pipettes automatiques et cônes à usage unique correspondants
- Tubes à hémolyse
- Cuves de mesure spectrophotométrique
- Bain marie à 37°C
- Chronomètre.

Protocole :

- Dans des tubes à hémolyse, préparer 1 mL d'une dilution de chaque fraction au $1/10^{\text{ème}}$ dans du tampon TEA.
- Conserver ces dilutions sur de la glace.
- Préparer 12 tubes à hémolyse et réaliser les mélanges réactionnels **sur glace** en suivant les indications du tableau 1 joint.
- Homogénéiser et incuber les tubes 10 minutes au bain marie à 37°C.
- Arrêter la réaction en mettant les tubes **dans la glace**.
- Transvaser dans des cuves de lecture et lire l'absorbance à 600 nm contre le tube 0.
- Compléter le tableau joint à rendre avec le compte rendu.

Compte-rendu :**Frottis**

- Noter et commenter l'aspect des frottis colorés.
- A partir des valeurs du diamètre du champ du microscope précédemment obtenues (Histologie, question 1), évaluer la taille des constituants des fractions B, C1 et C2.
Ces tailles vous permettent-elles de vérifier la nature des fractions préparées ?

Activité SDH

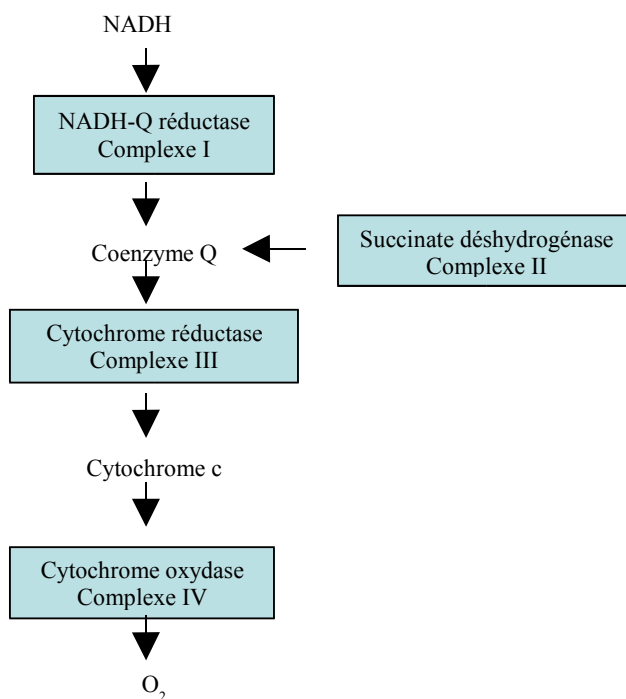
- Quels sont les substrats physiologiques de la SDH au sein de la chaîne mitochondriale ?
- Quelle est l'utilité du tube 0 ?
- Quelle est l'utilité des tubes 1, 3, 5 et 7 ?
- Interpréter après comparaison les résultats obtenus pour les tubes 8 et 9.
- Interpréter les résultats obtenus pour les tubes 10 et 11 (présence de malonate) par comparaison aux tubes 8 et 9 (absence de malonate).
Proposer un mode d'action du malonate sur la chaîne mitochondriale. Est-ce bien l'activité SDH que l'on mesure par cette méthode ?
- En admettant que c'est bien l'activité SDH qui est mesurée ici, calculer l'activité SDH de chaque fraction en variation d'unité d'absorbance à 600 nm (ΔA_{600nm}) par minute et par mL de fraction.
Calculer l'activité SDH totale des fractions B, C1, C2 et S en ΔA_{600nm} par minute. Compléter le tableau 2.

Evaluation de la méthode de purification

- Confronter l'analyse des frottis et les valeurs de l'activité SDH totale dans les fractions.
Observe-t-on un enrichissement en mitochondries dans l'une des fractions?
Comment pourrait-on améliorer le rendement de purification?
Comment pourrait-on améliorer la pureté de la fraction mitochondriale?

