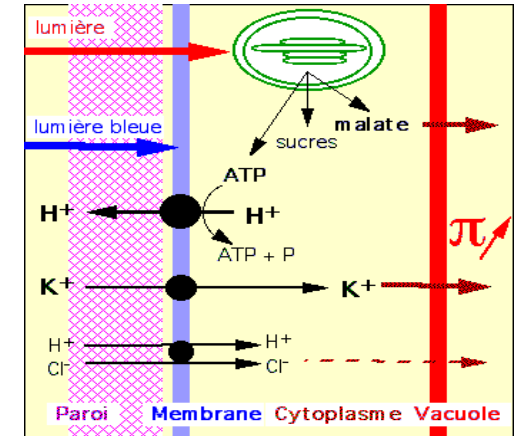


LICENCE 3

Physiologie végétale II (Bi607)  
NUTRITION VEGETALE

**TRAVAUX PRATIQUES**  
**(5 séances de 4 heures)**

- 1- Paramètres du bilan hydrique et mouvements stomatiques
- 2- Dosage des ions  $K^+$  et  $Na^+$ . Perméabilité membranaire.
- 3- Transport du saccharose et du glucose
- 4- Capacité d'échange cationique des racines
- 5- Absorption des ions nitrate par les racines



Enseignante : Annette BERTRAND  
([annette.bertrand@unicaen.fr](mailto:annette.bertrand@unicaen.fr))

UMR INRA-UCBN Ecophysiologie Végétale et Agronomie  
([www.rennes.inra.fr/umreva/](http://www.rennes.inra.fr/umreva/))

## Contenu des comptes-rendus

Les rubriques ci-dessous sont à reprendre dans les comptes-rendus, avec leur numérotation.

### 1- Introduction :

Indiquer en quelques lignes le contexte dans lequel se place l'étude effectuée.

### 2- Objectifs :

Indiquer précisément mais succinctement le(s) but(s) des expériences.

### 3- Méthodes :

Expliquer les méthodes employées en précisant les principes des méthodes utilisés. Il ne s'agit pas ici de rappeler les protocoles qui sont déjà détaillés dans ce polycopié.

### 4- Données brutes obtenues :

Indiquer les données obtenues lors du TP, en précisant bien les unités, les dilutions, les masses de végétal utilisé....

### 5- Exploitation des données :

Dans cette rubrique doivent se trouver les explications détaillées des calculs et les graphiques. Respectez bien les consignes indiquées dans le polycopié du TP considéré.

### 6- Description des résultats :

Résumer les résultats sous forme d'un tableau récapitulatif complet. Décrire succinctement mais rigoureusement les résultats obtenus.

### 7- Discussion des résultats et conclusion :

Commenter les résultats en les remettant dans le contexte de l'étude et en vous aidant des connaissances théoriques vues en cours ou en TD.

# Manipulation N° 1

- I. Mesure des paramètres du bilan hydrique dans un organe végétal (racine de carotte).
- II. Processus biologique dépendant de la turgescence cellulaire : étude des mouvements stomatiques.

\*\*\*

L'eau est nécessaire à la plante. Elle participe au maintien des structures, elle contribue au port des végétaux, elle commande divers mouvements tels que ceux des stomates, elle est indispensable au métabolisme et sert de "vecteur" aux substances nutritives, aux déchets et aux hormones.

Le flux d'eau du sol vers la plante dépend de nombreux facteurs se rapportant les uns à la plante, les autres aux conditions édaphiques : température, disponibilité de l'eau du sol et aux conditions atmosphériques qui influent sur la demande évaporatrice.

## I. Mesure des paramètres du bilan hydrique

La disponibilité de l'eau dans un système hydraté est donnée par la mesure du potentiel hydrique. Le potentiel hydrique d'un système est égal mais de signe opposé à l'énergie qu'il faut lui appliquer pour en libérer un gramme d'eau. Il se décompose en un certain nombre de termes différents selon que l'on considère la cellule, le sol ou l'air. Une circulation d'eau s'établit lorsqu'il y a des différences de potentiel hydrique entre les systèmes hydratés. L'eau se déplace spontanément du système ayant le potentiel le plus élevé vers le système ayant le potentiel le plus bas.

Dans les cellules végétales l'eau solubilise des substances dissoutes. Elle est contenue dans des espaces capillaires. Elle hydrate des substances colloïdales. Mais l'hydratation des cellules est limitée par tout ce qui s'oppose au gonflement du contenu cellulaire en présence d'eau : pression de la paroi, pression des cellules environnantes, pression gazeuse des méats. Le potentiel hydrique d'une cellule est la résultante des forces tendant à attirer les molécules d'eau dans la cellule et des forces tendant à empêcher l'entrée de l'eau dans la cellule.

$$\Psi_H = (\Psi_o + \Psi_m) + \Psi_T$$

$\Psi_o$  : potentiel osmotique dû aux substances dissoutes

$\Psi_m$  : potentiel matriciel dû aux forces d'imbibition des colloïdes et de rétention dans les capillaires.

$\Psi_T$  : potentiel de turgescence dû aux forces s'opposant au gonflement de la cellule.

Lorsque la cellule est très vacuolisée.

$$\Psi_H = \Psi_o + \Psi_\tau$$

$\Psi_H$ ,  $\Psi_o$ ,  $\Psi_\tau$  s'expriment en unité de pression (atmosphère, bar, mega-pascal),  $\Psi_H$  et  $\Psi_o$  sont négatifs  $\Psi_\tau$  est positif.

## A. Mesure du potentiel osmotique de la racine de carotte

### 1) Principe

Comme nous l'avons vu précédemment il existe une relation entre le potentiel osmotique d'une solution et la concentration en particules dissoutes : molécules non dissociées plus ions. On définit l'osmolarité d'une solution comme étant le nombre de particules contenues dans l'unité de volume. On peut écrire pour les solutions diluées :  $\Psi_o = - RT O$

Dans les conditions normales :  $\Psi_o = - 22,4 O$  (O en  $\text{osmol.L}^{-1}$  et  $\Psi_o$  en atm)

### 2) Mesure de l'osmolarité d'une solution

Cette mesure est basée sur la détermination de l'abaissement du point de congélation. Lorsqu'un solvant contient des particules dissoutes il se solidifie à une température  $\theta'$  inférieure à celle du solvant pur  $\theta$ .

$$\Delta = \theta - \theta'$$

Cet abaissement  $\Delta$  du point de congélation est proportionnel à l'osmolarité de la solution :

$$\Delta = k o$$

Dans le cas de l'eau  $k = 1,86, \Delta = 1,86 O$

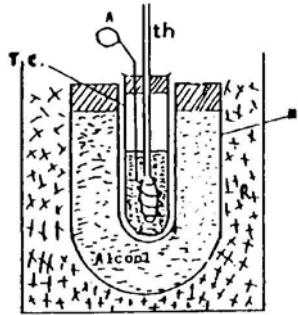
#### 2.1. Extraction des substances hydrosolubles de la racine de carotte

- peser 50 grammes de carottes = P (ne pas prendre les extrémités des carottes). Couper les carottes en fines lamelles que l'on introduit dans un erlenmeyer.
- verser environ 100 ml d'eau distillée sur les carottes coupées. Couvrir avec du papier d'aluminium. Faire bouillir et maintenir une douce ébullition pendant environ 30 minutes.  
**Veiller à ce que les carottes soient toujours recouvertes d'eau.**
- après refroidissement, filtrer l'extrait sur un papier filtre dans un entonnoir en récupérant l'extrait dans une fiole jaugée de 200 mL  
- Ajuster le volume à 200 mL avec de l'eau distillée.

