



Olympiades académiques 2022

Épreuve pratique de sélection

Sujet de biologie

Durée de l'épreuve : 3h

Instructions générales



Portez votre blouse dans le laboratoire durant toute l'épreuve.

Manger et boire sont interdits dans le laboratoire.

Vous devez porter des gants de protection et vos lunettes de protection lorsque vous manipulez des produits chimiques. Vous disposez d'un bécher poubelle pour éliminer les solutions et d'un collecteur pour les déchets plastiques (pipettes...).

Tous les papiers, y compris les feuilles de brouillon, doivent être rendus à la fin du test.

Tous les résultats doivent être transcrits sur la feuille de réponses.

Vous devez également rendre tous vos calculs en même temps que la feuille de réponses.

Seule la feuille de réponses et les feuilles attachées seront notées.

L'épreuve consiste en 3 activités d'une durée d'une heure chacune et doivent être réalisées individuellement. En arrivant sur chaque poste de travail, veillez à désinfecter celui-ci.

Vous avez **3 heures** pour terminer l'épreuve.

A la fin de l'épreuve laissez TOUT en place sur votre paillasse.

Vous ne pouvez rien emporter hors du laboratoire !

ECLAIREMENT LUMINEUX ET CELLULES VEGETALES.

Généralités

La photosynthèse qui se déroule dans les chloroplastes assure l'entrée de matière et d'énergie dans les réseaux trophiques. En effet, un tissu chlorophyllien bien éclairé est capable d'utiliser l'énergie lumineuse et la matière minérale (H₂O, CO₂, sels minéraux) pour fabriquer de la matière organique.

L'étude porte sur le végétal aquatique *Elodée* placé dans différentes conditions expérimentales :

- Rameaux A placés à l'obscurité pendant 48 h en présence de matière minérale
- Rameaux B exposés à la lumière à 650 lux pendant 48 h en présence de matière minérale
- Rameaux C exposés à la lumière à 1200 lux pendant 48 h en présence de matière minérale (rameaux C non fournis, les résultats vous sont donnés pour ces conditions)

Partie 1 - Eclairage et étiolement (durée : 1h)

Objectifs

On souhaite établir une relation entre l'éclairage lumineux et le nombre de chloroplastes présents dans les cellules végétales. Pour établir cette relation, il faut pouvoir extraire les chloroplastes et les visualiser au microscope afin de les compter.

Matériel et solutions

- rameaux A
- rameaux B
- mortier et pilon
- entonnoir
- erlenmeyer
- bécher de 150 mL
- 2 gazes
- 200 mL de solution de saccharose à $0,4 \text{ mole.L}^{-1}$
- Centrifugeuse + 4 tubes (capacité 15 mL : remplissage maxi 12 mL) + porte-tube
- 3 pipettes Pasteur 3 mL + 2 pipettes compte-gouttes
- 2 éprouvettes pour mesure précise de 10 mL
- balance, spatule
- ciseaux fins
- marqueur
- lame Kova + compteur
- microscope
- essuie-tout

1.1 Isolement des chloroplastes (source : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/isolement.htm>)

Sécher puis peser dans un bécher 2 g du végétal A. L'écraser entre mortier et pilon et ajouter 3 mL de solution de saccharose prélevés à la pipette. Broyer jusqu'à ce que l'ensemble soit homogène.

Eliminer les gros débris en filtrant sur gaze (presser la gaze pour récupérer plus de liquide et de rincer le mortier avec de la solution de saccharose, attention le volume final est de 10 mL!), compléter à 10 mL avec la solution de saccharose puis placer le filtrat obtenu dans un tube à centrifugation identifié.

Rincer la verrerie, puis faire de même pour obtenir un filtrat de rameaux B.

Appeler le professeur pour faire contrôler vos tubes.

Une centrifugeuse est un appareil qui génère un mouvement de rotation permettant la sédimentation au fond du tube des particules les plus lourdes, le liquide plus léger surnageant.

Identifier les tubes avec vos initiales. Centrifuger 2 minutes à 1500 rpm.

