

Sciences à l'École



Lycée René Char



C.gENial

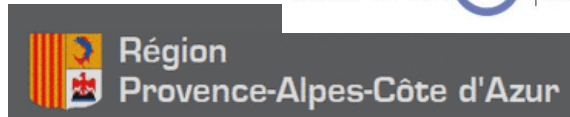
Fondation pour la culture scientifique et technique



GENOPOLE  
VIVRE L'INNOVATION



académie Aix-Marseille | ac-aix-marseille.fr



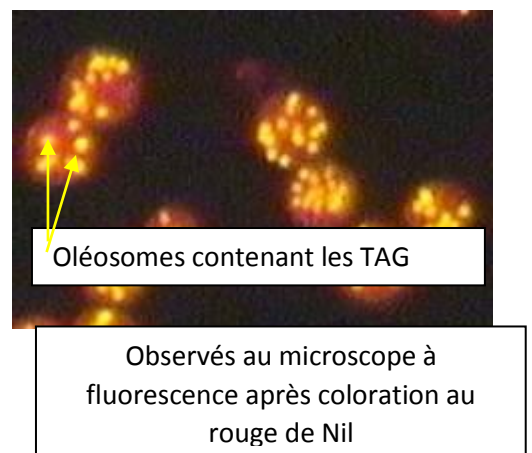
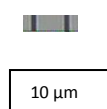
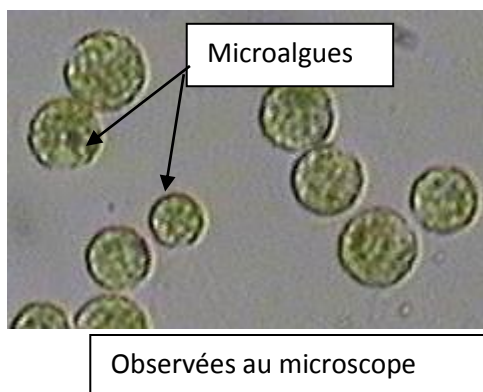
## Explorer la diversité génétique des microalgues pour produire un bio carburant de qualité



Par les élèves du TPE Génome du lycée René Char 2014-2015

## Produire du bio-pétrole à partir de microalgues

Les microalgues produisent au sein de leur unique cellule dans des oléosomes, des réserves de lipides ou triglycérides (TAG) ces molécules hautement énergétiques sont composées d'acides gras qui peuvent remplacer le pétrole fossile après un traitement approprié.



**Les recherches sur les algo-carburants peuvent se ranger selon trois axes :**

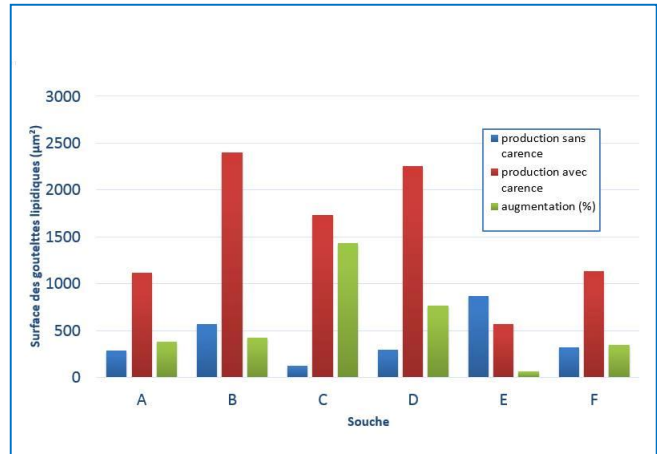
- 1 - explorer la diversité des microalgues afin de trouver celles qui produisent les plus grandes quantités de lipides avec des acides gras les plus adaptés à l'utilisation pour les moteurs.
- 2 - rechercher les techniques permettant de mettre les microalgues dans les meilleures conditions de production.
- 3 - rechercher et optimiser les procédés de récolte et de traitement de la matière énergétique.

