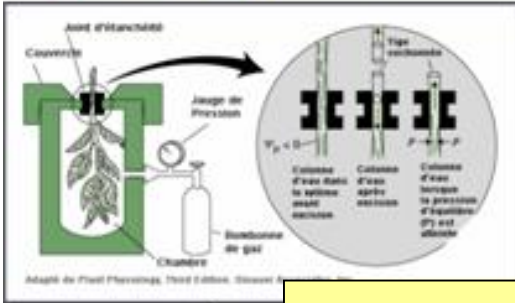


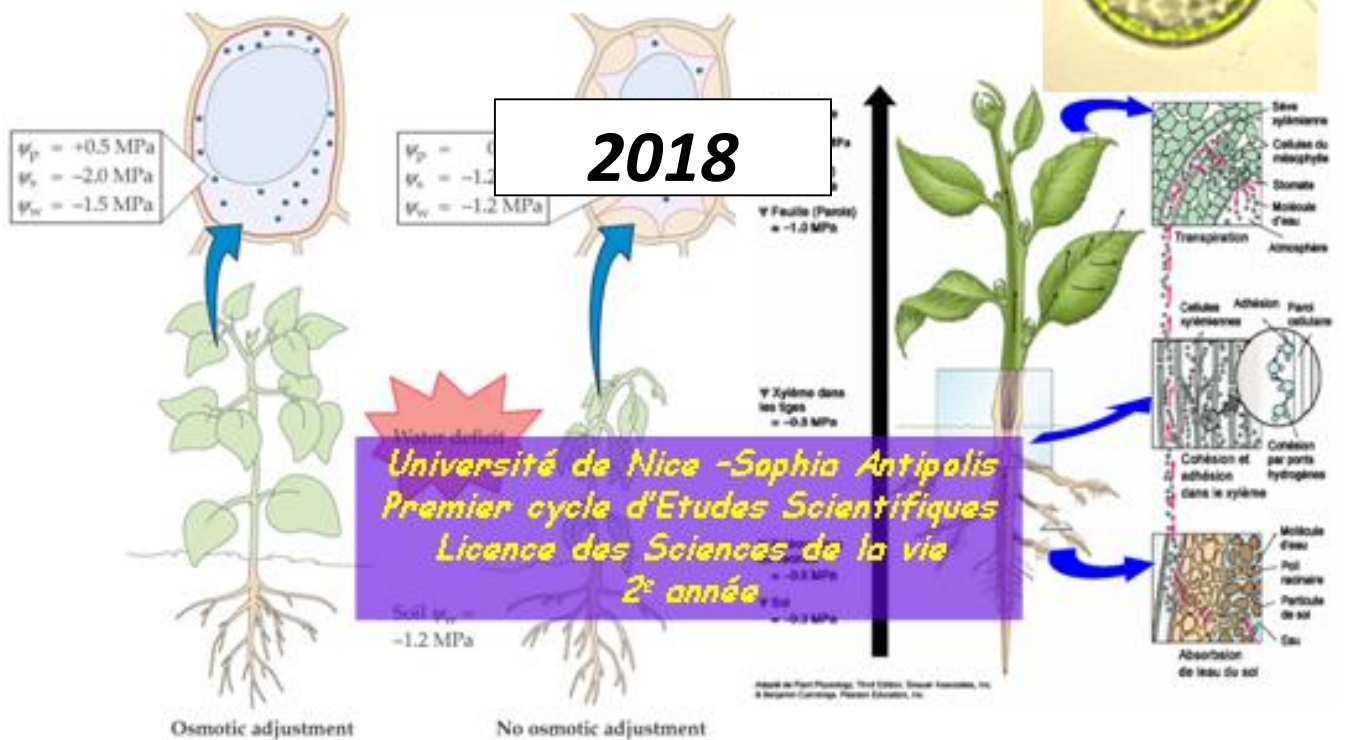
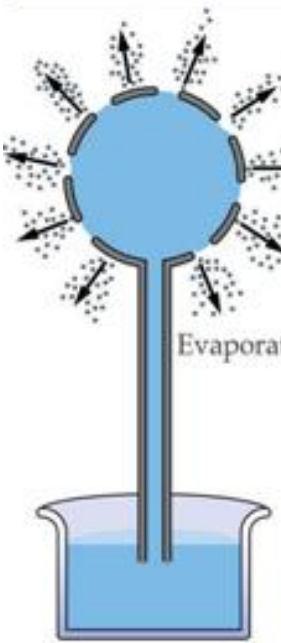
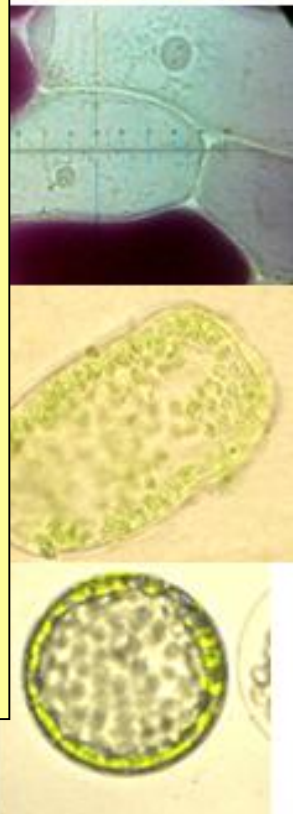
Nom :

