

*République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de
l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

Université Dr Moulay Tahar Saida

Département de Biologie

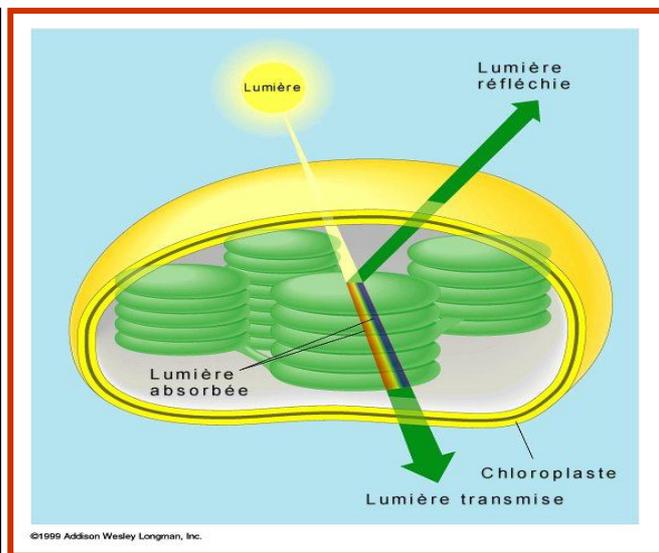
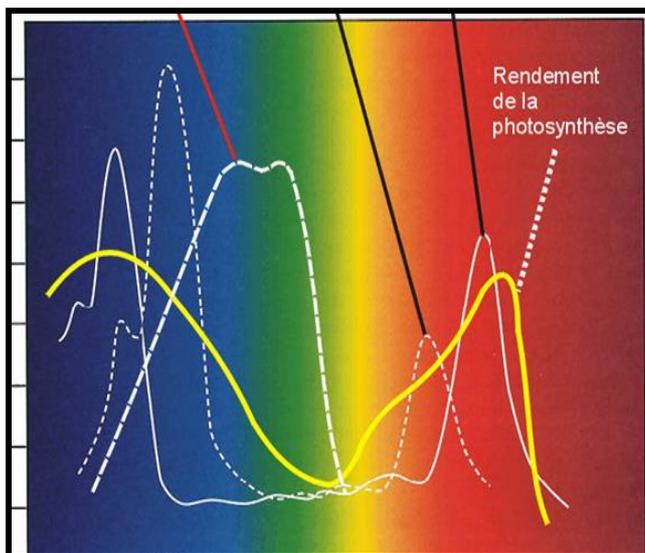


Polycopie de cours

Travaux pratique de physiologie végétale

Présenté par

Dr CHALANE FATIHA



2020-2021

Table de matière	Page
I. Nutrition hydrique	01
1. Osmose	01
1.1. Mise en évidence par la plasmolyse	01
2. Potentiel hydrique (méthode des frites)	03
3. La Transpiration	04
3. 1. La mise en évidence du siège par le chlorure de cobalt	05
4. Observation du comportement des stomates	06
II. Nutrition Minérale	09
1. Etude de la germination	09
2. Germination sur substrat terreau	09
2.1. Pouvoir germinatif	10
2.3. Germination et stress salin	11
III. Nutrition Azotée	12
1. LA forme de symbiose	12
IV. Nutrition carboné	15
1. Nécessité du dioxyde de carbone	15
2. L'effet de la température sur la respiration des végétaux supérieurs	17
2.1. Mise en évidence de l'émission de dioxyde de carbone	17
3. Respiration et fermentation	19
3.1. Respiration utilisation du dioxygène	19
4. Mise en évidence Production de dioxyde de carbone	21
5. Mise en évidence de la Synthèse de l'amidon par les feuilles	23
6. Mise en évidence de la Synthèse d'amidon par les chloroplastes	25
7. Pigments photosynthétique	28
7.1. Extraction de la chlorophylle	30
7.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)	31
7.3. Extraction à partir d'une feuille verte (exemple: pélargonium).	32
7.4. Extraction à partir d'une feuille à coloration dominante rouge	34

(exemple: prunus).

7.5. Fluorescence de la chlorophylle 36

8. Caractérisation des protéines (réaction xanthoprotéique) 37

9. Caractérisation des protéines (réaction du biuret) 38

Références

Préface

L'enseignement de la physiologie végétale a pour but de permettre aux étudiants d'acquérir des connaissances fondamentales sur le monde expérimental de la physiologie végétal. Il est devenu une nécessité dès le début de carrière d'un étudiant universitaire dans le domaine de «Sciences de la Nature et de la vie». Il présente un véritable passage obligé pour le tronc commun pour les différentes spécialités de science agronomie, pharmacie, sciences biologique et particulièrement dans les spécialités du domaine végétal (écologie végétale, biologie et physiologie végétale) et en fin à tous ceux qui s'intéresse à l'étude scientifique des végétaux et à leur organisation. Ce polycopié de cours représente le programme des travaux pratiques de la physiologie végétale.

I. Nutrition hydrique

1. Osmose

Phénomène de diffusion entre 2 liquides miscibles, à différentes concentrations, séparés par une membrane. Si la membrane est semi-perméable, le solvant va du compartiment le moins concentré en soluté vers celui qui est plus concentré. Si la membrane est perméable, en plus des mouvements de solvant, le soluté va du compartiment le plus concentré en soluté vers celui qui est moins concentré.

Lorsque le suc vacuolaire est moins concentré que la solution du milieu extérieur (on parle de milieu hypotonique), la cellule est plasmolysée, s'il est plus concentré (milieu hypertonique) que la solution du milieu extérieur, la cellule est turgescente. Lorsque les deux milieux, externe et vacuolaire, ont une concentration en soluté équivalente les milieux sont dits isotoniques.

1.1. Mise en évidence par la plasmolyse

Matériel

Bulbe d'oignon, solutions de Saccharose.

Le mesure du volume vacuolaire et osmose en utilisant des cellules colorées d'épiderme de radis ou d'oignon violet, il sera aisé grâce aux pigments vacuolaires de déterminer la concentration vacuolaire en condition normale dans le végétal.

Réalisez les solutions (5 mL de chaque) de concentrations molaires variées à l'aide d'une solution de saccharose à 1 mol.L⁻¹. (à préparer).

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Saccharose. Molaire 342G/L	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
H2Oml	20	18	16	14	12	10	8	6	4	2	0
Concentration Molaire	0	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10	10/10
Etat de la cellule											

1.2. Expérience 2

- Mettez un peu de chacune de ces solutions dans des coupoles numérotées de 1 à 11 comme les tubes.
- Disposez dans chaque coupole quelques coupes tangentielles d'épiderme coloré d'oignon, Attendez 30 minutes.
- Examinez les différentes coupes au microscope en ayant soin de monter les coupes entre lames et lamelles dans une goutte du liquide où elles ont séjourné.
- Observez l'état des cellules dans chaque solution dessinez l'état de la cellule

Résultat

Confrontée à une solution externe de concentration supérieure à la sienne, le protoplasme diminue de volume. La membrane plasmique se sépare progressivement de la paroi. Pendant un certain temps, elle reste accrochée par endroits par de fins tractus cytoplasmiques (fig 01)

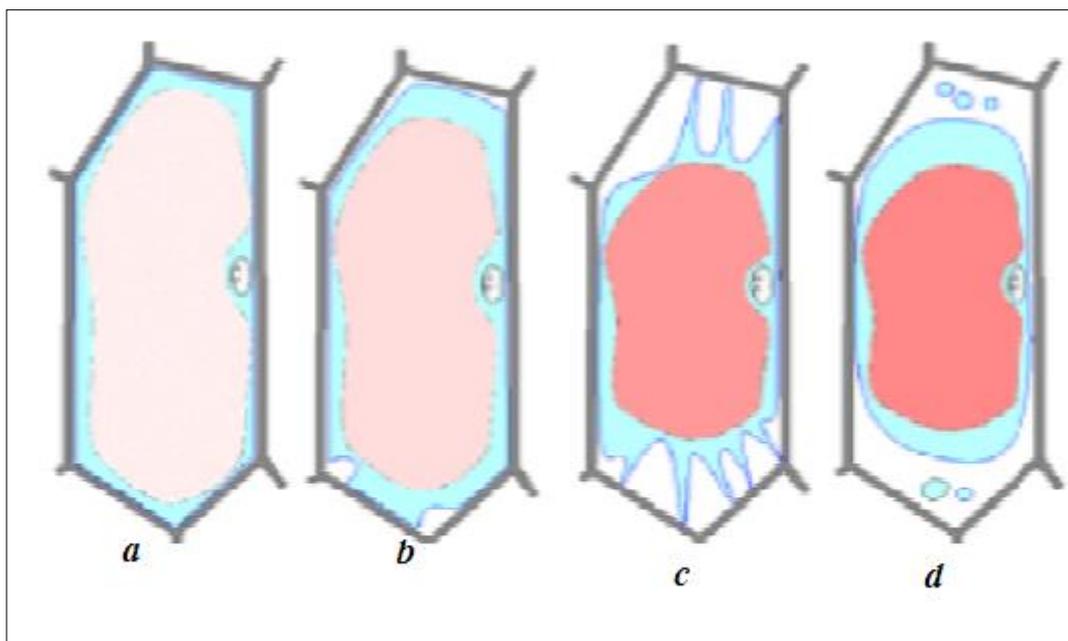


Figure 01 : représentation schématique des stades de la plasmolyse d'une cellule d'épiderme d'oignon placée dans une solution 0,6M de saccharose.

-**a** turgescence; **b** plasmolyse commençante; **c** plasmolyse la membrane plasmique reste attachée par de fins tractus ou plasmodesmes à la paroi; **d** plasmolyse complète

2. Potentiel hydrique (méthode des frites)

Matériel

- Tubercule de pomme de terre.
- Solution de saccharose.
- Papier millimétré, tubes à essai.

Protocole

Dans une pomme de terre :

- Taillez 11 frites exactement identiques.
- Pesez chacune d'entre elles 1 gramme.
- Préparer 11 tubes contenant respectivement 12 ml d'eau (tube 1) ou de solution de saccharose à 0,1M, 0,2M, 0,4M 0,6M et 1 M (tubes 1 à 11 fig 02).
- Placez une frite dans chacun des tubes en vérifiant qu'elles sont bien immergées. Attendez 1h30 puis Notez leur consistance.
- Essuyez-les et pesez-les à nouveau.
- Construisez la courbe figurant les variations de longueur de chaque frite en fonction de la concentration en saccharose.
- Interprétez vos résultats (un raisonnement rigoureux est attendu)

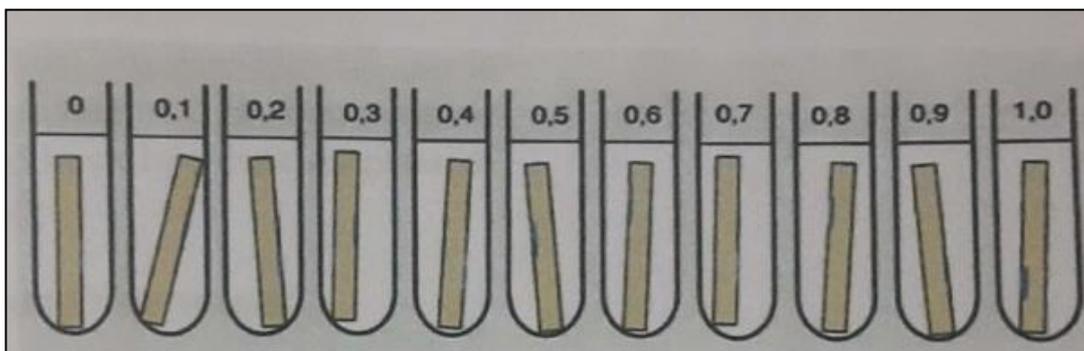


Figure 02 : Disposition des frites dans les solutions croissantes de saccharose

Résultat

On observe un allongement ou un rétrécissement qui peut atteindre 5mm soit 10%, soit la longueur initiale et L_x la longueur finale, la variation relative de longueur est donnée par la formule:

$$L = (L_x - L_0 / L_0) \times 100$$

Sur le graphe obtenu à partir de ces valeurs, on peut déterminer la concentration molaire de saccharose (flèche rouge) qui ne provoque aucune variation de volume et donc qui a le même potentiel hydrique que le morceau de tubercule de pomme de terre. La rupture de pente (flèche noire) indique la concentration qui provoque la plasmolyse limite, donc celle qui présente la même pression osmotique que l'échantillon. Cette dernière valeur est difficile à déterminer avec précision, ce qui est dommage car la différence entre les deux valeurs (suction et pression osmotique) représente la pression de turgescence de l'échantillon.

