

Culture de microalgues

- [Introduction](#)
- [1. Construire un bioréacteur à microalgues](#)
- [2. Culture de Chlamydomonas reinhardtii](#)
- [Culture de Dunaliella](#)

Introduction

Informations

- Guillaume Oiry
- guillaume.oiry@etu.sorbonne-universite.fr
- M2 Biologie Intégrative et Physiologie - Mention Neurosciences
- **Date de début - Date de fin estimée (ou réelle)**

CONTEXTE

Les microalgues sont des micro-organismes eucaryotes ayant une capacité photosynthétique. Ces propriétés leur confèrent un grand nombre d'avantages pour la production d'aliments et de protéines à intérêt médical, ainsi que pour le traitement de l'air et des eaux polluées.

Leur capacité de photosynthèse les rend pratiquement autonome quant à la production de molécules organiques nécessaires à leur subsistance, ayant essentiellement besoin d'eau, de lumière et de dioxyde de carbone.

Étant microscopiques, elles peuvent proliférer jusqu'à une très grande densité. En comparaison aux végétaux, pour une même surface ou volume de culture, les microalgues peuvent capter plus de dioxyde de carbone dans l'air ambiant, et produire une plus grande quantité de nutriments. Certaines microalgues sont riches en nutriments essentiels comme les protéines, les acides gras oméga-3 et les vitamines.

Enfin les microalgues peuvent être modifiées génétiquement pour produire des protéines à intérêt médical. Étant des organismes eucaryotes, leur machinerie cellulaire est relativement proche de celle des cellules animales, ce qui les rend plus fidèles que les bactéries et en même temps moins chères que les cellules animales (bien qu'un certain nombre de différences subsistent).

Les microalgues sont relativement simples à cultiver. Mais si nous voulons les étudier, les manipuler et contrôler un certain nombre de paramètres, nous avons d'abord besoin d'un bioréacteur.

Références

- Hypes, hopes, and the way forward for microalgal biotechnology :
[https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(22\)00345-6](https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(22)00345-6)

OBJECTIFS

1. Construire un bioréacteur à microalgues

Les microalgues sont relativement simples à cultiver. Mais si nous voulons les étudier, les manipuler et contrôler un certain nombre de paramètres, nous avons d'abord besoin d'un bioréacteur. Il doit répondre à certains critères :

- Approvisionnement automatique en dioxyde de carbone
- Agitation automatique pour éviter la sédimentation des microalgues et optimiser le rendement
- Ajustement de différents paramètres d'intérêt comme l'intensité et la qualité de la lumière
- Mesure de différentes variables comme la densité optique pour la croissance et la fluorométrie pour l'efficacité de photosynthèse, et ceci de façon automatique
- Moindre coût et idéalement fabriqué par toute personne sans expérience particulière

→ Tous ces critères sont remplis par le bioréacteur open-source Phenobottle, que nous allons fabriquer : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926420309735>

2. Premier test du bioréacteur

Pour vérifier que le bioréacteur fonctionne correctement nous allons tenter de reproduire les résultats de l'étude citée plus tôt, qui évalue différents paramètres d'une culture de la microalgue *Chlorella vulgaris* en employant donc ce même bioréacteur.

