# Les microalgues de notre région sont-elles de bonnes candidates pour la production de biocarburants ?

**Par les élèves du TPE Génome du lycée René Char 2015-2016**

*L'Algue Géniale*

Dans le contexte actuel du réchauffement climatique et de l'épuisement des énergies fossiles, il est urgent de trouver des sources d'énergies renouvelables. Les alguo-carburants fabriqués à partir de lipides contenues dans les micro-algues en culture présentent de nombreux avantages:

-Les cycles de divisions cellulaires sont rapides, la biomasse produite devient importante en un temps intéressant. De plus l'encombrement est peu important pour le stockage.

-Le carbone relâché par la combustion des lipides et générateur de l'effet de serre dans l'atmosphère est capté pour la croissance des algues grâce à la photosynthèse.

C'est donc une source d'énergie propre et intéressante à étudier.

Les années précédentes, des algues étudiées par le laboratoire de Cadarache nous ont été fournies. Celles-ci sont cultivées depuis les années 50 dans des laboratoires et ont été récoltées dans différents lieux des États-Unis. Nous voulons savoir si les algues de notre région pourraient les remplacer voir les supplanter. Pour cela il nous faut :

-isoler les algues trouvées sur des sites naturels des autres micro-organismes et n'avoir qu'une seule souche aux propriétés bien définies.

- identifier ces algues et les situer parmi les différentes espèces connues.

-comparer leur croissance à celle des algues de laboratoire (production de biomasse) ainsi que leur teneur en lipides.

Chaque groupe est chargé de s'occuper d'une de ces problématiques.

## 1- Isolement des algues sauvages et description phénotypique

par Morgane TERRIN et Amélie AUGUSTIN

Dans le cadre du TPE ''Génome'' notre groupe était chargé d'isoler les souches d'algues présentes dans les différents échantillons ramenés par l'ensemble des membres du TPE dans le but de répondre à la problématique, à savoir si les algues de notre région étaient compétitives dans la production de bio-carburant. Nous sommes donc le point de départ dans la réponse à cette problématique car avant de les étudier et de les mettre en culture en grande quantités il faut être sûr de n'avoir qu'une seule souche d'une seule espèce avec, si possible le moins de bactéries possible.

I. Récolte des algues:

Fig 1

Toutes les personnes du groupe ont prélevé des échantillons d'algues trouvés proche de chez eux. Les échantillons ont été récupéré en milieu liquide, sur des pierres ou encore de la terre. Une fois ces échantillons ramenés en classe nous les avons mis en culture en milieux nutritifs nous avons aussi lancé des cultures sur milieu gélosé.

Au bout de quelques semaines certaines cultures avaient pris une couleur verte, signalant la présence d'algues. Mais nombres des autres cultures étaient visiblement contaminées par des bactéries et des champignons, empêchant

la prolifération des algues. Ces cultures contaminées ont tout de même verdi de nombreuse semaines plus tard.

## II. Isolement des souches

Les souches récupérées étaient très contaminées empêchant pour certaines un développement significatif des algues. Nous nous sommes donc concentrées sur les souches d'algues qui s'étaient développées. Nous avons commencé par la dilution en milieu liquide nutritif sur quelques souches et par les isoler depuis un milieu gélosé, nous les mettions en culture puis nous les repiquions en les étalant pour pouvoir voir les différentes colonies et ainsi repiquer seulement une colonie.

