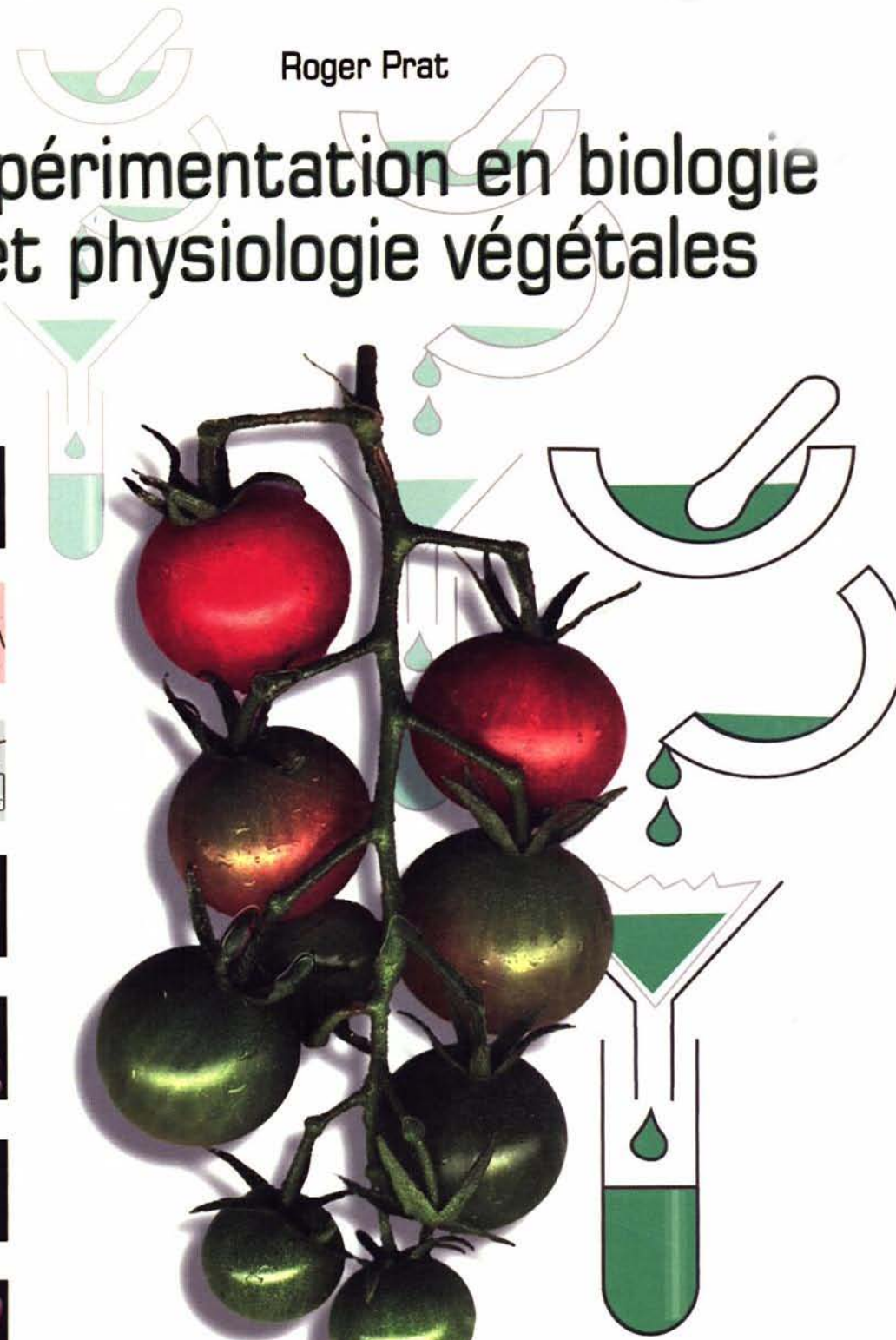
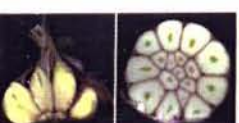
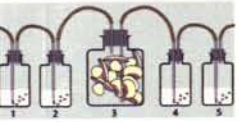


