

CONCOURS GÉNÉRAL DES LYCÉES

SESSION DE 2013

(Classe de terminale)

BIOCHIMIE - GÉNIE BIOLOGIQUE

PREMIÈRE PARTIE

DURÉE : 5 heures

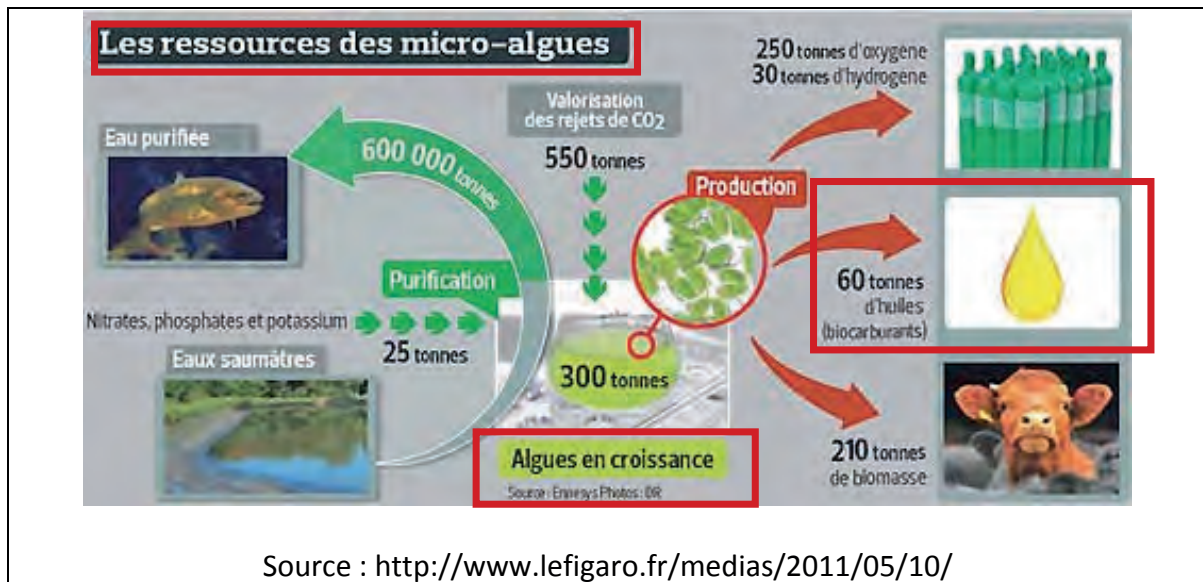
Calculatrice autorisée

Si au cours de l'épreuve un candidat repère ce qui lui semble une erreur d'énoncé, il le signale dans sa copie et poursuit sa composition en indiquant les raisons des initiatives qu'il est amené à prendre pour cela.

Microalgues et biodiesel

*Dictionnaire anglais-français autorisé.
Calculatrice autorisée.*

Différents secteurs d'activité utilisent les propriétés des microalgues, et ce, depuis déjà plusieurs décennies. Un nouveau domaine d'application de ces microalgues est en développement : celui de la production de biocarburants.



Composés de lipides extraits de microalgues, les algocarburants sont des biocarburants de «troisième génération». Ils peuvent remplacer avantageusement les biodiesels de «première génération», obtenus à partir d'huile végétale de plantes terrestres et donc aux dépens des cultures alimentaires.

Grâce à leur activité photosynthétique, les microalgues produisent des lipides à partir du dioxyde de carbone atmosphérique. Afin d'optimiser cette production, de nombreux laboratoires étudient leurs conditions de culture et tentent d'améliorer génétiquement les souches. Parallèlement, des équipes de chercheurs et d'ingénieurs conçoivent des photobioréacteurs pilotes pour atteindre des objectifs industriellement rentables.

1. Microalgues : des organismes photosynthétiques

1.1. Structures cellulaires des microalgues

Le terme microalgue désigne les algues microscopiques au sens strict (eucaryotes) et les cyanobactéries (procaryotes). Unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciés, ce sont des micro-organismes photosynthétiques. Les microalgues sont des constituants majeurs du phytoplancton. Elles jouent un rôle primordial dans la vie des écosystèmes aquatiques et sont à l'origine des chaînes alimentaires de nombreuses espèces lacustres ou marines.

1.1.1. Après avoir analysé les deux schémas du **document 1**, dresser un tableau des similitudes et des différences entre ces deux types de cellules.

1.1.2. En déduire une définition de la cellule eucaryote et de la cellule procaryote.

1.2. Photosynthèse des microalgues

Les microalgues présentent un processus photosynthétique similaire à celui des plantes supérieures. Cette photosynthèse se déroule au niveau des membranes des thylacoïdes.

Les thylacoïdes sont des organites en forme de saccules présents chez les cyanobactéries et dans les chloroplastes des cellules eucaryotes. L'espace intérieur, délimité par les membranes des thylacoïdes, s'appelle le lumen. L'espace extérieur est le cytoplasme chez les cyanobactéries, ou le stroma des chloroplastes chez les eucaryotes photosynthétiques.

Le **document 2** présente un schéma de l'ultrastructure du chloroplaste ainsi qu'un schéma fonctionnel. Il rapporte également une expérience simple permettant de mettre en évidence la capacité d'une microalgue à effectuer la photosynthèse.

- 1.2.1. Proposer un paramètre qui permet d'effectuer le suivi de la photosynthèse.
- 1.2.2. Choisir parmi les termes suivants, ceux qui conviennent à ce type d'organismes : chimiotrophes, phototrophes, hétérotrophes, autotrophes, auxotrophes, prototrophes. Justifier les choix effectués.
- 1.2.3. L'ultrastructure des chloroplastes rend la photosynthèse efficiente¹. Expliquer.

La photosynthèse comporte deux phases :

- une phase photochimique durant laquelle l'énergie de la lumière, captée par les chlorophylles, est convertie en énergie chimique conservée dans l'ATP. Ce processus conduit également à la formation de coenzymes réduits (NADPH).

- une phase chimique non photo-dépendante ou cycle de Calvin. Durant cette phase, le carbone du dioxyde de carbone est assimilé, ce qui aboutit à la synthèse des composés organiques.

1.3. Chlorophylles et phase photochimique

Les chlorophylles sont présentes dans les membranes des thylacoïdes. Leur structure chimique et leur spectre d'absorption figurent dans le **document 3**.

- 1.3.1. A partir des informations fournies par le spectre d'absorption de la chlorophylle a et des couleurs du spectre visible, expliquer pourquoi cette chlorophylle est de couleur verte.
- 1.3.2. Préciser le lien existant entre les structures moléculaires des chlorophylles et leur capacité d'absorber de la lumière.

Le diagramme du **document 4** présente le transfert acyclique des électrons de la photolyse de l'eau jusqu'au coenzyme réduit final.

- 1.3.3. A l'aide de ce diagramme, expliquer l'importance de la lumière dans les transferts d'électrons lors de la photosynthèse.

¹ *Efficiencia : capacidad de rendimiento, proceso eficaz con un alto rendimiento.*

1.4. Production d'ATP au cours de la photosynthèse

Le **document 5** décrit l'expérience de Jagendorf et Uribe (1966) ainsi qu'une expérience permettant de mesurer les variations de concentration en protons dans le milieu de suspension des thylacoïdes lors de transitions obscurité / lumière. Il comporte aussi une microphotographie montrant la présence d'ATP synthase à la surface des thylacoïdes.

Le **document 6** schématise le transfert de protons et d'électrons au niveau de la membrane du thylacoïde.

- 1.4.1. Analyser l'expérience du **document 5b**. En déduire l'évolution du pH du milieu dans l'étape 3 de l'expérience du **document 5a**.
- 1.4.2. A l'aide du **document 6**, dresser un inventaire des molécules produites lors de la phase photochimique de la photosynthèse. On ne tiendra pas compte des protons.
- 1.4.3. A partir de l'ensemble des informations, expliquer le mécanisme de synthèse de l'ATP au cours de la photosynthèse.

1.5. Cycle de Calvin

La phase chimique non photo-dépendante de la photosynthèse ou cycle de Calvin est une suite de réactions au cours de laquelle le dioxyde de carbone atmosphérique est transformé en un composé organique : le glycéraldéhyde 3-phosphate. L'enzyme clé du cycle de Calvin est appelée Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase).

Au cours du cycle de Calvin présenté dans le **document 7**, une molécule de glycéraldéhyde 3-phosphate est produite par intégration de 3 molécules de dioxyde de carbone.

- 1.5.1. Etablir le bilan moléculaire de cette suite réactionnelle.

Le métabolisme du glycéraldéhyde 3-phosphate peut ensuite donner naissance à différentes molécules organiques telles des glucides, des acides aminés ou encore des lipides.

Les lipides produits par *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) sont principalement des acides gras libres ou estérifiés (triglycérides également appelés TAG pour triacylglycérols). Leur étude nécessite :

- l'extraction des lipides totaux contenus dans les cellules d'une culture de la microalgue (**document 8**) ;
- la séparation des lipides totaux par chromatographie sur couche mince et leur identification grâce à la co-migration d'un mélange de lipides purifiés ;
- la détermination de la composition en acide gras des TAG et leur quantification par chromatographie en phase gazeuse.

- 1.5.2. Expliquer le rôle de la première centrifugation (indiquée en gras) lors de l'extraction des lipides totaux présentée dans le **document 8**.

- 1.5.3. Analyser et interpréter le chromatogramme présenté dans le **document 9**.

La révélation des lipides est réalisée avec du chlorure de manganèse et méthanol en milieu sulfurique. Les **documents 10 et 11** apportent des informations utiles au choix des mesures de protection à mettre en œuvre au laboratoire.

- 1.5.4. Choisir les équipements de protection individuel (EPI) et équipements de protection collective (EPC) à mettre en œuvre pour la manipulation des réactifs utiles à cette révélation. Justifier les choix.

1.6. La Rubisco

L'enzyme clé du cycle de Calvin est la Rubisco. Le texte du **document 12**, permet de découvrir quelques notions sur cette enzyme. Analyser le document en répondant aux questions suivantes.

- 1.6.1. Indiquer sa localisation dans la cellule végétale.
- 1.6.2. Citer le ou les substrats de la Rubisco.
- 1.6.3. Le fonctionnement de la Rubisco nécessite-t-il un cofacteur ? Si oui, nommer ce cofacteur et en préciser le rôle.
- 1.6.4. Indiquer les acides aminés impliqués dans la liaison avec le RuBP.
- 1.6.5. Cinétique de la Rubisco (EC 4.1.1.39)

La Rubisco de *Rhodospirillum rubrum* (bactérie photosynthétique), présente, dans la littérature, les caractéristiques suivantes :

- pH opt = 8
- $K_M = 3,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$
- $b_{(S)} = 100 \text{ nkat.mg}^{-1}$

Le **document 13** rend compte des résultats d'une étude expérimentale et de leur exploitation graphique selon la représentation de Lineweaver et Burk.

- 1.6.6. Déterminer les constantes cinétiques K_M et $v_{(C, S) i \max}$ de la Rubisco, en absence d'effecteur. Comparer les valeurs obtenues aux valeurs extraites de la littérature.
- 1.6.7. Expliquer le rôle du fructose 1,6-bisphosphate sur la cinétique enzymatique et qualifier cet effecteur.

2. Amélioration de la production d'algocarburants selon les conditions de culture

Des algues unicellulaires, comme *C. reinhardtii*, sont capables d'accumuler des lipides de réserve de type triglycérides lorsqu'elles sont placées dans certaines conditions de stress. Cette accumulation, qui peut représenter jusqu'à 80 % du poids sec, présente un intérêt biotechnologique dans la mesure où les lipides ainsi produits peuvent être utilisés comme source de biocarburant.

2.1. Etude de l'accumulation de lipides dans la microalgue modèle *C. reinhardtii*

Le **document 14** présente la composition d'un milieu nutritif Tris Acétate Phosphate contenant de l'azote (TAP+N), adapté à la culture de cette algue.

Des cellules de *C. reinhardtii* sont placées en conditions de stress c'est-à-dire cultivées dans un milieu nutritif sans azote (TAP-N). La présence de TAG est mise en évidence dans ces cellules par traitement au rouge de Nile, un fluorochrome qui émet un signal fluorescent jaune en présence de lipides neutres comme les TAG.

Les micrographies réalisées sont présentées dans le **document 15**.

- 2.1.1. A l'aide de la composition du milieu nutritif TAP+N présentée dans le **document 14**, identifier la source d'azote utilisée par les microalgues et indiquer le rôle de la solution minérale.

- 2.1.2. Expliquer le rôle de la condition de culture légendée « TAP+N » dans l'analyse de l'expérience présentée dans le **document 15**.
- 2.1.3. Décrire l'évolution de l'aspect de la microalgue observée sur les micrographies 1 à 4 et conclure sur l'effet de la carence en azote.

La composition en acides gras de *C. reinhardtii* est détaillée dans le **document 16**.

- 2.1.4. Comparer les résultats obtenus sur les milieux TAP+N et TAP-N. Identifier les acides gras dont la proportion est significativement augmentée sur le milieu carencé en azote.

Les chercheurs ont également étudié le devenir de deux autres molécules dans les cellules de *C. reinhardtii* cultivées en conditions de stress : l'amidon et la chlorophylle.

Le **document 17** présente la cinétique d'évolution des TAG, de l'amidon et de la chlorophylle sur le milieu TAP carencé en azote (TAP-N).

