



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**2015 - 2016**

## MASTER FAGE

---

Biologie et Ecologie pour la forêt, l'Agronomie et  
l'Environnement

Spécialité  
Biologie Intégrative des Arbres et des plantes cultivées

ETUDE DES EXCRETIONS CARBONEES ET AZOTEES DE LA MICROALGUE  
*TISOCHRYDIS LUTEA* EN CONDITIONS LIMITANTES DE NITRATE OU DE  
PHOSPHATE

ALMA ROBLIN

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 06/09/2016

Tuteurs : Jean-Baptiste Bérard, ingénieur d'étude en biologie marine  
Gaël Bougaran, chercheur en physiologie des microalgues

Enseignant référent : Yves Jolivet, professeur à l'université de Lorraine

Centre d'accueil : IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la mer,  
Rue de l'Île d'Yeu, 44300 Nantes

## **I. REMERCIEMENTS**

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements à l'ensemble de l'équipe pédagogique et administrative de l'université Lorraine, et en particulier à Yves Jolivet, responsable du master FAGE spécialisation BIA. Le soutien et la connaissance qui m'ont été apportées au cours des six mois de formation m'ont permis de mener à bien ce projet.

Je souhaite également adresser mes remerciements à Gaël Bougaran pour son accueil au sein du laboratoire IFREMER PBA. Cette opportunité de réaliser mon stage de master 2 au sein d'un laboratoire de recherche en biologie marine a été une expérience très enrichissante et formatrice.

J'adresse ma profonde reconnaissance à Jean-Baptiste Bérard et Gaël Bougaran pour m'avoir encadrée tout au long de ce stage avec encouragements, pour avoir été toujours disponible, à l'écoute, et pour m'avoir fait partager leur savoir.

Je souhaite remercier tout particulièrement Elodie Nicolau pour m'avoir encadrée sur toute une partie des analyses réalisées au cours de ce stage avec une grande implication et beaucoup d'encouragements. Ce travail en équipe a été d'une grande richesse scientifique et un immense plaisir.

Je tiens à saluer chaleureusement également Raymond, Caroline, Bruno, Christelle, Aurélie, Catherine, Grégory, Raymond et Mathieu pour l'intérêt et le temps qu'ils m'ont accordés tout au long de cette étude. Les échanges réguliers et les conseils techniques ont été précieux, les différents éclairages apportés m'ont donné une vision plus large du sujet.

Un grand merci à Ewa pour la réalisation des nombreuses analyses de nutriments.

J'aimerais aussi remercier Gaëlle Bulteau et le centre CSTB ainsi que Catherine Herrenkrecht, Emmanuel Gentil, Samuel Bertrand et Olivier Grovel pour m'avoir permis la réalisation de nombreuses analyses et m'avoir fait part de leurs très utiles connaissances scientifiques ainsi que de leur gentillesse.

Enfin, je ne saurais m'arrêter ici sans également saluer l'ensemble de l'équipe PBA ainsi que mes camarades stagiaires. La bonne humeur, la gentillesse et le professionnalisme qui caractérisent l'équipe ont rendu cette expérience très agréable.

## **II. Glossaire**

Acide aminé : un acide carboxylique possédant un groupe fonctionnel amine.

Anabolisme : l'ensemble des réactions chimiques de synthèse moléculaire de l'organisme considéré.

Autoclaver : en biologie, atteindre la stérilité microbiologique.

Autotrophie : production, par un organisme vivant, de matière organique par réduction de matière organique.

Axénique : exempt de tous germes saprophytes ou pathogènes.

Biocénose : En écologie, la biocénose est l'ensemble des êtres vivants coexistant dans un espace écologique donné, plus leurs organisations et interactions. Ensemble, le biotope et la biocénose forment un écosystème.

Biodiversité : la diversité de la vie sur Terre.

Biotope : un lieu de vie.

Chromatographie : méthode physico-chimique qui sert à séparer les différentes substances colorées présentes dans un mélange (échantillon en phase homogène liquide ou gazeuse).

Cycle biogéochimique : En écologie et plus généralement en sciences de la Terre, un cycle biogéochimique est le processus de transport et de transformation cyclique d'un élément ou composé chimique entre les grands réservoirs que sont la géosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère, dans lesquels se retrouve la biosphère.

Diatomée (*Bacillariophyta*) : microalgues unicellulaires (de 2  $\mu\text{m}$  à 1 mm) présentes dans tous les milieux aquatiques et enveloppées par un squelette externe siliceux nommé frustule.

Ecosystème : En écologie, un écosystème est l'ensemble formé par une association ou communauté d'êtres vivants (ou biocénose) et son environnement biologique, géologique, édaphique, hydrologique, climatique, etc (le biotope).

Excrétion : est l'action par laquelle des substances sécrétées (des déchets d'un métabolisme pour la plupart) d'un organisme vivant sont rejetés au-dehors sous forme de solides, liquides, gaz ou mucus.

Glucide : L'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) définit les glucides comme une classe de composés organiques contenant un groupe carbonyle (aldéhyde ou cétone) et au moins deux groupes hydroxyle (-OH).

Hétérotrophie : nécessité pour un organisme vivant de se nourrir de constituants organiques préexistants.

Hydrophobe : propriété d'un objet moléculaire de ne pas être soluble dans l'eau ni dans les produits polaires, menant à une ségrégation de l'objet vis-à-vis du solvant.

Inoculum : Échantillon contenant des germes vivants, destiné à être introduit au sein d'un milieu favorable à sa multiplication, afin de l'identifier, de l'étudier ou d'en produire une quantité supérieure.

Métabolisme : ensemble des réactions chimiques qui se déroulent au sein d'un être vivant pour lui permettre notamment de se maintenir en vie, de se reproduire, de se développer et de répondre aux stimuli de son environnement.

Oligotrophe : milieu particulièrement pauvre en éléments nutritifs.

Photobioréacteur : système assurant la production de micro-organismes photosynthétiques en suspension dans l'eau.

Photosynthétique : capables de synthétiser des biomolécules directement à partir de composés minéraux et d'énergie lumineuse.

Sécrétion : action conduisant une cellule à envoyer dans le milieu extracellulaire une substance.

Sécrétome : ensemble des protéines sécrétées par une cellule, un tissu ou un organisme.

### III. Abréviations

AA : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AMP : adénosine monophosphate

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine tri-phosphate

BRM : Biotechnologies et ressources marines

C : carbone  
 CI : carbone inorganique  
 CID (DIC) : carbone inorganique dissous (dissolved inorganic carbon)  
 CNEXO : Centre National pour l'Exploitation des Océans  
 COD (DOC) : carbone organique dissous (dissolved organic carbon)  
 COP (POC) : carbone organique particulaire (particulaire organic carbon)  
 Cpart : carbone particulaire  
 CT : carbone total  
 EMA : eau de mer autoclavée  
 EPIC : établissement public à caractère industriel et commercial  
 FMOC : 9-fluorenylméthylchloro-formate  
 HCL : chlorure d'hydrogène  
 HPLC: high performance liquid chromatography (chromatographie en phase liquid à haute performance)  
 IFREMER: Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer  
 ISTPM : Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes  
 N : azote  
 NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
 NID (DIN): azote inorganique dissous (Dissolved Inorganic Nitrogen)  
 NOD (DON): azote organique dissous (Dissolved Organic Nitrogen)  
 OPA : o-phthaldialdéhyde  
 P : phosphore  
 PBA : Laboratoire de Physiologie et de Biotechnologie des Algues  
 TDN: « Total Dissolved Nitrogen ».  
 TN: « Total Nitrogen ».  
 TPN: « Total Particulate Nitrogen »

#### **IV. Table des matières**

<b>I. REMERCIEMENTS .....</b>	<b>1</b>
<b>II. GLOSSAIRE .....</b>	<b>1</b>
<b>III. ABREVIATIONS .....</b>	<b>2</b>
<b>IV. TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>3</b>
<b>V. PRESENTATION DE L'IFREMER, INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER.....</b>	<b>6</b>
A. PRESENTATION DE L'IFREMER.....	6
B. LE LABORATOIRE PBA, PHYSIOLOGIE ET BIOTECHNOLOGIE DES ALGUES.....	6
<b>VI. INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>

A.	LES MICROALGUES .....	6
B.	LE CARBONE, L'AZOTE ET LE PHOSPHORE : DES MACROELEMENTS ESSENTIELS AUX MICROALGUES .....	7
1.	<i>Leur importance dans les cycles biogéochimiques.....</i>	7
2.	<i>Fraction carbonée.....</i>	8
3.	<i>Fraction azotée.....</i>	8
4.	<i>Fraction phosphorique.....</i>	8
C.	OBJECTIF DE L'ETUDE.....	9
1.	<i>Une mobilisation des éléments dépendante des conditions du milieu.....</i>	9
D.	ETAT DES LIEUX DES METHODES D'ANALYSES DU GLUCOSE ET DES ACIDES AMINES.....	9
2.	<i>Méthodes d'analyses des sucres et des acides aminés .....</i>	9
<b>VII.</b>	<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>10</b>
A.	CULTURE DE MICROALGUES.....	10
1.	<i>Culture en mode Batch.....</i>	10
2.	<i>Modèle biologique : La souche <i>Tisochrysis lutea</i> (T-iso) comme modèle d'étude.....</i>	11
3.	<i>Le milieu de culture.....</i>	11
4.	<i>Conditionnement des inocula.....</i>	11
5.	<i>Prélèvements effectués.....</i>	12
6.	<i>Le suivie de biomasse.....</i>	12
B.	LES ANALYSES .....	13
1.	<i>Récupération du surnageant de culture.....</i>	13
2.	<i>Dosage des glucides dissous dans le milieu de culture, basé sur les travaux de Dubois .....</i>	13
3.	<i>Quantification et identification des acides aminés dissous par HPLC fluométrique .....</i>	14
4.	<i>Détermination des acides aminés peptidiques et protéiques.....</i>	14
5.	<i>Analyse CHN.....</i>	15
6.	<i>Analyse du carbone organique dissous.....</i>	15
7.	<i>Dosage des nutriments N et P dans la fraction dissoute.....</i>	15
8.	<i>Dosage de l'azote organique dissous par la méthode d'une wet-oxydation .....</i>	15
<b>VIII.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>16</b>
A.	DEVELOPPEMENT DE LA METHODE D'ANALYSE DU GLUCOSE DISSOUS .....	16
1.	<i>Seuil de sensibilité et matrice d'eau de mer. ....</i>	16
B.	DEVELOPPEMENT DE LA METHODE D'ANALYSES DES ACIDES AMINES LIBRES ET LIES DISSOUS .....	17
1.	<i>Choix du kit et de la méthode utilisée .....</i>	17
2.	<i>Optimisation de l'analyse des acides aminés par HPLC fluo.....</i>	18
C.	ETUDE DE LA CROISSANCE DE T-ISO EN CONDITIONS LIMITANTES : SUIVI DE LA BIOMASSE CELLULAIRE ET DES ELEMENTS NUTRITIFS DES CULTURES .....	19
D.	ANALYSES DES EXCRETIONS GLUCIDIQUES .....	21
1.	<i>Etude des excrétiions du D-Glucose par T-iso.....</i>	21
2.	<i>Etude de la fraction carbonée dissoute et part du glucose dans ce dernier .....</i>	22
E.	IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES ACIDES AMINES DANS LA FRACTION DISSOUTE .....	25
1.	<i>Identification et quantification des acides aminés libres dissous dans une culture de T-iso en azote limitant ..</i> <i>.....</i>	25
2.	<i>Identification en quantification des acides aminés libres dissous dans une culture de T-iso en phosphore limitant.....</i>	26
3.	<i>Etude de la part de l'azote et du carbone des acides aminés libres dans le dissous.....</i>	27
4.	<i>Identification et quantification des acides aminés peptidiques et protéiques dissous dans une culture de T-iso .....</i>	27
5.	<i>Apparition d'un composé inconnu comportant une fonction amine.....</i>	28
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>28</b>
<b>X.</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>29</b>

<b>XI. ANNEXES .....</b>	<b>32</b>
A. ANNEXE 1: MILIEU DE CONWAY .....	32
B. ANNEXE 2 : COURBE DE CROISSANCE BACTERIENNE OU MICROALGALE.....	33
C. ANNEXE 3 : PROGRAMMATION DU PASSEUR D'ECHANTILLON.....	33
D. ANNEXE 4 : TEMPS DE SORTIE DES ACIDES AMINES.....	34

## V. PRESENTATION DE L'IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

### A. Présentation de l'IFREMER

L'IFREMER est né de la fusion en 1984 entre l'ISTPM (Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes) et le CNEXO (Centre National pour l'Exploitation des Océans). Cet institut est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) placé sous la tutelle conjointe du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et du ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie. Disposant d'un budget de 210 millions d'euros (2015), cet organisme de recherche remplit des missions diverses qui contribuent à la connaissance des océans et de leurs ressources, à la surveillance des milieux marins et côtiers ainsi qu'au développement durable des activités maritimes. L'IFREMER collabore avec les communautés scientifiques françaises, européennes et internationales en tissant des partenariats et en participant à des programmes de recherche internationaux. Le champ de compétences est très large, ses domaines d'excellence concernent aussi bien le développement de technologies d'exploration sous-marines, que l'halieutique et l'aquaculture, l'océanographie opérationnelle ou bien encore les biotechnologies. L'IFREMER compte environ 1500 salariés et est présent sur tout le littoral de la France métropolitaine et en outre-mer. L'institut possède 25 implantations structurées autour d'un siège social situé à Issy-Les-Moulineaux, de 5 grands centres et 20 stations rattachées.

### B. Le laboratoire PBA, Physiologie et Biotechnologie des Algues

Installé au centre Ifremer Atlantique situé à Nantes, le laboratoire de Physiologie et Biotechnologies des Algues (PBA) est rattaché à l'unité de Biotechnologies et Ressources Marines (BRM). Dirigé par Gaël Bougaran, le laboratoire PBA compte 13 salariés permanents auxquels viennent s'ajouter une moyenne de 5 salariés temporaires (stagiaires, doctorants et post-doctorants). Les activités de recherche du laboratoire visent à améliorer la compréhension de la physiologie et du métabolisme des microalgues en fonction de leurs conditions de culture ainsi qu'à étudier la dynamique de leur génomes afin de mieux comprendre l'adaptation des microalgues à leur environnement. Pour cela le laboratoire se compose de deux équipes: l'équipe "Algues et Génomes" qui étudie les métabolismes des microalgues inhérents à des conditions physiologiques déterminées, ainsi que leurs capacités d'adaptation et l'équipe "Ecophysiologie" qui étudie les relations entre les microalgues et leur environnement ainsi que les répercussions sur la croissance et la composition biochimique des microalgues marines. Grâce à des outils expérimentaux originaux, développés en interne, l'influence des facteurs abiotiques (lumière, nutrition minérale, température, pH) peut être caractérisée pour chaque espèce.

## VI. INTRODUCTION

### A. Les microalgues

Les microalgues sont des organismes unicellulaires ou pluricellulaires eucaryotes. Généralement photosynthétiques elles peuvent aussi être capables d'hétérotrophie ou de mixotrophie. Avec les cyanobactéries elles constituent le phytoplancton qui est à la base de la chaîne trophique aquatique (Worden et al., 2015). En effet, les algues jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement des écosystèmes marins. La production primaire des océans représente 50 % de la production primaire globale sur la planète (Geider et al., 2001). L'activité photosynthétique du phytoplancton fixerait entre 45 et 50 GT de carbone par an en moyenne avec un renouvellement de la biomasse dans les océans de l'ordre de la semaine (Berges et Falkowski, 1998 ; Geider et al., 2001). Ces organismes



sont capables de synthétiser de nombreuses molécules essentielles comme des acides aminés, des acides gras ou encore des vitamines. Leur rôle est donc prépondérant dans les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote. De plus, les microalgues sont retrouvées dans un large panel d'environnements allant des milieux aquatiques, aussi bien en eau douce qu'en milieu marin, aux milieux terrestres. Certaines espèces se sont adaptées à des milieux aux conditions extrêmes telles que de très hautes ou basses températures. Cette biodiversité et leur adaptation à de nombreuses niches écologiques sont à l'origine de métabolismes variés et d'une importante chimiodiversité. Ainsi elles possèdent un fort potentiel pour des applications biotechnologiques, notamment dans l'alimentation animale et particulièrement en conchyliculture, ou en bio remédiation des eaux usées (Barra et al., 2014). Les microalgues constituent également une source potentielle de molécules originales, qu'elles soient d'origine naturelle ou produites par expression recombinante pour des applications en santé humaine par exemple. Cependant, le potentiel biotechnologique des microalgues reste à ce jour peu exploité. Le nombre d'espèces de microalgues demeure incertain. Certains travaux proposent une estimation à 72 500 (Guiry, 2012), avec seulement 44 000 espèces identifiées. Moins d'une dizaine sont particulièrement étudiées, on trouve parmi celles-ci la bacillariophyte (diatomée) *Phaeodactylum tricornutum*, l'eustygmatoophyte *Nannochloropsis*, les chlorophycées *Dunaliella salina* et *Chlorella* ou encore l'haptophyte *Tisochrysis lutea*, qui sera le modèle d'étude dans ce rapport.