N° de groupe :



TRAVAUX PRATIQUES de PNV

LSV2



RELATIONS STRUCTURES - FONCTIONS CHEZ LES VEGETAUX

OSMOSE ET PERMEATION (TP1)

A. INTRODUCTION

Le potentiel osmotique

Le potentiel osmotique désigné par le symbole Ψ_s , est fonction de la température, de la concentration de la substance dissoute, et de ses caractéristiques de dissociation.

Le potentiel hydrique

La notion de potentiel hydrique a été largement discutée au cours.

Pour éclaircir des problèmes de terminologie, nous donnerons le tableau suivant :

Milieu intérieur	Milieu extérieur	$\Delta\Psi = \Psi_{\text{int}} - \Psi_{\text{ext}}$	
Iso-osmotique	Isotonique	équilibre	$\Delta\Psi = 0$
Hypo-osmotique	Hypertonique	plasmolyse	$\Delta\Psi > 0$
Hyper-osmotique	Hypotonique	turgescence	$\Delta\Psi < 0$

B. Evaluation des paramètres osmotiques

A) Détermination du potentiel de succion tissulaire

Les tubercules de pommes de terre sont constitués essentiellement de parenchyme de réserve. En mettant à profit la grande homogénéité de ce tissu, il est possible de réaliser un certain nombre d'expériences, telles que la mesure du poids frais ou d'une longueur, sur des fragments de tubercule.

1. Préparation du matériel

- Prendre trois pommes de terre, les placer dans l'appareil afin de découper les tubercules en parallélépipèdes de section carrée (env. 0,5 cm de côté).
- Conserver les segments de tissus dans un papier sopalin humide.
- Ajuster alors les fragments de tissus à une longueur déterminée de 4cm (au couteau de précision).
- Essuyer légèrement les segments de tissus ainsi obtenus sur un papier sopalin et les répartir en lots de 4, numéroté de 1 à 6.
- Déterminer rapidement, sur les balances, le poids frais (PF_0) de chaque lot (1 à 6).

2. Mode opératoire

- Préparer dans 6 tubes Falcon de 50 mL des solutions de saccharose aux concentrations indiquées (ci-dessous), à partir d'une solution stock (2M).

Tube	Ψ_s (bars) expérimentale	Concentration finale (M)	Calcul Ψ_s (bars) Solution idéale
1	0	0,00	
2	-2,6	0,10	
3	-5,2	0,20	
4	-11	0,40	
5		0,60	
6	-25,2	0,80	

- Incuber vos lots de fragments de pomme de terre dans chacun des tubes.
- Après 1 heure d'incubation, mesurer pour chacun des lots, le poids frais PF_f ainsi que la longueur moyenne L_f de chaque lot (légèrement essuyer les segments sur un papier sopalin).

