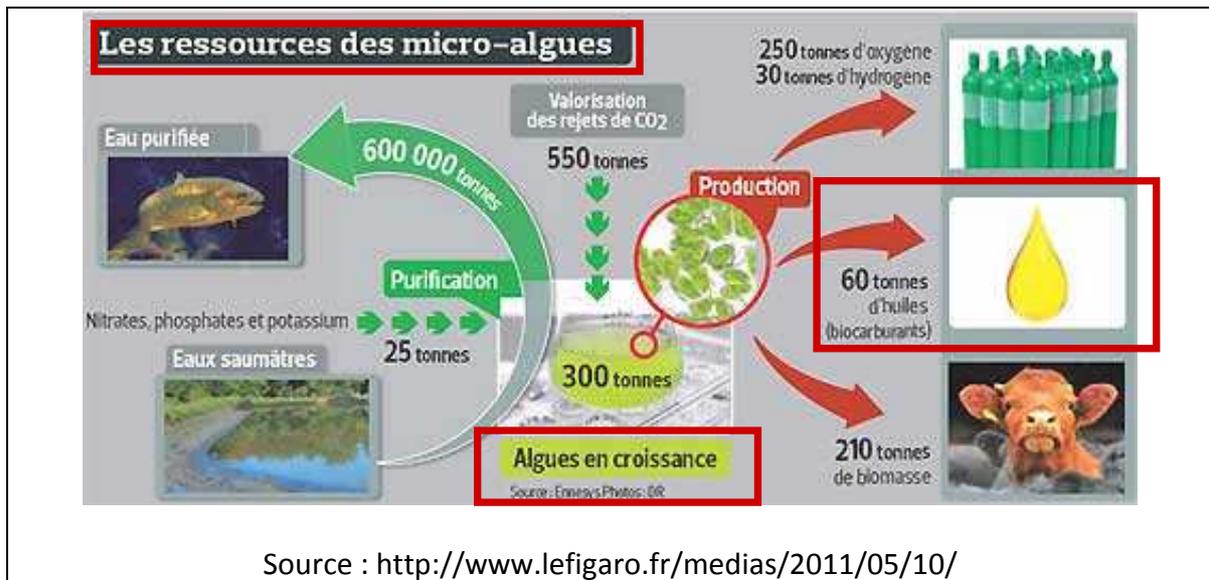


Microalgues et biodiesel

*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 de justesse comme l'écart entre la valeur mesurée et la valeur annoncée de la suspension contrôle.

- 4.2.4. Quantifier le défaut de justesse de cette méthode de dénombrement en calculant l'erreur de justesse 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 m³.
- 4.3.2. En utilisant la valeur du taux de croissance calculé dans la question 4.2.5. 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. Enoncer 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.