

# Module 58

## *Détermination du taux de lipides dans *Euglena gracilis**



DOLOY Jade

Module 58

## RESUME

Durant ce stage, nous avons souhaité travailler sur les biocarburants de troisième génération. Notre projet portait sur une production puis une analyse des lipides présents dans les microalgues *Euglena gracilis*. Nous avons souhaité étudier l'effet de l'âge de la culture et celui d'une carence en azote. Pour cela, nous sommes parties de deux souches d'Euglènes conservées au lycée depuis 2015. Nous avons pu les cultiver au sein de l'algothèque du lycée.

Pour réaliser ce projet, nous étions en partenariat avec Stéphan Cuiné qui travaille au CEA (Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives) de Cadarache, au LB3M (Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues).

Pour l'étude de l'effet de l'âge des cultures, celles-ci ont été lancées longtemps auparavant (en janvier). Durant les deux semaines du projet, nous avons commencé par préparer les milieux de culture pour les algues. Il y avait un milieu avec azote et un milieu sans azote pour l'étude en condition de carence. Après la production des algues dans l'algothèque du lycée, nous avons pu commencer nos analyses. Tout au long de ce stage, nous avons réalisé un suivi de la chlorophylle par spectrophotométrie et de la concentration cellulaire à l'aide de comptages en cellule de Malassez. Par la suite, pour pouvoir doser les lipides de ces algues, nous en avons tout d'abord fait l'extraction à l'aide de solvants. Ensuite nous avons réalisé une Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et en parallèle monsieur Cuiné a réalisé une CCM à Haute Performance (HPTLC) au CEA. Celles-ci servent à quantifier les lipides de réserve présents dans cette algue. Dans un deuxième temps, nous avons fait une trans-méthylation de nos extraits lipidiques. Elle a pour but de couper les acides gras, pour pouvoir mieux les identifier en réalisant une Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG). Les échantillons ont également été analysés en parallèle au lycée et au CEA (détection spectromètre de masse) afin de déterminer les profils d'acides gras de nos cellules (sans distinguer les lipides de réserve et les lipides membranaires).

Lors de ces analyses, nous avons rencontré de nombreux problèmes techniques. Nous avons donc été dans l'impossibilité de répondre à nos questions initiales. Mais nous avons pu observer la présence de lipides de réserve.

Cette algue semble donc prometteuse pour poursuivre les études en laboratoire. Les conditions de culture (depuis 2015 en milieu liquide posée sur une paille) peuvent être la cause de la présence de ces lipides détectés. Il faudrait donc la repiquer, l'analyser une nouvelle fois, et si elle garde ces critères, elle pourrait devenir intéressante pour une éventuelle production de biocarburants.

## SOMMAIRE

Résumé.....	1
I – Introduction.....	1
II – Contexte .....	1
III – Calendrier des manipulations.....	2
IV – Schéma protocole .....	3
V – Hygiène et sécurité .....	3
VI – Résultats et dysfonctionnements .....	4
6.1) Dosage .....	4
6.2) But de l'extraction des lipides .....	4
6.3) CCM .....	4
6.4) HPTLC (CEA) .....	4
6.5) Comparaison CCM/HPTLC .....	5
6.6) Utilité de la trans méthylation.....	5
6.7) Chromatographie gaz (lycée).....	5
6.8) Chromatographie Gaz (CEA).....	6
6.9) Comparaison chromatographie gaz lycée/CEA .....	7
6.10) Culture des algues .....	7
VII – Budget.....	7
7.1) Commentaires du budget.....	7
7.2) Tableau budget HT et TTC .....	8
VIII – Conclusion .....	9
IX – Annexe protocoles .....	10
10.1) Dosage des algues .....	10
10.2) Extration des lipides dans les algues .....	10
10.3) CCM (lycée) et HPTLC (CEA).....	10
10.4) Trans méthylation.....	10
10.5) Chromatographie gaz (lycée/cea).....	10

## I – INTRODUCTION

La population mondiale ne cesse d'augmenter. Les demandes en eau potable, en alimentation et en énergie explosent. La pollution engendrée par l'utilisation des énergies fossiles s'accompagne également d'une accumulation de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère accélérant le dérèglement climatique. Il est donc nécessaire de trouver des solutions accessibles et qui préservent l'environnement.

Depuis quelques années, des recherches se portent sur de nouveaux carburants moins polluants. Les biocarburants sont produits à partir de la biomasse visant à remplacer les carburants classiques provenant d'énergies fossiles. Le but est d'obtenir un bilan CO<sub>2</sub> nul, c'est-à-dire que le CO<sub>2</sub> rejeté par les voitures n'excédera pas le CO<sub>2</sub> utilisé par la biomasse. Il y a trois générations de biocarburants à ce jour.

- La génération 1 (agrocultures) est produite à partir de cultures destinées à l'alimentation. Ce sont les organes de réserves des plantes à huile comme le colza, le tournesol ou des plantes à sucre comme la betterave, la canne à sucre. Le problème majeur de cette méthode est qu'elle entre en compétition directe avec la production alimentaire.
- La génération 2 de biocarburant. Les chercheurs et ingénieurs souhaitent donc développer des biocarburants à partir de sources végétales non alimentaires (les parties non comestibles des plantes comme les tiges ou le bois ou les déchets agricoles)
- La génération 3 qui consiste à utiliser la biomasse d'algues pour faire des biocarburants (image 1). Cela permet de ne pas entrer en concurrence avec les cultures. Cette génération est encore au stade de la recherche. Cette technologie particulière exige de maîtriser la culture des algues, la récolte et l'extraction des huiles algales. Nous cherchons à obtenir une algue avec une teneur en huile qui représente jusqu'à 80% de sa matière sèche.

