

Cristallisation de la pariétine du Xanthoria

Réf. XANKIT

A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- Stocker** l'ensemble du colis à température ambiante, à l'abri de la lumière

COMPOSITION (Matériel nécessaire pour 20 binômes) :

1 sachet du thalle Xanthoria parietina de 2 g
1 flacon compte goutte de réactif de cristallisation 1* ; **2 flacons compte goutte de 30 ml à remplir avec l'acétone fournie. Attention risques d'évaporation : remettre dans le flacon initial après le TP.**
1 boîte de 50 lames en verre 76 x 26 mm ; 1 boîte de 100 lamelles couvre-objets 24 x 24 mm
1 flacon de vernis à ongle transparent

***Attention : contient de l'acide acétique à 75%**

MATERIEL NECESSAIRE

Microscope polarisant ; Plaque chauffante ; Hotte de filtration ; Lampe à UVA (365 nm), tubes à essais, feuille de plante chlorophyllienne (géranium, épinard ou autre).

Eventuellement, en manipe supplémentaire ou étude de document seule (annexe 4) :

Réactif cristallogène 2: appelé aussi **GAW** (Glycérol 1 ;
Ethanol (pur) 1 ; Eau distillée 1)

OBJECTIFS COGNITIFS

L'activité Xanthoria parietina permettra d'étudier un exemple de diversification du vivant sans modification du génome.

Il s'agira de montrer que seule l'association des deux symbiontes (appartenant à des groupes phylogénétiques très éloignés) est à l'origine de l'apparition d'un organisme nouveau (une chimère) caractérisé par un métabolisme nouveau permettant la colonisation de niches écologiques nouvelles.

L'activité ci-dessous permettra de construire la connaissance exigible suivante : Une diversification des êtres vivants est aussi possible sans modification des génomes : associations (dont symbioses).

1. A préparer avant l'activité (le matin du TP ou la veille) : Extraction (obtention d'un extrait en solution) :

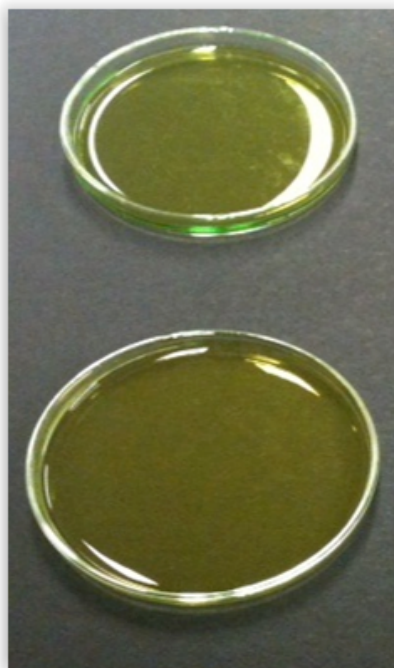
- Prélever un fragment d'échantillon (100 mg suffisent)
- Broyer à sec le thalle de lichen prélevé et mettre le broyat obtenu dans un tube en verre.
- Ajouter 1mL de solvant (**acétone (à manipuler sous hotte)** ou éthanol). **Laisser macérer 3 heures en agitant de temps en temps**

Procéder de même pour faire l'extraction des épinards (ou autre matériel végétal).

Le solvant change de couleur car il extrait les composés du lichen : la partie liquide est appelée « extrait ».

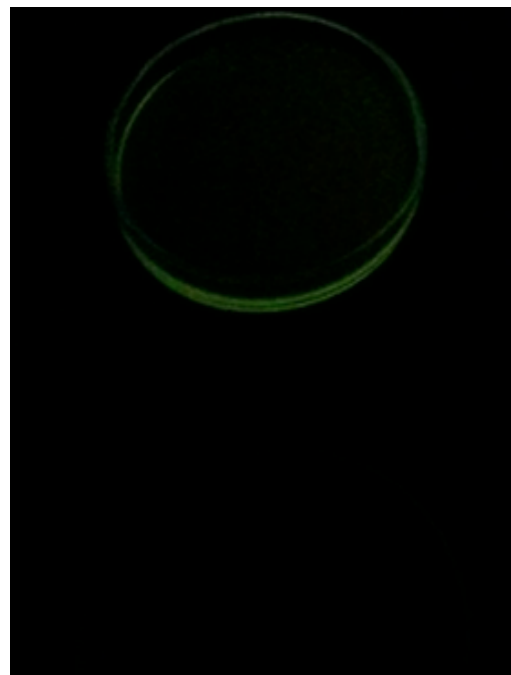
Pendant le TP :

Placer les deux extraits dans des boîtes de pétri. Placer les boîtes sous lumière UVA. Faire observer la fluorescence aux élèves.



