HAL
open science

Production de Polyhydroxybutyrates à partir d'acides gras volatils en culture ouverte : influence du degré de limitation en phosphore sur les réponses cinétiques et les sélections microbiennes.

Laetitia Cavaille

▶ **To cite this version:**

Laetitia Cavaille. Production de Polyhydroxybutyrates à partir d'acides gras volatils en culture ouverte : influence du degré de limitation en phosphore sur les réponses cinétiques et les sélections microbiennes.. Microbiologie et Parasitologie. INSA de Toulouse, 2015. Français. NNT : 2015ISAT0049 . tel-02083697

HAL Id: tel-02083697

https://theses.hal.science/tel-02083697v1

Submitted on 29 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)

Présentée et soutenue par :
Laëtitia Cavaillé

le lundi 1 juin 2015

Titre :

Production de Polyhydroxybutyrates à partir d'acides gras volatils en culture ouverte :
Influence du degré de limitation en phosphore sur les réponses cinétiques et les sélections microbiennes

---

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED MEGEP : Génie des procédés et de l'Environnement

Unité de recherche :

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (UMR 5504)

Directeur/trice(s) de Thèse :

Etienne PAUL (Professeur des Universités, INSA/LISBP, Toulouse, France)
Guillermina HERNANDEZ-RAQUET (Directrice de Recherche, INRA/LISBP, Toulouse, France)

Jury :

Rapporteurs :
Maria REIS (Associate Professor, FCT/UNL, Lisbonne, Portugal)
Manfred ZINN (Professeur, HEVS, Sion, Suisse)
Examinateurs :
Pierre FONTANILLE (Maître de Conférences, Polytech/Clermond Ferrand II, Aubière, France)
Jean-Louis URIBELARREA (Professeur des Universités, INSA/LISBP, Toulouse, France)
Maria ALBUQUERQUE (Docteur, VERI, Maisons-Laffitte, France)

Confidentialité

« © Tous droits réservés. Ce document, dans son contenu et dans sa forme, est strictement confidentiel et il est la propriété de VEOLIA RECHERCHE ET INNOVATION. Toute utilisation, reproduction, modification, communication à un tiers ou représentation intégrale ou partielle du présent document qui n'a pas été préalablement expressément autorisée par VEOLIA ENVIRONNEMENT RECHERCHE ET INNOVATION est formellement interdite. Une telle utilisation, reproduction, modification, communication ou représentation non autorisée, par quelque moyen que ce soit, constituerait une atteinte aux droits de VEOLIA RECHERCHE ET INNOVATION et une contrefaçon sanctionnée par la loi aux plans pénal et civil ».

"© All rights reserved. The content and form of this document is VEOLIA RECHERCHE ET INNOVATION's property and is strictly confidential. It is strictly prohibited to use, copy, modify, disclose or perform this document in full or in part without prior written authorisation from VEOLIA ENVIRONNEMENT RECHERCHE ET INNOVATION. Any such unauthorised use, copying, modification, disclosure or performance, in any way or manner whatsoever, shall qualify as a breach of VEOLIA RECHERCHE ET INNOVATION's rights and an infringement punishable by criminal and civil law."

Résumé

La production de biopolymères de type polyhydroxyalkanoate (PHA) est une alternative attractive pour remplacer, en partie, les plastiques produits à partir de ressources fossiles. Les contraintes techniques imposées par les cultures pures (substrat purifié, stérilité…) impliquent un coût de production qui rend la production de ces bioplastiques difficilement compétitive par rapport à celle des plastiques conventionnels. L'utilisation de cultures non axéniques permettrait de palier les contraintes des cultures pures mais nécessite une étape de sélection des microorganismes producteurs naturels de PHA.

A partir d'un inoculum issu de boues d'épuration et de substrats de types acides gras volatils (acide butyrique et acétique), une stratégie de limitation de la croissance par le phosphore pour accumuler du PHB a été mise en place. Nous avons étudié, avec les modes de culture fed-batch et chémostat, le potentiel de sélection de souches productrices et de production de PHA en fonction des paramètres opératoires (taux de dilution) et environnementaux (degré de limitation en phosphore). L'objectif scientifique a consisté à améliorer les connaissances sur le rôle d'une limitation en phosphore selon les conditions opératoires du procédé, tout d'abord sur la nature des souches sélectionnées, et ensuite sur la croissance et l'accumulation de PHB. Pour cela, une démarche associant l'identification des microorganismes en dynamique par une technique de séquençage, une caractérisation cinétique des microorganismes sélectionnés, une analyse des procédés et le développement d'une modélisation cinétique a été effectuée. L'objectif final du travail visait l'optimisation des procédés de production de PHB en culture non axénique par la productivité, les rendements, le titre final en PHB mais aussi la fiabilité et la robustesse du procédé, dans le but de définir une stratégie de production optimale de PHA.

Les performances atteintes lors des cultures en fed-batch se situent parmi les meilleures de la littérature (70% de PHB intracellulaire) en cultures mixtes sans étape d'enrichissement préalable en microorganismes producteurs. Les résultats ont montré le rôle de la limitation phosphore sur le déclenchement de la production de PHB.

En chémostat, l'analyse des paramètres macro-cinétiques, à partir des sélections microbiennes, a révélé les cinétiques de conversion du substrat carboné en PHB, biomasse catalytique et CO_2 dépendantes du degré de limitation en phosphore et du taux de croissance. Le taux de phosphore intracellulaire (dépendant du taux de croissance et du degré de limitation phosphore), a été identifié comme le paramètre majeur gouvernant la conversion du carbone. De plus, ce rôle a été observé pour toutes les populations sélectionnées sous limitation phosphore, démontrant un comportement universel de ces populations face à une limitation phosphore. En parallèle, des études dynamiques en batch à partir de ces populations ont permis de caractériser les paramètres cinétiques des souches, montrant une vitesse

Document confidentiel

maximale de production de PHB de 0,6 et 1,2 Cmol/Cmol.h avec acide acétique et butyrique respectivement.

Ces hypothèses réalisées à partir des observations expérimentales ont permis l'établissement d'un nouveau modèle cinétique basé sur le rôle du phosphore intracellulaire sur la conversion du carbone. La confrontation de ce modèle aux résultats expérimentaux a conforté et amélioré la compréhension des processus de dilution intracellulaire du phosphore et de stockage de PHB. Ce modèle a également permis d'explorer une large gamme de conditions environnementales et de prédire les comportements microbiens d'organismes producteurs et non producteurs.

A partir des résultats observés et du modèle cinétique établi, les performances de différentes configurations de procédés de production de PHA, en cultures ouvertes, ont pu être discutées : chémostat simple ou double étage, fed-batch, chémostat et batch... Les performances d'un procédé double étage en termes de productivités, taux de PHB intracellulaires, degré de sélection de producteurs et robustesse du procédé, permettent d'envisager un tel procédé à plus grande échelle.

Document confidentiel

Abstract

The production of polyhydroxyalkanoate (PHA) is an attractive alternative for plastics produced from fossil resources. The technical constraints imposed by pure cultures (purified substrate, sterilization ...) significantly increase the production costs, crippling its ability to compete with conventional plastics. The use of non-axenic cultures would avoid the constraints imposed by pure cultures but requires a selection step of PHA producers. Starting from a mixed microbial community (activated sludge) and volatile fatty acids (butyric and acetic acid), a strategy of growth limitation by phosphorus, in order to accumulate PHB, was performed.

From fed-batch and chemostat cultures, we studied the selection of PHA-producing microorganisms and the kinetics of carbon conversion, based on operating parameters (dilution rate) and environmental conditions (degree of phosphorus limitation). The scientific objective was to improve the knowledge about the role of phosphorus limitation according to the operating conditions of the process: (1) on the selected populations, and (2) on the cellular growth and PHB accumulation. The approach involved the identification of microorganisms by sequencing, the determination of kinetic rates for each selected populations, a process analysis and finally a mechanistic model was developed. The ultimate goal of the work was the optimization of a process for PHA production in non-axenic culture in regard to the productivity, the yield, the final PHB concentration but also the reliability and the robustness of the process, to define an optimal production strategy of PHA.

The performance achieved during the fed-batch cultures are among the best of the literature (70% of intracellular PHA content) in mixed cultures without enrichment step of PHA producers. The results showed the importance of phosphorus limitation on the PHB production. Thus, it has been demonstrated the importance of degree of phosphorus limitation to maintain cell growth, allowing enrichment in PHA producers, explaining the high content of PHA obtained. From microbial selections in chemostat culture, the analysis of macro-kinetic parameters revealed the conversion kinetics of the carbon substrate into PHB, catalytic biomass and CO_2, dependent on the degree of phosphorus limitation and the growth rate. The limits on the degree of plasticity of the intracellular phosphorus (ranging from 3.8% to 0.045%) were identified as a function of the specific growth rate. This intracellular phosphorus content (depending on the growth rate and degree of phosphorus limitation), is the parameter governing carbon conversion. Furthermore, the role of the intracellular phosphorus was examined for all populations selected under phosphorus limitation in this study, demonstrating a universal behavior of these populations face to phosphorus limitation. In parallel, studies carried out in batch reactors with these selected populations, were used to determine the kinetic parameters of the populations, showing a maximum PHB production rate of 0.6 and 1.2 Cmol/Cmol.h with acetic acid and butyric acid,

Document confidentiel

respectively. These hypotheses made from experimental observations allowed the establishment of a new kinetic model based on the role of intracellular phosphorus content on carbon conversion. The comparison of this model with experimental results has strengthened and improved the understanding of the mechanisms of intracellular phosphorus dilution and PHB storage. This model was also used to explore a wide range of environmental conditions and predict microbial behavior of microorganisms (producers and non-producers) according to the operating conditions, in chemostat or batch reactors. From the observed results and the established kinetic model, the performance of different configurations for the production of PHA, by non-axenic cultures, was discussed for chemostat (single or two-stage), fed-batch, chemostat and batch ... The performance and reliability of a two stage process in terms of productivities, intracellular PHB content, selection of PHA producers, demonstrate the potential of using non-axenic cultures for industrial PHA production.

Document confidentiel

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE ..... **- 1 -**

PARTIE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **- 9 -**

I. Les Poly-Hydroxy-Alkanoates : Généralités ..... **- 11 -**

I.1. Structures et propriétés chimiques ..... - 11 -

I.2. Les microorganismes producteurs de PHA ..... - 13 -

II. Les métabolismes de production de PHA à partir d'AGV ..... **- 15 -**

II.1. Assimilation des AGV ..... - 16 -

II.2. Biosynthèse de PHA ..... - 16 -

II.3. Polymérisation du PHA : les PHA synthases ..... - 17 -

III. Overflow de carbone et induction de la synthèse de PHA ..... **- 19 -**

III.1. Limitation nutritionnelle de la croissance cellulaire ..... - 19 -

III.2. Limitation anabolique de la croissance cellulaire ..... - 20 -

III.3. Régulation enzymatique du métabolisme de PHB ..... - 21 -

III.4. Modèles métaboliques et cinétiques ..... - 22 -

IV. Les procédés de production de PHA ..... **- 23 -**

IV.1. Les procédés existants à l'échelle industrielle ..... - 23 -

IV.2. Les cultures mixtes : Sélection de microorganismes producteurs ..... - 25 -

V. Croissance bactérienne et limitation phosphore ..... **- 28 -**

V.1. Besoins élémentaires pour la croissance bactérienne ..... - 28 -

V.2. Le phosphore intracellulaire ..... - 29 -

V.2.a Les molécules phosphorées ..... - 30 -

V.2.b Répartition du phosphore intracellulaire : importance des pools d'ARN ..... - 31 -

V.3. Limitation phosphore et réponses intracellulaires ..... - 33 -

V.3.a Concentration en phosphore extracellulaire et régulon pho ..... - 33 -

V.3.b Les pools des molécules phosphorées en limitation phosphore ..... - 35 -

V.4. Les modèles définissant le phosphore intracellulaire ..... - 36 -

VI. Synthèse bibliographique, enjeux et démarche ..... **- 38 -**

Document confidentiel

PARTIE II. MATERIELS ET METHODES - 43 -

I. Conditions expérimentales ..... - 45 -

I.1. Les consortia microbiens ..... - 45 -

I.2. Les milieux de culture ..... - 46 -

I.3. Les réacteurs ..... - 47 -

I.4. Stratégie de production de PHA ..... - 49 -

II. Techniques analytiques ..... - 50 -

II.1. Mesure des substrats ..... - 50 -

II.1.a Dosage des Acides Gras Volatils ..... - 50 -

II.1.b Dosage des orthophosphates ..... - 51 -

II.1.c Dosage de l'azote ammoniacal ..... - 51 -

II.2. Mesure de la DCO ..... - 51 -

II.3. Mesure de l' azote total ..... - 52 -

II.4. Extraction et dosage du PHB ..... - 52 -

II.5. Visualisation des cellules ..... - 53 -

II.6. Approche moléculaire ..... - 53 -

II.6.a Extraction et purification des acides nucléiques ..... - 53 -

II.6.b Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) ..... - 54 -

II.6.c Amplification par PCR ..... - 54 -

II.6.d Analyse des données de séquençage ..... - 55 -

III. Calculs opératoires ..... - 55 -

III.1. Facteurs de conversion ..... - 55 -

III.2. Détermination de la biomasse totale (PHB + X_C) ..... - 56 -

III.3. Etablissement des bilans et calcul des vitesses de réaction ..... - 56 -

III.3.a Réacteurs batch ..... - 57 -

III.3.b Réacteurs fed-batch ..... - 57 -

III.3.c Réacteur chémostat ..... - 57 -

III.3.d Vérification des bilans ..... - 58 -

III.3.e Calcul des rendements ..... - 59 -

III.4. Détermination des degrés de limitation en phosphore et du phosphore intracellulaire ..... - 59 -

Document confidentiel

PARTIE III. RESULTATS ET DISCUSSION - 61 -

CHAPITRE 1. ANALYSE MACROSCOPIQUE DE L'ENSEMBLE DES CULTURES REALISEES EN BIOREACTEURS - 63 -

I. Introduction ... - 65 -

II. Cultures Fed-batch ... - 66 -

II.1. Mode de conduite des cultures fed-batch ... - 66 -

II.2. Analyse macro-cinétique des cultures fed-batch ... - 66 -

II.2.a Cas des cultures FB1 et FB2 ... - 66 -

II.2.b Cas des cultures FB3 et FB4 ... - 69 -

III. Cultures Chemostat ... - 71 -

III.1. Démarche expérimentale menée en réacteur chémostat ... - 71 -

III.1.a Mise en place de la sélection microbienne ... - 74 -

III.1.b Exemple de réponses microbiennes types à l'augmentation du degré de limitation phosphore ... - 74 -