3. La Transpiration

Observer l'émission aérienne d'eau directement (par condensation) ou indirectement par perte de masse.

Matériel

- Pélargonium « lierre » ou toute autre plante à feuilles glabres non adaptée à la sécheresse et bien arrosées
- Solutions de chlorure de cobalt.
- Papier-filtre à texture fine, ruban adhésif.

Protocole

- Préparation du papier au cobalt
- imbiber une feuille de papier filtre (1/2 A4), avec une solution bien rose de chlorure de cobalt.
- Laisser sécher (étuve sèche à 80°C ou radiateur, si possible).
- Le papier sec devient bleu vif.

Remarque

Si la pièce est très humide, le papier peut prendre une couleur intermédiaire et irrégulière qui rendra difficile l'interprétation.

- Découper des carrés de papier au cobalt de 1×1 cm.
- Placer un carré de papier sur la feuille Pélargonium « lierre » et le coller avec du ruban adhésif de manière qu'il n'ait plus aucun contact avec l'atmosphère.
- Faire cette opération sur les faces supérieure et inférieure de la même plante
- Attendre 1h, observer.

Résultat

Le papier bleu redevient progressivement rose : le chlorure de cobalt sec a donc été réhydraté. Si le montage était bien hermétique, l'eau ne peut venir que de la feuille. Cela pourra être mis en relation avec la densité stomatique (fig 03).

On observe souvent (cela dépend de la plante utilisée) une action plus rapide sur la face inférieure. Cela pourra être mis en relation avec la densité stomatique.

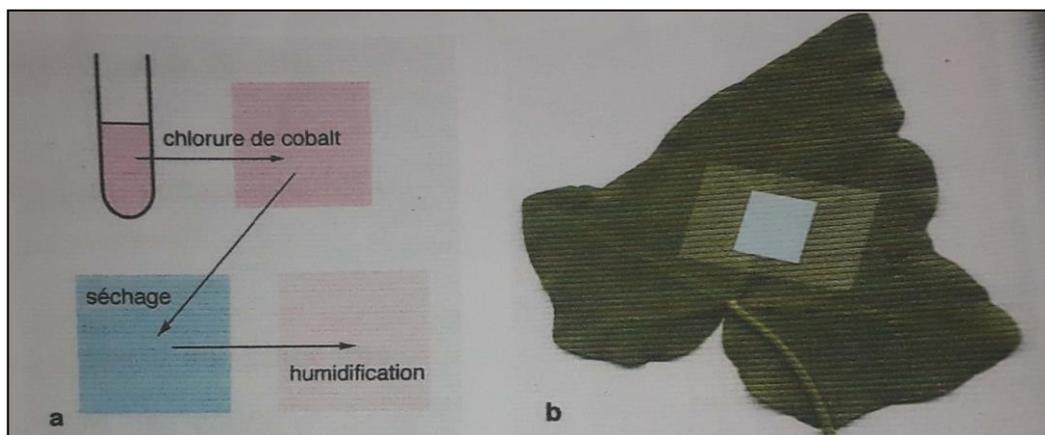


Figure 03: mise en évidence de la transpiration au niveau des feuilles, **a:** préparation du papier au cobalt. **b:** Placement du papier sur une feuille.

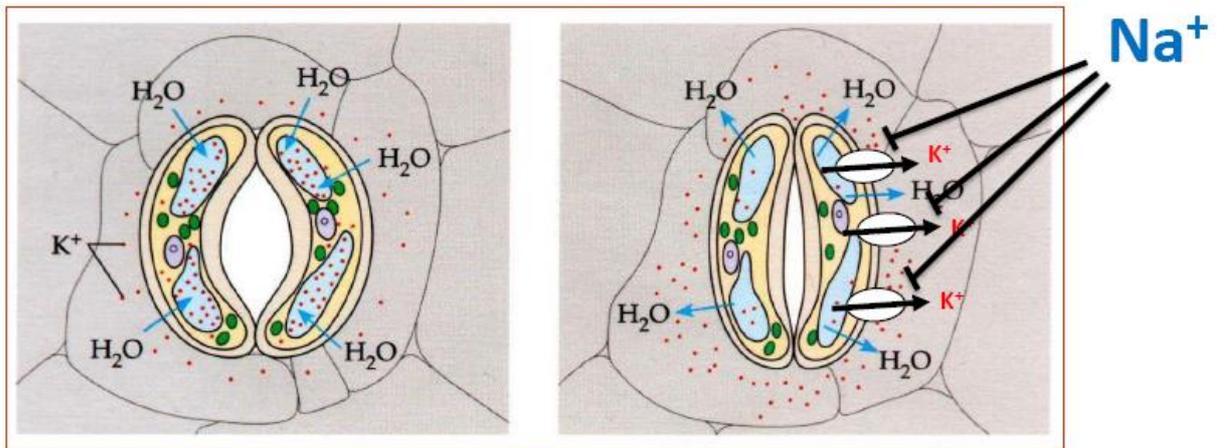


Figure 04: Contrôle de la transpiration au niveau des stomates

4. Observation du comportement des stomates

Les stomates sont au niveau de l'épiderme des feuilles et des tiges aériennes, le lieu de passage des gaz (dioxyde de carbone, dioxygène, vapeur d'eau) qui jouent un rôle fondamental dans la physiologie de la plante. Ces structures (que l'on peut considérer comme des "mini-organes" permettent de manière interactive de réguler ces échanges. Ce sont elles qui, chez les plantes terrestres constituent la véritable interface entre l'atmosphère externe et le réseau gazeux interne.

Objectif

Modifier les conditions de lumière du milieu (lumière, obscurité) et observe le comportement des stomates.

Matériel

- Microscope, Lames, Ruban adhésif, Vernis incolore.
- Feuilles de Pélagonium placées à la lumière et à l'obscurité.

Protocole

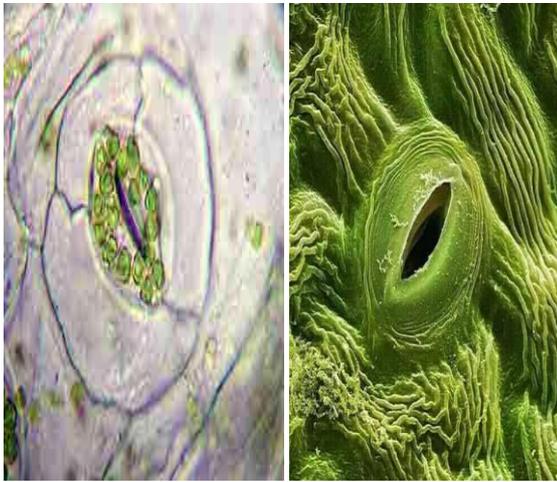
- Etaler une goutte de vernis incolore sur une surface de 0,5cm de diamètre sur la face inférieure de la feuille placée à l'obscurité.
- Répéter l'opération sur la face inférieure et supérieure de la feuille exposée à la lumière.
- Faire sécher les feuilles quelques minutes.
- Quand le vernis est sec, décoller la pellicule ainsi formée avec un ruban adhésif.
- Coller chaque ruban sur une lame Observer au microscope.

Résultat

Selon les conditions, l'ostiole apparaît clairement fermée (fig,A(fig5).) Stomate de feuille de Bégonia (*Begonia cucullat* Wild.) vu de face. Il est constitué de deux cellules de garde chlorophylliennes limitant une ouverture : l'ostiole.

Le stomate est entouré de trois cellules compagnes puis de cellules épidermiques banales. Remarquons que seules les cellules de garde des stomates possèdent des chloroplastes.

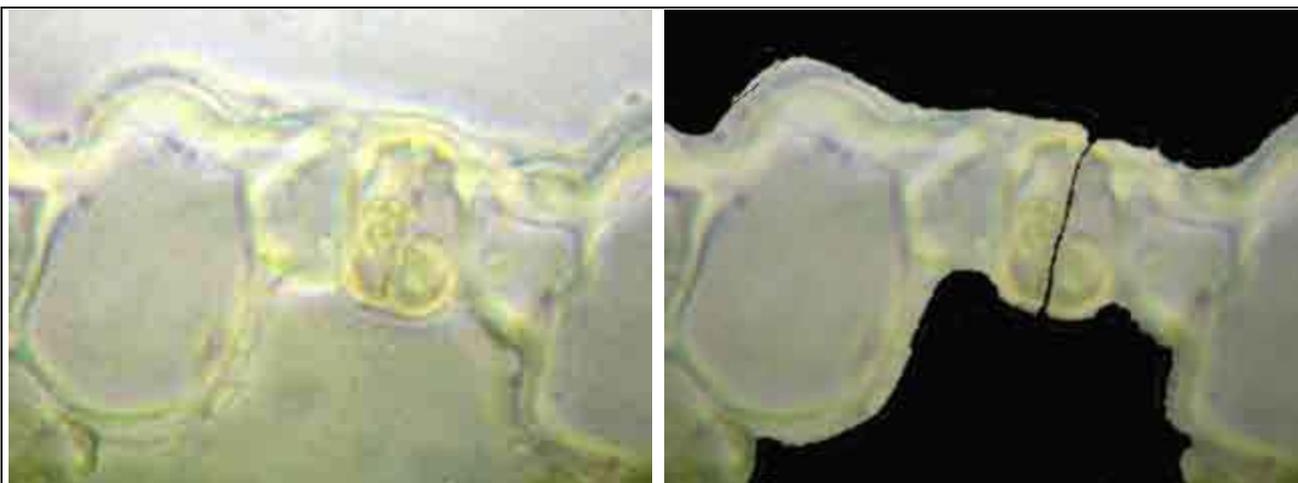
(Fig,B(fig5).), Stomate de feuille d'Erigéron vu de face. L'ostiole dans ce cas paraît ouvert



A plante à la lumière, les stomates sont ouverts

B plante à l'obscurité, les stomates sont fermés.

Figure 05: Observation du comportement des stomates



Stomate de feuille de Sétaire vue en section. On reconnaît les deux cellules de garde entourées par deux petites cellules compagnes.

l'espace sous-stomatique, tous les deux gazeux, sont séparés par le stomate. Il est ici fermé et un fin liseré noir (dessiné artificiellement) indique le passage possible des gaz.

Figure 06: l'organisation d'une feuille. Le stomate est ici dessiné ouvert

II. Nutrition Minérale

1. Etude de la germination

La germination est considérée comme étant le passage d'une semence inerte (vie ralentie) à une jeune plantule autotrophe. Les processus physiologiques qui se déroulent pendant cette phase sont très complexes. Cependant, l'activité peut se mesurer par le biais de plusieurs facteurs, principalement : imbibition et respiration.

1.2. Germination sur substrat terreau

Matériel

- Graines de pois.
- Caryopses de maïs.
- Petit pois.
- Lentille.
- Hypochlorite de sodium (eau de Javel).

- Barquettes pour préparations alimentaires.
- Terreau.