Nous nous sommes intéressés en particulier au premier de ces trois axes :

## Exploration de la biodiversité des microalgues pour un carburant de meilleure qualité

**Au cours des années précédentes**, les équipes d'élèves se sont penchées sur l'aspect quantitatif en étudiant des souches de laboratoire *Chlamydomonas reinhardtii* et des souches sauvages prélevées dans la nature. La production des TAG par les cellules est activée par une carence azotée. Les microalgues répondent à la carence en minéraux en stockant des molécules riches en énergie ce qui leur permet de résister à la mauvaise période.

Les équipes ont pu mettre en évidence entre autres une différence de production de lipides entre différentes souches de *Chlamydomonas reinhardtii* et une différence de réactivité à la carence.



**Cette année**, nous nous intéressons plutôt à l'aspect qualitatif.

Au cours de leur synthèse par la cellule, les acides gras sont modifiés (désaturés) pour répondre aux exigences métaboliques. C'est ainsi que sont synthétisés les omégas 3 (dit aussi insaturés), bien connu pour leur effet bénéfique sur l'alimentation humaine. Cependant pour constituer un biocarburant, les acides gras saturés présenteraient l'avantage d'être plus stables.

En 2013 l'équipe de chercheurs du LB3M de cadarache publie un article concernant l'identification chez *Chlamydomonas reinhardtii* d'une enzyme impliquée dans la désaturation des acides gras : **The Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii* Has a Single v-3 Fatty Acid Desaturase That Localizes to the Chloroplast and Impacts Both Plastidic and Extrplastidic Membrane Lipids** Hoa Mai Nguyen, Stéphan Cuiné, Audrey Beyly-Adriano, Bertrand Légeret, Emmanuelle Billon, Pascaline Auroy, Fred Beisson, Gilles Peltier, and Yonghua Li-Beisson

En septembre 2014, nos chercheurs référents Fred Beisson et Yonghua Li-Beisson du laboratoire de cadarache nous signalent qu'une équipe américaine vient d'identifier une souche de laboratoire de *Chlamydomonas reinhardtii* ayant perdu la fonction de cette enzyme suite à une mutation : **A high-throughput fatty acid profiling screen reveals novel variations in fatty acid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and related algae.**<sup>3</sup> Erin L. Pflaster<sup>1</sup>, Michael J. Schwabe<sup>1</sup>, Joyanne Becker<sup>1,2</sup>, Melissa S. Wilkinson<sup>1</sup>, Ashley Parmer<sup>1,3</sup>, Thomas .

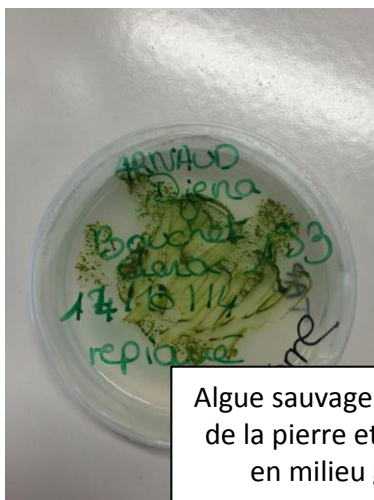
Ainsi cette souche produirait des acides gras plus adaptés pour la production de biopétrole.

Nous nous proposons de commander cette souche et de tenter de retrouver cette mutation de par nous-même et de vérifier si nos souches sauvages ainsi que les différentes souches du laboratoire de Cadarache sont touchées ou pas par la mutation.