On calculera alors :

$$\Delta L (\%) = ((L_f - L_o) / L_o) \cdot 100$$

$$\Delta PF (\%) = ((PF_f - PF_o) / PF_o) \cdot 100$$

Pression osmotique d'une solution idéale (formule de Van t'Hoff) :

$$\underline{\underline{\Pi = RT/V \cdot \log a_w \approx i \times C_B \times R \times T \times 1000 \text{ en Pa (1 bar = 101325 Pa)}}$$

3. Résultats

Reporter sur un graphique, les courbes correspondant au ΔL et au ΔPF , en fonction de la concentration molaire (M) du saccharose.

Pour chacune des courbes, déterminer la valeur de la concentration de saccharose correspondant à l'intersection avec l'abscisse.

Calculer les valeurs théoriques idéale de Π pour les différentes solutions suivant la formulation de Van t'Hoff.

Calculer à partir de cette valeur, le potentiel hydrique des tissus ($\Psi_w = \Psi_s = -\Pi$ car $\Psi_P = 0$ au point d'intersection sur l'axe des abscisses).

Exprimer alors Ψ_w en MPa et en Bar.

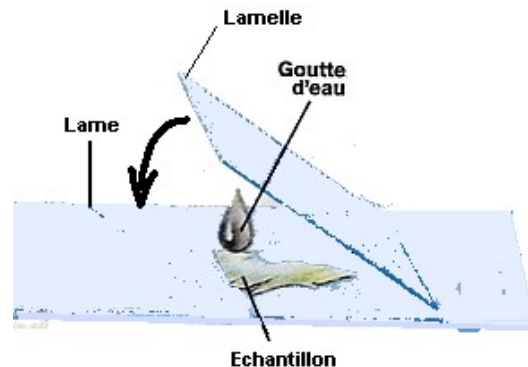
Rappels :

$0^\circ\text{C} = 273,15 \text{ K}$; $R = 8,31 \text{ J/mol.K}$; $i = 1$ pour le saccharose et pour le sorbitol, 2 pour le NaCl ; $C_B =$ Concentration Molaire de la solution.

B) Observations microscopiques

Les lambeaux épidermiques, constitués d'une assise cellulaire unique, permettent une observation microscopique aisée des cellules qui les composent. Les vacuoles de ces tissus

occupent la presque totalité de l'espace cellulaire. Il est ainsi possible, en plongeant ces lambeaux dans des solutions de potentiel osmotique variable, d'étudier les échanges d'eau entre les cellules et le milieu extérieur, et, d'obtenir, sur la base d'observations microscopiques, des informations sur le potentiel hydrique cellulaire.



1. Mode opératoire

- Inciser délicatement, à l'aide d'un scalpel, dans l'épiderme intérieur d'un épiderme de feuille de mâche.
- Détacher avec une paire de brucelles à pointes fines, le fragment épidermique ainsi délimité en le saisissant par un des coins.
- Placer le lambeau (face déchirée vers le bas) dans 1 mL d'une solution de sorbitol (6 tubes Eppendorf). Ajouter de 20 μ L de Rouge Neutre dans chaque tube Eppendorf.
- Après 5 min., observez entre lame et lamelle au microscope. Une observation à la fois !
- Dessinez les points extrêmes **de turgescence** et **de plasmolyse**, puis cherchez les points encadrant l'isotonie.

Choisir au microscope une zone facilement observable.

Observez la cellule et ses différents compartiments et organites, puis évaluez le potentiel hydrique cellulaire.

2. Evaluation du potentiel hydrique cellulaire

A l'isotonie, le potentiel hydrique de la cellule est égal au potentiel osmotique du milieu extérieur.

On utilisera des solutions de sorbitol (substance qui ne pénètre pas ou peu dans les cellules) à différentes concentrations (0 ; 2 ; 6 ; 8 ; 10 et 15 %).

En travaillant chaque fois avec un lambeau frais, noter la concentration C, pour laquelle il y a une légère plasmolyse.