Pour chaque tube de centrifugation, recupérer le surnageant avec une pipette Pasteur, le déposer dans l'éprouvette graduée et compléter à 10mL avec la solution de saccharose. Placer la solution obtenue dans un tube à centrifugation identifié afin de centrifuger à nouveau.

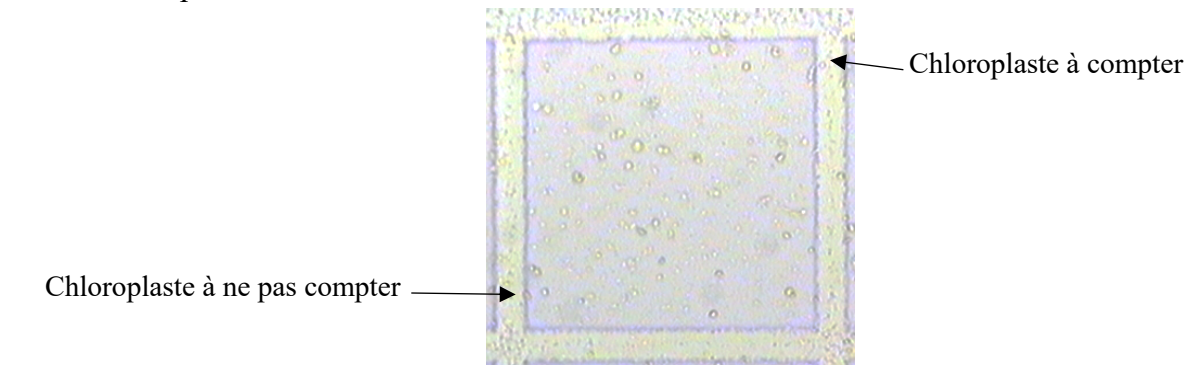
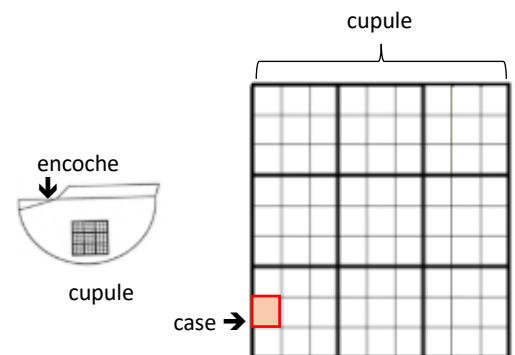
Appeler le professeur pour faire contrôler vos tubes.

Centrifuger 10 minutes à 2000 rpm. Eliminer les surnageants et recupérer les culots à compléter avec 10mL de solution de saccharose.

1.2 Numération des chloroplastes

Homogénéiser en agitant le tube bouché et prélever la solution obtenue (issue de cellules de rameaux A). Remplir un puits de comptage (cupule) de lame Kova grâce à la pipette compte-goutte dont l'extrémité sera placée au niveau de l'encoche. La goutte s'étale par capillarité.

Une lame Kova est une lame spéciale quadrillée qui permet le comptage de différents types de cellules et organites. Une cupule contient 9 cases comportant chacune 9 carrés : chaque carré contient un volume précis de 0,0111 µL. Laisser sédimenter les chloroplastes sur le quadrillage 1 à 2 minutes, et passer à la numération. A l'aide du compteur, compter les chloroplastes entiers (verts) contenus dans 4 carrés et faire la moyenne du nombre de chloroplastes par le nombre de carrés. Arbitrairement, lorsque les éléments à dénombrer sont sur la limite de la case, il est convenu de ne tenir compte que des éléments positionnés sur les côtés droits et inférieurs !



Calculer le nombre de chloroplastes au mL en multipliant le nombre trouvé par le facteur de conversion C.

$$C = 9 \times 10 \times 1000$$

- 9 : convertit le volume du carré en volume de la case (0,1µL)
- 10 : ramène le volume à 1 µL
- 1000 : ramène le volume à 1 mL de suspension

Appeler le professeur pour faire contrôler votre observation.

Barrer la cupule utilisée avec un marqueur une fois le comptage réalisé.