La physiologie des microalgues reste donc assez peu connue et la compréhension des mécanismes propres à ce groupe très divers est un élément clé de leur valorisation. En effet, la connaissance des modifications qu'entraînent des variations du milieu, tant au niveau de la cellule que de la population globale, fournit des moyens de contrôler et d'optimiser le développement des cultures en fonction des objectifs poursuivis. Ainsi pour mieux comprendre ces dynamiques écosystémiques il est primordial de comprendre leurs capacités de réponse d'acclimatation aux variations de la composition minérale de leur milieu et particulièrement aux éléments majeurs, le carbone, l'azote et le phosphore.

## B. Le carbone, l'azote et le phosphore : des macroéléments essentiels aux microalgues

### 1. Leur importance dans les cycles biogéochimiques

Le carbone, l'azote et le phosphore sont des éléments indispensables au développement des microalgues. La composition cellulaire moyenne pour ces trois éléments répond à un ratio relativement constant en milieu naturel de 106 C : 16 N : 1 P d'après les observations de Alfred Redfield en 1934. Ces éléments sous forme nutritives sont dits macroéléments de par leur grande quantité nécessaire à l'élaboration de la matière organique cellulaire. Dans les écosystèmes aquatiques leur concentration est soumise à des variations spatio-temporelles. Ces variations sont dépendantes du biotope et la biocénose associée et des forçages qui s'y opèrent : comme les intrants et la saisonnalité. Les éléments C, N et P, sous forme de composés nutritifs inorganiques et organiques, fixent une capacité trophique qui permettra la production primaire d'un système côtier. Puisque l'accès au carbone est rarement limitant, l'abondance et la disponibilité relative des nutriments azotés et phosphorés dans le temps vont fortement déterminer la dynamique des populations phytoplanctoniques par phénomène de limitation. Bien souvent dans les systèmes côtiers c'est l'élément azote qui se voit être limitant alors que pour l'océan oligotrophe il s'agit du fer (Hutchins et al., 1998). Dans les cycles biogéochimiques de ces trois éléments, les microalgues occupent donc une place importante dans l'acquisition de ces éléments dans le système trophique mais aussi dans leur séquestration.

L'étude de l'acquisition, de la métabolisation et du devenir de ces éléments par les microalgues est donc indispensable à une compréhension fine de leur flux dans les écosystèmes. Par ailleurs, cette

compréhension servira également à mieux maîtriser les productions de microalgues, voire diriger les procédés d'orientation métabolique des cultures industrielles.

## 2. Fraction carbonée

Le carbone est le constituant majeur des microalgues. D'un point de vue physiologique, le carbone est assimilé par les microalgues sous forme inorganique dissoute, le bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$  au niveau de la paroi, ou sous forme de  $\text{CO}_2$  via la photosynthèse. Dans des conditions alternatives à l'autotrophie les microalgues sont aptes à absorber le carbone organique dissous, on parle alors de mixotrophie et d'hétérotrophie. Le carbone représente en moyenne 35 % de leur poids sec (Sicko-Goad et al., 1984). Il participe à la synthèse des glucides, des protéines, des lipides et des acides nucléiques. L'allocation du carbone à ces compartiments biochimiques fluctue cependant (Geider et al., 1986). Une partie du carbone est constitutive de la cellule et ne varie que très peu. Une autre partie est plus plastique et constitue en majeure partie les réserves : oses et lipides. Les flux nutritifs et le métabolisme des microalgues sont dépendants des facteurs abiotiques : température, intensité lumineuse, composition du milieu et pH, notamment. Ces facteurs peuvent modifier l'activité de certaines voies métaboliques et donc le fonctionnement cellulaire de tout l'organisme. Les différents compartiments carbonés (COD et POC) sont donc dépendants de ces facteurs.

Le carbone organique dissous (COD) dans l'eau de mer est un important composant du cycle global du carbone. A la surface des océans la concentration du carbone organique dissous est de l'ordre de 300  $\mu\text{M}$  (Sugimura et Suzuki 1988). La teneur en carbone organique dissous est au moins deux fois supérieure à la surface de l'océan qu'en profondeur, en raison de la production de composés carbonés solubles par les algues, comme des sucres neutres, des lipides, de l'acétate et des oligosaccharides (Aluwihare et al., 1997).

## 3. Fraction azotée

L'azote est un constituant indispensable du phytoplancton. L'azote cellulaire participe à part égal à hauteur de 30 % dans la composition de chacun des acides nucléiques (ADN et ARN) et des protéines (environ 30 %). L'azote est également présent dans la structure de certains pigments, au sein du groupe tétrapyrrole des chlorophylles par exemple. Les chlorophylles représentent une part moindre, mais significative d'environ 10 % de l'azote cellulaire (Geider et La Roche, 2002).

Les microalgues trouvent l'azote sous forme dissoute dans le milieu. Nitrate et ammonium constituent les sources minérales les plus importantes dans l'inventaire global de l'azote marin allant de 7  $\mu\text{M}$  à plusieurs dizaines de micromolaires (Gruber et al., 2008). Dans un environnement aquatique, l'azote est présent dans plusieurs compartiments : sous forme inorganique ou organique, à l'état dissous ou particulaire. Jusqu'à une période relativement récente (1980), les océanographes théorisaient que les besoins en azote étaient uniquement satisfaits par un apport sous forme inorganique (Dugdale and Goering 1967). Les formes minérales d'azote assimilables par les microalgues sont les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) ainsi que l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Mais de nombreuses études ont depuis montré que des sources organiques servaient de substrat azoté aux microalgues (Turley 1986; Antia et al. 1991; Bronk et al. 2006; Killberg-Thoreson et al. 2013). L'azote a été longtemps considéré comme le nutriment limitant qui contrôle la croissance des microalgues dans les systèmes côtiers (Ryther and Dunstan 1971). Cette considération est aujourd'hui contrebalancée, le phosphore notamment est lui aussi un nutriment limitant (Vollenweider et al., 1981).

## 4. Fraction phosphorique

Le phosphore est un élément indispensable à la cellule. Le phytoplancton puise ce macroélément sous sa forme minérale  $\text{PO}_4$ . Une large part du phosphore cellulaire (environ 40 %) rentre dans la composition des deux types d'acides nucléiques. Les phospholipides membranaires représentent

jusqu'à 20 % du phosphore cellulaire. Enfin, bien que mobilisant une faible part du phosphore cellulaire, les pools adénosine phosphate (ATP, ADP, AMP) et NADPH jouent cependant un rôle crucial dans le métabolisme énergétique cellulaire (Geider et La Roche, 2002). Le phosphore est préférentiellement stocké dans la cellule sous forme de polymères linéaires d'orthophosphate, appelés polyphosphate (Eixler et al., 2006).

### C. Objectif de l'étude

#### 1. Une mobilisation des éléments dépendante des conditions du milieu

Selon les conditions du milieu, composition minérale, température, pH, intensité lumineuse, le métabolisme des microalgues varie. Des travaux ont montré que sous un stress nutritif azoté les microalgues anabolissent des réserves lipidiques (Chen et al., 2011, Sriharan et al., 1989). Les microalgues auraient tendance à stocker des réserves nutritives dans des conditions non propices à leur développement. L'étude de la composition en acides aminés dans une culture de diatomées en carence azotée montre que la teneur en acides aminés dissous décroît (admiraal et al., 1986). De récents travaux étudiant la fraction azotée inorganique et organique dissoute dans une culture de *Tisochrysis* (Bougaran et al., 2010), indiquent que cette microalgue excréterait de l'azote organique en condition de limitation par le phosphate. L'excrétion d'azote par *Dunaliella salina* serait au cœur des relations symbiotiques avec certaines bactéries (Le Chevanton, 2013). Une limitation des populations phytoplanctoniques résulte d'un déséquilibre entre la disponibilité de la ressource et la demande biologique ; l'élément dont la disponibilité est la plus faible par rapport aux besoins impose la limitation. Ainsi ces excrétions peuvent avoir un rôle important sur les dynamiques écosystémiques et la diversité planctonique. Le sécrétome des microalgues reste encore peu étudié ; pour tenter de comprendre le métabolisme de cette microalgue quant aux excrétions d'azote organique sous certaines conditions, il est question dans cette étude de quantifier et d'identifier cette fraction azotée organique dissoute en analysant les acides aminés dissous dans une culture de microalgues. Parallèlement la fraction carbonée sera étudiée via une quantification du glucose dissous.

La quantification et l'identification de ses excrétions seront étudiées tout au long des cultures de *Tisochrysis lutea* sous différentes conditions, l'une en azote limitant et l'autre en phosphore limitant. Une mise au point des protocoles expérimentaux a été réalisée afin de mener à bien les différentes analyses. Les cinétiques seront étudiées afin mieux comprendre la physiologie de cette microalgue et d'analyser les flux carbonées et azotées qui s'opèrent entre les différentes fractions.

### D. Etat des lieux des méthodes d'analyses du glucose et des acides aminés

#### 2. Méthodes d'analyses des sucres et des acides aminés

##### a. Méthodes de suivi des glucides dissous

D'après la littérature le dosage des glucides présents en eau de mer peut se faire via différentes opérations : des réactions enzymatiques spécifiques (Hicks et Carey, 1968) ; des analyses en spectrophométrie après traitement de l'échantillon au MTBH (3-méthyl-2benzothiazolinone hydrazone hydrochloride) (Dean Pakulsky et al., 1992 ; Johnson et al., 1977), ou au TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) (Miklestad et al., 1989) ; ou encore des chromatographies en phase liquide HPLC-PAD (Borch et Kirchman, 1997).

En milieu acide fort, à l'aide d'acide sulfurique, concentré et à chaud, les oses possédant au moins 5 carbones subissent une déshydratation interne avec cyclisation ; le produit obtenu est un composé furfuralique (furfural ou un de ses dérivés). Cette réaction est observée notamment avec les pentoses et les hexoses. Ces dérivés furfuraliques ont la propriété de pouvoir se condenser avec le phénol (Dubois, et al., 1956), ou d'autres composés ; résorcinol, orcinol,  $\alpha$ -naphtol, amines

cycliques ; pour former des composés colorés dont la couleur est fonction de l'ose de départ. Ainsi une analyse quantitative mais aussi qualitative peut être faite.

Pour doser les glucides dissous dans une culture de microalgues, le choix de la réaction reposera surtout sur son seuil de sensibilité et son adaptabilité à la matrice eau de mer. En effet dans une culture de microalgues la concentration en glucides dissous est très faible. Pour augmenter ces teneurs il est possible de concentrer l'échantillon à analyser. Une évaporation, un dessalement par électrodialyse (Josefsson et al., 1970) suivi d'une lyophilisation (Dawson et Mopper, 1978) ou peut permettre de concentrer l'échantillon.

Dans le laboratoire seul le protocole pour déterminer les sucres particuliers, par la méthode Dubois, a été mis au point. Cependant, dans son état actuel, il ne permet pas de quantifier les sucres en très faibles concentrations dans le milieu dissous, en raison d'un seuil de détection insuffisant. Dans la suite du rapport, le développement d'une méthode de dosage des sucres dissous dans un milieu de culture de microalgues s'appuie sur la méthode Dubois afin de proposer un protocole réalisable au sein du laboratoire.

#### b. Les méthodes de quantification et d'identification des acides aminés dissous

Dans la littérature, le dosage des acides aminés dans la fraction dissoute se fait par chromatographie en phase liquide (Parson, 2013). La détection en spectrométrie se fait par absorption du groupe carboxylique  $\text{-COOH}$  autour de 200 – 210 nm. Quelques acides aminés composés d'un cycle benzène peuvent être détectés aux longueurs d'ondes 250 – 280 nm mais l'analyse est peu sensible et sélective. Afin de remédier à ce problème des méthodes de dérivation existent en utilisant des réactifs qui réagissent avec la fonction amine ( $\text{-NH}_2$ ,  $\text{-NHR}$ ) spécifique à l'acide aminé. Les acides aminés subissent une dérivation avant de passer dans la colonne de chromatographie. Ils sont ensuite élués suivant leur polarité dans la colonne. Les réactifs de dérivation utilisés sont l'o-phthaldialdéhyde (OPA) pour doser et identifier les acides aminés primaires (Calull et al., 1991). Puis afin de doser les acides aminés secondaires, le 9-fluorenylméthylchloro-formate (FMOC) est utilisé (Sanders et Ough, 1985). Deux méthodes de dérivation existent ; pré-colonne ou post-colonne. Dans un souci d'une résolution fine et sensible une dérivation pré-colonne est préférable. En effet une dérivation pré-colonne a les avantages suivants : la consommation en réactifs peut être minimisée par spécificité de la réaction. Le produit de cette réaction est ensuite séparé par élution dans la colonne. Enfin, afin d'avoir une sensibilité élevée pour détecter de très faibles concentrations l'analyse se fait par fluorimétrie. En effet, les concentrations en acides aminés trouvées dans une culture de microalgues en eau de mer se situent entre 10 et 400  $\text{nmol.L}^{-1}$  (Admiraal et al., 1986).

## VII. MATERIEL ET METHODES

### A. Culture de microalgues

#### 1. Culture en mode Batch

La culture discontinue, également appelée culture en « batch », est un mode d'alimentation en volume constant. C'est le mode de culture des microalgues le plus commun (simplicité et coût réduit). Un volume d'une culture existante, appelé inoculum, est apporté dans un volume d'eau de mer stérile préalablement enrichie par une solution nutritive, ici appelé milieu de Conway. La composition de ce milieu est détaillée en ANNEXE 1. Cet apport initial de nutriment permet la croissance des microalgues. La concentration en cellules augmente jusqu'à l'épuisement des ressources nutritives essentielles, ou bien par une limitation due à un facteur abiotique. A terme, la culture périclité s'il n'y a pas de nouvel apport en nutriments. Le maintien de telles cultures nécessite donc un repiquage régulier. La croissance d'une culture en batch est un processus

dynamique comparable à une croissance bactérienne (ANNEXE 2), comportant classiquement plusieurs phases caractérisées par un taux de croissance  $\mu$  (exprimé en  $j^{-1}$ ).

## 2. Modèle biologique : La souche *Tisochrysis lutea* (T-iso) comme modèle d'étude

*T. lutea*, anciennement nommée *Isochrysis affinis galbana* clone Tahiti, est une haptophyte de l'ordre des Isochrysidales. Tout comme le coccolithophoridé *Emiliania huxleyi*. *T. lutea* est une microalgue marine biflagellée isokonte, de forme ronde et de taille comprise entre 6 et 8  $\mu m$  mais ne produisant pas de coccolithes (plaques de carbonate de calcium) à l'extérieur de la membrane plasmique (Bendif et al. 2013). Sa culture est parfaitement maîtrisée au laboratoire PBA, ce qui en fait un bon modèle pour des études éco-physiologique (Muñoz-Tamayo et al., 2014). Elle suscite de nombreux intérêts biotechnologiques pour l'alimentation humaine et animale car elle contient une grande quantité d'acides gras polyinsaturés (notamment le DHA, acide docosahexaénoïque). Elle est de ce fait très largement utilisée pour l'alimentation dans les écloséries conchylicoles (Borowitzka, 1997). De plus, elle est riche en lipides neutres, ce qui lui confère un intérêt pour la production de biocarburants (Chisti, 2007).



Les travaux de cette étude ont donc été réalisés avec la microalgue *Tisochrysis lutea* (T-iso) CCAP 927/14 (figure 1) acquise auprès de la Culture Collection of Algae and Protozoa présente dans la souchothèque du laboratoire PBA. C'est une souche sauvage polyclonale qui a été rendue axénique, c'est-à-dire affranchie de toute contamination bactérienne, de micromycètes ou de protozoaires, par un traitement antibiotique selon (Cho et al. 2002). Elle sera par la suite désignée T-iso.

FIGURE 1: Photographies de *Tisochrysis lutea* CCAP927/14 (en microscopie optique : Gx100), source : Laboratoire PBA

## 3. Le milieu de culture

L'ensemble des éléments nécessaires à la croissance de la souche est apporté par ajout du milieu d'enrichissement de Conway. Ce milieu peut être préparé en 3 solutions individuelles (solution principale, solution de métaux et solution de vitamines) ou bien être regroupé en une seule solution. Ces solutions sont stockées à 4 °C à l'abri de la lumière et sont filtrées sur filtre en fibre de verre à 0,2  $\mu m$ . L'utilisation de filtres en nitrates de cellulose ou en acétate de cellulose est proscrite dans le cadre de notre étude. Elle pourrait introduire un biais de mesure de l'azote ou du carbone dans le milieu.

Les expériences en azote limitant de cette étude sont conduites avec un enrichissement initial à 1 mL de solution de Conway N limitant par litre d'eau de mer. L'apport est à une concentration théorique en azote de 250  $\mu M$  et 250  $\mu M$  en phosphore, soit un ratio N/P de 1 inférieur au ratio de Redfield N/P de 16.