III.2. Analyse macro-cinétique de l'ensemble des cultures chémostat ... - 77 -

III.2.a Les régimes dynamiques ... - 77 -

III.2.b Les régimes stabilisés ... - 79 -

IV. Cultures Batch ... - 82 -

IV.1. Démarche expérimentale menée au cours des réacteurs batch ... - 82 -

IV.2. Analyse macro-cinétique des cultures batch ... - 84 -

V. Conclusion ... - 85 -

CHAPITRE 2. ETUDE DES PARAMETRES GOUVERNANT LA CONVERSION DU CARBONE SOUS LIMITATION CARBONE ET/OU PHOSPHORE - 87 -

I. Introduction ... - 89 -

II. Les zones de limitation nutritionnelles ... - 89 -

II.1. Mise en évidence et définition des zones de limitation selon le taux de dilution ... - 89 -

II.1.a Exemple de résultats pour D = 0,21h^{-1} et 0,045 h^{-1} ... - 89 -

II.1.b Illustration pour tous les taux de dilution ... - 91 -

II.2. Caractéristiques de la zone de double limitation ... - 92 -

III. Analyse stœchiométrique sous double limitation carbone et phosphore ... - 93 -

III.1. Evolution des rendements observés dans les zones de limitation nutritionnelle ... - 93 -

III.2. Devenir du carbone dans la zone de double limitation C&P ... - 94 -

III.2.a Répartition du carbone entre croissance et production de PHB ... - 94 -

Document confidentiel

III.2.b Notions de maintenance cellulaire ..... *- 96 -*

III.3. Etude de la dilution intracellulaire du phosphore en conditions de limitation de la croissance ..... - 98 -

IV. Analyse cinétique selon la limitation nutritionnelle ..... - 99 -

IV.1. Besoin en phosphore selon le taux de croissance ..... - 99 -

IV.2. Capacité de production de PHB selon le taux de phosphore intracellulaire ..... - 101 -

V. Etablissement d'un modèle cinétique ..... - 102 -

V.1. Construction du modèle cinétique : ..... - 103 -

V.2. Définition des processus et écriture des vitesses cinétiques ..... - 104 -

V.2.a Processus d'assimilation du phosphore extracellulaire ..... *- 104 -*

V.2.b Dépendance de la croissance catalytique vis-à-vis du P_{in} ..... *- 104 -*

V.2.c Processus de production de PHB ..... *- 105 -*

V.2.d Processus de maintenance cellulaire ..... *- 106 -*

V.3. Etude de la capacité prédictive du modèle cinétique ..... - 107 -

V.3.a Représentation des régimes stabilisés des cultures en continu ..... *- 107 -*

V.3.b Représentation des régimes dynamiques ..... *- 109 -*

V.3.c Evaluation de la capacité prédictive du modèle ..... *- 110 -*

V.4. Etude de sensibilité sur les paramètres du modèle ..... - 110 -

VI. Conclusion ..... - 111 -

CHAPITRE 3. ETUDE DES PARAMETRES GOUVERNANT LE DEVENIR DU CARBONE EN CULTURE CONTINUE - 113 -

I. Introduction ..... - 115 -

II. Détermination des paramètres cinétiques et stœchiométriques selon la sélection microbienne ..... - 115 -

II.1. Démarche adoptée ..... - 115 -

II.2. Détermination des paramètres des populations ..... - 117 -

II.2.a Sur acide acétique ..... *- 117 -*

II.2.b Sur acide butyrique ..... *- 120 -*

II.3. Discussion sur le modèle cinétique ..... - 121 -

III. Etude de la conversion du carbone selon les paramètres cinétiques (μ_{max}, q_{PHBmax}) et opératoires : *Identification des paramètres cinétiques impliqués* ..... - 122 -

III.1. Influence du μ_{max} et q_{PHBmax} sur l'extension de la zone de DLN ..... - 123 -

III.2. Etude du devenir du carbone selon les zones de DLN ..... - 124 -

III.2.a Analyse des rendements carbone et phosphore ..... *- 124 -*

III.2.b Analyse des limites intracellulaires aux frontières de la zone de DLN ..... *- 125 -*

Document confidentiel

III.3. Etude de la conversion du carbone selon les conditions opératoires : mise en évidence des paramètres gouvernant la production de PHB ..... - 126 -

III.3.a Etude en réacteur chémostat : influence du taux de dilution ..... - 126 -

III.3.b Le P_{in}, un paramètre déterminant, gouvernant le devenir du carbone ..... - 127 -

III.3.c Conclusions sur les paramètres gouvernant la redirection du carbone ..... - 129 -

III.4. Effet de la source de carbone : la présence de butyrate ..... - 129 -

III.4.a Influence des rendements Y sur l'extension de la zone de DLN ..... - 130 -

III.4.b Evolution des rendements observés dans la zone DLN ..... - 130 -

III.4.c Influence du paramètre P_{in} selon les sources de carbone sur les cinétiques de production de PHB . - 131 -

IV. Conclusion ..... - 133 -

CHAPITRE 4. ETUDE DE LA DYNAMIQUE MICROBIENNE ET DETERMINATION DES PARAMETRES INFLUANT LA SELECTION DE PRODUCTEURS DE PHA - 135 -

I. Introduction ..... - 137 -

II. Présentation des résultats ..... - 138 -

II.1. Effet du taux de dilution et de la nature de la source de carbone sur les dynamiques de sélections microbiennes ..... - 138 -

II.2. Effet du degré de la limitation en phosphore sur les dynamiques de sélections microbiennes ..... - 140 -

III. Discussion : Effet des conditions opératoires sur la sélection microbienne finale ..... - 142 -

III.1. La source de carbone ..... - 142 -

III.2. Le taux de dilution ..... - 143 -

III.3. Le niveau de limitation phosphore ..... - 144 -

III.4. Qualification de la sélection microbienne ..... - 145 -

III.5. Trajectoire à adopter pour sélectionner des microorganismes producteurs ..... - 146 -

IV. Conclusion ..... - 147 -

CHAPITRE 5. EVALUATION DU POTENTIEL DE PRODUCTION DE PHA AU SEIN D'UNE FILIERE INDUSTRIELLE - 149 -

I. Introduction ..... - 151 -

II. Résumé des performances des procédés de production de PHA ..... - 151 -

II.1. Les réacteurs discontinus ..... - 151 -

II.2. Les réacteurs continus ..... - 153 -

II.2.a Simple étage ..... - 153 -

II.2.b Double étage ..... - 154 -

Document confidentiel

III. Discussion : Argumentation d'un choix de procédé de fermentation .....- 155 -

III.1. Une teneur intracellulaire élevée .....- 157 -

III.2. Une productivité volumique maximale .....- 157 -

III.3. Des rendements carbones optimaux.....- 161 -

III.4. Une qualité du produit visée .....- 162 -

III.5. La conduite du procédé et ses limites .....- 163 -

IV. Conclusion .....- 166 -

CONCLUSION GENERALE..... - 169 -

I. Rappel du cadre de l'étude et description de l'approche scientifique .....- 171 -

II. Principaux résultats .....- 172 -

III. Perspectives.....- 175 -

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... - 177 -

ANNEXES ..... - 189 -

Document confidentiel

Liste des figures

Figure 1 : Production de plastiques dans le monde ces dernière années (PlasticsEurope, 2015) _____ - 3 -

Figure 2 : Quantité totale des déchets plastiques générés et recyclés entre 2006 et 2011 en Europe (PlasticsEurope, 2015) (PlasticsEurope et al., 2012) _____ - 4 -

Figure 3 : Schéma d'une coupe de granule de PHA (Rehm, 2010) _____ - 11 -

Figure 4 : Structure générale des PHA, avec R une chaine latérale déterminant le type de PHA (par exemple : pour x = 1 et R = CH_3, PHA = Poly-Hydroxy-Butyrique (PHB) _____ - 12 -

Figure 5 : Biosynthèse de PHB et PHV à partir de l'acétyl-CoA, du butyryl-CoA et du propionyl-CoA (Grousseau, 2012) _____ - 17 -

Figure 6 : Réaction catalysée par la PHA synthase _____ - 17 -

Figure 7 : Régulation enzymatique du métabolisme de production de PHA chez C. necator (Grousseau, 2012) __ - 21 -

Figure 8 : Compartimentation cellulaire proposée par (Franklin et al., 2011). a. Compartimentation et flux. b. Effet de la compartimentation de la biomasse sur les processus cellulaires en croissance limitée. Les flèches indiquent les effets positifs, négatifs ou variables. La composition de la biomasse (u, g et z) a de directs effets sur la croissance et le transport et un effet indirect, à travers la concentration de l'élément dans la biomasse, qui affecte la consommation métabolique du nutriment par unité de biomasse produite _____ - 29 -

Figure 9 : Répartition des molécules phosphorées en 3 fractions (adaptée selon Fush (1969)) _____ - 31 -

Figure 10 : Régulation de l'expression de l'opéron pho chez E. coli (Vershinina et Znamenskaya, 2002) _____ - 33 -

Figure 11 : Répartition des molécules phosphorées en 3 fractions et diminution du contenu phosphoré de chacune en fonction de la limitation phosphore selon Fush (1969) _____ - 35 -

Figure 12 : Représentation des relations entre le taux spécifique de croissance et le Pin selon les modèles cinétiques. Paramètres choisis : μ_{max} = 0,5 h^{-1}, P_{in_exp} = 3,8%, P_{in_crit} = 0,4%, KQ = 1 _____ - 37 -

Figure 13 : Récapitulatif de la démarche expérimentale, des conduites des cultures et de l'organisation des chapitres _____ - 41 -

Figure 14 : Schéma des réacteurs fed-batch et batch (A) et chemostat (B) _____ - 48 -

Figure 15 : Stratégie de degré de limitation en phosphore imposée au cours des expérimentations chémostat _ - 50 -

Figure 16 : Evolution du degré de la limitation en P appliqué et consommé, de la quantité cumulée de biomasse catalytique produite et du taux intracellulaire de PHB au cours du temps pour les cultures inoculées avec la boue activée de la station d'épuration M prélevée à 2 périodes différentes : FB1 (A) et FB2 (B) _____ - 67 -

Figure 17 : Evolution de la limitation P, de la quantité cumulée de biomasse catalytique produite et du taux intracellulaire de PHB au cours du temps des cultures inoculées avec la boue activée de la station d'épuration T et C : FB3 (A) et FB4 (B), respectivement _____ - 69 -

Figure 18 : Récapitulatif des conditions expérimentales imposées au cours des cultures en chémostat : Source de carbone, taux de dilution et type de limitation nutritionnelle ; Les expériences soulignées ont été inoculées avec une boue activée de la station d'épuration T alors que les autres ont été menées avec la boue activée de la station d'épuration B _____ - 73 -

Figure 19 : Evolution des degrés de limitation appliqués ($(C/P)_{app}$) et consommés ($(C/P)_{cons}$), de la concentration en biomasse catalytique (X_C) et du taux de PHB intracellulaire (PHB_{in}) (Figure 19A), ainsi que des composés solubles dans le surnageant ($P\text{-}PO_4^{3-}$ et AA) (Figure 19B) en fonction du nombre de temps de séjour hydraulique (TSH) pour un taux de dilution de 0,045 h^{-1} (expérience A6) _____ - 75 -

Document confidentiel

Figure 20 : Principales observations des dynamiques de populations bactériennes au cours des expériences en chémostat _____ - 78 -

Figure 21 : Récapitulatif des expérimentations réalisées en batch à partir des cultures en chémostat selon le nombre de temps de séjour de la culture chémostat. _____ - 83 -

Figure 22 : Evolution des vitesses spécifiques (A) et du taux de phosphore intracellulaire (P_{in}) et du taux de PHB intracellulaire (PHB_{in}) (B) au cours du batch A2a _____ - 84 -

Figure 23 : Evolution des vitesses spécifiques (A) et du taux de phosphore intracellulaire (P_{in}), du taux de PHB intracellulaire (PHB_{in}) et de la proportion de consommation du substrat AA par rapport à la totalité des substrats (B) au cours du batch A7a _____ - 84 -

Figure 24 : Concentrations résiduelles en phosphore et en carbone (AA) selon le degré de limitation appliqué pour les taux de dilution de 0,21 h^{-1} (A) et 0,045 h^{-1} (B) _____ - 90 -

Figure 25 : Forme de la zone de double limitation carbone et phosphore obtenue à partir des données issus des régimes stables en chémostat ; les données représentées par les cercles noirs sont obtenues à partir des cultures A1 à A8 ; les données représentées par les cercles blancs sont tirées de la Thèse de Frank (1999) les données représentées par les cercles gris sont tirées des travaux de Hao et chang (1987) _____ - 91 -

Figure 26 : Rendements observés de X_C et du PHB par rapport au substrat ($R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$, respectivement) et de la X_C par rapport au phosphore ($R_{Xc/P}$) en fonction du degré de limitation phosphore appliqué ($(C/P)_{app}$) pour une culture continue conduite à D = 0,045 h^{-1} ; la zone de double limitation carbone et phosphore est représentée en gris ; les lignes pointillées simulent les évolutions des rendements observés théoriques dans les zones de limitation carbone ou phosphore _____ - 93 -

Figure 27 : Evolution des rendements observés en biomasse catalytique et PHB par rapport au substrat carboné selon le degré de limitation en phosphore pour D = 0,21 h^{-1} (A) et D = 0,045 h^{-1} (B) _____ - 94 -

Figure 28 : Evolution des rendements observés de biomasse catalytique et du PHB par rapport au substrat ($R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$, respectivement) en fonction du degré de limitation phosphore consommé ($(C/P)_{cons}$) pour tous les taux de dilution testés ; les traits en pointillés représentent les limites de la zone DLN selon le D _____ - 95 -

Figure 29 : Evolution du coefficient de maintenance selon le $(C/P)_{app}$ (A) et le $R_{Xc/P}$ (B) pour tous les régimes obtenus lorsque D = 0,045 h-1 _____ - 97 -

Figure 30 : Evolution du rendement observé de la biomasse catalytique par rapport au phosphore ($R_{Xc/P}$) selon le ratio C/P consommé pour l'ensemble des taux de dilution appliqués ; les traits en pointillés représentent la frontière entre la zone de double limitation et de limitation phosphore pour chaque D indiqué _____ - 98 -

Figure 31 : Représentation des taux de phosphore intracellulaires minima et maxima, observés respectivement en conditions de limitation phosphore et en condition de limitation en carbone, en fonction des taux de dilution appliqués ; les traits en pointillés ainsi que la zone grise montrent une estimation de la zone de DLN. __ - 99 -

Figure 32 : Evolution de la vitesse spécifique de production de PHB en fonction du taux de phosphore intracellulaire en réacteur batch avec les populations microbiennes sélectionnées en chémostat sous AA et AA+AB : symboles ronds = Zoogloea spp. (sélectionnée à D = 0,12 h^{-1} et 0,045h^{-1}) et symboles triangles = Malikia spp. (sélectionnée à D = 0,31 h^{-1} et 0,21 h^{-1}) ; les lignes pointillées simulent les évolutions des q_{PHBmax} observés selon le P_{in} et la source de carbone _____ - 101 -