- 1.2.1. Réaliser les comptages pour le rameau A et consigner les résultats sur la feuille de réponses.**
- 1.2.2. Traduire les résultats sous forme d'histogramme sur la feuille de réponses.**
- 1.2.3. Conclure quant à la relation entre l'intensité lumineuse et le nombre de chloroplastes présents dans les cellules végétales.**



Partie 2 – Production de matière organique par photosynthèse (durée : 1h)

Les poissons de l'aquarium sont des êtres vivants hétérotrophes; ils se nourrissent de matière organique, notamment celle produite par les végétaux de l'aquarium. Pour obtenir des informations sur la localisation cellulaire de la synthèse d'amidon à la lumière, on utilise une plante aquatique, l'élodée du Canada (*Elodea canadensis*), dont la feuille est constituée seulement de deux assises de cellules.

Objectifs

On souhaite identifier à l'échelle cellulaire la localisation de la photosynthèse.

Matériel et solutions

- rameaux A
- rameaux B
- eau iodée  
- empois d'amidon
- eau distillée
- pincettes fines
- pipette
- lames, lamelles
- microscope
- verre de montre
- porte-tube
- 2 tubes à essai
- papier absorbant

2.1 Réalisation du test à l'eau iodée (mise en évidence de la présence de glucides complexes)

La coloration à l'eau iodée est caractéristique des polymères du glucose (glycogène, amidon).

Dans un tube à essai, verser 1mL d'eau distillée et y ajouter 4 gouttes d'eau iodée.

Dans le second tube à essai, verser 1mL d'empois d'amidon et y ajouter 4 gouttes d'eau iodée.



2.1 Compléter vos observations sur la feuille de réponses

2.2 Observation de cellules d'élodée

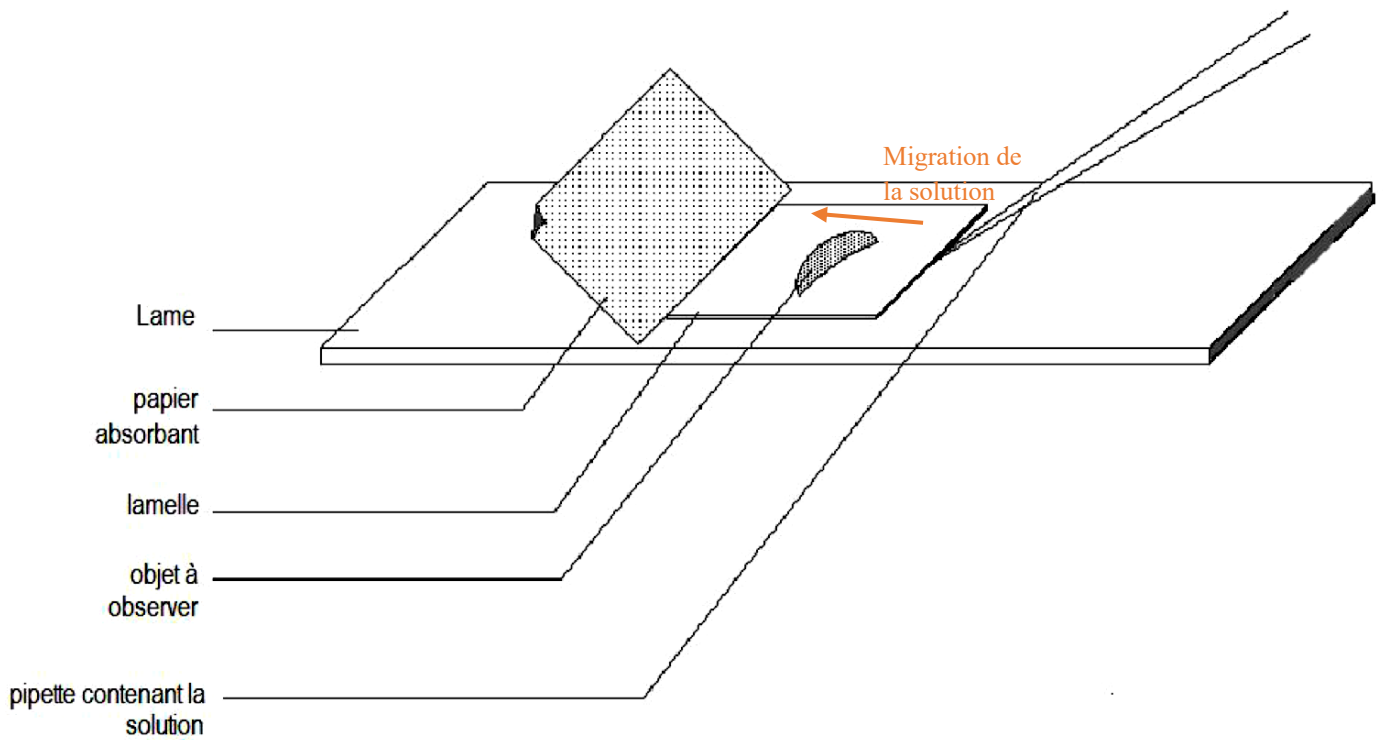
Prélever une feuille d'élodée du rameau B et plonger la feuille dans l'eau iodée (dans un verre de montre).