- 2.1.5. Analyser les courbes du **document 17**.
- 2.1.6. Conclure sur l'effet de la condition de stress « carence en azote » sur la survie de la cellule de *C. reinhardtii*.

Les lipides accumulés dans le cytoplasme des microalgues doivent être extraits avant d'être transformés en biodiesel. Pour optimiser les conditions d'extraction des lipides, des expériences sont menées sur la microalgue *Chlorella vulgaris*. Les résultats sont présentés sur le **document 18**.

- 2.1.7. Analyser les résultats présentés sur les **documents 18.a et 18.b**, en déduire et discuter les conditions opératoires optimales pour l'extraction des lipides de la microalgue étudiée.

2.2. Localisation des TAG dans la microalgue : les oléosomes

Les TAG sont emmagasinés dans des gouttelettes lipidiques localisées dans le cytoplasme des cellules de microalgues (**document 19.a**) et également nommées « oléosomes » ou « corps lipidiques ». Le modèle de ces structures lipidiques est représenté dans le **document 19.b**.

- 2.2.1. Expliquer la répartition des trois types de biomolécules constitutives des corps lipidiques.

Les chercheurs ont mis en évidence le nombre et les caractéristiques des protéines associées aux corps lipidiques. L'une d'entre elles est très abondante dans ces structures cellulaires : la « protéine majoritaire des gouttelettes lipidiques » ou « Major Lipid Droplet Protein » (MLDP).

Le **document 20.b** présente l'électrophorégramme obtenu après séparation des protéines constitutives de la microalgue. Les étapes du protocole opératoire réalisé sont rappelées dans le **document 20.a**.

- 2.2.2. Préciser la charge électrique globale des protéines séparées par cette méthode électrophorétique.
- 2.2.3. Estimer la masse moléculaire de la protéine MLDP.

3. Amélioration génétique des capacités de production en lipides

Au laboratoire, les teneurs en lipides sont considérablement accrues et peuvent atteindre 80% de la matière sèche lorsque la culture des microalgues s'effectue dans certaines conditions de stress (carence en azote). Cependant, ces conditions de fortes productivités ne peuvent pas être maintenues pendant de longues durées : elles conduisent le plus souvent à un arrêt de la croissance, puis, après un laps de temps, à la remobilisation des réserves lipidiques ainsi produites. Les recherches se sont donc orientées vers deux cibles pour améliorer les capacités de production en lipides de la microalgue modèle :

- l'ADN de *C. reinhardtii*, avec l'objectif de le modifier et d'isoler des mutants capables de produire une grande quantité de lipides dans des conditions de croissance normales ;
- la protéine MLDP, dont la fonction dans les corps lipidiques doit être élucidée.

3.1. Isolement de mutants de *C. reinhardtii* producteurs de lipides en grande quantité

3.1.1. Proposer un traitement physique permettant d'obtenir des mutants de *C. reinhardtii*.

Les **documents 21.a** et **21.b** présentent des micrographies de cellules sauvages et mutantes de *C. reinhardtii* colorées au rouge de Nile ainsi qu'une représentation graphique de la teneur en lipides dans ces deux types de cellules.

3.1.2. Exploiter ces documents et conclure.

3.2. Utilisation de la protéine MLDP comme marqueur de l'accumulation de corps lipidiques

Les chercheurs ont utilisé l'interférence par ARN pour diminuer l'expression de la protéine MLDP dans les cellules algales et observer l'effet de cette réduction. Le principe de cette méthode de génie génétique est décrit dans le schéma du **document 22**.

3.2.1. Reporter les numéros sur la copie et identifier les étapes de l'expression du gène encodant la protéine MLDP.

3.2.2. Dédire de ce schéma la stratégie utilisée pour diminuer l'expression de la protéine MLDP.

Le **document 23** présente les résultats obtenus lors de ces expériences d'interférence par ARN. Les chercheurs ont retenu deux critères :

- La quantité relative d'ARN messager (ARNm) dans les cellules,
- le diamètre des gouttelettes lipidiques accumulées.

3.2.3. Interpréter les résultats présentés dans le document.

4. Conditions de production de *C. reinhardtii*

Les études menées au laboratoire ont permis de sélectionner des souches d'algues d'intérêt pour la production industrielle. La culture d'algues à grande échelle nécessite de recourir à des technologies et des techniques adaptées.

4.1. Conservation des souches

Les souches sélectionnées sont conservées à l'aide de deux techniques décrites dans le **document 24** :

- le repiquage sur milieu de culture gélosé, cette technique étant également appliquée pour la conservation des souches microbiennes ;
- la conservation des microalgues par congélation à une température inférieure à -180 °C sous azote en cryotube.

La méthode de conservation par congélation est préférée à la méthode de repiquage en milieu gélosé.

- 4.1.1. A partir du **document 24c**, déterminer les conditions les meilleures pour la congélation des cellules.
- 4.1.2. Proposer des arguments en faveur de la méthode de conservation par congélation par rapport à la méthode de conservation par repiquage sur milieu gélosé.

4.2. Détermination des paramètres de croissance de *C. reinhardtii*

Un dénombrement des microalgues est réalisé au cours du temps dans un dispositif de culture. La préparation des échantillons consiste à faire sédimenter les microalgues contenues dans un échantillon sur le fond d'une chambre de sédimentation. Les algues sont ensuite dénombrées au microscope inversé. La technique de dénombrement est présentée dans le **document 25**.

Pour **valider les dénombrements**, un **contrôle qualité** de la technique a été réalisé à l'aide d'une suspension contrôle de microalgues à $5,00 \cdot 10^4$ microalgues.mL⁻¹ préalablement diluée. Comme pour toutes mesures, il existe un doute sur le résultat du dénombrement. L'analyse du processus de mesure permet d'identifier les sources d'incertitude qui peuvent être classées en 5 catégories : **Moyen** (matériel utilisé, réactifs...), **Méthode** (toutes les étapes de l'analyses), **Matière** (produit analysé), **Milieu** (conditions environnementales), **Main d'œuvre** (opérateur effectuant la mesure).

- 4.2.1. Lister les sources d'incertitude sur la dilution de la suspension contrôle.

Résultats du contrôle qualité :

	Essai 1	Essai 2
Nombre de microalgues comptées dans la surface de comptage	408	398

Données :

- Dilution de la suspension contrôle : 1/10
- s_r : 535 microalgues.mL⁻¹
- u_c : 600 microalgues.mL⁻¹

- 4.2.2. Etablir les équations aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques permettant de déterminer, pour chaque essai, le nombre de microalgues par millilitre de suspension.
- 4.2.3. A l'aide du **document 26**, étudier l'acceptabilité des valeurs mesurées en conditions de répétabilité et donner la valeur retenue. Exprimer le résultat dans le respect des critères métrologiques.

On considère l'erreur d'une mesure (encore appelée inexactitude de mesure) comme l'écart entre la valeur mesurée et la valeur annoncée de la suspension contrôlée.

- 4.2.4. Quantifier le défaut d'exactitude de ce dénombrement en calculant l'erreur en nombre de microalgues .mL^{-1} .

La croissance des microalgues sur 6 jours est suivie par dénombrement. Les résultats des dénombrements et la courbe de croissance figurent dans le **document 27**.

- 4.2.5. Calculer le taux de croissance népérien, aussi appelé vitesse spécifique de croissance.

- 4.2.6. Calculer le temps de génération.

4.3. Détermination de paramètres de culture en photobioréacteur

Un photobioréacteur peut être défini comme un système clos à l'intérieur duquel se déroule, en présence d'énergie lumineuse, une réaction biochimique de photosynthèse. Le photobioréacteur étudié est représenté sur les **documents 28a et 28b**.

Ce photobioréacteur est ensemencé avec une préculture de *C. reinhardtii* selon le protocole donné dans le **document 28c**.

- 4.3.1. Calculer le volume du photobioréacteur schématisé. Exprimer ce volume en m^3 .
- 4.3.2. En utilisant la valeur du taux de croissance calculé dans la question 4.2.2.1 et la valeur du volume du photobioréacteur, établir les équations aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques permettant de déterminer le temps d'incubation t .

4.4. Etude comparative de deux dispositifs de culture industrielle des microalgues

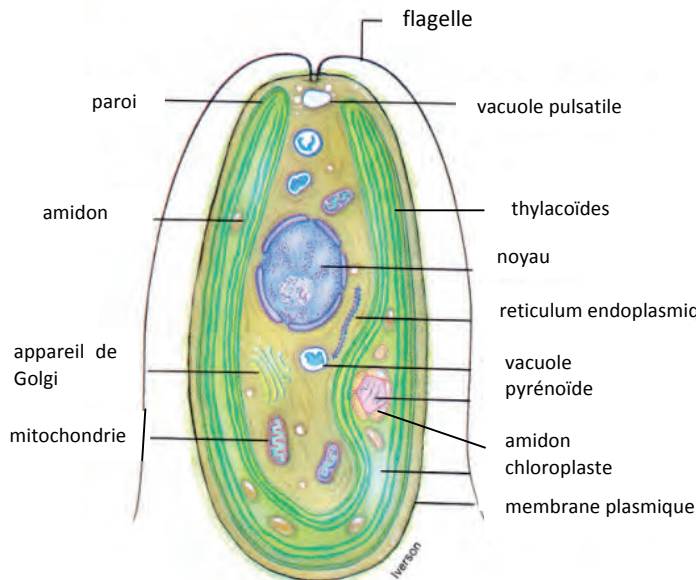
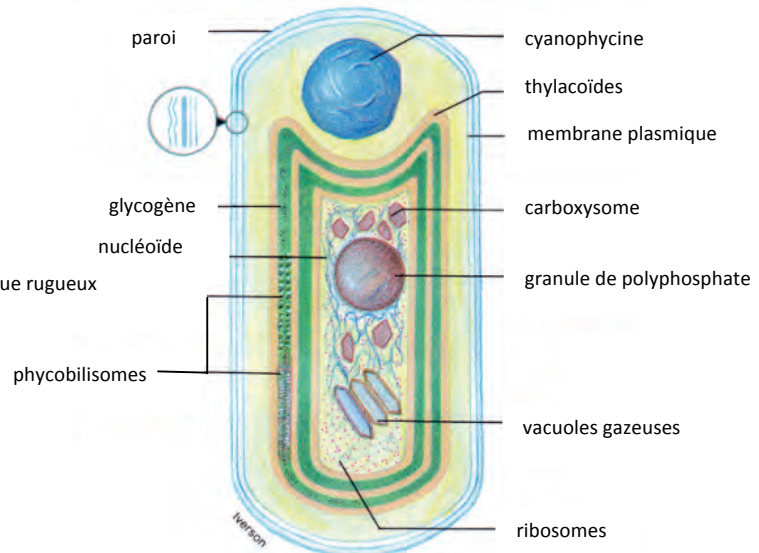
Deux technologies permettent aujourd'hui la culture des microalgues à l'échelle industrielle : les systèmes solaires ouverts et les systèmes artificiels fermés. Un exemple de chaque système est présenté sur le **document 29**.

- 4.4.1. Présenter, sous la forme d'un tableau, une étude comparative des deux dispositifs présentés. Trois critères seront abordés en priorité : les risques de contamination, les variétés des espèces cultivables, ainsi que la flexibilité de la production selon les conditions climatiques.

La souche de microalgue utilisée en vue de la fabrication de biodiesel est un mutant sélectionné pour sa capacité à produire des lipides en grande quantité. Sa culture est donc soumise à un certain nombre de contraintes. Les paramètres de production doivent être parfaitement reproductibles pour assurer dans une première phase, la croissance de la souche et dans une seconde phase, la production des lipides.

- 4.4.2. Énoncer trois arguments en faveur du choix d'un système artificiel fermé pour la culture de microalgues en vue de la fabrication de biodiesel, malgré un coût de production plus élevé qu'avec le système solaire ouvert.

Schémas de structures cellulaires de microalgues

A : algue unicellulairecellule de 10 à 20 μm environ**B : cyanobactérie**cellule de 5 μm environ

Source : Prescott, Harley, Klein, *Microbiologie*, Ed. De Boeck Université 1995 p 474, 537.

Les **thylacoïdes** sont les membranes où se déroule la photosynthèse.

Le **pyrénioïde** est une structure cellulaire interne aux chloroplastes, qui concentre les enzymes responsables de la photosynthèse. Le pyrénioïde est un centre de production de l'amidon : des grains d'amidon viennent s'accoler à l'extérieur du pyrénioïde.

Les **phycobilisomes** sont des complexes hétéroprotéiques ancrés dans les thylacoïdes. Ils comprennent entre autres les pigments photosynthétiques.

Le **carboxysome** est un compartiment protéique contenant les enzymes responsables de la photosynthèse.

La **cyanophycine** constitue une réserve d'azote et de carbone.

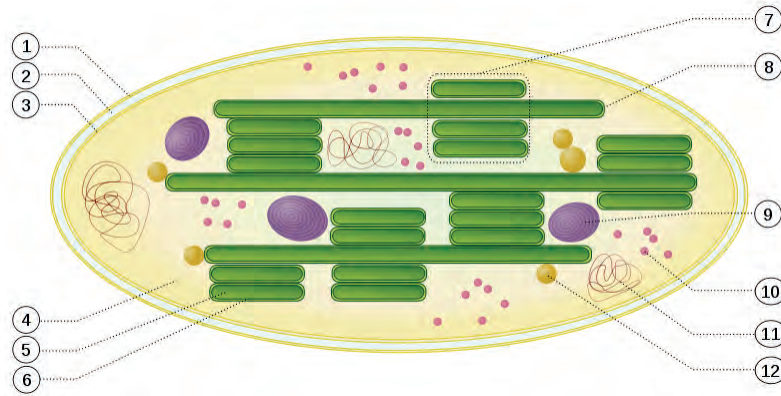
Les **granules de polyphosphate** sont des réserves de phosphates inorganiques quand le milieu est carencé en phosphates.