Figure 33 : Représentation des 4 processus établis pour le modèle cinétique _____ - 103 -

Figure 34 : Relation entre le q_{PHB} et le P_{in} établie par la fonction d'Haldane avec S = AA et S = AA+AB à partir des résultats présentés sur la Figure 32. Symboles ronds = Zoogloea spp. (sélectionnée à D = 0,12 h^{-1} et 0,045h^{-1}) et symboles triangles = Malikia spp. (sélectionnée à D = 0,31 h^{-1} et 0,21 h^{-1}) _____ - 105 -

Figure 35 : Evolution des rendements observés $R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$ et du degré de limitation phosphore appliqué (A) et des P_{in}, P_{in_max} et PHB_{in} (B) au cours du temps pour une expérience théorique : comparaison courbes simulées par

Document confidentiel

le modèle après calage et points expérimentaux. Les taux de dilution appliqués (de 0,31 h^{-1} à 0,023 h^{-1}) sont indiqués au-dessus des graphiques. _____ - 108 -

Figure 36 : Evolution des concentrations X_C et PHB au cours du batch A2b (A) et A5a (B) ; Evolution des teneurs intracellulaires P_{in} et PHB_{in} au cours du batch A2b (C) et A5a (D). Symboles = expérimentation ; Trait continu = simulation. _____ - 109 -

Figure 37 : Etude de l'influence des paramètres du modèle sur les variables d'état X_C, PHB, S_C et S_P sur l'ensemble des conditions opératoires des cultures en chémostat (A) et en batch (B)_____ - 111 -

Figure 38 : Résultats expérimentaux et simulés de l'évolution des concentrations en X_C et PHB et de PHB_{in} pour les cultures en batch : Pour la catégorie « Acinetobacter » (A2a (A), A2b (B) et A1a (C)) ; Pour la catégorie « Zoogloea » (A3d (A), A4a (B), b (C) et c (D)) ; Pour la catégorie «Autres souches sélectionnées» ((A8a (A), A5a (B), b (C) et c (D)). Durant le batch A2a, une condition de non limitation P est imposée pendant la 1ère phase de la culture. Le Batch A8a a été mené sans limitation P. Symboles = expérimentation ; Trait continu = simulation. _____ - 118 -

Figure 39 : Evolution des rendements observés (A et C) et des taux de phosphore et PHB intracellulaires (B et D) en fonction du degré de limitation appliqué en chémostat pour chaque catégorie de populations. La zone grise représente la zone de double limitation C&P observée expérimentalement; les traits en pointillé représentent les limites de la zone de double limitation C&P simulée. Symboles = expérimentation ; Trait continu = simulation. _____ - 119 -

Figure 40 : Frontières simulées entre les zones de limitation nutritionnelle avec AA selon les paramètres cinétiques et stœchiométriques des souches 1p, 1np, 2p et 2fp _____ - 123 -

Figure 41 : Evolution des rendements observés $R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$ pour la souche 1p (A) et 1np (B) selon le degré de limitation phosphore consommé pour 5 D appliqués _____ - 124 -

Figure 42 : Evolution du rendement phosphore ($R_{Xc/P}$) selon le degré de limitation phosphore consommé pour la population 1p (A) et 1np (B) selon le degré de limitation phosphore consommé pour 5 D appliqués ___ - 125 -

Figure 43 : Evolution des P_{in_min} et P_{in_max} (A) et PHB_{in_max} (B) selon le taux spécifique de croissance d'après les résultats simulés en chémostat avec les paramètres cinétiques et stœchiométriques des souches 1p, 2p et 2fp _____ - 126 -

Figure 44 : Evolution des gammes de q_{PHB} et des P_{in_min} selon les taux de croissance appliqués avec les paramètres cinétiques μ_{max} et q_{PHBmax} des souches 1p (A) et 2p (B) d'après les résultats simulés _____ - 127 -

Figure 45 : Evolution des q_{PHBmax} observés selon le P_{in_min} d'après les résultats simulés en réacteur chémostat (régimes permanents) ; Evolution des q_{PHBmax} observés selon le P_{in} d'après les résultats simulés en réacteur chémostat (régimes permanents) des souches 1p (A) et 2p (B) d'après les résultats simulés _____ - 127 -

Figure 46 : Evolution du q_{PHBmax} observé en fonction du P_{in_min} d'après les résultats simulés en chémostat avec les souches 1p, 2p et 2fp et du q_{PHBmax} observé en fonction du P_{in} d'après les résultats simulés en batch (régime dynamique) avec les souches 1p et 2p (A) ; Evolution du PHB_{in_max} en fonction du P_{in_min} d'après les résultats simulés en chémostat avec les souches 1p, 2p et 2fp (B) _____ - 128 -

Figure 47 : Zones de double limitation nutritionnelles pour chaque taux de dilution lorsque l'AA ou le mélange AA+AB est utilisé comme source de carbone _____ - 130 -

Figure 48 : Evolution des rendements observés en fonction du $(C/P)_{cons}$: comparaison des résultats simulés obtenus avec les paramètres cinétiques de la souche 1p avec des rendements théoriques limites d'AA (en noir) et du mélange AA+AB (en gris) _____ - 131 -

Figure 49 : Evolution du q_{PHBmax} observé selon le P_{in_min} obtenu en réacteur chémostat lorsque l'AA et un mélange AA+AB est utilisé comme source de carbone, d'après les résultats simulés _____ - 132 -

Figure 50 : Paramètres déterminants et impliqués dans la conversion du carbone et la distribution entre X_C et PHB

Document confidentiel

sous limitation phosphore _____ - 134 -

Figure 51 : Evolution de la dynamique des populations selon le nombre de temps de séjour au cours des expériences A1 et A3 (A) sur AA et B1 et B2 (B) sur AA+AB pour les taux de dilution appliqués de 0,31 h^{-1} et 0,21 h^{-1}. La catégorie « autres » regroupe toutes les populations minoritaires (OTUs < 5%). _____ - 139 -

Figure 52 : Evolution de la dynamique des populations selon le nombre de temps de séjour au cours des expériences A4 (A) acide acétique et B3 (B) acide acétique/butyrique pour les taux de dilution appliqués de 0,12 h^{-1} et 0,045 h^{-1}. La catégorie « autres » regroupe toutes les populations minoritaires (OTUs < 5%). _____ - 140 -

Figure 53 : Evolution de la dynamique des populations selon le nombre de temps de séjour au cours de l'expérience A9 (A), menée sous limitation phosphore uniquement et A8 (B), menée sous une dynamique en terme de degré de limitation phosphore appliqué. La catégorie « autres » regroupe toutes les populations minoritaires (OTUs < 5%). _____ - 141 -

Figure 54 : Evolution du q_{PHBmax} observé, du rendement en carbone total (R_{tot}) observé ($R_{Xc/S}$ + $R_{PHB/S}$) et du PHB_{in_max} selon le taux de dilution pour un réacteur chémostat simple étage _____ - 153 -

Figure 55 : Evolution du q_{PHB} et du PHB_{in} obtenus en chémostat en réacteur chémostat double étage selon le P_{in} du 1er étage et le temps de séjour du 2ème étage _____ - 154 -

Figure 56 : Procédés de production de PHA envisagés et les questions associées à chaque étape _____ - 156 -

Figure 57 : Concentration en biomasse catalytique et productivités volumiques de PHB pouvant être atteintes selon le k_La du réacteur et à la configuration du procédé _____ - 158 -

Figure 58 : Evolution de la puissance volumique dissipée et le coût exprimé en €/j/m^3 selon le K_La du réacteur d'après Garcia-Ochoa et Gomez (2009) et extrapolation du coût en €/h selon le coefficient de transfert de l'oxygène (K_La) d'un procédé (0,08 €/kWh) _____ - 159 -

Figure 59 : Relation entre la concentration en entrée de l'effluent fermenté et le k_La du réacteur _____ - 160 -

Figure 60 : Comparaison du devenir du carbone pour la production de PHB selon quatre configurations de procédés : un procédé type « feast & famine » (Johnson et al., 2009) (A), et les procédés envisagés dans cette étude, continu simple étage (B), continu double étage avec un TSH du 2ème étage de 3 h (C) et de 10 h (D) ___ - 161 -

Figure 61 : Evolution des taux de croissance et des vitesses spécifiques de PHB au cours de la culture FB3 _____ I

Figure 62 : Evolution des taux de croissance et des vitesses spécifiques de PHB au cours de la culture FB4 _____ II

Figure 63 : Estimation du taux de producteurs selon le temps de cultures pour les expérimentations FB1, FB2, FB3 et FB4 _____ III

Figure 64 : Evolution des populations actives au cours du temps des cultures FB3 (A) et FB4 (B). La catégorie « autres » regroupe toutes les populations minoritaires (OTUs < 4% des OTUs totaux). _____ V

Figure 65 : Photographies d'observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif (x100) après coloration spécifique de Neisser après 5 temps de séjour pour l'expérimentation A2 _____ VII

Figure 66 : Photographies d'observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif (x100) après coloration spécifique au noir de Soudant pour les expérimentations FB3 (45 h) et FB4 (30 h) _____ VII

Figure 67 : Photographies d'observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif (x100) après coloration spécifique au noir de Soudan des sélections microbiennes finales pour les cultures menées sous AA _____ VIII

Figure 68 : Photographies d'observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif (x100) après coloration spécifique au noir de Soudan des sélections microbiennes finales pour les expérimentations menées sous co-substrats AA+ AB _____ IX

Figure 69 : Evolution des résultats expérimentaux (points) et simulés (traits) de X_C (A), P_{in} (B) et μ (C) en fonction du temps pour le batch A2a avec le modèle linéaire et non linéaire _____ X

Document confidentiel

Figure 70 : Evolution des résultats expérimentaux et simulés de la concentration en X_C et PHB et de PHB_{in} au en batch : Avec la catégorie « Malikia » (B1b (A), B2a (B), B2b (C) et B2c (D)) ; Avec la catégorie « Zoogloea » (B3a (A), B3b (B), B3c (C) et B4b (D)). Symboles = expérimentation ; Trait continu = simulation. _____ XII

Figure 71 : Evolution des rendements observés (A et C) et des taux de phosphore et PHB intracellulaires (B et D) en fonction du degré de limitation appliqué pour chaque catégorie de populations. La zone grise représente la zone observée expérimentalement de double limitation C&P ; les traits en pointillé représentent les limites de la zone de double limitation C&P simulée avec le modèle. Symboles = expérimentation ; Trait continu = simulation. _____ XIII

Figure 72 : Résultats des régimes stables obtenus sur le mélange AA + AB sous limitation C&P et sous limitation P uniquement. A titre de comparaison, les traits en gris représentent les frontières de la zone de DLN déterminée à partir des résultats expérimentaux sur AA _____ XIV

Figure 73 : Rendements observés en biomasse catalytique et PHB en fonction du degré de limitation phosphore imposé selon le carbone lorsque S = AA + AB _____ XV

Figure 74 : Rendements observés en biomasse catalytique et PHB en fonction du degré de limitation phosphore imposé selon le carbone lorsque S = AA + AB _____ XV

Figure 75 : Evolution des rendements $R_{Xc/P}$ selon le degré de limitation phosphore imposé pour les régimes permanents obtenus avec AA et avec AA+AB _____ XVI

Figure 76 : Diversité initiale de la boue activée (OTUs regroupés en famille). Le groupe nommé « Autres » représente les populations minoritaires dans la communauté microbienne totale (OTUs < 2%) _____ XVII

Figure 77 : Evolution de la dynamique des populations selon le nombre de temps de séjour au cours de l'expérience A2 : conditions initiales de sélection sous limitation carbone uniquement et à un D = 0,21 h^{-1}. . La catégorie « autres » regroupe toutes les populations minoritaires._____ XVIII

Figure 78 : Evolution de la dynamique des populations selon le nombre de temps de séjour au cours des expériences A3 (A) et B2 (B). Un changement de dilution de 0,16 à 0,12 h^{-1} a été effectué au 118ème temps de séjour. La catégorie « autres » regroupe toutes les populations minoritaires. _____ XIX

Document confidentiel

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés mécaniques et thermiques de quelques PHA et plastiques dérivés du pétrole (Khanna et Srivastava, 2005) _____ *- 13 -*

Tableau 2 : Liste des genre bactériens producteurs de PHA (Koller et al., 2010) _____ *- 14 -*

Tableau 3 : Espèces bactériennes répertoriées en fonction des classes de PHA synthases (Rehm, 2003) _____ *- 18 -*

Tableau 4 : Expressions des vitesses métaboliques et cinétiques couramment utilisées dans les modèles de production de PHA _____ *- 22 -*

Tableau 5 : Souches bactériennes communément utilisées pour la production de PHA à l'échelle pilote et industrielle (Chen, 2009) _____ *- 24 -*

Tableau 6 : Conditions opératoires, sélections microbiennes et performances atteintes en cultures ouvertes ___ *- 27 -*

Tableau 7 : Eléments majeurs constituants une cellule bactérienne et leurs fonctions associées _____ *- 28 -*

Tableau 8 : Taux de phosphore généraux de quelques microorganismes (calculés à partir des données) _____ *- 30 -*

Tableau 9 : Fractions de phosphore dans les molécules phosphorées d'une cellule bactérienne (Raven, 2013) __ *- 30 -*

Tableau 10 : Principales molécules cellulaires et leur teneur en phosphore _____ *- 32 -*

Tableau 11 : Expression des vitesses spécifiques de croissance dans les modèles linéaires et non linéaires, pour un substrat conservé _____ *- 36 -*

Tableau 12 : Consortia microbiens utilisés pour les expérimentations fed-batch et chémostat _____ *- 45 -*

Tableau 13 : Solutions concentrées de carbone et de phosphore pour les cultures fed-batch _____ *- 46 -*

Tableau 14 : Solutions concentrées de sels et d'oligo-éléments pour les cultures fed-batch _____ *- 46 -*

Tableau 15 : Composition des milieux d'alimentation des chémostats _____ *- 47 -*

Tableau 16 : Récapitulatif des conditions expérimentales imposées pour les cultures fed-batch _____ *- 49 -*

Tableau 17 : Facteurs de conversion appliqués _____ *- 56 -*

Tableau 18 : Equations pour le calcul des vitesses pour le réacteur fed-batch _____ *- 57 -*

Tableau 19 : Equations pour le calcul des vitesses pour le réacteur chémostat en régime dynamique _____ *- 58 -*

Tableau 20 : Equations pour le calcul des vitesses pour le réacteur chémostat en régime permanent _____ *- 58 -*

Tableau 21 : Valeur des rendements théoriques limites (Y) et expression des rendements observés (R) _____ *- 59 -*

Tableau 22 : Expressions de la limitation phosphore appliquée et consommée _____ *- 59 -*

Tableau 23 : Récapitulatif de la conduite des cultures fed-batch FB1, FB2, FB3 et FB4 en termes d'inoculum et de degré de limitation phosphore appliqué _____ *- 66 -*