Déterminer la valeur du coefficient de dilution des substances hydrosolubles sachant que la matière sèche représente 14 % de la matière fraîche.

## 2.2. Utilisation du cryoscope

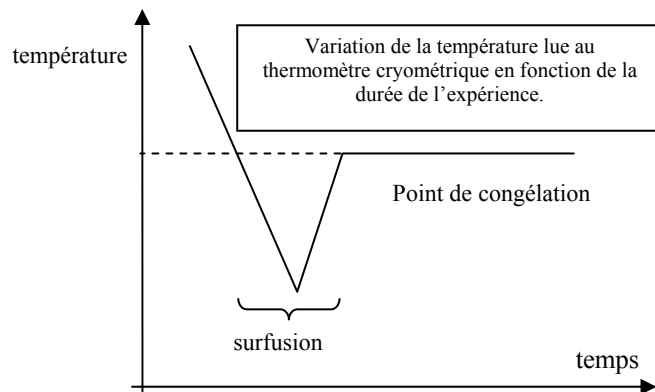
Le cryoscope comprend : un tube central (T.C.) muni d'un bouchon traversé par un agitateur (A) et par un thermomètre (th) gradué en centième de degrés. Ce tube central est entouré d'un manchon protecteur (M) rempli d'alcool. Le refroidissement de l'appareil est obtenu grâce à un mélange réfrigérant (glace + sel) contenu dans un cristallisateur.



### a) Détermination du O vrai du thermomètre.

Laver le tube TC et la base du thermomètre à l'eau distillée. Verser de l'eau distillée dans le tube de telle façon que le réservoir du thermomètre soit juste recouvert.

Remplir le cristallisateur d'un mélange réfrigérant (glace + sel). Placer le cryoscope bien bouché dans le mélange réfrigérant. Surveiller la température au thermomètre cryométrique. L'évolution de cette température en fonction du temps est indiquée sur le graphique ci-dessous. Noter la température  $\theta$  qui représente la température de congélation de l'eau pure donc le O vrai du thermomètre.



### b) Détermination du point de congélation de la décoction.

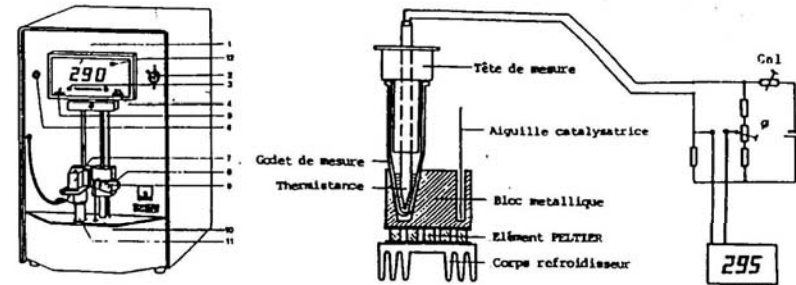
Opérer comme avec l'eau distillée et noter la température  $\theta'$ . Calculer :

$$\Delta = \theta - \theta'$$

Déterminer l'osmolarité de la décoction.

Déterminer l'osmolarité des liquides cellulaires en tenant compte du coefficient de dilution, calculé précédemment.

## 2.3. Utilisation de l'osmomètre.



1. Affichage numérique
2. Interrupteur on/off
3. Voyant: FIN DE MESURE
4. Trimmer pour étalonnage
5. Trimmer pour "point de zéro"
6. Poussoir pour étalonnage
7. Tête de mesure
8. Levier
9. Support aiguille
10. Aiguille froide
11. Godet de mesure
12. Indicateur d'erreur

MICRO-OSMOMETRE AUTOMATIQUE

Ne jamais manipuler l'appareil sans la présence d'un enseignant.

Mesurer l'osmolarité de la décoction et déterminer l'osmolarité des liquides cellulaires en tenant compte du coefficient de dilution.

## 2.4. Calcul du potentiel osmotique.

A partir de la relation :

$$\Psi_0 = - 22,4 \theta$$

calculer le potentiel osmotique des liquides cellulaires de la racine de carotte. Comparer les résultats obtenus avec les deux méthodes.

## B. Mesure de la participation des sucres réducteurs à l'osmolarité cellulaire

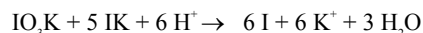
La racine de carotte est riche en sucres réducteurs ( glucose, fructose...) et non réducteurs (saccharose...). Ces substances hydrosolubles participent à l'osmolarité cellulaire déterminée précédemment. La méthode de Somogyi permet de mesurer la concentration des sucres réducteurs dans la décoction de racine de carotte et d'en déduire l'importance de leur participation dans l'osmolarité des liquides cellulaires.

### 1) Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode de Somogyi

En milieu alcalin et à chaud les oses sont réducteurs En présence de liqueur de Fehling, solution alcaline d'hydroxyde cuivrique  $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , une solution de glucose donne un précipité rouge d'oxydure cuivreux :



Si nous avons préalablement ajouté à la liqueur de Fehling de l'iodure de K et de l'iodate de K et si à la fin de la réduction du cuivre cuivrique à l'état cuivreux par le glucose nous acidifions, il se produit la réaction suivante :

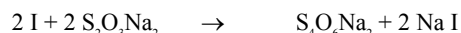


une partie de l'iode libérée est réduite à l'état d'iode par les ions cuivreux.



En dosant l'iode libre dans une solution témoin sans sucre et dans la solution sucrée, on trouve par différence la quantité de glucose présent.

L'iode est dosé par une solution d'hyposulfite de Na suivant la réaction.



### 2) Mode opératoire :

#### a) Préparation de la courbe d'étalonnage :

A partir d'une solution mère de glucose à  $1 \text{ g l}^{-1}$ , préparer 50 ml des solutions suivantes : 0,10 ; 0,20 ; 0,30 ; 0,40 et 0,50  $\text{mg ml}^{-1}$  de glucose.

#### b) Dosage des sucres réducteurs par la méthode de Somogyi:

Avec chacune des solutions à doser, verser dans un erlenmeyer:

- 5 ml de solution à doser (solutions étalon de glucose, décoction diluée 25 et 50 fois, et eau distillée pour le blanc: soit 8 erlenmeyers en tout)
- 5 ml de solution de Somogyi

- 1) Mettre les erlenmeyers **au bain marie bouillant pendant 16 minutes**, après les avoir recouvert de papier aluminium.

- 2) Refroidir.
- 3) Ajouter rapidement 5ml de  $\text{SO}_4 \text{H}_2$  2N. Agiter. Une coloration jaune due à l'iode se développe.
- 4) Doser cet iode avec le thiosulfate 0,005 N préparé à partir d'une solution à 0,1 N. Commencer par les solutions les plus concentrées. Quand la coloration jaune est devenue pâle, ajouter une pincée de thiodène et terminer le dosage jusqu'à virage du bleu à l'incolore. Soit  $v$  la quantité de thiosulfate utilisé pour les solutions étalon ou pour la décoction. Soit  $V$  la quantité de thiosulfate utilisé pour l'eau distillée.  
 $V - v$  ml de thiosulfate correspond donc à la quantité de glucose présent dans les 5 ml de solution étalon ou de décoction.
- 5) Etablir la courbe d'étalonnage et déterminer la concentration en sucres réducteurs exprimée en glucose dans la décoction (en  $\text{mg ml}^{-1}$  et mM).

**Remarque :** Plus il y a de glucose dans la solution, plus il y aura d'ions cuivreux formés et donc plus l'iode sera réduit. Il restera donc d'autant moins d'iode (I) avec les solutions concentrées en glucose et le volume d'hyposulfite versé sera plus petit. Il est donc préférable de commencer le dosage par les solutions les plus concentrées.