Pour le milieu en phosphore limitant, l'apport théorique initial est de 1120  $\mu M$  pour l'azote et seulement 8  $\mu M$  en phosphore, soit un ratio N/P de 140, supérieur au ratio de Redfield N/P de 16.

## 4. Conditionnement des inocula

### a. Pré-culture expérimentale de T-iso

Les cultures de T-iso sont conduites en mode « batch » : en erlenmeyers de 250mL pour les cultures « stock » et en ballons de 2L ou 6L pour les cultures expérimentales. Les ballons sont munis de bouchons perforés, équipés d'un système de bullage : l'air, filtré à 0,2  $\mu m$  (filtre Sartorius Midisart



PTFE), est amené par une canne en verre plongeant dans la culture. Ce léger bullage permet le brassage des microalgues dans la culture ainsi qu'un apport de CO<sub>2</sub>. Les ballons sont remplis avec de l'eau de mer naturelle, stockée dans des cuves à l'IFREMER de Nantes, filtrée à 0,2 µm, puis stérilisée par autoclavage (20 minutes à 121 °C). Après enrichissement en solution nutritive, il faut ensuite ensemercer les ballons avec un inoculum T-iso de la souche du laboratoire PBA où les cultures sont régulièrement repiquées et axéniques. Les expériences sont poursuivies en conditions stériles. Il faut donc travailler sous hotte à flux laminaire. Les ballons de culture sont ensuite placés à 25 °C et soumis à un éclairage continu. La lumière est fournie par des tubes fluorescents blancs dont l'éclairage moyen est de 100 µmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> mesurée avec un capteur de PAR (LICOR LI-250). Dans cette expérience, deux ballons de deux litres sont préparés en tant que pré-culture inoculum des photobioréacteurs de 5 litres. Pour préacclimater les cultures aux futures conditions expérimentales, un ballon est en condition de faible apport de phosphate, l'autre d'azote pour garantir une carence finale des cultures par l'un ou l'autre de ces éléments.

#### b. Cultures expérimentales de T-iso

L'expérience est conduite via quatre photobioréacteurs (Figure 2) de 5 litres afin de faire croître les cultures de T-iso. Ce plan d'expérience permet un réplica biologique pour chacune des deux conditions. Le milieu de culture des photobioréacteurs est préparé exactement comme ci-dessus, à ceci près qu'il s'agit de 5 litres. Avant d'inoculer les bouteilles de 5L un comptage cellulaire des pré-cultures est nécessaire afin de pouvoir inoculer de façon à obtenir la concentration cellulaire voulue dans les photobioréacteurs. L'utilisation d'un inoculum en phase de croissance exponentielle permet de s'affranchir de toute phase de latence. Les photobioréacteurs sont régulés à pH 8 grâce une injection de CO<sub>2</sub> asservie à la mesure pH, et soumis à un éclairage moyen de 300 µmol photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. La température moyenne des photobioréacteurs est de 27 °C.

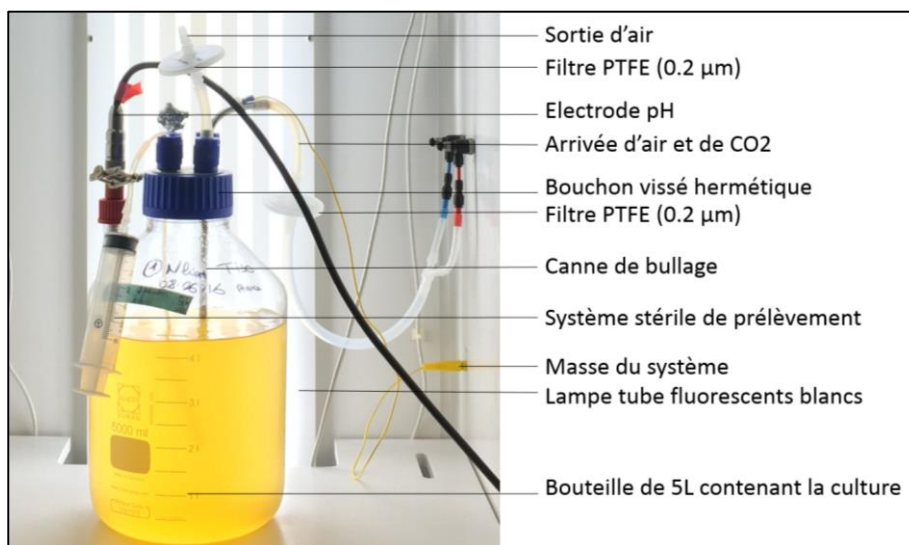


FIGURE 2: Photo légendée d'un photobioréacteur de 5L d'une culture de T-iso

#### 5. Prélèvements effectués

Un prélèvement quotidien est effectué. Les échantillons, destinés aux diverses analyses sont conservés à – 80 °C afin de s'affranchir de toute dégradation et contamination bactérienne.

#### 6. Le suivi de biomasse

La détermination de la concentration en cellules dans la culture est réalisée sur cellule de Malassez, à l'aide d'un microscope optique Leitz Diaplan équipé d'une caméra RVB reliée à un micro-ordinateur. Un aliquot de culture est diluée au 1/2 avec une solution de lugol (mélange d'iode et d'iodure de potassium permettant la fixation et coloration des cellules). Après homogénéisation,

une goutte de 25  $\mu\text{L}$  est déposée sur chacun des 2 quadrillages de la cellule de Malassez. L'observation est réalisée au grossissement  $\times 100$ . 20 champs différents pris aléatoirement autour de chaque grille sont enregistrés par la caméra, puis traités par le logiciel de reconnaissance de forme et de comptage : Aphelion. Le comptage est réalisé en double. Le logiciel donne en résultat le nombre de cellules par millilitres ainsi que l'erreur standard qui témoigne de l'homogénéité de dispersion de cellules sur la grille et donc d'un dépôt correct ou non de l'échantillon.

Une autre méthode de suivi de biomasse dans la culture est réalisée par des mesures d'absorbance à 680 nm (pic d'absorption de la chlorophylle) et à 800 nm. Une augmentation de la concentration en microalgues dans la culture se traduit par une augmentation de l'absorbance à 680 nm (liée à l'accroissement de la quantité de chlorophylle totale dans la culture). L'absorbance mesurée à 800 nm n'est pas spécifique d'un pigment mais de la biomasse globale dans la culture (y compris les contaminants éventuellement présents tels que les bactéries). La mesure de l'absorbance est réalisée en triplicat avec un spectrophotomètre SECOMAN Uviline 9400 dans des cuves de 1.5 mL. Le blanc est réalisé de la même manière, sur l'eau de mer stérile. Une bonne corrélation existe entre la concentration cellulaire de la culture et l'absorbance, cependant selon la morphologie de la cellule une erreur peut être commise. Une absorbance plus importante peut aussi être liée à des cellules qui grossissent ou qui accumulent plus de pigments, sans pour autant que leur nombre ait augmenté. L'absorbance demeure un estimateur très pratique de la biomasse.

## B. Les analyses

### 1. Récupération du surnageant de culture

Toutes les parties du dispositif de filtration en contact avec l'échantillon (porte filtres en verre 25 mm, une tulipe de filtration en verre, Falcon) sont traitées par une solution de HCl 10 % v/v (soit environ 1,2 M) et rincées préalablement et abondamment à l'aide d'eau déionisée ( $\text{H}_2\text{O}$  18,2 M) afin d'enlever toute trace de matrice organique absorbée.

L'échantillonnage de la fraction dissoute se fait via une filtration en cascade. Le surnageant des cultures de T-iso est récupéré de manière à éviter le relargage artificiel de molécules azotées ou carbonées dans le surnageant de culture. Il n'est donc pas envisageable de centrifuger avant la filtration en cascade. Le prélèvement subit une filtration douce avec un vide maximum contrôlé à 0,5 bar. La filtration en cascade s'effectue avec 3 types de filtres (diamètre 47 mm) à seuil décroissant :

- Filtre Whatman GF/C : filtre en fibres de verre, seuil nominal : 1.2  $\mu\text{m}$
- Filtre Whatman GF/F : filtre en fibres de verre, seuil nominal: 0.7  $\mu\text{m}$
- Filtre Whatman OE66 : filtre en acétate de cellulose, seuil nominal : 0,45  $\mu\text{m}$

La dernière filtration avec le filtre en acétate de cellulose est utilisée seulement pour les analyses d'acides aminés. Les filtres en fibres de verre sont préalablement calcinés à 450 °C pendant 4 heures. Ces filtrations en chaîne sont réalisées sur une unité de filtration Sartorius Stedim.

### 2. Dosage des glucides dissous dans le milieu de culture, basé sur les travaux de Dubois

Un volume d'1 mL d'échantillon est ajouté dans les tubes en verre préalablement calcinés à 450 °C pendant 4 heures afin d'enlever toute trace de contaminants glucidiques. Puis 25  $\mu\text{L}$  de solution de phénol à 98 % sont ajoutés. Chaque tube est vortexé 10 secondes, puis laissé au repos durant 20 minutes. Il faut ensuite apporter rapidement 2,5 mL d'acide sulfurique à 98 % directement sur la solution phénol/échantillon (sans toucher les parois du tube). Les tubes sont vortexés 10 secondes immédiatement après ajout de l'acide. Enfin les tubes sont placés durant 60 minutes en bain marie à 80 °C en les vortexant au bout de 30 minutes et 60 minutes. La coloration est stable pendant

quelques heures. La lecture l'absorbance se fait via un spectrophotomètre à 490 nm. Le blanc est réalisé avec 1 mL de d'eau de mer autoclavée.

### 3. Quantification et identification des acides aminés dissous par HPLC fluorimétrique

#### a. Préparation des phases mobiles, des réactifs :

Les deux phases mobiles sont préparées juste avant utilisation. La phase mobile A: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 5mM NaN<sub>3</sub>, dont le pH est ajusté à 8.2 et la phase mobile B: 1L de méthanol ; acétonitrile ; eau (45 :45 :10). Les réactifs, OPA et FMOC sont aliquotés à hauteur de 100 µL dans des vials avec inserts et stockés à 4°C. Les vials peuvent être utilisés jusqu'à 7 à 10 jours. Le diluent est réalisé avec 10 mL de la phase mobile A et 0.04 mL d'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentré, puis stocké à 4 °C. Les phases sont dégazées avec un appareil à sonication (40 kHz) afin d'éviter toutes bulles d'air dans le système HPLC, susceptibles d'endommager la colonne et de nuire à l'élution des composés sortants. Les réactifs et solvants sont filtrés à 0,2 µM avec un filtre en cellulose régénérée et en Nylon respectivement pour ne pas encrasser la colonne et l'HPLC.

#### b. Préparation de la gamme étalon

Le kit Agilent (ref : PN 5061-3330), à 10 pmol/µL composé de 17 standards d'acides aminés est utilisé afin de préparer les gammes. Les vials sont stockables 7 jours à 4 °C. Les points de gamme sont les suivants : 7,5 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1 µM, 750 nM, 500 nM, 250 nM, 100 nM, 75 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM.

#### c. Paramétrages de de l'HPLC

Avant d'installer la colonne, l'ensemble du système pompe et tuyauterie est purgé avec une solution 50 : 50 MeOH : H<sub>2</sub>O pour nettoyer le système. La pompe est réglée avec un débit de 1.5 mL.min<sup>-1</sup> avec une pression maximale 350 bars. La température du four à colonne est fixée à 40 °C pour la colonne greffée en C18 Poroshell 120HPH (10 cm, 2.7 µM) (Agilent). Cela permet une fluidification du solvant et donc d'augmenter la pression (pics plus nets, et ligne de base plus réduite). La pré-colonne évite un encrassement de la colonne par des particules non solubles et permet d'encaisser les fortes pressions en tête de colonne. Le gradient d'élution est donné dans le tableau 1.

Tableau 1: Gradient d'élution

Temps (min)	% de B	% de A
0	2	98
0,35	2	98
13,4	57	43
13,5	100	0
15,7	100	0
15,8	2	98
18	end	end

Concernant le détecteur ; une première détection se fait sur le détecteur à barrette de diode (DAD détection) et une seconde détection se déroule sur le détecteur fluorimétrique (Excitation : 340 nm ; Lecture : 450 nm. La programmation du passeur d'échantillon suit la note d'application d'Agilent 2015 (ANNEXE 3).

#### d. Rééquilibrage de la colonne et rinçage de l'HPLC

Une purge préliminaire d'H<sub>2</sub>O avec un débit de 2-3 mL.min<sup>-1</sup> est nécessaire pour nettoyer la colonne. Puis le conditionnement de la colonne se fait avec 60 % Acétonitrile et 40 % H<sub>2</sub>O HPLC grade.

### 4. Détermination des acides aminés peptidiques et protéiques

Afin de connaître l'ensemble des acides aminés présents dans la fraction dissoute il faut hydrolyser les peptides existants. Nous obtenons les acides aminés combinés en soustrayant les acides aminés libres aux acides aminés totaux obtenus après hydrolyse.



L'hydrolyse est une hydrolyse acide s'appuyant sur les travaux de Dawson et Pritchard (1978) en ajoutant à 1 mL d'échantillon dans un tube en verre d'hydrolyse, 1 mL d'HCl fumant (37 %, 12 M). L'échantillon subit ensuite un chauffage de 18 heures à 110 °C. Avant de mettre l'échantillon dans les vials d'analyses HPLC, il faut neutraliser la solution afin de ne pas endommager la colonne. Pour cela, d'après des essais de pHmètrie, il faut ajouter 600 µL de soude NaOH 12 N à l'échantillon pour neutraliser l'échantillon avant analyse.

## 5. Analyse CHN

Ces analyses quantifient le carbone et l'azote organique particuliers. Pour l'obtention d'un échantillon représentatif, la culture doit subir une vive agitation avant d'y prélever la quantité à filtrer sur filtre GF/F 25 mm préalablement calciné à 450 °C. Après filtration le filtre est déposé dans une boîte de Pétri de 40 mm de diamètre subissant une dessiccation au minimum de 12 h dans un four à 70 °C. Ensuite l'échantillon est analysé à l'aide d'un analyseur élémentaire (CN soil Analyseur Thermoscientific). Il subit une combustion totale de la matière organique à 1050 °C sous courant d'hélium et d'oxygène et sous pression. Le carbone de l'échantillon est transformé en dioxyde de carbone et la matière organique azotée en oxydes d'azote eux même réduit en azote moléculaire. Ces deux produits sont séparés sur une colonne chromatographique et quantifiés par mesure de la conductibilité thermique. Cette analyse est faite en parallèle du comptage cellulaire ; elle est aussi représentative de la biomasse de la culture. De plus, elle participe à établir des bilans azotés et carbonés pour la suite de l'étude. Une fois connue, la concentration de N particulière est ensuite reportée à la concentration de cellules ou de carbone particulière, pour calculer les quotas de N par cellule ou par unité de C.

## 6. Analyse du carbone organique dissous

Cette analyse est réalisée à l'aide d'un COTmètre, analyseur de carbone organique (TOC-5000A, Shimadzu). L'échantillon analysé est filtré à 0,7 µm pour ne conserver que la fraction dissoute. Le volume injecté est de 26 µL. L'échantillon subit une oxydation thermique à 680°C permettant de transformer tout le carbone organique dissous (COD) en carbone inorganique. Le carbone inorganique (CI) est dosé avant et après oxydation. Ce dosage s'effectue par lecture infrarouge du CO<sub>2</sub> émis après bullage à l'oxygène pur. Le seuil de détection de la méthode est de 42 µM. Dans un premier temps deux injections permettent d'analyser le carbone inorganique présent dans l'échantillon puis deux autres pour le carbone total (CT). Une troisième mesure est effectuée si le coefficient de variation entre les deux premières mesures est supérieur à 2%. Nous obtenons le carbone organique dissous présent dans l'échantillon par la soustraction suivante :  $COD = CT - CI$

## 7. Dosage des nutriments N et P dans la fraction dissoute

Cette analyse permet de doser l'azote et le phosphate inorganique contenus dans le milieu dissous de la culture (RES, fraction résiduelle minérale). L'analyse se fait sur 20 mL d'échantillon prélevé, filtré comme précédemment à 0,7 µm. L'analyse de NO<sub>3</sub> et PO<sub>4</sub> se fait via un spectrophotomètre en flux (autoanalyseur AA3, AXFLOW).