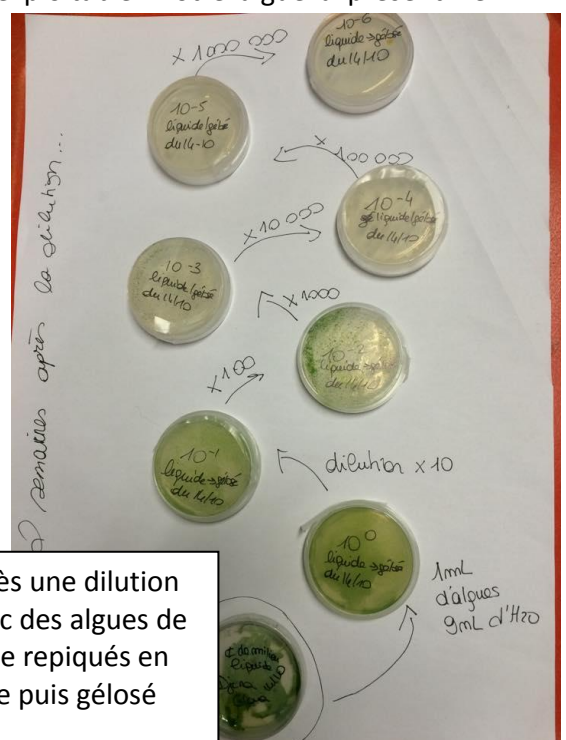
## Chaque binôme se spécialise dans une étape

### 1- Isolement des algues sauvages réalisé par Clara et Djena

Notre partie au sein du projet des TPE génome du lycée René char a débuté lorsque tous en classe avons repiqué des algues dans des milieux gélosés et liquides qui provenaient d'une pierre trouvée dans le jardin de notre professeur et où des algues semblaient accrochées dessus. Une semaine après, nous observons les résultats, et par chance les algues se sont développées dans nos cultures. Est-elle de l'espèce de chlamydomonas reinhardtii? Sinon produit-elle autant de lipides qu'elle? Nous avons dans un premier temps essayé d'isoler notre algue, afin de n'avoir qu'une colonie et ainsi pouvoir mieux l'observer. Pour cela nous avons réalisé une dilution en cascade. Les algues étant désormais en petite quantité dans les géloses, les champignons ont pris le dessus. Nous avons donc du trouver une véritable démarche d'élimination de ceux-là. Nous avons d'abord pensé à un antifongique, l'un des moyens les plus radicaux pour éliminer les champignons, mais il s'est avéré que celui-ci a détruit en parti l'algue. Nous avons donc procédé à un plan B en arrêtant l'agitation de nos algues, dans le but que celles-ci s'accrochent au bocal. Une fois cette étape réalisée nous avons pu vider le liquide qui contenait la majeure partie des champignons. La fiole a été rincée à plusieurs reprises afin de rendre l'algue la plus saine possible. Nous avons ensuite gratté pour récupérer l'algue, nous l'avons placé en milieu liquide. Cette algue a été ensuite centrifuger, et après récupération du culot nous avons pu purifier notre algue et la rendre exploitable. Notre algue à présent ne contient plus de champignons, nous avons alors pu réaliser le protocole de la mise en évidence des lipides. Malgré nombreuses réalisation de ce protocole, nous avons été obligées d'admettre que notre algue ne produit pas de lipides. Notre démarche nous a aussi permis de réaliser que notre algue n'était pas une chlamydomonas car les amorces fabriquées à partir du génome de chlamydomonas n'ont pas permis l'amplification.



Algue sauvage provenant de la pierre et repiquée en milieu gélosé



Les algues après une dilution en cascade avec des algues de milieu sauvage repiqués en milieu liquide puis gélosé

## 2 - Comparaison des productions lipidiques des souches étudiées par Chloé Lara et Audrey Guilhou

A partir des résultats de l'année dernière nous avons choisi de travailler sur deux souches de référence de *Chlamydomonas reinhardtii*. Une souche A dite « témoin » produisant peu de lipides et une souche D dite « quantitative » produisant beaucoup de lipides, toutes les deux issues du laboratoire de recherche de Cadarache.