Prélever une feuille d'élodée du rameau A et la monter dans une goutte d'eau entre lame et lamelle.

Observer une cellule de la préparation au microscope puis ***appeler le professeur pour faire contrôler votre observation.***

Remplacer l'eau de montage (sans modifier le champ d'observation du microscope) par l'eau iodée, l'injectant d'un côté de la lamelle avec la pipette tout en absorbant l'eau de l'autre côté (voir méthode page suivante).



Attendre 5 minutes puis observer à nouveau.

Monter la feuille d'élodée du rameau B qui trempait dans l'eau iodée entre lame et lamelle et observer une cellule de la préparation.

Appeler le professeur pour faire contrôler votre observation.

2.2.1 Réaliser un schéma d'interprétation de cellule d'Elodée du rameau B sur la feuille de réponses.

2.2.2 Mettre en relation vos observations à l'échelle cellulaire et les résultats du test à l'eau iodée pour conclure quant à la localisation cellulaire de la photosynthèse.

La photographie en MET permet d'étudier l'ultrastructure de ce type de cellule.

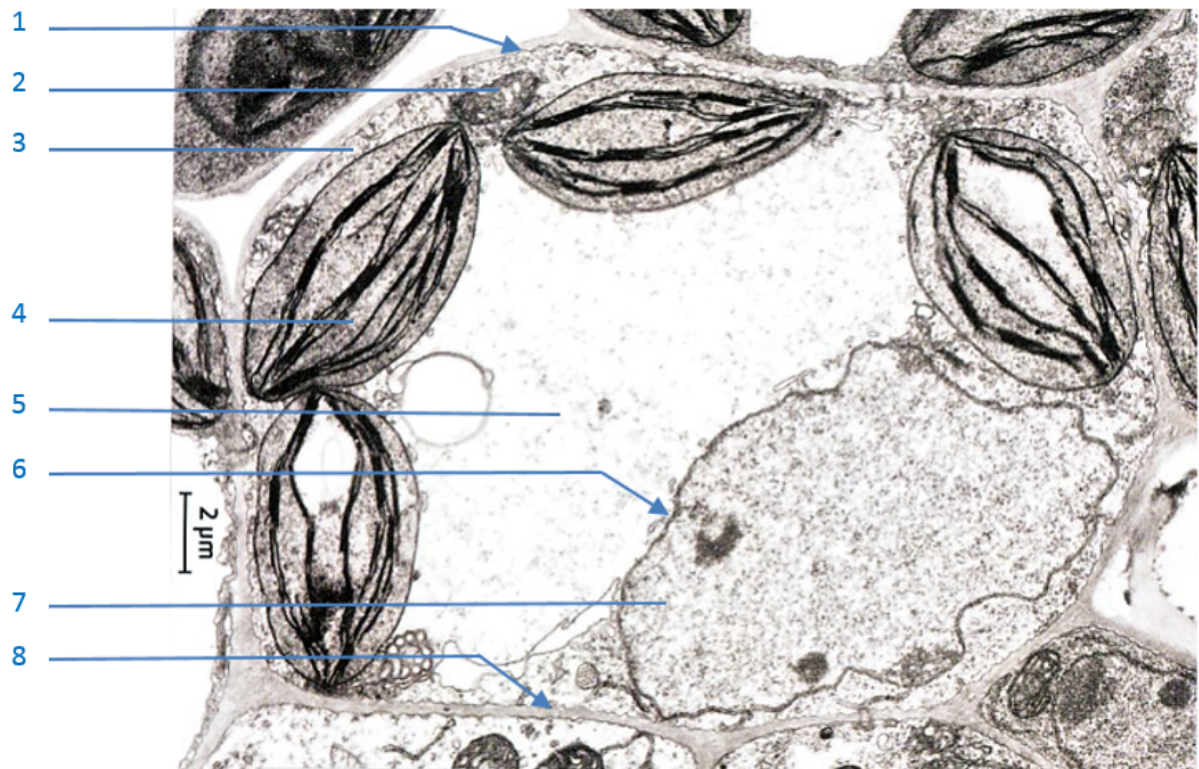
Description de la cellule végétale chlorophyllienne.