## 8. Dosage de l'azote organique dissous par la méthode d'une wet-oxydation

Ce protocole s'appuie sur les travaux de M. Pujo-Pay et P. Raimbault (Pujo-Pay et al., 1997). Le réactif utilisé pour l'oxydation est une solution de peroxydisulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), d'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) et de soude (NaOH) afin de maîtriser le pH final de réaction. L'échantillon filtré à 0,7 µm subit une oxydation à chaud dans des flacons en Teflon afin de minéraliser tout l'azote organique dissous (ROX : Résiduels Oxydés) présent dans le milieu de culture. Le mélange, échantillon, eau déionisée et réactif selon des ratios volumiques déterminés par une estimation de l'azote présent afin de ne pas saturer le réactif est ensuite autoclavé pendant 30 minutes à 121 °C (1 bar). Puis de la même façon que précédemment le dosage de l'azote inorganique se fait par

spectrophotométrie de flux. La minéralisation de l'azote organique s'ajoute à la fraction résiduelle RES de l'échantillon donnant un total oxydé (TOX). Nous obtenons par soustraction l'azote organique dissous dans la culture :  $[ROX] = [TOX] - [RES]$

## VIII. RESULTATS ET DISCUSSION

### A. Développement de la méthode d'analyse du glucose dissous

#### 1. Seuil de sensibilité et matrice d'eau de mer.

Dans la littérature le protocole de Dubois utilisant du phénol à 5 % (Dubois et al., 1956) convient à une matrice eau de mer et son seuil de sensibilité est de 20  $\mu\text{M}$ . Les résultats obtenus sur une gamme de concentration s'appuyant sur de précédents travaux effectués au laboratoire n'ont pas été concluants. En effet, le milieu dissous étant faiblement concentré, ce protocole ne permet pas de mesurer des absorbances significatives. La concentration glucidique atteint des valeurs inférieures à 20  $\mu\text{M}$  dans les cultures.

Ainsi dans l'hypothèse que les concentrations peuvent atteindre des valeurs plus basses que 20  $\mu\text{M}$ , la réaction avec le L-tryptophane (Josefsson et al., 1972) ayant un seuil de sensibilité de 2  $\mu\text{M}$  a été testée. Cependant, cette réaction réagit avec les nitrates présents dans l'eau de mer. L'origine de la coloration ne peut donc pas être associée directement à la simple présence de glucose. Cette réaction n'est donc pas utilisée dans la suite de cette étude.

Dans le but de concentrer l'échantillon, l'utilisation d'une colonne SPE échangeuse de cations, STRATA X6C en amont de la réaction a été mise en place. Néanmoins aucune trace de glucose n'a été observée dans la phase éluée après mesure de l'absorbance. Le glucose est donc, soit resté sur la colonne sans possibilité de l'éluer par la suite, soit il n'a pas été retenu par la résine ou encore la solution de lavage l'a élué. Le dosage de la solution de lavage n'a pas permis de mettre en évidence la présence de glucose.

Le dosage des glucides s'appuyant sur le protocole de Dubois utilise communément du phénol à 5 %. En effet, d'un point de vue pratique il peut se fabriquer au laboratoire en dissolvant 10 g de phénol dans 200 mL d'eau déionisée, de plus un phénol à 98 % est bien plus dangereux à manipuler. Cependant dans le souci de doser de très faibles concentrations glucidiques et donc d'éviter l'effet de dilution de l'échantillon par les réactifs, (1) du phénol à 98% a été testé. Des concentrations d'échantillon à 1  $\mu\text{M}$  ont pu être mesurées. (2) Différents volumes d'acide sulfurique ont été testés afin de gagner en sensibilité. Trois séries, pour chaque volume d'acide sulfurique, sont réalisées en utilisant une gamme de 5 points allant d'une concentration de  $1.10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$  à  $0.1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de glucose. Les résultats présentés dans la figure 3 montrent la moyenne et l'écart-type des trois séries, pour chaque volume d'acide.

Tout en autorisant une moindre dilution de l'échantillon, un volume d'acide de 2,5 mL permet de conserver une gamme linéaire (coefficient de corrélation très proche de 1 et supérieur à ceux obtenus pour les autres volumes d'acide) et d'obtenir une absorbance plus élevée qu'avec un volume inférieur. Un volume d'acide de 1 mL ne permet pas d'obtenir une gamme linéaire pour ces concentrations.

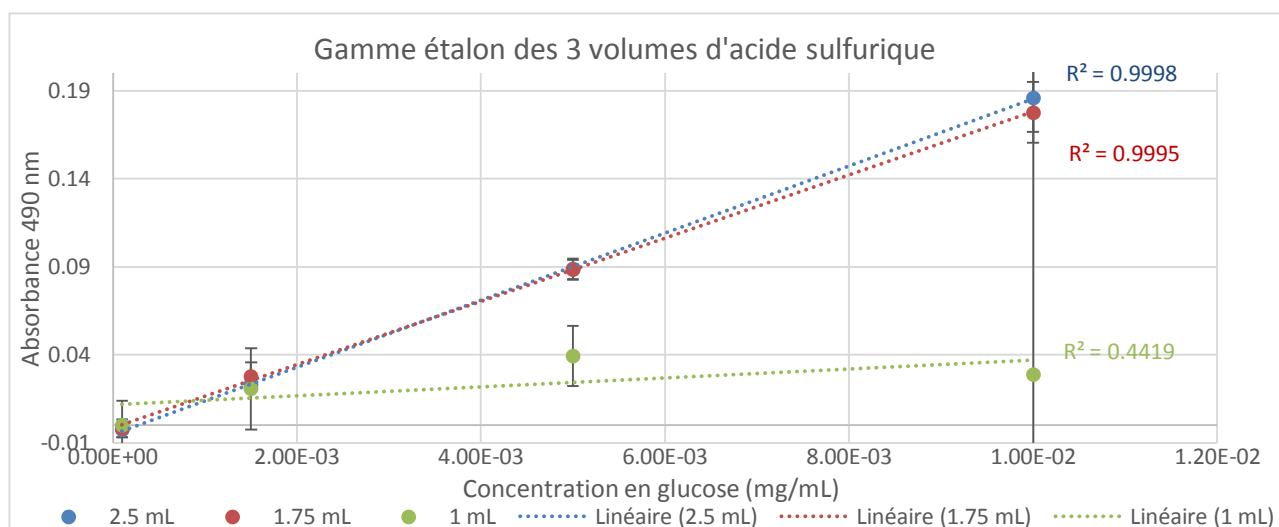


FIGURE 3 : Résultats du test volume d'acide sulfurique

Dans un second temps la fiabilité de l'analyse utilisant un volume de 2.5 mL d'acide sulfurique et du phénol à 98 %, a été vérifiée. La reproductibilité de la gamme étalon est réalisée en analysant trois fois une gamme de 13 points pour des concentrations de l'échantillon allant de 0.6  $\mu\text{M}$  à 600  $\mu\text{M}$  de glucose. La moyenne et les écart-types de trois séries sont représentés dans la figure 4.

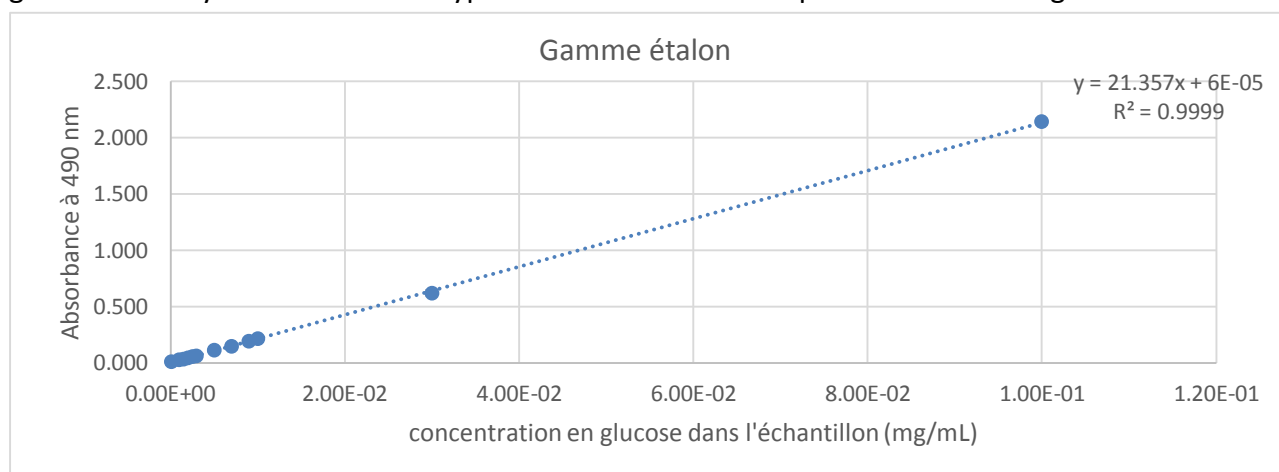


FIGURE 4: Linéarité de la gamme étalon pour le protocole dosage du glucose dissous

Ce protocole validé d'un point de vue fiabilité et sensibilité permettant de doser le glucose dissous en faibles concentrations sera donc utilisé dans la suite de l'étude.

## B. Développement de la méthode d'analyses des acides aminés libres et liés dissous

### 1. Choix du kit et de la méthode utilisée

Les acides aminés sont séparés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse après dérivation pré-colonne. Deux kits aux procédures automatisées, donc fortement reproductibles sont possibles, celui d'Agilent et celui de Waters. Waters propose une dérivation avec seulement 1 réactif. Cependant leur dérivation se fait à pH 5, or les composés formés à ce pH vont être protonés, et seront donc moins retenus sur la colonne engendrant une perte de 20 % de rétention (communication personnelle avec le Dr C. Herrenkrecht, université de Nantes). Une dérivation à pH 7-8 recommandée par Agilent permet une meilleure rétention des composés. La méthode d'analyse des acides aminés avec les réactifs et la note d'application proposées par le fournisseur Agilent est utilisée dans la suite de l'étude.

## 2. Optimisation de l'analyse des acides aminés par HPLC fluo

### a. Seuil de détection

Des analyses préliminaires ont été effectuées afin de déterminer si la méthode Agilent permettrait de détecter de faibles concentrations en acides aminés de l'ordre de la dizaine de nanomolaires. Pour cela il est important de minimiser les pics de pollution ainsi les réactifs sont préparés de manière la plus propre possible. Ces essais ont été réalisés avec les prélèvements de la fraction dissoute issu d'une culture de T-iso et les standards d'acides aminés (ANNEXE 4) dilués jusqu'au 10 nM. Ces premières analyses ont permis de quantifier les standards jusqu'au 10 nM.

### b. Test du volume d'échantillon injecté

Dans le but d'obtenir des gammes linéaires, pour des concentrations allant de 10 nM à 7,5  $\mu$ M, reliant l'aire du pic et la concentration pour chaque acide aminé, plusieurs volumes d'échantillon injectés ont été testés. Les volumes suivants ont été testés : 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9  $\mu$ L. Le volume d'échantillon à injecter choisi est de 5  $\mu$ L; volume pour lequel les acides aminés ont une gamme étalon linéaire, le chromatogramme a une ligne de base constante, il n'y a pas ou peu de trainée de pic ni de co-élution de pic et il n'y a pas de saturation du signal pour des concentrations en acide aminés inférieures à 7,5  $\mu$ M.

### c. Mise au point de la quantification et de l'identification des acides aminés

Les gammes étalons de chaque acide aminé ont été réalisées. L'étude des 12 chromatogrammes (exemple d'un chromatogramme figure 5) des standards d'acides aminés ont permis de connaître leur temps de rétention respectif (ANNEXE 4) et de mettre en évidence une bonne reproductibilité de ces temps de rétention via l'étude de leurs écarts-types. De plus, l'étude des gammes pour chaque acide aminé permet d'obtenir son seuil de saturation pour 5  $\mu$ L injecté. Ainsi nous pouvons retrouver l'acide aminé détecté dans l'échantillon ainsi que le quantifier.

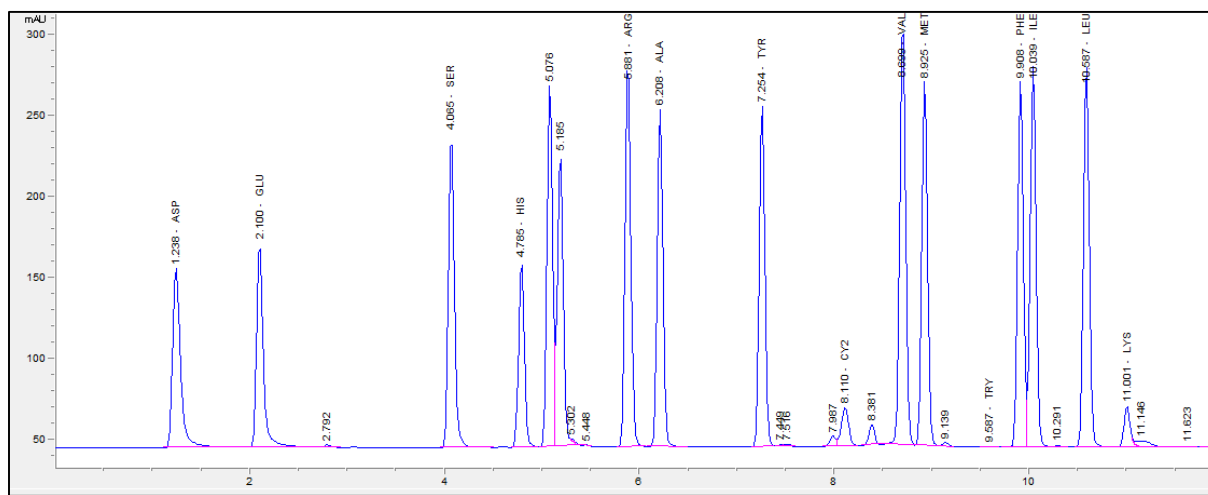


FIGURE 5 : chromatogramme sur ChemStation, injection des 17 standards (5 $\mu$ L injecté, à 5  $\mu$ M)

### d. Futures optimisations

Le détecteur de fluorescence équipant la chaîne ne peut pas opérer un changement de longueur d'onde de signal pour analyser les acides aminés dérivés au FMOC à la suite de ceux analysés par marquage à l'OPA tout en gardant une forte sensibilité. Les acides aminés tels que l'hydroxyproline et la proline n'ont donc pas pu être dosés. De plus, afin d'optimiser cette analyse, des modifications de gradient auraient été nécessaires, afin de bien séparer des pics quelquefois co-élus comme la glycine et la thréonine. Une régulation thermique de la chaîne permettrait aussi d'augmenter la

reproductibilité et la netteté des pics car la variation de température modifie la viscosité des phases et donc leur temps de latence dans les tuyaux, ce qui entraîne parfois une traînée à la base du pic.

### C. Etude de la croissance de T-iso en conditions limitantes : suivi de la biomasse cellulaire et des éléments nutritifs des cultures

Les deux réplicats de culture ont produit des résultats comparables ; l'acclimation des inocula aux conditions de limitation ultérieures, conjuguée à des apports d'éléments limitants appropriés a permis de contraindre le développement de la biomasse dans les deux types de cultures à  $5.10^9$  cellules.L<sup>-1</sup> le 3,7<sup>ème</sup> jour et  $10.10^9$  cellules.L<sup>-1</sup> le 4,6<sup>ème</sup> jour respectivement pour les culture limitées en N et P (figure 6b et 7b). Les taux de croissance maximale, avec  $\mu = \frac{d(X)}{dT} \cdot \frac{1}{X}$  le taux de croissance; où X est le nombre de cellules par mL et T, le temps en jour ; sont sensiblement comparables dans les deux cas de limitation. En N limitant  $\mu_{max}$  est de  $1.35 \text{ j}^{-1}$  atteint au bout de 21 heures, en P limitant le taux  $\mu_{max} = 1.6 \text{ jr}^{-1}$  est atteint dès 19 heures.