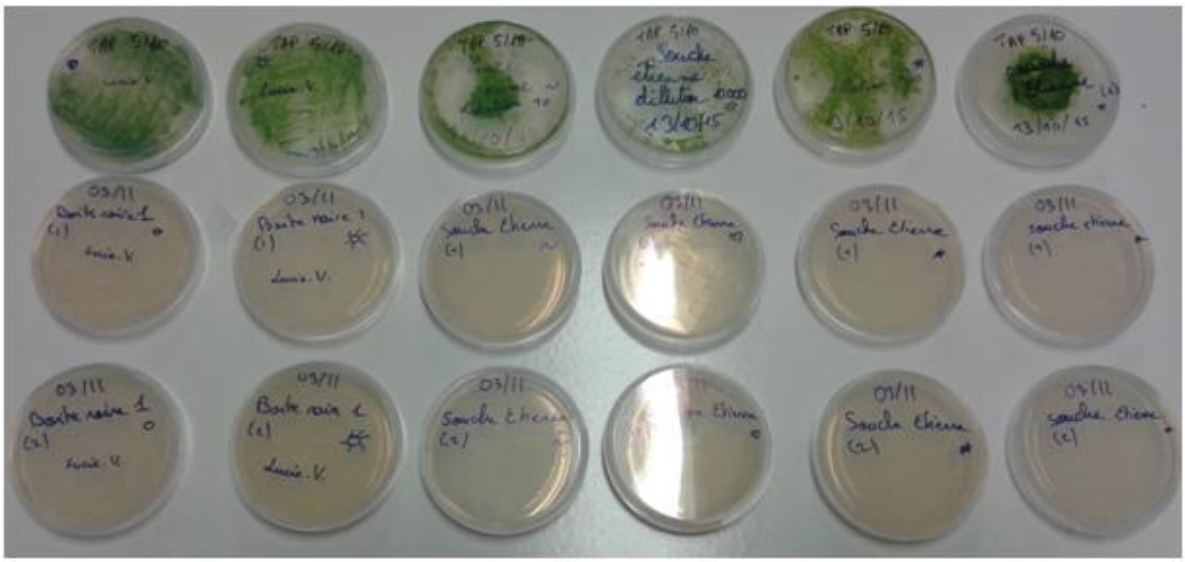


Fig 2

Au bout d'un certain nombre de repiquages nous avons obtenu une dilution suffisante pour que les colonies soit différenciables.
L'isolement en milieu gélosé a permis de supprimer les autres micro-organismes et une grande partie des bactéries. Ainsi lorsque nous les avons remis en milieu nutritif liquide nous n'avons pas eu de prolifération bactérienne. Nous avons ensuite continué l'isolement des souches des barrettes préalablement stérilisé au U.V. Puis on prélève quelques micro litres dans la première cellule (contenant les algues de l'échantillon) et on le met dans la seconde cellule que l'on complète avec du milieu nutritif liquide neuf et l'on continu ainsi jusqu'à la fin de la barrette.

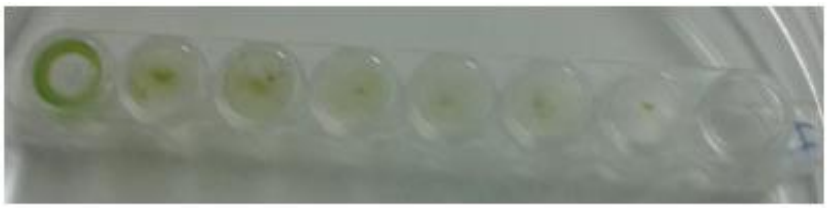


Fig 3

À la fin nous avons pu isoler deux souches d'algues différentes.

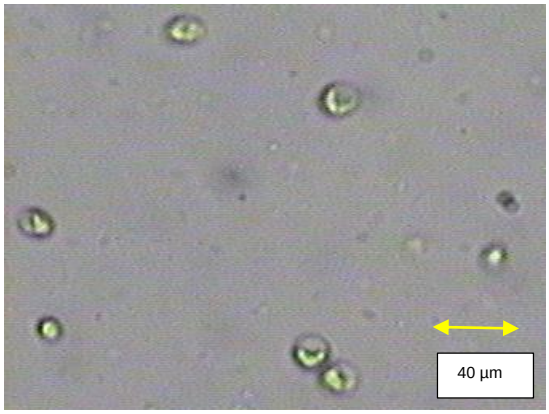
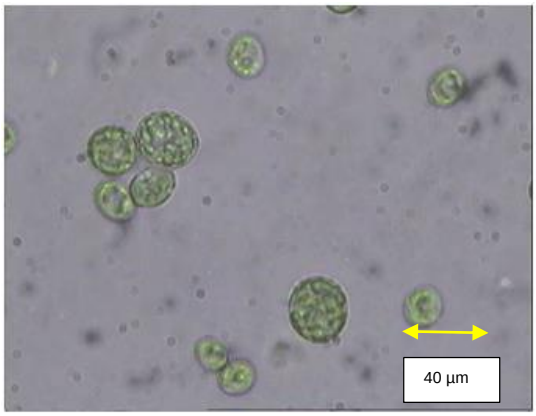
| Souche S2 | Souche S3 |
| --- | --- |
|   |   |

Fig 4

Ces deux souches isolées ont pu être transmise aux autres groupes pour qu'ils puissent travailler dessus

## 2 - Identification génétique des souches et phylogénie

par Benjamin BIRIG ;  Etienne AINA ; Valentin PIERRE ; Quentin VERWAERDE ; Mathis FAURE

Notre tâche consiste à identifier les souches d'algues sauvages récoltées et à déterminer les liens de parenté avec les souches de laboratoire, en comparant leurs génomes. Pour cela nous avons extrait l'ADN de chaque souche puis nous avons amplifié la partie correspondant au gène ribosomique. Nous avons finalement comparé les séquences amplifiées pour déterminer leur pourcentage de différence afin de les inscrire dans un arbre phylogénétique.

### 2.1 - Extraction d'ADN

Nous avons utilisé le kit "DNeasy Plant Mini Kit". La quantité d'algues nécessaire pour procéder à l'extraction est de 30 millions de cellules par tube, un comptage à la lame de Kova s'impose pour chaque souche en suspension.

Une fois cette étape réalisée, un simple produit en croix nous permet de trouver le volume adéquat à prélever pour l'extraction.

Les étapes du Kit permettent d'éliminer les constituants cellulaires autres que le matériel génétique. Durant la manipulation, l'ADN est précipité dans de l'alcool. Le passage dans la deuxième colonne retient la molécule, que nous récupérons par élution.

(Compléter la quantité d'ADN récup)

### 2.2 - Amplification de l'ADN

#### 2.2.1 - Le choix de la séquence à amplifier (amplicons) et des amorces

Pour mener des comparaisons entre espèces, nous avons choisi un gène ribosomique, propre aux eukaryotes, il code pour l'ARN composant la petite et la grande sous unité des ribosomes: SSU et LSU.
De nombreux chercheurs utilisent ce gène ou des parties de ce gène pour étudier les relations de parenté entre les espèces.