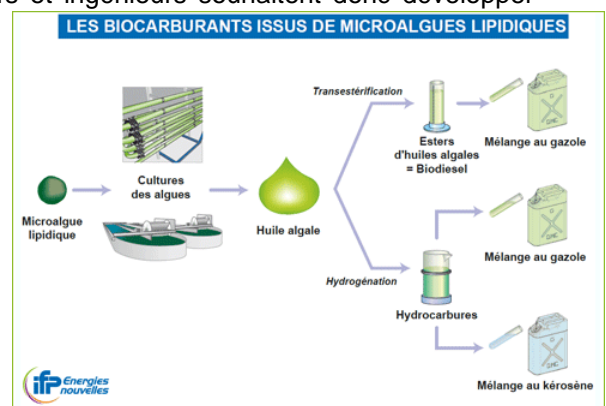


Image 1 : de l'algue au biocarburant  
<http://controverses.mines-paristech.fr/>

## II – CONTEXTE

Notre projet s'oriente vers les biocarburants de 3<sup>ème</sup> génération et donc la production puis l'analyse lipidique de microalgues.

Pour cela, nous avons travaillé en collaboration avec Stéphan Cuiné du CEA (Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives) de Cadarache, au Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues (LB3M). Le laboratoire effectue de la recherche fondamentale sur la photosynthèse avec un axe de recherche appliquée vers les biocarburants.

Nous avons voulu monter la culture d'algue à partir de l'algothèque du lycée (plus précisément sur l'algue *Euglena gracilis*). Nous voulions la cultiver selon plusieurs critères, puis analyser ses lipides grâce à deux analyses : Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) réalisée au lycée et en parallèle au CEA, et de la Chromatographie sur Couche Mince (CCM) réalisée au lycée et aussi en parallèle par la CCM à Haute Performance (HPTLC) effectuée par M. Cuiné au CEA.

Le but final était de voir si *Euglena gracilis* était une algue propice à une étude plus concrète en laboratoire pour la production des biocarburants (présences de chaînes courtes ≤ à C18 et peu ou pas insaturées)

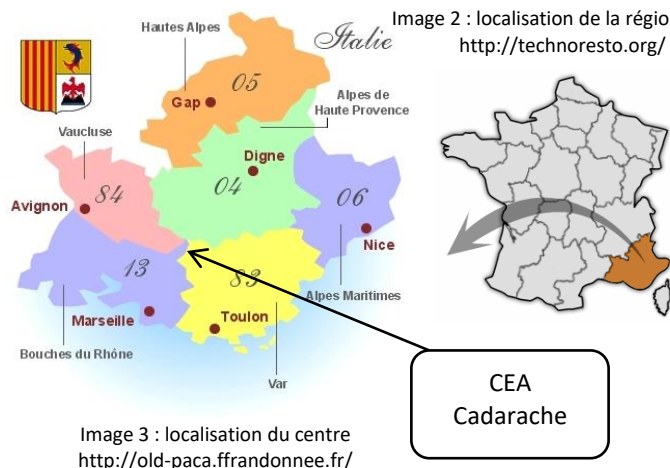


Image 3 : localisation du centre  
<http://old-paca.ffrandonnee.fr/>

Nos protocoles nous ont été envoyés par le CEA où se font des analyses de routine sur l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* (algue modèle du laboratoire pour les biocarburants).

Pour réaliser nos cultures de micro algues, nous sommes donc parties de deux cultures datant de 2015 stockées au lycée. Nous les avons repiquées une première fois dans un milieu de culture adapté afin de réaliser des dosages lipidiques en fonction de l'âge de la culture.

Par la suite nous avons réalisé une comparaison de milieux en créant une carence en azote, en utilisant et repiquant les mêmes souches de départ (celles de 2015). Le but est de stresser l'algue afin qu'elle fasse des réserves supplémentaires en lipides.

de cultures nous n'étions pas sûrs d'avoir des résultats sur les deux thématiques précédentes. Nous avons donc prévu une comparaison de méthode entre la CCM et la HPTLC (analyse des lipides de réserve) et entre les chromatographie gaz du lycée et du CEA (analyse des lipides de réserve et membranaire)

Traçabilité échantillonnage :

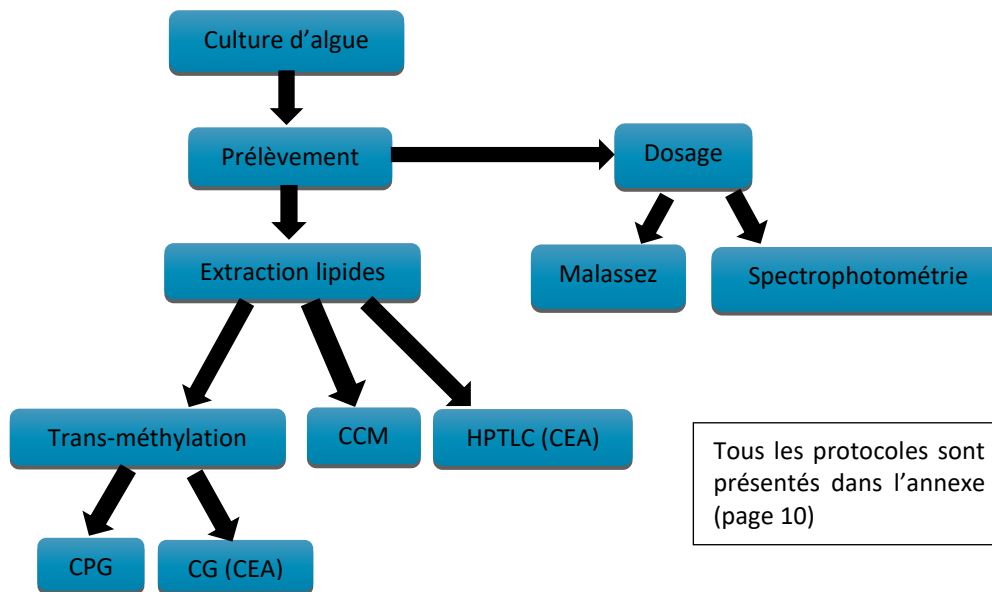
Comparaison des lipides par rapport à l'âge de la culture	Comparaison des lipides par rapport au milieu utilisé le 05/03/15
Echantillon 1 : souche n°8, datant de 2015	Echantillon 5 : souche n°5, milieu euglène normale
Echantillon 2 : souche n°5, datant de 2015	Echantillon 6 : souche n°8, milieu euglène normale
Echantillon 3 : souche n°8, repiqué le 11/01/18	Echantillon 7 : souche n°5, milieu euglène sans azote
Echantillon 4 : souche n°5, repiqué le 11/01/18	Echantillon 8 : souche n°8, milieu euglène sans azote