La **vacuole pulsatile** intervient dans l'équilibre hydrique de la cellule.

Les **vacuoles gazeuses** permettent de moduler la flottabilité de la cellule.

Document 2

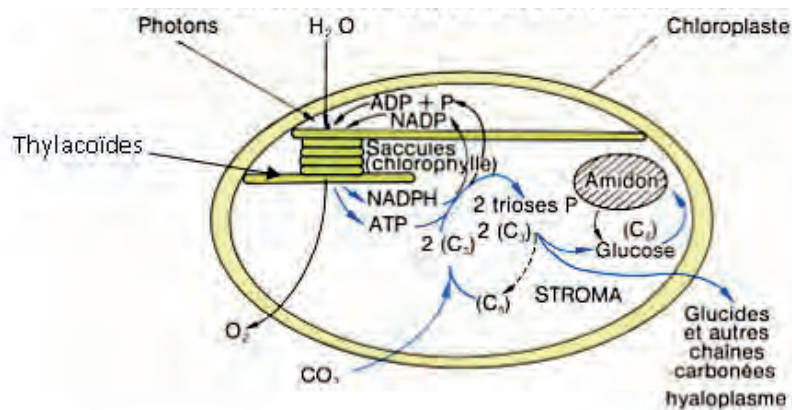
2.a Schéma de l'ultrastructure du chloroplaste



Source : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Chloroplast.svg>

1-membrane externe	2-espace inter-membranaire
3-membrane interne	4-stroma (fluide aqueux)
5-lumière du thylacoïde	6-membrane du thylacoïde
7-granum (thylacoïdes accolés)	8-thylacoïde inter-granaire (lamelle)
9-grain d'amidon	10-ribosome
11-ADN	12-plastoglobule (gouttelette lipidique)

2.b Schéma fonctionnel du chloroplaste



Source : G. Alkan-CART-P. Morin, *Biologie Term.D*, Ed. F. Nathan, p333

2.c Expérience

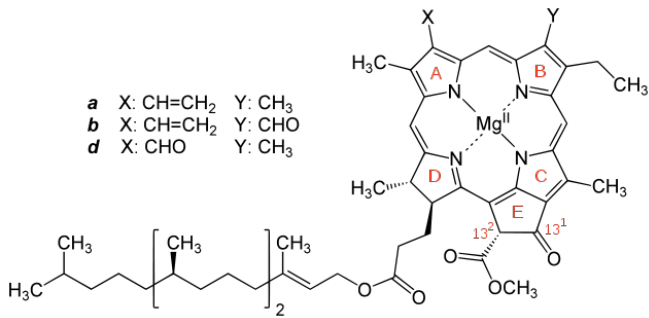
Culture après 6 jours



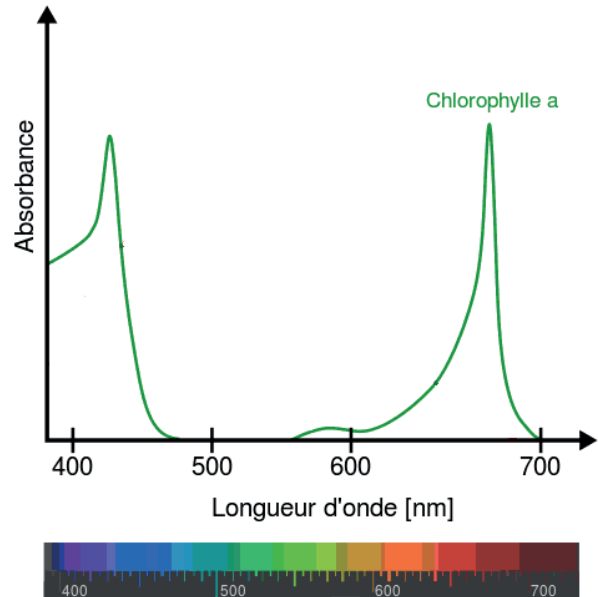
Des algues unicellulaires ont été mises en culture dans un milieu minéral et placées à la lumière. La photographie ci-contre montre la culture obtenue six jours après l'inoculation du milieu.

Document 3

Structures moléculaires des chlorophylles et spectre d'absorption

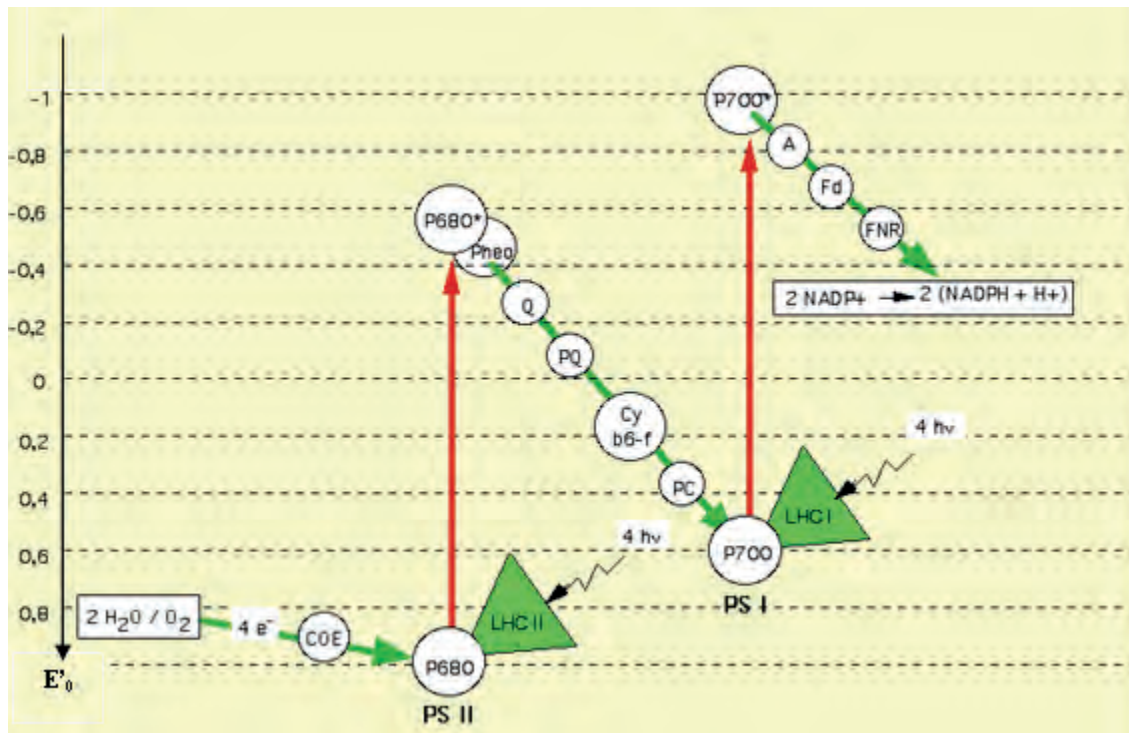


Source : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Chlorophylle>



Document 4

Schéma "en Z" de la photosynthèse, transfert acyclique des électrons.



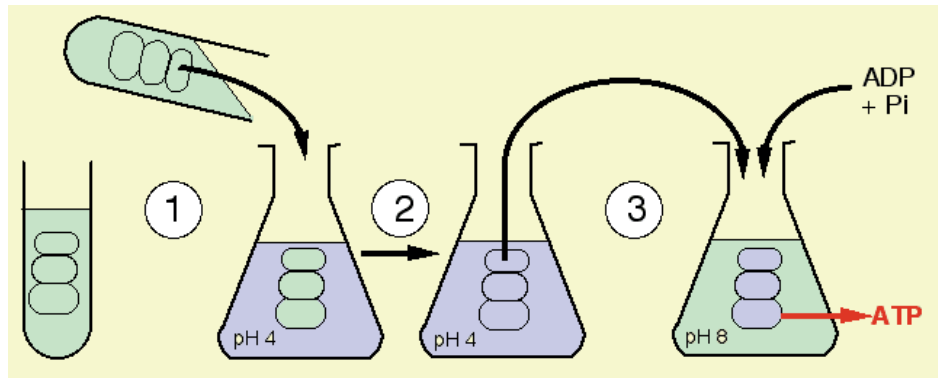
Source : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/image/Z1.gif>

PSI et PSII sont les photosystèmes I et II qui contiennent chacun une molécule de chlorophylle comme centre réactionnel.

Les LHC (light harvesting complex) sont des ensembles de pigments et de protéines qui collectent l'énergie lumineuse pour la distribuer aux centres réactionnels des photosystèmes.

Document 5

5.a Expérience de Jagendorf et Uribe (1966)



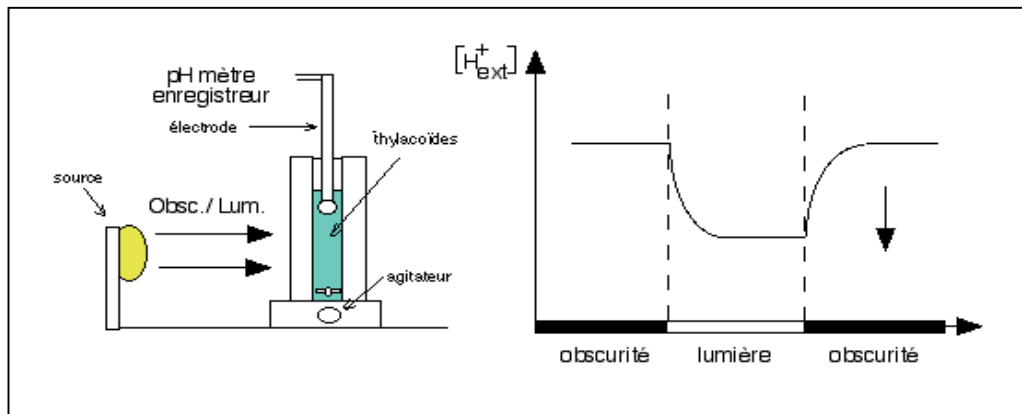
A partir d'une suspension de chloroplastes, les chloroplastes sont cassés (par choc osmotique par exemple) et les thylacoïdes sont isolés par centrifugation (le stroma a été éliminé). L'ensemble de l'expérience est effectué à l'obscurité.

- 1 - cette suspension est placée dans un milieu acide tamponné à pH 4,
- 2 - après quelques minutes, le pH des thylacoïdes s'est équilibré avec celui du milieu,
- 3 - on transfère alors les thylacoïdes dans un milieu basique tamponné à pH 8 en présence d'ADP, de phosphate inorganique (Pi) et de magnésium (Mg^{2+}).

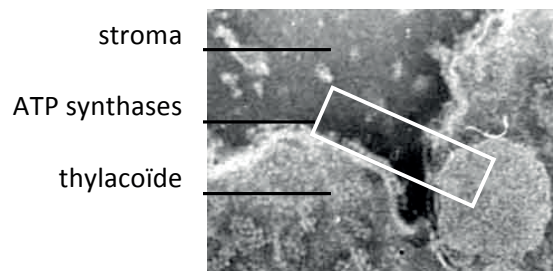
Résultat : un dosage d'ATP dans le milieu de suspension montre qu'il y a eu **synthèse d'ATP**.

5.b Mesure de la concentration en protons dans la suspension de thylacoïdes

Le dispositif de mesure (à gauche) permet l'enregistrement des variations de concentration en protons dans le milieu de suspension des thylacoïdes lors de transitions obscurité / lumière (à droite).



5.c Thylacoïdes en coloration négative observés en microscopie électronique à transmission

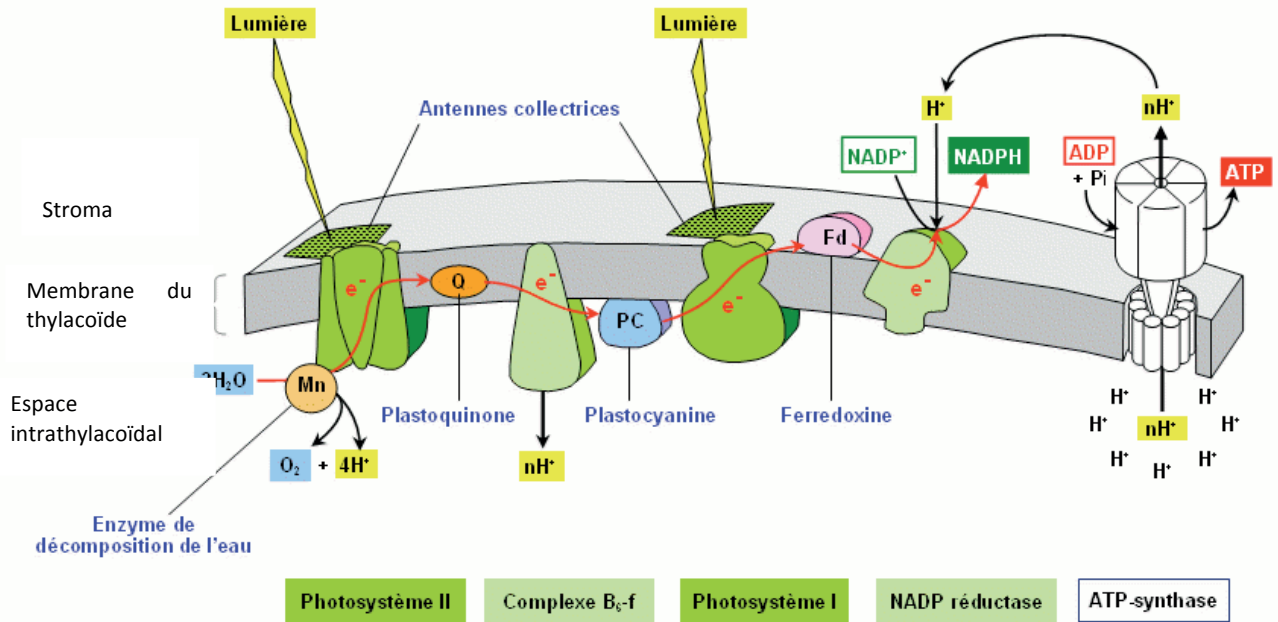


(Cliché : Marcel Signol).