Protocole

- Préparer les pots a germination en plaçant 2 cm de terreau dans une barquette.
- Ajouter de l'eau jusqu'a ce qu'elle affleure sur le cote.
- Laver les graines à l'hypochlorite de sodium pendant 5 min puis a l'eau courante et laisser
- imbiber 1 h (cette précaution est plus ou moins nécessaire selon l'origine des semences).
- Mettre a germé: Disposer les graines régulièrement a la surface du terreau.
- Recouvrir d'une feuille de papier filtre ou d'un mouchoir en papier humidifié.
- Placer a l'obscurité.
- Attendre de 3 a 10 j selon le type de semences et la température de la pièce étudier les étapes de la germination.
- Distinguer les différents types de germinations obtenues.
- Comparer la morphologie et la taille aux différents stades.
- Pour chaque lot, peser 10 semences (éliminer les semences restées sèches)

1.3. Pouvoir germinatif

Protocol

- Mettre 10 graines de chaque variétés dans une boite de pétri couverte de papier filtre imbiber le papier et recouvrir les graines par un autre papier imbibe d'eau.
- Fermer la boite de pétri et marquez la. Laissez vos boites de pétri sur les paillasses de cote et revenir les voir après 24h, 48 h et 72 h pour noter vos observations. A chaque fois comptez le nombre de graines germées.
- Déterminer a chaque fois le % de gémiation et tracer pour les variétés étudiées une courbe qui correspond aux variations de la germination en fonction du temps.
- Commentez vos résultats et donnez plus tard les copies

Calculer le taux de germination d'un lot de semence

Ex.: 24 graines germées sur 30 au total :

- le taux de germination est donc de 80 %.

Le taux de germination en % = Nombre de semence germées X 100 / Nombre de semence testées

1.4. Germination et stress salin

Protocole

Préparation des boites de pétri et semis:

Les boites de pétri utilisées sont des boites stériles de 19 cm de diamètre et de 3cm d'épaisseur, dans chacune des boites, nous avons placé 10 graines sur du coton imbibé de solutions salines de différentes concentrations. Le nombre de répétition était de cinq boites pour chaque traitement.

Les boites de pétri sont placées en salle de culture, où les principaux paramètres (température, photopériode hydrométrie) ont permis d'assurer un bon environnement à la culture.

Les graines sont choisies selon la taille et l'état sanitaire. Elles sont séparées manuellement des valves fructifères, ensuite stérilisées par un séjour de 15 minutes dans l'hypochlorite de sodium à 10 % puis rincées au moins 5 fois à l'eau distillée stérile afin d'effacer toute trace d'hypochlorite de sodium.

Quantité à semer = 100 X Nombre de plants désirés/Pourcentage de germination

Préparation des solutions salines

En mélangeant deux sels différents : le chlorure de sodium (NaCl) et le chlorure de calcium (CaCl₂) à volume égal (V / V) préparées dans un litre d'eau distillée six concentrations différentes (100, 200, 300, 400, 500, 600 meq.l⁻¹) et un témoin préparé à base d'eau distillée (0meq.l⁻¹).

Les données ci dessous nous montrent la composition de la solution saline.

Tableau - composition de la solution saline

Meq.L ⁻¹	100	200	300	400	500	600
NaCl (mM)	100	200	300	400	500	600
g/l	5,84	11,68	17,53	23,37	29,22	35,06
CaCl ₂ (mM)	100	200	300	400	500	600
g/l	5,54	11,08	16,64	22,19	27,74	33,29

III. Nutrition Azotée

1. LA forme de symbiose

Il existe essentiellement 2 sortes de bactéries fixatrices d'azote: les formes libres (Azotobacter p.ex.) et des formes symbiotiques (*) comme Rhizobium, associées aux légumineuses et à certains arbres (aulnes ...). Depuis l'Antiquité, les légumineuses (haricots, trèfle, luzerne ...) sont connues pour leur faculté d'améliorer les sols, car elles fixent l'azote de l'air. En réalité, cette fixation est due à des bactéries du genre Rhizobium leguminosarum, présentes dans les nodosités (**) des racines.

Matériel

- Racines de haricot ou de glycine (par ex.) avec nodosités.
- Microscope, lames, lamelles, aiguille lancéolée, iode, bleu de méthylène, rouge neutre.

Protocol

Avec l'aiguille lancéolée, on prélève un petit fragment d'une nodosité et on fait un premier écrasement avec le plat de l'aiguille.

On ajoute une goutte de colorant et, après 2 minutes environ, on place la lamelle et on procède à un nouvel écrasement en appuyant délicatement sur la lamelle avec le manche de l'aiguille.

Prélèvement

- Rhizobium bactérie fixatrice.
- Coloration et écrasement du fragment de nodosité.
- observation au fort grossissement.
- Observation des nodosités couleur et forme au binoculaire.

- Mesure de la longueur de la plante qui porte des nodosités (leurs formes et couleurs) comparaison et mettre la relation entre l'âge de la plante et la fixation de l'azote atmosphérique.
- Coupe au niveau des nodosités afin de voir les rhizobiums colorés.
- L'observation au microscope de ces bactéries montre 3 aspects morphologiques différents :
 - des formes jeunes, allongées, très mobiles.
 - des formes adultes, ramifiées en Y, qui fixent activement l'azote de l'air et produisent des sécrétions azotées utilisées par la plante.
 - des formes vieilles, ovoïdes, progressivement digérées par la plante.
- (*) La symbiose est une association entre 2 êtres vivants, à *bénéfice réciproque*. Dans le cas que nous étudions, Rhizobium prélève dans la plante les glucides nécessaires à sa nutrition carbonée, tandis que la plante profite des substances azotées produites par la bactérie
- (**) Nodosité: renflement présent sur les radicelles, dont le parenchyme central est fait de cellules géantes envahies par des bactéries (tissu bactérien). De grosses cellules déformées, contenant une quantité importante de bactéries du genre Rhizobium.
- Des grains d'amidon fortement colorés en bleu si l'on a utilisé l'iode.
- Avec le rouge neutre, on peut voir bouger certaines de ces bactéries (elles sont munies d'un cil non visible)

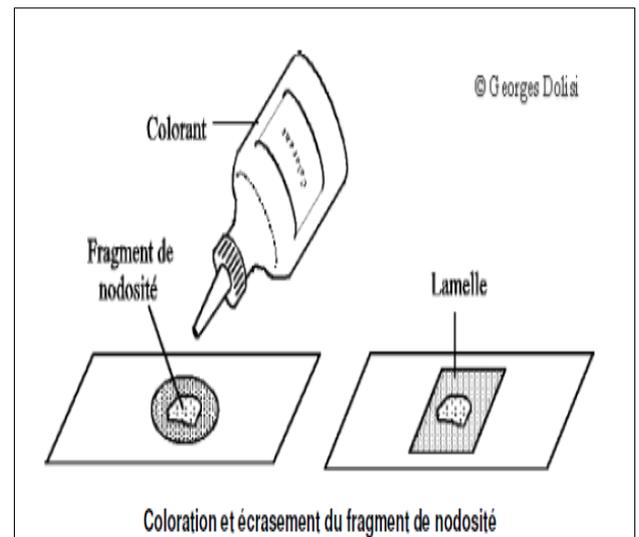
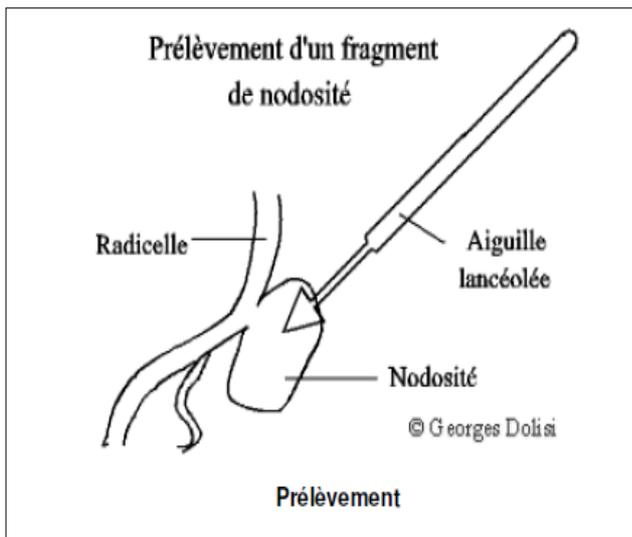


Figure 07: la méthode de prélèvement et la coloration du fragment de nodosité

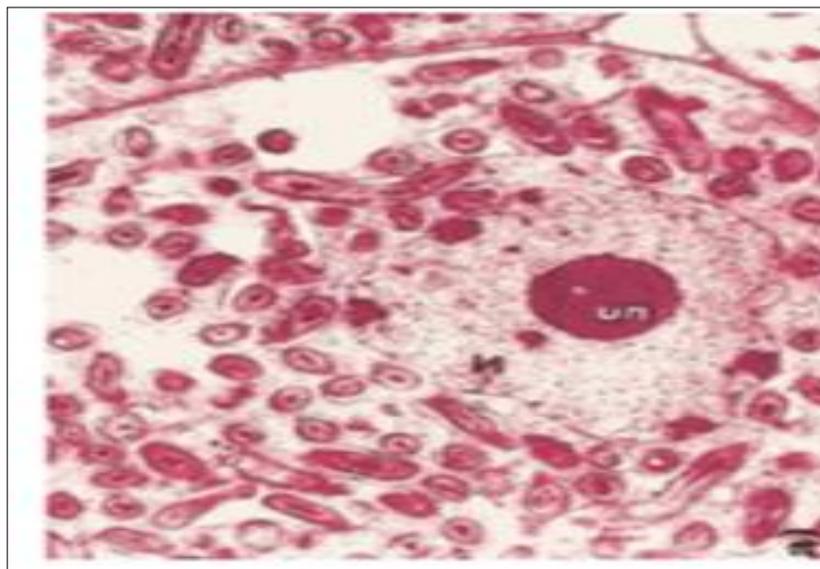


Figure 08 : observation microscopique des bactéries du genre rhizobium

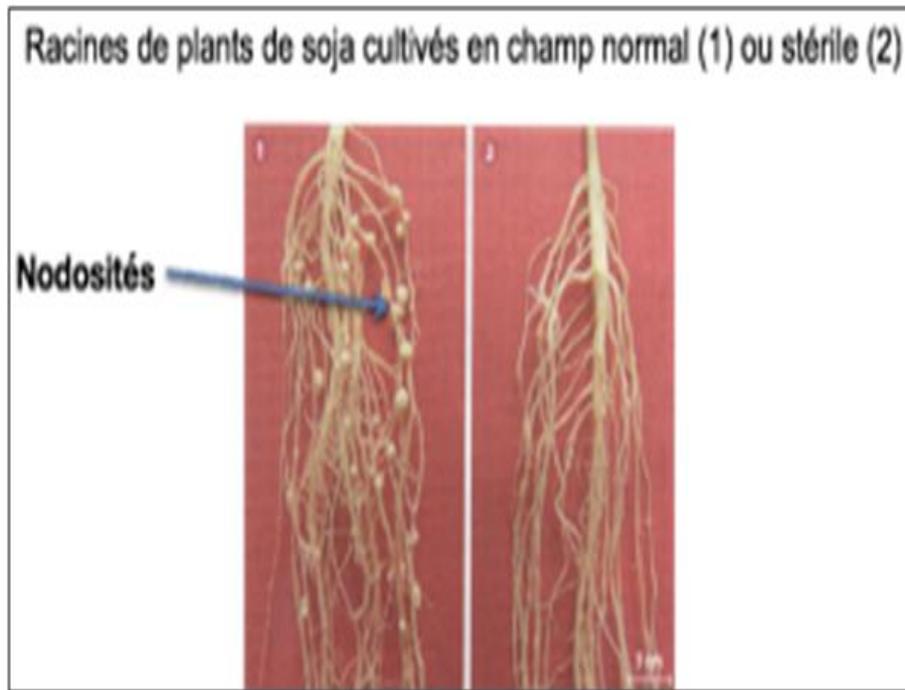


Figure 09: Observation microscopique des nodosités au niveau des racines

IV. Nutrition carboné

1. Nécessité du dioxyde de carbone

La production de dioxygène par une plante verte nécessite une source de carbone.

Matériel

- une plante aquatique, l'élodée du Canada.
- Les plantes sont placées dans de l'eau du robinet et recouvertes par un entonnoir et un tube à essai remplis d'eau.
- La cuve d'eau froide entre la lampe et le bac d'élodées permet d'éviter une élévation de température

Protocole

- Placer des élodées dans les dispositifs contenant de l'hydrogénocarbonate à 1%. Placer une cuve remplie d'eau froide entre la lampe et le bac à élodées afin d'éviter un élévation de température.
- Observer le dégagement de gaz dans le tube à essai après 2h.

