

NOM :

Prénom :

Salle :

**AGRÉGATION DE SCIENCES DE LA VIE -
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS**

CONCOURS EXTERNE – ÉPREUVES D'ADMISSION – session 2021

TRAVAUX PRATIQUES DE SPÉCIALITÉ DU SECTEUR A

Durée totale : 6 heures

**Analyses cellulaires, moléculaires, biochimiques et
métaboliques sur « le ver de Roscoff »**

Symsagittifera roscoffensis

Les 2 parties sont indépendantes.

Partie I : Mise en place et analyse structurale du partenariat « ver-algues » page 4

Durée conseillée : 3h30 – barème : 35/60

Partie II : Analyse fonctionnelle du partenariat « ver-algues » page 31

Durée conseillée : 2h30 – barème : 25/60

Les réponses aux questions figureront dans les cadres réservés à cet effet.

Une PCR suivie d'une électrophorèse est planifiée dans la partie I. Il vous est donc fortement conseillé de commencer cette partie maximum 4h après le début du TP.

N'oubliez pas d'appeler les correcteurs lorsque cela est demandé.

**AVANT DE REMETTRE VOTRE DOSSIER, VÉRIFIEZ QUE VOUS AVEZ BIEN INDIQUÉ
VOS NOM, PRÉNOM ET NUMÉRO DE SALLE EN TÊTE DE TOUS LES DOCUMENTS.**

Vous devez rendre la totalité des feuilles du dossier

NOM :

Prénom :

Salle :

Introduction

L'espèce *Symsagittifera roscoffensis*, dont le nom vernaculaire est le **ver de Roscoff**, est un ver plat marin appartenant à l'ordre des acœles.

Ces vers sont retrouvés à marée basse sur les côtes bretonnes, sous la forme de longues traînées vertes et denses.

Leur couleur verte vient de la présence, *in hospite*, de **micro-algues** spécifiquement de l'espèce *Tetraselmis convolutae*.



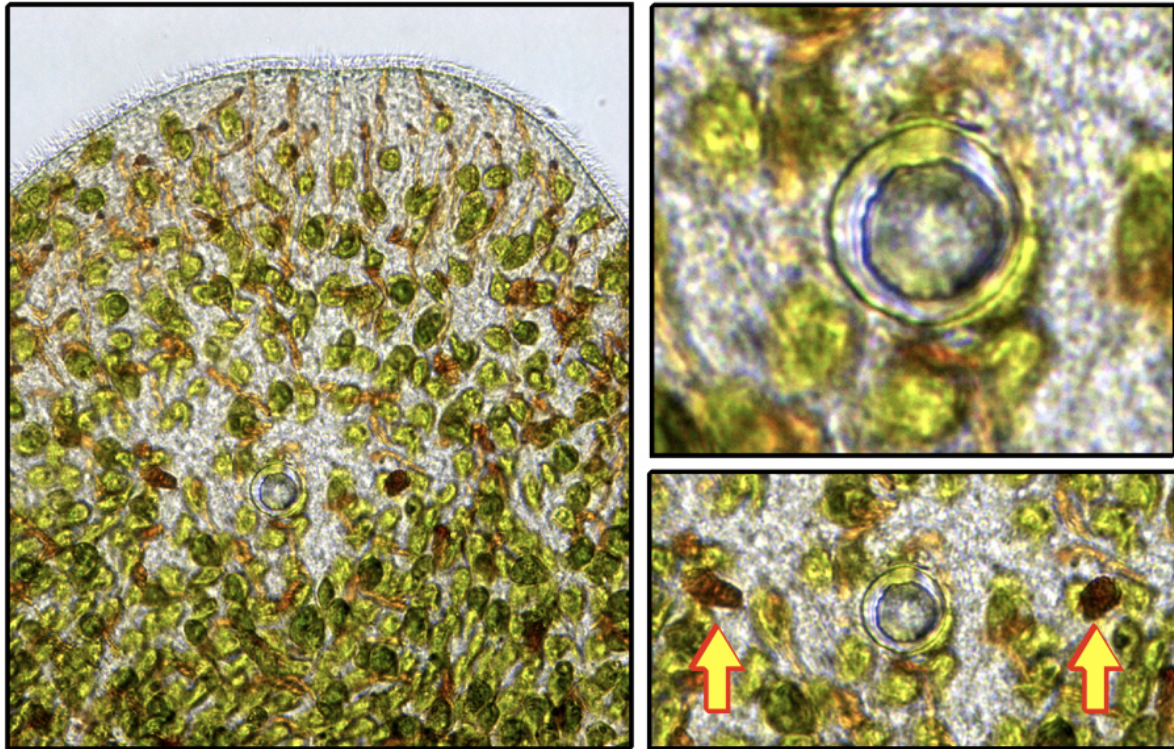
Figures 1 : Photographies du ver de Roscoff sur les côtes bretonnes, et cliché d'observation de **vers adultes verts** (contenant des algues) à la loupe binoculaire

NOM :

Prénom :

Salle :

Il est possible de repérer le pôle antérieur du ver en observant le sens de son déplacement, ainsi qu'en repérant des structures spécifiques : les photorécepteurs et le statocyste.



Figures 2 : à gauche : extrémité antérieure ("tête") de *Symsagittifera roscoffensis* - on y voit **des micro-algues vertes d'environ 14 micromètres** et au centre, on distingue le statocyste (circulaire) flanqué de 2 photorécepteurs (tâches marrons à équidistance du statocyste) ; grossissement : 400x. À droite, en haut : détail du statocyste. À droite en bas : les 2 photorécepteurs sont indiqués par des flèches jaunes.

Le TP que nous vous proposons est ainsi une étude de cet holobionte « ver-algue », en utilisant des outils et techniques de secteur A, soit de biologie cellulaire, biologie moléculaire et de biochimie, dans le but de réfléchir à la mise en place, à la structure et au fonctionnement du partenariat engagé.

Le déroulé du TP se fait sur les 6 heures ; cela ne vous empêche néanmoins pas de renouveler des manipulations, hors la PCR.

Certains candidats étaient mal organisés, leur paillasse n'étant notamment pas rangée au fur et à mesure, avec parfois des manipulations sur les copies. Ceci n'aide pas à la réalisation de manipulations propres.

D'autres ont commencé par traiter toutes les questions théoriques, sans se lancer dans l'observation des premiers stades, ce qui fait qu'ils ont été débordés par le temps.

NOM :

Prénom :

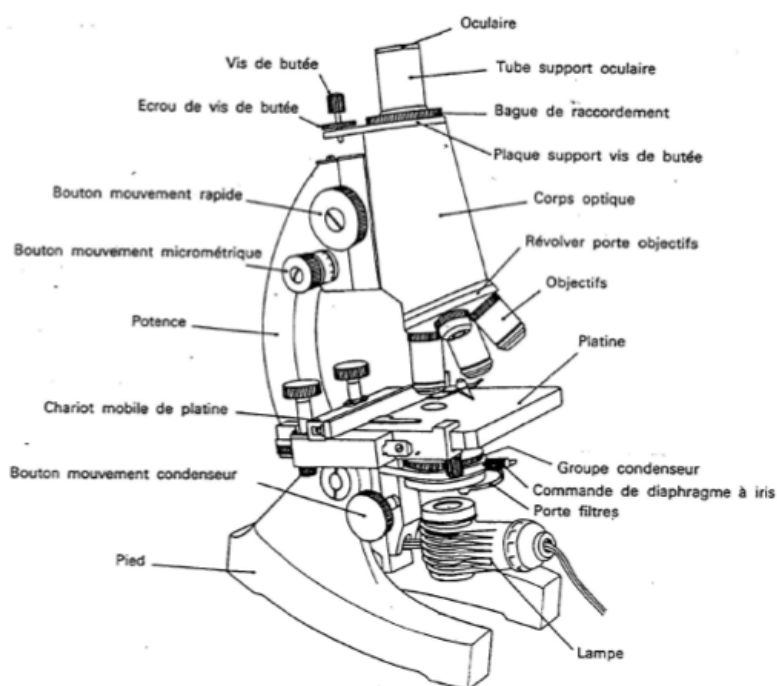
Salle :

Partie I : Mise en place et analyse structurale du partenariat « ver-algue »

I.A- Apports de la microscopie

Question I-A-1 : Rappeler le principe de la microscopie optique, ainsi que sa résolution ; légender ensuite le schéma suivant, en précisant le rôle de chacune des parties d'un microscope optique.

Réponse à la question I-A-1



Il y a émission de PHOTONS, qui TRAVERSENT l'échantillon. Si ce dernier est coloré, des photons sont plus ou moins absorbés, ce qui génère, à la sortie, une image contrastée (en couleurs) de l'objet étudié.

Résolution : de l'ordre du micromètre suffisait

Les connaissances de base (objectifs, platine, source de lumière, vis micrométriques et macrométriques) sont bien maîtrisées.

Par contre, la fonction des oculaires s'est souvent résumée à « placement des yeux », avec oubli du grossissement. Le diaphragme et le condenseur ont également été souvent oubliés ; ils sont pourtant bien utiles pour certaines observations...

Vous disposez d'un échantillon d'eau de mer prélevé au niveau des « traînées vertes » (Figures 1) dans un pot de prélèvement étiqueté « Prélèvement marin »,

NOM :

Prénom :

Salle :

Vous disposez également d'algues vertes benthiques *Tetraselmis convolutae* : flasque étiquetée « *Algues* ».

Loupe binoculaire et microscope optique, ainsi que lames et lamelles, sont présents sur votre paillasse.

Les vers doivent être exploités au maximum tout au long du TP avant d'être éliminés, et ceci seulement après des manipulations irréversibles pour leur survie : attention ainsi de bien replacer, éventuellement, les vers dans leur contenant après manipulations.

L'objectif de cette 1^{ère} partie est de générer des observations microscopiques (à la loupe binoculaire et au microscope) pour tester l'hypothèse qu'au cours du cycle de vie de *Symsagittifera roscoffensis*, il y a incorporation puis multiplication d'algues vertes benthiques au sein des juvéniles blancs de façon à former des adultes verts.

A partir du prélèvement d'eau de mer, isoler tout d'abord différents stades de vie du ver auxquels vous allez faire référence pour travailler l'hypothèse proposée.

Pour prélever les vers, vous vous aiderez d'une pipette plastique que vous identifierez comme spécifique au prélèvement des vers pendant toute la durée du TP. Vous pouvez vous servir des boîtes de pétri à votre disposition pour isoler au fur et à mesure les individus.

Afin de diminuer les mouvements des vers, vous pouvez les anesthésier en ajoutant une petite goutte de $MgCl_2$ à 7% (vous vous aiderez pour cela d'une pipette de prélèvement que vous réserverez à cette solution sur la totalité du TP).

Afin d'améliorer les observations, il vous est conseillé de placer les vers dans un volume minimum

Vous déposerez les différents stades choisis, dans leur ordre chronologique supposé de développement, sur une ou plusieurs lames de verre

Question I-A-2 : Rappeler ce que signifie $MgCl_2$ « à 7% ». Le $MgCl_2$ étant un compétiteur calcique, proposer une hypothèse pour expliquer son rôle anesthésiant sur les vers.

Réponse à la question I-A-2

7g pour 100 mL

Une des hypothèses pouvant être avancée est qu'un compétiteur calcique inhibe les cycles de contraction musculaire

Question I-A-3 : Schématiser les différents stades choisis et prélevés afin de les caractériser, et ce, dans l'ordre chronologique de développement du ver de Roscoff. Vous prendrez soin d'explicitier les caractéristiques qui ont guidé votre analyse, pour arriver à l'hypothèse proposée.