Tableau 24 : Paramètres cinétiques et stœchiométriques déterminés à partir des régimes stables selon le taux de dilution et le degré de limitation en phosphore appliqués avec AA comme source de carbone _____ *- 79 -*

Tableau 25 : Paramètres cinétiques et stœchiométriques déterminés à partir des régimes stables selon le taux de dilution et le degré de limitation en phosphore appliqués avec un mélange AA et AB comme source de carbone _____ *- 81 -*

Tableau 26 : Représentation de la matrice stœchiométrique du modèle cinétique _____ *- 103 -*

Tableau 27 : Récapitulatif des paramètres et de leurs valeurs (déterminées ou non) pour le modèle cinétique _ *- 107 -*

Tableau 28 : Récapitulatif des paramètres cinétiques et stœchiométriques des différentes catégories de populations

Document confidentiel

microbiennes avec AA comme source de carbone _____ *- 117 -*

Tableau 29 : Récapitulatif des paramètres cinétiques et stœchiométriques des différentes catégories de populations microbiennes avec un mélange AA et AB comme source de carbone _____ *- 121 -*

Tableau 30 : Valeurs des couples (μ_{max} ; q_{PHBmax}) choisies _____ *- 123 -*

Tableau 31 : Performances (q_{PHB} moyen, $R_{PHB/S}$ et PHB_{in}) calculées à partir des expérimentations fed-batch ___ *- 152 -*

Tableau 32 : Récapitulatif des conditions opératoires et des paramètres cinétiques calculés en chémostat simple et double étage _____ *- 155 -*

Tableau 33 : Récapitulatif des configurations de procédés de production de PHA envisagées, leurs conduites, les avantages et les inconvénients _____ *- 165 -*

Tableau 34 : Choix des temps de cultures pour l'estimation du taux de producteurs présent _____ *III*

Tableau 35 : Paramètres pris en compte pour la comparaison du modèle linéaire et non linéaire _____ *X*

Document confidentiel

Nomenclature et abréviations

Liste des symboles et abréviations

AA	Acide Acétique	
AB	Acide Butyrique	
ADF	Aerobic Dynamic Feeding, aussi désigné “feast and famine”	
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	
AGV	Acides Gras Volatils	
AN/AE	Anaérobie/Aérobie	
ATP	Adénosine Tri-Phosphate	
ARN	Acide RiboNucléique	
C	Carbone	
CO_2	Dioxyde de Carbone	
$(C/P)_{app}$	Ratio entre le substrat carboné et le phosphore appliqué	Cmol/Pmol
$(C/P)_{cons}$	Ratio entre le substrat carboné et le phosphore consommé	Cmol/Pmol
CPG	Chromatographie en Phase Gaz	
D	Taux de dilution	h^{-1}
DCO	Demande Chimique en Oxygène	mgO_2/L
DLN	Double Limitation Nutritionnelle	
EPS	ExoPolySaccharides	
GAO	Glycogen Accumulating Organisms	
k_La	Coefficient volumique de transfert	h^{-1}
K_i	Constante de demi-saturation du composé i	Cmmol/L
KI	Constante d’inhibition	Cmmol/L
m	Coefficient de maintenance cellulaire	h^{-1}
MES	Matière En Suspension	g/L
MS	Masse Sèche	g/L
MVS	Matière Volatile en Suspension	g/L
n	Constante pour les phénomènes d’encombrement stérique	
N	Azote	
NT	Azote Total	gN/L
N_P	Azote particulaire	gN/L
NH_4^+	Azote Ammoniacal	gN/L
O_2	Dioxygène	
P	Phosphore	

Document confidentiel

PAO	Polyphosphate Accumulating Organisms	
pb	Paire de bases	
PCR	Polymerase Chain Reaction	
PHA	PolyHydroxyAlcanoate	
PHB	PolyHydroxyButyrate	
PHB_{in}	Taux de PHB intracellulaire	
PHV	PolyHydroxyValérate	
P_{in}	Taux de phosphore intracellulaire	gP/gX_C
P_{in_crit}	P_{in} lorsque $\mu = 0$ en limitation phosphore	gP/gX_C
P_{in_exp}	P_{in} lorsque $\mu = \mu_{max}$	gP/gX_C
P_{in_lim}	P_{in} lorsque $\mu = 0$ sans limitation phosphore	gP/gX_C
P_{in_max}	P_{in} maximal pour un μ donné sans limitation phosphore	gP/gX_C
P_{in_min}	P_{in} minimal pour un μ donné en limitation phosphore	gP/gX_C
PolyP	Polyphosphate	
Q	Débit volumique	L/h
q_i	Vitesse spécifique de production ou de consommation du composé i	$Cmol_i/Cmol_{Xc}.h$
q_{i_max}	Vitesse spécifique maximale de production ou de consommation du composé i	$Cmol_i/Cmol_{Xc}.h$
q_{PCR}	PCR quantitative	
$R_{i/j}$	Rendement expérimental global de conversion du composé j en composé i	$Cmol_i/Cmol_j$
r_i	Vitesse de production ou de consommation du composé i	$Cmmol_i/L.h$
SBR	Sequencing Batch Reactor	
S_i	Concentration du substrat i	mmol/L
$S_{i,e}$	Concentration du substrat en entrée	mmol/L
STEP	Station d'Epuration	
T	Température	°C
TSH	Temps de Séjour Hydraulique	h
V	Volume de liquide dans le fermenteur	L
X_C	Biomasse Catalytique	Cmmol/L
X_T	Biomasse Totale	Cmmol/L
X_P	Concentration en Phosphore intracellulaire	Pmmol/L
X_{PHB}	Concentration en PHB intracellulaire	
$Y_{i/j}$	Rendement théorique limite de conversion du composé j en composé i	Cmol/Cmol

Lettres grecques

α	Paramètre cinétique de la fonction Haldane	
δ	Facteur d'amplification en limitation P dans les processus de maintenance	
ε	Constante de Michaelis-Maenten	
μ	Taux de croissance	h^{-1}
μ_{max}	Taux de croissance maximale	h^{-1}

Document confidentiel

Introduction générale

La population mondiale ainsi que les activités industrielles produisent une quantité grandissante d'effluents et de déchets organiques. Associée à cela, le renforcement des normes sur le traitement des eaux résiduaires induit entre autre une augmentation de la production de boues de station d'épuration. En France, ces boues, en accord avec la réglementation nationale et européenne (directive ERU), sont destinées à l'épandage (après compostage ou non) ou l'incinération. Ainsi, le traitement de ces pollutions entraîne des coûts et des consommations d'énergie très importants. Dans le but de répondre à cette problématique, une des solutions envisageables est de considérer les boues et les autres sous-produits issus de l'assainissement comme des gisements de carbone renouvelable pour pouvoir en retirer un gain économique. Ainsi, de plus en plus de filières innovantes de valorisation des déchets sous la forme d'intermédiaires organiques à haute valeur ajoutée sont proposées. Récemment, un intérêt croissant s'est porté vers le développement de polymères biodégradables d'origine biologique, dont les Poly-Hydroxy-Alcanoates (PHA). Ceux-ci peuvent constituer une alternative propre et durable aux plastiques issus de l'industrie pétrochimique.

En effet, la production mondiale de plastiques conventionnels (à partir de pétrole) augmente chaque année. En 2013, elle représentait près de 300 Mt dont 5 Mt en union européenne (Figure 1).

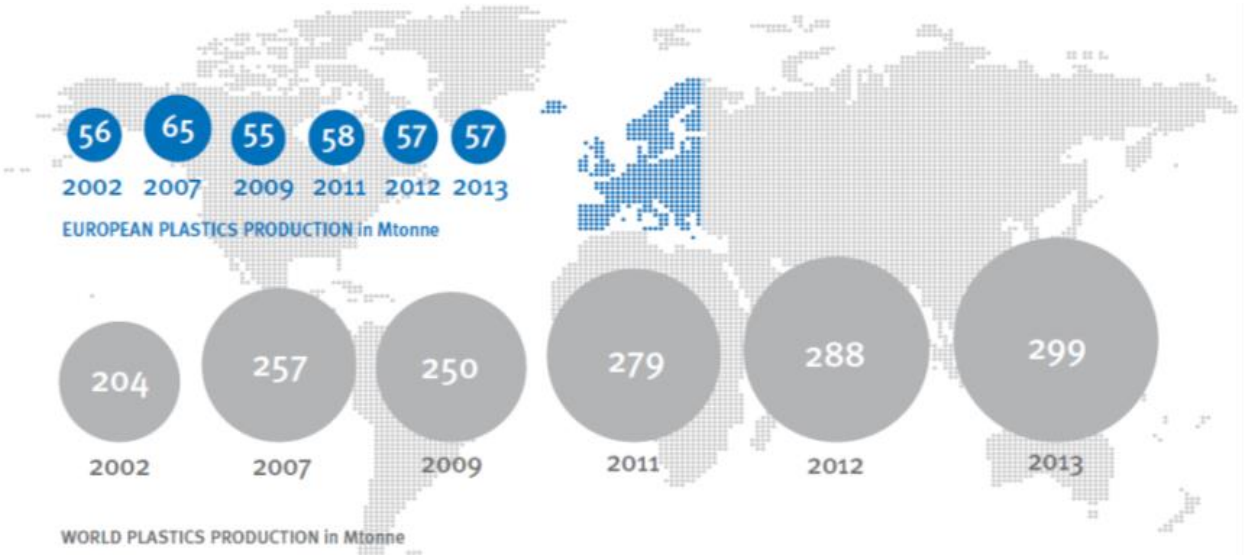

Figure 1 : Production de plastiques dans le monde ces dernière années (PlasticsEurope, 2015)

Ainsi, environ 4% de la production mondiale de pétrole est utilisé comme matière première pour fabriquer des plastiques et autant sont utilisés comme source d'énergie pour les fabriquer. Tout cela crée une inquiétude croissante pour la pérennité des matières plastiques comme le polypropylène et le polyéthylène ; surtout que plus d'un tiers de la production actuelle est utilisé pour le conditionnement, et donc ensuite rapidement abandonnée (Thompson et al., 2009).

Les consommateurs génèrent en moyenne 25 Mt/an de déchets plastiques. Actuellement, les filières d'élimination et/ou de réutilisation des déchets plastiques sont l'enfouissement, le recyclage et la production d'énergie (Figure 2).

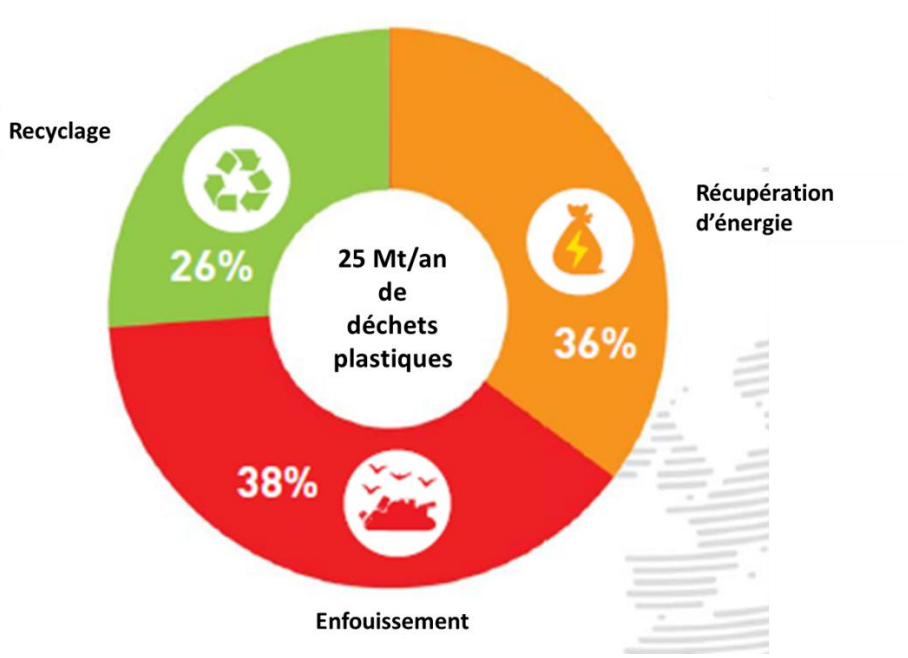

Figure 2 : Quantité totale des déchets plastiques générés et recyclés entre 2006 et 2011 en Europe (PlasticsEurope, 2015)

Le taux de récupération des matières plastiques augmente chaque année (60% en 2011 contre 34% en 2000). Le recyclage des matières plastiques ainsi que la récupération de l'énergie via ces déchets tendent à augmenter contrairement à l'enfouissement. Cependant, le recyclage des matières plastiques reste limité par un certain nombre de cycle de vie avant de perdre leur propriété mécaniques (Loo et Sudesh, 2007). Malgré cela, une trop grande quantité de plastiques s'accumulent dans l'environnement et prennent parfois plusieurs centaines d'années à se décomposer (Salehizadeh et Van Loosdrecht, 2004). De plus, lors de leur dégradation, des composés toxiques nocifs sont libérés bouleversant l'ensemble des écosystèmes. Le plastique synthétique est ainsi devenu le déchet le plus commun et le plus persistant dans les océans et sur les côtes du monde (Moore, 2008).

Ainsi, compte-tenu des diminutions des réserves de combustibles fossiles et de l'impact écologique catastrophique de ces déchets, la voie de production pétrochimique des plastiques n'est tout simplement pas viable (notamment pour l'emballage et les autres applications de courte durée). Tout cela pousse ainsi aujourd'hui à la recherche d'alternatives et c'est pourquoi des polymères écologiques sont recherchés.

Document confidentiel

Les Poly-Hydroxy-Alcanoates (PHA), l'Acide Poly-Lactique (PLA), le Poly-(Butylène Succinate) (PBS), le Poly-Ethylène (PE), le Poly-(Triméthylène Téréphtalate) (PTT) et le Poly-(P-Phénylène) (PPP) sont les polymères, contenant au moins un monomère synthétisé via des microorganismes. Parmi ceux-ci les PHA, PLA et PBS sont reconnus pour être biodégradables. Durant ces dernières années leurs propriétés et possibilités d'applications ont été étudiées et de nombreux produits dérivés ont été créés (Chen, 2009). La production de PHA via des sources biologiques est ainsi une solution qui gagne de l'importance afin de contrer les effets négatifs de la production et la dégradation des plastiques conventionnels (Kleerebezem et Van Loosdrecht, 2007).

Parmi ces PHA, un grand nombre de mélange de copolymères est possible, permettant d'acquérir différentes propriétés recherchées (souplesse, rigidité…). Le Poly-Hydroxy-Butyrate (PHB) se caractérise par sa biodégradabilité totale et, lorsqu'il est sous forme de polymère associé au Poly-Hydroxy-Valérate (PHV), par ses caractéristiques physiques très proches de celles du polypropylène. Pour l'industrie, un des produits recherchés est donc le copolymère P(3HB:3HV) avec un minimum de 15% de HV dans le copolymère. Ainsi, les PHA peuvent remplacer les plastiques issus de la pétrochimie dans une grande variété d'applications : fibres, textiles, films, adhésifs, produit de départ pour la synthèse des composés chiraux, matériaux d'emballage, prothèses, articles jetables, sutures chirurgicales et pansements (Lee, 1996).