Enfin bien sûr, nous travaillons sur la souche que nous avons commandée, la souche G dite « qualitative ». Nous savons qu'elle produit des lipides saturés mais sa production de lipide est-elle assez rentable par rapport à la souche D qui produit beaucoup ? Pour prouver ses résultats nous avons fait une étude microscopique fluorescente afin d'observer la production de lipides de chacune de ces souches. Nous avons ensuite mis en commun nos résultats avec ceux de Clara et Djena pour comparer avec la production lipidique de la souche sauvage.

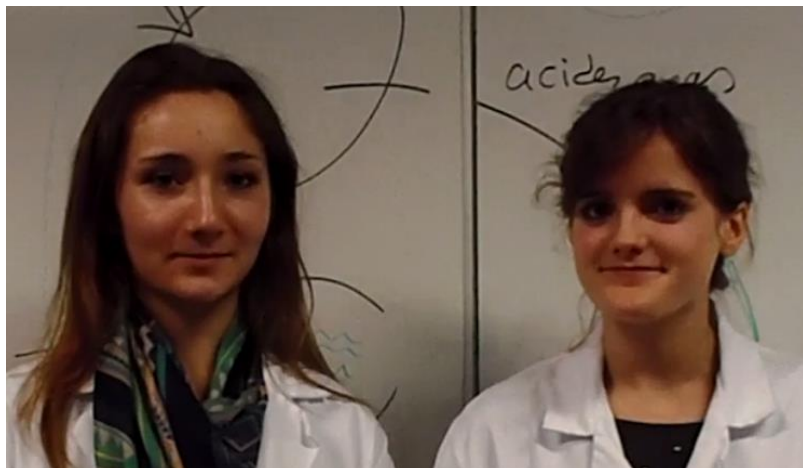


## 3 – Repérage de la mutation et comparaison génétique des souches étudiées

Après l'extraction de l'ADN, nous pourrions amplifier, par PCR, la partie pouvant porter la mutation et ainsi avoir la quantité suffisante pour permettre au Génopole d'Evry de la séquencer. Nous pourrions alors comparer les séquences des différentes souches et retrouver celle(s) qui possède(nt) la mutation.

### 3a - Préparation de l'extraction de l'ADN par Léa Balze et Margaux Clastre

Dans un premier temps, nous devons obtenir une quantité précise de cellules ( $30 \cdot 10^6$  cellules) afin de pouvoir réaliser l'extraction. Dans le cas contraire, les



réactifs utilisés pour l'expérience sont inefficaces. Nous avons donc choisi d'utiliser la méthode des lames de Kova, qui permet de compter les cellules dans un volume donné.

Une fois la concentration en cellules déterminée, il ne reste plus qu'à prélever un volume que nous calculons pour obtenir le nombre souhaité, c'est à dire  $30 \cdot 10^6$  cellules.

lame de Kova



Quand cette première étape a été réalisée, nous pouvons extraire l'ADN en suivant le protocole fourni par le kit. Nous avons donc procédé à diverses manipulations allant de l'ajout de réactifs (tels que le Buffer AP1 ou la RNase) à l'utilisation de la centrifugeuse à plusieurs reprises. Ceci a principalement permis la lyse cellulaire (la désintégration de la membrane cellulaire par l'action d'un agent extérieur), la précipitation des divers composants de la cellule (protéines, polysaccharides...), et la rupture des chaînes de nucléotides de l'ARN. Ces éléments ont été séparés de l'ADN grâce à l'action de la centrifugeuse. Ainsi nous avons pu extraire uniquement le composant moléculaire de la cellule qui nous intéressait pour la suite du projet, soit l'ADN.



Photo prise pendant l'extraction de l'ADN

3b - Préparation de l'amplification (dessin des amorces) par Mélodie Einig Iscain et Olivianne Ritzenthaler

Après quelques recherches sur internet sur les dernières trouvailles en microalgues, nous avons découvert que le gène muté est le gène FAD7.



Nous avons approfondi nos connaissances sur ce gène grâce à l'article suivant : « A high-throughput fatty acid profiling ».