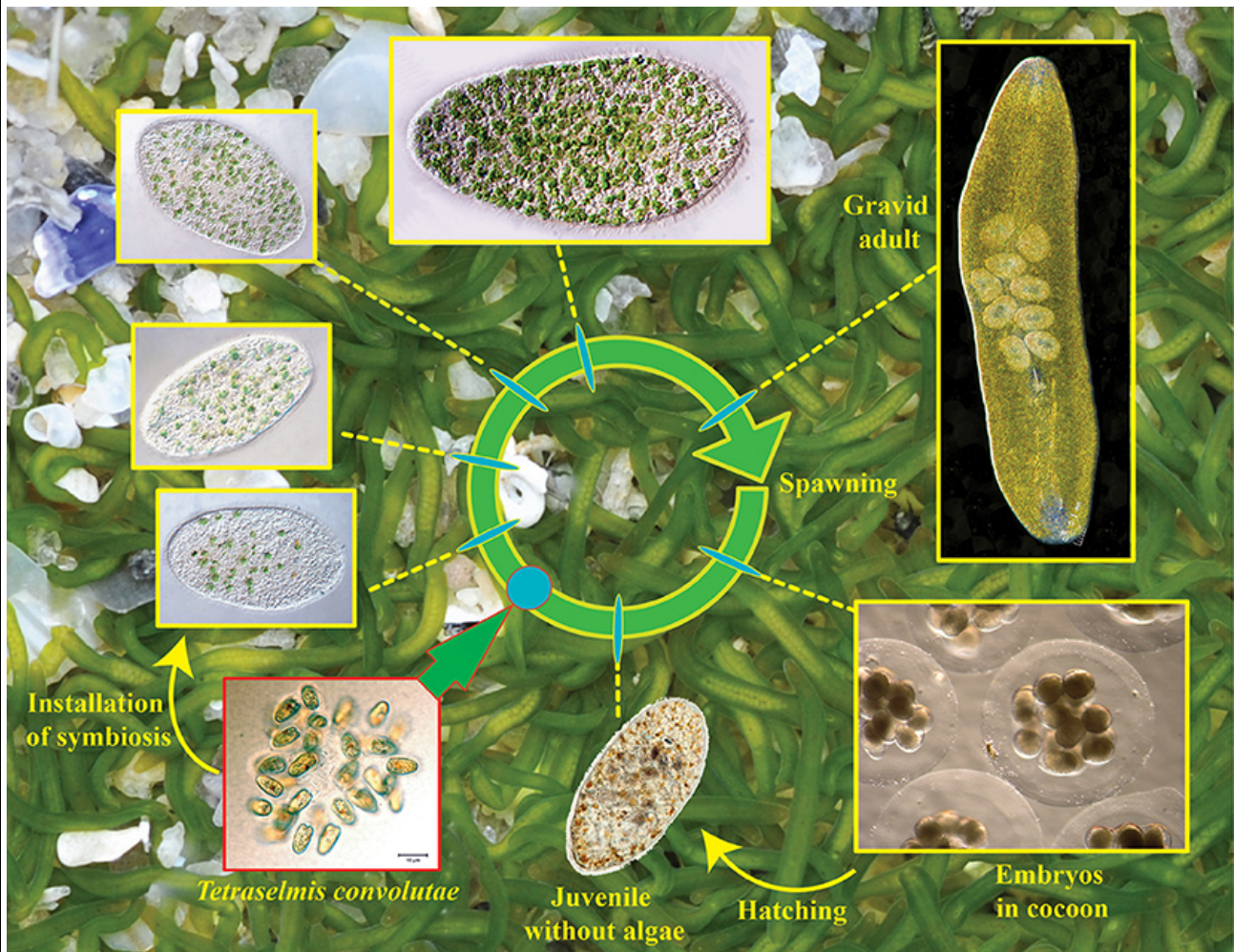
NOM :

Prénom :

Salle :

Une fois les schémas réalisés, vous appellerez un examinateur de salle pour qu'il évalue l'adéquation entre les différents stades de vie que vous avez observés et vos schémas.

Réponse à la question I-A-3



[The chimerical and multifaceted marine acoel *Symsagittifera roscoffensis*: From photosymbiosis to brain regeneration](#), septembre 2014, *Frontiers in microbiology*

Caractéristiques possibles : estimation de la taille des algues (confirmation des données de l'introduction, de la taille des vers, comparaison de la taille et du nombre des ovocytes au sein des adultes à maturité *versus* dans les cocons. Estimation du nombre d'algues aux différents stades. Evaluation des couleurs.

Le candidat peut repérer les individus suivants dans le prélèvement :

Individus 1 : ovocytes fécondés dans leur gangue muqueuse

Individus 2 : juvéniles blancs (solitaires), potentiellement à différents stades car de différentes tailles

Individus 3 : juvéniles qui commencent à contenir des algues

Individus 4 : adultes verts (coloniaux, avec biofilms), potentiellement à différents stades car de différentes tailles

NOM :

Prénom :

Salle :

Individus 5 : adultes verts contenant à maturité des ovocytes, repérables même à la loupe binoculaire, identiques aux ovocytes dans leur gangue muqueuse (individus 1)

Les étapes d'**observation** et de **description** doivent précéder la **caractérisation** et la **schématisation** : savoir « **mettre les yeux** » est fondamental pour débiter une étude, quel que soit le modèle. Il est important de disposer d'une culture naturaliste, d'un savoir en zoologie, avant de se lancer dans les techniques, sans doute mieux apprises par les candidats.

Il est également utile de réfléchir à la pertinence du choix de l'outil d'observation. Certains candidats ont su exploiter loupe ET microscope de façon complémentaire.

Des expériences complémentaires ont effectivement permis de démontrer que les juvéniles blancs ingèrent initialement des algues vertes benthiques *Tetraselmis convolutae*, ce qui leur permet d'acquérir la couleur verte observable chez les adultes.

Question I-A-4 : Rappeler ce qu'est une « couleur », ainsi que le lien que vous faites avec les pigments.

Réponse à la question I-A-4

Couleur : longueurs d'ondes d'une radiation lumineuse

Origine, le pigment : longueurs d'ondes de la radiation lumineuse émise par cette molécule

Question I-A-5 : Macroscopiquement et microscopiquement, les observations suggèrent ainsi une absence des microalgues chez les juvéniles, permettant de poser l'hypothèse d'une transmission / acquisition horizontale du photosymbionte. Cependant, avec les limites de la microscopie, il est difficile de rejeter la possibilité de la présence dans l'œuf d'une ou de quelques cellules microalgales qui pourraient être transmises verticalement par le géniteur. Comment pourriez-vous avancer sur cette question : proposez des expériences complémentaires en les justifiant.

Réponse à la question I-A-5

PCR suivies d'électrophorèses

Afin d'analyser l'évolution de l'algue suite à sa prise en charge par le ver, il vous est demandé d'extraire des algues à partir d'un ver adulte. Pour cela, quelques individus seront anesthésiés au $MgCl_2$ (n'en rajouter toujours qu'une toute petite goutte pour ne pas augmenter trop le volume), puis écrasés délicatement entre lame et lamelle. Les algues (sortant) du corps de *S. roscoffensis* peuvent alors être observées au microscope optique ; il est d'autant plus facile de les observer qu'on rajoute entre lame et lamelle une goutte d'eau de mer, qui permet de les remettre en suspension. Ne pas hésiter également à faire varier diaphragme, condenseur et mise au point du microscope.

Vous avez parallèlement à disposition des algues vertes libres et benthiques *Tetraselmis convolutae* : flasque étiquetée « *Algues* ».

NOM :

Prénom :

Salle :

Les algues libres sont très mobiles ; pour correctement les observer, vous pouvez mélanger dans un eppendorf 50 μ L d'algues avec 50 μ L de glycérol. Le glycérol, ainsi que sa pipette de prélèvement, est à demander aux examinateurs de salle.

Question I-A-6 : Comparez, à l'aide de schémas, les algues libres et les algues *in hospite*. Que pouvez-vous en déduire quant à l'évolution fonctionnelle de l'algue ?

Réponse à la question I-A-6

Les algues changent de forme, elles sont beaucoup moins sphériques *in hospite* que libres. C'est peut-être d  au fait qu'il y a également une perte très nette de la paroi des algues.

Certaines algues libres se déplacent (peut-être que les algues qui ne se déplacent pas sont les algues qui se divisent ; on les observe souvent par 2 sous les parois) ; aucune algue *in hospite* n'en est capable. Il y a donc vraisemblablement une perte de structure de mobilité (hypothèse d'un flagelle)

Ainsi, évolution fonctionnelle par régression lors de l'ingestion des algues libres par le ver

La question demandait explicitement une comparaison ; schématiser de façon séparée les 2 types d'algues ne répondait donc pas à la question posée.

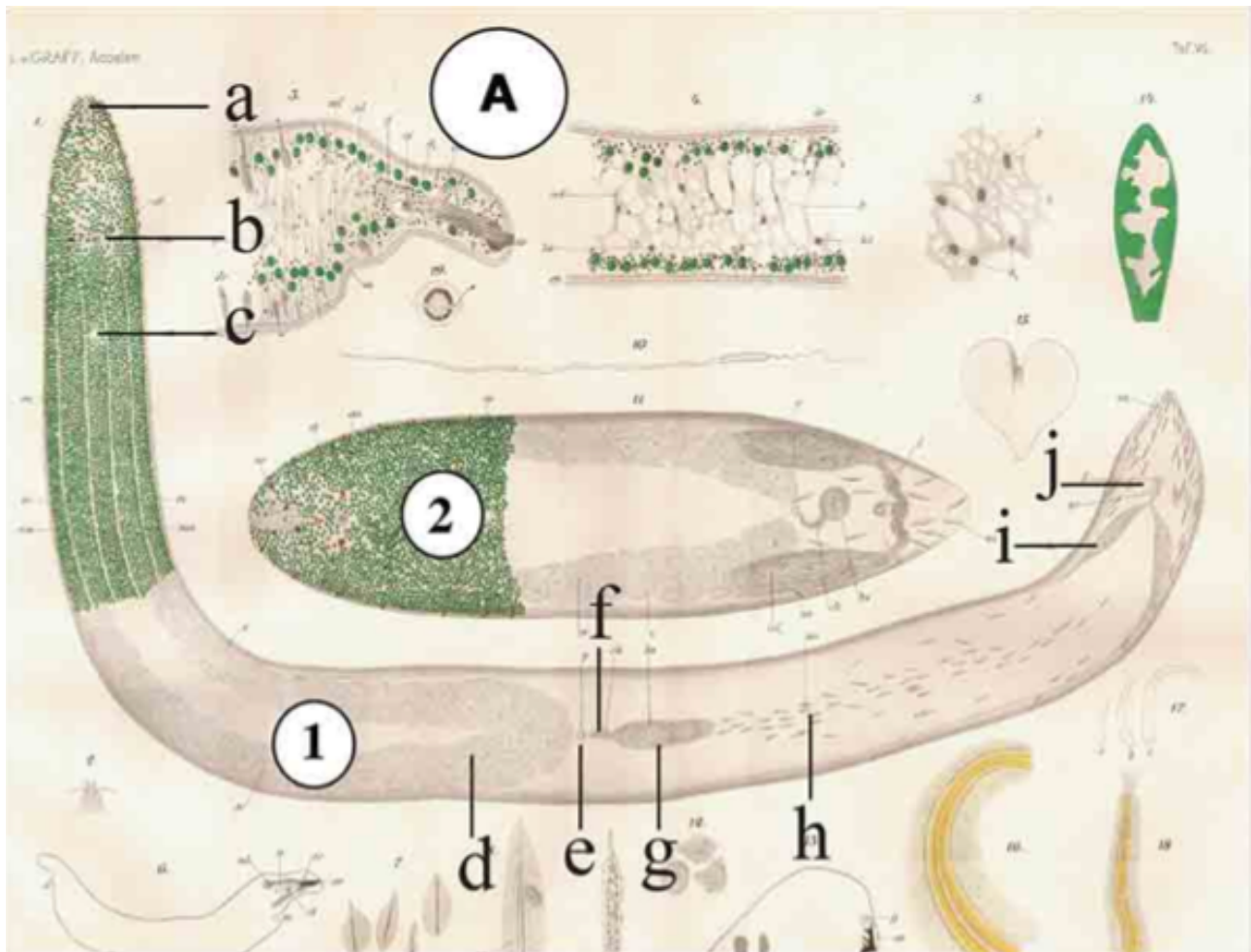
Attention aux rédactions finalistes « les algues n'ont plus besoin de bouger, donc elles perdent leur flagelle »

D'un point de vue historique, c'est Graff qui, en 1891, a montré l'organisation précise des algues au sein du ver : ne disposant bien sûr pas de la microscopie confocale et de la microscopie électronique à transmission à cette époque, il avait réalisé l'intégralité de ses observations à la loupe et au microscope optique, ce qui a sans doute largement contribué à ce qu'il devienne aveugle. Graf met notamment en évidence une localisation spécifique des algues en périphérie du ver, au niveau de l'épiderme.