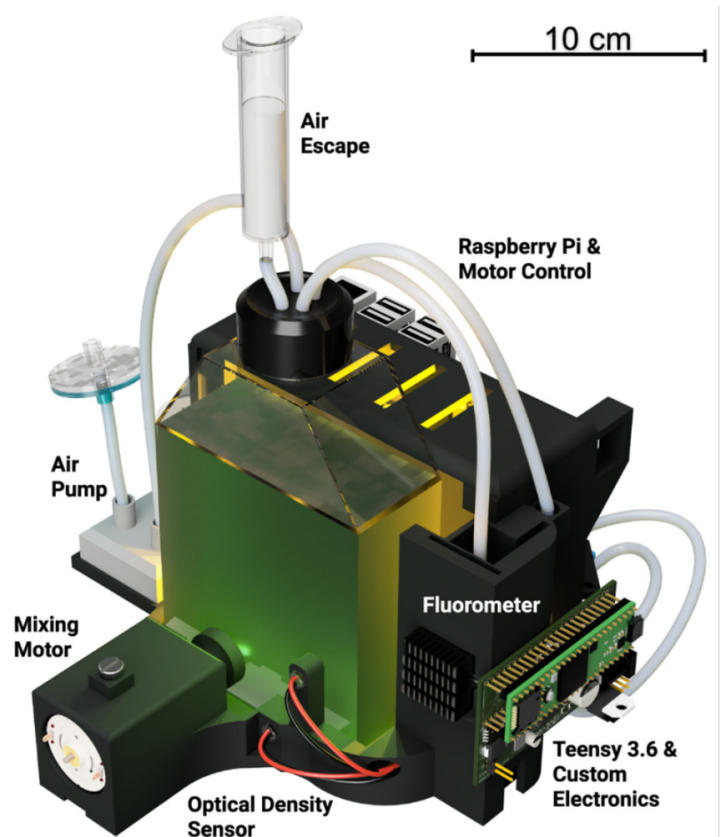
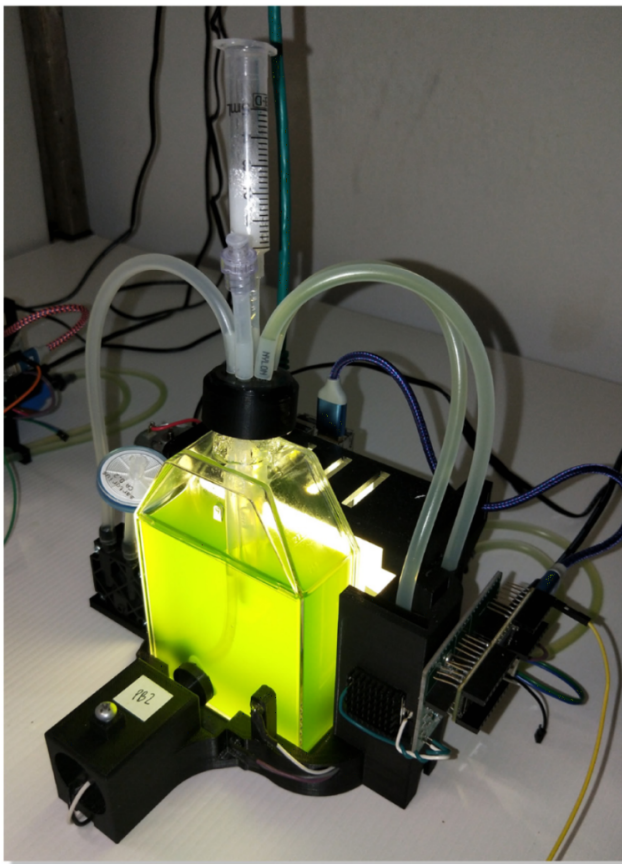
1. Construire un bioréacteur à microalgues