L'équipe de chercheur de Mark A. Buchheim et Matthias Wolf a par exemple travaillé sur la partie intronique du gène appelée ITS cf leur article "Towards an Automated Reconstruction of the Green Algal Tree of Life". Cette séquence est d'ailleurs très prisée par les chercheurs pour des études phylogéniques en général.

D'autre part, l'article "Vulcanochloris (Trebouxiales, Trebouxiophyceae), a new genus of lichen photobiont from La Palma" nous a donné des pistes pour choisir les séquences à amplifier sur ce gène et les amorces nécessaires à la production des amplicons.

C'est ainsi que nous avons choisi d'amplifier une partie (C1) de SSU avec le couple d'amorces euk 328f/ 895R et les parties introniques ITS 1 &2(C2) avec le couple ITS4/ nrSSU 1780:

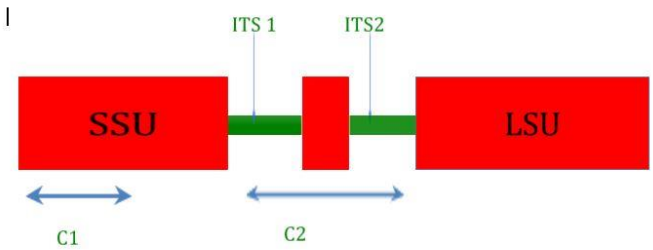



Fig 5

-La partie codante C1 est une séquence qui mute très peu, étant donné son utilité pour la cellule. Donc nous pouvons effectuer des comparaisons générales entres espèces, les différences génétiques étant rares.

-La partie non codante C2 (ITS en particulier). est une séquence qui mute rapidement, étant donné qu'elle est éliminée lors de l'épissage. Donc nous pouvons effectuer des comparaisons précises entre sous-espèces d'une même espèce.

Pour confirmer ce choix, nous avons recherché les amorces sur la base de données Phytozome. Par exemple, l'amorce euk328f se trouve sur 3 chromosomes à 5 endroits de même que l'amorce 895r.

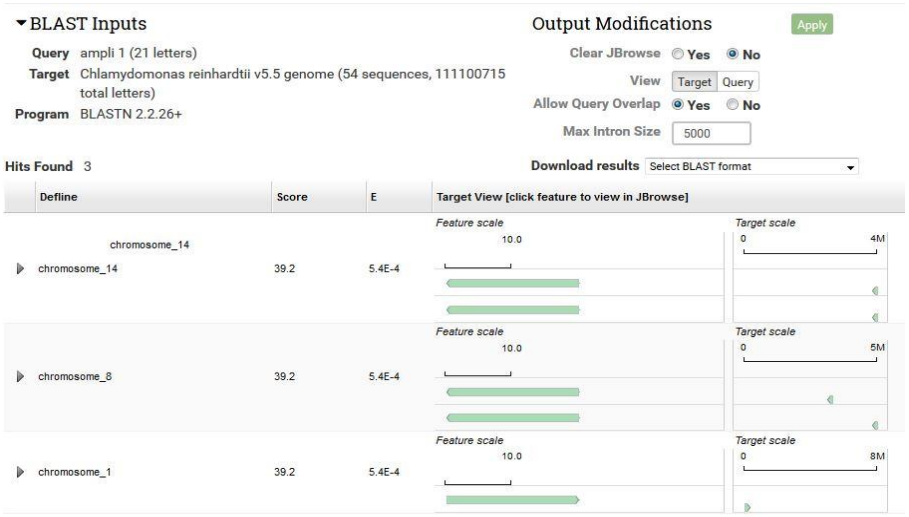



Fig 6

Images prise sur Phytozome

4.2.2 - L'amplification

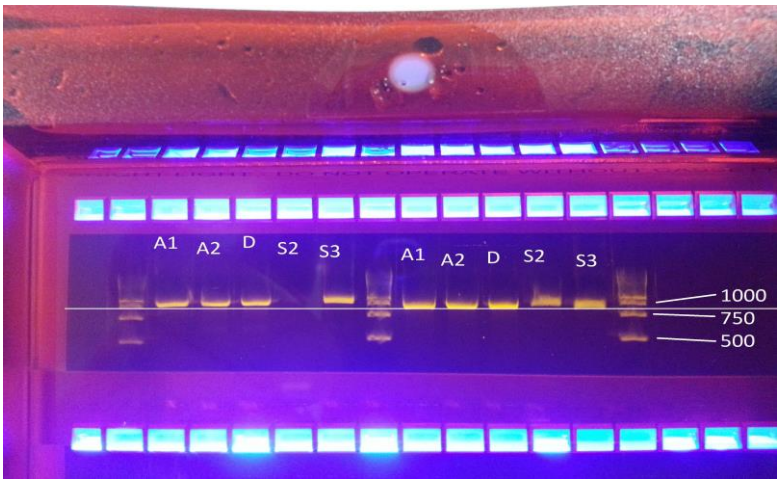
L'amplification est plus souvent appelé PCR : Polymerase Chain Reaction. Nous utilisons une enzyme ADN polymérase, ici la Taq polymerase ; c'est elle qui va assembler des bases pour créer des brins d'ADN supplémentaires, selon le principe de complémentarité des bases A&T / C&G. Nous ajoutons les bases, les amorces et l'ADN de nos algues.