- Vérifier qu'il s'agit de dioxygène avec une ficelle ou une brochette enflammée, éteinte puis plongée encore incandescente dans le tube en évitant de la mouiller
fig 10

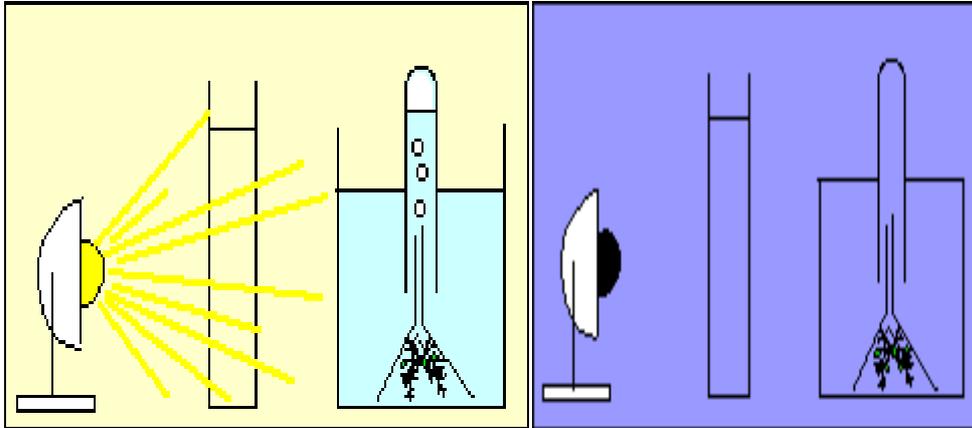


Figure10: Dégagement de gaz par les - Pas de dégagement de gaz à l'obscurité. élodées après deux heures d'éclairement.

La même expérience est réalisée en présence d'eau distillée (A), d'eau du robinet (B) et d'une solution de dihydrogénocarbonate de sodium (C).

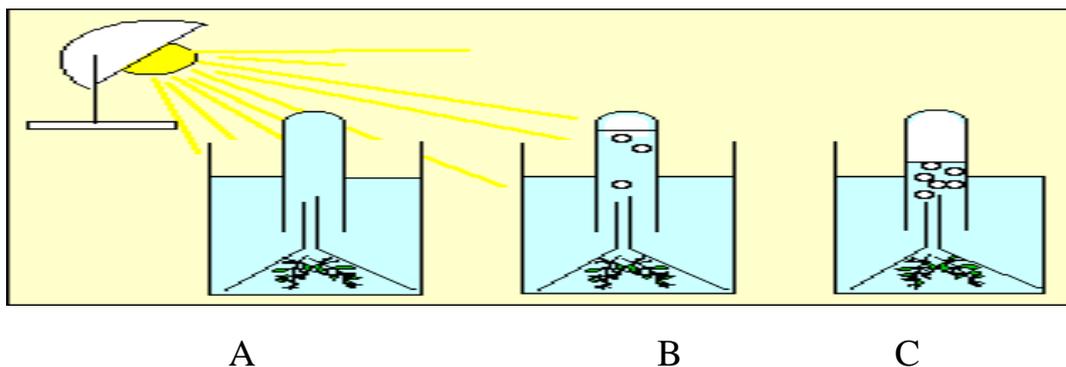


Figure 11: influence de la présence de CO_2 sur le dégagement d' O_2 , **A** l'eau distillée ; **B** eau de robinet **C** eau distillée additionnée d'hydrogénocarbonate de sodium.

Le dégagement de gaz est plus important en présence de dioxyde de carbone. Pour caractériser ce gaz, une baguette de bois enflammée puis éteinte (extrémité encore

incandescente) est plongée dans un tube de dégagement. La baguette se rallume, il s'agit de dioxygène

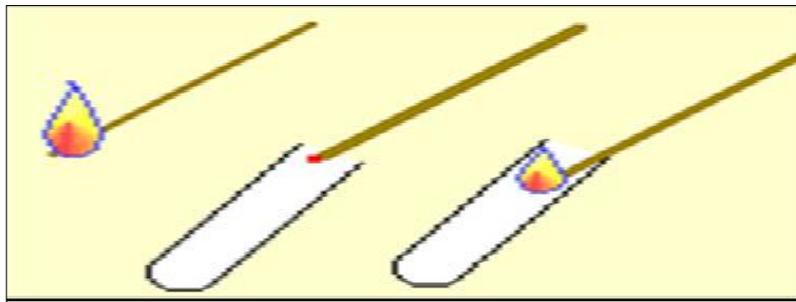


Figure 12: Mise en évidence de la nature du gaz dégagé (oxygène)

Conclusion

Une plante verte dégage du dioxygène à la lumière. Ce phénomène dépend de l'intensité lumineuse, de la température et de la présence de dioxyde de carbone.



L'animation ci-dessous permet de faire varier les différentes solutions d'incubation

2. L'effet de la température sur la respiration des végétaux supérieurs

2.1. Mise en évidence de l'émission de dioxyde de carbone

Introduction

La production de CO_2 (équimolaire de la production d'oxygène) devrait être un paramètre de mesure intéressant mais à cause de sa faible concentration dans l'air (0,035%) sa mesure réelle nécessite des capteurs infrarouges particulièrement coûteux.

Le CO_2 de l'air est en équilibre avec le CO_2 dissout dans l'eau. Le pH de la solution est fonction de la concentration en CO_2 de la solution si aucun paramètre n'intervient. La respiration dépend de la concentration en O_2 dans l'atmosphère et la température ambiante.

Matériel

- Erlen de 250mL avec bouchons en caoutchouc.
- Gaze en bande (compresse stérile).
- papier aluminium.
- Germination de grains de 48h.
- Na OH 0.2N.
- HCL 0.1N.
- BaCl₂.

Protocole

Dans 4 séries d'erlens, mettre 50mL de Na OH puis fermer avec bouchons. Peser 10germs, les mettre dans un petit sac de gaze, le suspendre à l'aide d'un petit cordon de ficelle fine entre le col et le bouchon de l'erien, entourer toutes les erlens avec du papier aluminium et les laisser durant 2h.

Série1 : Au réfrigérateur

Série 2 : Au température du laboratoire

Témoin de chaque Série: 50mL de Na OH puis fermer avec bouchons et entourer avec du papier aluminium. Mettre dans les conditions décrites.

Une fois le temps écoulé, enlever les germinations et les peser. Prélever de fractions de 10mL du NaOH, les placer dans des erlens de 100mL les fermer aussi tot, leur ajouter 5ml de BaCl₂ qui va précipiter le CO₂ absorbé par la soude et 3 gouttes de phénolphtaléine 1% (indicateur coloré). Titrer avec du HCl jusqu'à décoloration totale.

1. Discuter les résultats obtenus dans les séries expérimentales en les comparants avec leurs témoins.
2. Ecrire les réactions chimiques intervenant au cours de l'expérimentation et pendant les dosages.

3. Calculer la quantité de CO₂ rejetée par gramme de poids frais par heure pour les différentes températures choisies.

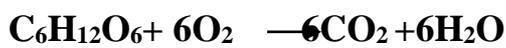
$$\text{moles CO}_2 = (V_1 - V_0) \text{HCl} \times \frac{n \text{HCl}}{1000 \text{ml}} \quad (V_1 \text{ et } V_0 \text{ sont les volumes d'HCl utilisé pour le titrage du}$$

CO₂ germination et témoin)

$$\% \text{ CO}_2 = \frac{\text{moles CO}_2}{V \text{ titration}} \times \frac{V \text{ réaction}}{V \text{ erlen}} \times \frac{RT}{P} \times 100$$

3. Respiration et fermentation

La respiration représente une fonction très générale de la physiologie des organismes vivants, animaux ou végétaux. Elle représente aussi l'une des fonctions le plus facilement décelable. La respiration permet une dégradation complète des substrats. Certains organismes réalisent des dégradations incomplètes appelées fermentations. Celles-ci ont un rendement énergétique très inférieure.



3.1. Respiration utilisation du dioxygène

La manière la plus simple pour mettre en évidence et analyser la respiration est de mesurer la consommation en dioxygène.

Mise en évidence

Observer la disparition de dioxygène (en volume). On utilisera un système clos dans lequel le dioxyde de carbone sera piégé par le potasse. La variation de volume observé sera essentiellement due à celles de la quantité de dioxygène.

Matériel

- Champignons.
- Flacons et bouchons à 1 ou 2 trous, tubes de verre coudés, robinets, tubes de caoutchouc.

- Potasse ou soude en pastille, solution d'encre à stylo ou de n'importe quel colorant miscible à l'eau (fig13)

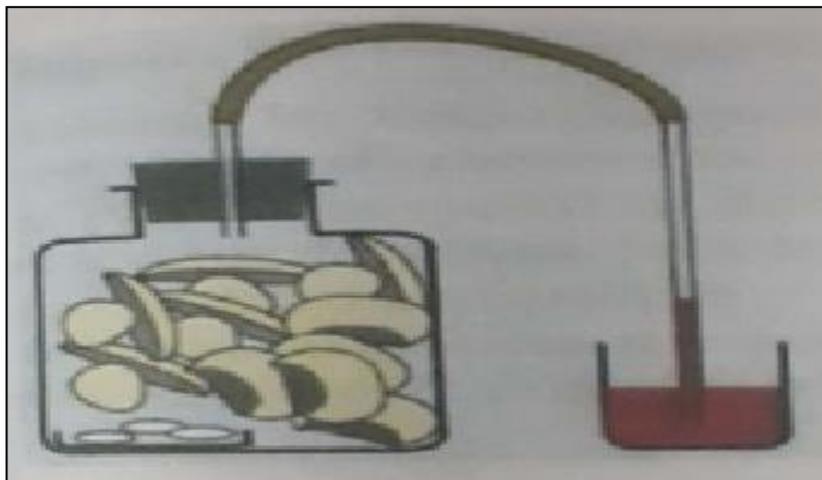


Figure 13: Montage expérimental simplifié.

Protocole

- Placer les champignons coupés en lamelle dans un grand flacon pourvu d'un bouchon à deux trous bien hermétique : placer dans le même flacon une coupelle contenant quelques pastilles de soude. Faire attention à ce que la soude ne se renverse pas les champignons.
- Fermer le flacon hermétiquement avec le bouchon et ouvrir le robinet de la tubulure d'équilibrage.
- Avec une pipette Pasteur, remplir le tube en U de façon à réaliser un manomètre et attendre quelques minutes pour laisser s'équilibrer pressions et températures : fermer le robinet
- Observer après 1h.
- Faire des témoins en réalisant le même montage sans champignons ou avec des champignons bouilles pendant 5min.

Résultat

Une dépression dans le flacon se traduit par une montée du liquide dans la branche proximale du manomètre. Dans le cas du protocole simplifiés le niveau du liquide monte dans le tube.

Conclusion

La potasse absorbe le dioxyde de carbone de l'air et celui produit par l'organisme .La diminution de volume de l'enceinte ne peut être due qu'à une consommation de dioxygène.

Remarque

Cette observation peut être rendue quantitative à condition de connaître le diamètre du tube exacte de matériel (masse de matière fraîche). Pour observer la respiration de plante verte opérer de même mais à l'obscurité. Il arrive que cette expérience donne des résultats inversés en début d'expérience(les dix première minutes). En effet, la température de la salle d'expérience se modifiés : le bocal en verre et l'air contenu dans le bocal ne se dilatent pas à la même vitesse. Ce n'est qu'après stabilisation des temperatures que les mesures deviennent significatives. On peut remettre à zéro après quelque minute si une dérive très forte apparait.

4. Mise en évidence Production de dioxyde de carbone

Mise en évidence du dioxyde de carbone dégagé par un organisme dans un air préalablement privé de dioxyde de carbone.