Source : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/chloneg.htm>

Document 6

Transferts d'électrons et de protons au niveau de la membrane du thylacoïde



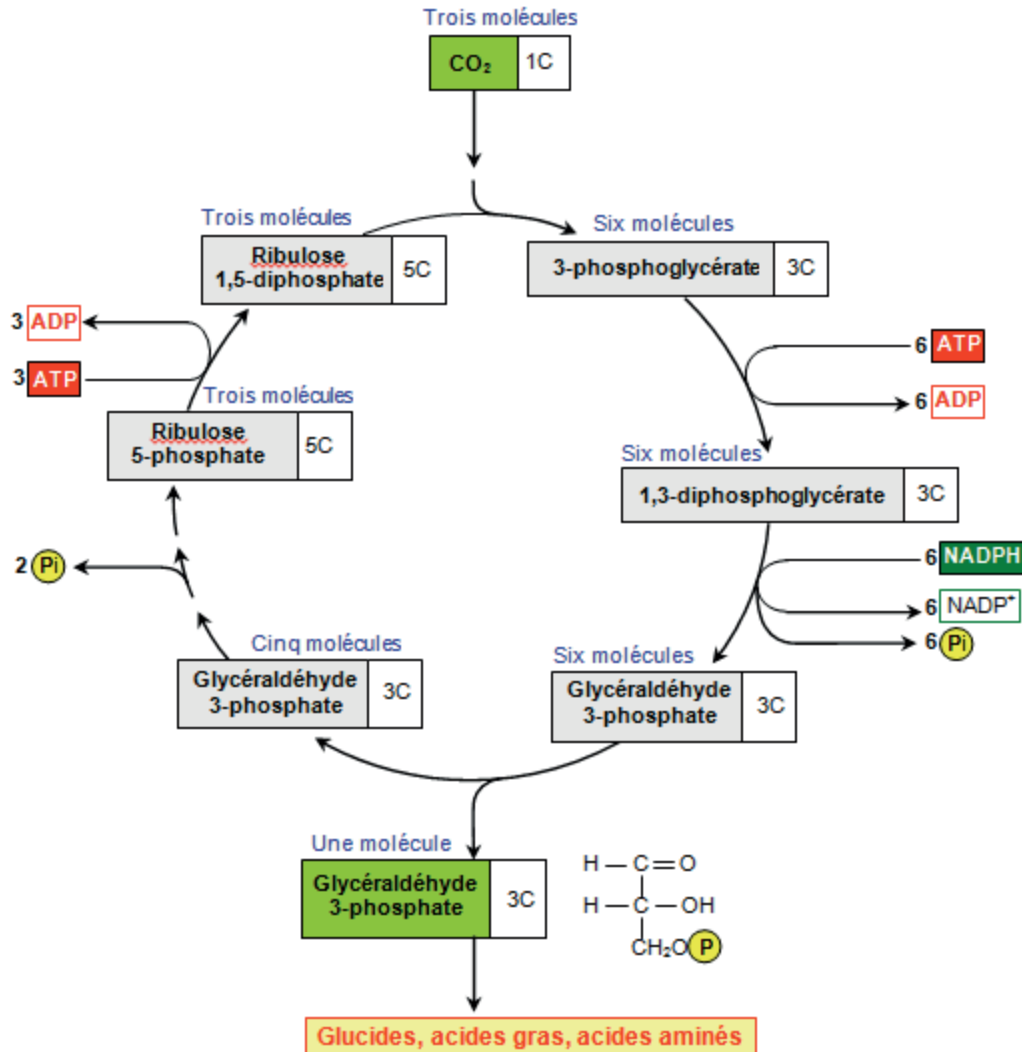
Remarques :

- La plastoquinone (Q) ressemble fortement à l'ubiquinone de la mitochondrie.
- Les ATP-synthases et les autres complexes macromoléculaires enchâssés dans la bicouche lipidique particulièrement fluide en raison de sa teneur élevée en acide gras insaturés se déplacent les uns par rapport aux autres. En conséquent, l'image linéaire et ordonnée du transfert d'électrons que laisse supposer le **schéma en « Z »** proposé par R. Hill et F. Bendall en 1960 **doit être corrigé** (voir le modèle de D. Arnon : Photosynthesis research 1995 ; 46 : 47 - 71).

Source : http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/affiche_image.php3?id_document=2923

Document 7

Cycle de fixation du CO₂ dans la photosynthèse : cycle de Calvin (version simplifiée)



Source : http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/affiche_image.php3?id_document=2880

Document 8

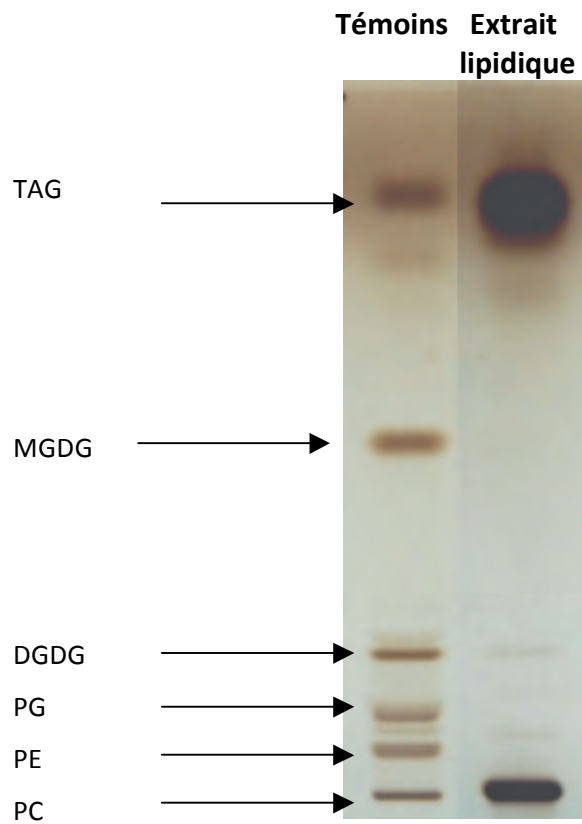
Protocole opératoire de l'extraction des lipides totaux des cellules *C. reinhardtii*

Un protocole d'extraction a été décrit par Zhu et al. (2002). Il s'agit d'une modification de la méthode d'extraction par voie humide de Bligh et Dyer (1959). Les cellules sont récoltées par **centrifugation à 8500 tr/min pendant 5 min** et lavées une fois avec de l'eau distillée. Après séchage, les échantillons sont broyés dans un mortier et extraits par un mélange de chloroforme : méthanol (**2:1, v/v**). Après agitation mécanique de l'échantillon pendant 5 h et des ultrasons pendant 30 min, les échantillons sont centrifugés à 3000 tr / min pendant 10 min. La phase solide est séparée avec soin en utilisant un papier filtre. La phase solvant est évaporée dans un évaporateur rotatif sous vide à 60°C. La procédure est répétée trois fois jusqu'à ce que la totalité des lipides soit extraite.

Source : <http://www.ensaia.inpl-nancy.fr/marie/web/ntic/pages/2009/rapport05.pdf>






Document 9

Séparation des lipides totaux de *C. reinhardtii* par chromatographie sur couche mince



TAG : Triacylglycerol ;
MGDG : Monogalactosyldiacylglycerol ;
DGDG : Digalactosyldiacylglycerol ;
PG : Phosphatidylglycerol ;
PE : Phosphatidylethanolamine ;
PC : Phosphatidylcholine.



Document 10

Réactifs révélateur	Classement SGH (Sécurité)				
Chlorure de manganèse et méthanol en milieu sulfurique					
	SGH 02	SGH 05	SGH 06	SGH 07	SGH 08

Document 11

<i>Danger Physique</i>	
Pictogramme	Danger
 SGH 01	<p>Produits explosifs</p> <p>Ces produits peuvent exploser au contact d'une flamme, d'une étincelle, d'électricité statique, sous l'effet de la chaleur, d'un choc, de frottements, ...</p>
 SGH 02	<p>Produits inflammables</p> <p>Ces produits peuvent s'enflammer, suivant le cas :</p> <ul style="list-style-type: none"> - au contact d'une flamme, d'une étincelle, d'électricité statique, ... ; - sous l'effet de la chaleur, de frottements, ... ; - au contact de l'air ; - au contact de l'eau, s'ils dégagent des gaz inflammables (certains gaz s'enflamment spontanément, d'autres au contact d'une source d'énergie : flamme, étincelle, ...).
 SGH 03	<p>Produits comburants</p> <p>Ces produits peuvent provoquer ou aggraver un incendie, ou même provoquer une explosion s'ils sont en présence de produits inflammables.</p>
 SGH 04	<p>Gaz comprimés</p> <p>Ces produits sont des gaz sous pression contenus dans un récipient. Certains peuvent exploser sous l'effet de la chaleur ; il s'agit des gaz comprimés, des gaz liquéfiés et des gaz dissous. Les gaz liquéfiés réfrigérés peuvent, quant à eux, être responsables de brûlures ou de blessures liées au froid appelées brûlures et blessures cryogéniques.</p>
 SGH 05	<p>Produits corrosifs pour les métaux</p> <p>Ces produits attaquent ou détruisent les métaux.</p> <p><i>SGH 05 représente à la fois un danger physique et un danger pour la santé</i></p>

Danger chimique

Pictogramme	Danger
 SGH 05	<p>Produits corrosifs pour la peau et/ou les yeux</p> <p>Ces produits peuvent ronger la peau et/ou les yeux en cas de contact ou de projection.</p> <p>SGH 05 représente à la fois un danger physique et un danger pour la santé</p>
 SGH 06	<p>Produits toxiques (toxicité aiguë)</p> <p>Ces produits empoisonnent rapidement, même à faible dose. Ils peuvent provoquer des effets très variés sur l'organisme : nausées, vomissements, maux de tête, perte de connaissance ou d'autres troubles plus importants entraînant la mort.</p>
 SGH 07	<p>Produits altérant la santé</p> <p>Ces produits chimiques ont un ou plusieurs des effets suivants :</p> <ul style="list-style-type: none">- ils empoisonnent à forte dose ;- ils sont irritants pour les yeux, la gorge, le nez ou la peau ;- ils peuvent provoquer des allergies cutanées (eczémas) ;- ils peuvent provoquer une somnolence ou des vertiges.
 SGH 08	<p>Produits portant gravement atteinte à la santé (CMR, STOT, Danger par aspiration)</p> <p>CMR : Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique STOT : Toxicité spécifique pour certains organes cibles.</p> <p>Ces produits rentrent dans une ou plusieurs de ces catégories :</p> <ul style="list-style-type: none">- produits cancérogènes : ils peuvent provoquer le cancer ;- produits mutagènes : ils peuvent modifier l'ADN des cellules et peuvent alors entraîner des dommages sur la personne exposée ou sur sa descendance (enfants, petits-enfants, ...) ;- produits toxiques pour la reproduction : ils peuvent avoir des effets néfastes sur la fonction sexuelle, diminuer la fertilité ou provoquer la mort du fœtus ou des malformations chez l'enfant à naître ;- produits qui peuvent modifier le fonctionnement de certains organes comme le foie, le système nerveux, ... Selon les produits, ces effets toxiques apparaissent si l'on a été exposé une seule fois ou bien à plusieurs reprises ;- produits qui peuvent entraîner de graves effets sur les poumons et qui peuvent être mortels s'ils pénètrent dans les voies respiratoires (après être passés par la bouche ou le nez ou bien lorsqu'on les vomit) ;- produits qui peuvent provoquer des allergies respiratoires (asthme, par exemple).
Danger pour l'Environnement	
Pictogramme	Danger
 SGH 09	<p>Danger pour le milieu aquatique</p> <p>Ces produits provoquent des effets néfastes sur les organismes du milieu aquatique (poissons, crustacés, algues, autres plantes aquatiques, ...).</p>

Document 12

La Rubisco d'après UC Davis - University of California - Ressources

The limiting reaction within the Calvin Cycle is carried out by the enzyme Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase, commonly referred as Rubisco (figure 1).

This enzyme was discovered by Melvin Calvin at Berkeley in the 1940's. Rubisco has since been named as the most abundant protein on earth.