Pour provoquer la réaction, un thermocycleur est indispensable. Il régule la température voulue pour le bon déroulement des cycles d'amplification.

Pour séparer les deux brins d'ADN, 95°C sont nécessaires. 10 à 15 minutes plus tard, la température baisse pour atteindre entre 56 et 64°C afin que les amorces se placent sur l'ADN à amplifier grâce à la complémentarité des bases. Enfin, la température remonte à 72°C et la Taq polymérase peut opérer. Cette dernière phase du cycle a une durée variable, selon la longueur de l'amplicon à transcrire. Ces trois phases constituent un cycle. Durant un cycle, le nombre de séquences à amplifier double. Nous avons programmé notre thermocycleur pour 35 cycles, environ 3 heures. Nous avons donc polymérisé $3.10^{7} \times 2^{35} = 10^{18}$ séquences; toutes pour le même amplicon.

2.2.3 - L'électrophorèse

Fig 7




L'électrophorèse permet de vérifier si l'on a bien amplifié une séquence, c'est un moyen de contrôle pour savoir si tout est à refaire ou pas. Cette expérience consiste à déposer les séquences obtenues suite a la polymérisation (amplicons) sur une plaque de gel et a faire passer dans cette plaque un courant électrique. En fonction du nombre de bases les molécules ne migrent pas à la même vitesse. Les résultats obtenus sont par chance excellents et correspondent aux résultats attendus.

On constate que nos amplicons possèdent entre 750 et 1000 paires de bases.

Nous avons envoyé ces amplicons au génopôle d'Every pour qu'ils puissent les analyser et nous envoyer les séquences d'ADN amplifié sous forme de fichier informatique. De cette façon, nous pourrons facilement faire notre repérage génétique entre algues par phytozome, en trouvant les séquences des introns, puis par génigen, en comparant ces séquences entre elles (divergences de bases sur le cadre de lecture).

## 2.3 - Identification des souches et phylogénie

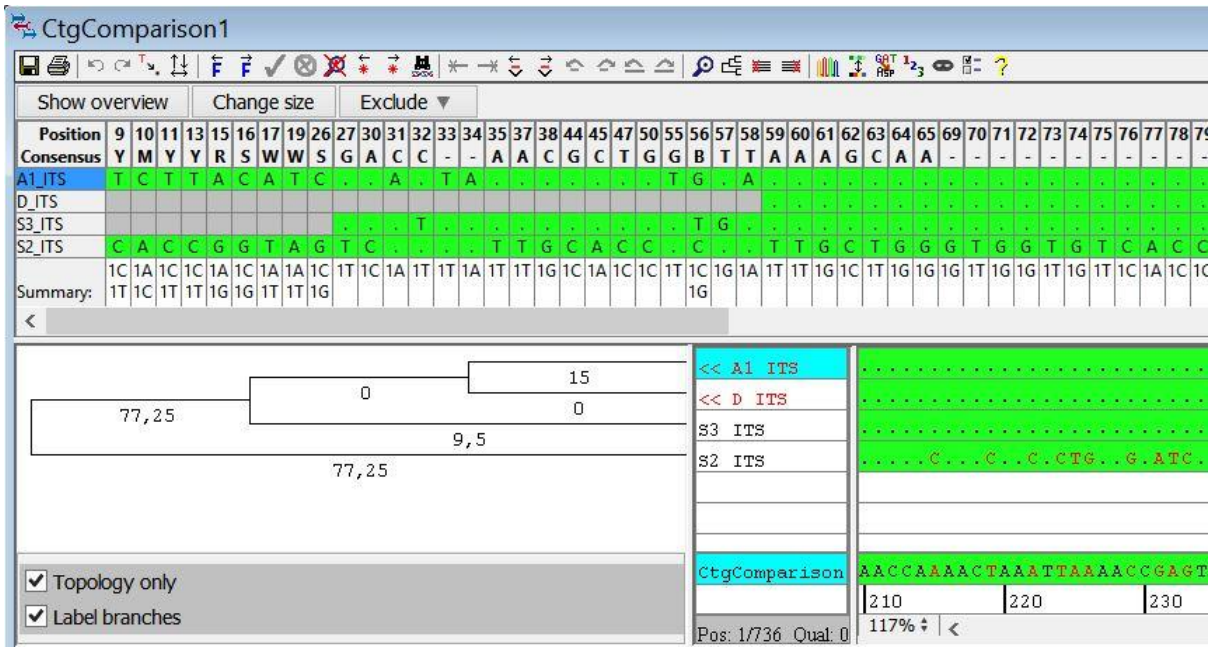
### 2.3.1 - Identification des séquences à partir du séquençage

Nous recevons nos résultats sous la forme d'un chromatogramme : les nucléotides ont été marqués avec quatre colorants différents. L'ADN est séquencé deux fois pour plus de fiabilité : dans le sens 3'5' et 5'3'. Le logiciel CodonCode nous permet de le convertir, et de le corriger manuellement au besoin, si le chromatogramme n'a pas été suffisamment clair (marqueurs non détectés).