### III – CALENDRIER DES MANIPULATIONS

Quand ?	Quoi – Qu'est-ce qui a été réalisé ?
Novembre à Février	Choix du projet, mise en place du contexte, choix et repiquage des souches, détermination des conditions de repiquage, mise en place de la conduite du projet, choix des protocoles, commande du matériel nécessaire
Lundi 5 mars	Préparation des milieux de culture, lecture de l'absorbance des souches (calculs et spectre d'absorption), comptage cellules de Malassez (photos), Adaptation de l'algothèque pour culture, repiquage des algues en milieu azoté et non azoté, préparation de toutes les solutions pour les manipulations à venir, mise en place du programme pour la CPG
Mardi 6 mars	Préparation de la solution de TagC17 et BHT, extraction des lipides, mise en place d'un bain marie à 30°C pour l'évaporation (CCM), réflexion et calcul pour la mise en place de la CCM, Trans méthylation de 4 premiers échantillons et de 3 tubes d'huile d'olive à différentes concentrations (1µL, 5µL et 10µL) pour étalonner la CPG
Mercredi 7 mars	Lecture de l'absorbance des souches, observation des cellules de Malassez (photos), préparation des 4 premiers échantillons CCM, duplicat extraction 4 premiers échantillons, Trans méthylation 4 premiers échantillons et C17, bibliographie sur les lipides de l'huile d'olive, CPG sur les huiles et les 4 premiers échantillons, repiquage des cultures en suivant la thématique choisie
Jeudi 8 mars	Lecture de l'absorbance des souches, observation des cellules de Malassez, extraction des 4 autres échantillons, CPG tagC17 et duplicate des 4 premiers échantillons, envoi du colis au CEA
Lundi 12 mars	Trans méthylation des 4 autres, évaporation des échantillons pour la CCM, CPG de l'hexane, lecture de l'absorbance des souches, observation des cellules de Malassez
Mardi 13 mars	CPG des 4 autres échantillons, préparation du solvant et du colorant pour la CCM, réalisation de la CCM
Mercredi 14 mars	Réflexion et recherche du coût global des manips, bibliographie des lipides présents dans les Euglènes, réflexion sur l'hygiène et la sécurité mises en place pendant les manipulations
Jeudi 15 mars au CEA	Analyse des résultats de l'HPTLC et de la CG, discussion autour des résultats des différentes manipulations et des dysfonctionnements rencontrés
Vendredi 16 mars	Calculs pour l'HPTLC et la CG, recherche sur les molécules trouvées, prise du pH du milieu sans azote, discussion des résultats obtenus avec le professeur, comparaison des différentes méthodes d'analyses utilisées

Les 4 premiers échantillons sont les échantillons 1, 2, 3 et 4 répondant à la thématique comparaison d'âge et les 4 autres échantillons sont les échantillons 5, 6, 7 et 8 répondant à la thématique comparaison carence en azote.

## IV – SCHEMA PROTOCOLE



## V – HYGIENE ET SECURITE

Analyse des points critiques pour la manipulation, le stockage et le traitement des déchets

- Cultures

Les milieux préparés doivent être stériles, c'est-à-dire être passés à l'autoclave. La manipulation des milieux doit se faire en conditions stériles pour ne pas les contaminer. Nous jetterons la totalité des consommables entrés en contact avec des algues dans la poubelle jaune DASRI, qui sera ensuite scellée et traitée (incinérée) par une entreprise extérieure. Le milieu contenant nos algues sera d'abord placé dans de la javel, et enfin passé à l'autoclave et jeté à l'évier.

- Extraction et Trans méthylation

La manipulation doit se faire sous hotte car on utilise des produits volatiles et dangereux pour l'homme (solvant CMR, toxique, corrosif...). Le port la blouse, des gants et des lunettes est obligatoire. Si le solvant entre en contact avec les gants, en prendre de nouveaux et se rincer les mains à l'eau et au savon. Il faut utiliser des tubes que l'on peut fermer, résistants au solvant (en verre), avec un bouchon si possible en téflon, étanches pour les centrifugations, l'agitation (vortex) et le stockage des échantillons.

Le stockage de tous nos solvants se fait dans des étagères fermées à clé avec une aération et un bac de récupération spécialement adapté. L'ajout de l'acide sulfurique se fait en mettant préalablement l'eau, tout doucement avec agitation, si le mélange vient à chauffer le mettre dans un bain d'eau froide.

Nous récupérons tous les liquides dans un bidon solvant, stocké sous hotte et qui sera ensuite traité par une entreprise extérieure. Les autres produits liquides seront, au cours de la manipulation mélangés à des solvants. Ils seront donc jetés dans le même bidon solvant. Pour le stockage des autres produits, une armoire sous clé avec aération suffit. Tous les consommables entrés en contact avec les produits seront jetés dans la poubelle rouge chimique.

Le lavage de la verrerie utilisée se fera avec de l'éthanol pour enlever les solvants non miscibles à l'eau. Ensuite les eaux de lavage sont jetées dans le bidon solvant, permettant aussi d'effectuer un premier rinçage éliminant un maximum de solvant avant de jeter dans l'évier puis le lavage se termine avec de l'eau savonneuse et enfin rinçage avec de l'eau distillée et séchage.

