

Kit effet des mutations sur le métabolisme

Réf. MMAH

A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée
- Stockage :**

Stocker les milieux de culture à **+4°C** (conservation 6 mois)

Stocker les souches à **température ambiante** :

Pour les besoins du transport, les souches sont placées dans des flacons hermétiques, elles ont donc été privées d'oxygène.

Nous vous conseillons de procéder à un dégazage (ouvrir la bouteille devant la flamme d'un bec bunsen ou sous une hotte à flux lumineuse) afin de renouveler l'air contenu dans les flacons.

Si possible, remplacer le bouchon hermétique par du coton cardé stérile, afin de permettre l'oxygénation.

Dans ces conditions, et avec un éclairage constant et suffisant pour les euglènes avec chloroplastes, les souches peuvent être conservées dans leur bouteille de transport 4 semaines.

Sinon, dégazer tous les jours ou tous les deux jours.

Conserver à température ambiante, lumière constante.

COMPOSITION DU COLIS :

- 1 flacon contenant 50 ml d'une suspension d'Euglènes (noté euglènes)
- 1 flacon contenant 50 ml d'une suspension d'Euglènes sans chloroplaste (noté Euglènes sans chloroplaste)
- 1 flacon contenant 400 ml de milieu minéral (noté MEUG00)
- 1 flacon contenant 400 ml de milieu organique (noté MEUG)

Option « matériel » pour 40 élèves soit 20 binômes :

Sachet contenant :

- ♦ 40 compte-gouttes stériles de 3 ml (goutte 40 µl)
- ♦ 200 tubes à bouchon vissant

MATERIEL NECESSAIRE :

- Microscope
- Lames et lamelles
- Matériel de l'option « matériel »
- Feutres permanents
- Bec bunsen ou hotte à flux laminaire

MATERIEL RECOMMANDE :

Étuve
Caméra pour microscope

FICHE PREPARATEUR

1) Préparation des tubes de milieu :

⚠ **ATTENTION** ⚠ : Il est indispensable d'effectuer cette opération en conditions stériles afin de ne pas contaminer les milieux de culture. Toute contamination fausserait les observations et les résultats.
Travailler devant la flamme d'un bec bunsen ou sous une hotte à flux laminaire.

Verser 4ml de milieu organique (noté MEUG) dans 80 tubes stériles de 5ml ou 10 ml. Avec un feutre permanent noter sur chaque tube MO pour Milieu Organique.

Verser 4ml de milieu minéral (noté MEUG00) dans 80 tubes stériles de 5ml ou 10 ml. Avec un feutre permanent noter sur chaque tube MM pour Milieu Minéral.

Conserver ces tubes sur un portoir à température ambiante (pour 2 à 3 jours) ou au réfrigérateur pour une durée plus longue.

➤ **Conseil** : Il est préférable d'utiliser des tubes à fond plat, sinon il sera nécessaire de fournir un portoir adapté aux tubes pour chaque binôme.

2) Préparation de la salle :

Sur chaque poste de travail, disposer :

- 4 tubes de milieu organique
- 4 tubes de milieu minéral
- 2 compte-gouttes stériles

3) Après le travail des élèves :

Incuber les 8 tubes à 25°C 4 tubes seront incubés à l'obscurité et 4 à la lumière (voir détail dans le protocole en page 9)
Pour les tubes incubés à la lumière, l'idéal est de les exposer à une alternance lumière/obscurité de 16heures/8heures.

PRINCIPE ET INTERET PEDAGOGIQUE:

A. Organisation du travail :

Les travaux pratiques se dérouleront en deux séances :

- **Première séance d'1h30 :**
 - Observation microscopique des deux souches.
 - Mise en culture des souches sur milieu minéral et organique et dans des conditions de lumière et d'obscurité.
- **Deuxième séance (la semaine suivante ou deux semaines après) :**
 - Observation microscopique des souches après culture
 - Évaluation de la concentration cellulaire en fonction des conditions de culture
 - Interprétation des résultats.