Fig 8

Une fois que les séquences sont prêtes, nous les comparons et en fonction des ressemblances, nous pouvons enfin construire un arbre phylogénique :

Fig 9




Les souches de laboratoire A et D sont très proches, tandis que la souche C2 est la plus éloignée des souches de laboratoire, elle a un lointain ancêtre commun.

Grâce à une recherche de l'amplicon sur phytosome, l'algue S2 semble proche de coccomyxa subellipsoidea.

## 3 -La production de biomasse

par Samuel GRAS et Louis CURÉ

Afin de savoir si les algues de notre région sont compétitives pour la production de bio-carburant, nous avons comparé la production de biomasse des algues prélevées dans la nature (Souches S2 et S3) avec celles des algues de laboratoire chlamydomonas reinhardtii (Souches A et D).

### I) Mise en culture

Après avoir effectué des recherches sur les différentes méthodes de culture, nous avons retenu une méthode réalisable au lycée : la culture en batch.
Nous avons choisi des erlenmeyers de 1L afin d'obtenir une quantité d'algues importante et nous donner la possibilité d'analyser les lipides. Ceci nécessite une pré-culture contenue dans des erlenmeyers de 100 mL.

Nous avons transféré des pré-cultures de souches A, D, et les sauvages S2 et S3 dans les erlenmeyers de 1L stériles et contenant du milieu de culture. La manipulation a été effectué sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter les contaminations des algues, même si les souches sauvages S2 et S3 n'étaient pas totalement isolées.

Fig 10

Nous avons utilisé des bulleurs afin de maintenir une homogénéité des algues dans le milieu de culture :

Fig 11

Nous avons ensuite suivi la concentration en algues des cultures grâce à des prélèvements réguliers et en utilisant des lames de Kova. Nous obtenons ceci :

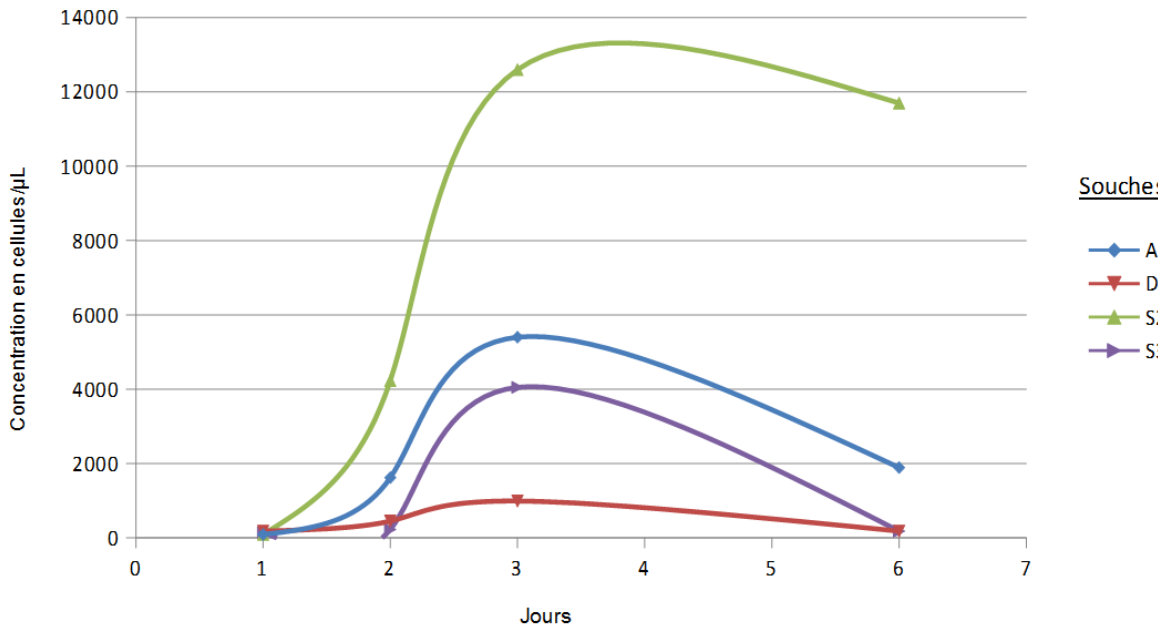



Fig 12

**Évolution de la concentration au cours du temps**

On remarque la souche S2 est beaucoup plus concentrée. Cependant, il faut mettre cela en relation avec la taille des cellules selon la souche. En effet, les algues de la souche S2 sont beaucoup plus petites que les autres souches :

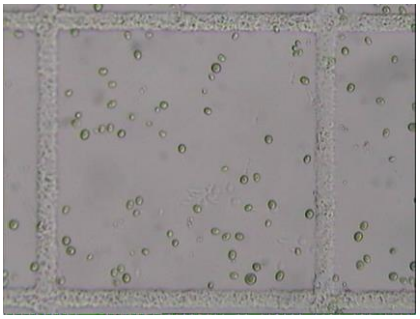
| Souche S3 au microscope | Souche A au microscope |
|---|---|
| |  |