- Evaporation des solvants

Cette étape est réalisée avant de placer les échantillons sur une plaque de silice ou d'injecter en CPG, elle sert à la concentration des échantillons. Elle doit se faire exclusivement sous hotte, qui doit être restée allumée toute la nuit s'il le faut. Attention de ne pas renverser les tubes dans le bain marie.

- CCM

La CCM est à réaliser sous hotte. La gestion des déchets et le stockage des produits se feront de la même façon que pour l'extraction. Attention aux vapeurs d'éther en sortant la plaque de la hotte pour la colorer. Attention aux brûlures dues au four, mettre des gants adaptés à la chaleur.



## VI – RESULTATS ET DYSFONCTIONNEMENTS



## 6.1) DOSAGE

Spectrophotométrie : nous effectuons ici un dosage de la chlorophylle en  $\mu\text{g}$  par mL. La formule couramment utilisée au LB3M n'est pas valide dans notre cas, car nous avons pris nos valeurs dans le milieu de culture et non dans du méthanol. Cependant c'est l'estimation de la biomasse la plus représentatif que nous ayons. Nous nous en servons juste comme simple indicateur.

Cellule de Malassez : comptage cellulaire non représentatif car nous n'avons pas fixé les algues au glutaraldéhyde, les euglènes sont flagellées et donc en mouvement permanent ; Nous pouvons donc selon le cas sur ou sous-estimer la quantité réellement présente dans les échantillons.

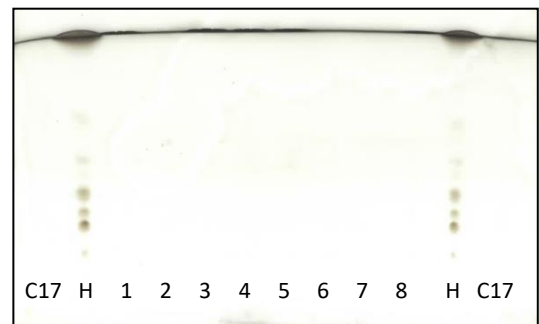
## 6.2) BUT DE L'EXTRACTION DES LIPIDES

Elle permet de lyser les algues puis d'éliminer un maximum de débris cellulaires transférant les lipides dans la phase organique. Cette phase organique sera concentrée par évaporation puis utilisée pour analyses complémentaires.

## 6.3) CCM

Résultat :

- Tache d'huile (H) : on voit les pigments et acides gras libres. Les triglycérides que nous cherchons à observer sont dans le front de solvant.
- Tag (taux d'acides gras) C17 : négatif, il se trouve dans le front de solvant.
- Echantillon (1 à 8) : même ce qui devrait être positif (comparaison avec HPTLC) ne l'est pas car les acides gras de réserve se trouvent dans le front de solvant.



Dysfonctionnement : après discussion sur notre manipulation avec Stéphane nous en avons conclu que le seau n'était pas étanche ce qui a entraîné une évaporation de l'éther, notre solvant n'était donc plus aussi polaire. Les triglycérides recherchés ont migré dans le front de solvant.

Du fait que nous n'avons pas eu le temps de refaire la manipulation, nous ne pouvons pas éliminer l'hypothèse que la plaque de silice était trop vieille.

## 6.4) HPTLC (CEA)

Résultat : nous observons les lipides de réserve de l'algue.

**A** : nous trouvons, dans les algues, au niveau du dépôt, les lipides polaires qui n'ont pas migré.

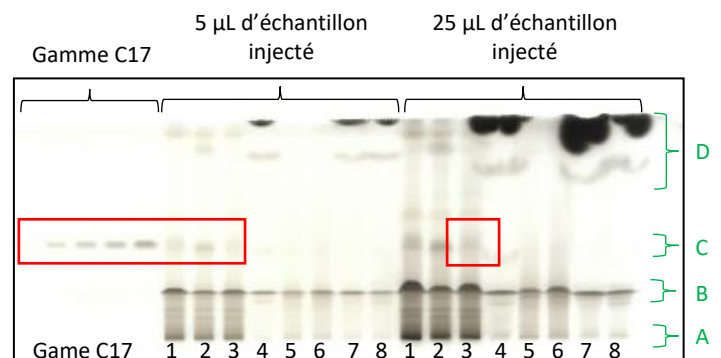
**B** : nous trouvons les acides gras libres.

**C** : nous trouvons nos triglycérides à analyser.

**D** : au-dessus jusqu'au niveau du front de solvant, se sont des contaminations non identifiables.

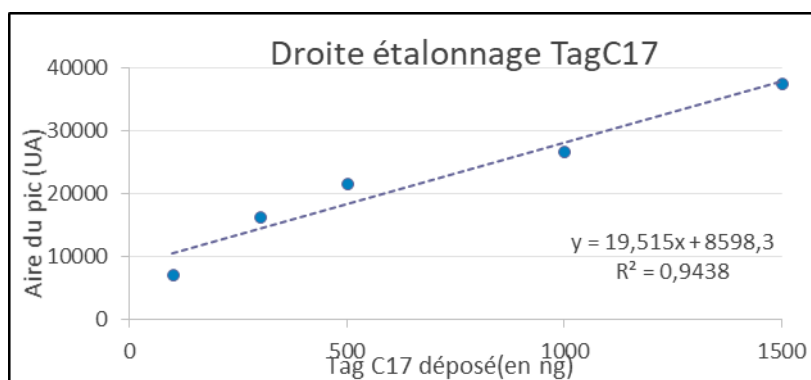
La quantification se fera à l'aide des encadrés rouges

Dysfonctionnement : les particules créant des grosses tâches sont une contamination extérieure non identifiée.