<https://github.com/HarveyBates/Phenobottle>

LISTE DU MATÉRIEL

hardware+.ods

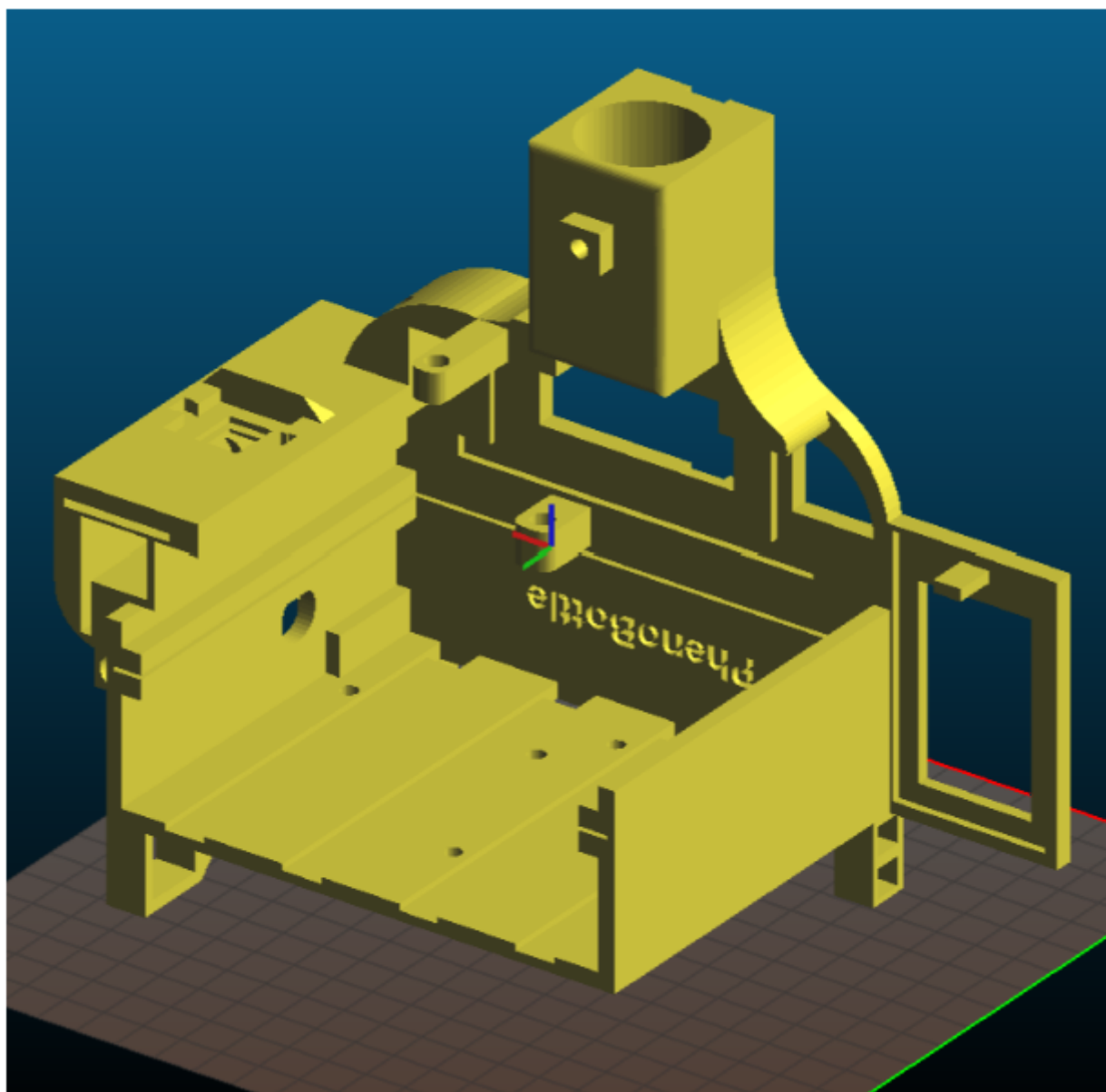
Adapté de la liste de Harvey Bates (voici l'original : [Phenobottle Hardware BOM.csv](#)), avec des liens vers les références qu'il a utilisées, et des références qu'on peut trouver en France (j'ai essayé de trouver les plus fidèles et les moins chères possible).