Fig 13

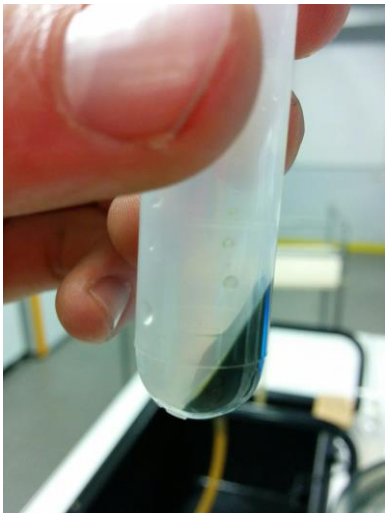
On remarque aussi que la souche D présente des résultats décevants. Nous avons soupçonné une contamination de la souche. Nous avons donc fait parvenir de nouvelles souches D pour la prochaine culture.
On remarque aussi que sans adjonction de milieu de culture, les cellules commencent à mourir au bout de 3 jours. Il faut donc extraire les algues ou ajouter du milieu de culture au bout de 3 jours.
Nous avons donc relancé une culture avec toutes les souches dont la nouvelle souche D, avec cette fois-ci une adjonction de milieu de culture. Au bout de 3 semaines, nous passons à l'extraction de la masse.

## II) Extraction de la biomasse

Fig 14 **Transfert des cultures dans des tubes**

Fig 15 **Culot d'algues après centrifugation**

Pour extraire la biomasse, il faut séparer le milieu de culture des algues. Pour cela, nous avons utilisé une centrifugeuse :



Nous avons ensuite pesé les tubes afin d'avoir la masse des algue+tube pour chaque tube.
On soustrait la masse des tubes vides correspondants et on on obtient la masse des algues.
Nous avons ramené ces résultats en équivalent pour 1 Litre de culture.

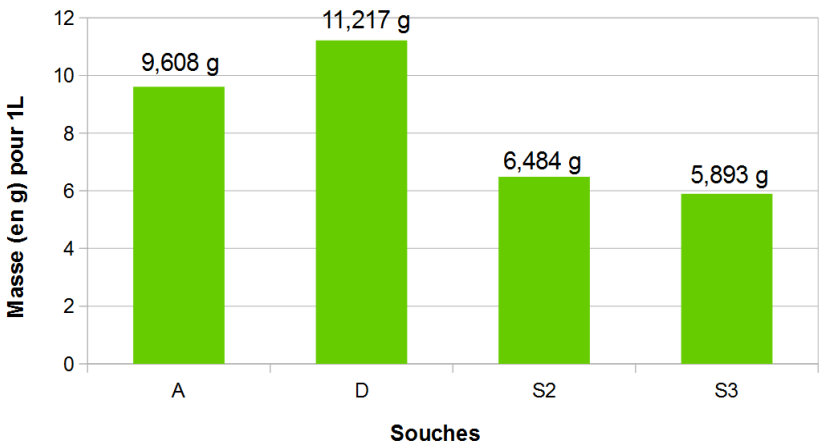



Fig 16 **Quantité de biomasse pour 1 Litre selon les souches**

On remarque tout d'abord que nos soupçons pour la souche D s'avéraient fondés car c'est la souche produisant le plus de biomasse à présent !

Nous observons donc que la production de biomasse des algues de notre région est certes inférieure à celle des algues de laboratoire mais qu'elle ne démérite pas.

## 4 - Caractérisation des souches par leur contenu en lipides

par Soukayna CHARKANI et Thi Di Hanh LE ; Lucie VICARI et Audrey AMY

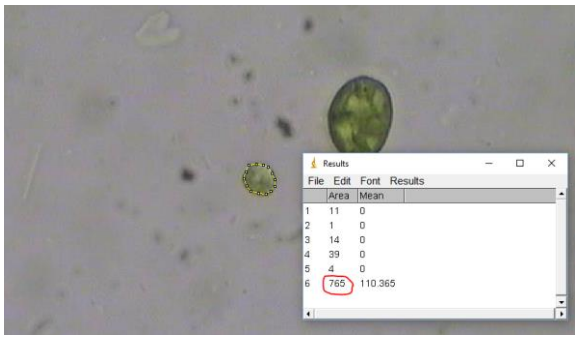
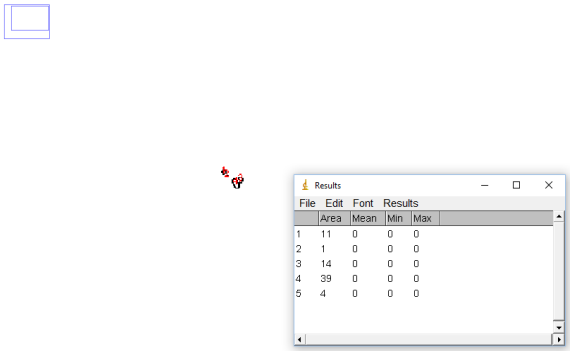
Notre groupe travaille sur la quantité de lipides produits par les souches, en particulier les sauvages S2 et S3 que nous avons ensuite comparées avec les souches de laboratoire A et D.