Matériel

- Champignons en morceaux, ou suspension de levure de boulangerie, ou germinations de blé (à l'obscurité).
- Montage expérimental (fig,14), . On utilisera soit une pompe refulante pour aquarium, soit une fiole de Mariotte, soit une trompe à vide. Le système sera toujours protégé par une fiole de garde.
- Solution de soude ou de potasse concentrée (10à30%)
- Solution de baryte 0.2 mol.L⁻¹.

Protocole

- Placer les échantillons dans le flacon 3.
- Régler le débit d'air le plus faible possible (par exemple une bulle par seconde).
- Observer après 15 à 60 min.

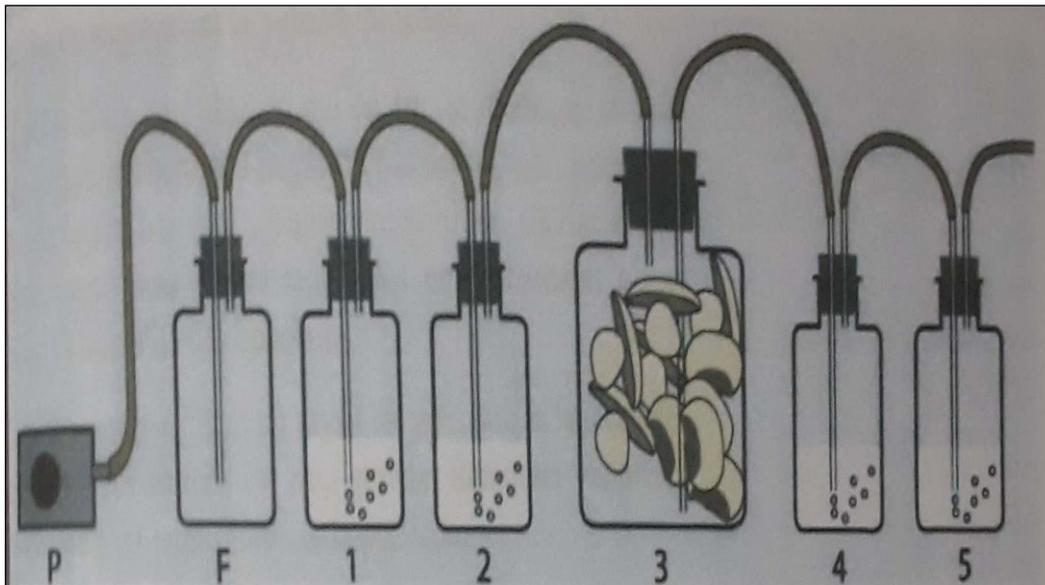


Figure 14: montage expérimental

Résultat

Un précipité blanc d'oxyde de baryum apparaît dans le flacon 4 et 5, ce qui montre la formation de dioxyde de carbone a été absorbé par la potasse ou la soude du flacon 1. Le précipité de carbonate de baryum observé dans les flacons 4 et 5 ne peut alors être dû qu'au dioxyde de carbone dégagé par l'échantillon.

Remarque

Si l'on étudie la respiration d'une plante verte, recouvrir le flacon 3 de papier noir afin d'éliminer toute interaction due à la photosynthèse. Si l'on étudie la respiration de levures en suspension, il faudra inverser la position des tubes d'arrivée et de sortie de l'air du flacon 3, de façon que celui-ci barbote dans la suspension. Les levures ne doivent pas avoir été mises à jeuner, mais il faudra, au contraire, leur donner un substrat (glucose 1%)

-Le flacon 3 (échantillon biologique) peut être mis dans différentes conditions, par exemple de température.

5. Mise en évidence de la Synthèse de l'amidon par les feuilles

Protocol

On éclaire une plante verte (pélargonium) pendant 12 heures. Certaines feuilles sont partiellement recouvertes d'un cache de papier noir.

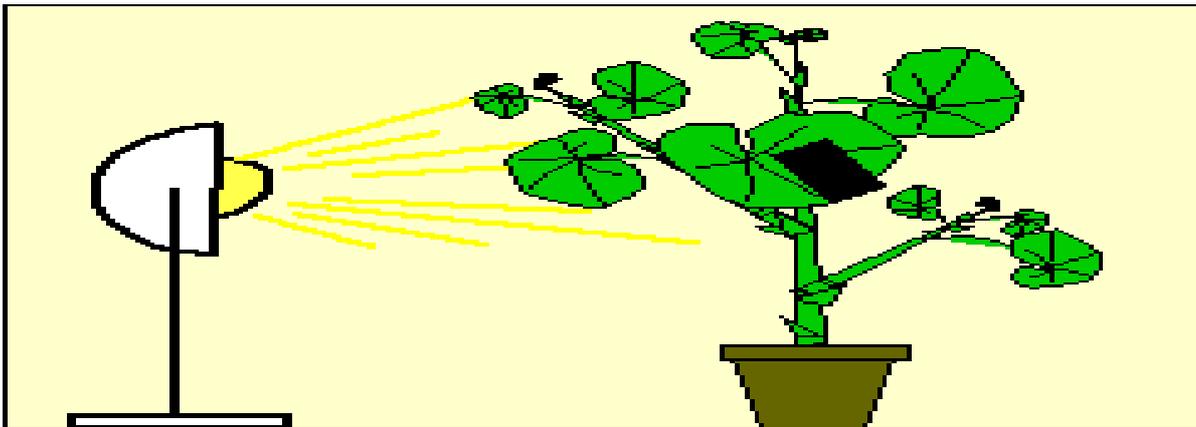


Figure15 : une plante verte (pélargonium) exposé a la lumière pendant 12heurs

L'expérience est réalisée avec une feuille normale, une feuille dont une partie a été cachée par du papier noir ou une feuille panachée.

Détacher les feuilles, les décolorer par de l'éthanol bouillant pendant 5 minutes, les recouvrir de lugol (réactif spécifique de l'amidon) dans une boîte de Pétri et observer.

Les feuilles se colorent en bleu-violet uniquement au niveau des régions vertes soumises à la lumière

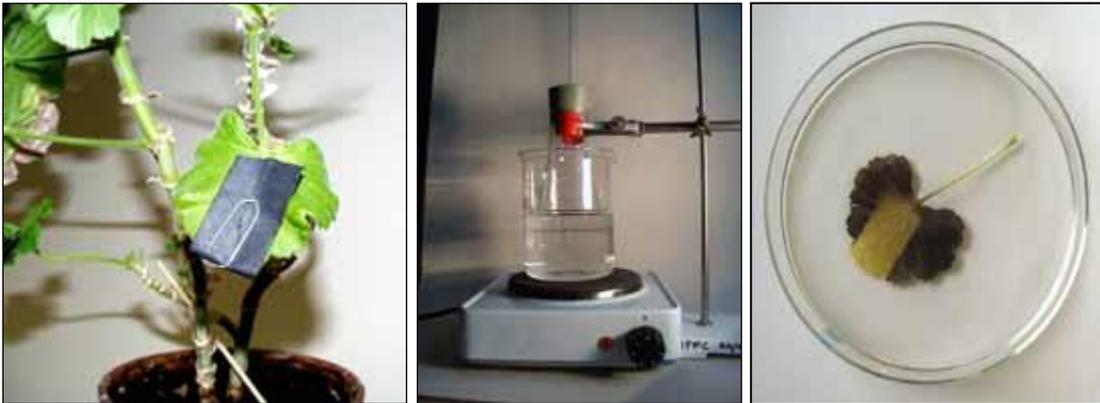
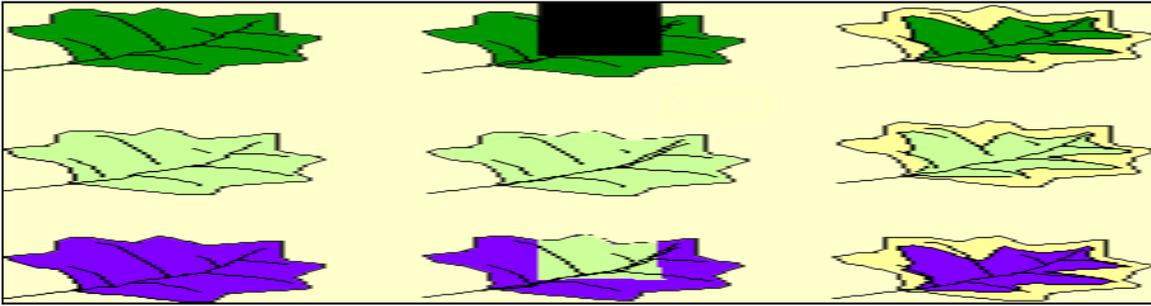


Figure 17 : Mise en évidence, de la synthèse d'amidon par les feuilles

Mise en évidence, de la synthèse d'amidon par les feuilles.

A gauche, sur un pied de pélargonium une partie d'une feuille est masquée par du papier noir et est vivement éclairée ; au centre, la feuille est décolorée par de l'éthanol bouillant, un réfrigérant permet d'éviter les vapeurs éthyliques (prévoir un récipient d'eau froide en cas d'ébullition exagérée et utiliser un système de chauffage électrique et non pas à gaz); à droite, la feuille plongée dans une boîte de Pétri contenant du lugol développe une coloration bleu-noir uniquement dans les parties éclairées, elle a donc synthétisé de l'amidon.



Figure 18: A gauche une feuille de coléus, à droite, après exposition à la lumière, décoloration à l'éthanol

Même expérience réalisée sur une feuille panachée. A gauche, une feuille de coleus, la partie extérieure est verte (chlorophylles), la partie intérieure est rouge (anthocyanes), la zone intermédiaire est brune ; à droite, après exposition à la lumière, décoloration à l'éthanol bouillant puis coloration par le lugol, les régions vertes et brunes sont colorées en bleu-noir, elles ont donc synthétisé de l'amidon. La couleur brune est due à l'association de deux pigments photosynthétiques (anthocyanes et chlorophylles).

Conclusion: la synthèse de matière organique (ici amidon) se réalise uniquement dans les régions vertes des feuilles lorsqu'elles sont éclairées.



6. Mise en évidence de la Synthèse d'amidon par les chloroplastes

Pour obtenir des informations sur la localisation de la synthèse d'amidon à la lumière,

Matériel

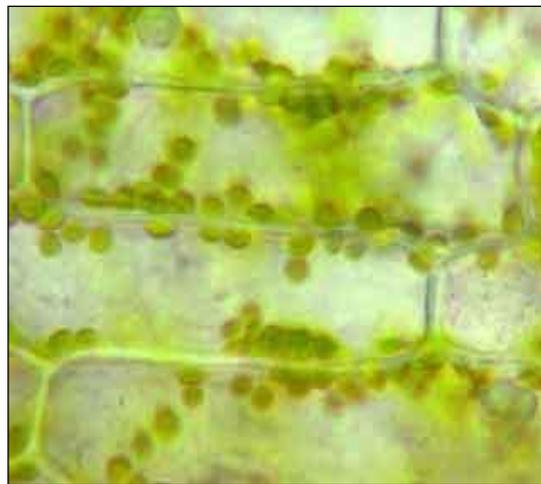
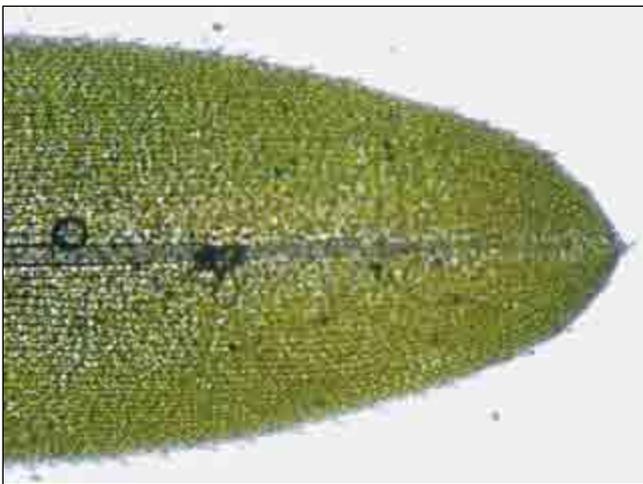
- une plante aquatique, l'élodée du Canada,
- hydrogénocarbonate de sodium.