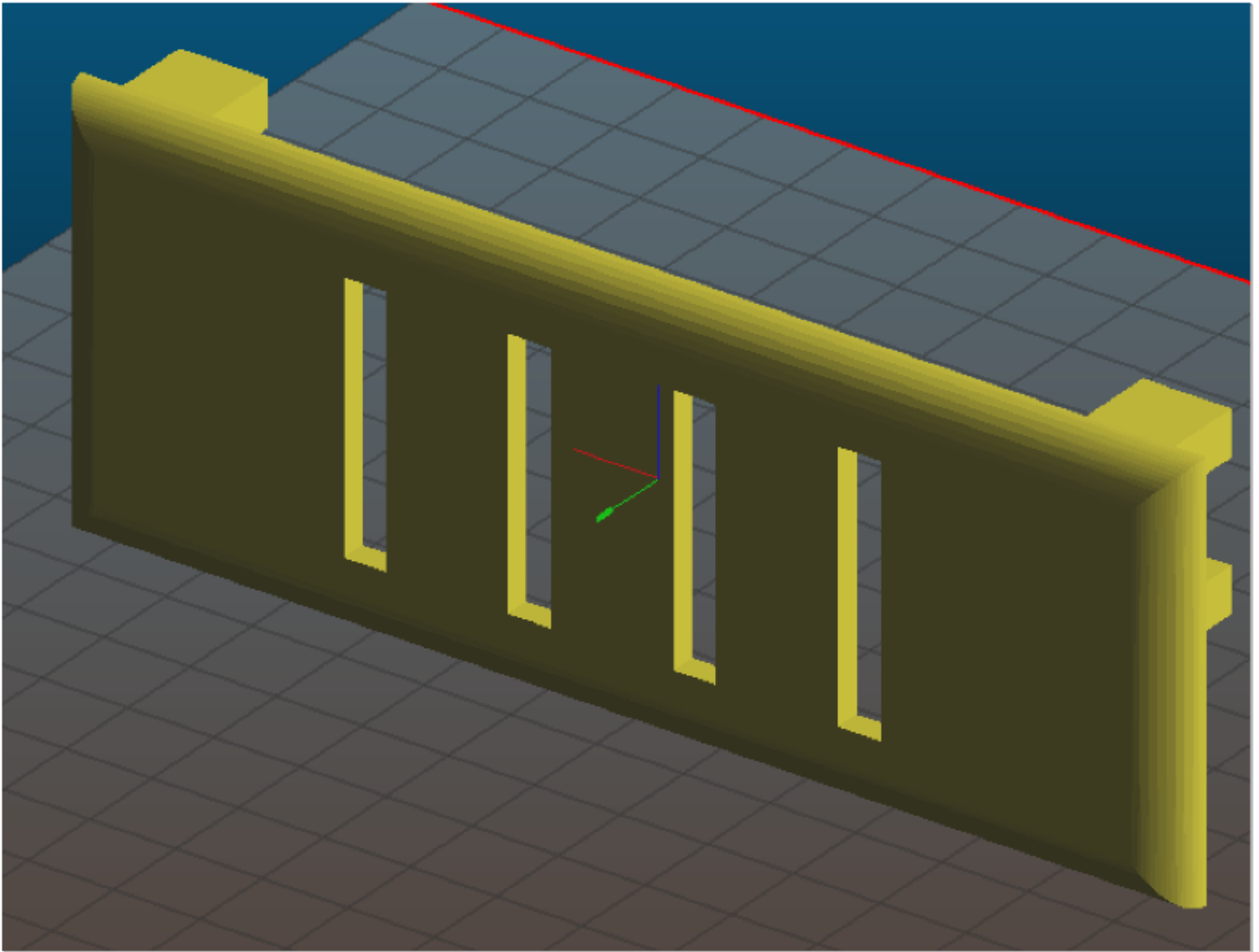
1. Impression 3D

4 pièces sont à imprimer :