### 3) Participation des sucres réducteurs à l'osmolarité cellulaire

En utilisant le résultat précédent (concentration en mM de glucose), exprimer en pour cent la participation des sucres réducteurs à l'osmolarité des liquides cellulaires en tenant compte du coefficient de dilution entre la décoction et les liquides cellulaires.

## II. Processus biologique dépendant de la turgescence cellulaire : étude des mouvements stomatiques.

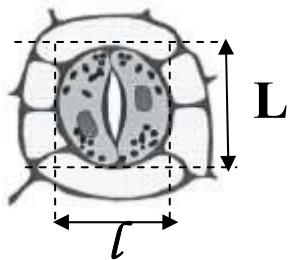
Le rôle de la turgescence est essentiel dans le bilan hydrique des végétaux et dans le maintien de leur forme, qui peut s'effondrer par flétrissement. D'autres processus biologiques indispensables à la vie des plantes font aussi intervenir les mécanismes de turgescence des tissus végétaux, à savoir certains types de mouvements ainsi que la croissance en longueur. Bien que les fonctions de ces processus soient nettement différentes, leurs mécanismes fondamentaux sont très proches. Dans ces cas, il y a interaction entre le transport actif primaire de protons, le transport actif secondaire d'ions et les processus osmotiques. La figure de la couverture montre le schéma général des réactions à la base de ces phénomènes.

Le  $K^+$  et les anions d'acide malique (malate) peuvent être accumulés comme substances osmotiquement actives. Il s'établit un courant osmotique d'eau, ce flux volumique génère une augmentation de la pression de turgescence.

Un des mouvements de turgescence les plus importants chez les plantes est l'ouverture et la fermeture des ostioles. Les ostioles sont de petites ouvertures à la surface des feuilles et d'autres organites aériens des plantes. Ils se situent entre deux cellules spécialisées de l'épiderme : les cellules stomatiques qui forment l'appareil stomatique (ou stomates). Une structure anatomique spécifique en particulier la constitution des parois cellulaires, assure l'ouverture du stomate, qui résulte d'une augmentation de volume et de la turgescence des cellules stomatiques, alors que le contraire assure la fermeture. La résistance à la perte d'eau (transpiration) est fortement augmentée lorsque les stomates sont fermés. Ainsi les mouvements stomatiques dépendant de la turgescence sont des mécanismes fondamentaux de la régulation du bilan hydrique chez les plantes.

Arracher à la face inférieure et entre les nervures d'une feuille de *Zebrina pendula* plusieurs lambeaux d'épiderme. Numérotés de 1 à 5 des verres de montre et verser:

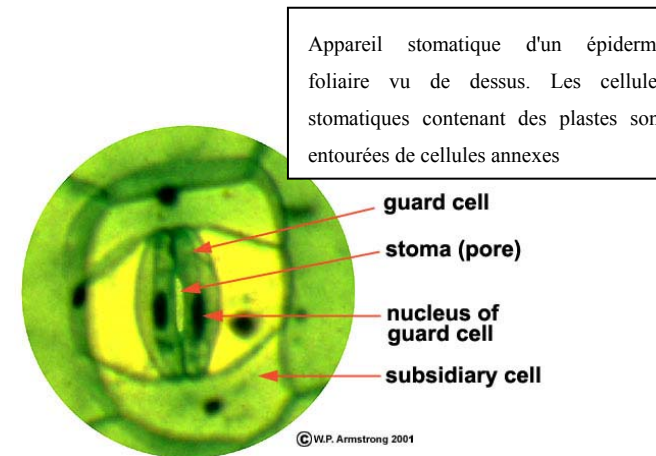
- de l'eau distillée dans le verre N° 1.
- de la solution de saccharose 1 M dans le verre N° 2.
- de l'eau distillée dans le verre N° 3, recouvrir d'une boîte opaque (obscurité)
- de la solution de chlorure de potassium 0,2 M dans le verre N° 4.
- de la solution de chlorure de calcium 0,2 M dans le verre N° 5.



Mettre plusieurs lambeaux d'épiderme dans les cinq verres de montre. Attendre 1 h 30 puis observer les lambeaux d'épiderme entre lame et lamelle dans une goutte du liquide où ils viennent de séjourner, à l'aide d'un microscope muni d'un oculaire micrométrique. Mesurer sur 10 stomates la longueur  $L$  des cellules stomatiques et la largeur  $l$ . Calculer pour chaque stomate le rapport  $L/l$  et la moyenne des 10 mensurations. Comparer la moyenne obtenue pour les cinq traitements. Étant donné que lorsque  $L/l$  augmente c'est qu'il y a fermeture de l'ostiole et inversement, décrire et commentez les résultats obtenus sur les mouvements d'ouverture et de fermeture des stomates dans les différentes conditions étudiées.

## PLAN DE TRAVAIL

- 1- Mise en route de l'extraction de la carotte
- 2- Préparation des épidermes de *Zebrina* pour l'observation des stomates
- 3- Préparation des solutions étalons pour le dosage des sucres réducteurs
- 4- Dosage des sucres réducteurs dans l'extrait de carotte et les solutions étalons.
- 5- Mesure du potentiel osmotique par le cryoscope et le micro-osmomètre.
- 6- Observation microscopique des stomates.



## Manipulation N° 2

**Dosage des ions  $K^+$  et des ions  $Ca^{2+}$  dans un tissu végétal : feuille d'endives.**

**Mise en évidence des effets de la température et des ions  $Ca^{2+}$  et  $Na^+$  sur la perméabilité membranaire.**

\*\*\*

Dans le végétal, le potassium reste sous forme d'ion  $K^+$  très mobiles, dissous dans les liquides intracellulaires, notamment dans la vacuole. Son abondance et sa mobilité en font le cation le plus important pour augmenter l'osmolarité vacuolaire et donc la turgescence vacuolaire. Les flux de potassium jouent ainsi un rôle déterminant dans le contrôle des mouvements de cellules ou d'organes commandés par des variations d'osmolarité. De même c'est le potassium qui assure pour l'essentiel l'équilibre des charges dans la cellule. Il accompagne ainsi les anions dans leur accumulation et leur migration, mais diffusent plus vite que les anions, il est le principal créateur des potentiels électriques de diffusion endocellulaire (voir cours et exercices de travaux dirigés). Enfin, les ions  $K^+$  sont ceux qui s'échangent le plus facilement contre les ions  $H^+$  émis par les pompes à protons, leur permettant ainsi en continu de créer des gradients de **pH** entre deux compartiments ainsi que la force protonmotrice qui en découle (voir exercices de travaux dirigés).

A ces fonctions où le potassium intervient de par son abondance s'ajoutent des fonctions catalytiques en activant de nombreuses enzymes. C'est donc un élément d'une extrême importance, indispensable à tout végétal.

Contrairement au potassium, le calcium est peu mobile. Ses deux charges (+) en font un élément qui se fixe sur les membranes biologiques généralement chargées négativement. Il participe à la structure de la paroi. La paroi primaire est un réseau hydraté dont la matière sèche renferme en majeure partie des polysaccharides associés à des protéines et des ions minéraux essentiellement les ions calcium. Les liaisons établies entre les ions  $Ca^{2+}$  et les polysaccharides sont acido-labiles. La concentration en  $Ca^{2+}$  du cytosol est normalement très faible et très bien régulée, son rôle est physiologiquement extrêmement important (voir cours et exercices de TD).

Un traitement des tissus par l'eau bouillante permet d'extraire uniquement les ions libres. Un traitement à l'acide HCl 0,5 N permet d'extraire à la fois les ions libres et les ions liés aux structures.