B. Intérêts pédagogiques :

- ➔ Observation d'êtres unicellulaires et d'ultra structures cellulaires
- ➔ Comparaison de deux types de métabolismes
- ➔ Étude de la photosynthèse

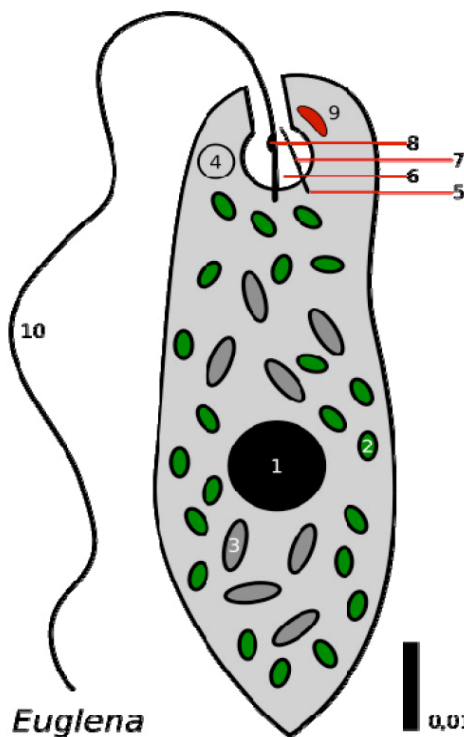
C. Notions sur les euglènes

Généralités :

Les Euglènes sont des algues unicellulaires d'eau douce (il existe de rares espèces d'eau marine), elles sont flagellées. Elles sont de forme fusiforme avec un flagelle unique.

Leur longueur est généralement comprise entre 30 et 70 μm pour une largeur comprise entre 6 et 18 μm .

Les euglènes s'observent facilement au microscope au grossissement x100 à x600.



1. Noyau
2. Chloroplastes
3. Granules paramylon
4. Vacuole contractile
5. Kinetosome
6. Réservoir
7. Flagelle court
8. Capteur de lumière (oeil rudimentaire)
9. Stigmate
10. Flagelle



0,01 mm

Schéma de structure de l'Euglène – Source : WIKIPEDIA

Métabolisme :

L'euglène est une algue qui a la particularité de posséder un double métabolisme autotrophe et hétérotrophe :

- Les euglènes possèdent des chloroplastes ce qui leur permet de se multiplier dans un milieu minéral en présence de lumière, c'est la photosynthèse (métabolisme autotrophe)

- Les euglènes sont également capables de se multiplier à l'obscurité sur un milieu organique (métabolisme hétérotrophe). Notre milieu contient de l'acide lactique mais d'autres sources organiques peuvent tout à fait être utilisées.

Le temps de génération d'une euglène sur milieu minéral est de 24 heures, lorsqu'elle est exposée à une alternance lumière/obscurité de 16heures/8heures à une température de 25°C et que les conditions d'oxygénation sont bonnes.

Après deux semaines de culture, la concentration de la suspension est généralement d'environ 5×10^5 cellules.ml⁻¹.

Cultivées dans les mêmes conditions avec de l'acide lactique, la concentration de la suspension atteint dans le même temps 3 à 4×10^6 cellules. ml⁻¹

Le temps de génération est d'environ 12 heures.

Lorsque les euglènes sont cultivées en milieu organique et à la lumière, elles profitent des deux types de métabolisme et leur croissance est optimale.

Lorsque les euglènes sont cultivées sur milieu minéral en présence de lumière, elles photosynthétisent.

Lorsque les euglènes sont cultivées sur milieu organique à l'obscurité, elles respirent uniquement et perdent leur chlorophylle, au microscope les chloroplastes sont observables mais ils sont vides. L'euglène paraît blanche.

Les euglènes peuvent perdre ces chloroplastes dans certaines conditions. Si on ajoute un antibiotique comme la streptomycine au milieu de culture des euglènes, la division des chloroplastes est inhibée alors que la division cellulaire n'est pas affectée. Au cours des divisions successives des euglènes, les chloroplastes sont répartis dans les cellules filles, mais au fil des générations, il y en a de moins en moins, ceux-ci ne pouvant plus se diviser. Au bout d'un certain nombre de divisions cellulaires, les cellules filles ne possèdent plus de chloroplastes. Elles deviennent donc uniquement hétérotrophes et se comportent comme des cellules animales.