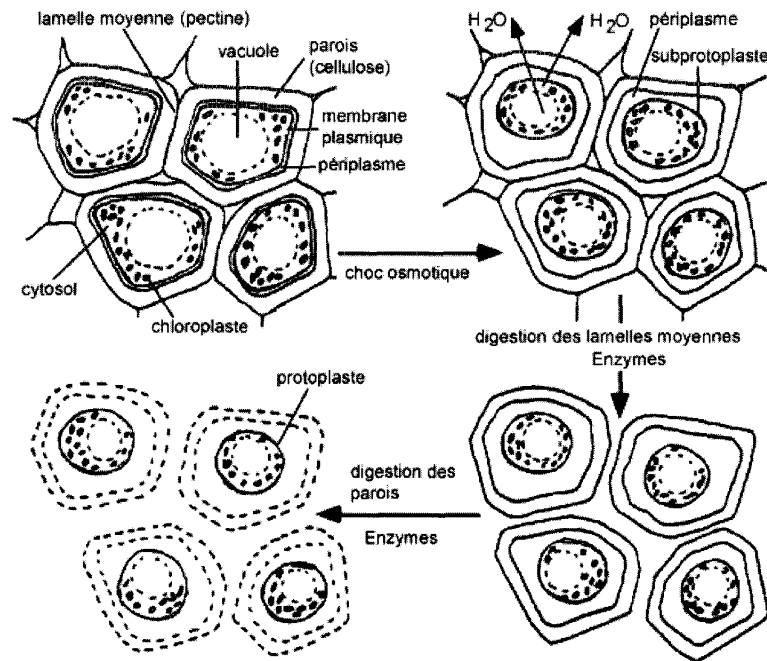
Déterminer par le calcul, la concentration molaire de sorbitol qui se rapproche le plus de l'isotonie et déduire le potentiel hydrique cellulaire en Mpa et en Bar.

C) Quelques propriétés des protoplastes foliaires

Le protoplaste est une cellule dont on a fait disparaître (mécaniquement ou enzymatiquement) la paroi. En l'absence des potentiels hydrostatiques (pressions) normalement exercées par la

paroi sur le contenu cellulaire, il n'est stable que dans des conditions isotoniques (ou légèrement hypertoniques) et prend alors une forme sphérique. Les protoplastes permettent d'étudier un certain nombre de caractéristiques du plasmalemme (perméabilité, charges, ...). Nous observerons la pénétration de deux types de colorants, pour lesquels le plasmalemme présente une perméabilité sélective.

1. Isolement des protoplastes



1.1. Incubation enzymatique

- Peler délicatement, à l'aide d'une brucelle à pointes fines, l'épiderme inférieur de 3-5 feuilles de **mâche** (*Valerianella olitoria*), et découper le mésophylle en lanières de 1mm² environ. Travailler sur un papier humide, pour éviter le dessèchement.
- Déposer immédiatement dans une boîte de Pétri 2 ml contenant une solution enzymatique TL déjà prête, contenant des cellulases, des pectinases et du sorbitol. Expliquer le rôle de ces divers composés.
- Déposer les fragments de feuilles (face pelée vers le bas) à la surface de la solution d'incubation.
- Envelopper la boîte de Pétri d'une feuille d'aluminium (obscurité) en y notant votre poste de travail et incuber à 30°C durant 60 minutes sur un **agitateur orbital** (50-100 tpm) - (Attention à ne pas renverser la boîte).