### A. Extraction et dosage des ions $K^+$ et $Ca^{2+}$ dans un tissu végétal

Le végétal utilisé est l'endive : *Cichorium*.

#### **1) Extraction.**

##### 1.1. Extraction à l'eau.

Peser 50 grammes de feuilles d'endives. Les couper en fines lamelles dans un erlenmeyer de 200 ml, verser 150 ml d'eau, faire bouillir et maintenir une douce ébullition **pendant environ 10 minutes**. Laisser refroidir et filtrer. Recueillir le filtrat dans une fiole jaugée de 200 ml, compléter le volume avec de l'eau distillée.

##### 1.2. Extraction avec une solution acide.

Peser 50 grammes de feuilles d'endives ; les couper en fines lamelles dans un erlenmeyer de 200 ml, verser 150 ml de solution d'HCl 0,5 N. Laisser reposer sur la paille pendant 24 heures.

Reprendre sur la paille l'extraction préparée la veille. Filtrer la solution et recueillir le filtrat dans une fiole jaugée de 200 ml, compléter le volume avec de l'eau distillée.

#### **2) Dosage des ions K par photométrie de flamme.**

##### 2.1. Principe du dosage.

Lorsqu'on fournit de l'énergie à un élément (par exemple de l'énergie thermique dans une flamme), on excite ses atomes qui reperdent cette énergie sous forme de radiations de fréquence bien déterminée (il y a passage d'électrons entre couches de niveau énergétique différent). Les radiations émises sont caractéristiques de l'élément considéré et, pour une énergie d'excitation donnée, l'intensité de l'émission des raies est proportionnelle au nombre de particules présentes.

Le principe de la mesure est donc le suivant : la solution contenant l'élément à doser est pulvérisée et entraînée (à l'état de fin brouillard) par un courant d'air comprimé dans la flamme d'un brûleur. Les éléments à doser sont alors excités et émettent des raies spéciales caractéristiques que l'on isole à l'aide d'un filtre sélectif et que l'on reçoit sur une cellule photoélectrique. Un instrument de mesure électrique permet ainsi d'apprécier indirectement la concentration de l'élément à doser dans la solution diluée (après un étalonnage de l'appareil à l'aide de solutions de concentrations connues).

## 2.2. Préparation des solutions étalons.

A partir d'une solution mère à  $500 \text{ mg l}^{-1}$  de  $\text{K}^+$  préparer des solutions à  $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg l}^{-1}$  et  $10 \text{ mg l}^{-1}$ .

## 2.3. Utilisation de l'appareil.

Régler avec le bouton de droite de l'appareil sur la valeur 15.00 avec la concentration  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . Noter les valeurs d'émission atomique (unité arbitraire) obtenues pour les autres solutions étalons. Construire la courbe d'étalonnage. Doser les ions  $\text{K}^+$  dans l'extraction à l'eau et l'extraction acide. Diluer les solutions avec de l'eau distillée si cela est nécessaire. Exprimer la teneur en  $\text{K}^+$  du végétal en % de la matière fraîche (g de  $\text{K}^+$  pour 100 g de matière fraîche). Comparer les deux modes d'extraction et calculer les proportions d'ions  $\text{K}^+$  libres et d'ions  $\text{K}^+$  liés par rapport aux ions  $\text{K}^+$  totaux. Commenter les résultats.

## 3) Dosage des ions $\text{Ca}^{2+}$ par complexométrie.

### 3.1. Principe.

Certaines molécules organiques (renfermant de l'azote et des radicaux acétiques) forment avec des ions métalliques des complexes au chelats stables et solubles dans l'eau, ce sont des complexons. Outre les complexons, certains indicateurs colorés peuvent former avec des ions métalliques des chelats dont la couleur est différente de la couleur propre des indicateurs considérés. Ces complexes (indicateur-métal) sont moins stables que les complexes (complexons-métal). De la sorte, l'introduction dans une solution contenant des ions métalliques, d'un indicateur coloré approprié aboutit à la formation d'un complexe coloré (indicateur-métal). Mais l'addition d'un complexon à ce milieu provoquera la formation d'un chelat (complexon-métal) non coloré et la solution prendra finalement la teinte propre de l'indicateur coloré. Du volume de complexon utilisé pour déplacer tout le chelat (indicateur-métal) on peut déduire la quantité de métal présent dans le volume initial de solution à titrer.

La coloration propre des indicateurs colorés utilisés par ces techniques varie souvent avec le **pH**. Or, au cours du dosage il y a libération d'ion  $\text{H}^+$ , il est donc nécessaire d'opérer en milieu tamponné et de veiller à ce que le **pH** ne varie pas.

### 3.2. Dosage du $\text{Ca}^{2+}$

☞ L'indicateur coloré est l'indicateur de PATTON et REEDER ou HHSN. Sa couleur propre à pH 12 est bleue. En présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , il se forme un chelat de couleur rouge bordeaux.

☞ Le complexon utilisé pour le titrage est le sel sodique de l'acide éthylène diamine tétracétique = **EDTA**.

☞ Pour connaître la teneur de la solution en calcium, il faut étalonner l'EDTA avec une solution de référence contenant des quantités connues de  $\text{Ca}^{2+}$ .

☞ Verser dans un bécher :

- 10 ml** de solution à doser (extraction à l'eau et extraction acide) ou **2,5 mL** de la solution de référence à  $1 \text{ mg de Ca}^{2+} \text{ ml}^{-1}$ .
- 10 mL d'eau distillée
- 2 ml de solution de soude 2,5 N. vérifier que le pH est supérieur à 12. Si ce n'est pas le cas, ajouter de la soude par tranche de 0,5 mL.
  
- une pincée (quantité à déterminer par l'opérateur) d'indicateur HHSN.
- agiter, titrer par la solution d'EDTA M/200, jusqu'à coloration bleue franche (pour les solutions d'endives, la solution est jaune avant dosage, donc la couleur bleu franche devient en fait du VERT !). Soit V le volume d'EDTA versé (faire 2 fois au minimum le dosage) pour la solution inconnue et n le volume d'EDTA versé pour la solution de référence.

Sachant le volume n mL d'EDTA versé pour 2,5 mg de  $\text{Ca}^{2+}$  (2,5 mL de solution de référence à  $1 \text{ mg de Ca}^{2+} \text{ mL}^{-1}$ ), déduire la masse de calcium contenue dans 10 mL d'échantillon et calculer la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  en mg/L pour chaque échantillon.

Exprimer la teneur en  $\text{Ca}^{2+}$  du végétal en % de la matière fraîche (g de  $\text{Ca}^{2+}$  pour 100 g de matière fraîche). Comparer les deux modes d'extraction et calculer les proportions d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  libres et d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  liés par rapport aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  totaux. Commenter les résultats.

## B. Effets des ions $\text{Ca}^{2+}$ et de la température sur la perméabilité cellulaire.

Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  se fixent sur les sites négatifs des têtes polaires des phospholipides membranaires, ce qui tend à les rapprocher les uns des autres et à leur donner plus de cohésion. Le calcium diminue ainsi la fluidité membranaire et par conséquent la perméabilité membranaire. Il freine la pénétration de la plupart des ions, l'antagonisme qu'il manifeste à leur égard a des conséquences heureuses quand ces ions sont toxiques (métaux lourds) ou présents à des doses excessives (ions  $\text{Na}^+$ ), mais à l'inverse, s'il s'agit d'éléments nécessaires, présents à des doses un peu insuffisantes il augmente les risques de carence (carence en fer dite chlorose calcique).