NOM :

Prénom :

Salle :



[*Symsagittifera roscoffensis* \(Graff, 1891\)](#) Arch. Zool. Exp. Gén. 9, 1–12

Question I-A-7 : Quelle technique actuelle pourraient permettre de mettre en évidence une telle localisation ?
Expliciter son principe, et énoncer ses limites.

Réponse à la question I-A-7

Microscopie confocale (la réponse était donnée dans l'introduction ci-dessus...).

Prise d'images selon des plans en z, puis reconstitution de la totalité de l'individu. Contrairement à un cliché d'épifluorescence, la multiplicité des clichés permet la localisation précise de l'émission de la fluorescence. Il est ainsi possible d'avoir une idée de l'organisation spatiale des objets émetteurs de fluorescence. Dans notre cas, on pourrait se servir de la fluorescence naturelle de l'algue.

La limite est sur la résolution du microscope : 2 objets émetteurs de fluorescence peuvent être confondus s'ils sont rapprochés.

Question I-A-8 : Quelles hypothèses pouvez-vous formuler pour expliquer cette localisation restreinte à la périphérie du ver, au niveau de l'épiderme ?

NOM :

Prénom :

Salle :

Réponse à la question I-A-8

Hypothèse 1 : réactions immunitaires du ver sur les algues ; test de l'hypothèse : marquage des cellules immunitaires du ver

Hypothèse 2 : jonctions cellulaires et lame basale empêchant la présence dans les tissus plus profonds ; test de l'hypothèse : microscopie électronique à transmission sur les jonctions et la lame basale

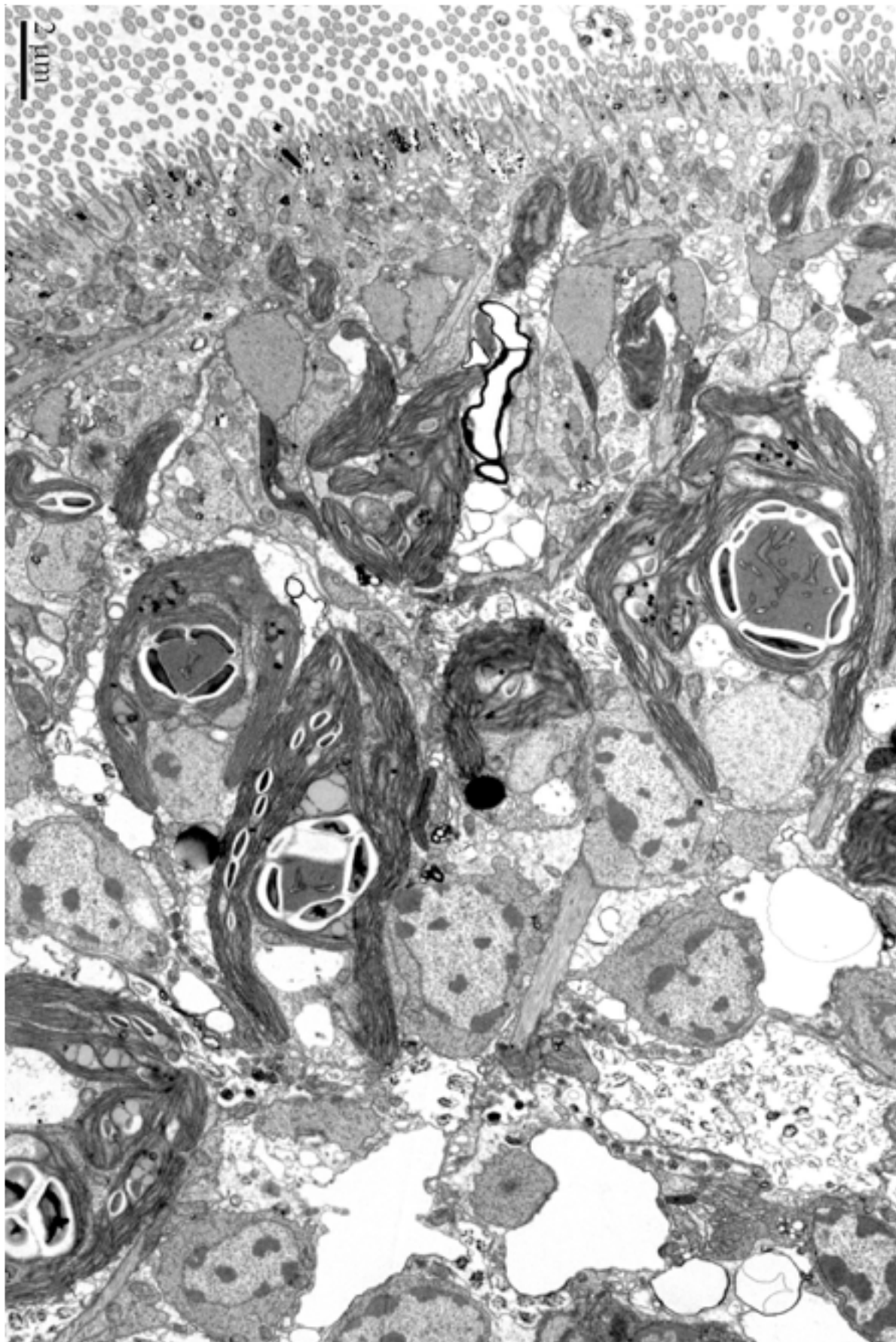
[Attention aux rédactions finalistes, très fréquemment rencontrées, et inadaptées en sciences : « les algues se placent à la périphérie, car c'est là où elles ont le plus de lumière »](#)

La micrographie électronique suivante (une micrographie, ainsi qu'un zoom) est réalisée en périphérie d'un ver adulte : vous pouvez repérer cette dernière par la présence des « cils », et visualiser les algues (repérables à leurs chloroplastes « chl ») en contact avec les cellules animales.

NOM :

Prénom :

Salle :



NOM :

Prénom :

Salle :

Question I-A-9 : Énoncer les différences entre microscopies optique et électronique

Réponse à la question I-A-9

Faisceau : de lumière versus électronique

Lentilles : optiques versus électromagnétiques

Résolution : 0,5 μm versus 0,2 nm

Question I-A-10 : Légender la micrographie, sachant que vous devez *a minima* repérer les algues, les pyrénoides, les thylacoïdes des chloroplastes, ainsi que les cellules musculaires. Vous prendrez également soin d'entourer les algues.

Réponse à la question I-A-10

Ajouter, en plus des légendes indiquées dans la question, les cils, les mitochondries, également les autres cellules animales

Question I-A-11 : A partir de l'ensemble des données à votre disposition, estimez le nombre d'algues dans un ver adulte, en considérant que son épaisseur est de de 80 μm . Vous explicitez vos calculs.

Réponse à la question I-A-11

Assimilation du ver à une figure géométrique, soit un cylindre ou parallépipède

Estimations de taille, en plus de l'épaisseur du ver donnée dans la question :

Diamètre d'une algue (MET) : 10 μm -> Volume algue (assimilation à une sphère)

Longueur d'un ver (Photo intro et échantillons) : 4000 μm

Largeur d'un ver : 500 μm ,

Algues sur $2/5^{\text{ième}}$ – $3/5^{\text{ième}}$ de cette longueur (Schémas de Graf)

Résultat final : environ 6000 algues dans un ver adulte

Peu de candidats se sont lancés dans le calcul. Il ne faut pas hésiter à essayer pourtant, les outils mathématiques étant souvent sollicités en SVT.

NOM :

Prénom :

Salle :

Ce nombre d'algues dans un ver adulte est constant, quel que soit le ver adulte étudié. Les 2 hypothèses posées sont que soit ces algues sont ingérées, soit qu'un nombre restreint d'algues est ingéré puis que ces dernières se multiplient.

Question I-A-12 : Que pourriez-vous proposer pour trancher entre ces 2 hypothèses ? Justifier votre réponse.

Réponse à la question I-A-12

Placer des juvéniles contenant déjà quelques algues dans de l'eau de mer filtrée, ne contenant aucune algue libre : cela continue à augmenter en nombre, il y a donc multiplication des algues *in hospite*.

Question I-A-13 : L'hypothèse qui a été confirmée est que c'est un nombre restreint d'algues qui sont ingérées, puis qu'elles se multiplient. Mais le nombre d'algues dans un ver adulte ne dépasse jamais le nombre que vous avez déterminé précédemment. Comment pouvez-vous expliquer ce fait ? Proposez au moins 2 hypothèses.

Réponse à la question I-A-13

Hypothèse 1 : Contrôle du cycle cellulaire de l'algue par le ver, peut-être par des produits du métabolisme, peut-être par des structures de liaison entre les cellules du ver et les cellules algales ?

Hypothèse 2 : digestion progressive des algues par le ver ? (Nous serions alors dans un cas encore plus complexe de partenariat !)

I.B- Identification de l'ensemble des partenaires de l'holobionte

La question se pose de savoir si seuls le ver et les algues, observables directement aux microscopes optique et électronique, sont présents dans l'holobionte. Nous allons poser l'hypothèse, par analogie avec de nombreux autres êtres vivants, qu'un microbiote procaryote pourrait être présent.

Pour tester cette hypothèse, nous vous proposons tout d'abord de procéder à une analyse biochimique sur une ou plusieurs populations identifiées préalablement.

Vous allez ainsi réaliser des colorations bactériologiques, au bleu de méthylène et suivant le protocole de Gram. Comme contrôle, il vous est fourni du yaourt de vache avec son petit lait dans un eppendorf.

Le protocole détaillé de la coloration au bleu de méthylène vous est fourni ci-dessous.

Pour la coloration des vers :

- Déposer quelques vers adultes sur une lame de verre
- Retirer un maximum d'eau de mer

NOM :

Prénom :

Salle :

- Laisser sécher avant d'ajouter quelques gouttes de bleu de méthylène, à l'aide d'une micropipette équipée d'un cône, pendant 1-2 minutes
- Rincer à l'eau distillée
- Laisser sécher la lame avant d'ajouter éventuellement de l'huile pour l'objectif à immersion

Pour la coloration du yaourt :

- Réaliser un frottis
- Laisser sécher avant de colorer au bleu de méthylène
- Rincer à l'eau distillée
- Laisser sécher la lame avant d'ajouter éventuellement de l'huile pour l'objectif à immersion

Le protocole détaillé de la coloration de Gram vous est fourni ci-dessous. Des gants sont à votre disposition.

- 2 lames peuvent être traitées en parallèle sur les cuves à coloration ; les déchets liquides restent dans la cuve ; si besoin, vous pouvez les évacuer dans la poubelle prévue à cet effet (aucun déchet dans l'évier).
- Réaliser un frottis ; dans le cas des vers, déposer quelques vers sur une lame de verre, puis éliminer un maximum d'eau de mer en utilisant la pipette et/ou du papier absorbant, enfin laisser sécher (accélération du séchage par mouvements de la main)
 - o Fixer avec de l'éthanol à 90°C (5 minutes), et laisser sécher
 - o Colorer au violet de gentiane en recouvrant la lame pendant 1 minute
 - o Laver à l'eau distillée
 - o Recouvrir la lame de lugol pendant 1 minute
 - o Laver à l'eau distillée
 - o Verser de l'alcool sur la lame inclinée pendant une 10aine de secondes
 - o Laver à l'eau distillée
 - o Colorer à la fuchsine en recouvrant la lame pendant 1 minute
 - o Laver à l'eau distillée
 - o Laisser sécher la lame avant d'ajouter éventuellement de l'huile pour l'objectif à immersion

Attention : l'utilisation d'huile nécessite une grande rigueur dans la manipulation ; quand de l'huile est ajoutée sur la lamelle, les seules observations possibles sont à l'objectif à huile. Attention à ne pas mettre d'huile sur les autres objectifs ; si tel était le cas, appeler un examinateur.