**Extrait de Xanthoria :
Fluorescence aux Uva**

**Extrait d'épinards : Pas de
Fluorescence aux UVA**



La fluorescence aux UV permet de mettre en évidence la capacité d'absorption dans l'UV de la parietine.

Note : l'absorption correspond à la dissipation dans le milieu d'une partie du rayonnement. In vivo, ce phénomène permet la protection des tissus vis-à-vis du rayonnement absorbé.

EXEMPLE DE SUJET ELEVE

D'après Marc André Selosse dans « La symbiose. Structures et fonctions, rôle écologique et évolutif », la symbiose présente plusieurs rôles évolutifs :

- elle est « créatrice » de formes, de métabolismes voire de comportements (car l'association entre deux organismes additionne leur génome et donc leurs potentialités et permet l'émergence de capacités nouvelles)
- elle engendre des chimères
- elle a un rôle créateur au niveau écologique.

A partir de l'exemple du lichen proposé dans le kit, vous montrerez en quoi la symbiose permet l'apparition d'un métabolisme nouveau permettant l'émergence de capacités nouvelles d'un point de vue évolutif.

Cristallisation puis OBSERVATION de la parietine

2. **Méthode de microcristallisation**

- **Protocole d'extraction de la substance lichénique (à faire sous hotte):** (les indications en italique sont facultatives)

- allumer la plaque chauffante et régler la température à 50°C.
- quand la température est atteinte au bout de quelques minutes, placer la lame en verre sur la plaque chauffante (la laisser sur la plaque chauffante pendant toute la durée de la réaction)
- placer le fragment de lichen au centre de la lame en verre.
- laisser tomber une goutte d'acétone sur le fragment de lichen puis attendre que la goutte s'évapore.
- répéter l'opération 10 fois
- enlever le fragment de lichen de la lame. Un dépôt blanchâtre ou jaunâtre plus ou moins circulaire doit être visible.
- déposer une petite goutte du réactif de cristallisation sur le dépôt, puis déposer la lamelle sur la goutte de façon à ce que celle-ci s'étale sous la lamelle.

*Il est possible d'exercer une petite pression sur la lamelle de façon à étaler la goutte plus facilement, mais attention à **ne pas faire glisser la lamelle** !*

- laisser sécher pendant 10 mn sur la plaque chauffante.
- colmater la préparation en déposant délicatement du vernis à ongles transparent autour de la lamelle couvrant l'objet.
- laisser sécher une minute.

3. Observation :

Observer au microscope polarisant en LPNA (lumière polarisée non analysée) puis en LPA (en croisant les filtres)



Observation en LPNA



Observation en LPA

4. Pour aller plus loin :

Proposer aux élèves les annexes ci-dessous

ANNEXES

Annexe 1 : Le lichen *Xanthoria parietina* est issu de l'association entre une Chlorophycée (Algue verte unicellulaire) du Genre *Trebouxia* et d'un Champignon Ascomycète nommé *Xanthoria parietina*. C'est ce dernier qui donne son nom au lichen. Répartition écologique des organismes impliqués dans l'activité :

	Chlorophycées du genre <i>Trebouxia</i>	Champignons au sens large	Lichen <i>Xanthoria parietina</i>
Exigences	Elles ont besoin d'eau et d'éléments minéraux. Elles ne tolèrent pas le soleil ni les températures élevées.	Les champignons tolèrent mal en général les milieux secs, salés et ensoleillés. On les trouve dans des milieux riches en matière organique. Ils ont en revanche une forte capacité de rétention d'eau	Peu d'exigences : On le trouve sur l'écorce des arbres, sur les tuiles des toits dans des milieux particulièrement exposés aux rayons du soleil, sur les roches en haute montagne, même en milieu marin (zone des embruns) Il tolère les milieux pollués. (pollution atmosphérique acide)