Calcul :

TagC17 droite	
Quantité déposée (ng)	Aire pic (UA)
100	7057
300	16306
500	21734
1000	26683
1500	37559



Calcul échantillon 1

- $X = (y - b) / a = (14765,25 - 8598,3) / 19,515 = 316$  ng
- $316 \times 100 = 31600$  ng pour 500  $\mu$ L  $\rightarrow$  le volume total au CEA est de 500  $\mu$ L et nous avons déposé 5  $\mu$ L sur la plaque ( $500/5 = 100$ )
- $31600 / 1000 = 31,6$   $\mu$ g pour passer de ng en  $\mu$ g
- $31,6 \times 3 = 94,8$   $\mu$ g  $\rightarrow$  nous avons envoyé 1/3 de l'extrait au CEA
- $94,8 / 2 = 47,4$   $\mu$ g/mL de culture  $\rightarrow$  car nous avons prélevé 2 mL de culture au départ

$\rightarrow$  Nous avons donc 47,4  $\mu$ g de triglycéride par mL de culture dans l'échantillon 1.

Nom	Volume déposé	Aire pic		Tag (ng) pour 500 $\mu$ L	Tag ( $\mu$ g)	Tag par mL de Culture
1	5.0 $\mu$ L	14765.25	316	31600	31,6	47,4
2	5.0 $\mu$ L	22095.53	691,64	69164	69,164	103,746
3	5.0 $\mu$ L	7822.52	<0 g			
3 bis	25.0 $\mu$ L	17602.62	461,41	9228,2	9,2282	13,8423

L'échantillon 3 à 5 $\mu$ L n'était pas assez concentré pour être quantifié nous avons donc pris le 3 bis à 25 $\mu$ L. Tous les autres échantillons à 5 ou 25 $\mu$ L sont <0 g donc non quantifiables. Cela est valable pour tout le reste du rapport, nous ne pouvons quantifier que les trois premiers.

## 6.5) COMPARAISON CCM/HPTLC

Nous quantifions ici les lipides de réserve des algues.

CCM	HPTLC
Ne demande pas beaucoup de matériel	Demande beaucoup de matériel
Pas cher	Gros investissement (coût)
Résultat normalement qualitatif mais dans notre cas absent	Résultat quantitatif et précis
Résultats rapides mais demande beaucoup de temps opérateur	Résultat rapide et peu de temps opérateur

Pour ces deux manipulations, cela aurait été bien de réaliser un blanc d'extraction des lipides, pour révéler d'éventuelles contaminations lors de la manipulation.

## 6.6) UTILITE DE LA TRANS METHYLATION

Cette étape rend volatile les acides gras et facilite leur élution lors de la chromatographie gaz. Elle permet aussi d'éliminer les composants qui préfèrent l'eau et le méthanol. Elle permet d'analyser les acides gras de la membrane (lipides polaires) et les lipides de réserve (lipides neutres, triglycérides). Elle coupe la liaison ester et donc enlève le glycérol pour le remplacer par un groupement méthyle ( $\text{CH}_3$ ).

## 6.7) CHROMATOGRAPHIE GAZ (LYCEE)

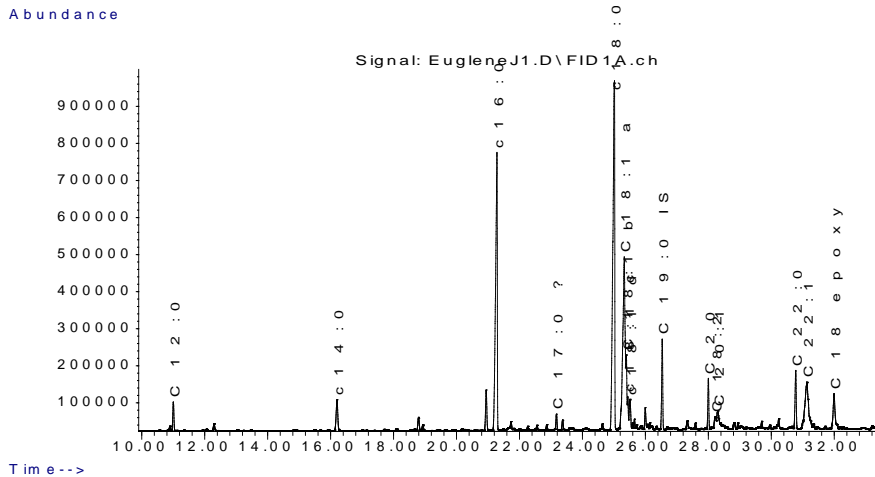
Résultat/dysfonctionnement : nous avons effectué différents chromatogrammes : hexane, huile d'olive, Tag C17 :0 et nos échantillons



Grace à tous nos résultats nous avons pu voir que la colonne sépare bien les lipides, mais que le détecteur FID (Détecteur à ionisation de flamme) n'est pas assez sensible pour permettre d'observer nos lipides à des concentration aussi faibles. Ce qui se vérifie, car nous nous sommes rendues compte trop tard que nous n'avions pas non plus observé le pic du Tag C17:0 il aurait fallu injecter une concentration > à 20 µg par échantillon.

Le passage de l'hexane aurait dû être réalisé en début de manipulation pour nettoyer la colonne.

## 6.8) CHROMATOGRAPHIE GAZ (CEA)



Nous avons ici un détecteur FID plus un spectromètre de masse

Résultats : nous n'avons pu caractériser que les trois premiers échantillons ; Dans les autres, des contaminations étaient beaucoup trop présentes pour avoir quelque chose de quantifiable.

Echantillon 1 : les lipides identifiés sont C12:0 acide laurique ; C14:0 acide myristique ; C16:0 acide palmitique ; C17:0 ? acide margarique ; C18:0 acide stéarique ; C18:1 acide oléique ; C19:0 étalon ; C20:0 acide arachidonique ; C20:1 acide

érunique ; C18:2 acide γ-linolénique (w6) ; C22:0 acide béhénique ; C18 époxy.

Après les avoir tous identifiés sur un premier échantillon, nous avons créé un programme pour les identifier sur tous les autres chromatogrammes

### Dysfonctionnement :

Nous supposons que le Tag C17 (C17:0 ?) trouvé est soit une dégradation du C19 soit une contamination du matériel utilisé (le standard interne utilisé ici est le tag C19:0). Les pics non identifiés sont probablement le BHT, des oxydations du BHT ou encore des résidus de plastique des bouchons inappropriés.