Données :

1. Schéma de la chaîne mitochondriale

2. Potentiels d'oxydoréduction standards E⁰' en volts

Oxydant	Réducteur	E ⁰ '
NAD	NADH ₂	-0,32
SDH-FAD	SDH-FADH ₂	0,01
Fumarate	Succinate	0,03
NBT oxydé	NBT réduit	0,08
Cytochrome c oxydé	Cytochrome c réduit	0,22
O ₂	H ₂ O	0,82

3. Formules développées

Succinate	-OOC-CH ₂ -CH ₂ -COO-
Malonate	-OOC-CH ₂ -COO-

Tableau:1 Mesure de l'activité SDH des fractions par spectrophotométrie

TUBE	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tampon TEA (μL)	800	900	700	900	700	900	700	900	700	800	600	700
Solution de malonate 1 M (μL)											100	100
Solution de succinate 100 mM (μL)	100		100		100		100		100		100	
Solution de NBT 0,5 % (μL)	100		100		100		100		100	100	100	100
Fraction C1 diluée 10 fois (μL)		100	100									
Fraction C2 diluée 10 fois (μL)				100	100							
Fraction S diluée 10 fois (μL)						100	100					
Fraction B diluée 10 fois (μL)								100	100	100	100	100
A600nm	0											

Tableau 2 : Activité succinate déshydrogénase des fractions

	Activité SDH ($\Delta A_{600nm} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ de fraction)	Volume total (mL)	Activité SDH totale ($\Delta A_{600nm} \cdot \text{min}^{-1}$)
Fraction B		5	
Fraction C1		2	
Fraction C2		2	
Fraction S		5	

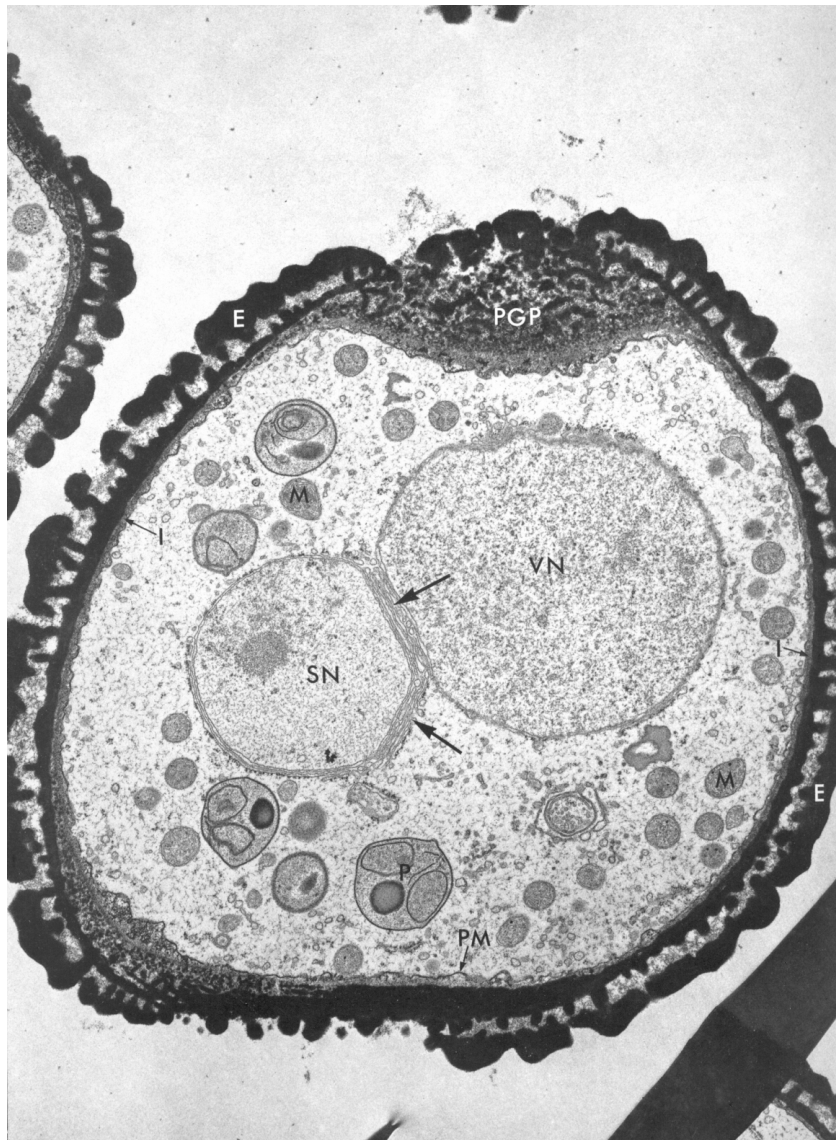
Etude et analyse d'échantillons végétaux (20 points)

Vous disposez d'une plante fraîche, d'une coupe histologique de bouton floral, d'un document photographique.
Réaliser :