Pour procéder à l'observation des lipides, nous colorons les algues au Rouge de Nil et utilisons un microscope à fluorescence

Suite à l'observation au microscope à fluorescence, nous avons calculé à l'aide du logiciel Image J la quantité de lipides produite de la souche A, D et les souches sauvages S2 et S3.

Pour cela, nous avons mesuré la surface des cellules ainsi que la surface fluorescente de lipides que possède cette cellule. Nous avons ensuite calculé le pourcentage de la surface cellulaire occupée par les lipides sachant que nous faisons une approximation puisque la cellule occupe un espace en trois dimensions.

Fig 17

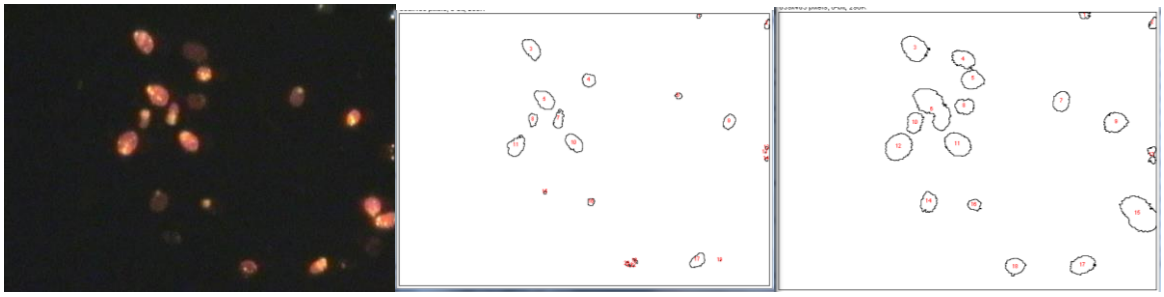
| Mesure de la surface d'une cellule sur Image J | Surface de lipide contenu dans une cellule sur Image J |
|---|---|
|  |  |





Nous avons ensuite fait un tableau de valeurs afin de déterminer une moyenne

Par exemple : Mesures des surfaces sur l'image de la souche A avec le logiciel ImageJ :



Capture d'image en fluorescence  Surface fluorescente  Surface cellulaire

Fig 18

<u>Réglages RVB choisis pour toutes les mesures</u> :

- des surfaces lipidiques 155 / 86 / 248
- des surfaces cellulaires totales 55 / 59 / 52

Il est évident que les proportions obtenues sont considérablement influencées par les réglages choisis initialement. Les variations de ces proportions sont tout de même significatives.

Le choix de l'échelle a été déterminé à partir d'une lame micrométrique observée au même grossissement.

Nous avons pris soin d'équilibrer le nombre d'images issues d'une même préparation microscopique afin de ne pas fausser la moyenne des résultats.

Nous avons pu constater dans un premier temps que les souches S3 et S2 contiennent moins de lipides que les souches de laboratoire mais après cela, nous avons mis les souches dans un milieu carencé liquide et calculé les résultats pour voir s'il y a une évolution car nous savons d'après les recherches bibliographiques et les manipulations de nos camarades des années précédentes que la carence en azote stimule la production de lipides.

Nous avons réessayé de calculer le pourcentage de lipides avec image j sur de nouvelles photos, les souches de la dernière fois (S2 et S3) et nos deux nouvelles souches : S2 et S3 carencés, mais ici nous avons seulement les résultats pour les souches A, D, S2, et S2C.

Nombre de cellules possédant des lipides par rapport au nombre total de cellules observées

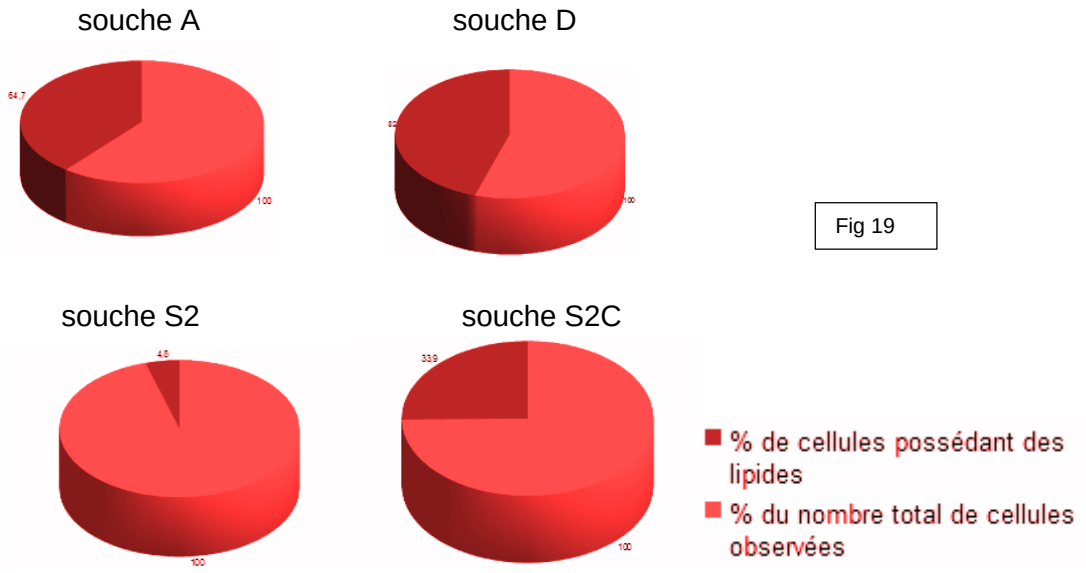



Fig 19

Surface occupée par les liposomes par rapport à la surface cellulaire totale dans les cellules possédant des lipides