Roger Prat

Expérimentation en biologie et physiologie végétales



Expérimentation en Biologie
et Physiologie végétales

ROGER PRAT

Expérimentation en Biologie et Physiologie végétales

Trois cents manipulations

PRÉFACE D'ANNIE MAMECIER

éditions
Quæ

HERMANN  ÉDITEURS

ISBN 978 2 7056 6690 3 (Hermann Éditeurs)
ISBN 978 2 7592 0027 6 (Éditions Quæ)

© 2007 HERMANN ÉDITEURS, 6 RUE DE LA SORBONNE, 75005 PARIS
© 2007 ÉDITIONS QUÆ, C/O INRA, RD 10, 78026 VERSAILLES CEDEX

Toute reproduction ou représentation de cet ouvrage, intégrale ou partielle, serait illi-
cite sans l'autorisation de l'éditeur et constituerait une contrefaçon. Les cas stricte-
ment limités à usage privé ou de citation sont régis par la loi du 11 mars 1957.

Table des matières

PRÉFACE D'ANNIE MAMECIER	1
Introduction	5
I Biochimie	9
1 OSES ET DIHOLOSIDES	9
1.1 Réaction générale des oses : réaction de Molisch	9
1.2 Mise en évidence des sucres réducteurs (réaction de Fehling)	10
1.3 Mise en évidence des sucres réducteurs (réaction au nitrate d'argent)	11
1.4 Hydrolyse acide du saccharose	12
2 CONSTITUANTS PARIÉTAUX	13
2.1 Réaction générale des polysaccharides (APS ou acide périodique/Schiff)	13
2.2 Mise en évidence de la cellulose	14
2.3 Mise en évidence des pectines	15
2.4 Extraction et propriétés des pectines <i>in vitro</i>	16
2.5 Mise en évidence de la lignine (phloroglucine chlorhydrique)	17
3 SUBSTANCES DE RÉSERVE	18
3.1 Mise en évidence et localisation de l'amidon par le lugol	18
3.2 Structure de l'amidon (phénomène de la croix noire)	19
3.3 Extraction de l'amidon et préparation d'un empois	20
3.4 Hydrolyse acide de l'amidon	21
3.5 Mise en évidence de l'inuline	23
3.6 Mise en évidence et caractérisation des lipides	23
3.7 Mise en évidence des grains d'aleurone	24
3.8 Caractérisation des protéines (réaction du biuret)	25
3.8 Caractérisation des protéines (réaction xanthoprotéique)	26
4 PIGMENTS PHOTOSYNTHÉTIQUES	26
4.1 Extraction globale des pigments	26
4.2 Chromatographie sur papier	28
4.3 Observation d'un spectre d'absorption	29
4.4 Spectre d'absorption (ExAO-spectrophotomètre)	30
4.5 Fluorescence de la chlorophylle	31
4.6 Séparation des pigments par solubilité différentielle	32

4.7	Séparation des pigments sur colonne	34
4.8	Spectres d'absorption des pigments	36
4.9	Extraction des pigments d'une algue rouge	37
5	AUTRES SUBSTANCES	38
5.1	Mise en évidence des lycopènes	38
5.2	Mise en évidence des anthocyanes	39
5.3	Extraction et propriétés des anthocyanes	40
5.4	Mise en évidence de l'oxalate de calcium	40
5.5	Mise en évidence des tannins	41
5.6	Mise en évidence d'essences	42
6	ACTIVITÉS ENZYMATIQUES	42
6.1	Mise en évidence d'une activité amylasique	42
6.2	Hydrolyse enzymatique de l'amidon	44
6.3	Synthèse de l'amidon	45
6.4	Mise en évidence d'une saccharase extracellulaire	46
6.5	Mise en évidence d'une peroxydase	47
6.6	Cinétiques enzymatiques	48
7	ACIDES NUCLÉIQUES	50
7.1	Mise en évidence in situ de l'ADN	50
7.2	Extraction de l'ADN	51

II Histologie des plantes **53**

1 QUELQUES TECHNIQUES SIMPLES D'HISTOLOGIE **53**

1.1	Réaliser des sections fines d'échantillons variés	53
1.2	Observer sans coloration les coupes obtenues	55
1.3	Utiliser des colorants spécifiques	56
1.4	Utiliser une double coloration, le carmin-vert d'iode	56