The enzyme is located in the chloroplasts' stroma, consisting of at least 15% and up to 50% of the chloroplast protein. The high concentration of Rubisco indicates a significant role for the metabolism. It is estimated that $4 \cdot 10^{10}$ kg of the enzyme is made every second on earth.

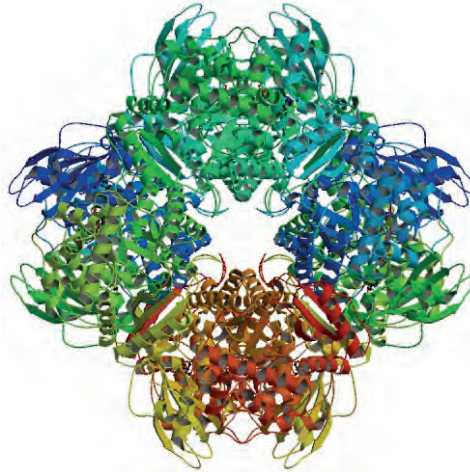


Figure 1. Crystal structure ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Source: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1IR1>

Rubisco's shape directly relates to its function. In order for Rubisco to function, it requires substrates supplied from the surrounding environment. These include carbon dioxide and Ribulose 1,5 bisphosphate (RuBP).

The enzyme will perform a conformation change and essentially 'slam' the Carbon dioxide onto RuBP. The result is a highly unstable six-carbon reaction intermediate

Due to the molecules instability the carbon splits into two molecules of 3-phosphoglycerate (3GP). In the Calvin Cycle each of the 3GP molecules will be synthesized into Glyceraldehyde 3-phosphate (G3P).

In the analysis of the active site within Rubisco it has been studied that there is the involvement of Mg^{2+} . This alkaline earth metal stabilizes formation of an enediolate carbanion equivalent that is subsequently carboxylated by CO_2 , as shown in figure 2. This conformation change, as shown in studies, activates a broadband of visible and infrared emissions. Once in stable formation Mg^{2+} , although not well depicted in figure 2, will form covalent bonds with four Oxygen atoms. This formation can be described as square planar when considering only the immediate ligands around Mg^{2+} .

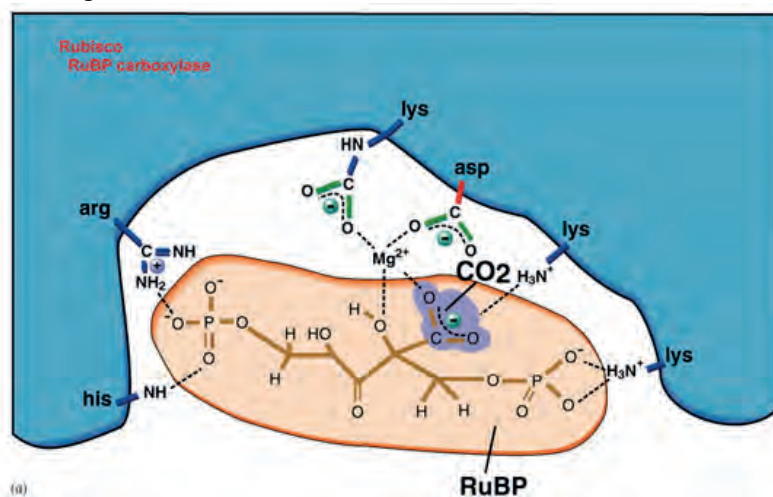


Figure 2: Active site of the Rubisco (From UC Davis - University of California - Ressources)

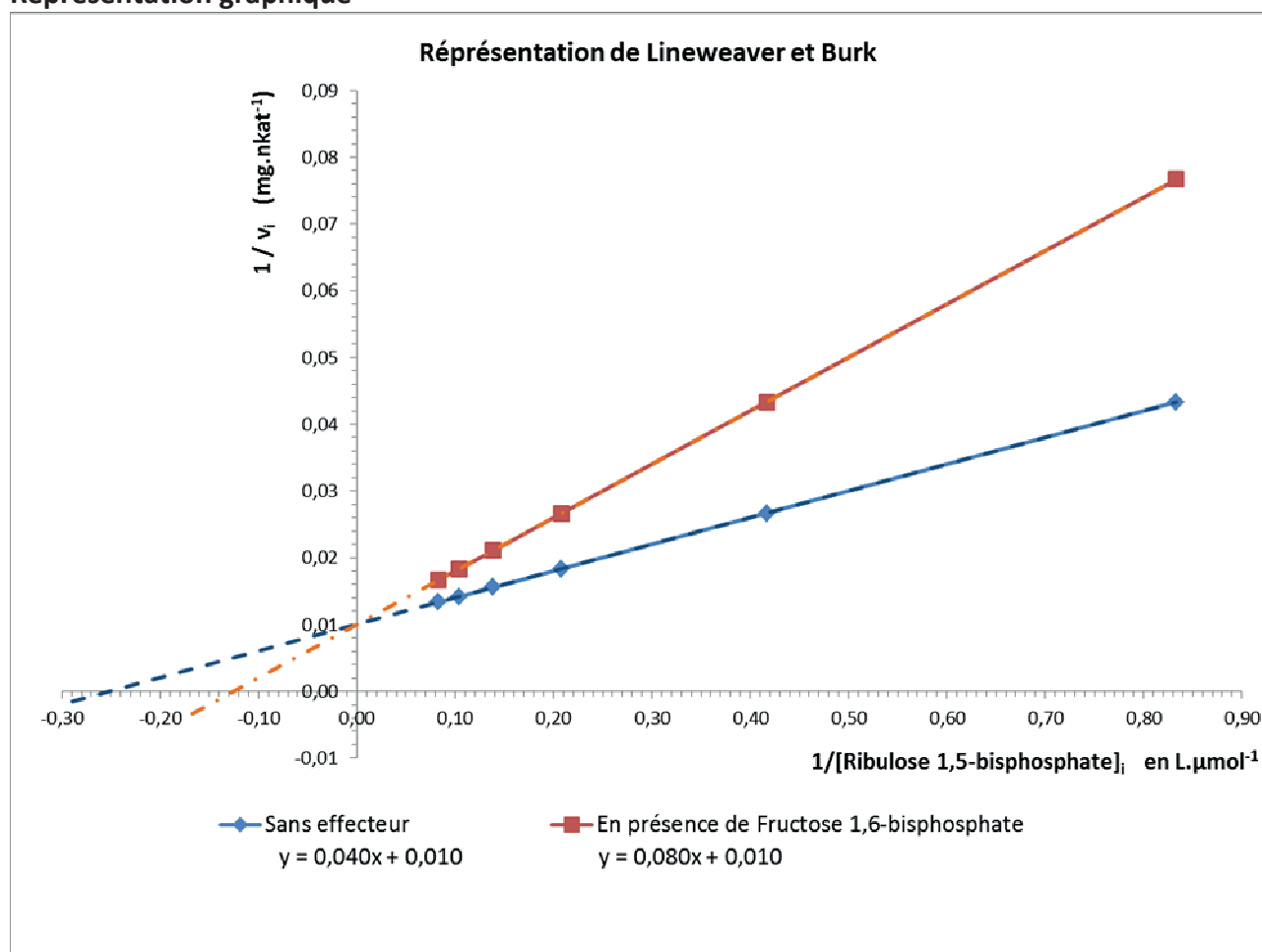
Document 13

Détermination des grandeurs cinétiques de la Rubisco

Résultats d'une étude expérimentale

[Ribulose 1,5-bisphosphate] ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	0,0	1,2	2,4	4,8	7,2	9,6	12,0	24,0	32,0
v_i sans effecteur (nkat.mg^{-1})	0,0	23,1	37,5	54,5	64,3	70,6	75,0	81,0	81,0
v_i en présence de Fructose 1,6-bisphosphate (nkat.mg^{-1})	0,0	13,0	23,1	37,5	47,4	54,5	60,0	66,0	66,0

Représentation graphique



Rappel :

La représentation de Lineweaver et Burk (ou représentation des doubles inverses), a pour

équation :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{v_{(c,S) \text{imax}}} \cdot \frac{1}{[\text{Ribulose 1,5 bisphosphate}]_i} + \frac{1}{v_{(c,S) \text{imax}}}$$

Document 14

Composition du milieu de culture Tris – Acétate – Phosphate avec azote (TAP+N)

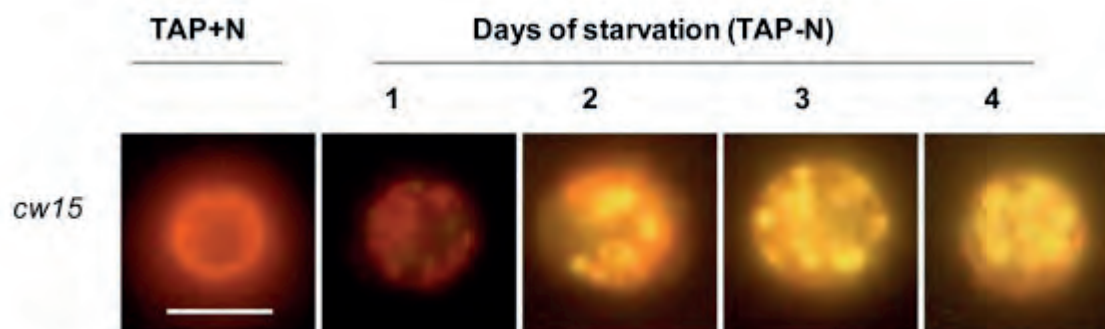
Le milieu de culture est réalisé à partir des solutions mères suivantes :

- **Solution A** (pour 1 L) : NH_4Cl 8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1 g.
- **Tris 0,2 M** (pour 1 L) : $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 24,2 g, ajuster le pH à 7,0 à l'aide d'acide acétique glacial.
- **Tampon II** (pour 100 mL) : K_2HPO_4 9,35 g, KH_2PO_4 6,3 g, ajuster le pH à 7,0.
- **Solution minérale** (pour un litre) : EDTA 50 g, H_3BO_3 11,4 g, ZnSO_4 22 g, MnCl_2 5,06 g, FeSO_4 4,9 g, CoCl_2 1,61 g, CuSO_4 1,57 g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 1,1 g.

Composition en solutions mères pour 1L de milieu TAP+N	Volumes
Tris	100 mL
Solution A	50 mL
Tampon II	1 mL
Solution minérale	1 mL
pH ajusté à 7	

Document 15

Détection de l'accumulation de lipides neutres dans les cellules d'une souche commune de *Chlamydomonas reinhardtii* (cw15)



Detection of neutral lipid accumulation in cw15, a common laboratory strain of *C. reinhardtii* using Nile red staining.

The yellow fluorescence observed in the presence of Nile red indicates the presence of neutral lipids while the red fluorescence corresponds to chlorophyll autofluorescence.

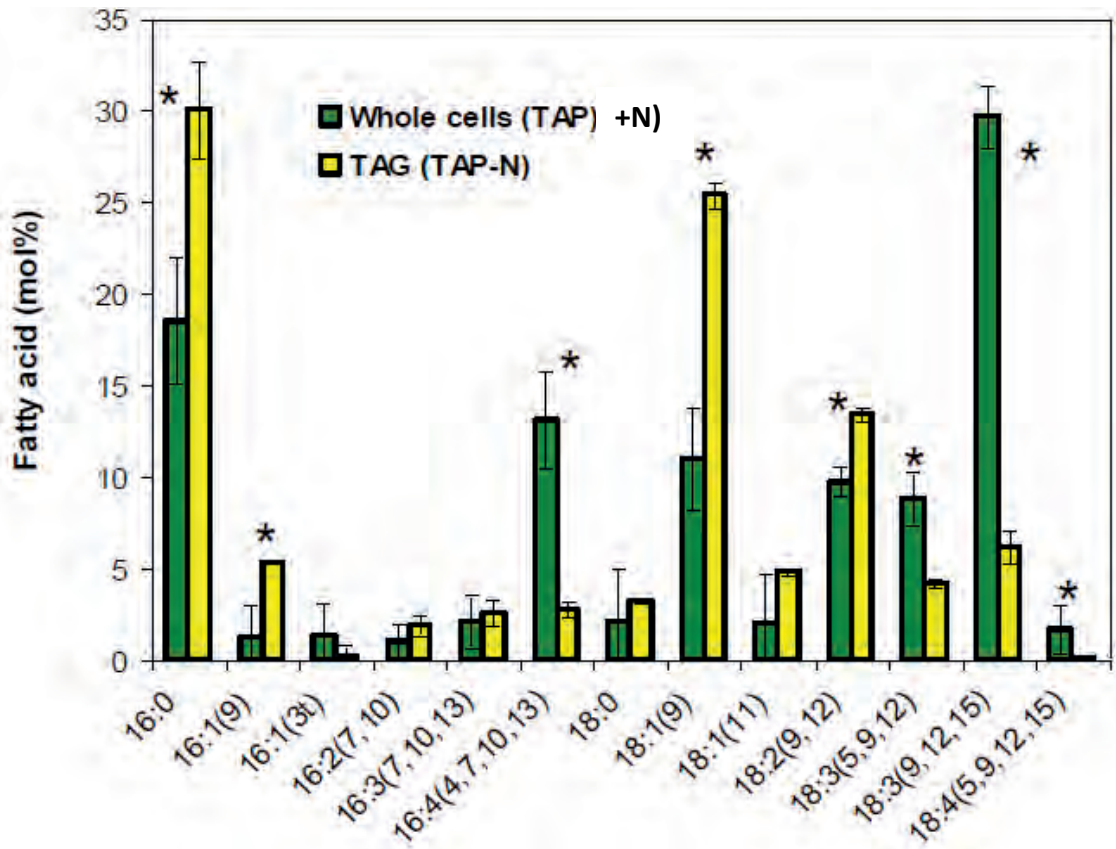
TAP+N : standard growth medium. TAP-N : nitrogen-depleted TAP medium. Bars = 8 μm .