La température agit sur la fluidité membranaire en l'augmentant (températures élevées) ou en la diminuant (températures basses), elle agit donc aussi sur la perméabilité.

Les modifications de la perméabilité membranaire sont suivies en étudiant le passage d'un constituant vacuolaire dans le milieu extérieur qui entoure la cellule. La racine de betterave rouge ayant des cellules dont les vacuoles sont très riches en pigments dissous (anthocyanosides) constitue un matériel commode pour suivre les variations de la vitesse de diffusion des pigments anthocyaniques à l'extérieur des cellules.

### 1) Mise en place de l'expérience.

Dans une racine de betterave rouge découper des cylindres à l'aide d'un emporte-pièce. Placer ces cylindres sur du papier absorbant et découper des morceaux de 2 cm de longueur. Il faut 20 de ces morceaux pour l'ensemble de la manipulation. Disposer ces morceaux dans un grand entonnoir de Büchner adapté à une fiole à trop plein. Laver à l'eau courante jusqu'à ce que le liquide de lavage soit incolore.

### 2) Action de différents traitements thermiques sur la perméabilité.

Préparer 6 tubes à essais numérotés de 1 à 6 et verser dans chacun d'eux 10 ml d'eau distillée.

Dans un grand bécher faire chauffer de l'eau distillée jusqu'à  $80^\circ\text{C}$ . Arrêter le chauffage. Plonger immédiatement dans cette eau. 2 morceaux de betterave rouge lavés.

Après 1 minute, sortir ces morceaux, les laver très rapidement à l'eau distillée et les plonger dans le tube N° 1.

Ajouter de l'eau froide dans le bécher. Quand la température est de  $70^\circ\text{C}$  y plonger 2 morceaux de betterave. Procéder comme précédemment.

Faire de même pour les traitements thermiques :  $60^\circ$ ,  $50^\circ$  et  $40^\circ$  et  $20^\circ\text{C}$ .

Après 10 min de séjour de tous les tubes à la température ambiante, mélanger par retournement le contenu de chaque tube et transvaser la solution dans un autre tube avant mesure de la DO à 530 nm. Représenter graphiquement l'évolution de la coloration (DO) en fonction de la température. Quelles déductions pouvez-vous faire ?

### 3) Action des ions $\text{Na}^+$ et $\text{Ca}^{2+}$ sur la perméabilité.

➤ Préparer trois tubes à essais numérotés de 7 à 9.

➤ Verser dans le tube n° 7, 10 ml de chlorure de sodium à  $7,5\text{ g.l}^{-1}$ . Y plonger 2 morceaux de betterave lavés.

➤ Dans le tube n° 8 faire la même chose avec 10 ml de chlorure de calcium à  $12\text{ g.l}^{-1}$ .

➤ Mélanger 10 ml de solution de chlorure de sodium à  $15\text{ g.l}^{-1}$  et 10 ml de solution de chlorure de calcium à  $24\text{ g.l}^{-1}$ . Mettre 10 ml de ce mélange dans le tube n° 9 et y plonger 2 morceaux de betterave lavés.

Après une heure de séjour de tous les tubes à la température ambiante agiter les tubes et comparer la coloration des liquides en mesurant la DO à 530 nm.

Que peut-on déduire de cette expérience ?

---

## PLAN DE TRAVAIL

- 1- Mettre en route les extractions des feuilles d'endives.
  - 2- Préparer et rincer les cylindres de betterave.
  - 3- Mettre en route la mise en évidence de l'action de la température et des ions sur la perméabilité membranaire (betterave).
  - 4- Préparer la gamme d'étalonnage du potassium.
  - 5- Faire les dosages du potassium et du calcium dans les extraits d'endives et les solutions étalons.
-

## Manipulation N° 3

### Perméabilité des cellules aux substances non électrolytes.

\*\*\*

Le passage de substances dissoutes à travers les membranes est appelé diffusion et les membranes sont alors dotées de propriété dite de perméabilité :

□ la diffusion passive de substances hydrophiles se produit dans les zones hydrophiles des membranes, probablement au niveau des protéines transmembranaires. La perméabilité dépend de la taille des particules qui diffusent.

□ la diffusion passive de substances lipophiles se produit dans les zones lipophiles des membranes. La perméabilité dépend de la solubilité dans les lipides des substances qui diffusent.

Une molécule organique neutre diffusera à travers les membranes d'autant plus rapidement qu'elle sera petite et lipophile.

Le passage d'une grosse molécule hydrophile à travers la membrane fait intervenir un système de transport. Dans le cas du glucose le transport est couplé au transport de protons ATP-dépendant.

#### A. Diffusion de petites molécules.

##### 1) Principe de la détermination du coefficient de perméabilité.

Plongeons des cellules d'épiderme de radis dans une solution contenant la substance X dont on veut étudier la pénétration dans les cellules. Soit :

$C_e$  = concentration moléculaire X dans la solution.

$C_i$  = concentration moléculaire X dans la cellule à l'instant t.

A = surface à travers laquelle s'établit la diffusion.

Pendant le temps dt le nombre N de molécules grammes de X contenues dans la cellule augmente de dN.

Si on rapporte la quantité de substance diffusant par unité de temps à l'unité de surface de la membrane on définit le flux de particules, J, au cours de la diffusion :

$$J = \frac{dN}{dtA}$$

J est proportionnel à la différence des concentrations dans les deux compartiments séparés par la membrane

$$J = - P \Delta C$$

Le signe - indique le sens de la diffusion d'un milieu à forte concentration vers un milieu à faible concentration.

P représente le coefficient de perméabilité : c'est une mesure quantitative de la perméabilité. P dépend des propriétés de la membrane et des particules qui diffusent, il s'exprime en  $\text{mol sec}^{-1}$ .

On peut tenter expérimentalement d'estimer P en considérant que l'on peut écrire :

$$dN = - P (C_e - C_i) A dt$$

Si on considère que le volume de la cellule végétale reste constant :

$$dN = V dC_i$$

$$dC_i = - P \frac{A}{V} (C_e - C_i) dt$$

Si on considère aussi que la surface A reste constante :

$$\frac{dC_i}{(C_e - C_i)} = K dt$$

Si on admet encore que le milieu extérieur est abondant par rapport au volume des cellules plongées dedans,  $C_e$  reste constant, donc

$$dC_i = - d(C_e - C_i)$$

$$\frac{-d(C_e - C_i)}{C_e - C_i} = K dt$$

équation différentielle qui a comme solution

$$- \ln (C_e - C_i) = K t + \text{constante}$$

Pour obtenir la valeur de cette constante, faisons  $t=0$ .

Si le temps  $t=0$  correspond au moment où on a plongé les cellules dans la solution du corps X, c'est-à-dire au moment où il n'y avait pas encore de X dans la cellule, on a  $C_i=0$  pour  $t_0$  donc

$$C_{te} = - \ln C_e$$

d'où l'équation

$$- \ln (C_e - C_i) = K t - \ln C_e$$

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{C_e}{C_e - C_i}$$

$$K = \frac{2,303}{t} \log \frac{C_e}{C_e - C_i}$$

Pour déterminer K, il faut mesurer  $C_i$  à un instant donné.

Soit une cellule dont la concentration moléculaire de la solution vacuolaire est  $C_v$ .

Plongeons la au temps  $t=0$  dans la solution de X à la concentration  $C_e$ , telle que  $C_e > C_v$ .