Les échantillons qui n'ont pas pu être analysés ont pu être contaminés par le transport dans des tubes non adaptés au solvant, ou par la manipulation lors de l'extraction ; C'est pour cela qu'il aurait été judicieux de faire un blanc.

µg lipide par mL de culture					
	RT (min)	Ech 0	Ech 1	Ech 2	Ech 3
C12:0	11.005	0,1	19,5	3,2	3,2
C14:0	16.259	0,6	30,9	12,6	12,2
<b>C16:0</b>	21.289	0,0	<b>280,7</b>	176,9	172,3
C18:0	25.047	0,0	389,4	228,4	198,2
C18:1 a	25.359	0,2	242,3	198,1	185,0
C18:1 b	25.359	0,2	39,8	34,5	11,5
C18:1 c	25.445	0,0	18,4	17,4	11,5
C18:1 d	25.572	0,0	28,3	26,4	18,3
C20:0	27.991	0,2	30,9	14,9	17,4
C20:1	28.299	0,2	24,8	7,3	8,4
C18:2	28.220	0,1	17,2	14,1	13,5
C22:0	30.787	1,6	45,4	9,8	15,1
C22:1	31.118	5,7	114,2	15,2	38,5
C18 epoxy	31.924	1,0	44,4	37,5	34,3

### Calcul :

#### **Exemple échantillon 1 avec le C16:0**

- (Aire du composé / aire de l'étalon C19) x 20  
= (28530994 / 6099023) x 20 = 93,6 µg pour 1/6 de l'échantillon (calcul avec les divisions préalable de l'échantillon.

→ Permet de réajuster le PIC en fonction de l'étalon C19:0 à 20 µg par échantillons et de transformer l'aire en quantité

- 93,6 x 6 = 651,6 µg pour avoir la valeur de la totalité de l'extrait
- 651,6 / 2 = **280,7 µg par mL de culture**  
→ 2 mL prélevé au départ

## 6.9) COMPARAISON CHROMATOGRAPHIE GAZ LYCEE/CEA

Les deux méthodes d'analyse permettent de quantifier la totalité des lipides de l'algue (membranaire plus réserve).

CPG	CG
Investissement important Permet une identification uniquement si on connaît le temps de rétention de ce que l'on cherche et qu'on a passé au préalable un étalon Demande la présence d'un technicien pour les injections Manque de sensibilité sur des quantités infimes	Investissement très important du au spectro de masse couplé à l'appareil Permet d'identifier presque n'importe quelle molécule Est capable d'injecter seul, peut donc effectuer des analyses dans la nuit grâce au passeur d'échantillons Très sensible

Plus la méthode de détection est fine (précise dans des quantités très faibles), plus la méthode d'analyse, préparation échantillon (manipulation : extraction des lipides, Trans méthylation) doit être délicate et non contaminante pour des résultats beaucoup plus propres.

## 6.10) CULTURE DES ALGUES

Nous pouvons conclure des résultats, obtenus grâce à toutes nos analyses, que nos cultures n'ont que très peu fonctionné. Nous ne pourrions donc pas faire de comparaisons sur nos thématiques de départ.

Les dysfonctionnements éventuels sont la probable contamination de nos cultures par nos manipulations (ce qui était plus ou moins observable sur lame de Malassez), le pH des milieux était peut-être trop acide car non tamponné, ce qui aurait pu jouer sur la difficulté des algues à se développer. Nous pouvons aussi estimer que nous ne les avons pas laissé se développer assez longtemps pour la thématique comparaison de carence d'azote ou non et dans de mauvaises conditions pour la thématique Age. Cependant, avec les observations effectuées grâce aux différents dosages, nous pouvons envisager que nous n'avons pas prélevé d'assez grandes quantités pour nos analyses ou alors, que nous les avons par la suite trop réparties (les échantillons analysés étaient dans ce cas trop dilués).

## VII – BUDGET

### 7.1) COMMENTAIRES DU BUDGET

- Pour transformer les prix HT (hors taxe) en prix TTC (toutes taxes comprises) nous avons utilisé une TVA à 20% ( $HT \times 1,2 = TTC$ )
- Le prix du gros matériel représente l'investissement total effectué. Nous ne pouvons pas effectuer les calculs pour l'amortissement. On a calculé pour un temps donné sur un nombre d'analyse car nous manquons de données au niveau d'un laboratoire scolaire
- Les calculs ne sont effectués que sur le laboratoire du lycée, la totalité du matériel utilisé à Cadarache n'y figure pas. On estime l'appareil HPTLC à 70 000 € et le CG couplé à un spectromètre de masse à 100 000 €.
- Nous pouvons aussi ajouter le coup de l'envoi des échantillons ainsi que le coup du déplacement du lycée jusqu'au CEA.
- Nous ne prenons pas en compte le coup d'achat de l'algue à l'Institut Pasteur au vu de son âge et des conditions de conservation de cette dernière
- Nous obtenons un total de coût de manipulation de 41,81 € TTC (produits + consommables). Notre budget était fixé à 200 €. Nous avons donc largement respecté notre budget