➤ Solution diluée de lugol.

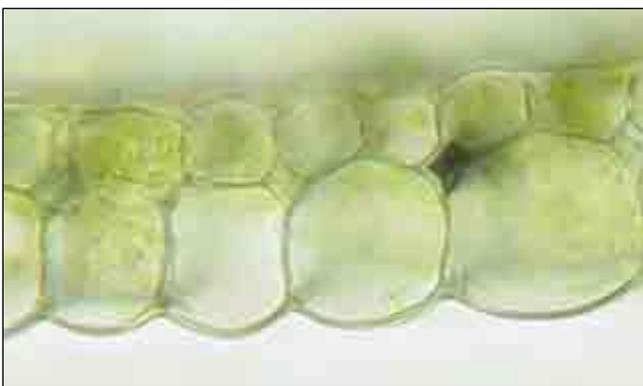
Protocol

Les feuilles d'élodée sont cultivées à la lumière pendant 12 heures en présence d'hydrogénocarbonate à 1% (source de carbone). Elles sont observées telles quelles (A) ou après coloration par le lugol, réactif spécifique de l'amidon (B).

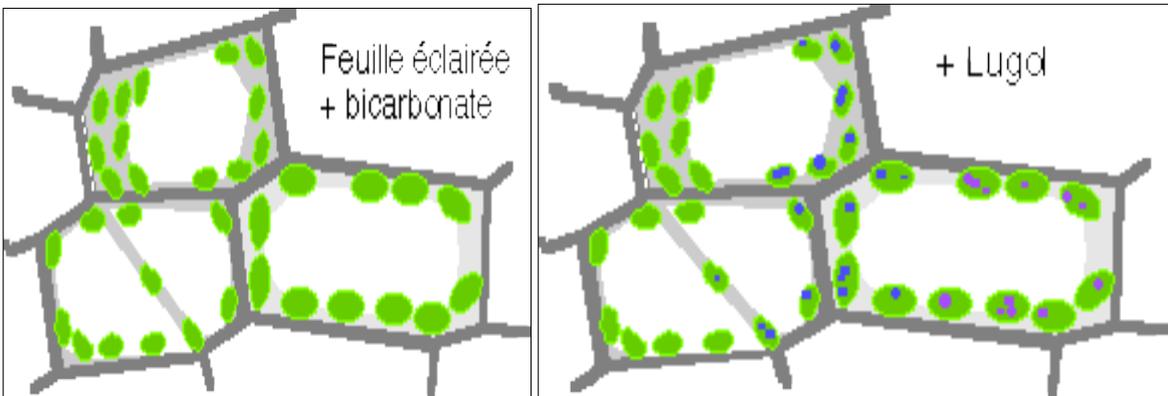
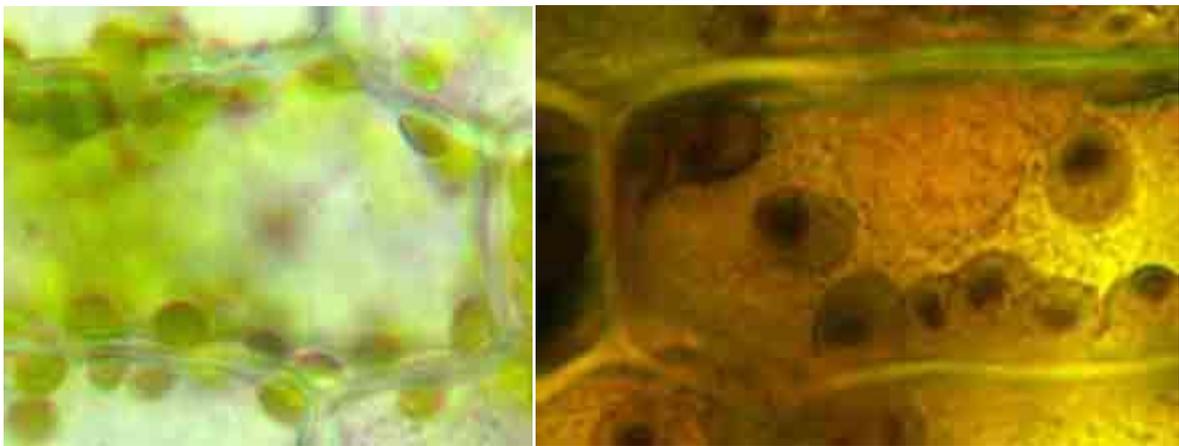
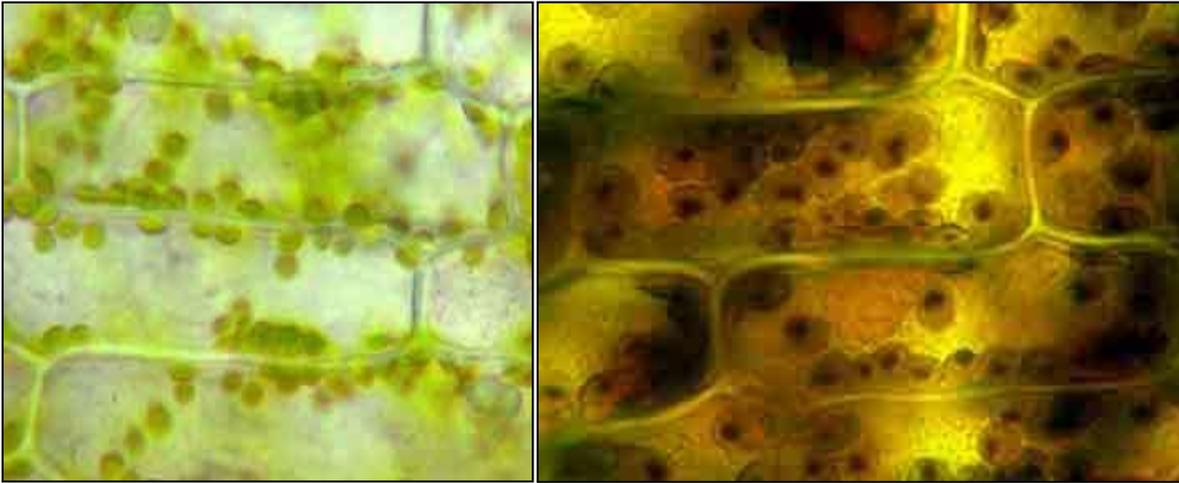
Dont la feuille est constituée seulement de deux assises de cellules. Ceci permet l'observation aisée des chloroplastes en microscopie photonique.



Portion de feuille d'élodée (taille réelle 10 mm). Cellules de feuille d'élodée.



Section transversale d'une feuille d'élodée. Elle est formée de deux assises cellulaires. Il n'y a pas de cuticule. Des méats chargés de gaz sont localisés entre les deux assises



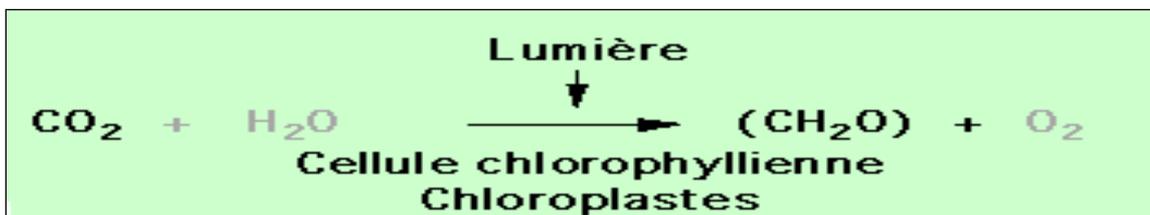
<p>A: Cellules d'élodée vivantes cultivées à la lumière en présence d'hydrogénocarbonate de sodium.</p>	<p>B: Les mêmes cellules colorées par le lugol, réactif spécifique de l'amidon</p>
---	--

Figure 19: observation microscopique des chloroplastes.

Dans certaines parties de la feuille, des grains bruns apparaissent dans les chloroplastes. La couleur brune (au lieu du bleu caractéristique de l'amidon) est due aux couleurs parasites (vert du chloroplaste et jaune du lugol).

Conclusion

La synthèse d'amidon (glucide) se réalise, à la lumière, en présence de dioxyde de carbone dans les chloroplastes des cellules chlorophylliennes.



7. Pigments photosynthétique

Chlorophylle

La chlorophylle, de part sa couleur verte, est le principal pigment contenu dans les plantes. Elle se trouve dans les chloroplastes des cellules végétales. Elle est indispensable pour l'activité photosynthétique de la plante qui consiste à produire de l'énergie chimique (ATP) à partir de l'énergie lumineuse du soleil. En effet la lumière du soleil est captée par la chlorophylle.

On distingue plusieurs formes de chlorophylles (a, b, c, d et f) qui n'ont pas la même structure chimique. Les plus courantes sont les chlorophylles A et B que l'on retrouve chez les plantes supérieures et chez les algues.

Pour ce qui est du spectre d'absorption, on observe un pic d'absorption de la chlorophylle A à 430 nm (bleu) et à 660 nm (rouge). La chlorophylle b absorbe fortement à 445 nm (bleu) et 645 nm (rouge)

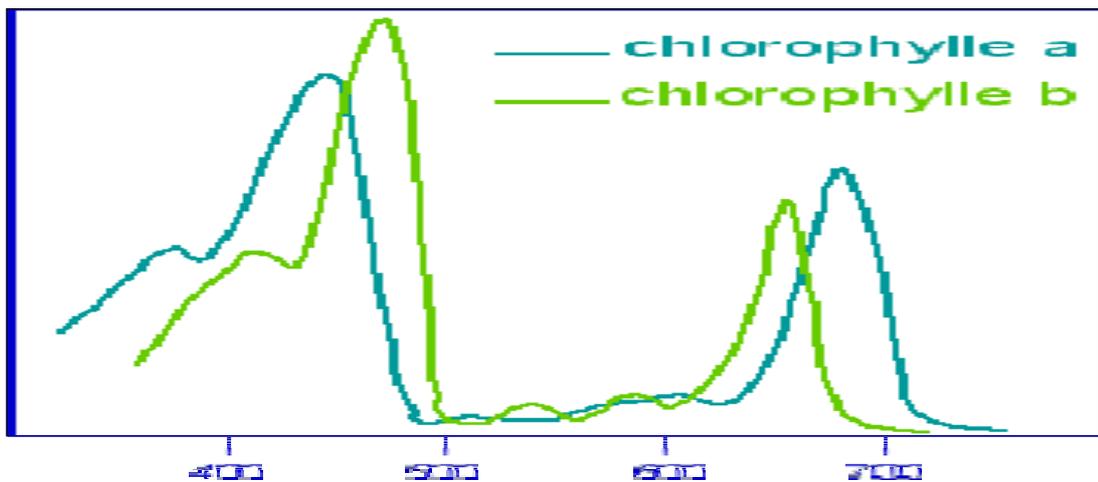
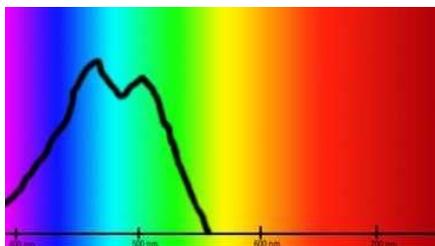


Figure 20: spectre d'absorption du chlorophylle.

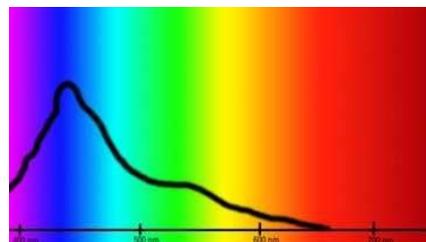
Spectres d'absorption des chlorophylles a et b

Autres pigments

Chez la plante, on peut distinguer d'autres pigments: le carotène qui est orange et la xanthophylle qui est jaune. Ils ne participent pas activement à la photosynthèse de la plante car ils ne peuvent pas libérer l'énergie accumulée.