2 RECONNAÎTRE LES DIFFÉRENTS TYPES DE TISSUS **57**

2.1	Tissus de revêtement	58
2.2	Tissus de soutien	59
2.3	Tissus conducteurs primaires	59
2.4	Parenchymes	60
2.5	Cambium et tissus conducteurs secondaires	60

3 APPLICATION À L'ÉTUDE DE QUELQUES ORGANES **61**

3.1	Tige de Dicotylédone herbacée (lamier)	61
3.2	Tige de Monocotylédone (iris)	62
3.3	Feuille de Dicotylédone (lierre)	62
3.4	Feuille de Monocotylédone (brome)	63
3.5	Racine jeune de Dicotylédone (ficaire)	64
3.6	Racine de Monocotylédone (iris)	65
3.7	Tige de Dicotylédone ligneuse (bruyère)	65
3.8	Racine de Dicotylédone ligneuse	66

4	CAS PARTICULIER DU BOIS	67
4.1	Interpréter la structure d'un tronc d'arbre	67
4.2	Structure microscopique du bois	69
5	QUELQUES APPLICATIONS	70
5.1	Planches de bois	70
5.2	Contreplaqué	70
5.3	Papyrus	71
III	Respiration et fermentation	75
1	RESPIRATION : UTILISATION DU DIOXYGÈNE	75
1.1	Mise en évidence	75
1.2	Nécessité d'un substrat (ExAO-oxygraphe)	77
1.3	Nature du substrat (ExAO-oxygraphe)	79
1.4	Concentration en substrat (ExAO-oxygraphe)	80
1.5	Respiration des plantes aériennes (ExAO-oxygraphe)	81
2	PRODUCTION DE DIOXYDE DE CARBONE	81
2.1	Mise en évidence	81
2.2	Cinétique (ExAO-pHmètre)	83
3	RESPIRATION MITOCHONDRIALE	84
3.1	Isolement de mitochondries	85
3.2	Fonctionnement <i>in vitro</i> des mitochondries	88
4	FERMENTATION ALCOOLIQUE	90
4.1	Mise en évidence	90
4.2	Mise en évidence des produits formés	91
4.3	Sucres fermentescibles	92
4.4	Fermentation propre des végétaux supérieurs	93
5	APPLICATIONS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE	95
5.1	Isolement du gluten à partir de farine de blé	95
5.2	Préparation d'une pâte à pain	96
IV	Photosynthèse	99
1	FORMATION DE DIOXYGÈNE	99
1.1	Mise en évidence (méthode des bulles)	99
1.2	Mise en évidence (indicateur d'oxydation)	102
1.3	Cinétique de la production de dioxygène	103
1.4	Effet d'écran	106
1.5	Rôle de l'éclairement	106
1.6	Importance de l'orientation foliaire (ExAO-oxygraphe)	107
1.7	Rôle de la chlorophylle	108
1.8	Rôle du dioxyde de carbone en milieu aquatique	109
1.9	Rôle du dioxyde de carbone en milieu aérien	110

2	CONSOMMATION DE DIOXYDE DE CARBONE	111
2.1	Mise en évidence en milieu aquatique	111
2.2	Cinétique de l'absorption de CO ₂ (ExAO-pHmètre)	112
3	SYNTHÈSE DE GLUCIDES	113
3.1	Rôle de la lumière et des pigments	113
3.2	Localisation au niveau des chloroplastes	114
4	SPECTRE D'ACTION	115
4.1	Protocole classique	115
4.2	Analyse critique	116
5	RÉACTION DE HILL	118
5.1	Isolement des chloroplastes	118
5.2	Mise en évidence d'une réduction	119
5.3	Dégagement de dioxygène et réduction (ExAO-oxygraphe)	121
6	PLANTES EN C3 ET EN C4	122