La cellule végétale est, comme toute cellule, délimitée par une membrane plasmique entourant le cytoplasme. Son caractère eucaryote est lié à la présence d'un noyau.

La membrane plasmique n'est pas visible car elle est accolée à une paroi bien discernable et entourant chaque cellule. Le cytoplasme est un territoire compartimenté qui, en plus du noyau, contient de nombreux organites.

La plus grande partie du volume cellulaire est occupée par une volumineuse vacuole remplie d'eau et de solutés; elle intervient dans l'équilibre hydrique et ionique de la cellule ainsi que dans la régulation du volume cellulaire. La vacuole est généralement unique chez les cellules différenciées: occupant alors toute la place, elle rejette en périphérie une mince couche de cytoplasme contenant les autres organites de la cellule. Le noyau est un territoire délimité par l'enveloppe nucléaire ponctuée de pores nucléaires. Ce noyau contient de l'euchromatine (transcriptionnellement active) reconnaissable par son aspect clair en microscopie électronique, et de l'hétérochromatine (transcriptionnellement inactive) proche de l'enveloppe (aspect foncé sur la microphotographie). Sur l'électronographie sont visibles des mitochondries et des chloroplastes qui sont rejetés en périphérie et animés d'un mouvement de cyclose en présence de lumière.

2.2.3 A l'aide des informations du texte, retrouver les légendes 1 à 8 de l'électronographie sur la feuille de réponses.



2.2.4 A l'aide de l'échelle de l'électronographie, calculer la longueur de la cellule et la longueur d'un chloroplaste. Posez vos calculs sur la feuille de réponses.







Partie 3 – Photosynthèse et longueurs d'ondes efficaces (durée : 1h)

La chlorophylle est un pigment, c'est-à-dire une substance colorée, qui est responsable de la couleur verte dans le végétal et dont la fonction biologique est directement liée à sa couleur.

Objectifs

Il s'agit ici de mettre en évidence le rôle des pigments chlorophylliens dans la photosynthèse.

Matériel et solutions

- rameaux B
- mortier et pilon
- ciseaux fins
- papier filtre
- chronomètre
- entonnoir
- erlenmeyer (50 mL)  
- éthanol
- carbonate de calcium
- grand tube à essai avec bouchon résistant aux vapeurs de solvants
- dispositif d'occultation de l'éprouvette (papier noir entourant l'éprouvette ou papier aluminium)
- papier à chromatographie (dit papier Whatman)
- solvant pour chromatographie :
 - 5 mL de cyclohexane    
 - 85 mL d'éther de pétrole
 - 10 mL d'acétone
- feutre noir

Équipements individuels de protection :

Compte tenu des produits utilisés, il est tout d'abord nécessaire de s'équiper des protections individuelles suivantes :



3.1 Séparation des pigments chlorophylliens

(Source: http://wiki.scienceamusante.net/index.php?title=La_chlorophylle)

La chromatographie est une technique de séparation des substances présentes dans un mélange : elle utilise la migration d'un liquide (solvant) sur un support solide (papier, plaque recouverte d'un gel...). Les constituants du mélange sont entraînés plus ou moins loin suivant leurs propriétés physico-chimiques (masse, polarité, solubilité...).