NOM :

Prénom :

Salle :

N'hésitez pas à travailler sur des organismes vivants, morts, dilacérés ou non, également des débris, qui sont parfois aussi sources de résultats.

Question I-B-1 : Quel est le principe de la coloration de Gram ? Préciser ensuite le rôle de chaque étape du protocole. Enfin, donner les limites de cette coloration.

Réponse à la question I-B-1

Coloration différentielle en fonction de l'épaisseur de la paroi bactérienne.

Sur frottis fixé à l'alcool = arrêt de toutes réactions métaboliques dont de dégradation ; coloration au violet de gentiane ou cristal violet = coloration différentielle des bactéries en fonction de l'épaisseur de leur paroi ; mordantage au lugol = fixation de la coloration ; décoloration à l'alcool + acétone = décoloration seulement des Gram-, dont la paroi est peu épaisse ; recoloration à la fuchsine = contre-coloration donnant une teinte rose aux Gram ; observation au microscope optique.

Certains germes restent insensibles à cette coloration, dont les mycobactéries (incluant les agents de la tuberculose et de la lèpre).

« La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries Gram- des bactéries Gram+ » : certes... mais ce n'est pas le principe de la coloration... Le principe d'une technique expérimentale avance notamment l'objectif de la réalisation de la manipulation (par exemple, un objectif de visualisation et de localisation pour la microscopie)

Il ne faut pas avoir peur de « faire » des manipulations, de proposer des hypothèses ; comme dans la posture d'un candidat auprès d'un chercheur, qui « découvre » ; il ne faut pas hésiter à aller de l'avant, plutôt que de seulement chercher à appliquer.

Les colorations sont à réaliser et **à faire évaluer par un examinateur.**

Question I-B-2 : Dans le cadre suivant, relever et interpréter l'ensemble des observations qui ont découlé des colorations, afin de commencer à répondre à la question posée, soit l'identification éventuelle d'un 3^{ème} partenaire, procaryote, dans l'holobionte.

Réponse à la question I-B-2

Contrôles positifs sur le yaourt, quelle que soit la coloration = mise en évidence de bactéries

Coloration au bleu de méthylène : coloration de quelques algues (identification à la taille, attention de ne pas confondre les algues et les bactéries, qui n'ont pas la même taille ; il est nécessaire d'avoir des ordres de grandeur en tête). Pas de coloration de bactéries.

Coloration de Gram très peu claire sur les vers : la périphérie des vers est rose / bleue, donc peut-être des Gram- et Gram+ en périphérie du ver, dans la matrice mais aussi dans l'épiderme ? Il n'était possible que de poser des hypothèses ici, les colorations n'étant vraiment pas source de résultats affirmés. Il s'agit de rester

NOM :

Prénom :

Salle :

logique, de se baser sur ses observations propres plutôt que de chercher à « trouver les résultats qu'on pense que le jury attend » ; certains candidats ont montré des colorations aux examinateurs de salle sans mises en évidence, leurs schémas disant le contraire...

Il est clair qu'à l'issue de cette coloration, on ne peut pas affirmer qu'il y a un 3^{ième} partenaire. Si ce 3^{ième} partenaire existe, alors il pourrait être impliqué dans la biologie du ver, mais les colorations ne permettent pas de l'affirmer.

Le jury souhaite rappeler que les bactéries s'observent à l'objectif 100 à immersion... Il a été montré plus de caséine au X40 que de bactéries en immersion, et même dans le yaourt, où des candidats pensaient voir des coques en observant un beau marquage bleu de la caséine au bleu de méthylène

Toujours pour avancer sur la question de savoir si un 3^{ième} partenaire procaryote est présent dans l'holobionte, vous allez maintenant procéder à une analyse moléculaire, via la réalisation d'une PCR.

Des amorces nucléiques spécifiques ont été conçues pour amplifier les séquences codant l'ADNr 28S du métazoaire, l'ADNr 18S de la microalgue verte et l'ADNr 16S procaryote.

Les amplicons attendus sont respectivement de 400, 600 et 750 nucléotides pour les jeux d'amorces amplifiant l'ADNr 28S du ver, l'ADNr 18S de la microalgues verte et l'ADNr 16S bactérien.

Pour chaque marqueur, vous disposez d'un couple d'amorces « métazoaires », « algues », « bactéries ».

Vous disposez des vers adultes, des vers juvéniles, ainsi que des microalgues. Il vous est précisé qu'aucune de ces cultures n'a été réalisée en conditions axéniques.

La manipulation sur glace est conseillée pour toutes manipulations relatives à la PCR.

Préparation de la matrice biologique contenant l'ADN génomique des microalgues:

- A l'aide de la lame Kova, ajuster la concentration d'algues à 1-1,5 millions de cellules par mL. Le protocole d'utilisation de la lame Kova est en annexe 5. Vous prendrez soin de barrer les puits que vous aurez utilisé sur la lame
- Avec la centrifugeuse de paillasse, culotez pendant 2 minutes 1,5 ml de la culture ajustée à la bonne densité dans un tube eppendorf (pensez à l'équilibrage de la centrifugeuse)
- Enlever le surnageant et reprendre les micoalgues culotées dans 100 microlitres d'eau distillée.

NOM :

Prénom :

Salle :

Préparation de la matrice biologique contenant l'ADN génomique des vers adultes et juvéniles pour la PCR :

- Prélever 5 vers adultes, et les placer dans un eppendorf
- Prélever 20 juvéniles et les placer dans un eppendorf
- Anesthésier les vers avec 50 μL de MgCl_2 à 7% pendant 30 secondes
- Centrifuger à la centrifugeuse de paillasse, et ne conserver que le culot (placer le tube sous la loupe binoculaire pour enlever un maximum d'eau de mer SANS éliminer les animaux). Bien prendre soin d'éliminer tout liquide pouvant contenir du MgCl_2 qui pourrait inhiber la PCR.
- Ajouter 50 μL d'eau distillée
- Broyer les vers à l'aide du pilon qui vous est fourni, puis homogénéiser au vortex.

Vous réaliserez différents mélanges réactionnels, le matériel à votre disposition étant strictement le suivant :

- 12 microtubes PCR
- 3 eppendorfs
- Centrifugeuse de paillasse
- Micropipettes p2/p10/p20/p200 avec cônes adaptés
- 30 μL de chaque couple d'amorces, dans 3 eppendorfs différents
- 20 μL d'eau ultrapure
- 150 μL de « Mix »

La base d'une réaction PCR est la suivante :

« Mix » contenant une ADN polymérase, des dNTPs, du MgCl_2 , un milieu tampon : 10 μL ,

Couple d'amorces : 6 μL ,

Matrice biologique : 4 μL ,

La préparation de la PCR est notifiée page 27. Vous devez au préalable répondre aux questions suivantes.

Question I-B-3 : Expliciter l'utilisation de la lame

Réponse à la question I-B-3

Attention à ne pas oublier les dilutions lors du retour à la concentration de la solution mère. Erreur classique lors des comptages...

NOM :

Prénom :

Salle :

Question I-B-4 : Quels sont les contrôles que vous allez réaliser, et quels résultats attendez-vous pour ces contrôles pour valider les manipulations que vous allez réaliser ?

Réponse à la question I-B-4

Test de chaque couple d'amorce (3 microtubes) dans des mélanges où l'eau de mer remplace la matrice à amplifier (contrôles négatifs) : cela permet d'identifier d'éventuelles contaminations.

Question I-B-5 : Pourquoi les manipulations menant à la réalisation de la PCR doivent-elles être réalisées sur glace ?

Réponse à la question I-B-5

Les basses températures (sur glace / proche de 4 degrés) préservent et stabilisent les composants chimiques et biochimiques et diminuent drastiquement les processus chimiques et enzymatiques (dont les appariements des amorces avec leurs régions cibles ou avec de la processivité de l'ADN polymérase qui ne commencera donc pas la synthèse des brins).

Question I-B-6 : Rappeler le principe de la PCR, ainsi que des différentes étapes du programme. Au bout des 30 cycles programmés, quelle quantité d'ADN sera obtenue ?

Réponse à la question I-B-6

Énoncé du principe de la PCR : amplifier une portion spécifique d'acide nucléique, délimitée par un couple d'amorces.

Phases de dénaturation : l'ADN double brin devient ADN simple brin par rupture des liaisons hydrogène faibles suite à une phase de haute de température, libérant ainsi la matrice de la PCR

Phases d'hybridation : la température est calculée en fonction de la longueur et de la composition des amorces. Cette étape permet un appariement entre les ADN simple brins et les amorces ; les amorces, en grande quantité, se fixent à leur séquence complémentaire : le double brin alors obtenu (ADN monocaténaire et l'amorce) est le substrat de l'ADN polymérase pour initier la polymérisation.

Phases d'élongation : la température de 72 degrés, est optimale pour le fonctionnement de l'ADN polymérase qui ajoute les nucléotides libres à la suite des amorces hybridées en synthétisant ainsi un brin complémentaire d'ADN

Evolution du nombre théorique de copies amplifiées au cours de 30 cycles de PCR à partir d'un brin bicaténaire d'ADN :

à T₀ : 2⁰ soit 1 ADN bicaténaire

après 1 cycle 2¹ soit 2 copies ADN bicaténaire

après 2 cycles 2² soit 4 copies ADN bicaténaire

NOM :	Prénom :	Salle :
-------	----------	---------

après 3 cycles 2^3 soit 8 copies ADN bicaténaire

après n cycles 2^n soit n copies ADN bicaténaire

après 30 cycles 2^{30} soit environ 1.10^9 (1 milliard) copies ADN bicaténaire en partant d'une copie d'ADN bicaténaire.

Question I-B-7 : Pourquoi avoir choisi d'amplifier de l'ADNr ?

Réponse à la question I-B-7

Les séquences cibles doivent être des séquences conservées pour la reconstitution des phylogénies, présenter des zones variables permettant de discriminer les espèces, être largement renseignées pour permettre une identification dans le cas d'un séquençage, et générer des amplicons de taille comprise entre 100 et 2000 kb.

Question I-B-8 : Sous forme d'un tableau à 2 entrées : matrices biologiques (adulte / juvénile / microalgues) versus couples d'amorces (ADNr28S, ADNr18S et ADNr16S), indiquez pour chaque combinaison les résultats de la PCR qui peuvent être attendus, en justifiant dans chaque cas votre réponse.

Réponse à la question I-B-8

	Couple ADNr 28S (métazoaire)	Couple ADNr 18S (micro-algue)	Couple ADNr 16S (procaryote)
Adultes	+ amplicons à 400 pb, spécifiques des métazoaires = adultes + juvéniles	+ amplicons à 600 pb, spécifiques du micro-algal = adultes verts + micro-algues	+ / - amplicon à 750 pb ?
Juvéniles	+ amplicons à 400 pb, spécifiques des métazoaires = adultes + juvéniles	- aucun amplicons à 600 pb	+ / - amplicon à 750 pb ?
Microalgues	- aucun amplicons à 400 pb	+ amplicons à 600 pb, spécifiques du micro-algal = adultes verts + micro-algues	+ / - amplicon à 750 pb ?