Les cellules se plasmolysent, mais peu à peu X pénètre dans la cellule, la concentration moléculaire dans la vacuole devient  $C_v + C_i$ , l'osmolarité cellulaire augmente. Il y a déplasmolyse. A l'instant  $t_1$  on arrive au stade de plasmolyse limite. on a alors

$$C_v + C_i = C_e$$

Donc à l'instant  $t_1$  ou les cellules atteignent l'état de plasmolyse limite :

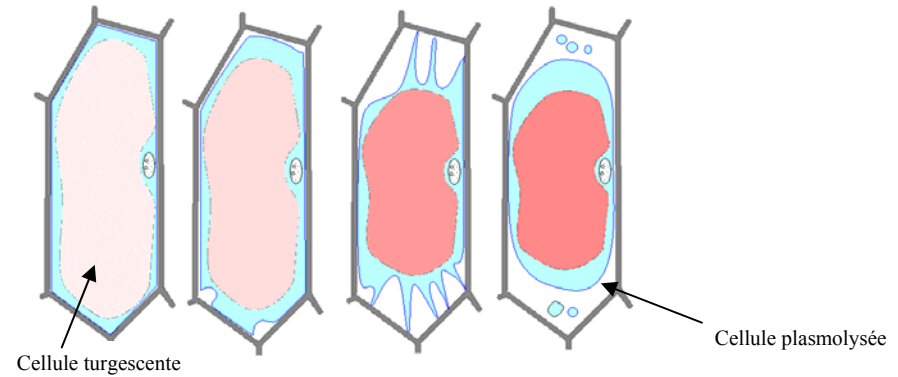
$$C_i = C_e - C_v$$

$$K = \frac{2,303}{t_1} \log \frac{C_e}{C_e - (C_e - C_v)}$$

$$K = \frac{2,303}{t_1} \log \frac{C_e}{C_v}$$

## 2) Détermination de $C_v$

Soit toute une série de solutions de concentrations variées d'une substance qui pénètre difficilement dans la cellule. Parmi ces solutions, certaines ont un potentiel osmotique supérieur au potentiel osmotique du suc vacuolaire. Plongées dedans, les cellules sont turgescentes. Par contre, d'autres solutions ont un potentiel osmotique inférieur à celui du suc vacuolaire. Entre les deux groupes de solutions, il existe une solution intermédiaire isotonique avec la solution vacuolaire. En utilisant des cellules colorées d'épiderme de radis, il sera aisé grâce aux pigments vacuolaire de déterminer si la cellule est turgescente ou plasmolysée.



Les solutions de concentrations moléculaires variées sont obtenues à partir d'une solution de saccharose M.

Tubes n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ml de saccharose M	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
ml d'eau	20	18	16	14	12	10	8	6	4	2	0
concentration molaire	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	10

Mettre un peu de chacune de ces solutions dans des verres de montre numérotés de 1 à 11 comme les tubes.

Disposer dans chaque verre de montre quelques coupes tangentielles d'épiderme coloré de radis (les plus fines possibles). Attendre 30 minutes; examiner 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. Supposons, par exemple, que l'on observe des cellules turgescentes dans les coupes ayant séjourné dans les solutions des tubes de 1 à 3 et des cellules plasmolysées pour les solutions des tubes de 4 à 11. On peut écrire que la concentration moléculaire de la solution isotonique à la solution vacuolaire et par conséquent la concentration moléculaire est telle que

$$0,2 \text{ M} < C_v < 0,3 \text{ M}$$

### 3) Détermination du temps $t_1$

#### 3.1. X est de la formamide $\text{H-CO-NH}_2$ .

Sur une lame porte-objet, déposer une goutte d'une solution de formamide à 10 M ( $C_e = 10$ ). Plonger dedans 2 ou 3 coupes tangentielles de radis (épiderme coloré). Noter l'heure. Recouvrir très rapidement d'une lamelle. Observer immédiatement au microscope. Voir la plasmolyse des cellules et suivre la déplasmolyse. Noter l'heure dès que l'on arrive au stade de plasmolyse limite. En déduire le temps  $t_1$  nécessaire pour avoir une déplasmolyse complète des cellules. Cette expérience nécessite de manipuler extrêmement rapidement. Vous pouvez aussi monter vos coupes préalablement dans l'eau, puis en les laissant montées sous le microscope enlever l'eau avec un papier absorbant et remplacer par la solution de formamide.

#### 3.2. X est de l'acétamide $\text{CH}_3\text{-CO-NH}_2$ .

Procéder de la même manière que précédemment avec une solution 10 M d'acétamide. Mesurer le temps  $t_1$ .

#### 3.3. X est de l'urée $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ .

Utiliser une solution d'urée M. Mesurer le temps  $t_1$ .

Calculer les valeurs de  $K_F$ ,  $K_A$  et  $K_U$ , interpréter les résultats en sachant que la

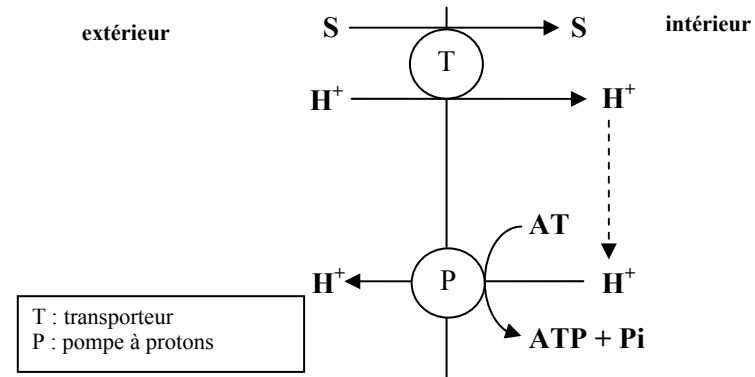
- masse moléculaire de la formamide = 45
- masse moléculaire de l'acétamide = 59
- masse moléculaire de l'urée = 60

et que le groupement méthyl  $\text{CH}_3$  est lipophile alors que le groupement amine  $\text{NH}_2$  est hydrophile.

A votre avis pourquoi le saccharose pénètre difficilement dans les cellules ?

### B. Transport membranaire du glucose.

Le passage du glucose à travers la membrane nécessite l'intervention d'un système de transport. Celui-ci est couplé avec le fonctionnement d'une pompe à protons au niveau de la membrane plasmique et fonctionne comme l'indique le schéma ci-dessous :



Lorsqu'on incube des tissus foliaires sur un milieu non tamponné, on observe une acidification du milieu qui est due au fonctionnement des pompes à protons. Le transport actif de  $\text{H}^+$  crée un gradient de pH et un gradient de charge de part et d'autre du plasmalemme qui permet l'absorption du glucose. Si l'on ajoute du glucose on observe une alcalinisation transitoire qui indique que le transport du glucose est couplé à un transport de protons.

#### 1) Mise en évidence du fonctionnement des ATPases plasmalemmiques, suivi du pH du milieu.

Découper à l'emporte-pièce 50 disques d'environ 1 cm de diamètre dans des feuilles d'épinards; éviter les grosses nervures. Mettre dans un bécher de 150 ml avec 50 ml de milieu d'incubation non tamponné. Placer sous agitation. Noter au bout de 10 min la valeur du pH. Ajouter 10 ml d'une solution de glucose à 300 mM. Noter la valeur du pH toutes les 10 minutes pendant 2 heures. Tracer la courbe d'évolution du pH en fonction du temps.

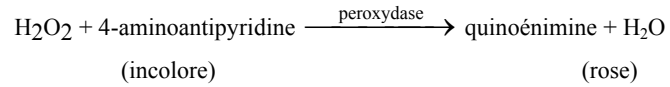
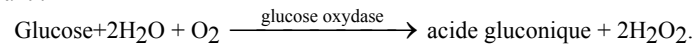
**Attention:** Les variations des valeurs de pH sont peu importantes et cette manipulation est délicate à réaliser.