Spectre d'absorption de la xanthophylle



Spectre d'absorption du carotène

Figure 21: spectre d'absorption des chlorophylles.

7.1. Extraction de la chlorophylle

Principe

L'extraction de la chlorophylle des végétaux permet d'obtenir une solution chlorophyllienne qui va servir à réaliser la suite des manipulations du protocole. Les feuilles de la plante sont mises en contact avec de l'éthanol absolu qui va les léser mécaniquement et va détruire les membranes des cellules dans le but d'en extraire les organites (les lipides et les lipoprotéines sont solubles dans l'éthanol). Le broyat ainsi obtenu est filtré et la chlorophylle est extraite grâce au dichlorométhane, solvant d'extraction. Après une seconde filtration, le filtrat est chauffé afin de garder uniquement les pigments de la chlorophylle.

Protocole

- Peser 10g de feuilles d'épinard dans un bécher et les hacher grossièrement à l'aide d'une paire de ciseaux. Placer les feuilles hachées dans un mortier, et les broyer avec du sable de fontainebleaux et 10ml d'éthanol absolu.
- Filtrer le broyat dans un Erlenmeyer à l'aide d'un coton cardé.
- Récupérer la pulpe dans le coton cardé et la placer dans un bécher. Ajouter 12ml de dichlorométhane et agiter pendant deux minutes.
- Filtrer à nouveau le mélange de la même manière que précédemment et récupérer le filtrat.
- Séparer le filtrat en deux : l'un servira à la CCM Faire évaporer l'autre filtrat dans un bain marie. à 95°C Il servira à la chromatographie de partage sur colone.
- On obtient de la chlorophylle pure collée au fond de l'Erlen meyer.
- Resolubiliser la chlorophylle dans quelques millilitres de solvant apolaire/solvant polaire 9:1.

7.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Principe La chromatographie sur couche mince permet une séparation des pigments dans un but d'analyse. La phase fixe est composée d'une couche solide sur laquelle est déposé un gel de silice servant de support et la phase liquide est constituée d'un éluant qui sépare les différents pigments. Plusieurs gouttes de solution de chlorophylle sont déposées sur la phase fixe à l'aide d'un capillaire pour former une tâche. La plaque de silice est mise en contact avec la phase liquide qui va migrer et entraîner les pigments de la chlorophylle par capillarité.

Une fois que la migration est terminée, on obtient plusieurs tâches colorées sur la plaque de silice correspondantes aux différents composants de la chlorophylle **Protocole**

- Découper une bande de plaque de silice d'environ 15 cm de long et 2 cm de large.
- Tracer une croix à 1 cm du fond de la bande, ceci est le repère pour placer la tâche de chlorophylle.
- Déposer une goutte de chlorophylle extraite sur la croix et attendre que ça sèche. Répéter cette opération 6 fois afin que la tâche verte soit bien visible.
- Préparer 10ml d'éluant avec 40% de solvant apolaire (éther de pétrole) et 60% de solvant polaire (éther diéthylique). Verser dans une éprouvette graduée de 100ml.
- Mettre la bande de plaque de silice et la faire tremper dans l'éluant sans toucher la tâche.
- Couvrir l'éprouvette et la mettre à l'obscurité.
- Faire migrer pendant 1 heure.

On voit que les deux pigments absorbent entre 400nm et 550nm (vert-bleu) ce qui prouve leur couleur jaune-orange.

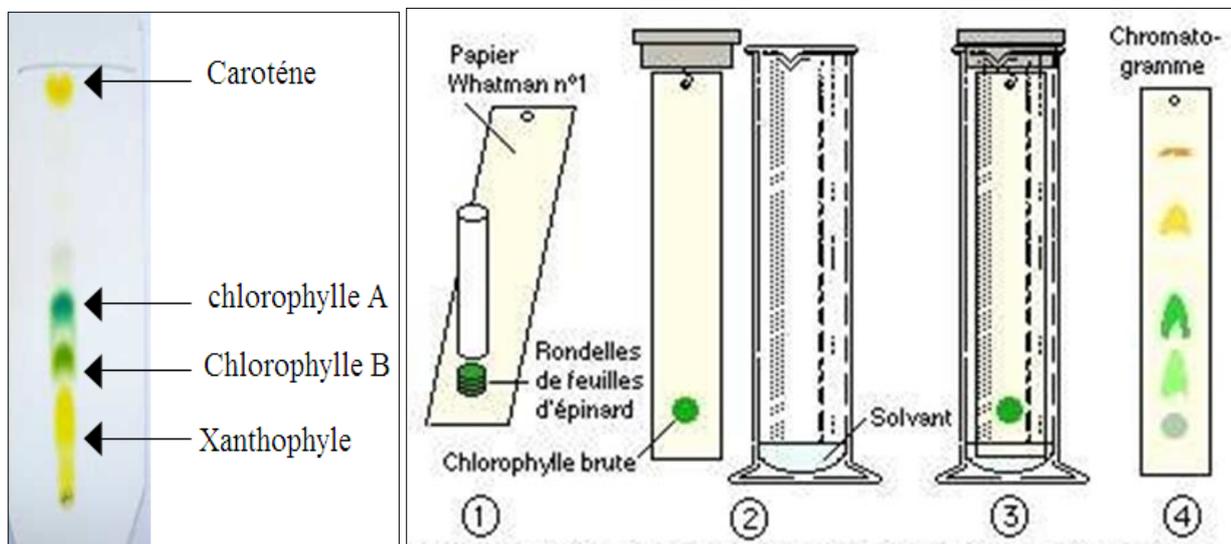


Figure23: Chromatographie sur couche mince (CCM)

7.3. Extraction à partir d'une feuille verte (exemple: pélargonium).

On broie des feuilles d'une plante bien verte dans de l'acétone (ou de l'alcool à 95°) en présence de sulfate de sodium anhydre (déshydratation) et de carbonate de calcium (neutralisation des acides organiques) jusqu'à l'obtention d'une solution bien verte puis on filtre. On verse 1 volume de cette solution dans une ampoule à décanter et on ajoute 1/5 de volume d'éther de pétrole, on agite très doucement. La solution se sépare en 2 phases: La phase étherée, verte, contient la plupart des pigments et la phase hydro-alcoolique (ou hydro-acétonique), jaune, une partie des xanthophylles seulement.

Cette expérience montre que les pigments (verts et jaunes : chlorophylles et caroténoïdes) sont solubles dans les solvants organiques. Elle permet de recueillir une solution très propre permettant de réaliser un spectre ou une chromatographie.



Extraction



Séparation



Figure 24: Extraction, séparation à partir d'une feuille verte.

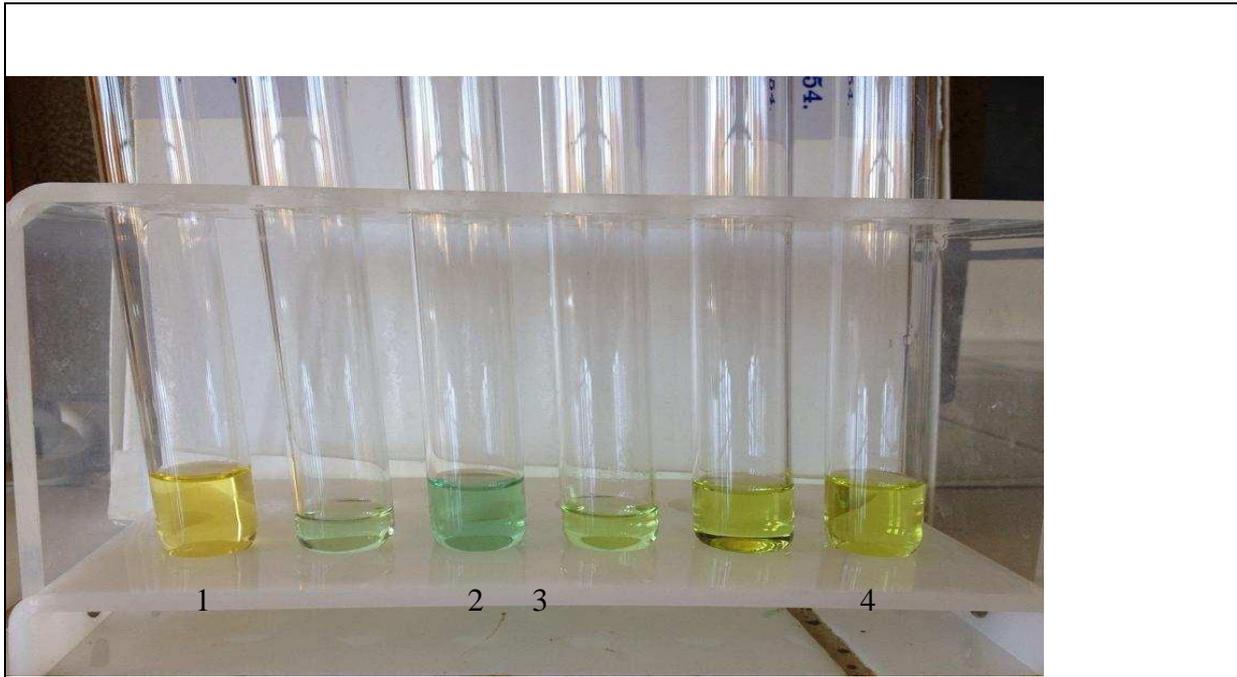


Figure 25: Fractions des différents pigments (de gauche à droite: 1.Carotène, 2.chlorophylle A, 3. Chlorophylle B, 4. Xanthophylle)

7.4. Extraction à partir d'une feuille à coloration dominante rouge (exemple: prunus).

Cette expérience peut être réalisée chez toutes les plantes "vertes", même chez celles dont les feuilles apparaissent colorées en rouge-violet. Réalisons-la avec une feuille de prunus à feuilles rouges. Les solutions d'extraction (hydro-alcoolique ou hydro-acétonique) apparaissent vert jaune. La séparation montre une phase étherée bien verte (elle contient les pigments solubles dans les solvants organiques, chlorophylles et caroténoïdes) et une phase hydro-alcoolique (ou hydro-acétonique), rouge violacée qui contient outre un peu de xanthophylle, des pigments anthocyaniques solubles dans l'eau.

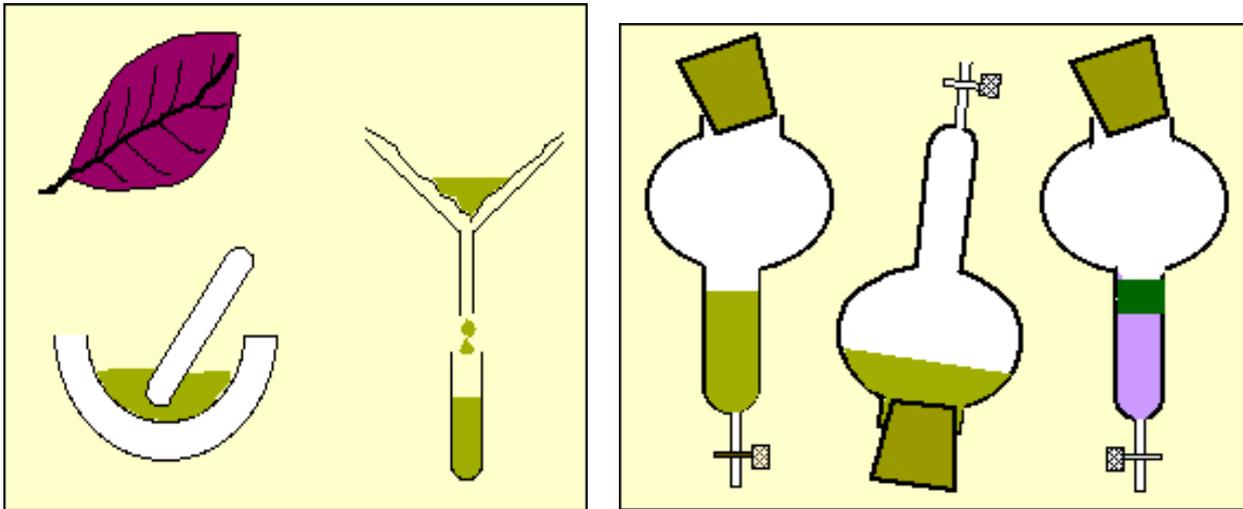


Figure 26: Extraction, séparation à partir d'une feuille rouge.