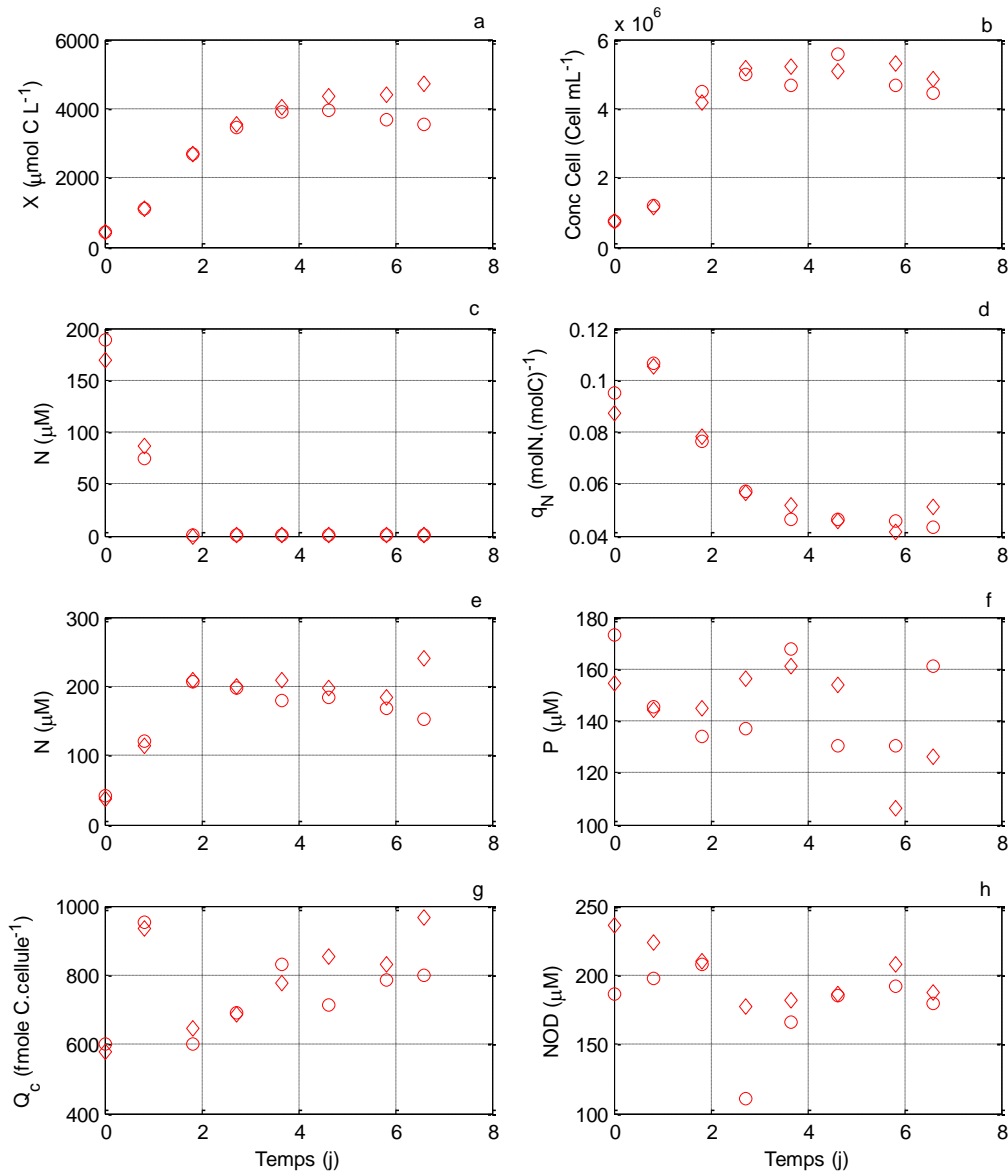


FIGURE 6 : Evolution des variables mesurées au cours des cultures limitées par le N des réplicats 1 (◇) et 2 (○). (a) carbone particulaire ; (b) concentration cellulaire ; (c) N résiduel ; (d)  $q_N$  ; (e) N particulaire (f) P résiduel ; (g) Quota cellulaire en carbone ; (h) NOD (azote organique dissous)

La concentration en élément limitant décroît rapidement pour atteindre des valeurs non détectables ; au 1,8 jour en N limitant et dès le 1<sup>er</sup> jour en P limitant (figure 6c et 7f). Une très faible concentration, entre 0 et 1  $\mu\text{M}$  de phosphore inorganique, est présent dans la culture en P limitant juste après épuisement à 1,9 jours (figure 7f). Ce résultat pourrait s'expliquer par les travaux de Rothhaupt (Rothaupt, 1992) sur un possible relargage de phosphore bactérien en retour à une utilisation des excréments de carbone organique microalgales. Cependant, aucune explosion bactérienne n'a pu être observée.

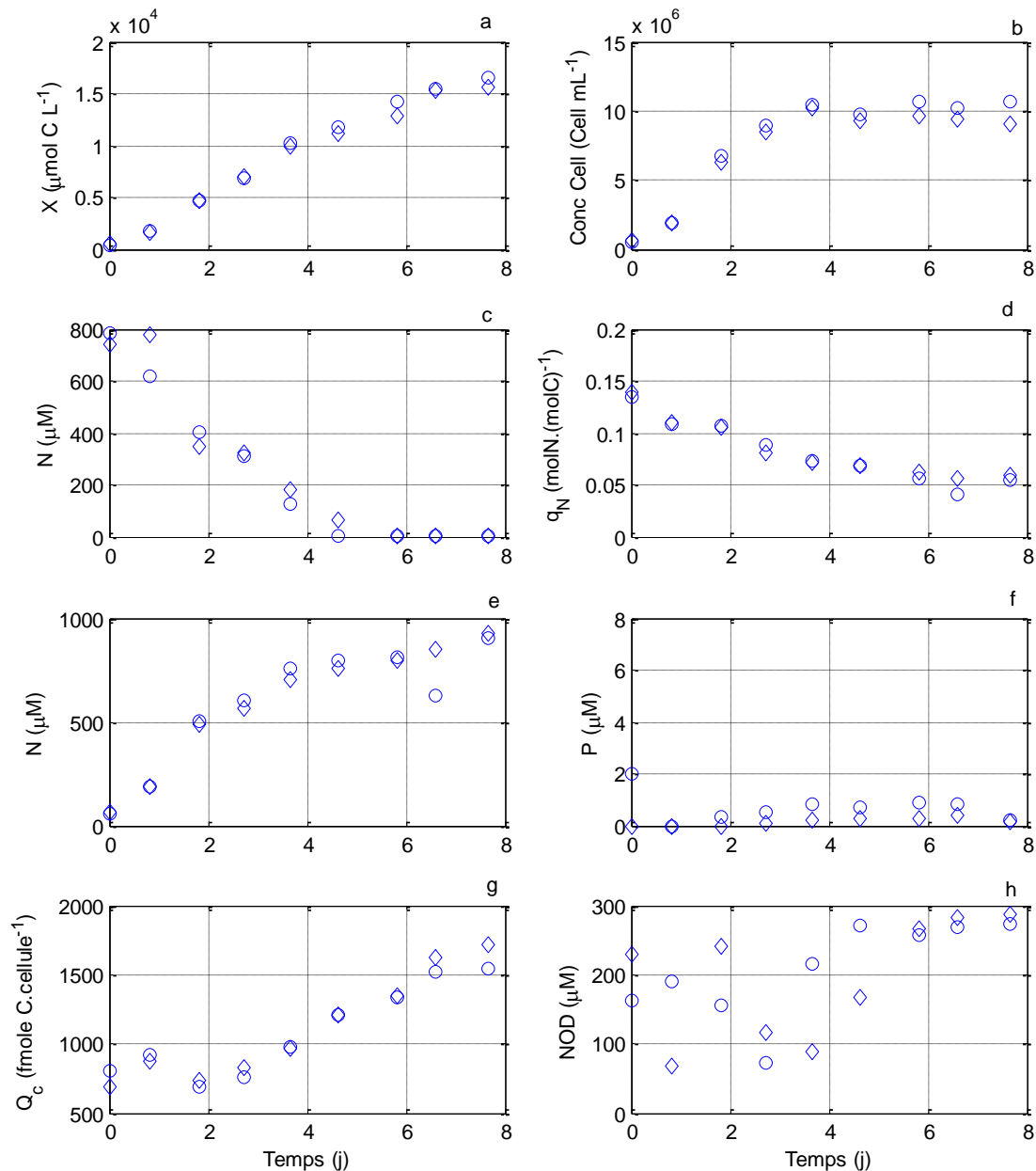


FIGURE 7 : Evolution des variables mesurées au cours des cultures limitées par le P des réplicats 1 (◇) et 2 (○). (a) carbone particulaire ; (b) concentration cellulaire ; (c) N résiduel ; (d)  $q_N$  ; (e) N particulaire (f) P résiduel ; (g) Quota cellulaire en carbone ; (h) azote organique dissous

Concernant l'élément non limitant (P), il reste présent tout au long de la phase de croissance. Le phosphore persiste pour des concentrations de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{M}$  dans les cultures en N limitant (figure 6f). En effet le manque d'azote ne permettant pas à la cellule de croître et d'anaboliser de la matière organique notamment des protéines, ne nécessite donc pas une grande quantité de phosphore. En azote limitant le quota cellulaire  $Q_N$  maximale ( $0,11 \text{ molN} \cdot \text{molC}^{-1}$ ) est

rapidement atteint en accord avec une très rapide diminution de l'azote inorganique. Un fort déclin de ce quota est observable en phase stationnaire (figure 6d). L'ensemble de l'azote inorganique est métabolisé et est donc acquis par la biomasse dès le deuxième jour.

En revanche en P limitant, quasiment tout l'azote inorganique est consommé lorsque la culture parvient en phase stationnaire. Les résultats des évolutions observées en P limitant sont plus étalés dans le temps par rapport aux cultures N limitantes. Alors que le  $\text{PO}_4$  disparaît dès les premières heures de culture, le  $\text{NO}_3$  est épuisé seulement au bout du 5<sup>ème</sup> jour. En effet le manque de phosphore et donc d'énergie limite la vitesse d'absorption de l'azote par les cellules (Bougaran, 2010). Le  $Q_N$  maximal est atteint dès le début de culture puis diminue jusqu'à une valeur minimale de  $0.05 \text{ molN.molC}^{-1}$ . En phase stationnaire on observe un arrêt de l'accumulation d'azote particulaire après épuisement de l'azote inorganique en début de phase stationnaire.

Le quota de carbone cellulaire (figure 6 et 7 g) est d'en moyenne  $824 \text{ fmoleC.cell}^{-1}$  et  $1627 \text{ fmoleC.cell}^{-1}$  pour N limitant et P limitant respectivement. Ces quotas maximaux sont atteints en fin de phase stationnaire pour les deux types de limitations. Le quota de carbone élevé en condition de carence par le P peut être dû au fait que la culture possède (1) davantage d'exsudats ou (2) de débris cellulaires qui biaisent la mesure du vrai C cellulaire ou (3) des cellules de volume supérieur.

Dans la suite du rapport nous nous intéresserons particulièrement aux résultats obtenus en phase de croissance. L'étude du compartiment dissous en phase stationnaire n'est pas représentative du métabolisme et du comportement d'une cellule au vu de la mortalité et de la lyse cellulaire qui s'opèrent. En effet les analyses du compartiment dissous se trouvent entachées d'erreurs du fait du relargage potentiel du matériel organique par les lyses cellulaires.

#### D. Analyses des excréctions glucidiques

##### 1. Etude des excréctions du D-Glucose par T-iso

Une première observation graphique nous montre que le taux de D-glucose augmente dans le compartiment dissous (figure 8, a, b). En étudiant son taux d'excrétion selon la formule suivante :

$\mathcal{E} = \frac{d([\text{glucose}])}{dT} \cdot \frac{1}{X}$  ; où [glucose] est la concentration en D-glucose dans la fraction dissoute en  $\mu\text{M}$ , X est la biomasse représentée par le carbone particulaire en  $\mu\text{M}$  et T le temps ; on observe une distinction entre les cultures en phosphore et en azote limitant (figure 8 e, f). La limitation en phosphore entraîne une moins forte excrétion de glucose dissous dans le milieu en phase de croissance. Il est possible que T-iso palie à son manque énergétique relarguant moins de glucides, contrairement à une limitation en azote qui favorise un relargage glucidique surtout en phase stationnaire. Un stress, comme une limitation en azote, favorise la microalgue à passer à un processus de production de réserves lipidiques et engendre une excrétion des mucilages tels que les EPS (substance exopolymérique) et COE (carbone organique extracellulaire) (Stone, 1990 ; Micklestead, 1974). Ce graphique met en évidence ce processus d'exclusion de matière organique. Le taux d'excrétion glucidique est plus élevé dans les cultures en azote limitant. Sous les deux conditions de limitation le taux d'excrétion glucidique augmente au cours du temps.

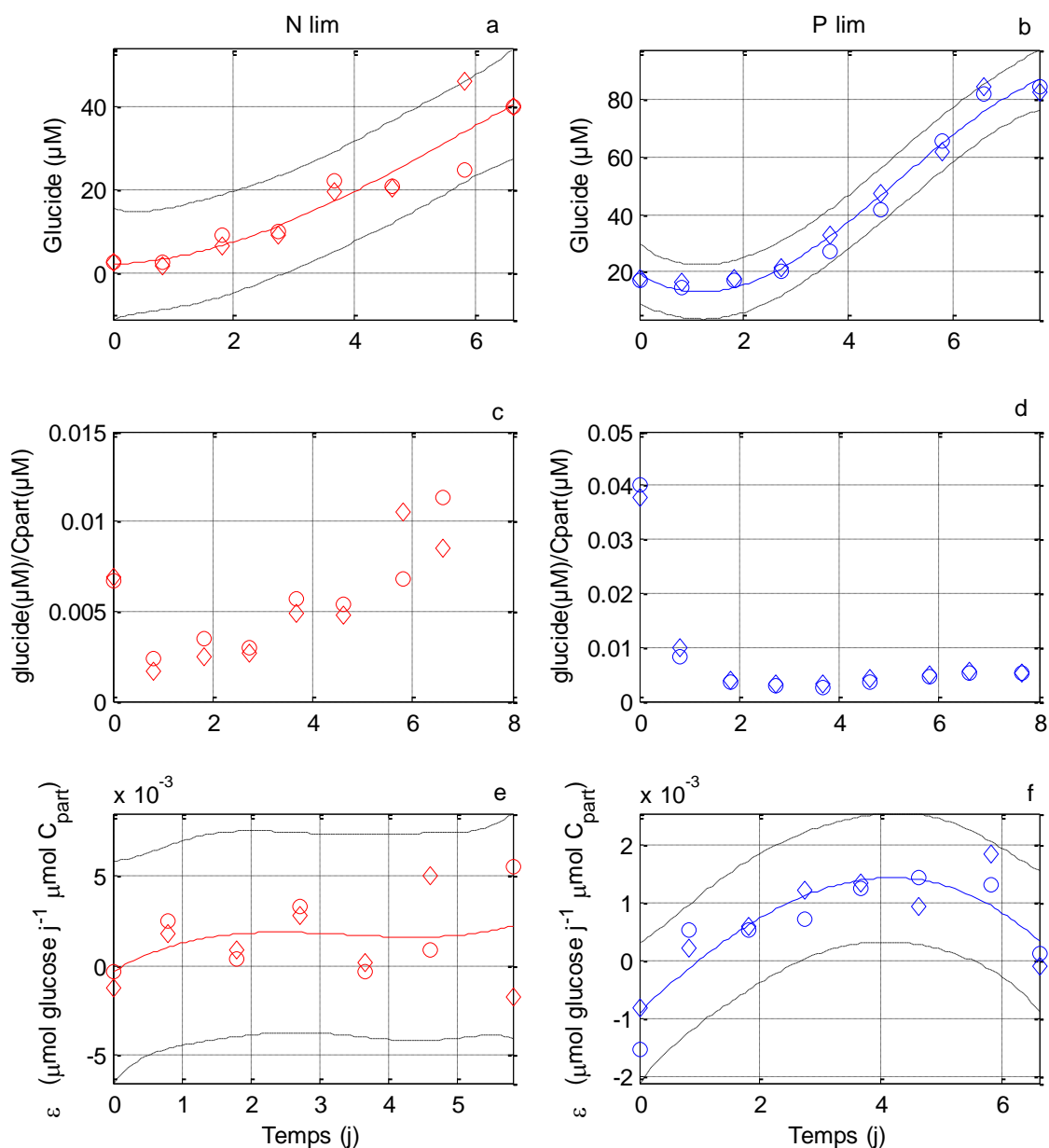


FIGURE 8 : Evolution des variables mesurées au cours des cultures limitées par le N (a, c et e) et le P (b, d et f) des réplicats 1 (◇) et 2 (○). (a), (b) concentration en glucose ( $\mu\text{M}$ ) ; (c), (d) glucose/Carbone particulaire; (e), (f) taux d'excrétion glucidique ; (--) intervalle de confiance à 95 %

## 2. Etude de la fraction carbonée dissoute et part du glucose dans ce dernier

### a. Etude de l'évolution du carbone organique dissous et de la contribution du glucose à cette fraction en culture sous limitation azotée

Les résultats d'analyses de carbone organique dissous montrent des évolutions très différentes d'un réplicat à un autre. Dans le 1<sup>er</sup> réplicat, le COD et le COD ramené à la biomasse diminuent en phase de croissance exponentielle alors que ces valeurs augmentent dans le 2<sup>ème</sup> réplicat (figure 9 a, b).

D'après la littérature, le COD marin est de l'ordre 300 micromolaires (Susuki et Sugimura, 1988). Le 2<sup>ème</sup> réplicat semble être le plus en adéquation et donc représentatif de l'évolution du carbone organique dissous. De plus, deux autres raisons favorisent ce choix. Le COTmètre a fourni de très fortes valeurs en début de culture dans le 1<sup>er</sup> réplicat, qui semble être un problème technico-analytique ou de contamination de l'échantillon. Cependant les résultats de plusieurs blancs d' $\text{H}_2\text{O}$  et d'EMA semblent valider la fiabilité de la machine.