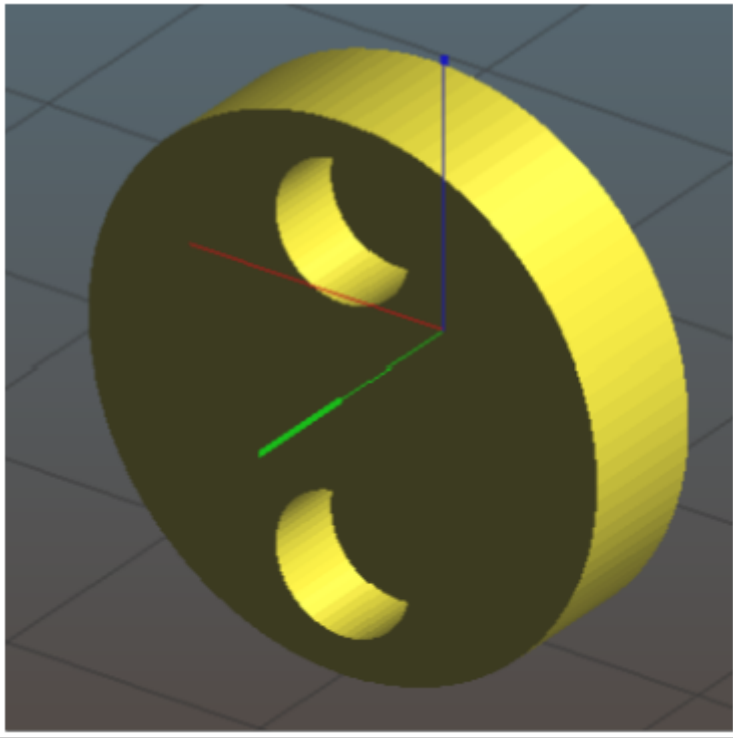
- Le cadre principal



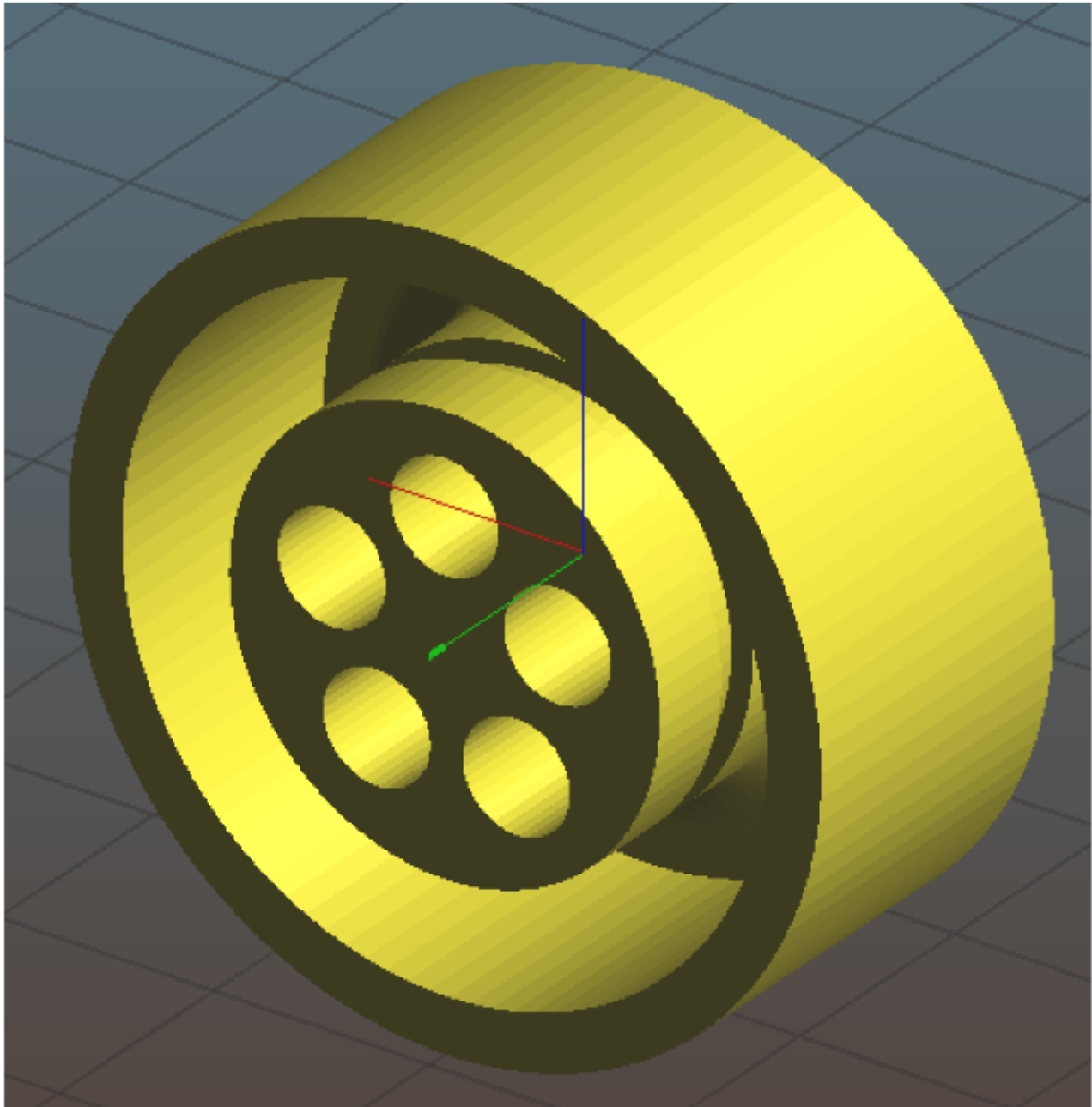
- Le couvercle



- L'attache du moteur magnétique



- Le bouchon du flacon de culture



2. Agitation

- Flasque Falcon :
- Moteur
- Aimants néodyme (5 mm OD x 2 mm W)

L'agitation du milieu de culture est nécessaire pour éviter que les microalgues ne stagnent au fond. D'une part pour qu'elles puissent se développer dans tout l'espace du flacon, et aussi pour assurer des conditions homogènes de culture (même exposition à la lumière et accès au dioxyde de carbone).

Suivant le moteur choisi le modèle 3D du cadre principal devra peut-être être adapté.

3. Lumière

- Bande LED (50cm)

4. Approvisionnement en dioxyde de carbone

- Pompe péristaltique
- Tube en silicone (5m, 5mm OD x 3 ID mm)

5. Capteur de densité optique

- 2 LED de 875nm

Permet de mesurer la prolifération des microalgues.