En se plaçant dans cette problématique de valorisation et de réduction des boues d'une part et d'alternative viable aux plastiques conventionnels d'autre part, ce projet de recherche présente la possibilité de produire des bioplastiques par biocatalyse à partir des boues d'épuration fermentées. Une évaluation du cycle de vie et une analyse financière de la production de PHA, à partir de boues primaires et secondaires de station d'épuration urbaines ou d'effluents concentrés, utilisant une culture mixte, ont montré le potentiel très prometteur de cette production de PHA (Gurieff et Lant, 2007).

Actuellement, le PHA est principalement produit en culture pure, par certaines espèces bactériennes choisies pour leurs performances d'accumulation et pour la spécificité du substrat qu'elles peuvent assimiler et transformer en PHA. Différents types de substrats carbonés purifiés (osidiques, acides gras à courtes ou à longues chaînes hydrocarbonées) peuvent être utilisés comme précurseurs de la biosynthèse du polymère et sont directement liés à la qualité du PHA produit (Anderson et Dawes, 1990; Dias et al., 2006). Cependant, les contraintes techniques imposées par les cultures pures (substrat purifié, stérilité…) impliquent un coût de production élevé du PHA qui rend la production des bioplastiques non compétitive par rapport à celle des plastiques conventionnels (Choi et Lee, 1999). En effet, près de 11% des coûts totaux de production représentent la stérilisation et la maintenance des réacteurs (Venkateswar Reddy et Venkata Mohan, 2012). Un deuxième facteur important dans le coût de

production des PHA est celui du substrat. Dans le but de commercialiser les PHA, des essais pour réduire les coûts de production ont été menés (Salehizadeh et Van Loosdrecht, 2004). Un moyen de réduire ces coûts opérationnels est de créer un système qui ne nécessite donc pas la stérilisation et la maintenance des réacteurs (réacteurs « low cost »). C'est pourquoi un intérêt croissant est porté sur l'utilisation de cultures mixtes et d'eaux usées pour produire des PHA (Venkateswar Reddy et Venkata Mohan, 2012). Outre le fait que les cultures mixtes soient des cultures ouvertes, il est possible de supposer qu'elles soient plus robustes, et aient une forte capacité d'adaptation face à la composition variable des substrats issus des déchets (boues valorisées sous forme d'AGV).

La démarche mise en place lors de cette étude tente de palier à l'ensemble des problématiques actuelles. Ainsi, à partir de consortia microbiens issus de boues de stations d'épuration, une étude du potentiel de production de PHA est effectuée en utilisant comme substrat le surnageant de boues fermentées.

Deux processus principaux ont été décrits pour l'enrichissement de producteurs de PHA : le système « AN/AE », processus alternant conditions anaérobie et aérobie et le processus de « feast & famine » (alimentation dynamique aérobie – système ADF). Des revues détaillées de ces processus ont été publiées (Dias et al., 2006; Serafim et al., 2008). Le système ADF est basé sur un processus entièrement aérobie dans lequel les boues sont soumises à des périodes consécutives d'excédent externe de substrat (feast) et de famine (famine). Ce processus est principalement utilisé pour sélectionner et enrichir les organismes stockeurs de PHA. De nos jours, le système ADF est considéré comme la stratégie la plus prometteuse pour la production industrielle de PHA car elle permet un potentiel d'accumulation stable lors de la phase successive de production en fed-batch (Salehizadeh et Van Loosdrecht, 2004). Des teneurs intracellulaires de PHA atteignant jusqu'à 90%, sont atteintes avec ce système lorsqu'une carence en azote est appliquée lors de la phase de production (Johnson et al., 2009). Récemment, cette stratégie a été appliquée avec succès pour la production de PHA soit avec un substrat synthétique soit avec un effluent réel (Albuquerque et al., 2011). Encore plus récemment, cette stratégie a été testée à l'échelle pilote (Tamis et al., 2014a). L'étape d'enrichissement est le facteur clé pour la production de PHA à des taux et des rendements élevés. Le processus de sélection est relativement long et la culture en fed-batch impose l'utilisation d'un substrat concentré.

En partant de ces constats, ce travail visait une production continue de PHB à partir de surnageant de boues fermentées, en réduisant les efforts de sélection de surproducteurs, et conduisant à de fortes teneurs et concentrations en PHA malgré l'utilisation de substrats dilués.

Document confidentiel

Pour répondre à cet objectif, nous avons opté pour une sélection et une production sous limitation en phosphore étant donné qu'une limitation en cet élément déclenche le stockage du carbone en PHA tout en maintenant une croissance cellulaire. Pour démarrer l'étude, nous avons pu nous appuyer sur l'expérience forte d'une équipe du LISBP (EAD8) sur la production de PHA sous limitation phosphore. En effet, deux travaux de thèse concernant la mise en œuvre d'une souche de *Cupriavidus necator* ont été réalisés (Aragao, 1996; Grousseau, 2012).

Dans notre travail, deux modes de culture ont été mis en place : fed-batch et chémostat. Un plan d'expérience a été construit pour comprendre les relations entre degré de limitation de la croissance en phosphore, conditions de conduite des réacteurs et les deux objectifs du procédé à savoir la sélection de microorganismes surproducteurs de PHB et l'atteinte de fortes teneurs en PHB intracellulaire.

Après l'étude bibliographique et la présentation du matériel et des méthodes utilisées pour ce travail, un premier chapitre de résultats synthétisant l'ensemble des résultats expérimentaux est exposé. Les trois chapitres suivants ont pour objectif d'analyser et d'améliorer les connaissances sur les mécanismes gouvernant la production et la sélection de microorganismes producteurs de PHA en limitation phosphore (et carbone). Enfin, un dernier chapitre discutera des aspects concernant la mise en œuvre de procédés de production de PHA et de sa faisabilité à l'échelle industrielle.

Cette étude a été réalisée au LISBP de l'INSA de Toulouse dans le cadre d'un contrat ANR Valoria et en collaboration avec Veolia Recherche et Innovation via le dispositif CIFRE de l'ANRT.

PARTIE I. Etude bibliographique

Dans l'étude bibliographique réalisée, la première partie est consacrée à la description des Poly-Hydroxy-Alcanoates (PHA), leurs propriétés et intérêts. La partie suivante s'intéresse aux métabolismes de production de PHA par les bactéries, de l'assimilation des AGV jusqu'à la synthèse du polymère. Ensuite, les mécanismes intracellulaires induits par une limitation nutritionnelle ainsi que les régulations enzymatiques associées sont détaillés afin d'établir le lien avec la production de PHA. La quatrième partie s'intéresse aux différents modes de production de PHA existants. Enfin, la dernière partie s'articule autour du phosphore intracellulaire, de par sa répartition et ses niveaux de régulations dans la cellule. Cette étude bibliographique permet de faire un bilan de l'état de l'art sur les modes production de PHA existants, les mécanismes intracellulaires impliqués dans la synthèse de PHA et ceux répondant à une limitation phosphore.

I. LES POLY-HYDROXY-ALKANOATES : GENERALITES

I.1. Structures et propriétés chimiques

Les PHA sont une classe de polyesters produits naturellement par divers microorganismes à partir de ressources renouvelables comme les carbohydrates, les lipides, les alcools ou les acides organiques.

Les PHA sont stockés sous forme de granule intracellulaire visible au microscope optique avec des propriétés réfractaires (Figure 3). Les granules ont des diamètres compris entre 0,2 et 0,7 µm et sont constituées de 97,7% de PHA, 1,8% de protéines et 0,5% de lipides (Koller et al., 2010).

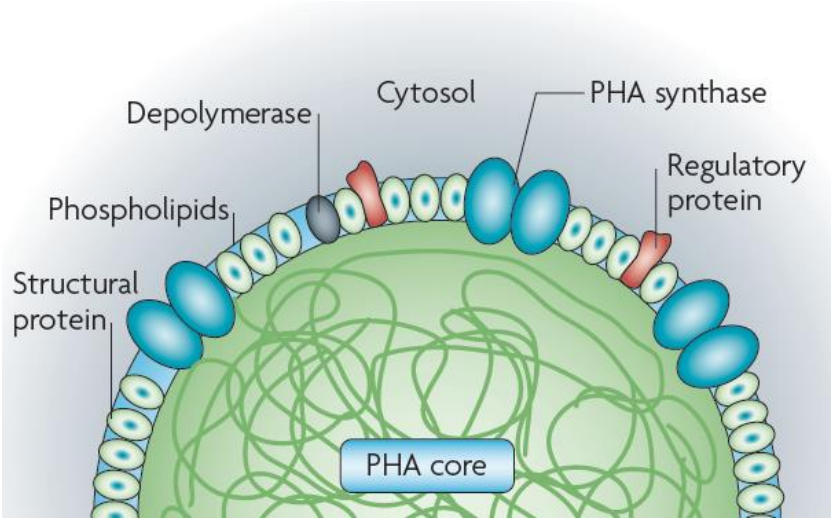

Figure 3 : Schéma d'une coupe de granule de PHA (Rehm, 2010)

Depuis la découverte du premier PHA par Lemoigne en 1926, plus de 100 unités monomériques constituant les PHA ont été découvertes dans plus de 300 microorganismes différents (Dias et al., 2006; Koller et al., 2010). La formule générale des PHA est présentée dans la Figure 4.

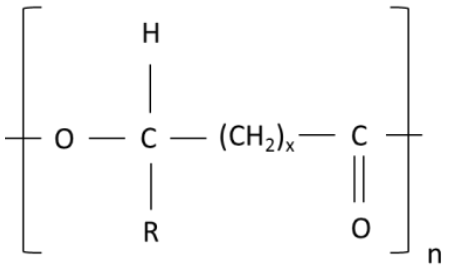

Figure 4 : Structure générale des PHA, avec R une chaine latérale déterminant le type de PHA (par exemple : pour x = 1 et R = CH_3, PHA = Poly-Hydroxy-Butyrique (PHB)

La composition de la chaîne latérale où l'atome R et la valeur de n détermine l'identité de l'unité monomérique (Braunegg et al., 1998). La famille la plus abondante de PHA est celle de l'homopolymère Poly-(3-Hydroxy-Butyrate) (P(3-HB)) pour lequel n = 1 et R est un groupe méthyle. Les monomères peuvent avoir des chaines latérales saturées, insaturées, directes, branchées. De manière générale, ces chaines sont aliphatiques. Certaines bactéries peuvent synthétisées des PHA avec des fonctions aromatiques, halogènes, pseudo-halogènes ou encore alcools (Koller et al., 2010).

Les auteurs différencient ces polyesters en deux grandes catégories : ceux constitués de monomères à chaine carbonée courte ($C_3 \rightarrow C_5$ ou scl-PHA pour Short Chain Length PHA) et ceux constitués de monomères à chaine carbonée plus longue ($C_6 \rightarrow C_{14}$ aussi appelés mcl-PHA pour Medium Chain Length PHA). Les monomères sont tous dans la configuration chirale *R* du fait de la stéréospécificité des enzymes impliquées dans les voies métaboliques de synthèse. Les PHA présentent donc des propriétés optiques (Lee et Choi, 1999) à l'exception du P(4-HB) (Koller et al., 2010). Il existe tout de même une 3ème catégorie où les monomères sont constitués de plus de 15 atomes de carbone (lcl-PHA pour Long Chain Length) (Koller et al., 2010). Les PHA ont un haut poids moléculaire de l'ordre de 100-1000 kDa. La masse molaire dépend de l'espèce microbienne productrice (due à la spécificité de la PHA synthase (Koller et al., 2010)) ainsi que des conditions de culture telles que le pH, la nature et la concentration de la source en carbone.

Les PHA sont complètement biodégradables, biocompatibles et leurs propriétés sont similaires au polypropylène et au polyéthylène dans certains cas. Lors de leurs dégradations, ils sont transformés en eau et dioxyde de carbone en condition aérobie et en méthane et CO_2 en condition anaérobie (Venkateswar Reddy et Venkata Mohan, 2012).

Les propriétés du bioplastique sont fonction du type de PHA synthétisé, qui peuvent être dirigées pendant la biosynthèse du PHA, par exemple par le choix des ratios entre substrats (Koller et al., 2010). Le Tableau 1 présente les propriétés thermoplastiques de certains PHA et les compare aux plastiques conventionnels. Par exemple, le PHB possède un fort degré de cristallinité et est donc rigide et cassant.

Document confidentiel

Cependant, il est insoluble dans l'eau et est relativement résistant à la dégradation hydrolytique, aux solvants, aux rayons ultra-violets. De plus, il présente une faible perméabilité à l'oxygène (Chen, 2009). Par intrusion de blocs tels que 3HV, 4HB ou 5HV, les caractéristiques de ce thermoplastique sont proches de celles du polypropylène (Koller et al., 2010; Lee et Choi, 1999). Plus généralement, les mcl-PHA constituent un élastomère avec des points de fusion plus bas et des températures de transition basses ainsi qu'une faible cristallinité. Leur consistance et texture ressemblent à celles des résines ou du latex (Koller et al., 2010). Ainsi, les domaines d'applications sont divers et variés : produits de base, matériels d'emballage, pour des applications médicales ou pharmaceutiques.

Tableau 1 : Propriétés mécaniques et thermiques de quelques PHA et plastiques dérivés du pétrole (Khanna et Srivastava, 2005)

Polymère	Température de fusion (°C)	Elongation avant cassure (%)	Module de Young (GPa)
P(3HB)	179	5	3,5
P(3HB-co-3HV)			
3 % HV (mole)	170	-	2,9
25 % HV (mole)	137	-	0,7
P(3HB-co-4HB)			
3 % HB (mole)	166	28	-
64 % HB (mole)	50	591	30
90 % HB (mole)	50	1080	100
P(4HB)	53	1000	149
Polypropylène	170	400	1,7
Polyéthylène-terephtalate	262	7300	2,2
Polystyrène	110	-	3,1

I.2. Les microorganismes producteurs de PHA

A l'heure actuelle, plus de 300 microorganismes sont référencés comme producteurs de PHA. Le Tableau 2 recense les principaux genres microbiens producteurs.

Des souches microbiennes ont été identifiées comme étant capable d'accumuler du PHA à la fois sous les conditions aérobies et anaérobies (Chee et al., 2010). Il est possible de classer les microorganismes en deux groupes selon les conditions de culture nécessaires à la synthèse du polymère (Chee et al., 2010) :

- Biosynthèse découplée à la croissance cellulaire. L'accumulation du polymère est favorisée par la disponibilité de la source de carbone par rapport à un autre composé limitant la croissance cellulaire comme l'azote, le phosphore ou l'oxygène dissous ou encore par certains microcomposants comme le soufre, le potassium, l'étain, le fer, ou le magnésium. C'est le cas pour *Cupriavidus necator* et certaines souches de *Pseudomonas*.