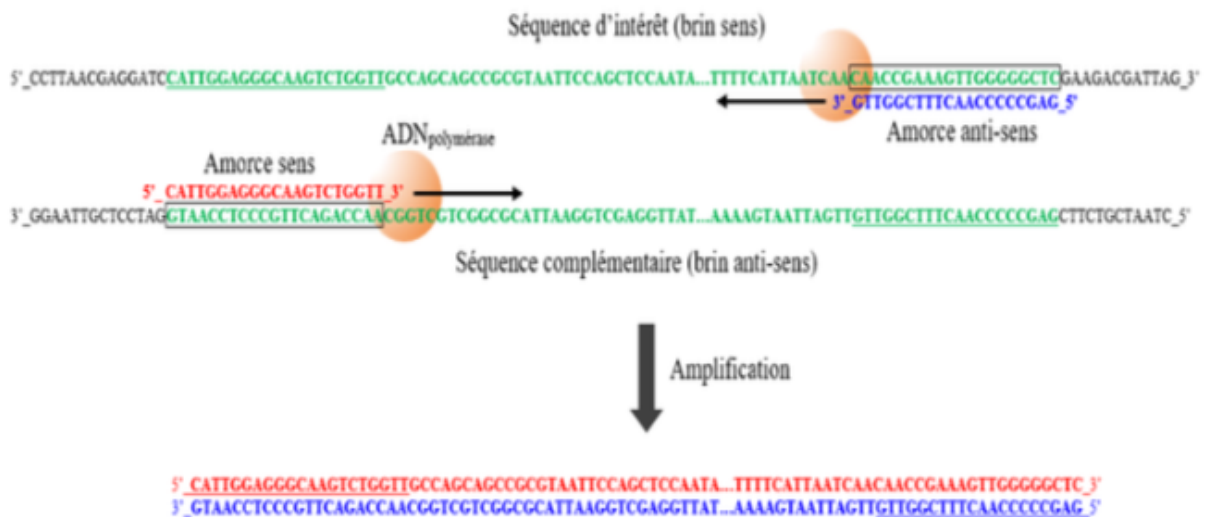
Les résultats sur la dernière colonne sont variables, en fonction des hypothèses d'intégration d'un microbiote au fur et à mesure du cycle de vie du ver.

NOM :	Prénom :	Salle :
-------	----------	---------

Question I-B-9 : A partir de la séquence génomique de l'ADNr 18S ci-dessous, déterminer des amorces potentielles pour amplifier une portion de gène que vous préciserez également. Expliciter votre raisonnement et les paramètres qui ont guidé votre choix des amorces.

```
>Microbiote_Eucaryote_photosynthetique_de_Symsagittifera_rosco
ffensis_Pontusval_Brignogan_sequence_partielle_ADNr_18S_1856b
TACGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTATACTGTGAAA
CTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGATAAC
CGTAGTAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCAGACTTCTGGAAGGGACGTATTTAT
TAGATTTAAGGCCAACCCGAGCTTGCTCGTCTCTTGGTGAATCATGATAACTCCACGAATC
GCATGGCCTCGCGCCGGCGATATTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAATTGGCGATGGTA
GGATAGAGGCCCTACCATGGTGTAAACGGGTGACGGGGGATTAAGGTTTCGATTCCGGAGAG
GCAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCAGCGCAAATTACCCAATC
CTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCTTCTTAAGTCTGGTAAATTG
GAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGGCCGGC
AGCCCGGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGT
AGTTGGATTTCCGATGGGATTTGCCGGTCCGCCTTTGAGGTTGCAGTGGTAGGTCTCTAT
CTTGTGTGCGGGGACTAGCTCCTGGGCTTCACTGTTCGGGACCTAGGAGCCGGACGAA
GTTACTTTGAGTAAATAGAGTGTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGAATATATTAGCATGG
GAATAACACGATAGGACTCTGGCTTATCTTGTGGGTCTGTGAGACCAGAGTAATGATTA
AGAGGGACAGTCGGGGGACATTCGTATTTCAATTGTGAGAGGTGAAATCTTGGATTTATG
AAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTGTCAAAGGATGTTTTCATTAATCAAGGAACGAAA
GTTGGGGCTCGAAGGACGATTAAGATAACCGGTCCCTAGTCTCAACAATAAAACGATGGC
CGACTAGGGATGGCAGATGTTTTTTTTGGATGACTCTGCAGGCCTAATGGAGAAAATCA
AGTTTTTGGGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCAGAT
GTTTTTTGATGACTCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTTGGTTCCGGGGGG
AGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAG
CCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCAGACATAGTGAGGATT
GACAGATTGAGAGCTCTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTGG
```

Réponse à la question I-B-9



Nombre de nucléotides de l'amorce : 10-25 nucléotides

Amplicon de 600 nucléotides puisqu'on travaille sur l'ADNr micro-algal

NOM :

Prénom :

Salle :

Rapport GC/AT pour la stringence : un oligonucléotide riche en GC permet de travailler à des températures d'hybridation plus élevées

Question I-B-10 : Expliquer le rôle de chaque fraction du mélange réactionnel

Réponse à la question I-B-10

Les réponses attendues doivent être en lien avec les connaissances en enzymologie

Polymérase : enzyme qui catalyse la formation de liaisons phosphoester entre la séquence génétique en formation et les dNTPs

dNTPS : substrats de la polymérase, ajoutés à la séquence génétique en formation

MgCl₂ : cofacteur de la polymérase

Milieu tampon de l'enzyme ; cf connaissances en enzymologie : conditions pH et conditions ioniques – conformations de la protéines – spécificité et affinité de substrat – spécificité et efficacité de réaction

Tampon de charge : permet que le mélange déposé tombe au fond du puits d'électrophorèse

(Traceurs colorés : contrôle de la migration lors de l'électrophorèse ; non exigé)

Question I-B-11 : Quel protocole allez-vous réaliser pour répondre à la question posée, à savoir l'identification des partenaires de l'holobionte, en ne vous servant strictement que du matériel indiqué ci-dessus ? Vous répondrez à cette question en générant **un schéma explicatif** de ce protocole.

Réponse à la question I-B-11

3 contrôles : 3 microtubes

Chaque couple d'amorces est testé sur les 3 organismes, ver adulte / ver juvénile / algue, soit 9 microtubes au total.

Afin de pallier les imprécisions de pipetage, l'équivalent d'un 1/2 microtube est ajouté pour chaque eppendorf contenant 1 pré-mélange réactionnel :

27 µL d'amorce AMi (AM1 dans un tube à partir des 30 µL fournis, AM2 dans un 2^{ème} tube, AM3 dans un 3^{ème} tube) + 45 µL de Mix à partir des 150 µL fournis

Chaque pré-mélange réactionnel est réparti dans 4 microtubes (16 µL), puis est ajouté à chaque microtube, soit 4 µL d'eau de mer pour les contrôles, soit 4 µL de matrice biologique (de ver adulte, de ver juvénile ou d'algue)

Chaque couple d'amorces est testé sur chacun des 3 organismes, soit 9 combinaisons donc 9 réactions de PCR dans 9 microtubes au total.

NOM :

Prénom :

Salle :

- 3 microtubes contiendront 4 μL de matrice du ver adulte

- 3 microtubes contiendront 4 μL de matrice du juvénile

- 3 microtubes contiendront 4 μL de matrice microalgue

Ainsi, 1 tube eppendorf contiendra **10 μL « Mix »** et **6 μL amorces ADN_r** pour **3 matrices différentes**

1
réaction
PCR



10 μL mix
6 μL amorces
4 μL matrice

Réalisation de 3 mélanges pré-réactionnels dans les 3 eppendorfs fournis



27 μL amorces 1
45 μL mix



27 μL amorces 2
45 μL mix



27 μL amorces 3
45 μL mix

16 μL de mélange pré-réactionnel dans chaque microtube PCR



4 μL 4 μL 4 μL 4 μL 4 μL 4 μL 4 μL 4 μL 4 μL 4 μL 4 μL
VA VJ A C VA VJ A C VA VJ A C

VA/VJ/A : matrice biologique de vers adultes/vers juvéniles/algues
C : contrôle eau ultrapure

Comme l'énoncé le demandait, il était attendu un schéma...

NOM :

Prénom :

Salle :

Question I-B-12 : Comment auriez-vous pu améliorer l'expérience si vous aviez pu disposer de plus de 12 microtubes de PCR ?

Réponse à la question I-B-12

Faire des dupliques

Vous devez préparer les mélanges PCR puis appeler les examinateurs pour qu'ils récupèrent vos microtubes. Attention de bien les annoter, vos tubes étant mélangés à ceux des autres candidats de votre salle dans la machine PCR.

La durée totale de l'amplification est d'environ 55 minutes pour 25 cycles de PCR. Les départs des machines PCR vous sont indiqués sur le tableau de salle.

Les examinateurs vous rapporteront vos échantillons à la fin du programme de PCR.

Vous disposez alors d'un gel d'électrophorèse d'agarose à 1%, avec 13 puits disponibles.

Ce gel contient déjà du « gel-green », une substance non toxique permettant de visualiser l'ADN à 488 nm.

Avant de déposer sur gel, vous devez ajouter dans chacun de vos microtubes PCR 10 μ L de tampon de charge. Vous pouvez alors déposer 20 μ L du mélange PCR/Tampon de charge sur le gel à votre disposition dans la cuve. Vous prendrez également soin de déposer un marqueur de taille, qui est à demander aux examinateurs ; il est commun à l'ensemble de la salle, veillez donc à vous désinfecter les mains avant utilisation. Une fois le dépôt réalisé, vous appellerez un examinateur pour qu'il procède au lancement de l'électrophorèse (durée d'environ 30 minutes).

A l'issue de l'électrophorèse, **votre gel sera visualisé et évalué par les examinateurs** ; la suite du TP se fait sur une photographie « type » des résultats que vous devriez obtenir. Cette photographie « type » est à demander aux examinateurs de salle lorsque vous avez fini de déposer sur votre gel, et à coller dans l'encadré de la question I-B-15.

Question I-B-13 : Quelle est la signification du « 1% » dans le protocole ? Qu'est-ce qu'aurait induit plutôt l'utilisation d'un gel à 2% ?

Réponse à la question I-B-13

1% = 1g d'agarose pour 100 mL de tampon de migration

Plus on augmente le % donc la quantité d'agarose, plus le maillage est serré et plus on augmente le pouvoir de séparation. En augmentant le % du gel d'agarose on sépare plus facilement des fragments d'ADN de taille proche. Dans un gel de plus faible pourcentage, ces fragments ne seraient pas séparés.

NOM :

Prénom :

Salle :

Question I-B-14 : Expliquer le principe d'une électrophorèse. Vous réaliserez un schéma de la cuve d'électrophorèse, en indiquant notamment anode et cathode.

Réponse à la question I-B-14

Séparation en fonction de la taille des fragments, ces derniers migrant dans un maillage : plus ils sont petits, plus ils migrent loin.

La charge massique est constante, c'est donc l'encombrement lors de la migration qui permet de séparer les molécules

Migration dans un champ électrique : l'ADN étant chargé négativement, il migre vers le pôle +, qu'il faut donc placer à l'opposé des puits de dépôt.

La migration de molécules biologiques chargées (ions) dans une matrice appropriée - dans le cas présent un gel d'agarose immergé dans un électrolyte (= un tampon de migration) - n'est possible que dans un champs électrique établi entre 2 électrodes (l'anode (pôle + vers lequel migrent les anions, d'où le nom) et la cathode (pôle - vers lequel migre les cations, d'où le nom) et créé par un générateur. L'ADN étant chargé négativement (anion), il migre vers le pôle + (l'anode). Au cours de la migration (déplacement imposé par le champs électrique), la séparation se fait en fonction de la taille des fragments d'ADN amplifiés migrant dans un maillage défini : plus ils sont petits, plus ils migrent loin car les plus grands ont une progression ralentie par le maillage.

Question I-B-15 : Quels sont les résultats attendus pour les 3 contrôles que vous avez effectués ? Schématiser ces résultats à la suite de la photographie.