1.2. Purification

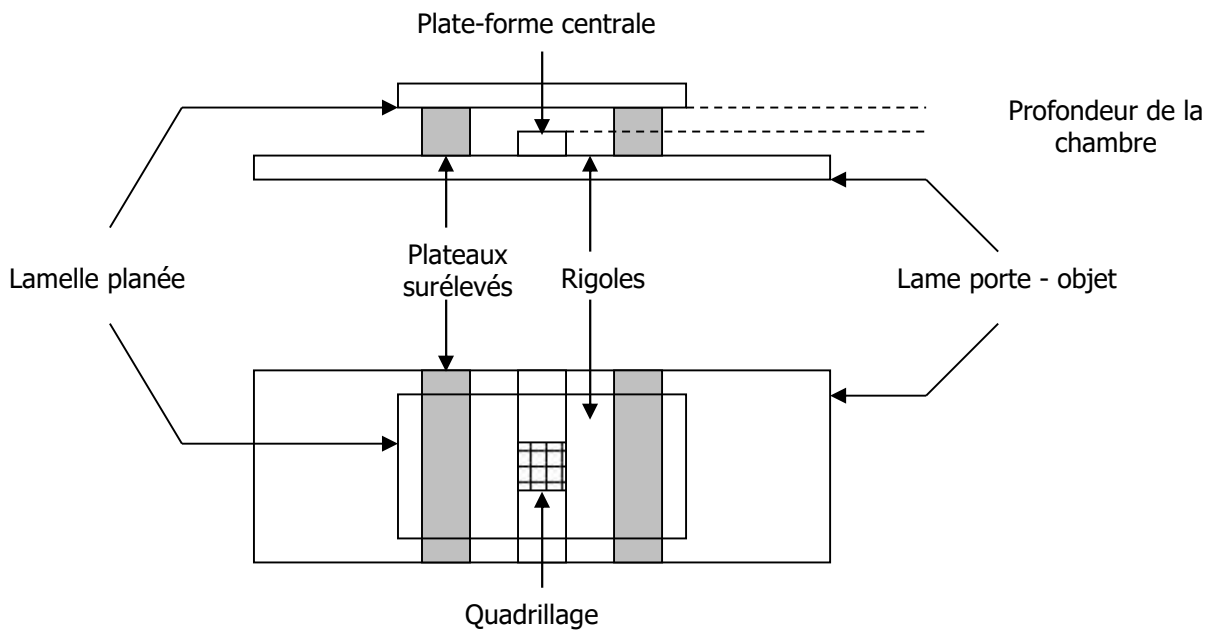
- Filtrer la suspension de protoplastes à travers un filtre nylon (100 μ m), pour éliminer les restes de feuilles non digérées et récupérer le filtrat dans un tube Falcon de 50 mL. Rincer le matériel après usage.
- Centrifuger 1,5 mL de la suspension de protoplastes (tubes eppendorf de 1.5 mL, **500 tpm, 5 min**).

- Eliminer le surnageant et laisser 100-150 μL de solution. Rincer avec 500 μL de tampon dépourvu des solutions enzymatiques. Centrifuger de nouveau. Le culot de protoplastes sera suspendu avec 100 μL de solution en tapotant sur le tube. Ne surtout pas vortexer.
- Conserver cette suspension de protoplastes dans son tube eppendorf et agiter doucement avant usage.

2. Observation et comptage des protoplastes

- Prélever une goutte de suspension de protoplastes (env. 20 μL) et la déposer sur la **gouttière centrale** de la cellule de comptage (**Malassez, voir explication**). **Estimer le nombre de protoplastes isolés et leur concentration (protoplastes/mL).**
- Observer alors, à un grossissement final de 400x-600x, les détails morphologiques des protoplastes. **Dessiner une cellule de protoplaste et déterminez la position des chloroplastes, des vacuoles etc...**

Une **cellule de numération** est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage :



Le volume de comptage est déterminé par :

- la surface du quadrillage gravé sur la lame.
- la profondeur de la chambre.

Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

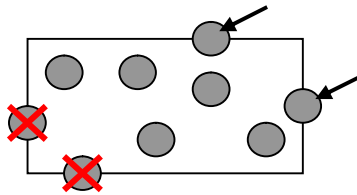
→ Le volume correspondant au quadrillage total est égal à **1 mm³ = 1 μL**

→ Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit **0,01 mm³ = 10 nL**

Pour la Numération

- Observer à l'objectif **x10** pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer). Régler le contraste et la lumière pour observer la grille et les protoplastes.
- Observer ensuite à l'objectif **x40** ou à **x60** pour réaliser le comptage (Voir instructions).
- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).