- Biosynthèse couplée à la croissance cellulaire. L'accumulation du polymère a lieu durant la croissance cellulaire sans limitation nutritionnelle comme par exemple pour des espèces des genres *Rhodococcus, Nocardia, Rhizobium, Corynebacterium*… (Anderson et al., 1990).

Tableau 2 : Liste des genre bactériens producteurs de PHA (Koller et al., 2010)

Microorganismes producteurs de PHA		
Acidovorax	*Erwinia*	*Oscillatoria*[a]
Acinetobacter	*Escherichia*[a]	*Paracoccus*
Actinobacillus	*Ferrobacillus*	*Paucispirillum*
Actinomycetes	*Gamphospheria*	*Pedomicrobium*
Aeromonas	*Gloeocapsa*[a]	*Photobacterium*
Alcaligenes[a,b]	*Gloeothecea*	*Protomonas*
Allochromatium	*Haemophilus*	*Pseudomonas*[a,b]
Anabaenab	*Halobacterium*[a,c]	*Ralstonia*[a,b]
Aphanothecea	*Haloarcula*[a,b,c]	*Rhizobium*[a,b]
Aquaspirillum	*Haloferax*[a,b,c]	*Rhodobacter*
Asticcaulus	*Halomonas*[a]	*Rhodococcus*[b]
Azomonas	*Haloquadratumc*	*Rhodopseudomonas*
Azospirillum	*Haloterrigenac*	*Rhodospirillum*[b]
Azotobacter[a,b]	*Hydrogenophaga*[a,b]	*Rubrivivax*
Bacillus[a,b]	*Hyphomicrobium*	*Saccharophagus*
Beggiatoa	*Klebsiella*	*Shinorhizobium*
Beijerinckia[b]	*Lamprocystis*	*Sphaerotilus*[a]
Beneckea	*Lampropedia*	*Spirillum*
Brachymonas	*Leptothrix*	*Spirulina*[a]
Bradyrhizobium	*Methanomonas*	*Staphylococcus*
Burkholderia[a]	*Methylobacterium*[b]	*Stella*
Caryophanon	*Methylosinus*	*Streptomyces*
Caulobacter	*Methylocystis*	*Synechococcus*[a]
Chloroflexus	*Methylomonas*	*Syntrophomonas*
Chlorogloea[a]	*Methylovibrio*	*Thiobacillus*
Chromatium	*Micrococcus*	*Thiococcus*
Chromobacterium	*Microcoleus*	*Thiocystis*
Clostridium	*Microcystis*	*Thiodictyon*
Comamonas[a,b]	*Microlunatusb*	*Thiopedia*
Corynebacteriumb	*Moraxella*	*Thiosphaera*
Cupriavidus[a,b]	*Mycoplana*[a]	*Variovorax*[a,b]
Cyanobacterium[b]	*Nitrobacter*	*Vibrio*
Defluviicoccus[b]	*Nitrococcus*	*Wautersia*[a,b] *(actuellement*
Derxia[b]	*Nocardia*[a,b]	*Cupriavidus)*
Delftia[a,b]	*Nostoc*	*Xanthobacter*
Ectothiorhodospira	*Oceanospirillum*	*Zoogloea*[a]

[a] Connaissance détaillée de la croissance et des cinétiques de production de PHA
[b] Accumulation de copolymères connus
[c] Archae

Document confidentiel

De manière générale, les granules de PHA constituent une réserve de carbone pour les microorganismes, mais également une réserve d'énergie sous forme de pouvoir réducteur (Anderson et Dawes, 1990). Par exemple, les granules peuvent servir de carbone endogène et de source d'énergie pour la production de spores (*Bacillus* spp.) et de sporocystes (*Azotobacter* spp.) (Koller et al., 2010). Plus récemment, d'autres auteurs suggèrent que le granule de PHA possède également une fonction de réserve d'acides aminés, de par la grande quantité de protéines structurales (PhaF) mise à la disposition du métabolisme cellulaire lors de la dégradation du PHA (Galán et al., 2011).

L'accumulation de PHA est le plus souvent, induite par un stress nutritif constituant un avantage dans un environnement instable. Dans les procédés de boues activées, les PHA constituent l'une des plus importantes réserves de stockage du carbone (Oshiki et al., 2010). En effet, des conditions instables résultant d'un régime d'alimentation variable déclenchent le stockage du carbone sous forme de PHA chez les microorganismes producteurs (Salehizadeh et Van Loosdrecht, 2004). Parmi ces populations, on retrouve les organismes accumulateurs de polyphosphates (polyphosphate-accumulating organisms ou PAO) et les organismes accumulateurs de glycogène (glycogen-accumulating organisms ou GAO).

Le PHA représente donc une réserve carbonée et ainsi un avantage sélectif, et même une réelle contrainte évolutive dans certains milieux. D'autre part, une accumulation intracellulaire de PHA permet d'accroître la résistance de la cellule à différents stress environnementaux (stress salins, thermique, oxydatifs, UV …) (Zhao et al., 2007).

II. LES METABOLISMES DE PRODUCTION DE PHA A PARTIR D'AGV

Les cinétiques de croissance cellulaire et de production de PHA en culture bactérienne sont fonction de l'espèce considérée, de la source de carbone utilisée et de la nature de la limitation. Lors de l'entrée dans la cellule, les AGV sont d'abord activés sous forme d'acyl-CoA via des acyl-CoA synthétases spécifiques. Les AGV activés sont ensuite convertis en biopolymères selon différentes voies métaboliques. Un même acide gras peut emprunter plusieurs voies et certaines voies métaboliques sont empruntées par différents AGV. Enfin, différents polymères peuvent être synthétisés selon la nature des AGV présents dans le milieu et de leur quantité, ainsi que des conditions opératoires. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la biosynthèse du PHA sont connus et assez bien compris. La production des PHA relève d'un métabolisme central commun à de nombreux microorganismes. De manière générale, les acides gras volatils sont convertis en hydroxyacyl avant d'être synthétisés en PHA grâce à une enzyme : la PHA synthase.

II.1. Assimilation des AGV

L'acide acétique ou acide éthanoïque est un acide carboxylique de formule CH_3COOH. Il est phosphorylé par l'enzyme acétokinase en acétyl-phosphate puis en acétyl-CoA par une phosphotransacétylase (Shi et al., 1997). L'assimilation de l'acide butyrique (acide butanoïque) de formule chimique $CH_3CH_2CH_2COOH$ est réalisée par la β-oxydation, après activation en butyryl-CoA

Quant à l'assimilation de l'acide propionique ou propanoïque (CH_3CH_2COOH), elle peut se faire via le cycle du méthyl-citrate ou via la β-oxydation, après activation en propionyl-CoA. Le cycle du méthyl-citrate permet de former du pyruvate et du succinate qui vont ensuite servir de précurseurs anaboliques via la gluconéogénèse et le cycle de Krebs, respectivement.

Les AGV présentent des effets inhibiteurs qui peuvent être liés :

- à leur fonction acide,
- à leur propriété lipophile,
- à la molécule, provoquant une inhibition spécifique des voies métaboliques par leur forme non dissociée et ainsi une acidification du cytoplasme.

II.2. Biosynthèse de PHA

Quatre voies métaboliques majeures de production de PHA sont considérées (Lee et Choi, 1999).

(1) Pour *Cupriavidus necator* l'acetyl-CoA est converti en P(3HB) en 3 étapes : condensation avec formation de liaison C-C catalysée par la β-ketothiolase formant l'acétoacétyl-CoA. Puis l'acétoacétyl-CoA réductase NADPH-dépendante catalyse la réduction de l'acétoacétyl-CoA en R-(-)-3-hydroxybutyryl-CoA (réaction stéréosélective). La troisième réaction est catalysée par la PHA synthétase qui lie le R-(-)-3-hydroxybutyryl-CoA à la chaine croissante du P(3HB) par une liaison ester. Grousseau (2012) présente un schéma récapitulant l'ensemble de ces étapes à partir des AGV (Figure 5).

(2) Pour les bactéries photosynthétiques telles *Rhodospirillium rubrum,* il existe 5 étapes. Cette voie est très similaire à la précédente mais l'acétoacétyl-CoA est réduit par une réductase NADPH-dépendante en S-(+)-3-hydroxybutyryl-CoA et ensuite convertie en R-(-)-3-hydroxy-butyryl-CoA par deux enoyl-CoA hydratases.

(3) La troisième voie est rencontrée dans la plupart des *Pseudomonas*. Les intermédiaires de la β-oxydation conduisent à la production de PHA à moyenne chaine, par exemple *Pseudomonas oleovorans* accumule majoritairement du 3-hydroxyoctanoate (3HO) et du 3-hydroxyhexanoate (3HHx) lorsque cultivé sur octane, octanol or octanoate.

Document confidentiel

(4) La quatrième voie est aussi rencontrée pour la famille des *Pseudomonas*. On obtient alors des copolymères de mcl-hydroxyalkanoates (3-hydroxydecanoate (3HD)). Les précurseurs pour la biosynthèse de PHA sont dérivés de la voie de synthèse de novo d'acides gras.

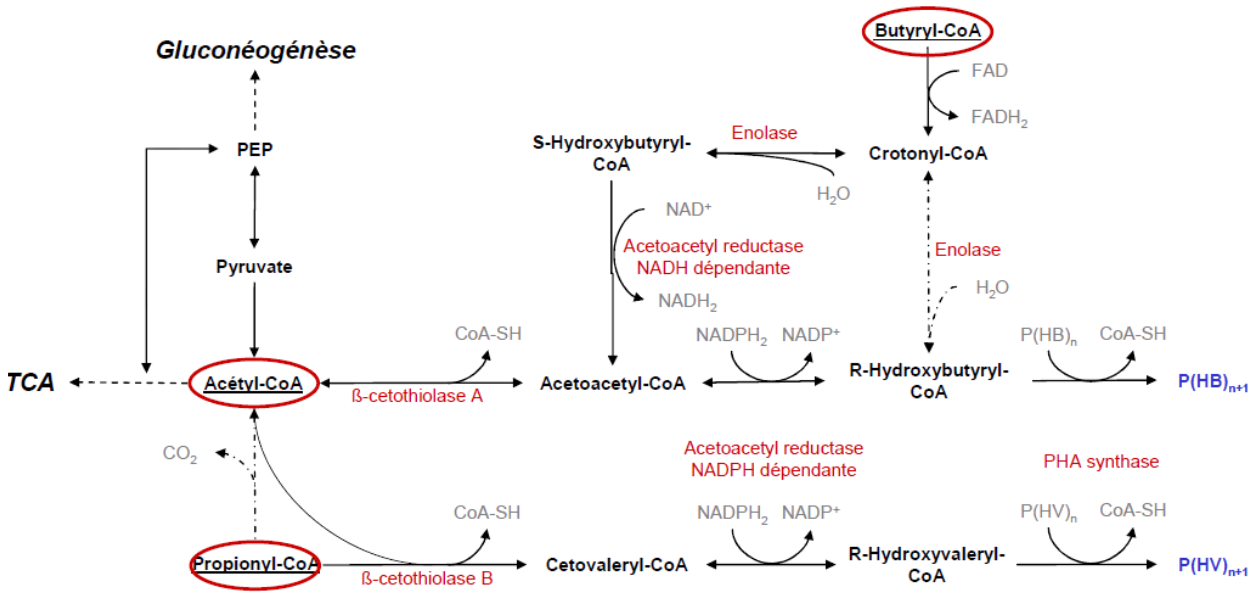

Figure 5 : Biosynthèse de PHB et PHV à partir de l'acétyl-CoA, du butyryl-CoA et du propionyl-CoA (Grousseau, 2012)

II.3. Polymérisation du PHA : les PHA synthases

Les PHA synthases (PHAase) sont les enzymes clés dans la biosynthèse des PHA. Elles catalysent la conversion des substrats de (R)-3-hydroxyacyl-CoA en PHA avec la libération d'un co-enzymeA (Figure 6).

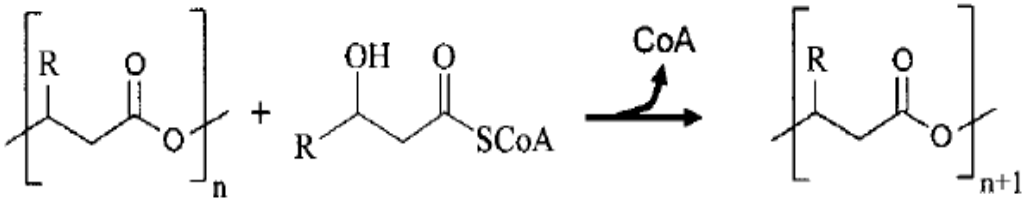

Figure 6 : Réaction catalysée par la PHA synthase

La séquence nucléotidique de 59 gènes codant pour des PHA synthases provenant de 45 bactéries différentes ont été obtenues. Grâce aux structures primaires déduites de ces séquences, à la spécificité de substrats de ces enzymes et la composition des sous unités, 4 classes de PHA synthases ont été définies (Tableau 3).

Tableau 3 : Espèces bactériennes répertoriées en fonction des classes de PHA synthases (Rehm, 2003)

Classes	Sous-unités	Espèces	Substrats
I	PhaC ~ 61-73 kDa	*Alcaligenes eutrophus, Rhodococcus ruber, Rodobacter sphaeroides, Methylobacterium extorquens, Alcaligenes latus, Burkholderia cepacia, Acinetobacter sp., Comamonas acidovorans, Sinorhizobium meliloti, Nocardia corallina, Paracoccus denitrificans …*	$3HA_{scl}$-CoA [~C3-C5], $4HA_{scl}$-CoA, $5HA_{scl}$-CoA, $3MA_{scl}$-CoA
II	PhaC ~ 60-65 kDa	Bactéries de type *Pseudomonas (oleovorans, aeruginosa, fluorescens, putida,…)*	$3HA_{mcl}$-CoA [~≥C5]
III	PhaC PhaE ~ 40 kDa ~ 40 kDa	*Chromatium vinosum, Thiocystis violacea, Thiocapsa pfennigii, Synechocystis sp…*	$3HA_{scl}$-CoA ($3HA_{mcl}$-CoA[~C6-C8], 4HA-CoA, 5HA-CoA)
IV	PhaC PhaR ~ 40 kDa ~ 22 kDa	Bactéries de type *Bacillus (megaterium, amylovorans, laterosporus, circulans, subtilis, cereus, brevis, …)*	$3HA_{scl}$-CoA

Les classes I et II possèdent des enzymes constituées uniquement d'un type de sous unité (PhaC). Leurs masses moléculaires sont comprises entre 61 kDa et 73 kDa. D'après leur spécificité de substrats *in vivo* et *in vitro*, la classe I de PHA synthases (type *Cupriavidus necator*) utilisent préférentiellement des thioesters CoA d'acides gras hydroxylés comprenant 3 à 5 atomes de carbone. Les enzymes de la classe II (type *Pseudomonas aeruginosa*) utilisent préférentiellement des thioesters CoA d'acides gras hydroxylés comprenant 6 à 14 atomes de carbone. La classe III (*Allochromatium vinosum*) comprend des enzymes constituées de 2 types de sous unités : la sous unité PhaC (40 kDa environ) avec une similarité de séquence de 21-28% avec les classes I et II de PHAase et la sous unité PhaE (40 kDa environ) qui n'a pas de similarité avec les autres PHAase. Ces enzymes préfèrent des thioesters CoA d'acides gras hydroxylés comprenant 3 à 5 atomes de carbone. La classe IV de PHAase (*Bacillus megaterium*) ressemble à la classe III, mais PhaE est remplacé par PhaR (20 kDa environ) (Rehm, 2003).