V	La plante et l'eau	125
1	OSMOSE	125
1.1	Mise en évidence de la plasmolyse	125
1.2	Construction d'un osmomètre	127
1.3	Expérience de Traube	128
1.4	Turgescence et plasmolyse	129
1.5	Rôle de la paroi (protoplastes)	131
2	MESURE DES PRESSIONS CELLULAIRES	132
2.1	Pression osmotique et concentration cellulaire	132
2.2	Pression osmotique (méthode cryoscopique)	134
2.3	Pression osmotique (méthode densitométrique)	135
2.4	Pression osmotique (méthode réfractométrique)	136
2.5	Potentiel hydrique (méthode des frites)	137
3	PERMÉABILITÉ AUX SUBSTANCES DISSOUTES	139
3.1	Coloration vitale de la vacuole	140
3.2	Pénétration différentielle de substances	140
3.3	Pénétration des ions	141
4	ABSORPTION DE L'EAU	141
4.1	Mise en évidence (potomètre)	142
4.2	Localisation	143
4.3	Sécheresse du sol	144
5	TRANSPIRATION	145
5.1	Mise en évidence	145
5.2	Localisation par le chlorure de cobalt	146
5.3	Observation des stomates	147
5.4	Réalisation d'empreintes stomatiques	148
5.5	Fermeture des stomates en cas de stress hydrique	149

5.6	Réalisation d'un modèle de stomate	150
6	CIRCULATION DE L'EAU	150
6.1	Mise en évidence	150
6.2	Expérience de Dixon	152
6.3	Structure du système conducteur	153
7	MOUVEMENTS DE TURGESCEANCE	154
7.1	Observation de la séismonastie de la sensitive	154
7.2	Morphologie de la feuille de sensitive	156
7.3	Potentiel d'action de la sensitive (ExAO)	156
7.4	Mouvement de la dionée gobe-mouche	158
7.5	Repliement des feuilles d'oyat	159
8	ADAPTATION DES PLANTES AUX MILIEUX SECS	161
8.1	Laurier-rose : des cryptes pilifères	161
8.2	Ptilotrichum : des poils-parasols	162
8.3	Plantes grasses : réduction de la surface foliaire	163
9	ADAPTATION DES PLANTES AU MILIEU AQUATIQUE	164
9.1	Une plante aquatique : le nénuphar	164
9.2	Une plante de milieu humide : le jonc	165
9.3	Cas particulier de l'élodée	165
VI	Morphogenèse	167
1	GERMINATION	167
1.1	Types de germinations	167
1.2	Étapes de la germination	168
1.3	Forces d'imbibition des graines	169
1.4	Vie ralentie et vie active (ExAO-oxygraphe)	170
1.5	Apparition de sucres réducteurs au cours de la germination	170
1.6	Mise en évidence d'une activité amylasique	171
1.7	Extraction d'une activité amylasique	172
2	LOCALISATION DE LA CROISSANCE	173
2.1	Cinétique de la croissance d'un organe	173
2.2	Expérience de Sachs	174
2.3	Gradient de croissance d'une tige	175
2.4	Mesure des longueurs cellulaires	176
2.5	Localisation des divisions cellulaires	177
3	RÉGULATION DE LA CROISSANCE	178
3.1	Test <i>pisum</i> de Went	178
3.2	Test <i>avena</i> de Went	180
3.3	Effet inhibiteur de la lumière et étiolement	181
3.4	Rôle de l'étiolement	182
3.5	Effet de l'éthylène sur le sens de croissance	183
3.6	Effet de l'auxine sur l'élongation	184

4	DOMINANCE APICALE	187
4.1	Mise en évidence	187
4.2	Rôle des cytokinines	188
4.3	Rôle de l'auxine	189
5	RAMIFICATION	191
5.1	Acrotonie et basitonie	191
5.2	Hypotonie	192
5.3	Monopode et sympode	193
6	CROISSANCE DU SYSTÈME RACINAIRE	194
6.1	Racines pivotantes et fasciculées	194
6.2	Formation des racines secondaires	194
6.3	Rhizogenèse et auxine	195
7	MOUVEMENTS DE CROISSANCE	195
7.1	Mise en évidence du gravitropisme	196
7.2	Annulation du gravitropisme	197
7.3	Gravitropisme des racines	197
7.4	Observation des cellules réceptrices de la coiffe	199
7.5	Mise en évidence et étude du phototropisme	200
7.6	Étude en 3D d'un mouvement de circumnutation	202
7.7	Circumnutation et thigmotropisme	203
7.8	Mise en évidence d'une thermonastie	205