- 1.** *Une analyse florale de la plante fraîche (traduite par un texte concis, une formule florale, un diagramme floral, une coupe longitudinale)*
- 2.** *Un schéma d'ensemble de la coupe histologique.*
- 3.** *Une étude comparée des deux échantillons qui sera traduite dans le tableau ci-dessous.*

	Plante fraîche	Coupe de bouton floral
calice		
corolle		
androcée		
gynécée		

- 4.** *Déterminer avec la flore : la famille, le genre, l'espèce de la plante fraîche.*
- 5.** Le document photographique proposé est un élément fortement grossi de la coupe histologique de bouton floral.
 - *Par quelle technique ce document a-t-il été obtenu ?*
 - *Dans quel organe le rencontre-t-on ?*
 - *Au moyen du calque fourni réaliser un schéma soigneusement légendé, titré, avec une échelle graphique.*



6. Nous avons disposé côte à côte une classification classique des Angiospermes et une classification phylogénétique récente.

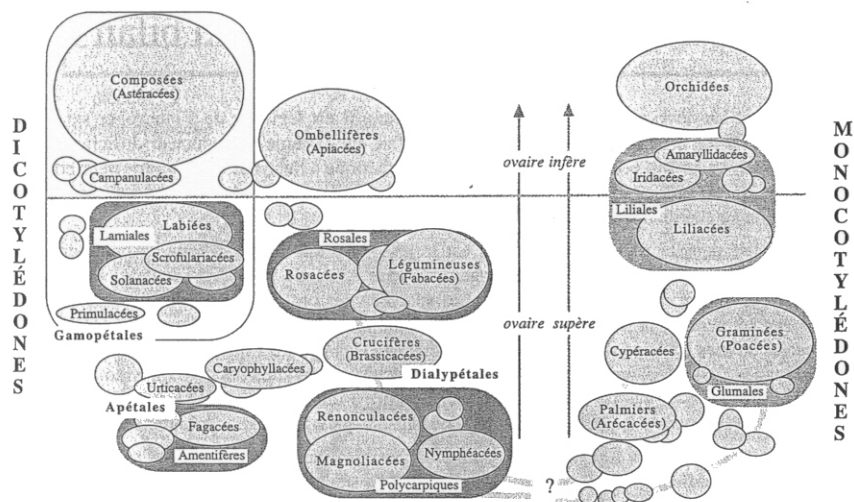
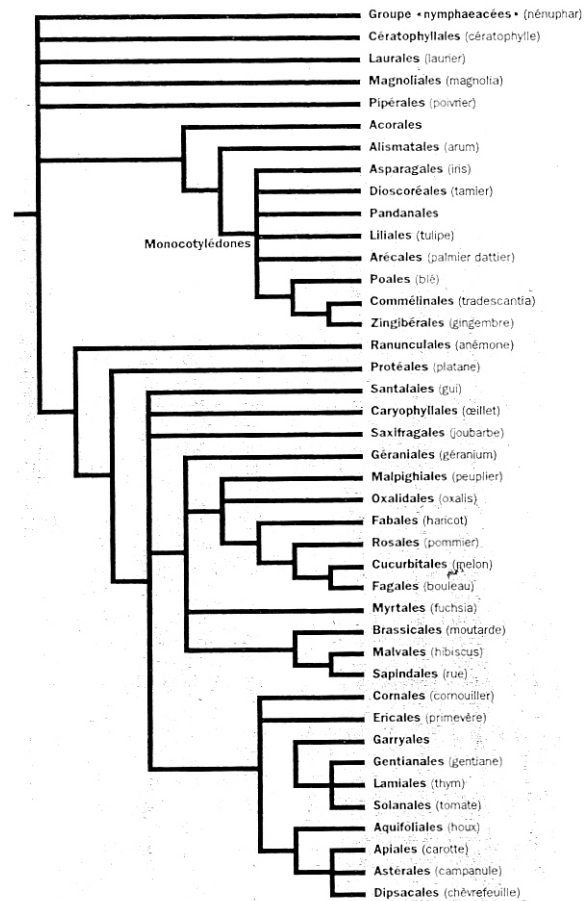


Schéma récapitulatif des sous-ensembles d'Angiospermes, situation de quelques grandes familles



Cladogramme des

[APG, 1998]

Angiospermes, redessiné d'après

- Sur quelles analyses repose essentiellement la classification phylogénétique ?

- Quelles sont les familles dont la position systématique a peu varié et celles où elle a été bouleversée ?

Dans la classification phylogénétique ce sont les ordres (désinence -ales) qui sont indiqués, mais ils contiennent obligatoirement les familles correspondantes.