Source : Siaut M. (2011) *BMC Biotechnology*

Document 16

Analyse de la composition en acides gras de *C. reinhardtii*

16. a Analyse de la composition en acides gras de *C. reinhardtii* :



Analysis of fatty acid composition in *C. reinhardtii*. Comparison of the fatty acid composition of the TAG fraction and total lipids. The TAG fraction was isolated from cells cultivated in TAP-N for 2 days while total lipids were from cells grown in TAP+N medium. Asterisks denote a statistically significant difference.

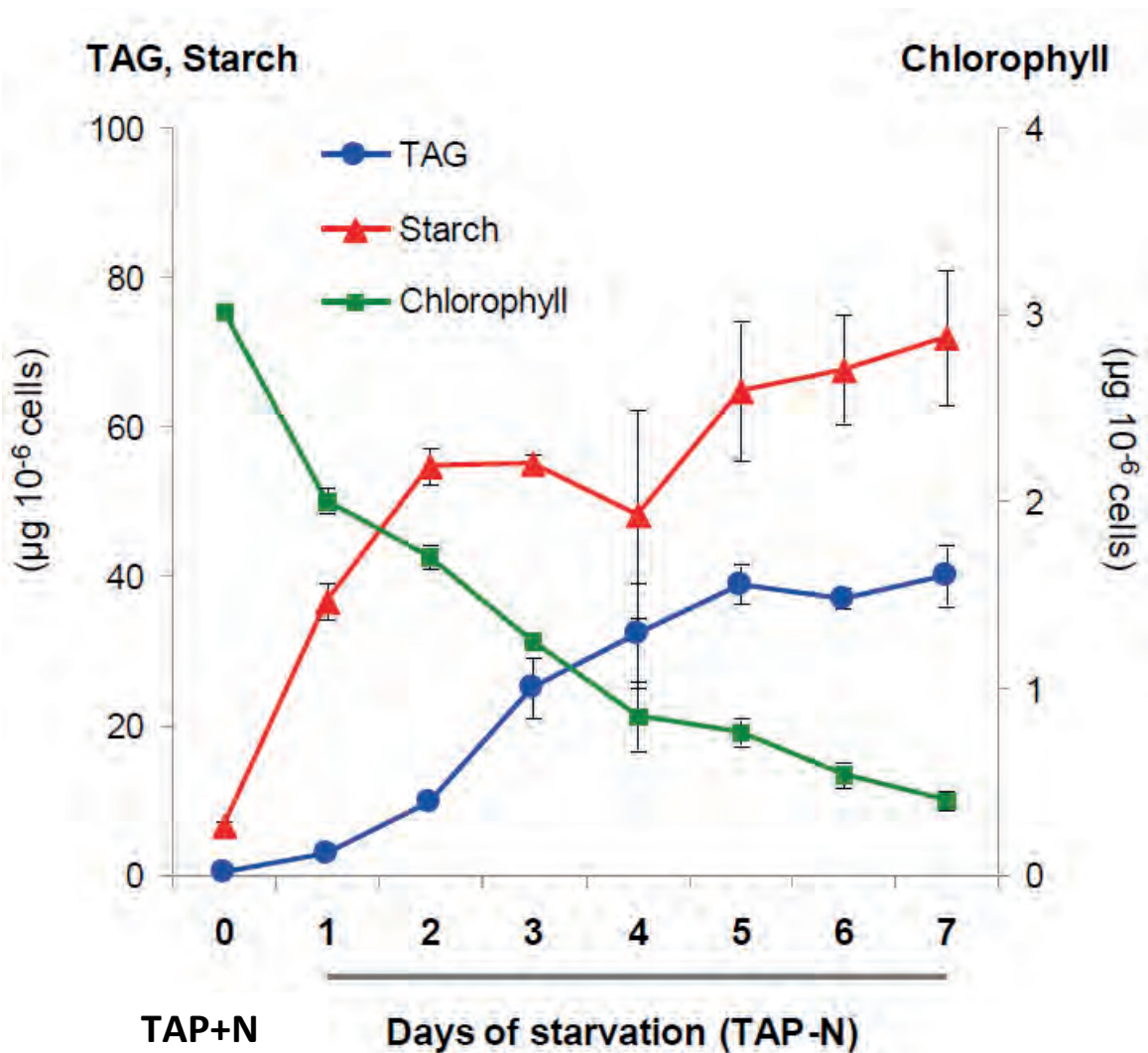
Source : Siaut M.(2011) *BMC Biotechnology*.

16. b Noms systématique et commun des acides gras cités dans le document 16. a :

Symbole	Nom systématique	Nom commun connu	Symbole	Nom systématique	Nom commun connu
16:0	Acide hexadécanoïque	Acide palmitique	18:0	Acide octadécanoïque	Acide stéarique
16:1 (9)	Acide hexadéc-9-énoïque	Acide palmitoléique	18:1 (9)	Acide octadéc-9-énoïque	Acide oléique
16 :1 (3t)	Acide 3-trans-hexadécénoïque		18:1 (11)	Acide octadéc-11-énoïque	Acide vaccénique
16:2 (7,10)	Acide hexadéc-7, 10-diénoïque		18:2 (9, 12)	Acide octadéca-9, 12-diénoïque	Acide linoléique
16:3 (7, 10, 13)	Acide hexadéc-7, 10, 13		18:3 (5, 9, 12)	Acide octadéca-5, 9, 12-triénoïque	Acide pinolénique
16:4 (4, 7, 10, 13)	Acide hexadéc-4, 7, 10, 13-tétraénoïque		18:3 (9, 12, 15)	Acide octadéca-9, 12, 15-triénoïque	Acide α -linoléique
			18:4 (5, 9, 12, 15)	Acide octadéca-5,9, 12, 15-tétraénoïque	Acide conféronique

Document 17

Cinétique d'évolution des réserves en amidon (starch), TAG et chlorophylle dans les cellules de *C. reinhardtii* cultivées sur le milieu TAP-N



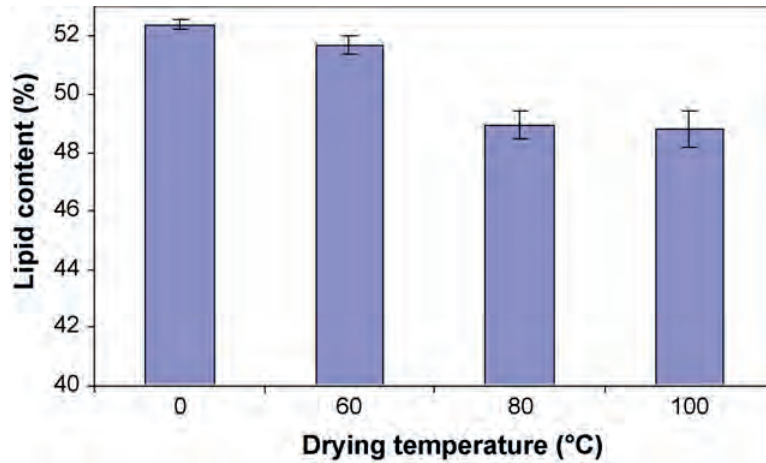
Time course of accumulation of triacylglycerols, starch and chlorophyll in *C. reinhardtii* in response to nitrogen depletion. Precultures of strain *cw15* were grown in TAP+N medium for 2 days before changing medium to TAP-N (day 0).

Source : Saut M.(2011) *BMC Biotechnology*.

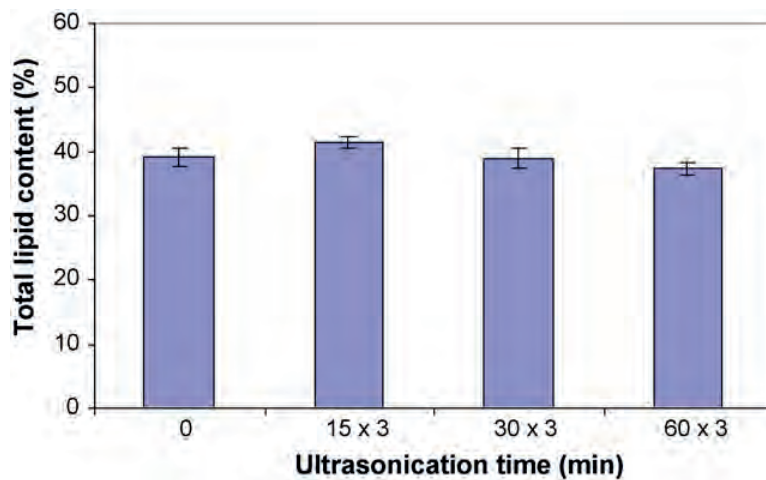
Document 18

Etude des conditions opératoires d'extraction des lipides de la micro-algue *Chlorella vulgaris*.

18. a Effet de la température de séchage des échantillons sur le rendement en lipides :



18 b Effet du temps de traitement des échantillons aux ultrasons sur le rendement en lipides :

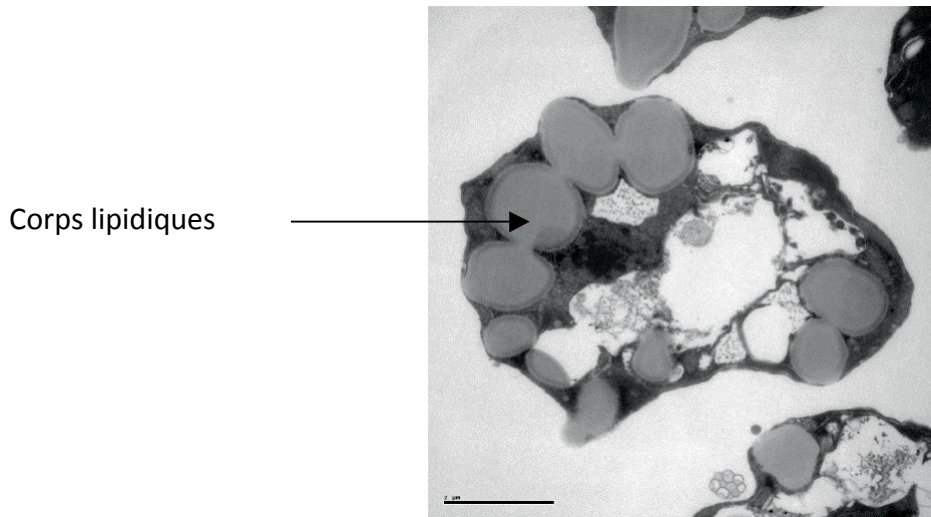


Source : Widjaja and coll. (2008) *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers*.

Document 19

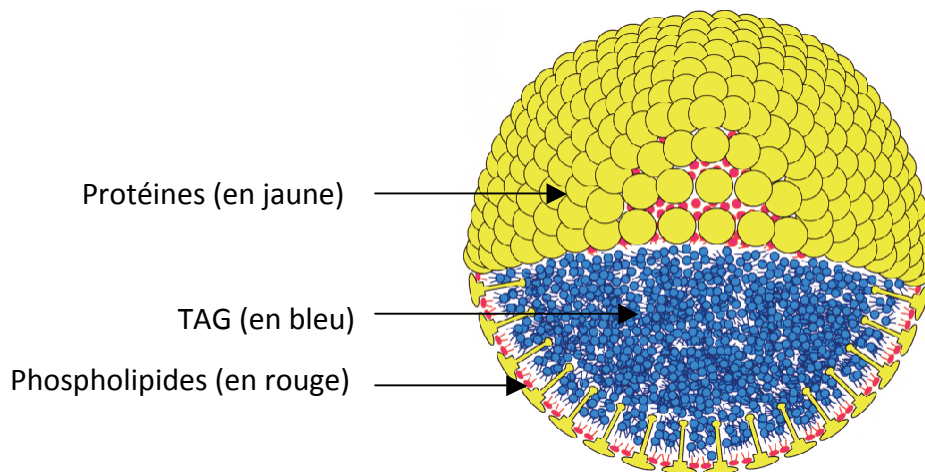
Localisation des TAG de réserve dans les corps lipidiques

19.a Image of *Chlamydomonas reinhardtii*



Source : Siaut M. (2011) BMC Biotechnology.

19.b Modèle structural d'un corps lipidique



Source : Tzen and Huang (1993) JBC.