VII	Reproduction	207
1	FLEURS ET FLORAISON	207
1.1	Fleur de renoncule	207
1.2	Fleur de tulipe	208
1.3	Fleur de genêt	210
1.4	Fleur de moutarde	211
1.5	Capitule de pissenlit	212
1.6	Floraison	212
2	MÉIOSE, POLLINISATION ET FÉCONDATION	213
2.1	Androcée (étamines et pollen)	213
2.2	Méiose	214
2.3	Germination du grain de pollen	216
2.4	Autopollinisation chez le pois	217
2.5	Le <i>Melandrium</i> , plante dioïque	218
2.6	Cas de la sauge	218
2.7	Cas des primevères	219
3	LES FRUITS	220
3.1	La tomate, une baie	220
3.2	Le petit pois, une gousse	221
3.3	La pomme, un fruit complexe	222

3.4	L'abricot, une drupe	223
4	LES GRAINES	223
4.1	Graine de haricot	223
4.2	Graine de ricin	224
4.3	Caryopse de maïs	225
5	GÉNÉTIQUE	227
5.1	Expérience de Mendel	227
5.2	Observation d'épis de maïs hybride	228
5.3	Utilisation d'ascomycètes à spores haploïdes orientées	230
VIII	Multiplication végétative	233
1	BULBES	234
1.1	Bulbe d'oignon	234
1.2	Bulbe d'ail	235
1.3	Bulbe de jacinthe	236
1.4	Bulbe de tulipe	238
1.5	Bulbe de crocus	240
2	TUBERCULES ET RHIZOMES	242
2.1	Tubercule de carotte	242
2.2	Tubercule de dahlia	243
2.3	Tubercule de pomme de terre	244
2.4	Rhizome de sceau de Salomon	244
3	MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE NATURELLE	245
3.1	Cas de l'élodée	245
3.2	Cas du fraisier	246
3.3	Cas du bryophyllum	247
3.4	Cas de la ficaire	247
4	MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE PROVOQUÉE	248
4.1	Boutures de pélagonium	248
4.2	Cas du tradescantia	249
4.4	Cas du bégonia	249
4.4	Cas du saintpaulia	250
5	CELLULES ISOLÉES ET PROTOPLASTES	251
5.1	Isolement mécanique de cellules	251
5.2	Isolement enzymatique de cellules	252
5.3	Isolement mécanique de protoplastes	253
5.4	Isolement enzymatique de protoplastes	254
5.5	Fusion de protoplastes	255
5.6	Régénération de paroi	256

ANNEXE 1	
Matériels biologiques	259
ANNEXE 2	
Produits utilisés	269
ANNEXE 3	
Systèmes ExAO	285
1 Principe général	285
2 Application à la mesure de la concentration en dioxygène	287
3 Application à la mesure du pH	291
4 Application à la colorimétrie	292
5 Application à la spectrophotométrie	292
6 Application à l'étude de phénomènes électriques	293
Bibliographie	295

Préface

L'expérimentation est au service de l'explication des phénomènes biologiques. L'approche forme aussi au mode de pensée expérimental, par un va-et-vient indispensable entre les idées explicatives, qu'on appelle *hypothèses*, et les faits naturels et provoqués par l'expérience. En outre, elle est reconnue par les enseignants comme un moyen de motiver leurs élèves à partir de données concrètes, dans les situations d'acquisition des connaissances relatives au fonctionnement du vivant.

Cependant, notamment du fait de son recours à l'électronique et à l'informatique, l'expérimentation mise en œuvre par les chercheurs se coupe de plus en plus de celle qu'il est possible de réaliser dans les laboratoires de nos établissements scolaires. Aussi, l'intérêt d'un ouvrage qui fait un pont utile entre le niveau de la recherche et celui de l'enseignement ne fait aucun doute. La sauvegarde et le renforcement des activités pratiques sont souhaités à la fois par les universitaires enseignants-chercheurs, par les inspecteurs généraux et régionaux ainsi que par les professeurs de sciences de la Vie et de la Terre.