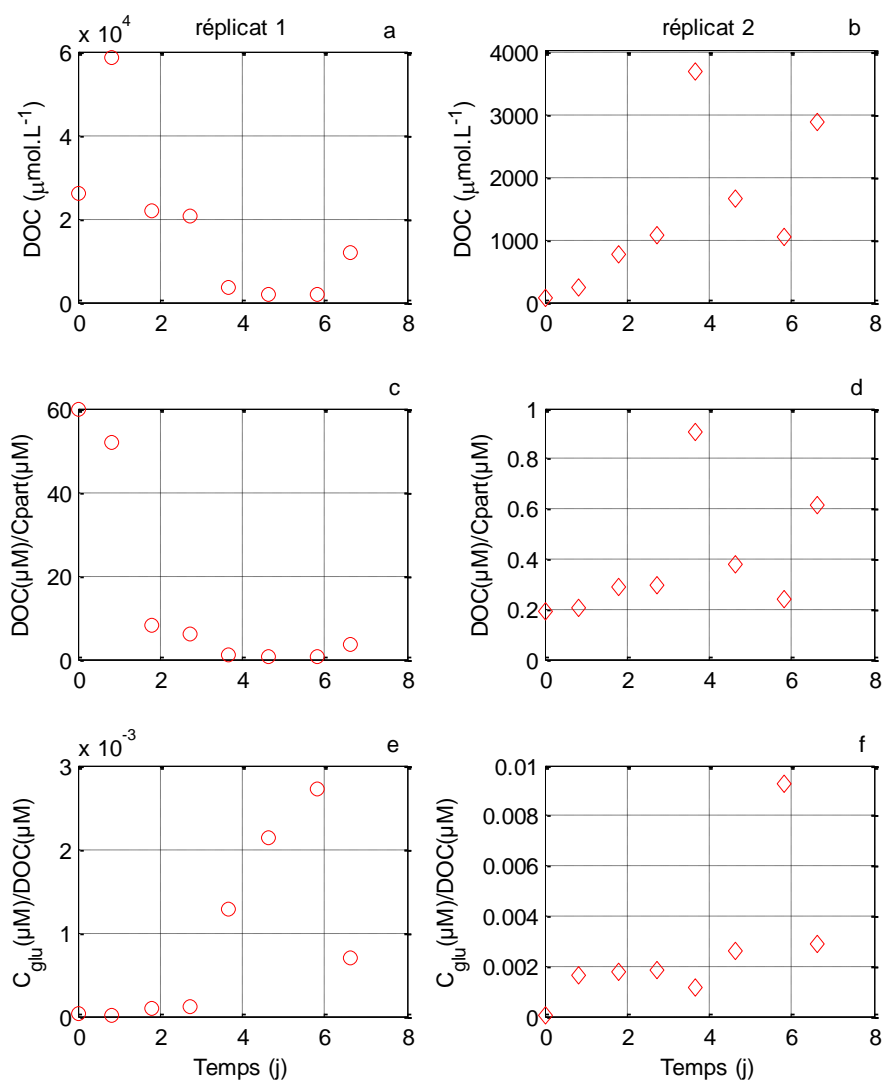


FIGURE 9 : Evolution des variables mesurées au cours des cultures limitées par le N des réplikat 1 (○) et 2 (◇). (a), (b) carbone organique dissous ; (c), (d) DOC/Carbone particulaire ; (e), (f) Carbone glucidique dissous/carbone organique dissous

De plus, il existe une évolution similaire du COD et du glucose dans la culture. Enfin, les résultats d'analyses au COTmètre des 3 points du 1<sup>er</sup> réplikat (au 3,6 ; 4,6 ; 5,8<sup>ème</sup> jour), n'étaient pas hors gamme, sans dilution de l'échantillon, contrairement aux autres points, semblent en accord avec le 2<sup>ème</sup> réplikat. Dans la suite de ce rapport afin de pouvoir au mieux analyser les cinétiques d'évolution des prochains résultats nous nous appuierons sur les résultats du COD du 2<sup>ème</sup> réplikat. Un triplicat

aurait peut-être permis de valider ou non ce choix.

Ainsi si l'on s'intéresse au deuxième réplikat, la part du carbone glucidique dans le COD augmente surtout en début de culture (figure 9 f) et la quantité de carbone organique dissous augmente plus rapidement que la biomasse (figure 9 d) sur toute la phase de culture, selon une tendance linéaire. Cependant sur cette même phase le taux d'excrétion reste faible, inférieur à 0.8 et relativement constant.

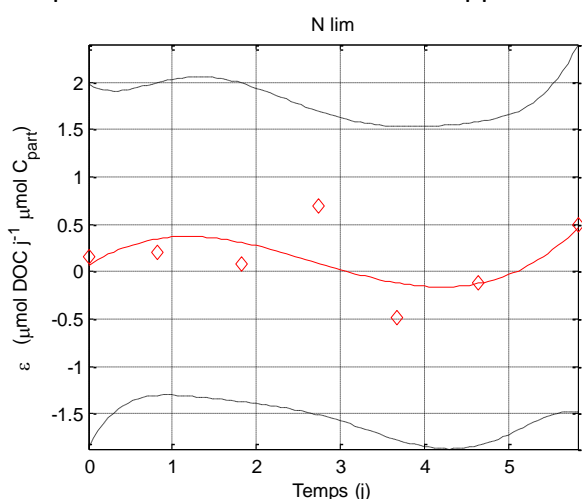


FIGURE 10 : Taux d'excrétion du carbone organique dissous en azote limitant; en rouge : réplikat (2) en N limitant; (--) intervalle de confiance à 95 %

b. Etude de l'évolution du carbone organique dissous et de la contribution du glucose à cette fraction en culture sous limitation phosphorique

La tendance générale de l'évolution du DOC dans le milieu est comparable dans les deux réplicats (figure 11). Le carbone organique dissous tend à diminuer puis augmente en phase stationnaire. Pour l'interprétation des résultats, les points aux jours 2 et 6 sont exclus. En effet, malgré les similitudes d'évolutions dans les deux réplicats, il est important de noter que les ordres de grandeurs de ces résultats sont très différents. Il faudrait effectuer des analyses sur des échelles de temps plus rapprochées pour valider ou non l'hypothèse d'une dynamique inconstante du COD entre 0 et 3 000  $\mu\text{M}$  au cours de la journée et ainsi exclure la possibilité d'un artéfact. Cependant il est possible qu'au cours de la filtration afin de récupérer la fraction dissoute de l'échantillon, une contamination ait eu lieu.

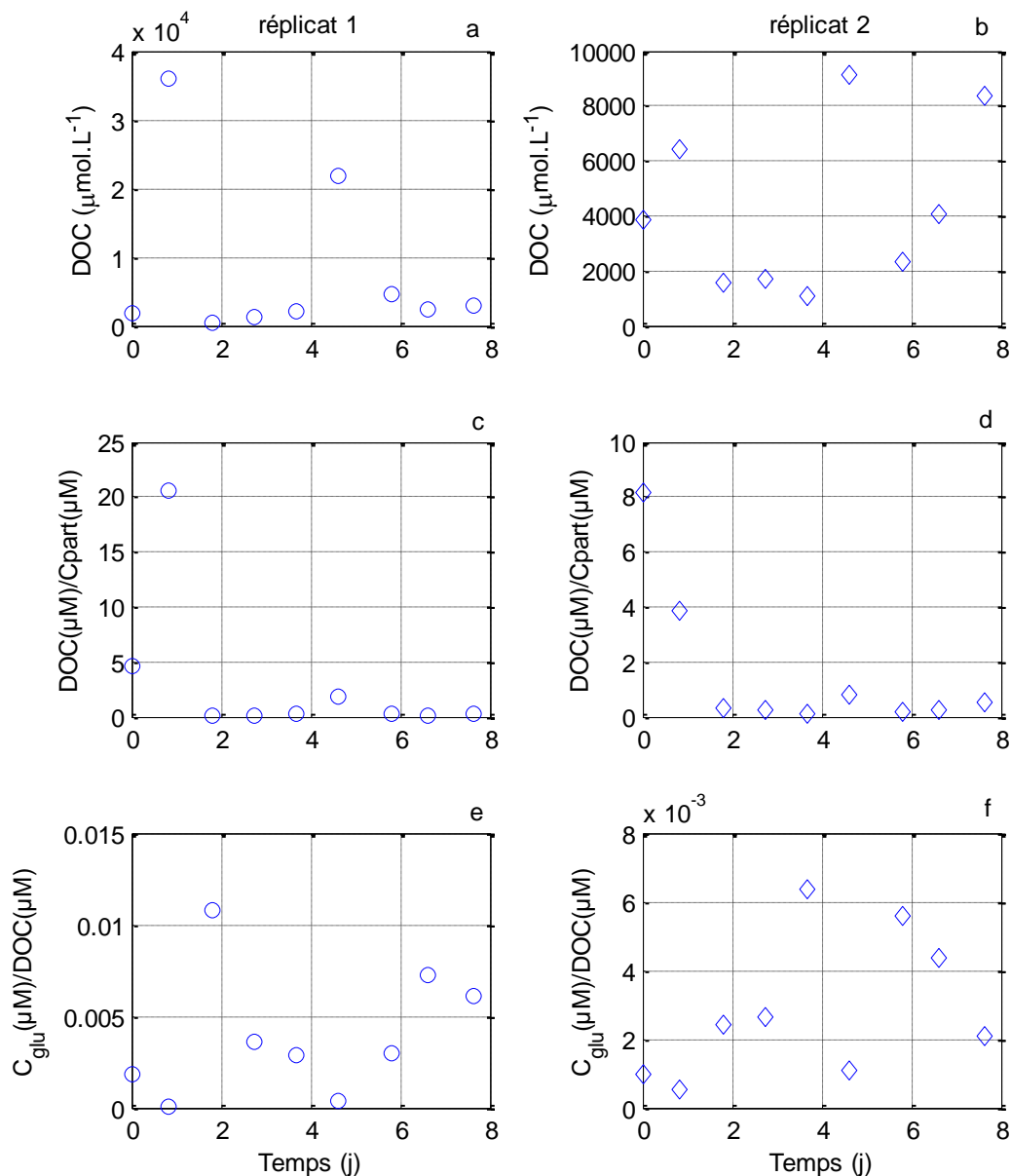
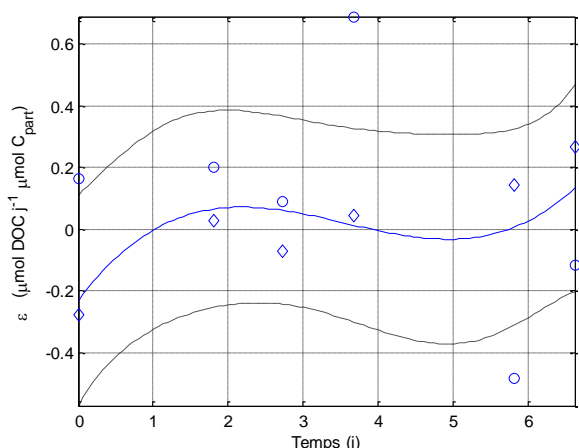


FIGURE 11 : Evolution des variables mesurées au cours des cultures limitées par le P des réplicats 1 (○) et 2 (◇). (a), (b) carbone organique dissous ; (c), (d) DOC/Carbone particulaire ; (e), (f) Carbone glucidique dissous/carbone organique dissous

La contribution du glucose au DOC est de l'ordre de  $5 \cdot 10^{-3}$  (figure 11 e et f), ce qui est du même ordre de grandeur que pour le réplikat 2 en azote limitant. Cependant cette contribution semble moins augmenter au cours du temps.

De même qu'en azote limitant, le taux d'excrétion de carbone organique est faible (proche de 0.1). Cela ne veut pas dire qu'il n'y a pas d'excrétion absolue. Nous avons vu précédemment qu'en azote



limitant les cellules avaient tendance à relarguer des glucides. Ainsi l'hypothèse est la suivante ; il se peut qu'en N limitant cette fraction COD s'enrichisse en glucides comme le montre la figure 8(d) et s'appauvrisse en d'autres molécules carbonées comme les acides aminés. A l'inverse en phosphore limitant les cellules excréteraient des acides aminés. Une augmentation de NOD est d'ailleurs observable en phosphore limitant (figure 7h).

FIGURE 12 : Taux d'excrétion du carbone organique dissous en phosphore limitant; réplicats 1 (○) et 2 (◇); (--) intervalle de confiance à 95 %

## E. Identification et quantification des acides aminés dans la fraction dissoute

### 1. Identification et quantification des acides aminés libres dissous dans une culture de T-iso en azote limitant

En azote limitant seul les acides aminés suivants ont été détectés par l'HPLC (les autres sont en concentration inférieure à 10 nM) : l'acide aspartique, l'histidine et thréonine (les acides aminés majoritaires dans le milieu), l'acide glutamique et la sérine. Leur concentration est de l'ordre de la dizaine de nM et la concentration en acides aminés libres totaux est globalement comprise entre 100 et 200 nM (figure 13). Certains acides aminés restent en concentration constante et faible. D'autres acides aminés (asparagine, histidine, thréonine) ont une concentration qui diminue fortement, d'un facteur 10 en phase de croissance exponentielle. Les travaux d'Admiraal *et al* (1986) décrivent ce même rapide épuisement des acides aminés dissous en limitation en azote. Pour l'ensemble des acides aminés, lorsque l'on rapporte la concentration à la biomasse cellulaire, le ratio que nous appellerons dans la suite, C, tend à diminuer fortement en phase de croissance. De plus en comparaison avec les cultures en phosphore limitant la part d'acides aminés libres dans le surnageant d'une culture en azote limitant est très faible. Ceci est à rapprocher du fait de la carence azotée de ces cellules, condition dans laquelle les cellules n'auront pas tendance à sécréter l'élément limitant. Par ailleurs, cette observation est en accord avec les observations d'Admiraal (1986) qui montrent que les microalgues sont capables d'absorber certains acides aminés pour couvrir leurs besoins en azote.

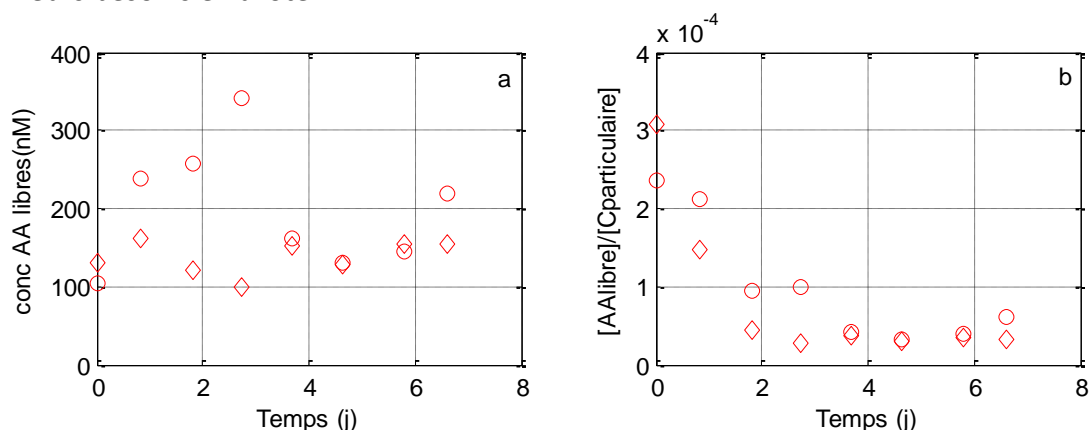


FIGURE 13 : Evolution des variables mesurées au cours des cultures limitées par le N des réplicats 1 (○) et 2 (◇). (a) concentration en acides aminés libres totaux ; (b) concentration en acides aminés libres totaux rapporté à la biomasse cellulaire

## 2. Identification en quantification des acides aminés libres dissous dans une culture de T-iso en phosphore limitant

La concentration totale en acides aminés libres dans le milieu de culture en phosphore limitant varie de 200 nM en début de culture à plus de 1000 nM en fin de culture (figure 14). En azote limitant la concentration est beaucoup plus faible. Ces résultats montrent une réelle différence selon l'élément limitant. En P limitant, leur concentration totale connaît un maximum alors que le taux de croissance tend vers zéro (lorsque les cellules entrent en carence par le P) et juste avant que l'azote minéral soit épuisé dans le milieu. Par la suite, leur concentration diminue rapidement, suggérant une absorption par les cellules microalgales ou par d'autres organismes comme des bactéries.

L'étude des résultats montre que la majeure partie des acides aminés dans le milieu de culture est représenté par la glutamine, et l'histidine dont leur concentration est de plusieurs centaines de nanomolaires.

La concentration de chaque acide aminé augmente dans la fraction dissoute notamment la glutamine et l'histidine (figure 14 a). Cependant après l'étude du ratio C de ces acides aminés, deux profils d'évolution du ratio sont possibles. Pour les acides aminés, sérine, asparagine, acide glutamique, histidine, thréonine et la valine le ratio diminue fortement en phase de croissance. Le taux d'excrétion de ces acides aminés est faible et diminue au cours de la culture. Les autres acides aminés (leucine (figure 14 c), tyrosine, arginine, méthionine, phénylalanine, alanine, isoleucine) ont une toute autre évolution au cours de la culture. Leur concentration rapportée à la biomasse augmente fortement en phase de croissance puis diminue légèrement en phase stationnaire. Leur taux d'excrétion est croissant en phase de croissance. L'azote inorganique dissous est acquis jusqu'à épuisement et une partie est relarguée en acides aminés. Cet export d'acides aminés est sans doute lié au stress provoqué par la limitation en phosphore.