**Numération sur le rectangle
= 7 protoplastes**

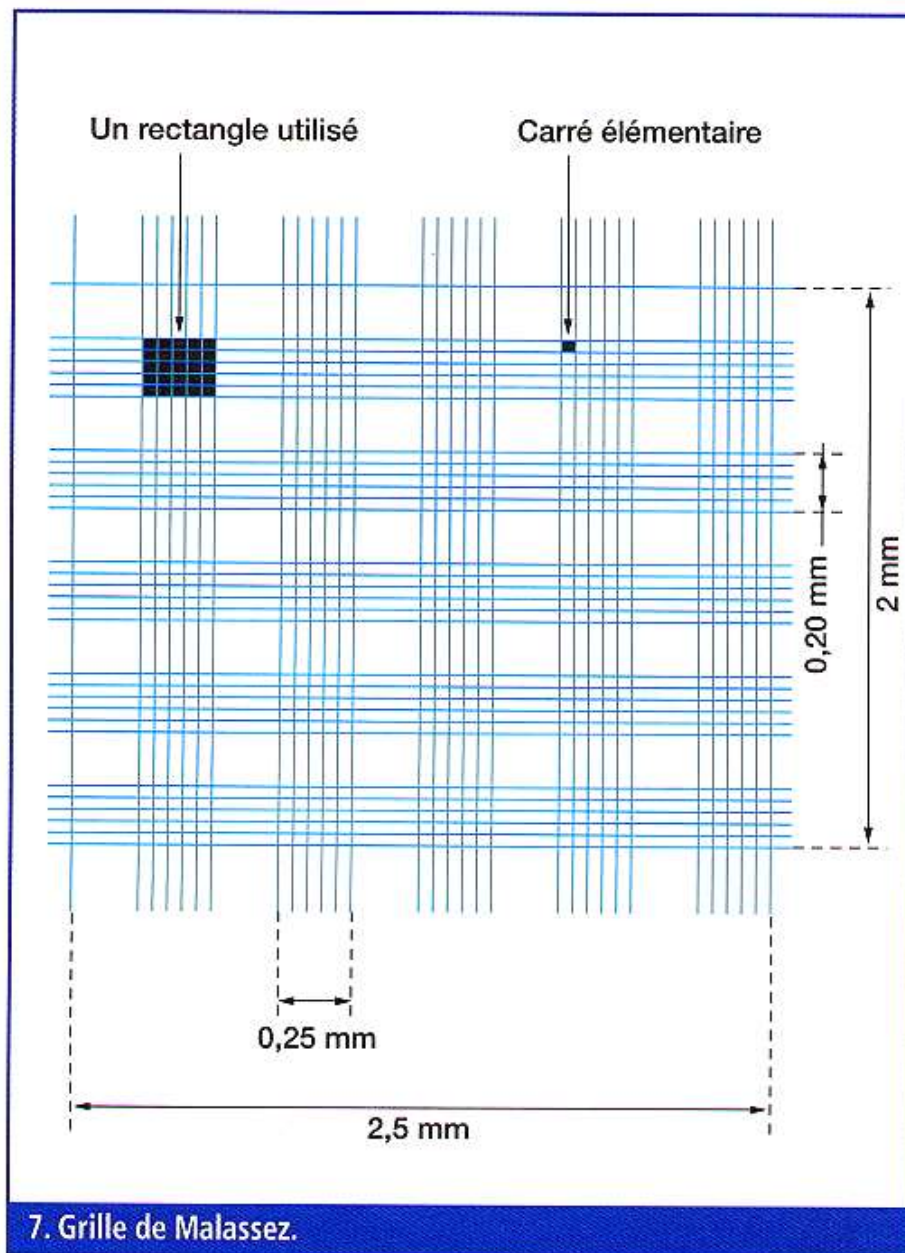
3. Perméabilité sélective

- Pipeter délicatement 20 μL de la suspension de protoplastes sur deux lames de microscopie.
- Ajouter sur les lames 1 et 2, respectivement, 20 μL , des colorants suivants :
 - ❶ : Rouge neutre 0.1 % v/v en solution TL.
 - ❷ : Phénosafranine 0.1 % v/v en solution TL.
- Recouvrir d'une lamelle et après 2 min, observez au microscope. **NE PAS LAISSER SECHER !**

Pour les deux essais, déterminer, le nombre de protoplastes colorés (A compter sur 20 protoplastes sans a priori).

Commenter les résultats.

Annexes :



Solution TL :

10% Sorbitol
Tampon MES pH 6.15 0.05 M

Ajouter **extemporanément** (en cours de TP):

50 % de sorbitol 20%
50 % de MES 100 mM
0.1 g de Cellulase Sigma (C-8546)
0.2 g de Pectinase Fluka (17389)