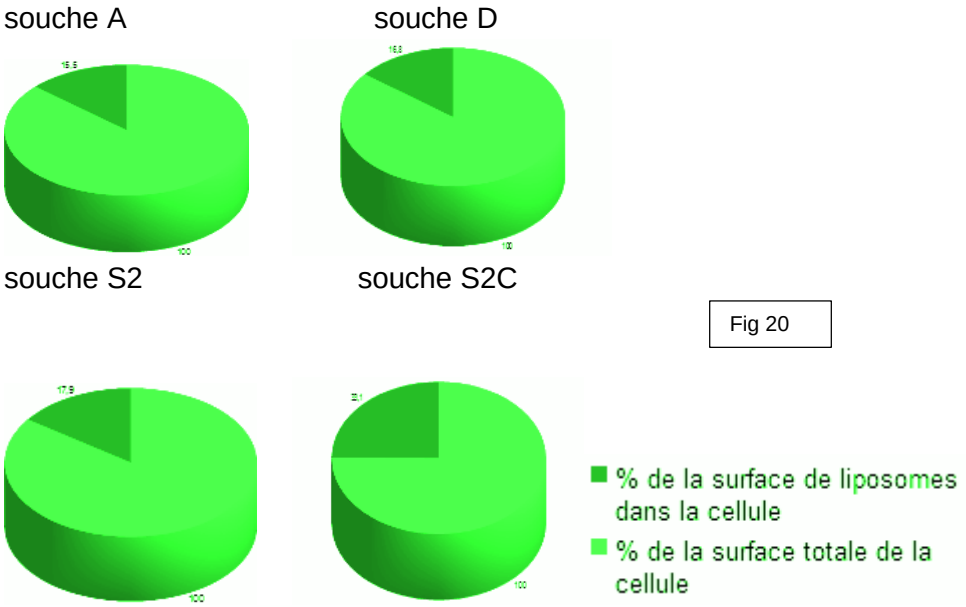
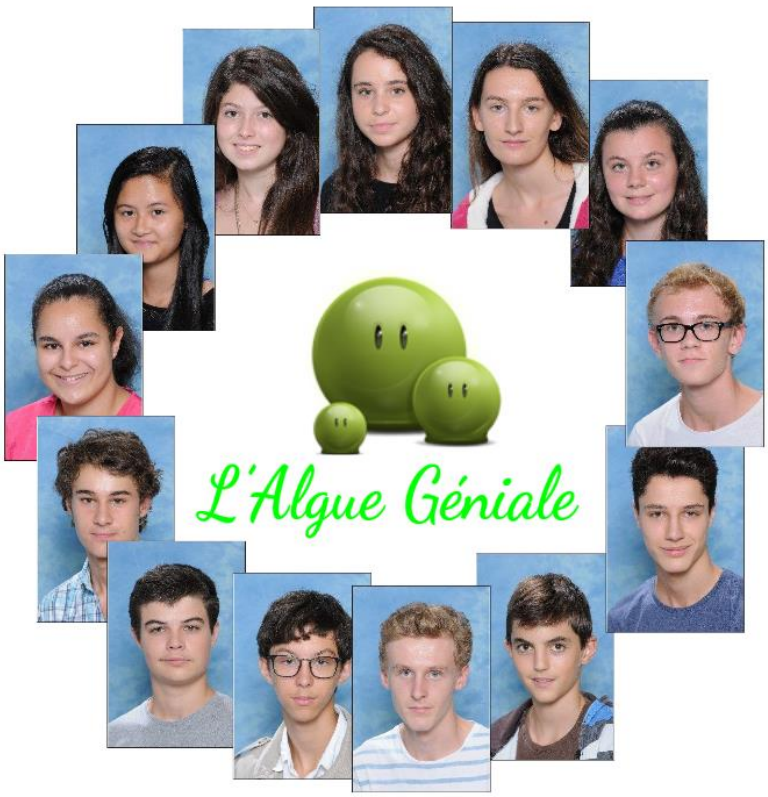



Fig 20

**BILAN :**

On remarque qu'en milieu carencé, la souche S2 produit nettement plus de lipides non seulement dans les cellules elles-mêmes mais aussi dans plus de cellules car on constate grâce au pourcentage qu'il y a beaucoup plus de cellules possédant des lipides que dans la S2 dans un milieu non carencé (4,8% contre 33,9% après la mise en milieu carencé en azote).

La souche S2C reste tout de même moins productive en lipides que la souche A ou D donc elle n'est pas vraiment compétitive dans la production d'algocarburant.

Il serait intéressant de comprendre pourquoi seules certaines cellules se mettent à produire des lipides, car lorsque nos souches produisent des lipides, le pourcentage de surface de liposomes dans la cellule est élevé. De plus nous n'avons pas pu encore tester toutes les souches que nous avons récoltées.

Annexe