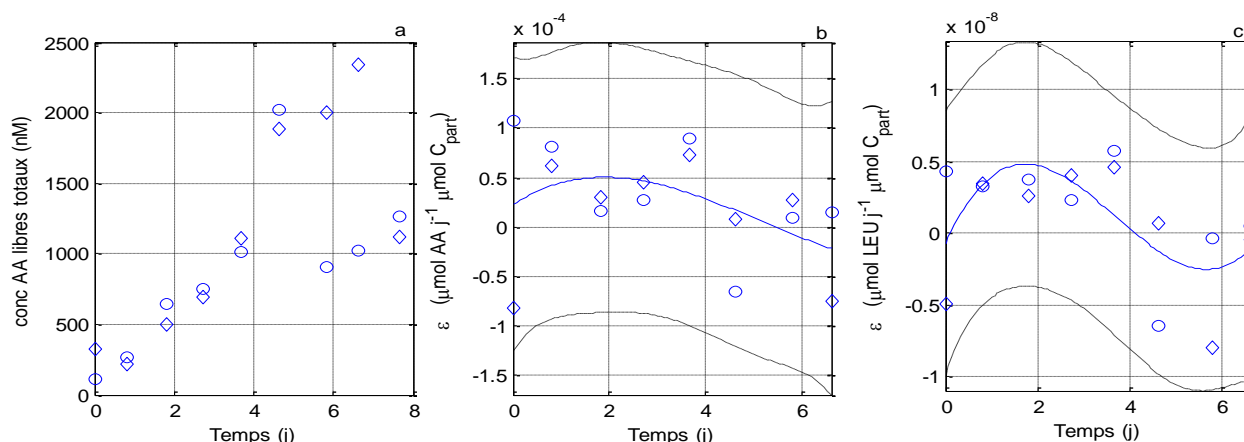


FIGURE 14 : Evolution des variables mesurées au cours des cultures limitées par le P des réplicats 1 (o) et 2 (◇). (a) concentration en acides aminés libres totaux ; (b) Taux d'excrétion des acides aminés libres ; (c) Taux d'excrétion de la leucine ; (--) intervalle de confiance à 95 %

Ces résultats confortent en partie une des hypothèse établie par Bougaran (2014) : sous forte limitation ou carence en phosphore, les cultures de T-iso exporteraient de l'azote organique dans le milieu extracellulaire. Le manque d'énergie (ATP) empêchant l'anabolisme de protéines favoriserait le relargage des acides aminés libres intracellulaires, dont l'assimilation dans les chaînes polypeptidiques est très énergivore. Turpin (1991) propose en effet une dépense énergétique double pour l'assimilation de l'azote dans les protéines, par rapport à son transport et son assimilation dans les acides aminés. De plus il s'avère que 6 acides aminés sur les 7 les plus exportés dans le milieu extracellulaire font partie des acides aminés à propriété hydrophobe. Il est donc intéressant de noter que ces excréctions sélectives ne peuvent pas être liées à de la lyse cellulaire. Cette propriété hydrophobe les rend facilement exportables au travers de la membrane plasmique.

### 3. Etude de la part de l'azote et du carbone des acides aminés libres dans le dissous

Afin d'établir des bilans sur la part des acides aminés dans le carbone et l'azote organique dissous, l'étude des ratios suivant a été réalisé.

En azote limitant la part du carbone des acides aminés dans le COD diminue en phase de croissance, en effet c'est la part glucidique qui tend à contribuer davantage (figure 15a). La part azotée des acides aminés dans le NOD est très faible (de l'ordre de un pour mille) et tend à très légèrement augmenter au cours de la culture (figure 15c).

En phosphore limitant (figure 15 b et d), la part du carbone provenant des acides aminés et la contribution azotée de ces aminés dans le NOD augmentent fortement en phase de croissance. Ces observations mettent en évidence l'excrétion d'acides aminés dans le milieu extracellulaire.

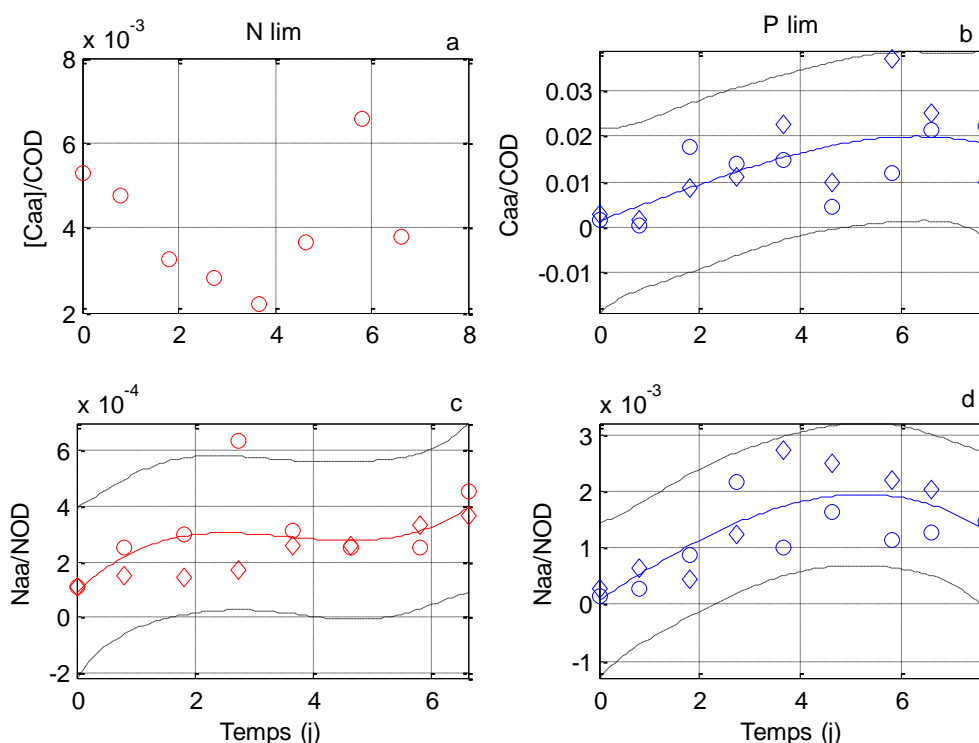


FIGURE 15: Evolution des variables mesurées au cours des cultures des réplicats 1 (○) et 2 (◇). (a) (c) Part du carbone des acides aminés dans le COD ; (b) (d) Part de l'azote des acides aminés dans le NOD ; (--) intervalle de confiance à 95 %

Dans tous les cas de figure, les acides aminés libres représentent une faible fraction du NOD et du COD et n'expliquent donc pas leurs évolutions majeures. Il serait intéressant d'étudier ce phénomène et plus particulièrement le rôle de ces excréments. Les travaux de Chevanton (2013) ont supposé l'existence d'une interaction de commensalisme entre certaines bactéries et *Dunaliella sp.* La microalgue aurait un meilleur rendement grâce à la reminéralisation par la bactérie, de l'azote organique qu'elle relargue.

### 4. Identification et quantification des acides aminés peptidiques et protéiques dissous dans une culture de T-iso

Les résultats obtenus ne peuvent pas être représentatifs de la totalité des acides aminés. Les acides aminés les plus abondants ont pu être détectés. En effet, suite à l'hydrolyse acide et à chaud, certains acides aminés ne sont plus détectés. Ceci peut être dû soit à une dégradation de la molécule ou soit à une dilution trop importante par les réactifs d'hydrolyse. Ainsi les acides aminés suivants, pourtant présents dans les analyses d'acides aminés libres, ne sont plus observables : acides aspartique, acide glutamique, asparagine, histidine, thréonine méthionine, tyrosine, isoleucine.

Malheureusement il est difficile de juger de la pertinence de ces résultats. La concentration totale en acides aminés peptidiques dans le milieu de culture en phosphore limitant est inférieure à 10 nM en début de culture et d'environ 6  $\mu\text{M}$  en fin de culture. En azote limitant la concentration peptidique est beaucoup plus faible ; en début de culture elle est inférieure à 10 nM et de 400 nM en fin de culture. En rapportant les concentrations à la biomasse cellulaire, il semble que la fraction peptidique est deux fois supérieure en P limitant qu'en azote limitant. Cependant ces résultats ne sont pas représentatifs, car une part des acides aminés n'est plus détectée. Néanmoins un point important serait de s'intéresser à la présence de la glycine et de la cystine issue de la part peptidique et ou protéique dans le milieu dissous et non présents sous la forme d'acide aminé libre.

### 5. Apparition d'un composé inconnu comportant une fonction amine

Dans les chromatogrammes nous avons pu observer l'apparition d'un composé inconnu. La seule supposition sur sa composition est qu'il possède une fonction amine car il est dérivé avec l'OPA. Sa concentration évolue de la même façon dans les quatre photobioréacteurs (figure 16). De plus sa concentration rapportée à la biomasse est identique dans les deux conditions de culture et son taux d'excrétion est plus élevé en début de culture. Il serait intéressant de connaître cette molécule qui semble être fortement excrétée surtout en phase stationnaire. Trois autres standards d'acides aminés - la  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine, la N-(2-aminoethyl)-glycine et la 2,4-Diaminobutyric Acid, acides aminés non protéinogènes souvent produits par des cyanobactéries ont été analysés à l'HPLC fluo. Les temps de rétention de ces trois standards, différent du composé inconnu, n'a donc pas permis d'avancer dans son identification. Des analyses plus poussées de spectrométrie de masse couplées avec de la chromatographie en phase gazeuse permettraient peut être de d'identifier cette molécule.

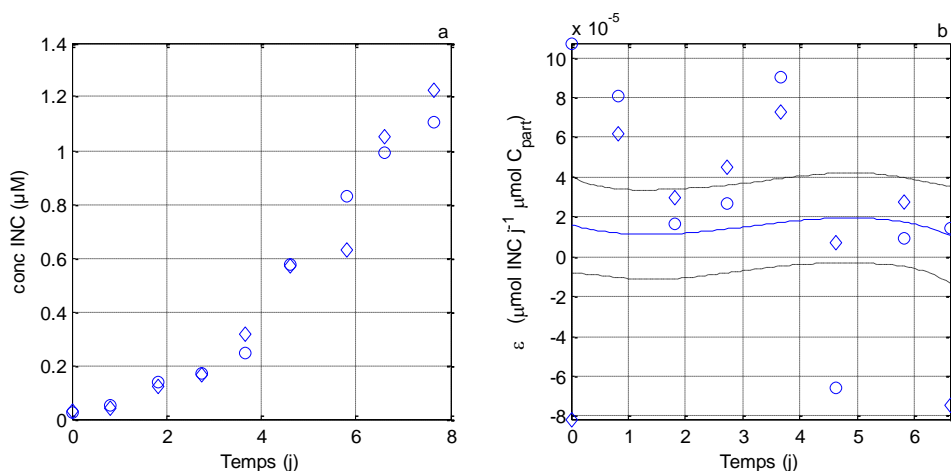


FIGURE 16 : Evolution des variables mesurées au cours des cultures en P limitant des réplicats 1 (○) et 2 (◇). (a) concentration de l'inconnu (μM) ; (b) Taux d'excrétion du composé inconnu ; (--) intervalle de confiance à 95 %

## IX. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude est l'objet de l'analyse du carbone et de l'azote organique dissous en particulier en passant par la quantification du glucose, et la quantification et l'identification des acides aminés présents dans le milieu extracellulaire. Des mises au point protocolaires ont été nécessaires afin d'en mesurer les dynamiques. En effet le milieu dissous étant faiblement concentré, le seuil de détection des différents protocoles initiaux a dû être optimisé.

Aucune contamination des cultures n'a été remarquée lors des observations microscopiques quotidiennes et par l'étude de la densité optique des cultures. Néanmoins une analyse plus précise

à l'aide du Cybergreen permettrait de confirmer cela. En effet une pollution bactérienne entraînerait un biais dans les analyses.

L'analyse du glucose nous a permis de mettre en évidence une excrétion ou un relargage glucidique plus fort dans les cultures limitées par l'azote durant la phase de croissance que celles limitées par le phosphore. Seul le D-glucose a pu être quantifié. Il serait intéressant par la suite d'identifier plus précisément quels sont ces glucides excrétés. Par exemple en utilisant des techniques de chromatographie.

En phosphore limitant une exportation d'acides aminés au cours de la culture est visible. Ces résultats ont tout d'abord confirmé l'hypothèse d'une excrétion de matière organique azotée en phosphore limitant et ont aussi permis l'identification d'une part de ces acides aminés excrétés. Il serait intéressant d'affiner notre connaissance sur le rôle des excrétions de ces acides aminés. Des hypothèses de toxicité intracellulaire ou d'allélopathie dans le milieu extracellulaire pourraient être des pistes de recherches ultérieures. De plus des études concernant les mécanismes d'excrétions pourraient être réalisées grâce à des approches moléculaires.

L'identification et la quantification des fractions COD et NOD dans le milieu peuvent être des indicateurs de l'état nutritif des cultures de microalgues. De plus l'étude de la fraction dissoute d'une culture de microalgue régie par l'apport ou non d'élément indispensable, N, P, à la cellule a un intérêt à la fois dans la compréhension plus fine des processus écosystémiques et donc des cycles biogéochimiques mais aussi dans les applications biotechnologiques par une maîtrise plus fine du métabolisme cellulaire.

Le composé aminé inconnu excrété pourrait être une molécule intéressante. Après identification, il serait intéressant d'effectuer des tests biologiques et d'identifier un possible rôle en écologie et son éventuel intérêt en biotechnologie. Dans l'objectif d'une production de cette molécule il faudrait analyser une culture non carencée en nutriment afin de savoir si cette excrétion est due à un stress nutritif. Si cette carence est effectivement un facteur d'excrétion de cette molécule, les conditions de cultures de production pourraient être ainsi optimisées.

Ce travail a permis de développer des méthodes d'analyse de la fraction dissoute des cultures de microalgues. Il ouvre des perspectives nouvelles pour étudier les dynamiques et le rôle du sécrétome de ces organismes. Il s'agit d'un domaine de recherche encore peu exploré, dont les retombées pourraient être particulièrement intéressantes pour les approches écosystémiques et les valorisations biotechnologiques des microalgues.

## X. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Admiraal W, Peletier H, et Laane RWPM. 1986. Nitrogen Metabolism of Marine Planktonic Diatoms; Excretion, Assimilation and Cellular Pools of Free Amino Acids in Seven Species with Different Cell Size. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 98 (3): 241-63.
- Aluwihare LI, Repeta DJ, et Chen RF. 1997. A major biopolymeric component to dissolved organic carbon in surface sea water. *Nature* 387 (6629): 166-69. Doi: 10.1038/387166a0.
- Antia NJ, Harrison PJ, et Oliveira L. 1991. The Role of Dissolved Organic Nitrogen in Phytoplankton Nutrition, Cell Biology and Ecology. *Phycologia* 30 (1):1-89. doi:10.2216/i0031-8884-30-1-1.1
- Barra L, Chandrasekaran R, Corato F, et Brunet C. 2014. The Challenge of Ecophysiological Biodiversity for Biotechnological Applications of Marine Microalgae. *Marine Drugs* 12 (3): 1641-75.
- Bendif EM, Probert I, Schroeder DC, et De Vargas C. 2013. On the Description of *Tisochrysis Lutea* Gen. Nov. Sp. Nov. and *Isochrysis Nuda* Sp. Nov. in the Isochrysidales, and the Transfer of Dicrateria to