## 7.2) TABLEAU BUDGET HT ET TTC

## Produits

Produits	Quantité utilisée	Conditionnement	Prix HT	Prix réel
Ethanol	5 mL	1 L	4,20 €	0,02100 €
EDTA	5,8 mg	250 g	10,90 €	0,00025 €
Acide acétique	1,68 mL	1 L	4,50 €	0,00756 €
Méthanol	253 mL	1 L	5,70 €	1,44210 €
Chloroforme	35 mL	1 L	8,33 €	0,29155 €
KCl	0,12 g	250 g	2,25 €	0,00108 €
Acide sulfurique	9 mL	1 L	7,20 €	0,06480 €
BHT	5 mg	10 g	32 €	0,01600 €
C17	2 mg	10 g	29 €	0,00580 €
NaCl	727 mg	1 kg	4,25 €	0,00309 €
Ether diéthylique	22,3 mL	1 L	10,90 €	0,24307 €
CuSO4	20 g	250 g	8,67 €	0,69360 €
H3PO4	8 mL	1 L	14,60 €	0,11680 €
CaCl2, 2H2O	25 mg	500 g	30,60 €	0,00153 €
MgSO4, 7H2O	75 mg	500 g	60,50 €	0,00303 €
K2HPO4	75 mg	1 kg	99,20 €	0,00744 €
KH2PO4	175 mg	1 kg	80,90 €	0,01416 €
H3BO3	2,4 mg	500 g	45,80 €	0,00022 €
MnCl2, 4H2O	1,8 mg	500 g	95,40 €	0,00034 €
ZnSO4, 7H2O	0,22 mg	1 kg	119,80 €	0,00003 €
CuSO4, 5H2O	0,08 mg	500 g	116,30 €	0,00002 €
CoSO4, 7H2O	0,09 mg	500 g	9,60 €	0,00000 €
VOSO4, 2H2O	0,043 mg	10mg	15,40 €	0,06622 €
Vitamine B12	40 µg	30 mg	2,19 €	0,02920 €
Biotine	40 µg	3 g	24,90 €	0,00033 €
Javel	1 L	1 L	4,53 €	4,53000 €
MgSO4, 7H2O	1 g	500 g	60,50 €	0,12100 €
K2PO4	1 g	1 kg	99,20 €	0,09920 €
KNO2	10 g	1 kg	49,60 €	0,49600 €
Peptone (de viande)	1 g	500 g	68,40 €	0,13680 €
Fe EDTA	11,6 mg	1 kg	0,81 €	0,00001 €
Hexane	156,2 mL	1 L	13,20 €	2,06184 €
			Total produits HT	10,47407 €
			Total produits TTC	12,5688798

## Consommable

Produits	Quantité utilisée	Conditionnement	Prix HT	Prix réel
Cônes 0,5 - 10 µL	50	1000	6,00 €	0,30000 €
Cônes 100 - 1000 µL	50	1000	9,83 €	0,49150 €
Cône 1 - 5 mL	50	1000	9,83 €	0,49150 €
Cône 10 - 100 µL	50	1000	9,83 €	0,49150 €
Pipette pasteur	100	1000	67,82 €	6,78200 €
Gants vinyle	100	100	4,02 €	4,02000 €
Parafilm	1	38 m	36,72 €	0,96632 €
Tube ependorf	8	1000	49,74 €	0,39792 €
Lame	12	50	2,44 €	0,58560 €
Lamelle	12	1000	13,44 €	0,00089 €
Plaque silice 20 cm	1	25	185,61 €	7,42440 €
Cuve spectro	20	100	8,10 €	1,62000 €
Micropipette capillaire	10	250	19,90 €	0,79600 €
			Total consommable HT	24,37 €
			Total consommable TTC	29,24 €

Total (produit + consommable) HT	34,84 €
Total (produit + consommable) TTC	41,81 €

## Gros matériel

Produits	Prix HT	
Micro pipette 0,5 - 10 µL	58,75 €	
Micro pipette 100 - 1000 µL	58,75 €	
Micro pipette 1 - 5 mL	58,75 €	
Micro pipette 10 - 100 µL	58,75 €	
Eprouvette 100 mL	6,96 €	
Bécher 50 mL	5,01 €	
Erlen 250 mL	6,67 €	
Fiole jaugée 200 mL	22,78 €	
Poire d'aspiration	2,54 €	
Propipette	66,91 €	
Pipette jaugée 1 mL	4,48 €	
Pipette graduée 2 mL	2,45 €	
Pipette graduée 1 mL	2,42 €	
Pipette graduée 5 mL	2,87 €	
Pipette graduée 10 mL	6,20 €	
Pipette graduée 20 mL	5,32 €	
Spatule 250 mm	8,01 €	
Sabot de pesée 35 mL	6,33 €	
Sabot de pesée 10 mL	5,29 €	
Entonnoir 80 mm	1,02 €	
Entonnoir 100 mm	1,47 €	
Pissette eau/alcool	4,60 €	
Bain marie	778,00 €	
Chronomètre	15,62 €	
Lunette de sécurité	2,14 €	
Blouse	47,01 €	
Portoir de tube	6,56 €	
Tube à hémolyse (verre)	7,67 €	
Centrifugeuse	6 913,00 €	
Vortex	166,25 €	
Colone CPG	625,00 €	
CPG (appareil)	40 000,00 €	
Sorbone	5 043,00 €	
Tube en verre	6,84 €	
Four	120,00 €	
Falcon pour autoclave 250 mL	29,70 €	
Autoclave	11 539,50 €	
Seringue CPG	193,30 €	
Balance de pesée	923,33 €	
Algothèque	1 000,00 €	
Agitateur magnétique	112,00 €	
Aimant	9,20 €	
Spectrophotomètre	4,58 €	
Cellule de Malassez	22,93 €	
Microscope	4 500,00 €	
Becher 100 mL	50,67 €	
Thermomètre	3,25 €	
Bouchon pour fiole	1,94 €	
Seau de 5L	3,05 €	
Gants de sécurité	4,73 €	
Total gros matériel HT		72 525,59 €
Total gros matériel TTC		87 030,71 €

## VIII – CONCLUSION

- Les analyses réalisées dans le cadre de notre projet nous ont permis d'arriver à plusieurs conclusions concernant nos manipulations :

Pour celles réalisées au lycée il aurait fallu plus d'anticipation et de réflexions préalables afin d'obtenir des résultats plus concluants. Mais grâce aux manipulations réalisées au CEA nous avons pu comprendre d'où venaient nos erreurs et comment nous aurions pu les rectifier (ce qui n'a pas été fait par manque de temps). Au vu de la quantité de lipides présents dans nos échantillons, nous n'avions pas un matériel assez précis au lycée pour les observer et nous n'aurions pas pu les identifier.