La comparaison des 59 PHAase révèle une similarité de ces enzymes qui varie de 8 à 96% d'acides aminés. En observant les régions des séquences des acides aminés avec la plus forte similarité, 6 blocs conservés ont pu être identifiés. La région N-terminale (environ 100 acides aminés pour les PHAase de la

Document confidentiel

classe I) est très variable. Cette région n'est pas nécessaire pour l'activité de l'enzyme à l'inverse de la région C-terminale. Huit résidus d'acides aminés sont identiques dans les 59 PHAase connues suggérant un rôle important de ces derniers pour le fonctionnement de l'enzyme.

Un arbre phylogénétique a été établi sur la base d'un alignement multiple et prenant en considération la classification des PHAase. Cependant, parmi la classe I de PHAase, il existe une forte diversité indiquant que cette classe possède des propriétés enzymatiques diverses. Les profils d'hydrophobicité de toutes les classes de PHAase montrent un modèle similaire indiquant une topologie similaire pour les protéines respectives. La comparaison des profils d'hydrophobicité des classes I et II de PHAase montre uniquement une différence aux positions 110-130 (PHAase de *C. necator*) ou 80-110 (PHAase de *P. aeruginosa*) suggérant que cette région contribue à la spécificité du substrat (Rehm, 2003).

L'organisation génétique des gènes de biosynthèse des PHA varie en fonction des organismes producteurs (Solaiman et al., 2000). Les gènes codant pour les PHAase et pour les autres protéines liées au métabolisme des PHA sont souvent groupés dans les génomes bactériens (Rehm, 2003).

III. OVERFLOW DE CARBONE ET INDUCTION DE LA SYNTHESE DE PHA

Traditionnellement, la formation PHA a été souvent considérée comme une réponse métabolique face à une croissance déséquilibrée (Stal, 1992). Cependant, il est possible d'identifier deux cas où un microorganisme peut se retrouver face à un excès de carbone. Dans un cas, la croissance du microorganisme est limitée par un élément nutritif, engendrant un excès de la source carbonée disponible pour la croissance. Dans un second cas, le microorganisme fait brusquement face à un excès de carbone et son anabolisme n'est pas en mesure de s'adapter rapidement, engendrant le stockage de ce carbone sous forme de réserve intracellulaire.

Les mécanismes intracellulaires induits par une limitation nutritionnelle ainsi que les régulations enzymatiques déclenchées sont détaillés afin d'établir le lien avec la production de PHA. A partir de ces bases, les modèles cinétiques et métaboliques développés dans la littérature sont résumés.

III.1. Limitation nutritionnelle de la croissance cellulaire

Bien que le rôle physiologique des facteurs limitants diffère, les bactéries répondent aux différentes limitations d'une façon similaire. Les mécanismes de contrôle semblent donc être similaires (Babel et al., 2001).

De manière générale, le phosphore est essentiel pour la conversion de l'énergie du substrat carboné sous forme d'ATP. La génération d'ATP peut être plus difficile en situation de limitation en phosphore. Or une des formes de stockage de l'énergie ne consommant pas d'ATP peut alors être d'accumuler du PHA. Tout le substrat carboné peut alors être converti en PHA et les cellules en limitation de phosphore stockent en plus grande quantité que dans des conditions de non limitation de la croissance. En situation de limitation par le phosphore, une baisse d'activité de l'ATP synthase et une répression du cycle de Krebs, imputables à un manque de phosphore, sont constatés (Marzan et Shimizu, 2011). Le fonctionnement de la chaine respiratoire est alors ralenti (ainsi que le cycle de Krebs) et la cellule adopte alors le shunt glyoxylique pour pouvoir synthétiser l'oxaloacétate et le malate qui sont des précurseurs métaboliques. L' α-cétoglutarate, quant à lui, ne peut pas être synthétisé. Or, la deuxième étape de la synthèse de PHB étant connectée métaboliquement à celle d'α-cétoglutarate, il est possible d'envisager que la production de PHB permette à la cellule de synthétiser ce précurseur métabolique. En outre, ce nœud métabolique permet d'assurer l'équilibre redox de la cellule.

En situation de limitation azotée, la synthèse protéique est ralentie, assurant une redirection des flux de carbone vers la synthèse de PHA (ne contenant pas d'azote). Ceci dit, cette limitation a aussi un impact sévère sur la croissance cellulaire, en réduisant toutes les activités enzymatiques et donc les cinétiques d'activité métabolique. Au contraire, le phosphore est supposé être plus mobilisable que l'azote, d'un composé intracellulaire à un autre, par réorganisation intracellulaire (Aragao, 1996; Grousseau, 2012; Vershinina et Znamenskaya, 2002; Zavaleta-Pastor et al., 2010). La limitation phosphorée pourrait donc permettre une plus grande flexibilité que la limitation azotée.

III.2. Limitation anabolique de la croissance cellulaire

Les procédés dits de « feast & famine » repose sur des cycles composés d'une période d'alimentation en source de carbone et éléments nutritifs et d'une période de famine. Les processus de croissance et de production de PHB ont lieu pendant la période de « feast », permettant aux microorganismes ayant stockés le PHB, de croitre sur cette réserve carbonée et de survivre à la période de « famine » imposée. Plusieurs hypothèses alternatives impliquant différents niveaux de contrôle ont été proposées pour expliquer ces mécanismes.

(1) Un niveau de contrôle implique la régulation de la croissance au niveau protéomique et transcriptomique : Van Loosdrecht et Heijnen, (2002) ont émis l'hypothèse que l'ARN et les protéines sont produits principalement pendant la période de « feast » et que leur activité chute pendant la période de « famine ». En effet, la croissance cellulaire pendant cette période ne génère pas de manière équivalente les protéines, ce qui dilue et diminue la teneur en protéines par cellules. Ainsi, cela conduit à une quantité d'ARN moindre par rapport à la croissance cellulaire, impliquant une redirection des flux de

carbone vers les processus de stockage pendant la prochaine période de « feast ».

(2) Un autre scénario est basé sur le contrôle de la croissance et de la production de PHA au niveau métabolomique, impliquant une limitation des métabolites internes. Lorsque l'assimilation du substrat est maximisée, la consommation des molécules d'ATP est très élevée. La chute de ces molécules limiterait ainsi la croissance cellulaire dépendante de l'ATP (Third et al., 2003). Également d'autres niveaux de contrôles au niveau métabolomique peuvent être impliqués, comme l'activation et la désactivation des enzymes allostériques.

III.3. Régulation enzymatique du métabolisme de PHB

De manière générale, la redirection du carbone vers la synthèse de PHB est régulée de façon enzymatique et est induite :

- par de fortes concentrations intracellulaires en $NAD(P)H_2$, un ratio $NAD(P)H_2/NAD(P)$ élevé
- pour une faible concentration en CoA-SH et une forte concentration en acétyl-CoA.

Le schéma général de régulation enzymatique de *Cupriavidus necator* est présenté sur la Figure 7 et peut être généralisé à la production de PHA.

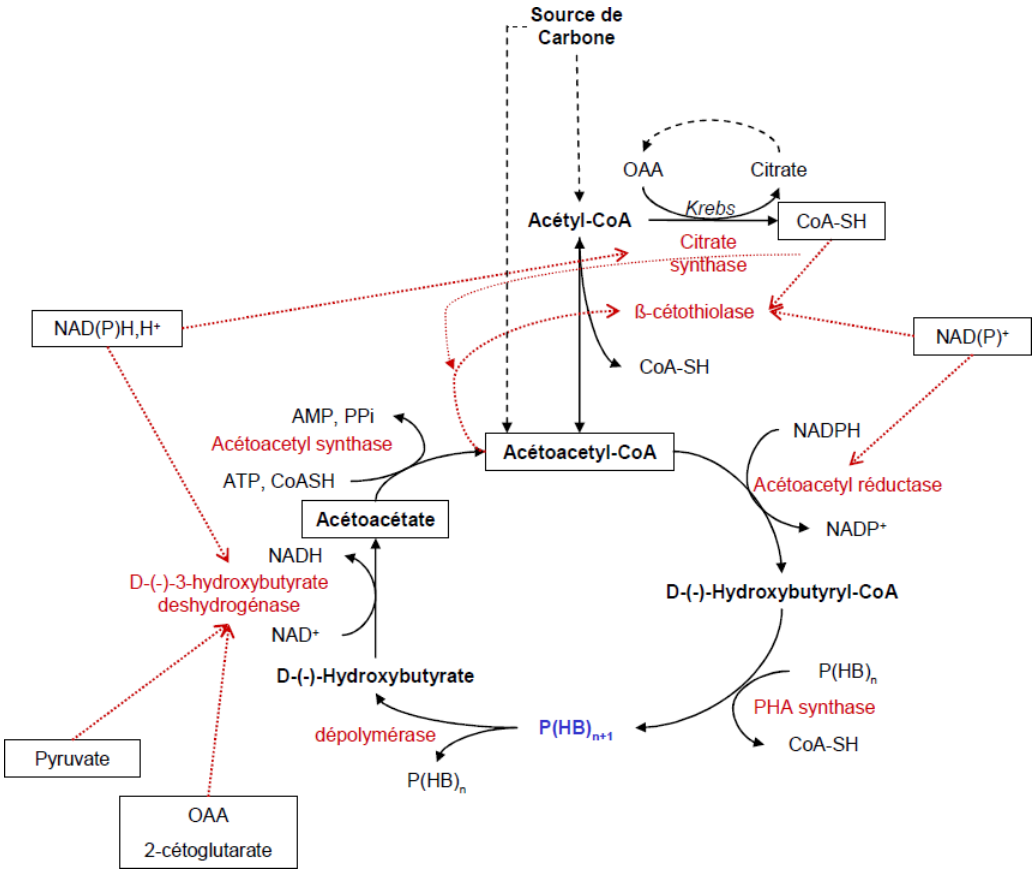

Figure 7 : Régulation enzymatique du métabolisme de production de PHA chez *C. necator* (Grousseau, 2012)

III.4. Modèles métaboliques et cinétiques

Dans le but de comprendre, prédire les comportements métaboliques et cinétiques impliqués dans la production de PHA, il est utile d'avoir un modèle qui décrit les conversions biologiques et physico-chimiques dans un réacteur. Un tel modèle peut être utilisé pour ajuster les données expérimentales afin d'identifier les valeurs des paramètres cinétiques et stœchiométriques caractéristiques, qui permettent une comparaison des données de processus et la prédiction de l'effet des variables opérationnelles.

Actuellement, plusieurs modèles peuvent être trouvés dans la littérature pour décrire l'ensemble des processus (Van Aalst-van Leeuwen et al., 1997; Beun et al., 2000, 2002; Ciggin et al., 2012; Dias et al., 2008, 2005; Johnson et al., 2009; Pardelha et al., 2014). Un modèle métabolique pour la synthèse de PHA par des cultures mixtes utilisant l'acétate comme seule source de carbone (Beun et al., 2002; Dias et al., 2005) a été adapté à partir d'un modèle développé pour une culture pure (Van Aalst-van Leeuwen et al., 1997). Sept réactions sont considérées durant la phase d'alimentation (stockage, croissance et maintenance cellulaire) et la phase de famine (croissance maintenance et cellulaire). Sur la base de ce modèle métabolique, un rendement théorique maximale (en l'absence de croissance cellulaire) de 0,74 acétate $Cmol_{PHB}/Cmol_S$ a été déterminé pour une culture microbienne mixte (Dias et al., 2005). Le modèle a été étendu afin de décrire l'utilisation à la fois de l'acétate et le propionate en tant que sources de carbone (Dias et al., 2008).

Bien que l'ensemble des modèles développés décrivent bien les processus mis en évidence dans les conditions opératoires définies, Tamis et al. (2014b) compare les modèles actuels, soulève les points d'amélioration, afin de concevoir un modèle généralisé et prédictif pour les procédés de production de PHA de type « feast & famine ».

Le Tableau 4 résume les expressions des processus des modèles métaboliques et mécanistiques issus de la littérature (d'après Tamis et al. (2014b)).

Tableau 4 : Expressions métaboliques et cinétiques couramment utilisés dans les modèles de production de PHA

Processus	Expressions métaboliques	Expressions cinétiques
Consommation substrat	AGV + ATP → AGV-CoA + n_0 CO_2 + n_1 NADH	$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{q_{PHA}}{Y_{PHA/S}} + m$
Production PHA	AGV-CoA + n_2 NADH → PHA	$q_{PHA} = q_{PHA_max} \frac{S_C}{S_C + K_C}\left(1 - \left(\frac{PHB_{in}}{PHB_{in_max}}\right)^n\right)$
Croissance	n_3 AGV-CoA + $Y_{ATP/X}$ ATP → X + n_4 CO_2 + n_5 NADH	$\mu = \mu_{max} \frac{S_C}{S_C + K_C}$
Maintenance	ATP → 0	m
Catabolisme	AGV-CoA → n_6 NADH + n_7 CO_2	--
Phosphorylation oxydative	NADH + 0,5 O_2 → (P/O) ATP	--

Document confidentiel

Les processus considèrent uniquement la consommation de substrats de types AGV. D'autres types de substrats peuvent être présents, par exemple dans des flux de déchets, conduisant à des dynamiques différentes. Les processus de croissance et de production de PHA sont souvent représentés par une équation de Monod. A des concentrations intracellulaires élevées de PHA, de nombreuses observations indiquent que la vitesse de synthèse de PHA diminue avec l'augmentation de la teneur en PHA intracellulaire. Ce phénomène peut être modélisé par l'introduction d'une fonction d'inhibition empirique qui dépend de la teneur intracellulaire en PHA maximale (Van Aalst-van Leeuwen et al., 1997). Les valeurs numériques de la puissance (n) montrent une grande variabilité entre les expériences (jusqu'à un facteur 10), même lorsque les espèces identiques sont sélectionnées (Jiang et al., 2011a; Johnson et al., 2010a, 2010b).