FICHE DE MANIPULATION PAR LES BINOMES :

A. CONSIGNES GENERALES POUR LE TP :

ATTENTION, pour votre sécurité et la réussite de l'expérience, respecter bien les conditions de travail suivantes :

Prendre l'habitude de noter au marqueur indélébile le contenu des tubes et les initiales du binôme qui a manipulé

Ne pas contaminer l'espèce étudiée avec des souches externes et ne pas polluer l'environnement avec les expériences menées sur la souche étudiée :

- ◆ Nettoyer la paillasse à l'alcool ou à l'eau de javel
- ◆ Passer les mains à l'alcool
- ◆ Porter une blouse en coton
- ◆ Travailler dans une zone de stérilité lors de la manipulation des souches, des milieux et instruments stériles :
- ◆ Dans un diamètre de 35 cm autour de la flamme d'un bec bunsen, ou
- ◆ Dans le diamètre recommandé par le constructeur d'un bec électrique, ou
- ◆ Dans un diamètre de 25-30 cm autour d'une lampe à alcool, ou
- ◆ Dans la zone de stérilité d'une hotte à flux
- ◆ Eviter les mouvements brusques et de parler devant les tubes ouverts
- ◆ Utiliser des instruments et des milieux stériles

ATTENTION : une fois qu'un instrument ou un milieu stérile est entré en contact avec une cellule, le sol, une main, le col d'un tube, une solution..., il est contaminé.

B. PREMIERE SEANCE :

Chaque binôme dispose de 4 tubes de milieu organique et 4 tubes de milieu minéral et de deux compte-gouttes stériles.

1) Préparation des cultures et préparation des lames à observer au microscope :

Utiliser une poire stérile et verser 0,5 ml de suspension d'euglènes (2 graduations sur la poire prévue dans le matériel optionnel) dans deux tubes de milieu minéral et deux tubes de milieu organique.

Avant de passer à l'autre souche, déposer une goutte de suspension d'euglènes sur une lame et couvrir avec une lamelle **sans appuyer !**

Avec un marqueur permanent noter sur les tubes et la lame EUG pour euglènes. Noter également les initiales du binôme sur chaque tube.

Utiliser l'autre poire stérile et verser 0,5 ml de suspension d'euglènes sans chloroplaste dans deux tubes de milieu minéral et deux tubes de milieu organique.

Déposer une goutte de suspension d'euglènes sans chloroplaste sur une lame et couvrir avec une lamelle **sans appuyer !**

Avec un marqueur permanent noter sur les tubes et la lame ESC pour euglènes sans chloroplaste. Noter également les initiales du binôme sur chaque tube.

2) Observation au microscope :

Les euglènes sont facilement observables au grossissement x100. Un grossissement de x400 ou x600 permet de mieux observer les cultures.

Observer et décrire les similitudes et différences entre les deux souches, observer la présence ou non de chloroplastes facilement visibles grâce à la couleur verte de la chlorophylle qu'ils contiennent.

➤ **Conseil** : Les euglènes se déplacent assez rapidement avec leurs flagelles. Il est possible de les ralentir pour mieux les observer en utilisant un produit nommé PROTOSLO. Déposer une goutte de PROTOSLO sur la lame puis une goutte de suspension à observer, attendre 1 minute, couvrir avec une lamelle et observer.

4) Mise en culture :

🔔 **ATTENTION** 🔔 : **Ne pas visser complètement les bouchons sur les tubes afin de permettre à l'air de passer.**

Mettre les tubes en culture à 25 °C.

Pour chaque souche, mettre en culture :

- à la lumière :
 - un tube de milieu organique
 - un tube de milieu minéral.
- à l'obscurité :
 - un tube de milieu organique
 - un tube de milieu minéral.

☞ **NB** : Si un contaminant (type champignon par exemple) apparaît dans un tube, écartez-le immédiatement pour éviter de contaminer les autres tubes.

C. DEUXIEME SEANCE (une ou deux semaines après) :

Pour chaque tube de culture prélever une goutte de suspension et effectuer un montage lame lamelles pour réaliser une observation au microscope.