- Nos résultats de manipulations nous permettent par la suite de conclure sur la qualité de nos cultures qui sont les suivantes :

Pour la thématique sur la pertinence de l'utilisation de milieu azoté ou non azoté, les algues n'ont pas poussé. Cela est sûrement dû à un matériel non optimal, une contamination par des bactéries, un milieu trop acide, des temps de génération trop longs par rapport au temps d'analyse... Tous ces paramètres auraient dû être contrôlés et anticipés, cependant, au vu du cadre de réalisation de l'étude, de tels « résultats » étaient prévisibles.

En revanche, nous avons pu constater que les échantillons d'Euglène âgés et cultivés par notre professeur de biologie pendant plusieurs années (échantillons 1 et 2), présentent des caractéristiques intéressantes pour la réalisation de biocarburant. En effet, ces algues ont une majorité de chaînes carbonées courtes inférieures à C18 et non insaturées. Ces chaînes sont plus facilement utilisables pour la création de biocarburant, car les caractéristiques qu'elles présentent limitent au maximum les oxydations permettant un stockage sur du beaucoup plus long terme. Les souches présentent aussi un caractère intéressant supplémentaire et surprenant : la présence du lipide C18 époxy normalement créé par les feuilles des arbres comme résine pour leur protection à l'eau. A quoi sert ce lipide dans une algue et comment est-elle arrivée à en avoir besoin ?

Nous pouvons estimer que l'algue garde ses caractéristiques en étant repiquée dans un nouveau milieu grâce aux résultats de l'échantillon 3. Nous ne pouvons pas conclure sur la présence de ces lipides dans les algues, si la souche a muté avec les conditions qui lui ont été infligées ou si la souche sauvage les comporte aussi (nous manquons de données sur la souche sauvage d'euglène)

Toutes les caractéristiques qu'ont permis de soulever nos analyses sont des questionnements pour Stéphan Cuiné qui aimerait par la suite prendre plus de temps pour analyser la souche. Mieux la comprendre et voir si elle garde vraiment ces caractéristiques permettrait d'avoir une souche prometteuse pour les biocarburants.

## IX – ANNEXE PROTOCOLES

## 10.1) DOSAGE DES ALGUES

Spectrophotométrie :

Formules calculs concentration chlorophylles ( $\mu\text{g/mL}$ )

= (DO 653 – DO 750) x 19,71 + (DO 666 – DO 750) x 4,44 (Proportionnel à la quantité d'algues)

Cellule de Malassez :

Comptage cellulaire

Calcul = cellules comptées x 100 x 1000

## 10.2) EXTRATION DES LIPIDES DANS LES ALGUES

- Prélever 1 mL de culture, centrifuger 10 min à 3000 rpm (rotation par minute) à 4°C
- Vider le surnageant
- Reprendre le culot dans 1 mL de solution 1Mm EDTA et 0,5 mM acide acétique puis transférer dans un tube en verre
- Ajout 3 mL de méthanol : chloroforme (2:1)
- Vortexer 10 min (lyse cellulaire)
- Ajout 1 mL chloroforme
- Ajout de 0,8 mL de solution à 0,8% de KCL (précipitation des protéines)
- Vortexer brièvement pour mélanger
- Centrifuger 2 min à 3000 rpm à 4°C
- Prélever la phase inférieure et la placer dans un nouveau tube en verre (phase organique)
- Renouveler l'extraction sur la phase aqueuse restante, ajout 1 mL d'hexane. Vortexer, centrifuger,
- Prélever la phase supérieure et la mélanger à la phase déjà isolée
- Utiliser directement pour manipulation ou congeler à -20°C

## 10.3) CCM (LYCEE) ET HPTLC (CEA)

A partir des extraits de lipides, évaporer et reprendre dans 500  $\mu\text{L}$  d'hexane

Déposer sur plaque silice les échantillons

Solvant : hexane : Ether diéthylique : acide acétique (17 : 3 : 0,2, vol/vol)

Colorant : MeOH (200 mL),  $\text{CuSO}_4$  (20g),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (8 mL),  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (8 mL),

Chauffer 30 min 140°C

## 10.4) TRANS METHYLATION

- Placer 1 mL d'extrait de lipides dans le tube.
- Ajouter 1 mL d'acide sulfurique à 5% dans le méthanol.
- Ajouter 500  $\mu\text{L}$  du mélange préparé (160  $\mu\text{L}$  de BHT et 80  $\mu\text{L}$  de tag C17 :0) .
- Placer les tubes au vortex pendant 30 secondes.
- Chauffer les tubes à 85°C pendant 90 minutes.
- Ajouter 1.5 mL de 0.9% de NaCl.
- Ajouter 1 mL d'hexane.
- Centrifuger à 4000 rotations par minute pendant 2 minutes.
- Récupérer la phase supérieure et transférer dans un nouveau tube.
- Évaporer sous flux d'azote en chauffant à 35°C.
- Ajouter 250  $\mu\text{L}$  d'hexane, pipeter le tout, le placer dans un flacon de GC FID.
- Lancer l'analyse.

## 10.5) CHROMATOGRAPHIE GAZ (LYCEE/CEA)

Caractéristique de l'appareil (Lycée)

- Injecteur : Température : 250°C, mode : Split, split flux : 10 ml/min, ratio : 5
- La seringue : injecté 4  $\mu\text{L}$  au CEA ou 0,5  $\mu\text{L}$  au lycée
- Le four : La température du four est programmée par palier successif (en gradient), 50°C pendant 1min50, 150°C avec un avancement de 15°C/min, 250°C avec un avancement de 6°C/min
- La colonne : Colonne polaire TR-WAX, thermo-long 30 m, diamètre intérieur de 0.32 mm, taille des pores de 0.25  $\mu\text{m}$
- Gaz vecteur :  $\text{H}_2$  à 2 ml/min
- Détecteur : Détecteur à ionisation de flamme (FID), température de 250°C