6. Fluoromètre

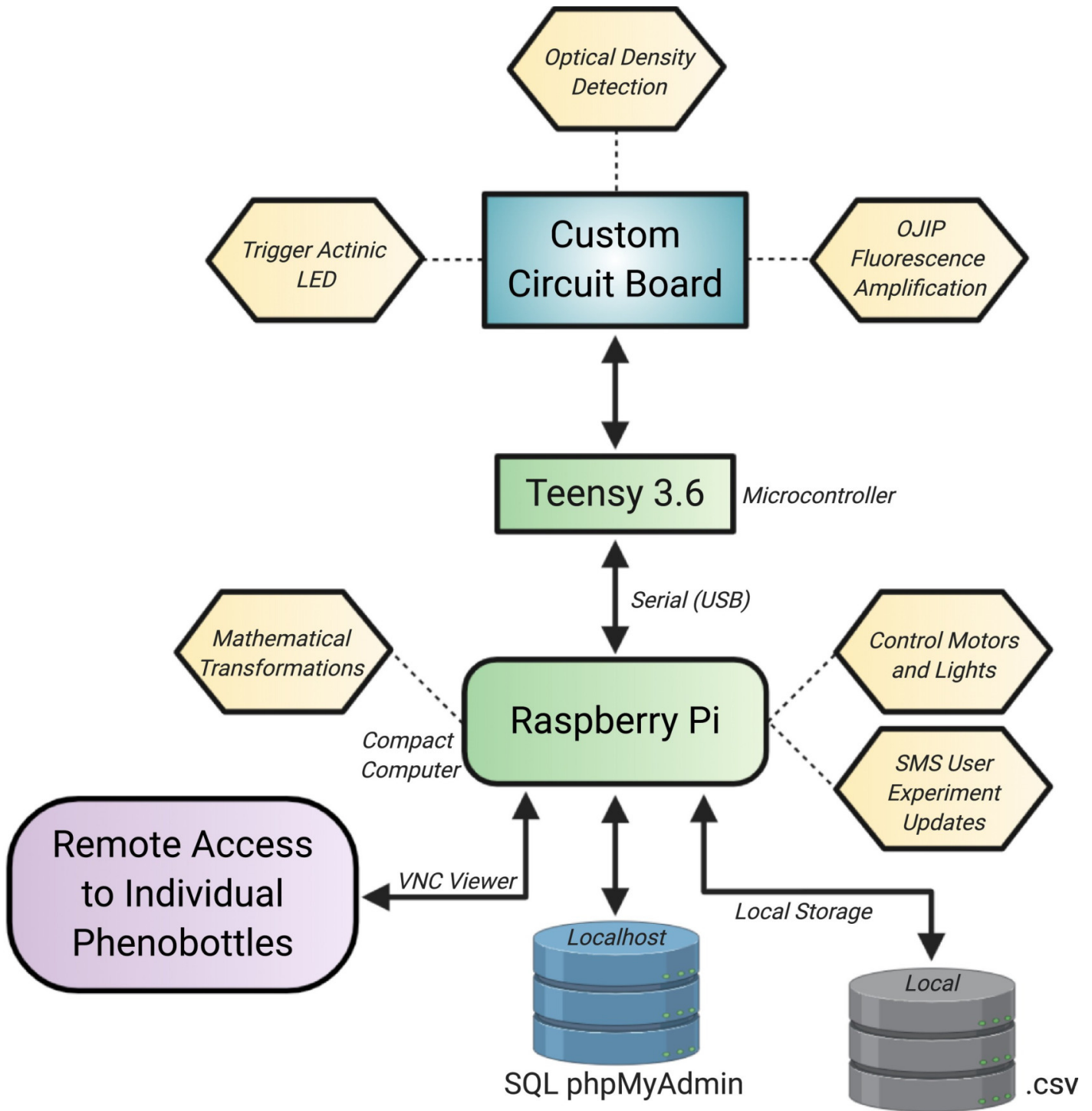
- Pompe à vide
- COB LEDs 10W (bleu, vert, jaune, rouge)
- Cuve de spectrophotomètre en polystyrène : à récupérer ?
- Connecteur d'irrigation
- Colle résistante à l'eau
- Filtre passe-haut 695nm
- Filtre infrarouge

Permet de mesurer l'activité de photosynthèse des microalgues.