Cultures à la lumière :

- Euglènes dans milieu minéral
- Euglènes dans milieu organique
- Euglènes sans chloroplastes dans milieu minéral
- Euglènes sans chloroplastes dans milieu organique

Cultures à l'obscurité :

- Euglènes dans milieu minéral
- Euglènes dans milieu organique
- Euglènes sans chloroplastes dans milieu minéral
- Euglènes sans chloroplastes dans milieu organique

Comparer la densité de chaque culture (nombre de cellules par ml de culture) en regardant le nombre de cellules visibles sur un champ d'observation au microscope au grossissement x100. Il n'est pas nécessaire d'effectuer un comptage, une simple estimation suffit.

Observer la couleur des cellules en fonction des conditions de culture.

Observer les chloroplastes des euglènes dans les différentes conditions de culture.

INTERPRETATIONS ET CONCLUSIONS

Souche	Milieu/Conditions	Densité	Couleur
Euglènes	MO/Lumière	++++	Verte
	MO/Obscurité	+++	Blanche
	MM/Lumière	++	Verte
	MM/Obscurité	La souche ne pousse pas	-
Euglènes sans chloroplastes	MO/Lumière	+++	Blanche
	MO/Obscurité	+++	Blanche
	MM/Lumière	La souche ne pousse pas	-
	MM/Obscurité	La souche ne pousse pas	-

MO = Milieu organique

MM = Milieu minéral

Cette manipulation est véritablement passionnante car elle est simple à réaliser et elle permet d'illustrer un certain nombre de points du programme scolaire :

Euglènes :

Lorsque les euglènes poussent sur milieu organique à la lumière, elles profitent des deux métabolismes autotrophe et hétérotrophe. La densité de la culture est donc optimale et les cellules sont vertes du fait de la présence de chlorophylle indispensable à la photosynthèse.

Lorsque les euglènes poussent sur milieu minéral à la lumière, les cellules sont toujours vertes puisqu'elles photosynthétisent mais la densité est moindre car elles ne profitent pas du métabolisme hétérotrophe.

Les euglènes sont incapables de pousser sur milieu minéral à l'obscurité ce qui prouve que c'est bien la photosynthèse qui lui permet de pousser sur milieu minéral. La lumière est indispensable à la photosynthèse.

Les euglènes peuvent pousser à l'obscurité sur milieu organique, elles sont blanches car elles ne photosynthétisent pas et perdent la chlorophylle contenue dans leurs chloroplastes. Leur métabolisme est alors purement hétérotrophe.

Le chloroplaste est donc l'organite cellulaire de la photosynthèse.

Euglènes sans chloroplastes:

Les euglènes sans chloroplastes sont incapables de pousser sur milieu minéral à l'obscurité (comme l'euglène) mais aussi à la lumière. C'est la grande différence avec l'euglène non mutée qui pousse sur milieu minéral à la lumière.

Le chloroplaste est bien l'organite cellulaire de la photosynthèse. La mutation de cette souche a un effet direct sur son métabolisme : La souche est incapable de photosynthétiser, son métabolisme est purement autotrophe.

Sur milieu organique la souche pousse selon la même vitesse de croissance à l'obscurité comme à la lumière.

FICHE CONSERVATION

Conserver les souches à température ambiante :

Pour les besoins du transport, les souches sont placées dans des flacons hermétiques, elles ont donc été privées d'oxygène.

Nous vous conseillons de procéder à un dégazage (ouvrir la bouteille devant la flamme d'un bec bunsen ou sous une hotte à flux lumineuse) afin de renouveler l'air contenu dans les flacons.

Si possible, remplacer le bouchon hermétique par du coton cardé stérile, afin de permettre l'oxygénation.

Dans ces conditions, et avec un éclairage constant et suffisant pour les euglènes avec chloroplastes, les souches peuvent être conservées dans leur bouteille de transport plus de 4 semaines.

Sinon, dégazer tous les jours ou tous les deux jours.

Conserver à température ambiante, lumière constante.

Conserver les milieux à **+ 4°C**.

FICHE TRI ET RECUPERATION

Les tubes de culture peuvent être jetés dans les bacs de récupération du plastique après avoir bien été décontaminés.

⚠ ATTENTION ⚠ : on ne contrôle jamais totalement ce qui pousse sur milieu organique, la décontamination est obligatoire.