Réponse à la question I-B-15

Rien au niveau des contrôles, pas d'amplification, ce qui montre que les amorces sont spécifiques des matrices biologiques, et qu'il n'y a pas d'amplification de matériel autre que les vers (ce qui était à craindre vu que les cultures n'étaient pas axéniques).

Il suffisait donc d'ajouter 3 colonnes « vides » aux 3 tailles définiées, à droite de la photo du gel...

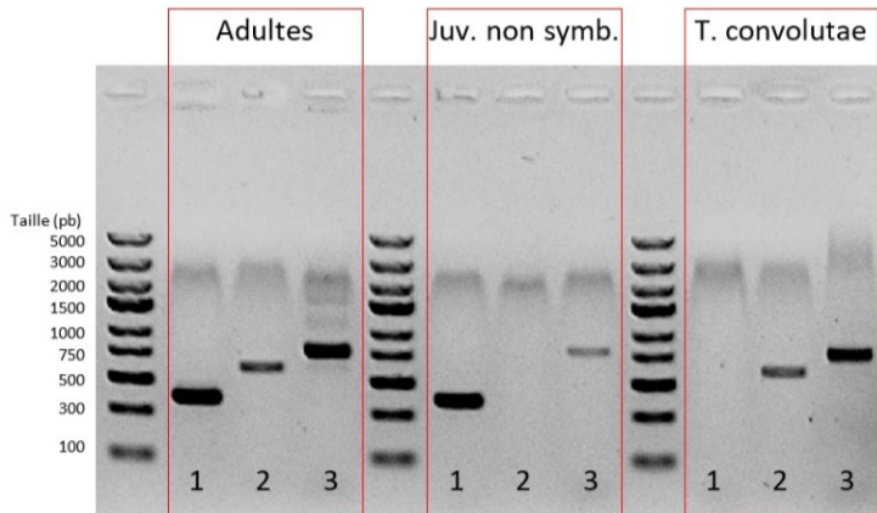
Question I-B-16 : Analyser les résultats obtenus (en partant du principe que vos contrôles sont vérifiés), en revenant éventuellement sur vos analyses biochimiques (colorations), l'objectif étant toujours de tester l'hypothèse de l'existence d'un 3^{ième} partenaire procaryote dans l'holobionte

Réponse à la question I-B-16

NOM :

Prénom :

Salle :



R1/I1 : confirmation des résultats de microscopie, à savoir partenariat ver / algue

R2/I2 : Ajout d'un nouveau partenaire, procaryote. Présence de ce partenaire dans les 3 populations, on ne peut pas conclure sur l'ensemencement initial.

Certains candidats peuvent avancer 2 hypothèses, tout à fait justifiées :

Hypothèse 1 : le milieu n'est pas stérile, donc il s'agit de bactéries présentes dans le milieu (non axénique)

Hypothèse 2 : il s'agit de l'amplification de l'ADN chloroplastique, présent dans les algues. Cette hypothèse aurait pu être vérifiée en menant l'expérience également sur des vers juvéniles dépourvus d'algues.

Expérience complémentaire au TP : les vers juvéniles dépourvus d'algues sont positifs pour la présence de ces bactéries, donc hypothèse 2 invalidée, reste l'hypothèse 1.

Retour sur les colorations : il faut que les réponses soient logiques ; si les candidats ont vu des bactéries ou non...

Parfois accumulation d'observations sans interprétation par rapport aux questionnements posés. Attention à bien raisonner avec une démarche. Par exemple ici, on s'intéresse d'abord à la question des algues, puis à la question du microbiote. Il faut générer une étude de documents avec une démarche de résolution de questionnement, et non faire seulement une lecture du document puis des interprétations floues.

Certains candidats ont pu être troublés par des résultats souvent discordants entre la coloration de Gram (peu ou pas visible) et le test PCR positif avec les amorces procaryotes. Dans ce cas, il était simplement attendu des candidats qu'ils notent cette discordance et tentent éventuellement de l'expliquer...

NOM :

Prénom :

Salle :

Partie II : Analyses métaboliques du partenariat ver-algues

L'analyse de l'incorporation des algues par le ver montre que si cette dernière ne se produit pas dans les 15 jours de vie du ver, celui-ci meurt. En effet, une analyse histologique du ver montre que bouche et pharynx se ferme à ce moment-là. Ainsi **se pose la question de la survie de chaque organisme** (nous ne considérerons dans cette partie que l'hôte animal et les algues) **au sein du partenariat, de leurs métabolismes respectifs, ainsi que des échanges entre eux.**

Nous nous proposons ainsi de réaliser des analyses métaboliques **sur les 3 populations suivantes : les vers juvéniles, les vers adultes et les algues libres.**

Voici les outils dont vous disposez avec tout le matériel nécessaire à leur utilisation. Les fiches techniques renvoyant à leur utilisation sont en en annexes :

- Annexe 2 : **Spectrophotomètre** (le planning de passage à ce poste vous est indiqué sur le tableau de salle). Des feuilles d'épinard sont à votre disposition, comme végétal de référence. Il vous est rappelé le schéma suivant, l'analyse se faisant dans le visible.



- Annexe 3 : **Chromatographie sur papier** ; mise à disposition de feuilles d'épinard comme végétal de référence
- Annexe 4 : **Coloration à l'eau iodée**

Question II-1 : Identifier les questionnements qui pourraient être résolus à l'aide de chaque outil proposé, dans l'objectif d'analyser le fonctionnement du partenariat ver-algues.

Réponse à la question II-1

Manipulations pas forcément difficiles, mais qui demandent les compétences suivantes :

- la compréhension des outils et techniques utilisées
- le respect d'un protocole
- la connaissance et la compréhension de notions fondamentales (couleur / pigment / photosynthèse)
- la capacité à confronter des résultats expérimentaux à des documents de référence

NOM :

Prénom :

Salle :

Spectrophotomètre : mise en évidence des longueurs d'onde d'absorption maximale, en ajoutant comme contrôle des feuilles d'épinard. Mise en évidence que l'absorbance maximale des vers adultes est dans la longueur d'onde de la chlorophylle, ce qui fait poser l'hypothèse de cette molécule, avec un mécanisme de photosynthèse oxygénique équivalent à celui des Angiospermes.

Chromatographie sur papier : mise en évidence des molécules / pigments impliqués dans l'absorption lumineuse, toujours avec l'épinard comme contrôle ; encore un argument en faveur de l'hypothèse que c'est bien le pigment chlorophylle qui permet l'absorption lumineuse, et qui est à l'origine d'un mécanisme de photosynthèse oxygénique, O₂ qui est mesuré par la sonde à O₂.

Coloration à l'eau iodée : mise en évidence de la présence d'amidon. D'après les publications, 37 à 58% du CO₂ fixé par l'algue passe aux cellules du ver, sous forme d'acides gras, de stérols. *Si les individus sont placés à l'obscurité pendant plusieurs heures en amont de la manipulation, on observe une diminution de la quantité d'amidon = consommation par l'algue et/ou le ver (non réalisé au cours du TP).*

II-2 : Études ExAO

Cette manipulation ne sera pas réalisée au cours de ce TP pour des raisons pratiques.

Il vous est ainsi fourni directement les résultats, pour des vers adultes, des vers juvéniles, et des algues, placés alternativement à la lumière et à l'obscurité.

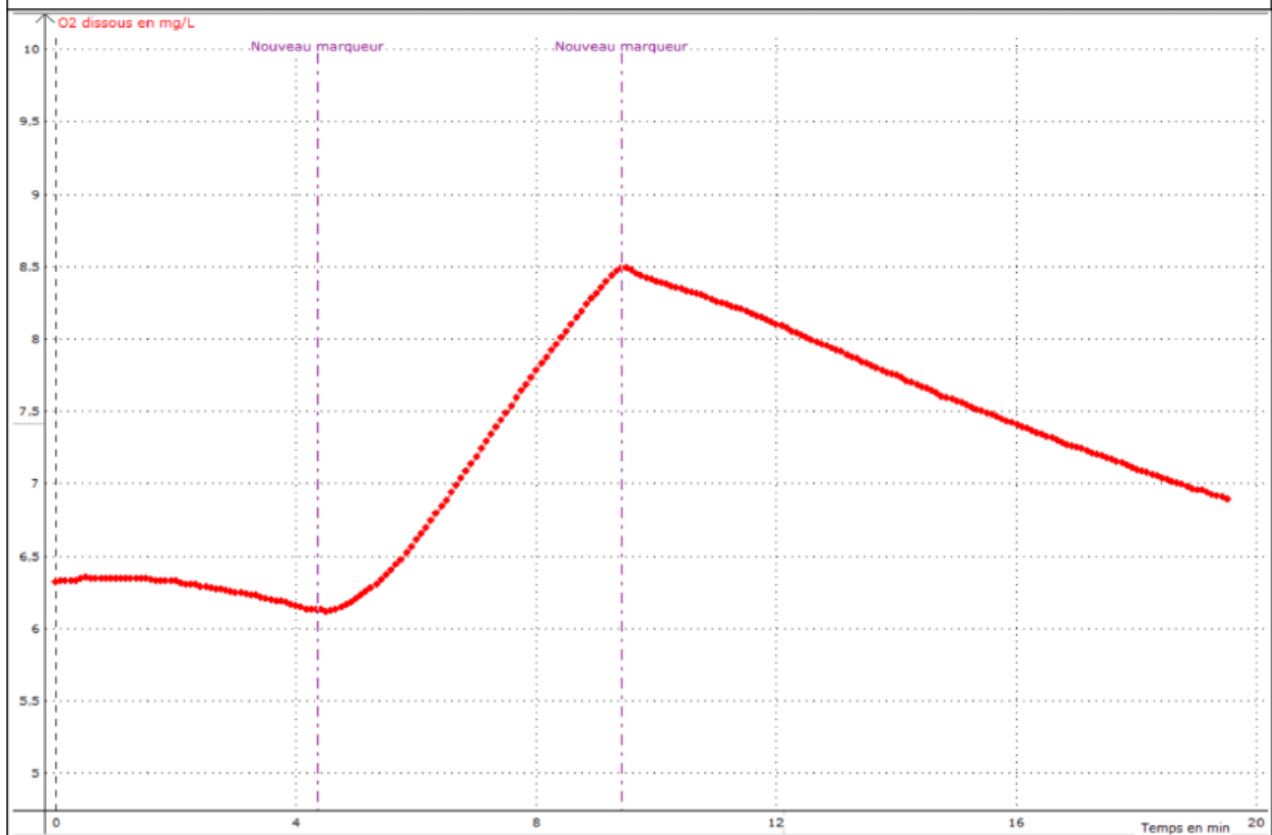
Études sur les vers adultes :

NOM :

Prénom :

Salle :

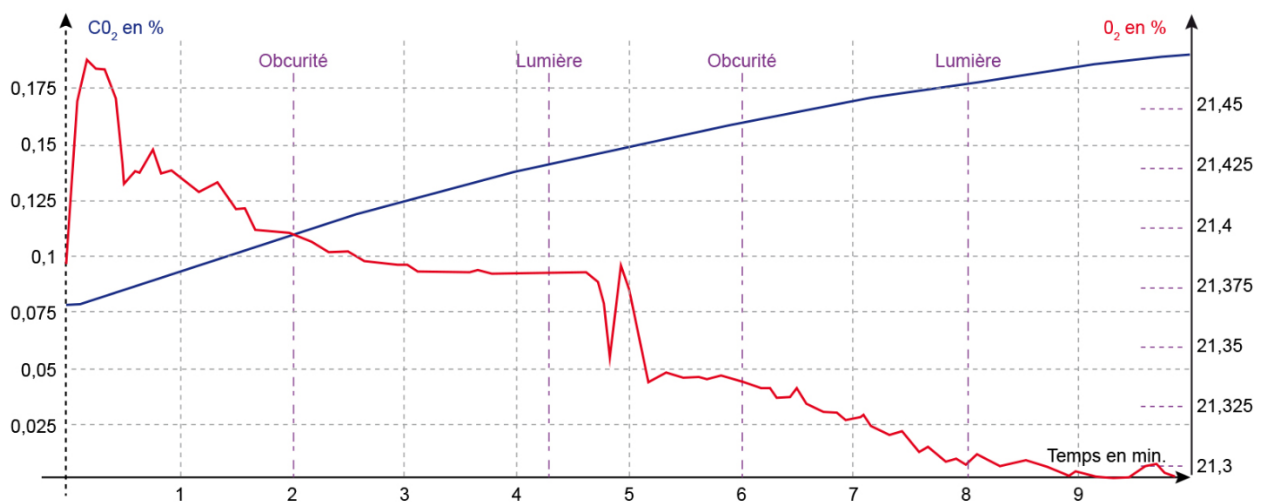
RESULTATS DE L'EXAO DES VERS ADULTES



Exao - Copie écran des résultats - Séquence Obscurité - Lumière - Obscurité

Etude sur des vers juvéniles :