#### 2) Mesure de l'absorption du glucose par les disques foliaires en fonction du pH du milieu extérieur.

Découper deux lots de 50 disques de feuilles d'épinard. **Peser chacun de ces lots.** Mettre le premier **lot 1** dans un becher avec 50 mL de milieu d'**incubation 1**: milieu tamponné pH5 enrichi avec 1 mM glucose. Mettre le deuxième **lot 2** avec 50 mL de milieu d'**incubation 2**: milieu tamponné pH 8 enrichi avec 1 mM de glucose. Dans un troisième **becher 3** mettre 50 mL de **milieu 3**: eau distillée avec 1 mM de glucose, **sans disques foliaires**. Ce becher servira de témoin. Au bout d'une heure procéder au dosage du glucose des solutions **1, 2 et 3**.

### **3) Dosage du glucose**

La détermination enzymatique du glucose est basée sur le couple de réactions enzymatiques suivant :



L'intensité de la coloration rose, mesurée au spectrophotomètre à 505 nm est proportionnelle à la concentration en glucose.

- Prélever 50 µl des solutions à doser (solution 1, 2 et 3 et solution étalon à 1g.L<sup>-1</sup>, blanc) et les placer directement dans une cuve pour spectrophotomètre à volume réduit.
- Ajouter 1 ml de réactif de Trinder dans chacun de ces tubes.
- Mélanger par retournement en bouchant la cuve avec un morceau de parafilm.
- Après 15 min d'incubation à température ambiante, lire la DO à 505 nm.
- Déterminer la concentration en glucose des 3 solutions inconnues par comparaison avec la solution étalon.

Calculer pour chaque condition d'incubation des disques (pH 5 et pH 8), la vitesse d'absorption du glucose en mg.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> de feuilles. Quelles conclusions faites vous ?

---

#### **PLAN DE TRAVAIL**

- 1- Découper et peser les disques foliaires de feuilles d'épinard.**
  - 2- Mettre en route la mise en évidence du fonctionnement des ATPases plasmalemmiques.**
  - 3- Mettre en route la mise en évidence de l'effet du pH sur le transport de saccharose.**
  - 4- Préparer les solutions de saccharose pour la détermination de C<sub>v</sub>.**
  - 5- Préparer les épidermes de radis pour la détermination de C<sub>v</sub>.**
  - 6- Déterminer t<sub>1</sub> (épiderme de radis)**
  - 7- Déterminer C<sub>v</sub>.**
  - 8- Doser le glucose dans les solutions 1, 2 et 3 ainsi que dans la solution étalon.**
-

# Manipulation N° 4

## Mesure de la $CECCa^{2+}$ et de la $CECK^+$ d'une racine

La racine n'est pas électriquement neutre, elle se comporte généralement comme un colloïde. Il est maintenant admis que le pouvoir adsorbant des racines joue un rôle dans l'absorption des cations. Les plantes à fortes CECR (capacité d'échange cationique racinaire) adsorbent puis absorberaient préférentiellement les cations polyvalents, tandis que celles à faible CECR adsorbent puis absorberaient préférentiellement les cations monovalents.

Pour chaque cation la capacité d'échange d'une racine est spécifique.

### I. Mesure de la $CECCa^{2+}$

Les mesures sont réalisées sur des racines de **haricots** et d'**orge**. Les racines sont délicatement extraites du sol par immersion dans l'eau. On sépare les racines du reste de la plante. La détermination de la  $CECCa^{2+}$  se fait sur 1,5 grammes de racines et sur 4 lots pour permettre une étude statistique (4 lots de racines de haricots et 4 lots de racines d'orge).

Les racines sont d'abord plongées dans 100 ml de HCl 0,05 eq. pendant 3 mn, puis elles sont rapidement lavées dans de l'eau distillée et séchées entre deux feuilles de papier absorbant. On obtient des "racines  $H^+$ ". **Jeter la solution HCl 0,05 eq. ayant été utilisée** (après traitement des 2 x 4 lots).

Les racines saturées en ions  $H^+$  sont ensuite plongées dans 100 ml de  $Ca(NO_3)_2$  0,05 eq. pendant 3 mn. Elles se saturent en ions  $Ca^{2+}$ . A l'issue des 3 mn elles sont rapidement lavées et séchées. On obtient des racines  $Ca^{2+}$ . **Jeter la solution  $Ca(NO_3)_2$**  (après traitement des 2 x 4 lots).

La désorption des ions  $Ca^{2+}$  est obtenue après un séjour de 3 mn des racines dans 100 ml de HCl 0,05 eq. A l'issue des 3 mn, les racines sont lavées et séchées, elles serviront pour la détermination de la  $CECK^+$ . **La solution HCl-Ca est conservée.** Les ions  $Ca^{2+}$  sont dosés par complexométrie.

La  $CECCa^{2+}$  est exprimée en milliéquivalents de calcium pour 100 g de matière racinaire sèche. Pour le haricot la matière sèche représente 12 % de la matière fraîche et pour le maïs 13%.

Pour chaque plante, calculer la moyenne et l'écart-type à la moyenne de la  $CECCa^{2+}$ .

### II. Mesure de la $CECK^+$

Les racines précédemment utilisées pour la mesure de la CECR sont plongées dans 100 ml de HCl 0,05 N pendant 3 mn, puis elles sont rapidement lavées à l'eau distillée et séchées. On obtient des racines " $H^+$ ". **Jeter la solution HCl 0,05 N.**

Les racines  $H^+$  sont plongées dans 100 ml de  $KNO_3$  0,05 N pendant 3 mn. A l'issue des 3 mn, elles sont rapidement lavées et séchées. On obtient des "racines  $K^+$ ". **Jeter la solution  $KNO_3$ .**

La désorption des ions  $K^+$  est obtenue après un séjour de 3 mn des racines dans 100 ml de HCl 0,05 N. A l'issue des 3 mn, les racines sont jetées. **La solution HCl- $K^+$  est conservée.** Les ions  $K^+$  sont dosés par spectrophotométrie de flamme.

La  $CECK^+$  est exprimée en milliéquivalents de  $K^+$  pour 100 g de matière racinaire sèche. Pour chaque plante, calculer la moyenne et l'écart-type à la moyenne de la  $CECCa^{2+}$ .

## III. Dosage des ions $Ca^{2+}$ et $K^+$

### 1) Dosage des ions $Ca^{2+}$ par complexométrie.

Principe du dosage (cf. manipulation 2)

#### Dosage du $Ca^{2+}$

Dans le becher contenant les 100 mL de solutions **HCl-Ca** verser:

- 4 ml de solution de soude 2,5 N. Vérifier que le pH est  $\geq 12$ .
- une pincée d'indicateur HHSN (**coloration rose**).
- agiter, titrer par la solution d'EDTA N/200 (préparée à partir de solution N/10: 10 mL qsp. 200 mL), jusqu'à **coloration bleue franche**. Soit V le volume d'EDTA versé (faire 2 fois au minimum le dosage).

Procéder de la même façon pour toutes les solutions **HCl-Ca**.

Pour connaître la teneur de la solution en calcium, il faut étalonner l'EDTA avec une solution de référence contenant des quantités connues de  $Ca^{2+}$ . La solution étalon contient 1 mg de  $Ca^{2+}$  mL<sup>-1</sup>. On effectue un titrage de 2,5 ml de cette solution par l'EDTA M/200. Dans un bécher de 100 mL verser:

- 2,5 mL de la solution de  $Ca^{2+}$  à 1 mg.mL<sup>-1</sup>.
- 2 ml de solution de NaOH 2,5 N. Vérifier que le pH est  $\geq 12$ .
- une pincée d'indicateur HHSN (**coloration rose**).
- agiter et titrer par la solution d'EDTA M/200. Soit n ml le volume d'EDTA versé.