Dans son ouvrage, Roger Prat ménage une place à peu près égale à chacun des huit chapitres suivants : la constitution chimique caractéristique des végétaux (biochimie), l'histologie des plantes en relation avec la systématique et la biologie, le catabolisme (respiration, fermentations), la photosynthèse, les dispositifs et mécanismes liés à l'approvisionnement et à la régulation de la perte en eau, la morphogenèse, la reproduction sexuée et la multiplication végétative naturelle et provoquée. Son intérêt explicatif provient, notamment, du rapprochement des données morphologiques, concernant des échantillons communs, des données anatomiques et histologiques, trop souvent dispersées dans les publications, ainsi que des données physiologiques tirées de l'expérimentation. Il s'agit donc d'un ouvrage extrêmement complet et comportant les bases scientifiques indispensables dans le domaine de la biologie et de la physiologie végétales.

Chaque objet d'étude est présenté selon un plan très clair qui distingue entre le matériel utilisé, le protocole expérimental définissant les gestes techniques, les résultats et, lorsque cela est nécessaire, leur interprétation est suivie de remarques complémentaires. Il ne s'agit donc pas de la progression organisée d'une démarche, mais d'une présentation assez exhaustive de manipulations classiques, de techniques d'observation et de mise en évidence (coupes, colorations et réactions spécifiques...), de techniques d'extraction ou encore d'isolements histologiques ou cellulaires. De très nombreux matériels frais, représentés par des organes végétatifs ou reproducteurs, des tissus et des constituants chimiques de la plante sont utilisés dans ces manipulations.

Il faut souligner aussi la modernité des exemples d'utilisation de l'expérimentation assistée par ordinateur (ExAO), dont le développement dans les établissements scolaires tient à la synergie des efforts des universitaires, enseignants, inspecteurs, et constructeurs, entrepris depuis près de deux décennies. Roger Prat a d'ailleurs joué un rôle moteur dans cette évolution. L'expérimentation permise donne à la démarche expérimentale son véritable sens : il s'agit, en introduisant la variation d'un paramètre, de provoquer un effet contrôlé sur une fonction et de quantifier la relation, après que la nature de celle-ci a été appréhendée par une ou des hypothèses explicatives à éprouver. Ancrée dans une démarche de pensée liée à la cinétique des phénomènes, l'expérience donne l'intelligence au geste et complète les manipulations basées sur des techniques d'observation ou de mise en évidence. De nombreux exemples d'expériences sont proposés : la relation entre imbibition des graines en germination et consommation de dioxygène, l'activité enzymatique dans la mobilisation des réserves de la plante, l'étude du pouvoir réducteur des chloroplastes en fonction de l'éclairement ou encore l'effet du stress hydrique sur la perte d'eau, etc. Quelques montages tout à fait originaux, comme la mesure de la différence de potentiel liée au repliement d'une feuille de sensitive, sont à souligner.

La qualité scientifique de l'ouvrage tient aussi à son illustration : schémas en couleur, très clairs, marquant les étapes du protocole ainsi que les résultats, diagrammes floraux de qualité exceptionnelle, images histologiques et leur interprétation, par exemple. Cette abondante illustration, avec ses légendes précises, soutient la lecture et la compréhension du texte relatif

aux protocoles et aux résultats d'une façon encore plus attrayante et aussi beaucoup plus complète que dans l'ouvrage précédent du même auteur sur l'expérimentation en physiologie végétale.

Les universitaires, dans le cadre des enseignements de la licence et du master, ainsi que les professeurs des classes préparatoires aux grandes écoles puiseront dans l'ouvrage de Roger Prat une multitude d'idées de protocoles de manipulations et d'expériences réalisables. Les enseignants du secondaire en sciences de la Vie et de la Terre, au collège et surtout au lycée où plus de la moitié de l'horaire est réservée aux travaux pratiques, disposeront de ces riches propositions en les adaptant à la démarche pédagogique choisie. En outre, les étudiants qui préparent les concours de recrutement, agrégation de SV-STU et Capes, ainsi que les professeurs stagiaires des IUFM, trouveront dans l'ouvrage de Roger Prat de nombreuses références utiles dans leur recherche du développement de l'utilisation des matériels biologiques.

Pour son exceptionnelle qualité, son adaptation possible à divers publics, du collège à l'université, cette production déjà expérimentée dans un enseignement préparatoire à l'agrégation est très attendue. Elle contribuera au développement de l'aspect expérimental d'un enseignement moderne. L'ouvrage apparaît aussi comme une véritable contribution au maintien d'une culture générale fédérant avec une totale réussite, dans un très large domaine, les apports de plusieurs sciences de la vie. Un très large succès est donc souhaité à cet important travail de synthèse.