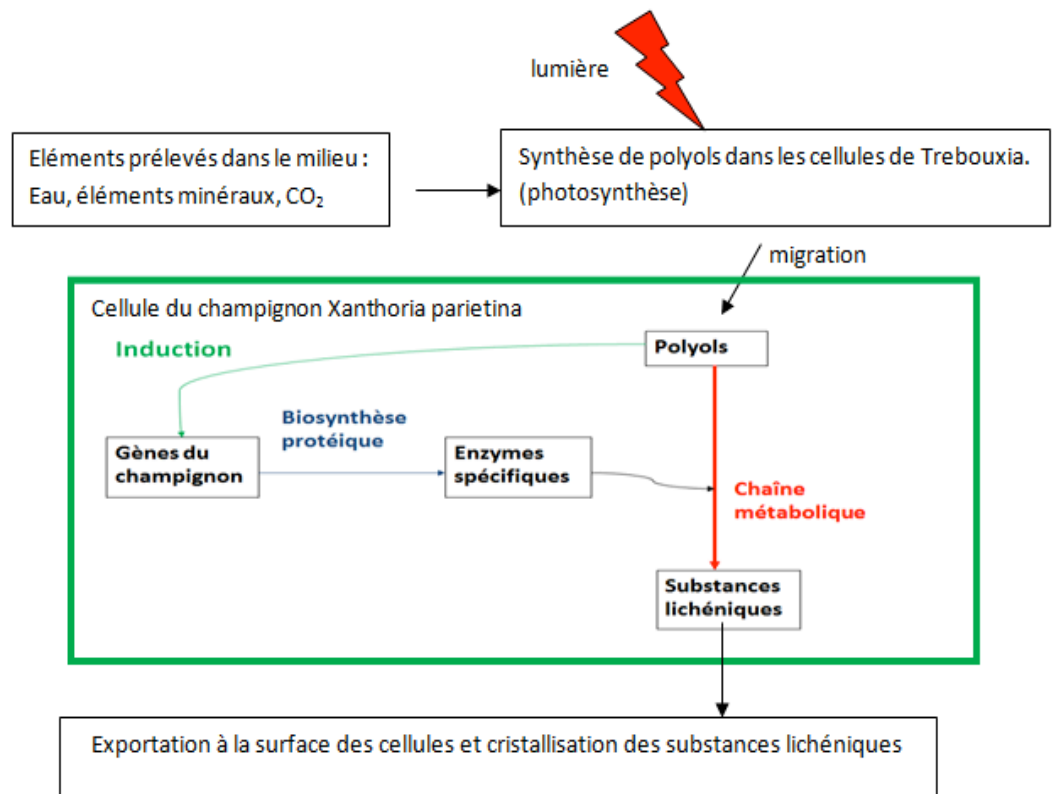
Annexe 2 : Expériences de culture in vitro de quelques organismes :

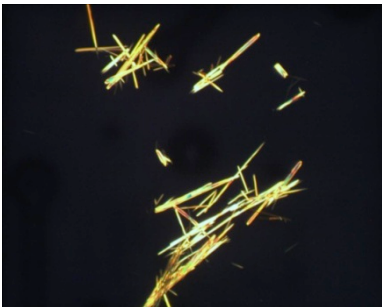
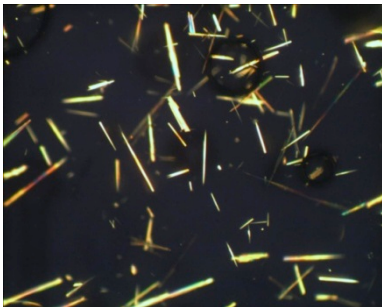
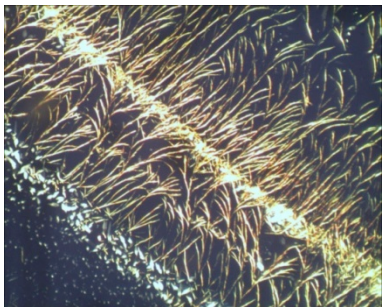
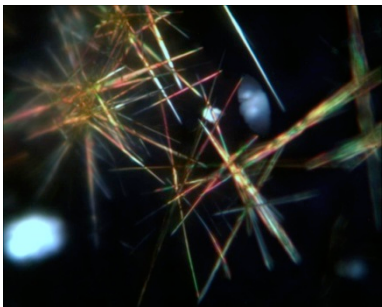
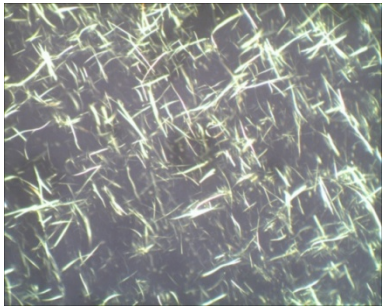
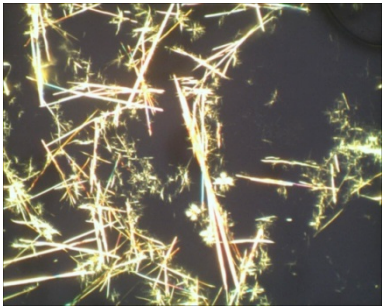
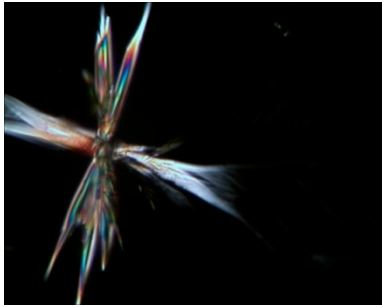
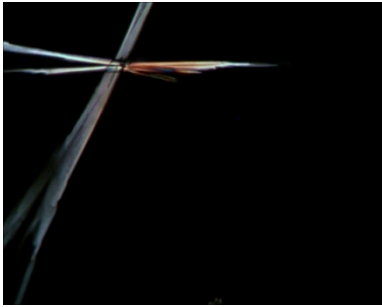
Production de substances lichéniques	Lichen Xanthoria parietina (organisme entier)	Champignon isolé De Xanthoria parietina	Algue Trebouxia isolée	Champignon isolé + ajout de polyols dans le milieu de culture
	+	-	-	+