- Préparer dans le grand tube à essai : disposer le papier à chromatographie dans le tube pour repérer le niveau du solvant à mettre (le papier doit tremper d'un demi-cm dans le solvant). Veiller à prendre le papier uniquement par les bords sans poser vos doigts sur la zone de migration.
- Retirer le papier, verser le solvant jusqu'au niveau repéré et fermer le tube sans le papier. L'atmosphère de l'enceinte doit être saturée en vapeur d'éluant.
- Tracer un trait au crayon à 1.5 cm du bas de la bande de papier pour marquer l'emplacement du dépôt. La tâche de pigments doit être aussi petite et foncée que possible. Pour cela écraser, à l'aide d'un agitateur, un petit morceau de feuille à l'emplacement prévu, répéter l'opération au moins 6 fois, sur le même emplacement, en renouvelant le morceau de feuille.
- Placer le papier à chromatographie dans le tube en vérifiant que les dépôts de pigments sont bien situés au-dessus du niveau du solvant et boucher.

Recouvrir le tube de papier d'aluminium et laisser migrer le solvant à l'obscurité pendant 15 minutes.

3.1.1 Joindre le résultat de la chromatographie à la feuille de réponses et entourer les pigments séparés.

La chlorophylle est constituée de plusieurs molécules de structures chimiques très proches : les chlorophylles a, b, c et d, les xanthophylles et les caroténoïdes. Les chlorophylles a et b sont les plus abondantes chez les plantes supérieures et algues vertes, en proportions variables suivant l'espèce. Les chlorophylles c et d sont présentes chez les algues brunes et cyanobactéries.

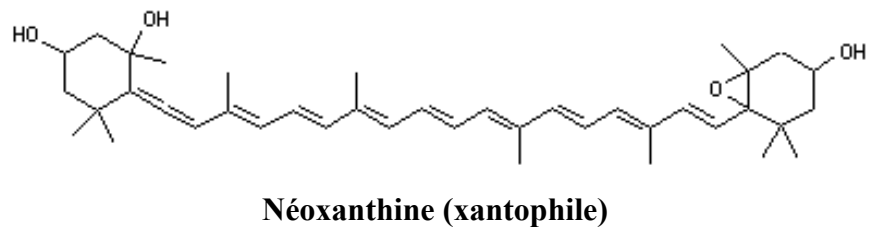
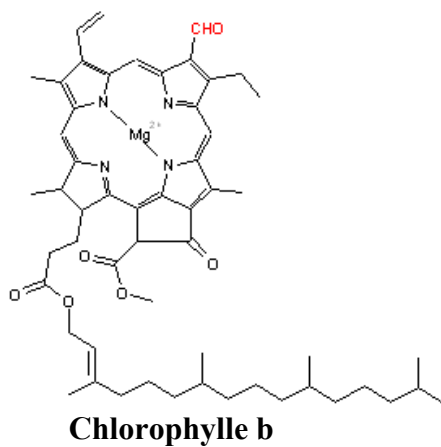
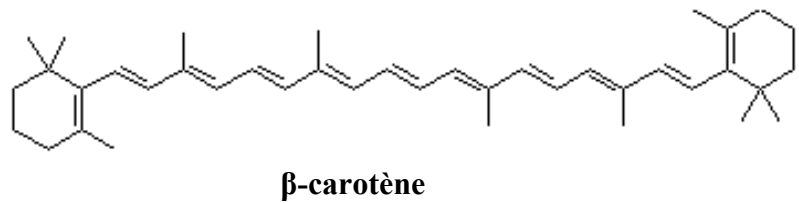
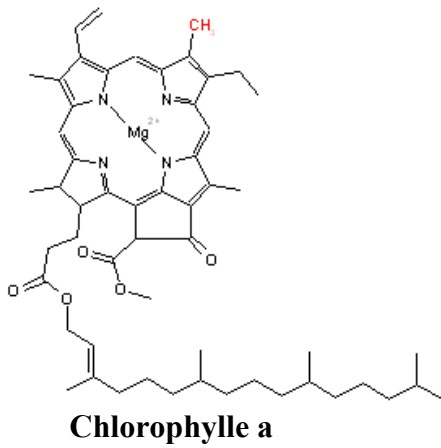
Les pigments solubles dans le solvant migrent sur le papier de chromatographie et se répartissent de la façon suivante:

Résultats attendus	
<i>Chlorophylle b (vert jaune), chlorophylle a (vert bleuté), xanthophylle (jaune), caroténoïdes (orangé)</i>	→
faible migration	forte migration

3.1.2. Annoter les pigments séparés sur le résultat de la chromatographie.

La technique de chromatographie est basée sur les différentes interactions entre une molécule, un support solide et un solvant. Le solide est du papier donc de la cellulose qui présente à sa surface de nombreux groupes hydroxyles (-OH) qui vont interagir avec les molécules dissoutes dans un solvant.