Sa mutation a été découverte à l'université du Nebraska dans le Lincoln, par le « center for plant science innovation ».

Ensuite pour trouver la partie mutée de la séquence du gène, il nous a fallu utiliser Phytozome (site internet du même genre que NCBI). On a pu déterminer la localisation de la mutation dans la séquence [soit les n° des 3 nucléotides] où la mutation a lieu.

Pour ce faire on a donc dû rentrer la séquence où se situait le gène FAD7, fournie par l'article cité précédemment, pour trouver la séquence qui correspondait à la localisation de ce gène.

Une fois cela fait, nous avons donc pu définir les amorces (ou primer en anglais) pour amplifier la partie désirée et envoyer nos résultats. Nous avons par la suite reçu les résultats du séquençage.

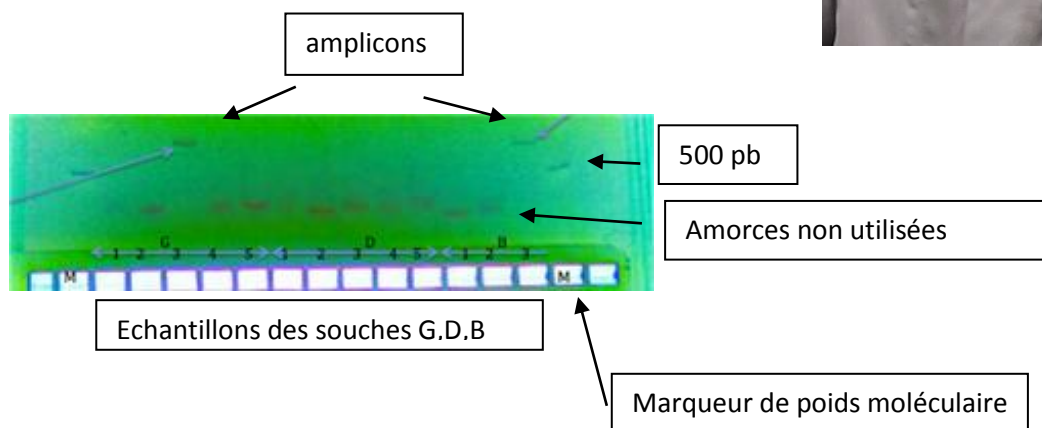
Parmi les cinq couples d'amorces définies, seul le couple n° 3 a fonctionné.

### 3c - Amplification et Exploitation des fichiers de séquences obtenues par Emma Falzei et Ramzy Bacha

La PCR (Polymérase Chain Réaction) est une réaction qui sert à amplifier l'ADN.