D'après STOCKER-WÖRGÖTTER

Annexe 3 : Biogenèse des substances lichéniques (d'après Mosbach 1967, Henssen et Jahns 1974, Chantal Van Haluwyn 1993)

Induction = activation de l'expression de certains gènes.



Substances lichéniques :	Réactif cristalloène 1	Réactif cristalloène 2
<p>Acide stictique Réactifs 1 et 2 : cristaux en forme de baguettes ou d'aiguilles.</p>	 <p>Photo : M.Boulangier X 100</p>	 <p>Photo : M.Boulangier X 100</p>
<p>Physcion 1 : cristaux ramifiés ayant la forme de dendrites (d'aspect plumeux) 2 : aiguilles disposées en étoiles ou ayant le même aspect que dans GE</p>	 <p>Photo : M.Boulangier X 100</p>	 <p>Photo : M. Boulangier X400</p>
<p>Acide psoromique 1 : Amas de baguettes pouvant être disposées en étoiles. 2 : baguettes associées à des particules irrégulières</p>	 <p>Photo : M.Boulangier X 100</p>	 <p>Photo : M.Boulangier X 100</p>
<p>Acide usnique 1 et 2 : cristaux en forme d'étoiles ou de croix.</p>	 <p>Photo : M. Boulangier X400</p>	 <p>Photo : M. Boulangier X400</p>

Annexe 4 : Planche de détermination de quelques substances lichéniques avec 2 réactifs cristalloène différents.

Les descriptions sont basées sur l'aspect de ces substances lichéniques cristallisées avec le réactif de cristallisation du kit. Les observations sont réalisées au microscope en lumière polarisée analysée.

5. Réponses attendues :

La substance extraite du *Xanthoria parietina* présente l'aspect de cristaux ramifiés ayant la forme de dendrites (aspect plumeux) avec le réactif cristallogène 1 et d'aiguilles dans le réactif cristallogène 2. Il s'agit donc de physcion.

Le physcion a la particularité d'être phosphorescent lorsqu'il est exposé aux UV, ce qui traduit son absorption dans l'UV. In vivo, cette substance protège les tissus des UV, ce qui (d'après l'annexe 1) confère au lichen la possibilité de coloniser des milieux exposés à la lumière (contrairement aux deux partenaires qui le constituent).

D'après l'annexe 2, seule l'association des deux partenaires (Chlorophycée et Ascomycète) permet la synthèse de physcion. Les deux partenaires, indépendamment, sont incapables de synthétiser de substances lichéniques.

D'après l'annexe 3, ce sont les polyalcools produits chez l'organisme *Trebouxia* grâce à la photosynthèse, qui induisent l'expression de certains gènes du champignon ascomycète. Ces gènes codent pour des enzymes qui interviendront au niveau d'une chaîne métabolique permettant la transformation des polyalcools en physcion.

La symbiose génère bien un nouveau métabolisme.

C'est ce nouveau métabolisme à l'origine de la synthèse d'une substance protégeant les tissus du lichen des UV qui permettra à celui-ci d'occuper des milieux fortement exposés à la lumière (comme les tuiles d'un toit ou les rochers en haute montagne).

On comprend ainsi comment, d'un point de vue évolutif, la symbiose est à l'origine de **l'apparition d'un métabolisme nouveau permettant l'émergence de capacités nouvelles.**