<http://www.reseau-canope.fr/svt-taches-complexes/chapitre.html?page=st1st1clua>



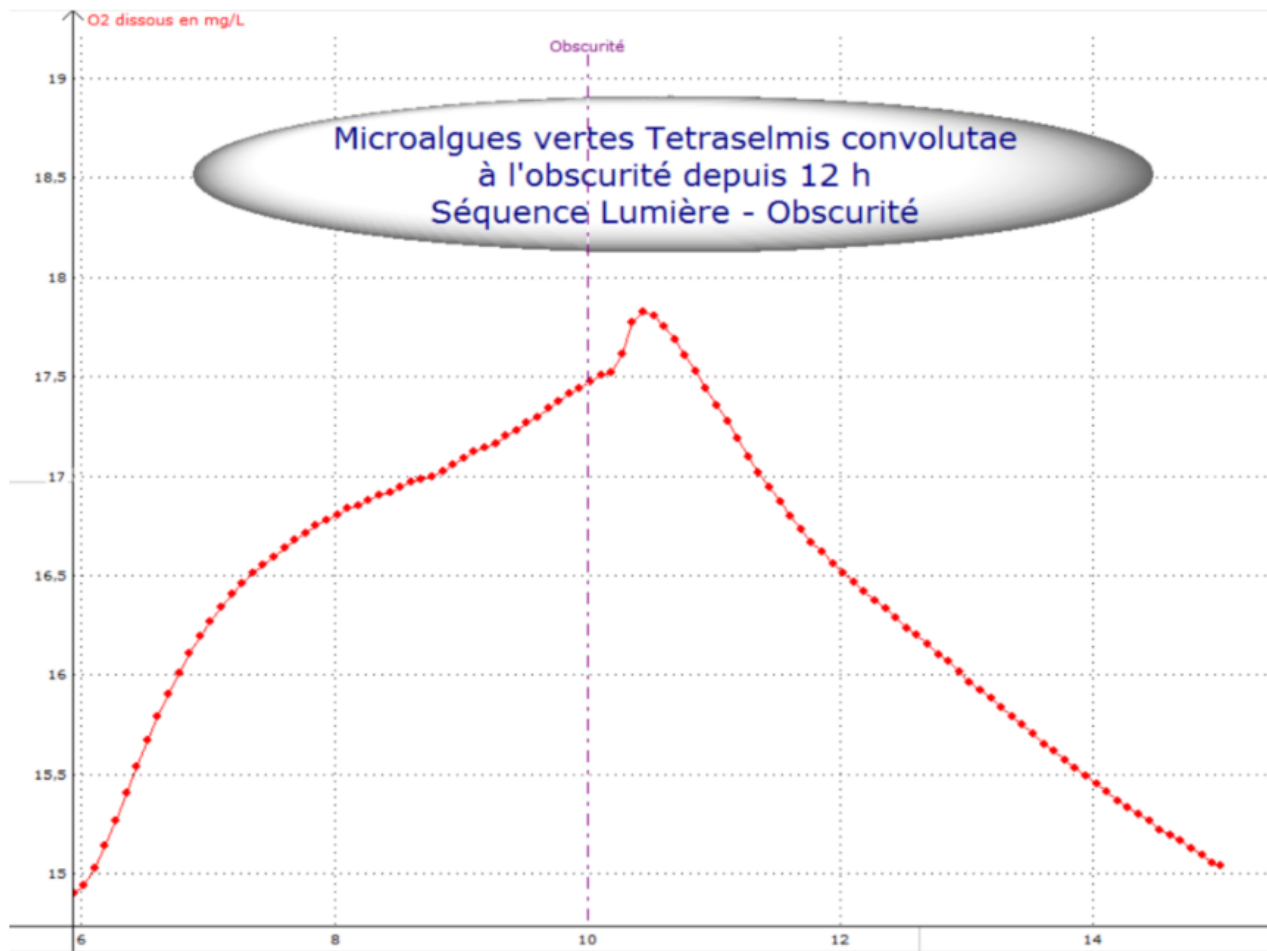
NOM :

Prénom :

Salle :

Etude sur des algues :

https://www.svt-lycee-elorn.ovh/ver_roscoff.php



Microalgue verte (*Tetraselmis convolutae*) - Exao - Sonde O₂ retournée - Algues à l'obscurité depuis 12h

Question II-2-a : Quelle est la signification de « ExAO » ? Quel est le principe de cet outil ?

Réponse à la question II-2-a

L'Expérimentation Assistée par Ordinateur (ExAO) ne diffère pas fondamentalement de l'expérimentation telle qu'elle était menée classiquement avec divers instruments de mesures et appareils de laboratoire, mais l'incorporation de l'ordinateur dans une chaîne de mesure apporte de nombreux avantages.

L'acquisition des données peut être automatisée, les résultats des mesures peuvent être sauvegardés aisément et traités par divers outils logiciels. De plus, la présentation des résultats sous forme graphique est

NOM :

Prénom :

Salle :

considérablement simplifiée ce qui en facilite l'analyse et l'exploitation pédagogique. Enfin, compte tenu des possibilités de communication entre logiciels différents fonctionnant sur une même interface utilisateur comme WINDOWS, les données peuvent être facilement exportées vers un tableur, un traitement de texte ou un logiciel de présentation multimédia.

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/principe.htm>

Question II-2-b : Que déduisez-vous des résultats obtenus à l'ExAO, toujours dans l'objectif d'analyser le fonctionnement du partenariat vers-algues.

Réponse à la question II-2-b

Les résultats vers *versus* algues sont interprétables uniquement qualitativement, la quantité de pigments n'ayant pas été évalué. En ce qui concerne les résultats concernant les seuls vers, une analyse quantitative est par contre possible (mais inutile !).

La synthèse de O₂ ne se produit que chez les vers adultes verts, et non chez les juvéniles blancs -> partenariat fonctionnel, mise en place d'une autotrophie au C. Cela signifie que la photosynthèse de l'holobionte dépasse ses dépenses respiratoires.

Inversement, le partenariat procure sans doute une autotrophie à l'N à l'algue, à partir des cristaux d'acide urique du ver (visibles au microscope polarisant en lumière polarisée analysée).

Attention à ce que les candidats déduisent l'intensité photosynthétique nette, par prise en compte de la consommation de O₂ lors de la respiration (qui ne s'arrête pas quand il y a photosynthèse !)

Bonus : à noter que ce n'est pas parce qu'il y a un arrêt brutal de la lumière qu'il y a un arrêt brutal de la synthèse de O₂...

II-3 : Études au spectrophotomètre

Question II-3-a : Vous rappellerez le principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre, ainsi que les précautions à prendre pour que les résultats obtenus soient interprétables.

Réponse à la question III-3-a

Utilisation de la loi de Beer-Lambert qui relie l'absorbance à une concentration, qui peut ainsi être déterminée par cette technique.

Utilisation d'un blanc, ici de l'eau de mer / absorbance strictement inférieure à 2 ; si non, dilution nécessaire

Question II-3-b : Après avoir noté dans le cadre suivant les manipulations que vous envisagez au spectrophotomètre, vous les réaliserez (le protocole détaillé vous est présenté en annexe 2), puis noterez les

NOM :

Prénom :

Salle :

résultats et les interprétations que vous déduisez, toujours dans l'objectif d'analyser le fonctionnement du partenariat vers-algues.

Réponse à la question II-3-b

Réalisation d'un spectre d'absorption dans le visible pour les 2 populations (3-4 mesures suffisaient)

Pics d'absorption à 450 et 650nm pour les vers adultes verts, pic d'absorption à 460 nm pour les vers juvéniles blancs (décalage vers les longueurs d'onde jaune-orange) = différence dans les pigments pour les 2 individus.

Pics identiques pour l'épinard et les vers adultes

Interprétation : ce sont les mêmes pigments qui absorbent la lumière naturelle chez les vers adultes / les algues / l'épinard : en utilisant des pré-requis, hypothèses sur chlorophylles, xanthophylles et caroténoïdes, testés ensuite par chromatographie.

Les candidats ont parfois fait des raisonnements quantitatifs, ce que ne permettait pas la manipulation.

Certains candidats n'ont fait des mesures qu'aux longueurs d'onde d'absorption maximales des chlorophylles, ce qui ne leur a pas permis de mettre en évidence des pics d'absorption, et donc de comparer qualitativement les différents matériels.

II-4 : Études par chromatographies

Vous disposez pour cette partie :

- D'un système de chromatographie pouvant contenir une bande de papier sur laquelle peut être analysé un dépôt
- De 50 mL d'éluant de chromatographie (90% éther de pétrole, 10% acétone)

Attention à bien manipuler avec des gants, et à ne surtout pas verser d'éluant de chromatographie dans l'évier ; vous disposez de poubelles de salle prévues à cet effet.

Le protocole détaillé vous est présenté en annexe 3.

Question II-4-a : Rappeler le principe de la chromatographie

Réponse à la question II-5-a

Technique pour séparer les constituants d'un mélange ; les molécules à séparer sont entraînées par un fluide (liquide ou gaz) que l'on appelle la phase mobile. Elles interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec un support (matrice) fixe (solide ou liquide fixé) que l'on appelle la phase stationnaire ; il y a donc une distribution ou partition des composants entre ces 2 types de phase. Le flux du fluide vecteur étant continu, c'est la rétention plus ou moins longue des différentes molécules sur le support fixe qui va les séparer les unes des autres.

NOM :

Prénom :

Salle :

Question II-4-b : Quelles sont les caractéristiques d'une chromatographie sur papier ?

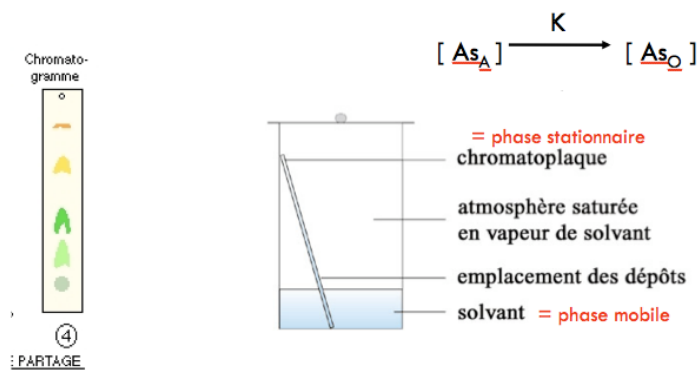
Réponse à la question II-4-b

Séparation des molécules selon quel paramètre ? (la séparation se fait grâce à des différences de solubilité entre les 2 phases ; elle se fait entre 2 liquides bien qu'un des 2 soit adsorbé à un support.

Chromatographie de partage

- Liquide fixé/liquide mobile
- Solvant aqueux / solvant organique

SOLUBILITÉ



Question II-4-c : Après avoir noté dans le cadre suivant les manipulations que vous envisagez par chromatographie, vous les réaliserez, puis noterez les résultats et les interprétations que vous déduisez dans les cadres suivants, toujours dans l'objectif d'analyser le fonctionnement du partenariat vers-algues.