- the Prymnesiales (Haptophyta). *Journal of Applied Phycology* 25 (6): 1763-76. Doi: 10.1007/s10811-013-0037-0.
- Berges JA, et Falkowski PG. 1998. Physiological Stress and Cell Death in Marine Phytoplankton: Induction of Proteases in Response to Nitrogen or Light Limitation. *Limnology and Oceanography* 43 (1): 129-35. Doi: 10.4319/lo.1998.43.1.0129.
- Borch NH, et Kirchman DL. 1997. Concentration and Composition of Dissolved Combined Neutral Sugars (Polysaccharides) in Seawater Determined by HPLC-PAD. *Marine Chemistry* 57 (1-2): 85-95. Doi: 10.1016/S0304-4203(97)00002-9.
- Bougaran G, Bernard O, et Sciandra A. 2010. Modeling Continuous Cultures of Microalgae Colimited by Nitrogen and Phosphorus. *Journal of Theoretical Biology* 265 (3): 443-54.
- Bronk DA, See JH, Bradley P, Killberg L. 2007. DON as a source of bioavailable nitrogen for phytoplankton. *Biogeosciences* 4 3:1247–1277.
- Calull M, Fábregas J, Marcé RM, et Borrull F. 1991. Determination of Free Amino Acids by Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate. Application to Wine Samples. *Chromatographia* 31 (5-6): 272-76. Doi:10.1007/BF02275749.
- Chen M, Tang H, Ma H, Holland TC, Ng SKY, et Salley SO. 2011. Effect of Nutrients on Growth and Lipid Accumulation in the Green Algae *Dunaliella Tertiolecta*. *Bioresource Technology* 102 (2): 1649-55.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from Microalgae. *Biotechnology Advances* 25 (3): 294-306.
- Cho JY, Choi JS, Kong IS, Park SI, Kerr RG, Hong YK. 2002. A procedure for axenic isolation of the marine microalga *Isochrysis galbana* from heavily contaminated mass cultures. *Journal of Applied Phycology* 14 (5) 385–390. Doi: 10.1023/A:1022199332224
- Dawson R, et Kenneth M. 1978. A Note on the Losses of Monosaccharides, Amino Sugars, and Amino Acids from Extracts during Concentration Procedures. *Analytical Biochemistry* 84 (1): 186-90.
- Dawson R, et Pritchard RG. 1978. The Determination of  $\alpha$ -Amino Acids in Seawater Using a Fluorimetric Analyser. *Marine Chemistry* 6 (1): 27-40. Doi:10.1016/0304-4203(78)90004-X.
- Dean Pakulski J, et Benner R. 1992. An Improved Method for the Hydrolysis and MBTH Analysis of Dissolved and Particulate Carbohydrates in Seawater. *Marine Chemistry* 40 (3-4): 143-60.
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, et Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28 (3): 350-56. Doi:10.1021/ac60111a017.
- Dugdale RC, et Goering JJ. 1967. « Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity1 : uptake of nitrogen in primary productivity. *Limnology and Oceanography* 12 (2): 196-206. doi:10.4319/lo.1967.12.2.0196.
- Eixler S, Karsten U, et Selig U. 2006. Phosphorus Storage in *Chlorella Vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) Cells and Its Dependence on Phosphate Supply ». *Phycologia* 45 (1): 53-60.
- Geider RJ, Delucia EH, Falkowski PG, Finzi AC, Grime JP, Grace J, Kana TM, et al. 2001. Primary Productivity of Planet Earth: Biological Determinants and Physical Constraints in Terrestrial and Aquatic Habitats. *Global Change Biology* 7(8):849-82. Doi: 10.1046/j.1365-2486.2001.00448.x.
- Geider R, et La Roche J. 2002. Redfield Revisited: Variability of C:N:P in Marine Microalgae and Its Biochemical Basis. *European Journal of Phycology* 37 (1): 1-17. Doi:10.1017/S0967026201003456.
- Gruber N et Galloway JN. 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle *Nature* 451, 293-296. Doi:10.1038/nature06592
- Guiry MD. 2012. How many species of algae are there? *Journal of Phycology* 48 (5): 1057-63.
- Hicks SE et CAREY FG. 1968. Glucose determination in natural waters. *Limnol. Oceanog.* 13:301-363.
- Hutchins DA, et Bruland KW. 1998. Iron-limited diatom growth and Si:N uptake ratios in a coastal upwelling regime. *Nature* 393 (6685): 561-64. Doi:10.1038/31203.
- Johnson KM et Sieburth JMcN. 1977. Dissolved Carbohydrates in Seawater. I, A Precise Spectrophotometric Analysis for Monosaccharides. *Marine Chemistry* 5 (1): 1-13.
- Josefsson BO. 1970. Determination of Soluble Carbohydrates in Sea Water by Partition Chromatography after Desalting by Ion-Exchange Membrane Electrodialysis. *Analytica Chimica Acta* 52 (1): 65-73.



- Josefsson B Uppström L, et Östling G. 1972. Automatic Spectrophotometric Procedures for the Determination of the Total Amount of Dissolved Carbohydrates in Sea Water. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* 19 (5): 385-95. doi:10.1016/0011-7471(72)90081-2.
- Keil R G, et Kirchman DL. 1991. Dissolved Combined Amino Acids in Marine Waters as Determined by a Vapor-Phase Hydrolysis Method. *Marine Chemistry* 33 (3): 243-59.
- Killberg-Thoreson L, Sipler RE et Bronk DA. 2013. Anthropogenic Nutrient Sources Supplied to a Chesapeake Bay Tributary Support Algal Growth: A Bioassay and High-Resolution Mass Spectrometry Approach. *Estuaries and Coasts* 36(5): 966-80. doi:10.1007/s12237-013-96045
- Le Chevanton M, Garnier M, Bougaran G, Schreiber N, Lukomska E, Bérard J-B, Fouilland E, Bernard O, et Cadoret JP. 2013. Screening and Selection of Growth-Promoting Bacteria for *Dunaliella* Cultures. *Algal Research* 2 (3): 212-22. doi:10.1016/j.algal.2013.05.003.
- Muñoz-Tamayo R, Martinon P, Bougaran G, Mairet F, et Bernard O. 2014. Getting the Most out of It: Optimal Experiments for Parameter Estimation of Microalgae Growth Models. *Journal of Process Control* 24 (6): 991-1001. doi:10.1016/j.jprocont.2014.04.021.
- Myklestad S, O. Holm-Hansen, K M. Vårum, et B. E. Volcani. 1989. « Rate of Release of Extracellular Amino Acids and Carbohydrates from the Marine Diatom *Chaetoceros Affinis* ». *Journal of Plankton Research* 11 (4): 763-73. doi:10.1093/plankt/11.4.763.
- Myklestad S. 1974. Production of Carbohydrates by Marine Planktonic Diatoms. I. Comparison of Nine Different Species in Culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 15 (3): 261-74.
- Parsons TR, Maita Y, et Lalli CM. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. 1st ed. Pergamon international library of science, technology, engineering and social studies. Oxford [Oxfordshire] ; New York: Pergamon Press.
- Pujo-Pay M, Conan P, et Raimbault P. 1997. Excretion of Dissolved Organic Nitrogen by Phytoplankton Assessed by Wet Oxidation and <sup>15</sup>N Tracer Procedures. *Marine Ecology Progress Series* 153: 99-111.
- Rothhaupt K. 1992. « Stimulation of Phosphorus-Limited Phytoplankton by Bacterivorous Flagellates in Laboratory Experiments ». *Limnology and Oceanography* 37 (4): 750-59.
- Ryther JH, et Dunstan WM. 1971. Nitrogen, Phosphorus, and Eutrophication in the Coastal Marine Environment ». *Science* 171 (3975): 1008-13. Doi:10.1126/science.171.3975.1008.
- Sanders EM, Ough CS, Am J. 1985. Determination of Free Amino Acids in Wine by HPLC *Enology Viticology* 36: 43-46;
- Sicko-Goad LM, Schelske CL, et Stoermer EF. 1989. Estimation of intracellular carbon and silica content of diatoms from natural assemblages using morphometric techniques. *Limnology and oceanography* 29(6) 1170-1178
- Sriharan S, Bagga D, et Sriharan TP. 1989. Environmental Control of Lipids and Fatty Acid Production in the diatom *Navicula Saprophila*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 20-21 (1): 281-91.
- Stone L. 1990. Phytoplankton-bacteria-protzoa interactions: a qualitative model portraying indirect effects. *Marine ecology progress series*, 64:137-145
- Sugimura Y, et Suzuki Y. 1988. A High-Temperature Catalytic Oxidation Method for the Determination of Non-Volatile Dissolved Organic Carbon in Seawater by Direct Injection of a Liquid Sample. *Marine Chemistry* 24 (2): 105-31. Doi:10.1016/0304-4203(88)90043-6.
- Turley CM. 1986. Urea Uptake by Phytoplankton at Different Fronts and Associated Stratified and Mixed Waters on the European Shelf. *British Phycological Journal* 21 (2): 225-38.
- Turpin DH. 1991. Effect of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology* 27 (1): 14-20.
- Vollenweider RA. 1981. Eutrophication — a global problem. *WHO Water Quality Bulletin*, (V.6)
- Worden AZ, Follows MJ, Giovannoni SJ, Wilken S, Zimmerman AE, et Keeling PJ. 2015. Rethinking the Marine Carbon Cycle: Factoring in the Multifarious Lifestyles of Microbes. *Science* 347 (6223): 1257594-1257594. Doi:10.1126/science.1257594.

## XI. Annexes

### A. ANNEXE 1: milieu de Conway

#### Solution de métaux :

Nom usuel	Formule brute	CAS	Quantité
Chlorure de Zinc	ZnCl <sub>2</sub>	7646-85-7	2,10 g
Chlorure de Cobalt	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	7791-13-1	2,00 g
Ammonium heptamolybdate	6(NH <sub>4</sub> ) Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	12054-85-2	0,90 g
Sulfate de Cuivre	Cu SO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	7758-99-8	2,00 g

Eau distillée : qsp 100 ml

#### Solution principale :

Nom usuel	Formule brute	CAS	Quantité
EDTA Disodique	Na <sub>2</sub> EDTA	60-00-4	45,0 g
Nitrate de sodium	Na NO <sub>3</sub>	7631-99-4	100,0 g
Acide Orthoborique	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10043-35-3	33,6 g
Dihydrogénophosphate de sodium	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13472-35-0	20,0 g
Chlorure de manganèse	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	13446-34-9	0,4 g
Chlorure ferrique	FeCl <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	10025-77-1	1,3 g

Traces de métaux : 1 ml

Eau distillée : qsp 1 l

#### Solution vitaminique :

Nom usuel	CAS	Quantité
Thiamine Chlorhydrate	59-43-8	200 mg
Vitamine B12	68-19-9	10 mg

Eau distillée : qsp 100 ml

#### Solution silicatée (diatomées seulement) :

Nom usuel	Formule brute	CAS	Quantité
MetaSilicate de sodium	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 5H <sub>2</sub> O	10213-79-3	4,0 g

Eau distillée : qsp 100 ml

#### Dosage :

1 ml par litre d'eau de mer de la solution principale,

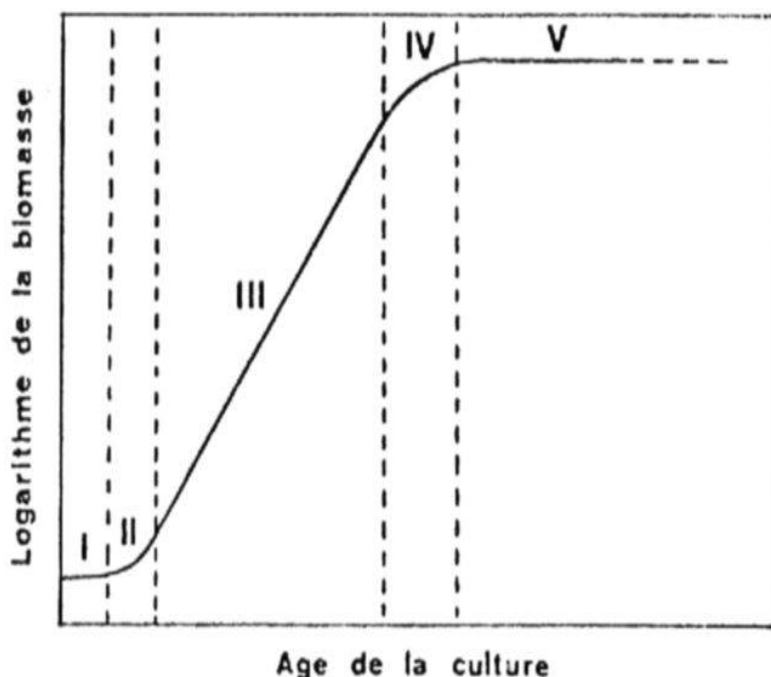
0,1 ml par litre d'eau de mer de la solution vitaminique,

2,5 ml par litre d'eau de mer de la solution silicatée pour les diatomées.

Référence : MERE A : "Production d'algues unicellulaires" (Audineau, Blancheton - Station IFREMER de Palavas 1985-1986)

## B. ANNEXE 2 : courbe de croissance bactérienne ou microalgale

La croissance d'une culture en batch est un processus dynamique comparable à une croissance bactérienne, comportant classiquement plusieurs phases caractérisées par un taux de croissance  $\mu$  (exprimé en  $j^{-1}$ ) variable



I : Une phase de latence : phase d'acclimatation des cellules au nouvel environnement, le taux de croissance est nul.

II : Une phase d'accélération : augmentation continue du taux de croissance jusqu'à atteindre son maximum ( $\mu = \mu_{\max}$ )

III : Une phase linéaire : le taux de croissance est constant.

IV : Une phase de ralentissement : le taux de croissance décroît puis devient nul.

V : Une phase stationnaire: la biomasse est constante, elle a atteint son maximum.

VI : Une phase de déclin: la densité cellulaire diminue rapidement.

FIGURE 17 : Croissance d'une culture bactérienne (ou algale) dans un milieu fermé. La biomasse est reportée sur une échelle logarithmique, le temps sur une échelle arithmétique source : microorganismes et cycles biogéochimiques, Quéguiner B.

## C. ANNEXE 3 : programmation du passeur d'échantillon

1. Draw 2.5  $\mu$ L from Borate vial (Agilent P/N 5061-3339) vial n°1
2. Draw 1.0  $\mu$ L from Sample vial n°11 à 21
3. Mix 3.5  $\mu$ L in air 2 times maxspeed
4. Wait 0.2 min draw 0  $\mu$ L from vial n°2 (eau pour rincer l'aiguille)
5. Draw 0.5  $\mu$ L from OPA vial (Agilent :P/N 5061-3335) vial n°3
6. Mix 4.0  $\mu$ L in air 6 times with maxspeed
7. Draw 0.4  $\mu$ L from FMOc vial (Agilent : P/N 5061-3337) vial n°4
8. Mix 4.4  $\mu$ L in air 6 times with maxspeed
9. Draw 0  $\mu$ L from vial n°6 acétonitrile
10. Draw 32  $\mu$ L from injection diluent vial n°5
11. Mix 20  $\mu$ L in air 8 times maxpseed
12. Inject
13. [Wait 0.1 min
14. Valve bypass (évite au flux de solvant de passer dans l'injecteur)

#### D. ANNEXE 4 : Temps de sortie des acides aminés

Tableau 2 : sortie des acides aminés et écart-type établis sur 12 points de gamme

	temps de rétention	écart type	AA
1	1.267	0.011	ASP
2	2.088	0.014	GLU
3	3.833	0.010	ASN
4	4.043	0.011	SER
5	4.598	0.012	GLN
6	4.757	0.012	HIS
7	5.045	0.013	GLY
8	5.157	0.011	THR
9	5.849	0.012	ARG
10	6.173	0.012	ALA
11	7.211	0.014	TYR
12	8.065	0.014	CY2
13	8.658	0.014	VAL
14	8.881	0.016	MET
15	9.631	0.020	TRY
16	9.854	0.017	PHE
17	9.989	0.017	ILE
18	10.530	0.018	LEU
19	10.958	0.028	LYS

## Résumé :

Les variations du milieu de vie du phytoplancton entraînent des modifications au niveau de la cellule mais aussi au niveau de la population globale. Ainsi pour mieux comprendre ces dynamiques écosystémiques il est primordial d'étudier leurs capacités de réponse et d'acclimatation aux variations de la composition minérale de leur milieu et particulièrement aux éléments majeurs que sont le carbone, l'azote et le phosphore. Ainsi l'étude des fractions azotée (NOD) et carbonée (COD) organiques dissoutes dans des cultures de T-iso en mode batch en azote (N) limitant d'une part et en phosphore (P) limitant d'autre part a été réalisée. L'identification et la quantification des acides aminés dissous sont réalisées par des analyses HPLC en fluorimétrie. La quantification du glucose dissous est réalisée par une réaction colorimétrique d'une sensibilité de 0,6  $\mu\text{M}$ . Les limitations en P et plus particulièrement en N entraînent une excrétion de glucides. En limitation par l'N la concentration en acides aminés dans la culture est constante et faible autour de 150 nM. En P limitant la microalgue excrète dès la phase de croissance de nombreux acides aminés (jusqu'à 2  $\mu\text{M}$ ). La part de l'azote des acides aminés dans le NOD est dix fois supérieure en condition de limitation par le P, validant ainsi l'hypothèse d'un relargage de NOD dans ces conditions. Cependant, dans tous les cas étudiés, les acides aminés libres et liés, de même que le glucose représentent une faible fraction du COD et/ou du NOD, n'expliquant pas les évolutions majeures de ces fractions.

## Abstract:

Variations of phytoplankton environment cause modifications on cellular metabolism but also on population evolution. To better understand the ecosystem dynamics, it is fundamental to study acclimatization capacity in response to environment and mineral composition variation, in particular regarding major nutrients such as carbon, nitrogen and phosphorus. Therefore this study aimed at evaluating dynamics for dissolved organic nitrogen (DON) and carbon (DOC) in N or P-limited batch culture of T-iso. Amino acids were identified and quantified by HPLC and D-glucose was quantified by colorimetric reaction with a 0.6  $\mu\text{M}$  sensitivity threshold. P and especially N limitation cause glucose secretion. Under limited N, amino acid concentration is low and constant between 150 nM, while under limited P, microalgae secreted amino acids with concentrations that reached 2  $\mu\text{M}$ . Nitrogen from amino acid nitrogen in the NOD fraction is twice as high under limited P as under limited N. Thus, this study validates the hypothesis that P limitation causes DON secretion. Nevertheless it was found that amino acids and glucose contribute little to DOC and/or DON fractions and do not explain major variations for the two fractions.