Plus la molécule sera polaire et présentera d'atomes d'oxygène, plus elle pourra se lier avec les groupes hydroxyles du support et donc plus elle sera difficilement entraînée par le solvant.



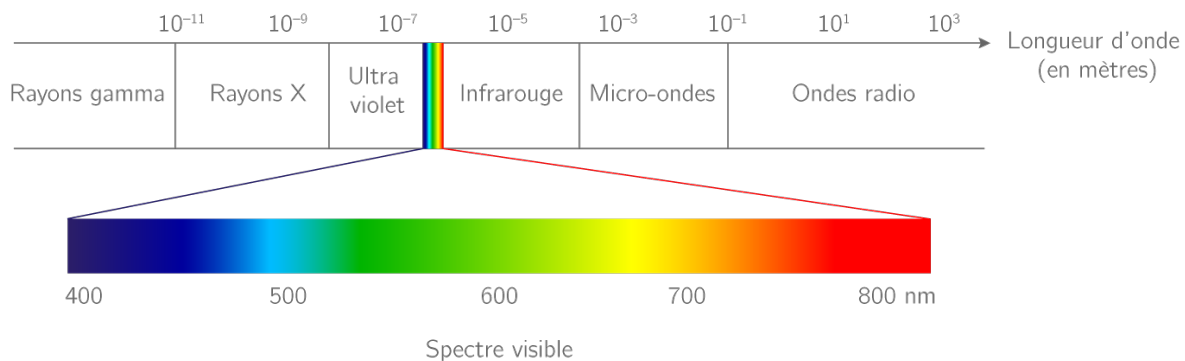
3.1.3 Comparant les structures des différents composés du mélange et justifier leur ordre de séparation en complétant la feuille de réponses.

3.2 Pigments chlorophylliens et efficacité photosynthétique

En aquariophilie, les plantes aquatiques décoorent et oxygènent le milieu. Elles consomment également les déchets nutritifs rejetés par les poissons ainsi que le nitrate et le phosphate présent dans l'aquarium, ce qui permet de limiter la présence d'algues. Certains poissons s'en nourrissent, il est donc important de simuler la croissance des plantes aquatiques.

On voudrait augmenter la production des plantes (en stimulant au maximum la photosynthèse) en utilisant des lumières de longueur d'onde efficace grâce à l'utilisation des LEDs qui, avec une dépense énergétique faible ont l'avantage d'émettre à différentes longueurs d'ondes et donc de pouvoir cibler le spectre lumineux le plus approprié à la plante aquatique.

Les différents domaines des ondes électromagnétiques :



La lumière visible est constituée d'une infinité de radiations colorées formant le spectre lumineux visible : de 380 nm (violet) à 780 nm (rouge). Le pigment est une substance colorée car elle absorbe certaines longueurs d'onde de la lumière. Les longueurs d'onde non absorbées constituent la couleur visible, perçue par notre œil.

On cherche à déterminer, par spectrophotométrie, les LEDs monochromes susceptibles de stimuler au maximum la photosynthèse pour la plante donnée.

Principe de la spectrophotométrie

La **spectrophotométrie** d'absorption est une méthode physique d'analyse chimique. Elle permet de mesurer la proportion de lumière absorbée par une espèce colorée en solution. On appelle cette grandeur **l'absorbance**. Le spectrophotomètre fait passer une lumière blanche à travers une solution et compare son intensité avec celle d'un faisceau de lumière blanche qui n'aurait pas traversé la solution. Le rapport sans unité donne l'absorbance de l'espèce colorée pour chaque radiation composant la longueur d'onde : on obtient alors un **spectre d'absorption**, dans lequel plus l'absorbance est grande, plus la lumière est absorbée pour cette longueur d'onde.