7. Connectique

- Raspberry Pi 3b+
 - Alimentation
- USB to Micro-USB
- Teensy
- Micro-contrôleur

- Alimentation 15V 1.2A
- Motor Hat
 - Alimentation
 - Adaptateur jack
- Câbles



8. Programmation

2. Culture de Chlamydomonas reinhardtii

Matériel

[matériel.ods](#)

1. Milieu de culture

La composition du milieu de culture est issue de [<https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-020-02124-2>]. Son principal intérêt par rapport au milieu TAP utilisé habituellement est l'absence de solution TRIS (avec du bicarbonate de soude à la place) et donc son plus bas coût.

Protocole pour la préparation du milieu :

<https://www.protocols.io/private/3E11E4295FAA5B8ECD86E11E4B793955>

Protocole pour la préparation de la solution de Hutner : <https://www.chlamycollection.org/methods/media-recipes/hutners-trace-elements/>

2. Culture

Protocole : <https://www.protocols.io/view/culturing-chlamydomonas-reinhardtii-36wgq4rrkvk5/v1>

Culture de *Dunaliella*

Mortain-Bertrand, Anne, et al. « A METHOD FOR THE CRYOCONSERVATION OF *DUNALIELLA SALINA* (CHLOROPHYCEAE): EFFECT OF GLYCEROL AND COLD ADAPTATION¹ ». *Journal of Phycology*, vol. 32, n° 2, avril 1996, p. 346-52. *DOI.org (Crossref)*,

<https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00346.x>.

Source: Chat GPT et article

Voici un **protocole détaillé de cryoconservation de *Dunaliella salina*** en laboratoire, adapté aux moyens standards (congélation à -80 °C ou azote liquide si disponible).

☐☐ Protocole de cryoconservation de *Dunaliella salina*

☐☐ Matériel nécessaire

-

Culture saine et exponentielle de *D. salina*

-

Milieu de culture (ex. : F/2 ou Johnson avec 20–25 % NaCl)

-

Cryoprotecteur : Glycérol (10 %) ou DMSO (5–10 %)

-

Tubes cryogéniques stériles (1,8 ou 2 mL)

-

Glace ou bain de refroidissement (alcool + glace carbonique)

-

Congélateur à -80 °C ou cuve d'azote liquide (-196 °C)

-

Pipettes stériles

-

Boîte isotherme si transport entre étapes

☐ Étapes du protocole

1. Préparation de la culture

-

Prélever une culture saine de *Dunaliella salina* en phase exponentielle (dense, bien verte/rosée selon la souche).

-

Centrifuger doucement si nécessaire (ex. : 2500 g, 5 min) pour concentrer la biomasse, puis resuspendre dans un volume réduit de milieu.

2. Ajout du cryoprotecteur

-

Mélanger le cryoprotecteur au milieu de culture :

-

Exemple : 900 μ L de culture + 100 μ L de glycérol pur (pour atteindre 10 %)

-

Bien homogénéiser (éviter la formation de bulles).

Travailler rapidement pour éviter un choc osmotique prolongé.

3. Aliquotage

-

Distribuer dans des tubes cryogéniques stériles (1,5 à 2 mL max/tube).

-

Fermer hermétiquement.

4. Refroidissement progressif

-

Placer les tubes dans un système de refroidissement contrôlé :

-

Idéal : **boîte de congélation progressive** (ex. : Nalgene™ Mr. Frosty) → -1 °C/min

-

Alternatif : refroidir les tubes dans un bloc de polystyrène au congélateur -80 °C
pendant 2-4 h

5. Stockage

-

Une fois à -80 °C, transférer :

-

Soit dans un congélateur -80 °C (conservation correcte jusqu'à 2-3 ans)

-

Soit dans de l'azote liquide pour stockage long terme (>10 ans)

☐☐ Décongélation et reprise

1.

Sortir le tube et le **plonger rapidement dans un bain-marie à 37 °C** (30–60 s).

2.

Dès que la glace est fondue, transférer immédiatement dans un tube contenant du milieu frais à température ambiante.

3.

Laisser se réacclimater à la lumière faible et température douce (20–25 °C) pendant quelques jours.

4.

Observer la reprise de la croissance (microscopie ou turbidité visuelle).

□ Notes importantes

-

Toujours **étiqueter clairement** chaque tube (nom de souche, date, cryoprotecteur utilisé).

-

Ne jamais recongeler un échantillon déjà décongelé.

-

Pour chaque souche, garder **au moins 3 tubes de secours**.