Annie MAMECIER

*Inspectrice générale de l'Éducation nationale,
doyenne du groupe des Sciences de la vie et de la Terre*

Introduction

Les végétaux représentent une très grande partie du monde vivant et jouent un rôle essentiel dans les cycles de la matière au sein de la biosphère. Les végétaux chlorophylliens (et quelques bactéries) sont les seuls organismes à pouvoir vivre sans l'intervention d'autres organismes. Ils peuvent en effet, grâce à la photosynthèse, utiliser les radiations solaires pour synthétiser leur propre matière à partir des éléments minéraux à leur disposition dans l'air (le carbone sous forme de dioxyde de carbone) et dans le sol. Ils représentent, avec certaines bactéries, la source unique d'intégration de la matière minérale dans une forme organique assimilable ou utilisable par les autres êtres vivants. Les champignons (non chlorophylliens) et de nombreuses bactéries assurent la poursuite du cycle de la matière dans le monde vivant. Ils permettent la dégradation complète de la matière organique synthétisée précédemment et le retour de celle-ci à l'état minéral.

La première édition était consacrée essentiellement à la physiologie végétale. Dans cette nouvelle édition, nous avons voulu associer à la physiologie un certain nombre d'observations de biologie en développant des chapitres sur l'histologie, la morphogenèse et la reproduction. Il nous a paru important, chaque fois que cela était possible, de développer des observations sur certaines applications pratiques.

L'étude des végétaux présente aussi un intérêt pédagogique. Leur immobilité et l'absence, non de sensibilité, mais de système central de perception et d'analyse du monde extérieur, en font un matériel expérimental de choix. Contrairement à l'expérimentation réalisée sur les animaux vivants, l'expérimentation sur les végétaux ne pose pas de problèmes éthiques. Ceci présente une grande importance dans l'enseignement, en particulier au niveau des collèges et des lycées. De ce point de vue, l'utilisation des végétaux permet de développer certains concepts essentiels de la biologie et des sciences expérimentales en général. Il est ainsi possible, grâce à l'étude du fonctionnement des végétaux, de montrer, d'analyser et d'expliquer

simplement un certain nombre de notions fondamentales de biologie et d'initier les élèves à la démarche expérimentale.

Ce livre a été réalisé en réunissant et en intégrant de manière coordonnée les cours et travaux pratiques effectués au cours de nombreuses années d'enseignement. Son but est de proposer une panoplie importante de manipulations de biologie et physiologie végétale, réalisables dans un temps compatible avec une séance de travaux pratiques. Les manipulations proposées recouvriront les manipulations classiques ou même élémentaires exécutables au niveau d'une classe de collège et des manipulations plus sophistiquées, utilisant l'expérimentation assistée par ordinateur (ExAO).

Avertissement

Les expériences proposées ont été réparties selon de grands thèmes. Certains thèmes sont très expérimentaux, comme l'étude de la constitution des végétaux et celle des grandes fonctions physiologiques, et sont illustrés par des schémas. D'autres sont davantage basés sur des observations, comme l'étude de l'histologie ou de la reproduction, et sont illustrés par de nombreuses photographies.

Chaque expérience est proposée avec un plan approximativement constant : principe, matériel, protocole, résultats, conclusions, interprétation ou remarques.

Afin d'éviter des répétitions dans l'énoncé des techniques utilisées dans différentes expériences complémentaires, seuls les noms des produits et du matériel biologique sont cités, leur préparation est précisée dans trois annexes situées à la fin de l'ouvrage et auxquelles l'expérimentateur pourra se référer. Ces trois annexes concernent :

- les différents matériels biologiques ;
- les produits chimiques utilisés ;
- les techniques de prise et de traitement des données expérimentales par ExAO.

En aucun cas, cet ouvrage ne veut se substituer à des manuels ou à des directives pédagogiques concernant les programmes des lycées et collèges et leur réalisation pratique. À chaque expérimentateur ou à chaque professeur de choisir les manipulations qui lui paraissent convenir le mieux à la compréhension du problème scientifique qu'il veut démontrer. À lui aussi