Remarque

Les couleurs variées de ces types de feuilles sont dues aux proportions relatives des différents types de pigments (chlorophylles et caroténoïdes) et anthocyanes, ces dernières pouvant varier du rouge au bleu.

Cette expérience peut se réaliser sur n'importe quel type de feuille et aussi sur des thalles d'algues, quelque soit sa couleur apparente due à des pigments surnuméraires

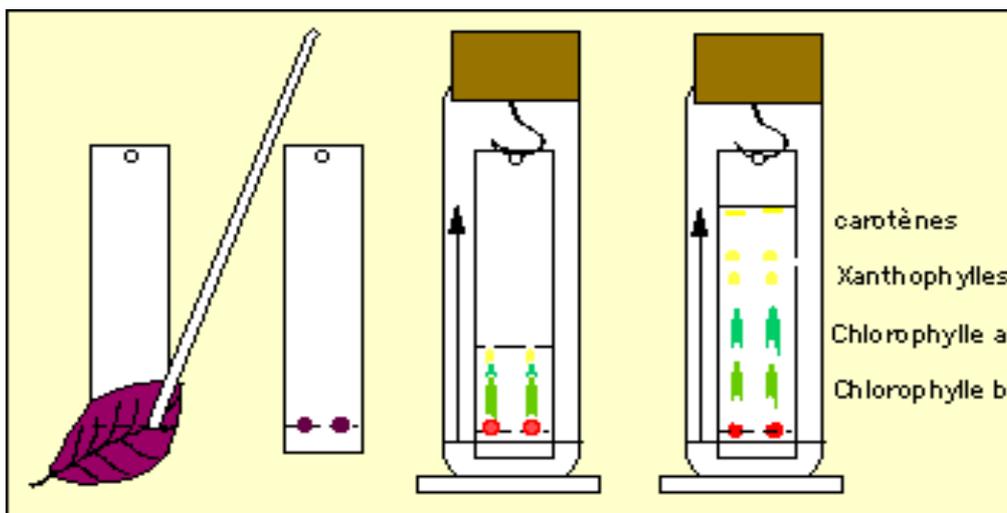


Figure 27: Fractions des différents pigments CCM

Chez les plantes supérieures (spermaphytes), cette composition en pigments solubles (chlorophylles et caroténoïdes) dans les solvants organiques est constante. Quelques variations sont possibles dans leurs proportions relatives.

7.5. Fluorescence de la chlorophylle

Lorsqu'on observe une solution de chlorophylle (ou même un extrait de pigments bruts), on constate que, par transparence, la solution apparaît verte. Cette couleur est due au fait qu'elle absorbe les radiations bleues et rouges et ne laisse passer que les radiations jaunes et vertes. Si on regarde le tube de côté, la solution apparaît rouge.

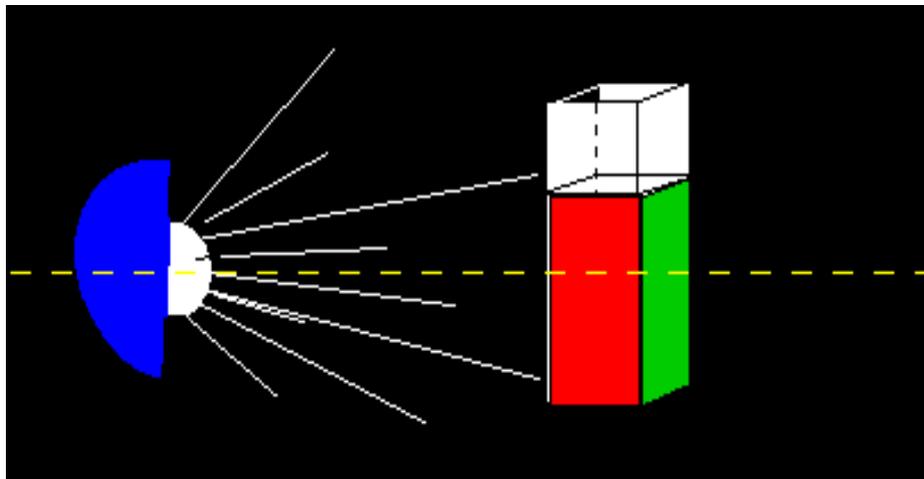


Figure28: Fluorescence de la chlorophylle à l'obscurité.

Ce phénomène devient remarquable si, à l'obscurité, on éclaire le tube par de la lumière ultra violette, l'ensemble de la solution devient rouge vif. La solution de chlorophylle, extraite de la plante, réagit à une excitation lumineuse par l'émission d'une lumière rouge (fluorescence).

8. Caractérisation des protéines (réaction xanthoprotéique)

Matériel

- Solution de protéines, graines de haricot.
- Acide nitrique, solution d'ammoniaque.
- Bain-marie à 100°.

Protocole

- Dans un tube à essai, mettre 5ml de solution de protéine (couleur blanche).
- Chauffer au bain-marie 100° pendant 5min la coloration devient jaune fig 29
- Ajouter de l'ammoniaque le précipité vire à l'orange.

Remarque

Cette réaction est caractéristique des protéines qui contiennent des acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane, phénylalanine). Elle peut se réaliser sur des fragments d'organes

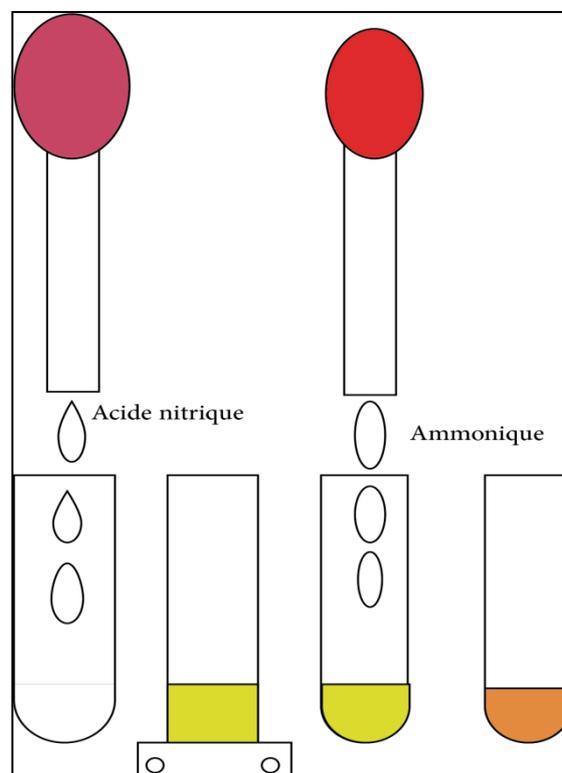


Figure 29: Réaction xanthoprotéique.

9. Caractérisation des protéines (réaction du biuret)

Cette réaction est très générale et caractéristique de toutes les protéines et tous les polypeptides

Matériel

- Solutions de protéines.
- Soude à 20%, solution de sulfate de cuivre à 1%.

Protocole

- Dans un tube à essai, mettre 5ml de solution de protéines ajouté 1ml de soude agité.
- Ajouter goutte à goutte la solution de sulfate de cuivre en agitant doucement.

Résultat

La solution se colore progressivement en rouge ou en violet selon les protéines utilisées

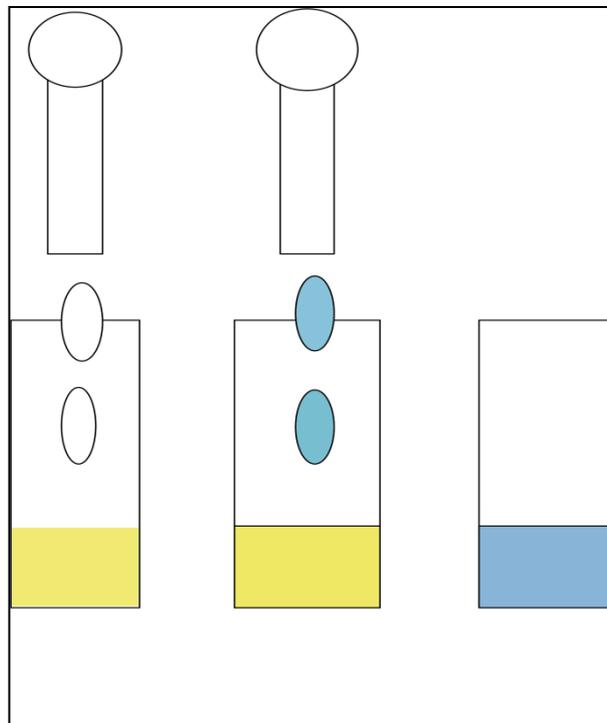


Figure 31: Réaction de biuret.

Remarque

La coloration rouge est spécifique de la présence de la liaison peptidique. La coloration bleue, accessoire est due aux fonctions aminées libres.

Références bibliographie

- Daniel Robert, Anne- Marie Catesson., 2000 . Biologie végétale, Organisation végétative. Volume 2, 359 pp.
- Dunod., 1992. Reproduction et développement des végétaux, 233 pages.
- Gorenflot., 1992. Biologie végétale. Plantes supérieures II – Appareil reproducteur. 3ème édition. Edition Masson. 255 pp
- Harmont J., 2000). Biologie végétale. éd. Deboeck université. 944 pp.
- Jean-Frédéric Terral et Christine Heinz., 2010. Diversité et fonction des structures morpho-anatomiques des végétaux: l'exemple des Angiospermes FLBI204, Université Montpellier 2, Licence Biologie - L1S2
- Jean- Claude Rameau, D. Mansion et G. Dumé., 1993. Flore forestière française : guide écologique illustré. Montagnes, Paris, Institut pour le développement forestier. Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, 2424 p.
- Jean T., 2015. Cours: Classification, évolution et reproduction des 'végétaux'. Faculté des Sciences et des Techniques | Université de Nantes. 71p
- Laberche Jean-Claude., 2010. Biologie Végétale. 3e édition. Ed. Dunod. 305p.
- Louis Genevès.
- Lascombes G., 1968 Manuel de travaux pratiques de physiologie animale et végétale. Hachette, Paris.
- Murray N., 2009. Biologie végétale. Structure, fonctionnement, écologie et biotechnologies. Ed. Nouveaux horizons. Paris. 613p
- Ozenda P., 2000. Les végétaux. Organisation et diversité biologique. Éd. Dunod, Paris.
- Picot A & Grenouillet P., 1992. La sécurité en laboratoire de chimie et de biochimie. Technique et documentation. Lavoisier, Paris.
- Reymond M., 2007. Cours : La nouvelle systématique «végétale». Développement et évolution de la fleur. ENS Lyon.34p.
- Remy, S., et al., 2004 Atlas d'histologie et d'anatomie des plantes vasculaires Namur, Belgique : Presses universitaires de Namur. Version de démonstration récupérée le 14 février 2011 du site des Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix à Namur.
- Riou-Nivert P., 2001. Les résineux, tome 1: Connaissance et reconnaissance. Broché.
- Roland J-C., Vian B., 1985. Atlas de Biologie Végétale, Ed Masson.

Roland J.-C, Roland F., El Maarouf-Bouteau H. & Bouteau F., 2008. Atlas Biologie Végétale, 2.

Savouré B., 1980 Manipulations pratique en physiologie végétale. Masson, Paris.

Organisation des plantes à fleurs. 9 e édition. Dunod, Paris, ISBN 978-2-10-053799-0.

Vallade J., 1999. Structure et développement de la plante. Morphogenèse et biologie de la reproduction des Angiospermes. Éd. Dunod, Paris.

http://www.plantes-botanique.org/biologie_030_les-tissus-vegetaux

<http://www.bioeco.free.fr/index.htm>

<http://www.flora-phyto.com/content/6-botanique-la-tige>

http://www.afd-ld.org/~fdp_bio/content.php)