Attention, les résultats de votre chromatographie doivent être joints à votre copie (collés/scotchés) pour évaluation.

Réponse à la question II-4-c

NOM :

Prénom :

Salle :

CHROMATOGRAPHIE ASCENDANTE
Séparation des pigments photosynthétiques

Front de migration du solvant

Migration des pigments selon leur solubilité dans le solvant

Solvant organique (Acétone, alcool)

Eprouvette en verre

Bouchon

Papier Watmann

Bêta carotène (10%) + soluble

Xanthophylles (10%)

Chlorophylle a (60%)

Chlorophylle b (20%) - soluble

Tâche initiale

Feuille verte (Géranium)

Ver adulte (S. roscoffensis)

Microalgue verte (T. convolutae)

4 tâches sur la bande de la feuille d'épinard correspondant aux chlorophylles A et B, aux xanthophylles et au carotène.

Mise en relation avec les résultats obtenus au spectrophotomètre : confirmation.

II-5 : Études de colorations à l'eau iodée

Question II-5-a : Quel est l'intérêt de traiter les vers à l'alcool avant la coloration ?

Réponse à la question II-5-a

Il n'était pas demandé un « savoir », très peu présent dans une épreuve de travaux pratiques ; la manipulation sans alcool pouvait être réalisée par les candidats, ils pouvaient ainsi déduire que la fonction principale du traitement à l'alcool était de fixer les vers à la lame...

Question II-5-b : Vous réaliserez les manipulations précitées, puis noterez les résultats et les interprétations que vous déduisez dans les cadres suivants, toujours dans l'objectif d'analyser le fonctionnement du partenariat vers-algues

Réponse à la question II-5-b

Mise en évidence de grains d'amidon uniquement chez les adultes verts (il était donc absolument nécessaire de faire la manipulation avec des juvéniles : certains ayant déjà quelques algues, les colorations s'y limitaient).
Hypothèse du transfert de l'amidon depuis les algues vers les vers (des colorations sur des adultes placés à

NOM :

Prénom :

Salle :

l'obscurité pendant 24/47/72h ont été réalisées pour mettre en évidence ce potentiel transfert ; aucune modification a été observé, mêmes à 72h).

II-6 : Bilan

Question II-6-a : Réaliser un bilan écrit, puis un bilan schématisé, de l'ensemble des résultats et interprétations, de telle sorte à répondre au questionnement initial sur les métabolismes et échanges métaboliques entre les différents partenaires.

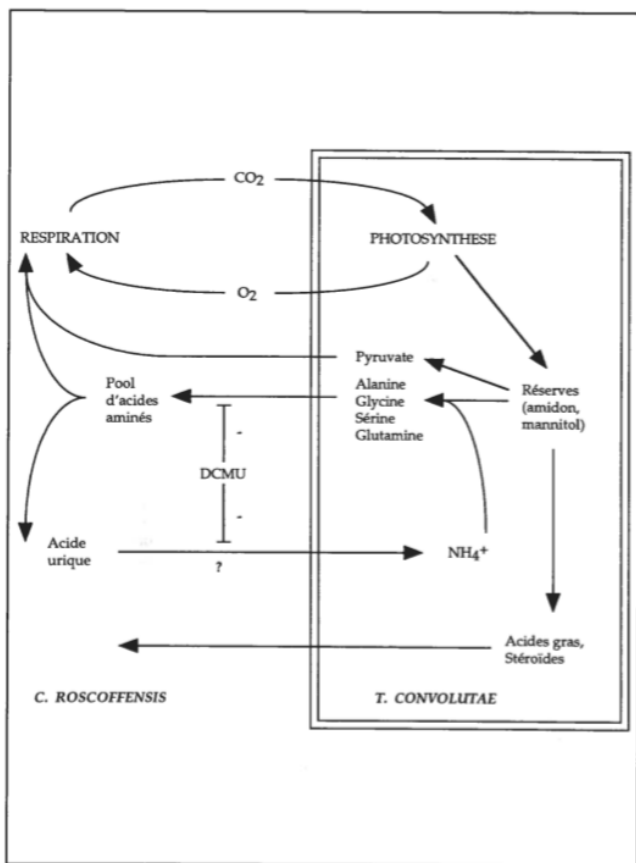
Réponse à la question II-6-a

L'étude d'ExAO permet de démontrer que le métabolisme du ver-algue est identique au métabolisme de l'algue seule, métabolisme absent des vers juvéniles blancs, quant à la production de O₂ parallèle à la consommation de CO₂, ce qui rappelle le mécanisme de photosynthèse de l'élodée ou du géranium.

L'étude au spectrophotomètre montre que le spectre d'absorption du ver-algue est identique au spectre d'absorption de l'algue, témoignant de pics à des longueurs d'onde de 430 et 660 nm, longueurs d'onde d'absorption des chlorophylles comme en témoigne l'Elodée. L'étude biochimique de chromatographie confirme que c'est sans doute un mécanisme similaire à celui de la photosynthèse du géranium, le profil de la séparation des pigments étant identique.

Enfin, la coloration à l'eau iodée des individus montre que l'issue de cette photosynthèse est identique à celle des organismes végétaux, soit la synthèse d'amidon dans les algues. Nous pouvons faire l'hypothèse que cet amidon est, au moins en parti, transféré au ver. Ainsi, le partenariat a induit le fait que le ver devienne, au cours de l'évolution, autotrophe au C, comme les algues qui lui sont associées.

Il est à prévoir que des transferts inverses, du ver vers les algues, existent.



Acta Bot. Gallica, 2000, 147 (4), 323-331.

Fig. 2.- Échanges trophiques entre *Convolvula roscoffensis* et ses chlorelles (DCMU : di-chlorophényl-di-méthyl-urée, inhibiteur de la photosynthèse ; *-* : inhibition).
 Fig. 2.- Trophic exchanges between *Convolvula roscoffensis* and its algal symbionts (DCMU: dichlorophényldiméthylurea, a photosynthesis inhibitor; *-*: inhibition).

Un exemple de symbiose algue-invertébré à Belle-Isle-en-Mer : la planaire *Convolvula roscoffensis* et la prasinophycée *Tetraselmis convolutae*

par Marc-André Selosse

La plupart des candidats est allée jusqu'à ce niveau du TP, mais n'a rien écrit ou schématisé. D'après leur copie, ils avaient pourtant répondu à plusieurs questionnements. Il est dommage de ne pas arriver à en faire, au moins en partie, une synthèse en fin de travail.

Question II-6b : Quelles expériences complémentaires proposeriez-vous pour compléter ces bilans ?

Réponse à la question II-6b

Test des acides gras, des autres sucres que l'amidon, des acides aminés

Test des composés microbiotiques (DMNS, acides uriques, etc.)

FIN DE L'ÉPREUVE

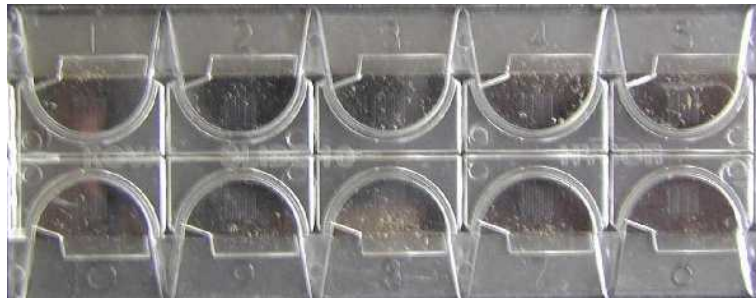
Merci à Mr Xavier BAILLY, de la station biologique de Roscoff.

NOM :

Prénom :

Salle :

Annexe 1 : Utilisation de la lame KOVA



Une lame KOVA®

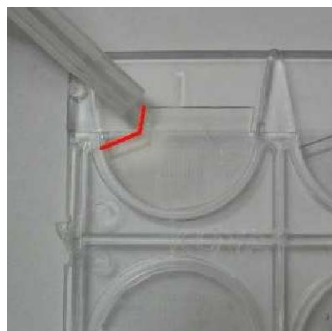
Les lames KOVA® comportent chacune 10 puits de comptage à usage unique. Chaque puits a une capacité de 6,6 μL et porte une grille comportant 9 grands carrés, chacun découpé en 9 petits carrés :

- les 9 grands carrés contiennent au total 1 μL ;
- 1 grand carré formé de 9 petits carrés contient 0,1 μL ;
- 1 petit carré contient 0,01 μL .



Chaque petit carré mesure 330 μm de côté. La profondeur du puits de comptage sous la grille est de 100 μm .

Remplir le puits avec une suspension au préalable homogénéisée en appliquant le cône dans l'encoche :



Après comptage, il est recommandé de barrer au feutre le puits pour éviter toute réutilisation.

NOM :

Prénom :

Salle :

Annexe 2 : Analyses au spectrophotomètre

Réalisation du broyat de vers pour analyses de spectrophotométrie

Prélever une 20aine de vers adultes et les déposer dans un mortier : afin de faciliter le prélèvement des vers, vous pouvez générer des ondes dans le milieu les contenant (par tapotements), ce qui les fait descendre et donc se concentrer.

Retirer un maximum d'eau de mer de sorte que les vers soient le plus concentré possible

Ajouter un peu de sable de Fontainebleaux, ainsi que 10 mL d'éthanol

Broyer à l'aide du pilon

Filtrer à l'aide d'un Erlenmeyer équipé d'un entonnoir dans lequel sera déposé un filtre à café

Récupérer le filtrat en vue de procéder à des analyses de spectrophotométrie

Réalisation du broyat d'épinard pour analyses de spectrophotométrie :

Hacher grossièrement la totalité des feuilles d'épinard fournies à l'aide d'une paire de ciseaux.

Placer les feuilles hachées dans un mortier, et les broyer avec du sable de fontainebleaux et 10 mL d'éthanol.

Filtrer le broyat dans un Erlenmeyer équipé d'un entonnoir dans lequel sera déposé un filtre à café.

Récupérer le filtrat en vue de procéder à des analyses de spectrophotométrie

La notice technique de chaque spectrophotomètre est affichée à côté de l'appareil.

Ne pas hésiter à diluer le filtrat obtenu si l'absorbance est trop élevée.

Attention, la pulpe d'épinard (broyat) servira à la manipulation de chromatographie : ne pas la jeter

NOM :

Prénom :

Salle :

Annexe 3 : Analyses par chromatographie sur papier

Précautions générales :

- Éviter de trop toucher la bande de papier à chromatographie, la saisir par ses extrémités.
- Manipuler avec des gants
- Ne pas verser d'éluant de chromatographie dans l'évier ; vous disposez de poubelles de salle prévues à cet effet.

Tracer un trait au crayon papier à 2 cm de l'extrémité de la bande de papier

Y déposer un verre et l'écraser à l'agitateur en verre : attention de ne déposer que le verre, déposer un minimum de liquide ; laisser sécher la bande.

Renouveler cette opération 3 ou 4 fois jusqu'à obtenir une tâche sur le papier à chromatographie

Placer la bande de chromatographie dans la colonne, contenant suffisamment d'éluant pour que le papier s'imbibe d'éluant, SANS que la tâche de contacte l'éluant.

Afin d'éviter les vapeurs d'éluant, fermer la colonne et la placer à l'obscurité à l'aide de papier aluminium.

En fin de migration, sortir la bande et laisser sécher avant présentation à l'examineur.

En ce qui concerne l'épinard, vous utiliserez le broyat obtenu dans l'annexe 2.

NOM :

Prénom :

Salle :

Annexe 4 : Protocole de coloration à l'eau iodée

Prélever le/les ver(s) à étudier, et le(s) déposer directement sur une lame de verre

Retirer un maximum d'eau de mer

Ajouter quelques gouttes d'alcool à 90°C pendant 30s-1min

Retirer l'alcool et rincer à l'eau distillée

Ajouter quelques gouttes d'eau iodée

Placer entre lame et lamelle

Observer en PLEINE lumière.