Calculer la teneur en  $Ca^{2+}$  (en mg.L<sup>-1</sup>) dans la solution HCl-Ca.

### 2) Dosage des ions $K^+$ par photométrie de flamme.

Principe du dosage (cf. manipulation 2)

#### Préparation des solutions étalons.

A partir d'une solution mère à 500 mg.l<sup>-1</sup> de  $K^+$  préparer des solutions à 2,5; 5 et 10 mg.l<sup>-1</sup>.

#### Utilisation de l'appareil.

Régler avec le bouton de droite de l'appareil sur la valeur 15.00 avec la concentration 10 mg.L<sup>-1</sup>. Noter les valeurs d'émission atomique (unité arbitraire) obtenues pour les autres solutions étalons. Construire la courbe d'étalonnage. Dosier les ions  $K^+$  dans la solution **HCl-K**. Diluer les solutions avec de l'eau distillée si cela est nécessaire. Calculer la teneur en  $K^+$  (en mg.L<sup>-1</sup>) dans la solution HCl-K.

# Manipulation N° 5

## Absorption des ions nitrate par les racines d'orge

Le nitrate, pour être absorbé, doit être transporté contre un gradient de potentiel électrochimique membranaire négatif et le plus souvent contre un gradient de concentration. Le cytosol est chargé négativement (-100 à -250 mV) par rapport au milieu extérieur et la concentration en  $\text{NO}_3^-$  des cellules racinaires (de l'ordre du mM) est généralement beaucoup plus élevée que dans le milieu (de l'ordre du  $\mu\text{M}$  à plusieurs centaines de  $\mu\text{M}$ ). L'énergie nécessaire au transport actif de l'anion est fournie par une hydrolyse d'ATP grâce à une pompe à protons  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase située au niveau du plasmalemme. Le transport du nitrate fait intervenir quatre systèmes de transport.

- **Deux systèmes de transport sont exprimés de façon constitutive :**
  - CHATS (constitutive high affinity transport system).
  - CLATS (constitutive low affinity transport system).
- **L'expression de deux autres systèmes de transports est induite par la présence d'ions nitrates dans le milieu extérieur:**
  - IHATS (inductible high affinity transport system).
  - ILATS (inductible low affinity transport system).

Les systèmes de transport à **forte affinité** (CHATS et IHATS) opèrent pour de faibles concentrations extérieures en nitrate (< 500 $\mu\text{M}$ ) et les systèmes de transports à **faible affinité** (CLATS et ILATS) fonctionnent pour de fortes concentrations extérieures en nitrate (> 500 $\mu\text{M}$ ).

### 1. Absorption des ions nitrate en fonction de la concentration du milieu en $\text{NO}_3^-$ .

#### Mesure des vitesses d'influx ou d'efflux du nitrate dans la plante :

Verser **200 ml** de chacune des solutions de concentrations connues en  $\text{NO}_3^-$  (200, 400, 600 et 800  $\mu\text{M}$ ) dans les bacs d'expérience correspondants.

Rincer les racines de chaque lot de plantes mises à votre disposition avec de l'eau distillée, puis, transférer les plantes sur les bacs d'expérience (**noter le nombre de plantes contenues dans chaque bac**).

L'absorption des ions nitrate par les racines de maïs est déterminée en suivant la disparition du nitrate de la solution tampon MES-KOH 10 mM pH = 5,5. Toutes les 15 minutes à partir du temps  $t_0$  et pendant 2 heures, **1 ml (pour les concentrations 200 et 400  $\mu\text{M}$ ) ou 250 $\mu\text{L}$  (pour les concentrations 600, 800 et 1000  $\mu\text{M}$ )** de la solution sont prélevés et placés dans un tube à hémolyse soigneusement annoté comme l'indique le tableau suivant:

	Bac 1	Bac 2	Bac 3	Bac 4	Bac 5
Temps	200 $\mu\text{M}$ $\text{NO}_3^-$	400 $\mu\text{M}$ $\text{NO}_3^-$	600 $\mu\text{M}$ $\text{NO}_3^-$	800 $\mu\text{M}$ $\text{NO}_3^-$	1000 $\mu\text{M}$ $\text{NO}_3^-$
0	1 <sub>0</sub>	2 <sub>0</sub>	3 <sub>0</sub>	4 <sub>0</sub>	5 <sub>0</sub>
15	1 <sub>1</sub>	2 <sub>1</sub>	3 <sub>1</sub>	4 <sub>1</sub>	5 <sub>1</sub>
30	1 <sub>2</sub>	2 <sub>2</sub>	3 <sub>2</sub>	4 <sub>2</sub>	5 <sub>2</sub>
45	1 <sub>3</sub>	2 <sub>3</sub>	3 <sub>3</sub>	4 <sub>3</sub>	5 <sub>3</sub>
60	1 <sub>4</sub>	2 <sub>4</sub>	3 <sub>4</sub>	4 <sub>4</sub>	5 <sub>4</sub>
75	1 <sub>5</sub>	2 <sub>5</sub>	3 <sub>5</sub>	4 <sub>5</sub>	5 <sub>5</sub>
90	1 <sub>6</sub>	2 <sub>6</sub>	3 <sub>6</sub>	4 <sub>6</sub>	5 <sub>6</sub>
105	1 <sub>7</sub>	2 <sub>7</sub>	3 <sub>7</sub>	4 <sub>7</sub>	5 <sub>7</sub>
120	1 <sub>8</sub>	2 <sub>8</sub>	3 <sub>8</sub>	4 <sub>8</sub>	5 <sub>8</sub>

Pour les tubes correspondant aux solutions prélevées dans les bacs 3, 4 et 5, le volume est amené à 1 mL en ajoutant 750  $\mu\text{L}$  d'eau distillée dans chaque tube.

*NB : Penser à étalonner les micropipettes à la balance.*

### 2. Détermination de la concentration en $\text{NO}_3^-$ des prélèvements

Les ions  $\text{NO}_3^-$  sont dosés selon la méthode de Cawse (1967). Le principe repose sur la capacité des ions nitrate à absorber les rayons ultraviolets en milieu acide: l'absorbance à 210 nm est proportionnelle à la quantité de nitrate présente dans la solution.

A partir d'une solution  $\text{KNO}_3$  1 mM, préparer des solutions à 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  et 500  $\mu\text{M}$  dans des fioles jaugées de 50 ml. Compléter les volumes avec de l'eau distillée.

Dans un tube à hémolyse, ajouter :

- 1 ml de la solution étalon.
- 1,5 ml d'acide perchlorique à 7,7 %

Agiter et mesurer l'absorbance à 210 nm en utilisant une cuve en quartz.

Procéder de la même façon pour chacun des prélèvements (7x4 prélèvements) réalisés précédemment en remplaçant 1 ml de la solution étalon par 1 ml de prélèvement ou d'eau distillée pour le réglage du zéro au spectrophotomètre.

### 3. Expression des résultats et interprétation

Pour chaque cas, faire la représentation graphique de la quantité de  $\text{NO}_3^-$  dans le bac en fonction du temps et déterminer les vitesses d'influx ou d'efflux des ions  $\text{NO}_3^-$  dans les racines exprimée en  $\mu\text{mol NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ plante}^{-1}$ .

Tenir compte dans vos calculs des volumes de solution prélevée et du volume total de solution dans le bac. Détaillez votre mode de calcul.

Représenter graphiquement l'évolution des vitesses d'influx dans la racine en fonction de la concentration extérieure en nitrate.

Commentez les résultats.