Document 20

Fractionnement des protéines cellulaires de *C. reinhardtii* et identification de la MLDP associée aux corps lipidiques

20. a Protocole opératoire :

1) Extraction des protéines cellulaires :

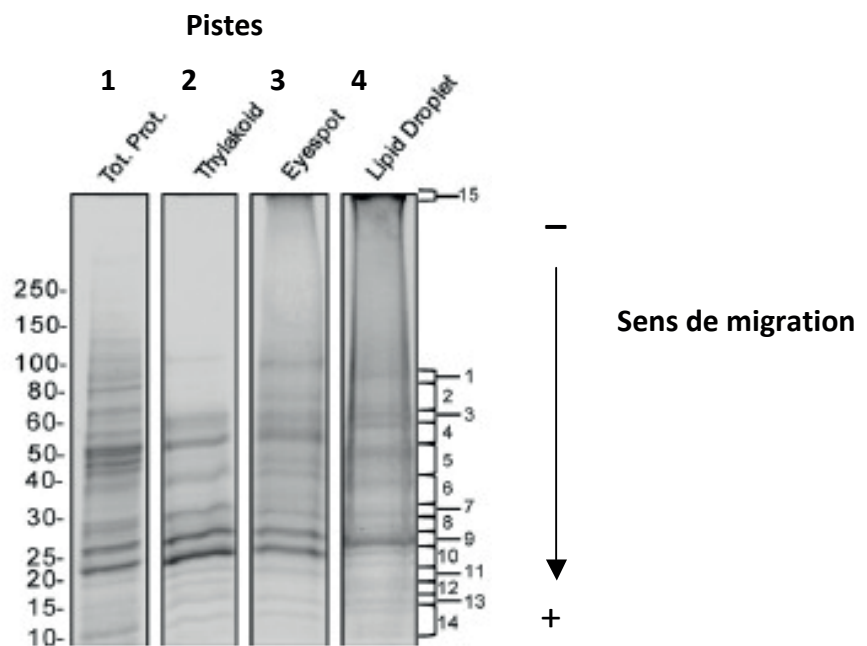
- de la cellule entière (Tot. Prot.) ;
- des thylacoïdes (Thylakoïd) ;
- des pyrénoides (Eyespot) ;
- des corps lipidiques (Lipid Droplet).

2) Dépôt sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Les extraits obtenus dans l'étape 1 sont déposés respectivement pistes 1, 2, 3 et 4.

2) Migration électrophorétique

3) Révélation

20. b Résultats :



Les masses moléculaires des protéines sont indiquées sur la gauche de la figure en Kilodalton.

Les numéros placés à droite correspondent aux bandes d'intérêt excisées de la piste 4 du gel pour une étude plus approfondie.

Source : Moellering (2009) *Eucaryotic cell*

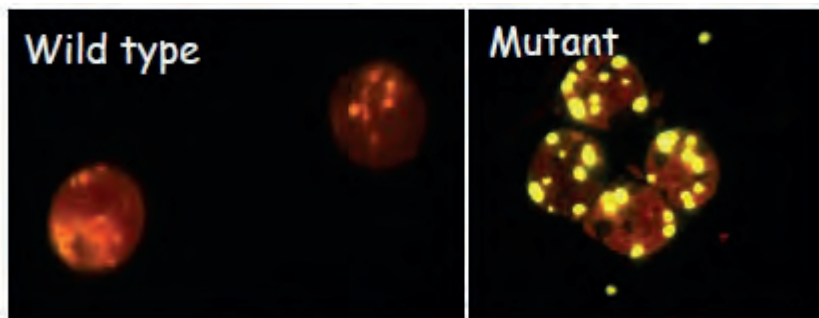
Document 21

Mise en évidence d'une accumulation de lipides chez un mutant de *C. reinhardtii* cultivé en conditions de croissance normales

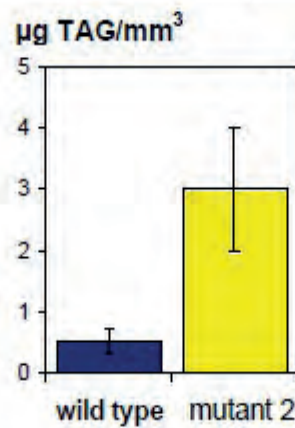
21. a Micrographies des cellules de *C. reinhardtii* colorées au rouge de Nile

Wild type = cellules sauvages de *C. reinhardtii*

Mutant = cellules obtenues par mutation

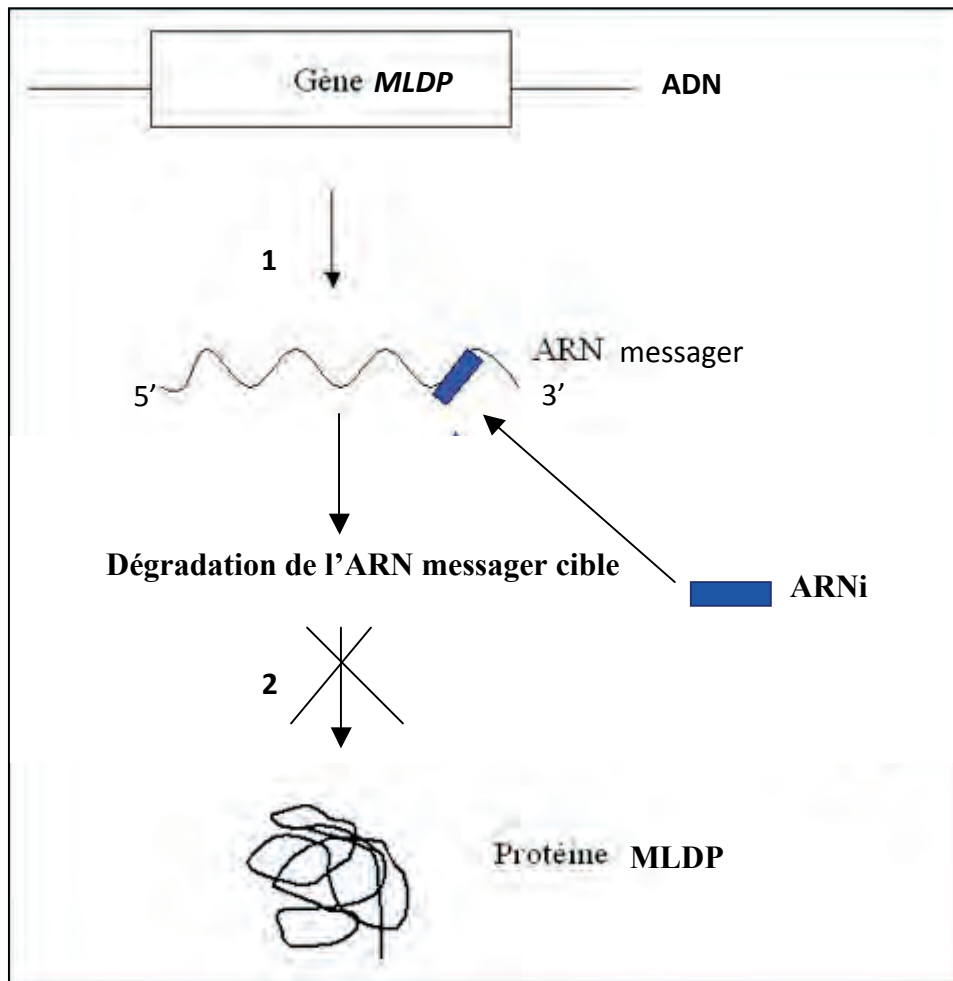


21. b Oil content



Source : Beisson (2012)

Document 22
Principe de l'interférence par ARN

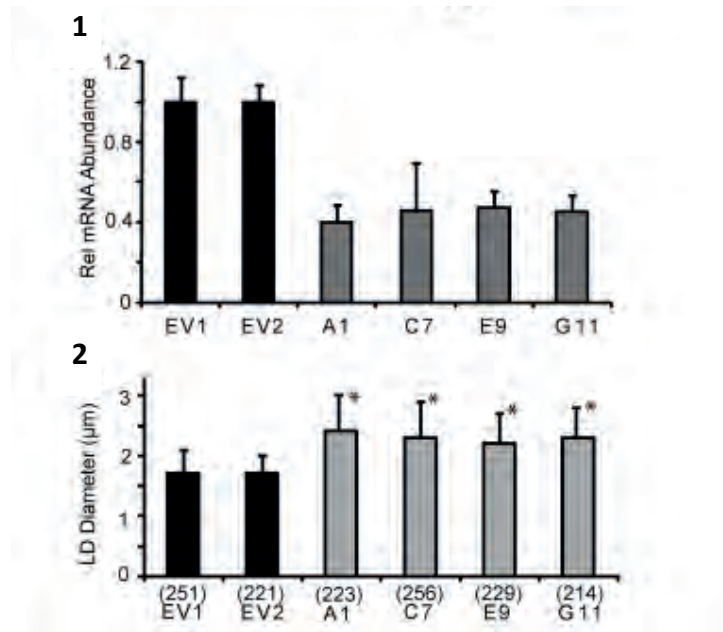


ARNi = ARN interférant

Source : <http://www.sidablog.fr/articles/3/nouveau-traitement-arn-interferences-contre-vih.php>

Document 23

Réduction de l'expression de la protéine MLDP par la méthode d'interférence par ARN



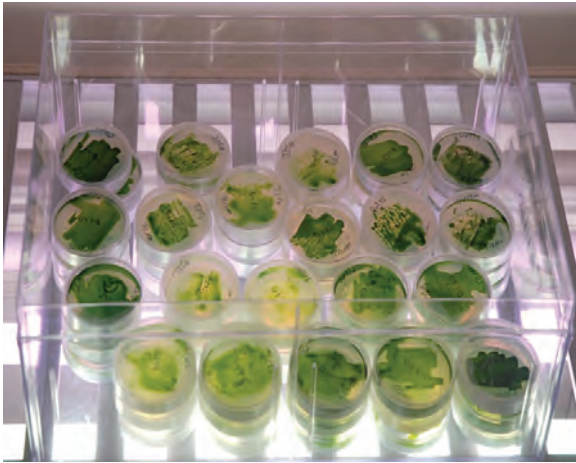
1 : Niveaux d'ARN messager dans deux lignées de cellules de *C. reinhardtii* contrôles (EV1 et EV2) et dans quatre lignées de cellules modifiées grâce à l'interférence par ARN (A1, C7, E9 et G11).

2 : Diamètre des corps lipidiques mesuré pour ces mêmes lignées contrôles et modifiées.

Source : Moellering (2010) *Eucaryotic cell*.

Document 24

24a : Culture en boîte

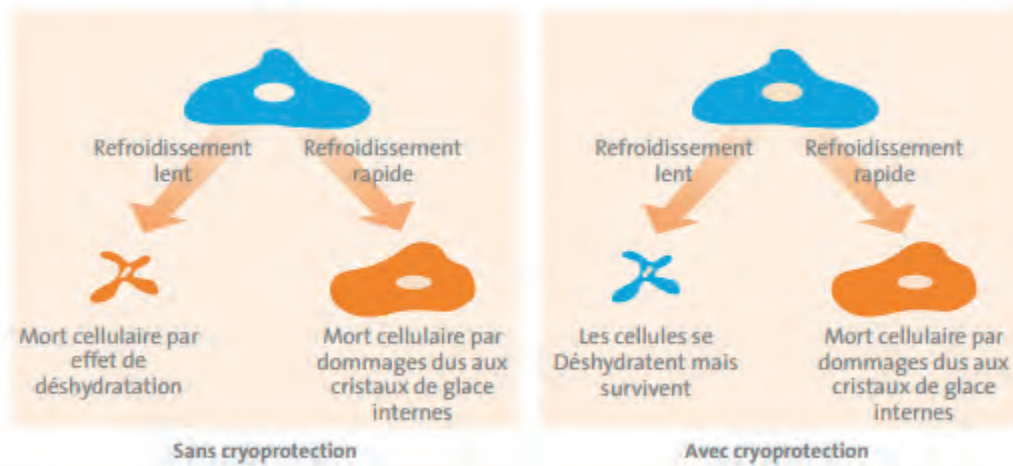


24b : Conservation en cryotubes



Source : <http://www.biosolis.org/ingenierie-des-photobio.html>

24c : Effets des vitesses de congélation sur les cellules

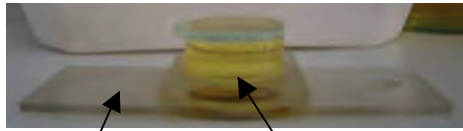


Source : http://www.labcluster.com/images/Cryoconservation_Corning.pdf

Document 25
Système de dénombrement des microalgues

Présentation de la technique :

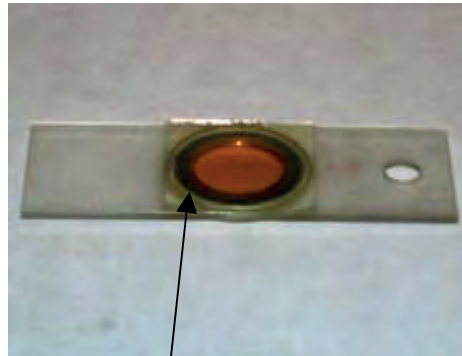
Sédimentation



Plaque Wild

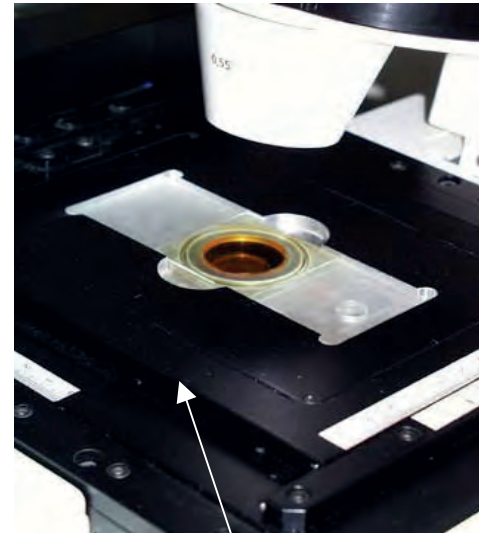
Tube de sédimentation de 25 mL

Montage de la lame



Lamelle de verre

Observation et dénombrement



Microscope inversé X40

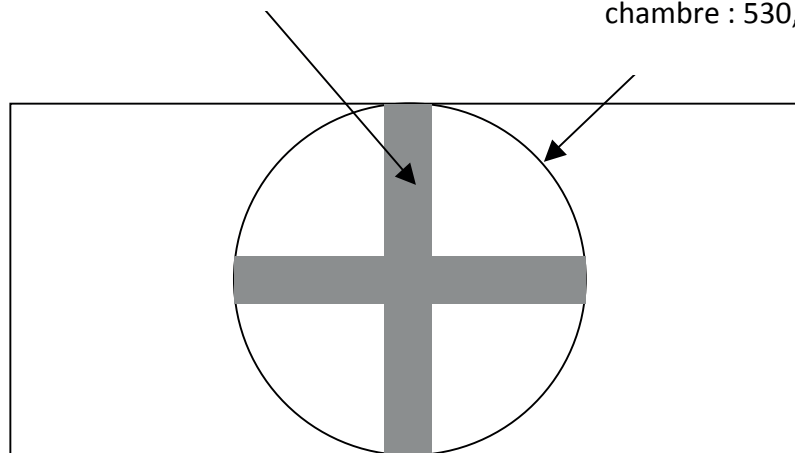
J.C. DRUART et F. RIMET. Protocoles d'analyse du phytoplancton de l'INRA : prélèvement, dénombrement et biovolumes. INRA-Thonon, Rapport SHL 283 - 2008, 96 p.