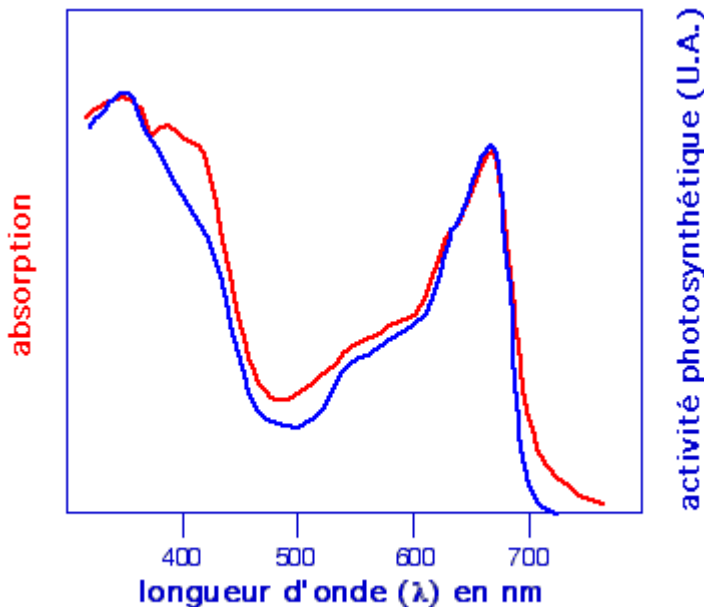
3.2.1 Obtention d'une solution de pigments bruts.

- Placer dans un mortier une pointe de spatule de carbonate de calcium qui permettra un broyage efficace. Ajouter 8 rameaux d'élodée d'environ 5 cm.
- Broyer à l'aide du pilon. Ajouter progressivement environ 5 mL d'éthanol (= solvant des pigments) et continuer à broyer jusqu'à obtention d'un liquide résiduel de couleur foncée (solution bien concentrée).
- Filtrer le contenu du mortier de façon à obtenir la solution de pigments qui doit être foncée.
- Utiliser le spectroscope pour comparer le spectre obtenu avec la solution alcoolique de pigments à celui obtenu avec de l'alcool :
 - o Remplir la petite cuve avec de l'alcool et observer au spectroscope à main. Vider ensuite le contenu de la petite cuve.
 - o Verser dans la cuve un peu de solution de pigments et observer avec le spectroscope à main.

3.2.2 Colorer sur la feuille de réponses le spectre d'absorption des pigments bruts : représenter le spectre d'absorption de la lumière blanche (avec l'éthanol = témoin) et le spectre d'absorption obtenu à travers la solution de pigments bruts. *Appeler le professeur pour faire contrôler vos résultats*

3.2.3 Spectres d'absorption et spectre d'action d'une solution de pigments bruts.

Le spectre d'action photosynthétique est la variation de l'intensité de la photosynthèse de cellules intactes sous lumière monochromatique pour les différentes longueurs d'onde de la lumière visible. Pour obtenir un spectre d'action, on éclaire des cellules d'élodée avec de la lumière de différentes longueurs d'ondes et on porte sur un graphique la mesure du rendement de la photosynthèse (en mesurant la quantité de dioxygène libérée ou la consommation de dioxyde de carbone) en fonction de la longueur d'onde.



Comparaison d'un spectre d'absorption et d'un spectre d'action.

Le spectre d'absorption (courbe rouge, en % de l'absorption totale de la lumière incidente par des élodées) a été obtenu à partir de pigments bruts d'élodée sur lesquels est envoyé un faisceau de lumière monochromatique. On détermine alors la capacité des pigments à absorber la lumière.

Le spectre d'action (courbe bleue : activité photosynthétique en unité arbitraire) a été obtenu en mesurant le taux de dioxygène dégagé par ce même fragment de feuille d'élodée.

Analyser ces résultats en complétant la feuille de réponses.

3.2.4 Conclusion : déterminer les LED monochromes capables de stimuler au maximum la photosynthèse. Reporter votre conclusion sur la feuille de réponses.