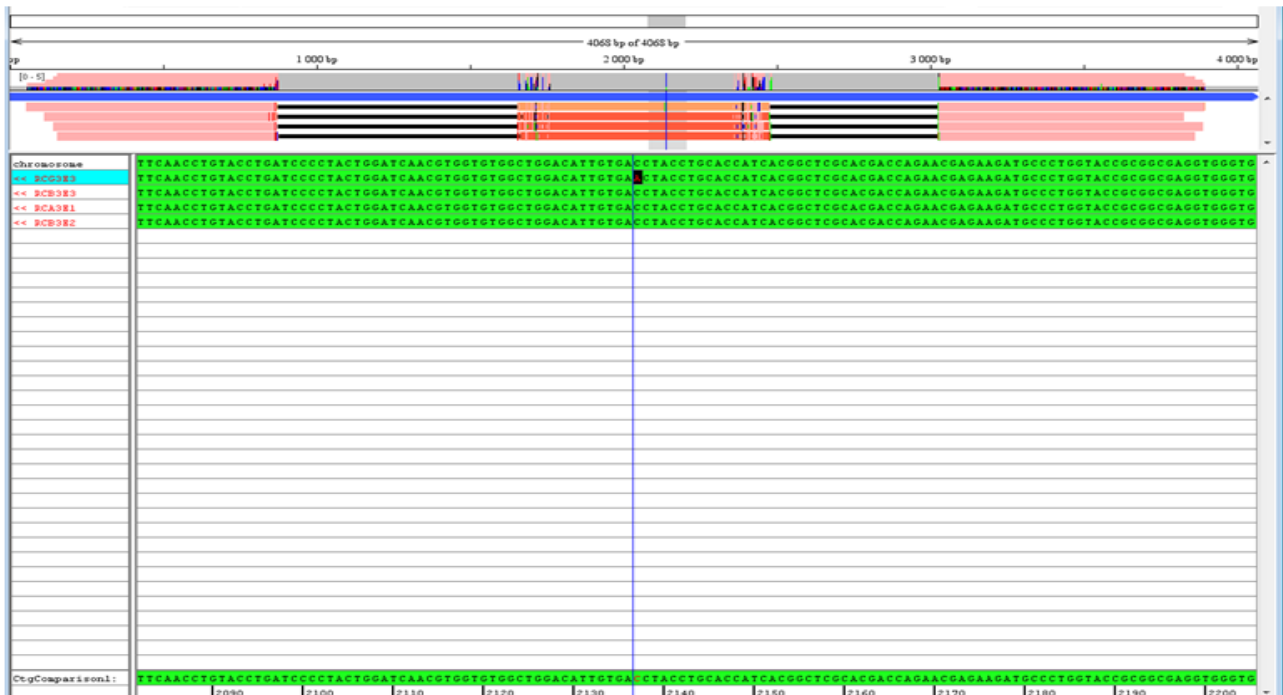
L'électrophorèse va nous permettre de vérifier si l'amplification a fonctionné.

Les résultats d'électrophorèse ci-dessous montrent que sur les 13 échantillons traités ici, deux ont pu être amplifiés (G3 et B3).



Après plusieurs séances d'amplification nous avons finalement obtenus des résultats positifs pour le couple d'amorce n° 3 sur les souches A,B,D,G. Les échantillons d'ADN amplifiés ont été envoyés au génopôle d'EVRY pour être séquencés.

Les résultats de séquençage ont pu être exploités grâce à l'application Codoncode.



Nous avons comparé ici les séquences de l'amplicon n°3 (amplicon produit par le couple d'amorces n°3) pour les souche A,B,G et D

Nous pouvons constater que la mutation consiste en une modification d'un seul nucléotide : C est remplacé par A

De plus, la mutation est présente ici seulement sur la souche G. Cette petite mutation sur le gène a une grande conséquence sur l'enzyme désaturase codée par le gène. L'enzyme perd sa fonction et ne peut plus former sur les acides gras des doubles liaisons. Ainsi les acides gras produits sont saturés et plus stables pour être utilisés comme biocarburant.



## Annexe

### Les dates clef du projet

09/09/2014	Début des TPE
07/09	Nous isolons des souches sauvages trouvées sur des pierres calcaires et dans le sol
14/10	Réception et mise en culture des souches de laboratoire venant de cadarache (chaque année nous devons repiquer des souches indemnes de contamination) Lecture en avant-première de l'article concernant la souche mutée G
17/11	Réception de la souche G (De l'Université du Minnesota)
16/12	Extraction de l'ADN des souches étudiées
19/12	Visite du laboratoire LB3M sur le centre de Cadarache et de la Cité des énergies (projet biomasse 3 G)
06/01/2015	Commande des amorces que nous avons dessinées pour l'amplification de l'ADN
27/01	Etude de la production des lipides des souches par microscopie à fluorescence
03/02	Amplification n°1 de l'ADN extrait obtention d'échantillons d'ADN à séquencer pour les souches A, B et D
17/02	Amplification n°3 de l'ADN extrait obtention d'échantillons d'ADN à séquencer pour les souches G, B Et envoi des échantillons d'ADN au Génopole d'Evry
13/03	Réception des séquences envoyées par Corinne Cruaud du Génopole d'Evry