Détails de la plaque Wild :

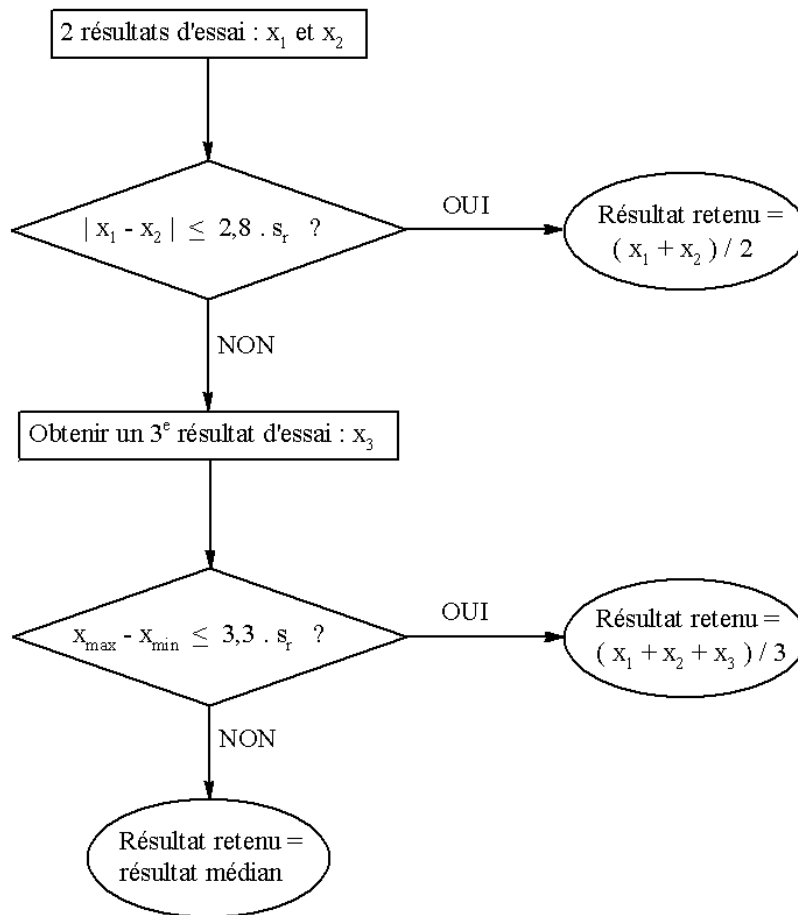


Surface de comptage : 1,70 mm²

Surface entière de la chambre : 530,66 mm²



Document 26
Logigramme d'acceptabilité des résultats

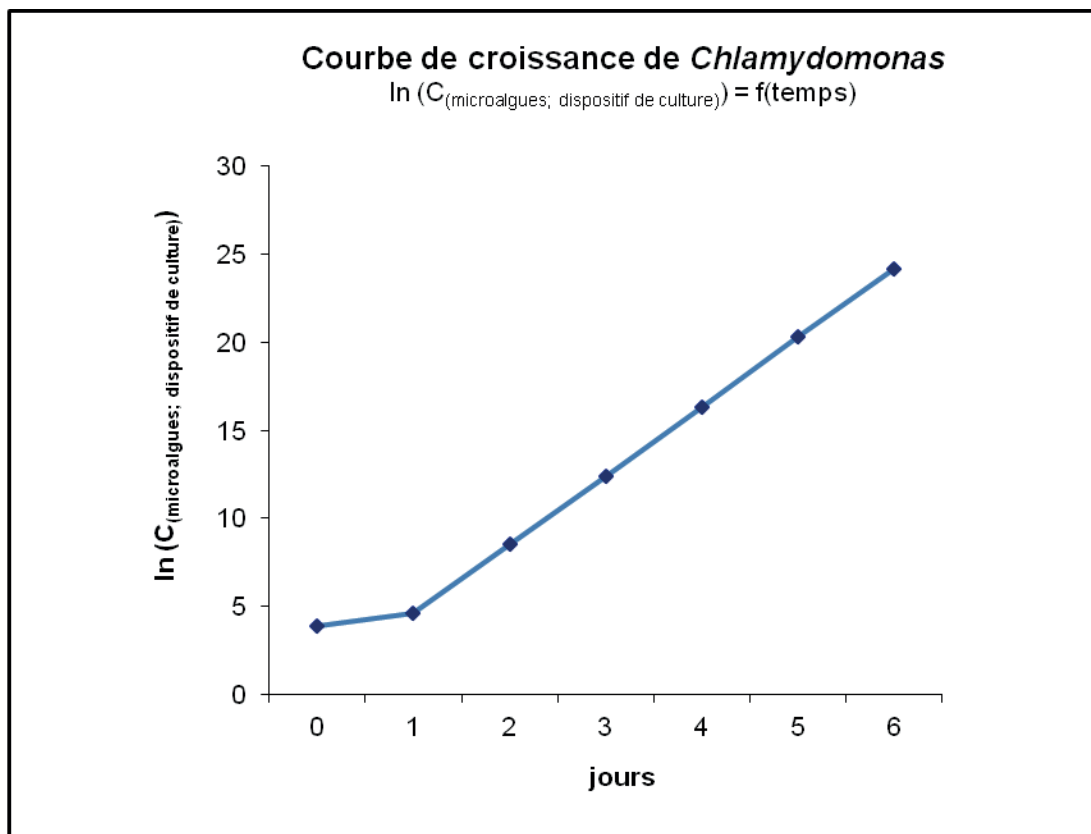


Source : Norme ISO 5725

Document 27

Résultats du dénombrement pour la réalisation de la courbe de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*

Jour	0	1	2	3	4	5	6
C (microalgues ; dispositif de culture)	50	100	$5,00 \cdot 10^3$	$2,50 \cdot 10^5$	$1,25 \cdot 10^7$	$6,25 \cdot 10^8$	$3,12 \cdot 10^{10}$
$\ln(C$ (microalgues ; dispositif de culture))	3,91	4,61	8,52	12,4	16,3	20,3	24,2



Document 28

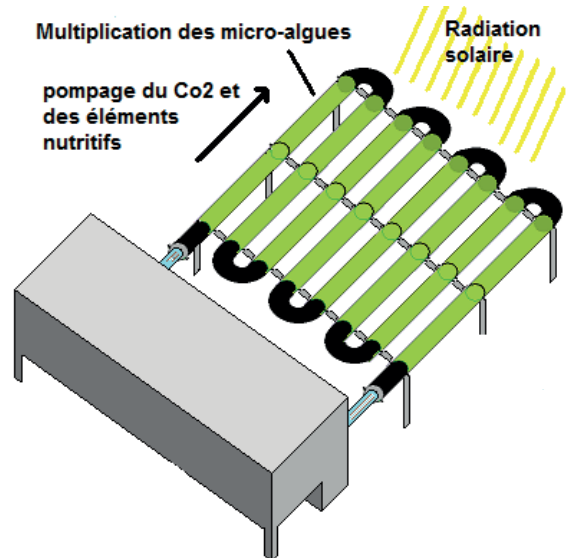
Culture en photobioréacteur

28 a : Photo de photobioréacteur



Source :
http://www.hielscher.com/fr/algae_reactor_cleaning_01.htm

28 b : Schéma de photobioréacteur



Diamètre des tubes : 5 cm
Longueur des tubes : 80 m
Nombre des tubes : 8

Source :
<http://sitiosolar.com/SITIOSOLAR%20EN%20FRANCES/Les%20biocombustibles%20de%20microalgues.htm>

28 c : Protocole d'ensemencement du photobioréacteur

- Préculture au laboratoire dans un réacteur contenant le même milieu de culture que celui du photobioréacteur
- Transfert de la totalité de la préculture dans la cuve du photobioréacteur, soit un inoculum de 10^6 microalgues en phase exponentielle de croissance
- Incubation pendant un temps t nécessaire pour obtenir une population de $5,00 \cdot 10^5$ microalgues.mL⁻¹.

Document 29

Dispositifs de culture industrielle des microalgues

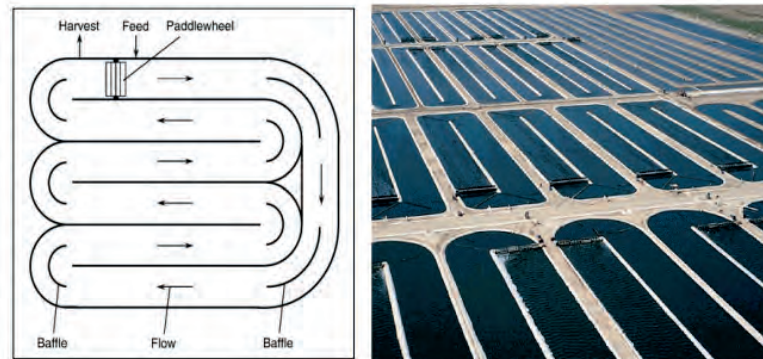
Le procédé « raceway » (champ de course) : un exemple de système solaire ouvert

C'est une culture réalisée en extérieur dans un bassin en forme de boucle. C'est donc une culture saisonnière puisque soumise aux aléas climatiques et non protégée des contaminations, à moins de cultiver des espèces extrémophiles en milieu alcalin ou hypersalé.

La culture d'algues circule dans le bassin sous l'action d'une roue à pales qui assure le brassage et évite la sédimentation des algues.

La source de CO₂ est atmosphérique, la source de lumière est naturelle. De l'eau filtrée, additionnée d'éléments minéraux est additionnée en continu afin de pallier l'effet d'évaporation.

La taille des bassins est variable : de 0,5 à 10⁵ m³, la concentration en biomasse atteint 0,1 à 0,2 g.L⁻¹ et la productivité 10 à 30 t/ha/an.



Source : <http://www.ceva.fr>

Le procédé en photobioréacteur : un système artificiel fermé

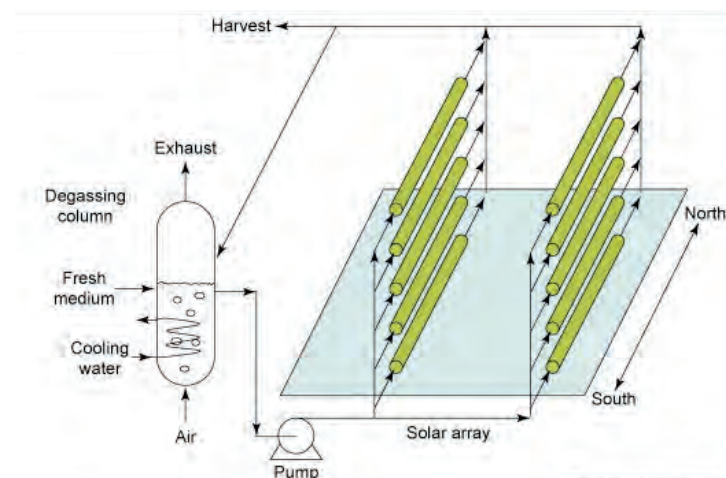
Il présente de fortes similitudes avec les bioréacteurs bactériens. Les microalgues circulent entre un réservoir qui porte une colonne de dégazage et le collecteur de rayonnement solaire composé de tuyaux transparents qui laissent entrer la lumière. Les tuyaux sont disposés sous forme de plan incliné pour permettre d'augmenter le rayonnement incident. Les tubes ne dépassent pas un diamètre de 10 cm pour éviter les zones d'ombre.

L'éclairage de ces tubes peut être réalisé à l'aide de sources lumineuses artificielles qui nécessitent un surcoût d'énergie.

Un flux turbulent est maintenu dans l'écoulement au moyen d'une pompe afin d'éviter la sédimentation et les zones d'ombre. Un générateur assure l'approvisionnement en CO₂.

Les paramètres de la culture peuvent être rigoureusement contrôlés.

Le volume de ces réacteurs varie de 0,1 à 2 m³, avec une concentration en biomasse qui peut atteindre 10 g.L⁻¹ et une productivité de 100 t/ha/an.



Source : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779908000218>