De manière générale, les modèles cinétiques sont construits à partir de la limitation en azote, un élément non conservateur. Ainsi, les processus de croissance cellulaire et de production de PHA sont formulés par le terme de limitation et d'activation de Monod par l'azote, respectivement. L'étude bibliographique a permis de soulever qu'aucun modèle cinétique n'a été établi pour la production de PHA sous limitation en phosphore, un élément conservateur.

IV. LES PROCEDES DE PRODUCTION DE PHA

Depuis la fin des années 1980, la biotechnologie industrielle a consacré un effort considérable en exploitant la capacité naturelle de certains microorganismes à accumuler du PHA, en vue de produire des polyesters biodégradables avec des propriétés thermoplastiques intéressantes et des productivités élevées. La voie principalement empruntée jusqu'à aujourd'hui, consiste en l'amélioration des stratégies de fermentation microbienne de cultures pures utilisant à la fois des types sauvages et des organismes génétiquement modifiés. Cependant, un intérêt croissant est porté sur les cultures non axéniques à partir d'une sélection microbienne de producteurs de PHA. Après avoir présenté les procédés industriels actuellement sur le marché, les recherches et les résultats obtenus en cultures non axéniques, à partir de boues activées, sont exposés.

IV.1. Les procédés existants à l'échelle industrielle

Actuellement, le PHA est principalement produit en culture pure, par certaines espèces bactériennes choisies pour leurs performances d'accumulation et pour la spécificité du substrat qu'elles peuvent assimiler et transformer en PHA. Une production microbienne efficace dépend de la concentration cellulaire, du taux de croissance, du pourcentage de PHA intracellulaire, des rendements, des coûts globaux… (Chen, 2009). De plus, les performances maximales d'accumulation de PHA peuvent être atteintes plus facilement en culture pure grâce à l'homogénéité du système sur un plan métabolique.

Bien que de nombreux types de PHA aient été découverts, seuls quatre d'entre eux ont été produits à grande échelle et commercialisés : le PHB, le P(HBcoHV), le P(3HBco4HB) et le P(HBcoHHx). Le Tableau 5 recense les souches généralement utilisées pour la production de PHA. Typiquement, la production de PHA par des cultures pures est effectuée en mode discontinu, le temps total de fermentation est compris entre 38 et 72 heures. En général, une stratégie fed-batch est utilisée pendant laquelle une croissance exponentielle est assurée afin d'atteindre une densité cellulaire élevée. Les conditions de limitation de la croissance sont imposées afin d'induire stockage de PHA. Ces modes de procédés industriels permettent d'atteindre des concentrations en biomasse globalement supérieures à 60 g/L avec un taux de PHA intracellulaire supérieur à 50%.

Tableau 5 : Souches bactériennes communément utilisées pour la production de PHA à l'échelle pilote et industrielle (Chen, 2009)

Souches	Modification génétique	Type de PHA et échelle *(t/an)*	Substrats	MS finale *(g/L)*	PHA final *(%MS)*	Entreprises
Ralstonia eutropha	Non	PHB (10)	Glucose	> 200	> 80%	Tianjin North. Food, Chine
Alcaligenes latus	Non	PHB (10-300)	Glucose ou Saccharose	> 60	> 75%	Chemie Linz, btF, Autriche Biomers, Allemagne
Escherichia coli	*phbCAB + vgb*	PHB (10)	Glucose	> 150	> 80%	Jiang Su Nan Tian, Chine
Ralstonia eutropha	Non	PHBV (300-2000)	Glucose + proprionate	> 160	> 75%	ICI, GB Zheliang Tian An, Chine
Ralstonia eutropha *Escherichia coli*	Non *phbCAB*	P3HB4HB (>10 000)	Glucose + 1,4-BD	> 100	> 75%	Metabolix, Etats-Unis Tianjin Green Biosci, Chine
Ralstonia eutropha	$phaC_{Ac}$	PHBHHx (1)	Acide gras	> 100	> 80%	P&G, Kaneka, Japon
Aeromonas hydrophila	Non	PHBHHx (1)	Acide laurique	< 50	< 50%	P&G, Jiangmen Biotech Ctr, Chine
Aeromonas hydrophila	*phbAB + vgb*	PHBHHx (0,1)	Acide laurique	~ 50	> 50%	Shandong Lukang
P. putida *P. oleovorans*	Non	mcl PHA (0,1)	Acides gras	~ 45	> 60%	ETH, Suisse
Bacillus spp.	Non	PHB (5)	Saccharose	> 90	> 50%	Biocycles, Brésil

MS : Matières Sèches ; vgb : gène codant l'hémoglobine Vitreoscilla ; phbCAB : gènes de synthèse du PHB codant la β-ketothiolase, l'acetoacetyl-CoA reductase et la PHB synthase ; 1,4-BD : 1,4-butanediol ; $phaC_{Ac}$: gène phaC de la PHA synthase de Aeromonas caviae ; phbAB : gène codant β-ketothiolase et l'acetoacetyl-CoA reductase.

Document confidentiel

IV.2. Les cultures mixtes : Sélection de microorganismes producteurs

L'utilisation de cultures mixtes, telles que les boues activées, présente certains avantages : pas de nécessité de processus de stérilisation et la possibilité d'utiliser des substrats économiques et des déchets comme source de carbone. Ceci devrait permettre une production plus économique des PHA contrairement aux cultures pures (Dias et al., 2006; Venkateswar Reddy et Venkata Mohan, 2012). Elles permettent aussi l'utilisation d'une plus grande variété de substrats en raison de la présence de plusieurs organismes producteurs de PHA. Un effort considérable a été réalisé dans la production de PHA en utilisant des cultures mixtes et comme substrat des eaux usées d'origines différentes comme des eaux usées municipales, de la mélasse de canne à sucre, des eaux usées d'usines à papier, des effluents de moulins à huile d'olive, des effluents de réacteur de production de biohydrogène et des déchets alimentaires (Venkateswar Reddy et Venkata Mohan, 2012).

La première étude faisant mention d'une production de PHA par une culture mixte est réalisée par Wallen et Rohwedder au milieu des années 70. Ils observent qu'une boue activée issue d'un procédé d'élimination du phosphore peut accumuler un polymère contenant des unités HB, HV, et HHx (Wallen et Rohwedder, 1974). Parmi les organismes producteurs, deux types de métabolisme de PHA ont été signalés :

1) la production de PHA durant une phase anaérobie par des organismes accumulant des polyP ou du glycogène (PAO/GAO), avec une consommation ultérieure des substances de réserves pour la croissance cellulaire durant une phase aérobie (Smolders et al., 1994),
2) la production de PHA par des cultures aérobies lorsque celles-ci sont alimentées par des pulses de substrats, suivie d'une croissance cellulaire lorsque le substrat est absent (Beun et al., 2002).

En appliquant les conditions environnementales appropriées, ce type de microorganismes pourrait être enrichi sélectivement dans des bioréacteurs.

De manière générale, la production de PHA est réalisée en mode fed-batch en limitant la croissance des cellules après une étape d'enrichissement en producteurs de PHA. Deux procédés d'enrichissement principaux ont été décrits : le procédé anaérobie-aérobie (AN/AE) et le procédé de « feast & famine » ou encore appelé « Aerobic Dynamic Feeding » (ADF). Des revues détaillées de ces procédés ont déjà été publiées (Dias et al., 2006; Serafim et al., 2008).

Le système AN/AE de production de PHA comprend une étape d'enrichissement de culture effectuée dans la station de traitement par boues activées (STEP), dans lequel les conditions AN/AE sont imposées, suivie d'une étape d'accumulation pour la production de PHA. Cette dernière étape est effectuée dans un réacteur alimenté en substrat fermenté contenant des acides gras volatils (AGV). Le taux de PHA

accumulé dans ces systèmes est généralement faible, ne dépassant pas 20% de la masse sèche de cellules (Satoh et al., 1996), mais peut être augmenté par une micro-aération durant la phase anaérobie du système AE/AN, permettant d'atteindre un contenu en PHA variant de 33% à 62% (Satoh et al., 1996; Takabatake et al., 2000). En appliquant une limitation nutritionnelle par l'azote, 60% de PHA a été accumulé dans des conditions aérobies (Bengtsson, 2009).

Le système ADF est un procédé strictement aérobie où les boues sont soumises à des périodes consécutives d'excès (« feast ») et de carence en substrat (« famine »). Dans de nombreux cas, le système ADF est conduit dans des réacteurs SBR (« Sequencing Batch Reactor ») et est principalement utilisé pour la sélection de la culture pour atteindre une proportion élevée de microorganismes producteurs de PHA. Par ailleurs, ce procédé est considéré être la stratégie la plus prometteuse pour la production industrielle, car elle permet une accumulation stable en PHA (Salehizadeh et Van Loosdrecht, 2004), atteignant des teneurs jusqu'à 67% sans limitation nutritionnelle (Serafim et al., 2004), jusqu'à 89% sur acide acétique (Johnson et al., 2009) ou sur acide lactique (Jiang et al., 2011b). Les expériences en laboratoires réalisées à partir d'effluents réels ont abouti généralement à des teneurs en PHA inférieures : par exemple, 75% sur la mélasse fermentés (Albuquerque et al., 2010) et 77% sur eaux usées issues de l'industrie papetière (Jiang et al., 2012). Néanmoins, les résultats ci-dessus montrent que les cultures d'enrichissement en microorganismes producteurs peuvent atteindre des teneurs en PHA semblables à celles des cultures pures génétiquement modifiés qui sont classiquement utilisées en biotechnologie industrielle pour la production de PHA. Jusqu'à présent, une seule expérience a montré la capacité des boues activées à stocker directement (sans enrichissement préalable) une grande quantité de PHA (jusqu'à 56%) avec une limitation N (Mengmeng et al., 2009). Le Tableau 6 récapitule les conditions opératoires, les sélections microbiennes et les performances atteintes en cultures ouvertes.

Document confidentiel

Tableau 6 : Conditions opératoires, sélections microbiennes et performances atteintes en cultures ouvertes

Mode enrichis-sement	Substrats	Communautés microbiennes	Accumulation PHA	Limitation croissance	q_{PHB} [1]	$R_{PHA/S}$ [1]	PHA_{in} [2]	Réf.
ADF	AA	Dominantes : γproteobacteria	Fed-batch (alim. continue, pH 7, 30°C)	Carence N	1,4	0,60	89	(Johnson et al., 2009)
		nd	Fed-batch (pH non contrôlé, 22°C)	Limitation N	0,41	0,70	65	(Serafim et al., 2004)
		Plasticicumulans acidovorans	Batch (pH 7, 30°C)	Limitation N	1,74	0,61	88	(Jiang et al., 2011c)
	AB				3,64	0,89	88	(Marang et al., 2013)
	AA + AB				3,72	0,82	88	
	AA + AV	Dominant: βproteob. (*Comomonas, Thauera et L. hyaline*) + *Firmicutes*	Batch (pH 9,5, 25°C)	Aucune limitation	0,12[3]	0,43[3]	46	(Villano et al., 2010)
	AGV (AA, AP, AB, AV)	nd	Fed-batch (alim. continue, pH 8,4, 23-25°C)	Limitation N	0,26	0,80	77	(Albuquerque et al., 2011)
	Molasse fermentée (AA, AP, AB, AV)	*26% Azoarcus* 8% *Thaurea* 50% *Paracoccus*	Fed-batch (pH non contrôlé, 23-25°C)	Limitation N	0,27	0,62	61	(Albuquerque et al., 2012)
	Effluents papetiers (60% AGV)	*Plasticicumulans acidovorans +* Microorganismes non stockeurs	Batch (pH 7, 30°C)	Limitation N	0,7	0,8[3]	77	(Jiang et al., 2012)
ADF + micro-environnement	AGV (AA, AP, AB, AV)	71% *Firmicutes* 29% *Proteobacteria*	Fed-batch (alim. continue, pH non contrôlé, 29°C	Limitation N	nd	nd	45	(Venkateswar Reddy et Venkata Mohan, 2012)
				Limitation N + P	nd	nd	54	
AN/AE	AA	Dominant: *Competibacter* (GAOs)	Fed-batch (pH 7,7, 30°C)	Limitation N	0,44	nd	60	(Bengtsson, 2009)
			Conditions aérobies		0,38	nd	49	
Sans enrichis-sement	Liquide fermenté (VFAs)	nd	Fed-batch (pH 8,1-8,6, 21°C)	Limitation N	0,31[3]	0,37[3]	56	(Mengmeng et al., 2009)

[1] *exprimé en Cmol*
[2] *exprimé en pourcentage de MVS*
[3] *exprimé en DCO*
nd : non déterminé

V. CROISSANCE BACTERIENNE ET LIMITATION PHOSPHORE

Dans cette partie, l'étude bibliographique vise à analyser les besoins nutritionnels pour la croissance, les molécules phosphorées intracellulaires et les différents pools associés de manière à identifier des mécanismes clés permettant aux cellules de s'adapter face à une limitation nutritionnelle en phosphore. Enfin, les différents modèles retrouvés dans la littérature permettant de décrire le comportement du phosphore intracellulaire sous limitation phosphore sont exposés.

V.1. Besoins élémentaires pour la croissance bactérienne

Passant de l'échelle moléculaire, cellulaire et de l'organisme à l'échelle de la planète, le phosphore est probablement le principal facteur limitant de la productivité végétale sur Terre au cours des périodes géologiques. Dans les milieux environnementaux, le phosphore peut être présent sous forme dissoute ou sous forme particulaire. Trois types de formes de phosphore particulaire peuvent être distingués, les formes organiques contenues dans la biomasse, les formes minérales (ou inorganiques) insolubles, ainsi que les formes adsorbées (Larpent et Champiat, 1988).

Le Tableau 7 présente les éléments constituants majoritairement une cellule bactérienne.

Tableau 7 : Eléments majeurs constituants une cellule bactérienne et leurs fonctions associées

Eléments	% MS	Fonctions
C	50	Constituant majeur du matériel cellulaire dans les protéines, les acides nucléiques, les lipides, les carbohydrates…
O	20	Constituant du matériel cellulaire, de l'eau cellulaire, O_2 est l'accepteur d'électron en condition aérobie
N	14	Acides aminés, nucléotides et coenzymes
H	8	Constituant majeur des composés organiques et de l'eau cellulaire
P	3	Acides nucléiques, phospholipides, acides téichoïques, lipopolysaccharides, métabolites
S	1	Acides aminés et coenzymes

Selon Franklin et al. (2011), la cellule peut être compartimentée et il est possible de considérer la stœchiométrie globale comme la résultante des stœchiométries de ces compartiments (Franklin et al., 2011). Les parts relatives de chaque compartiment vont aussi influencer la stœchiométrie globale. L'approche proposée consiste alors à diviser la biomasse en compartiments regroupant les fonctions structurelles de base de la cellule (z), celles liées au mécanisme de croissance (g), et celles liées à l'acquisition et à la consommation des nutriments (u) comme présenté sur la Figure 8.

Document confidentiel

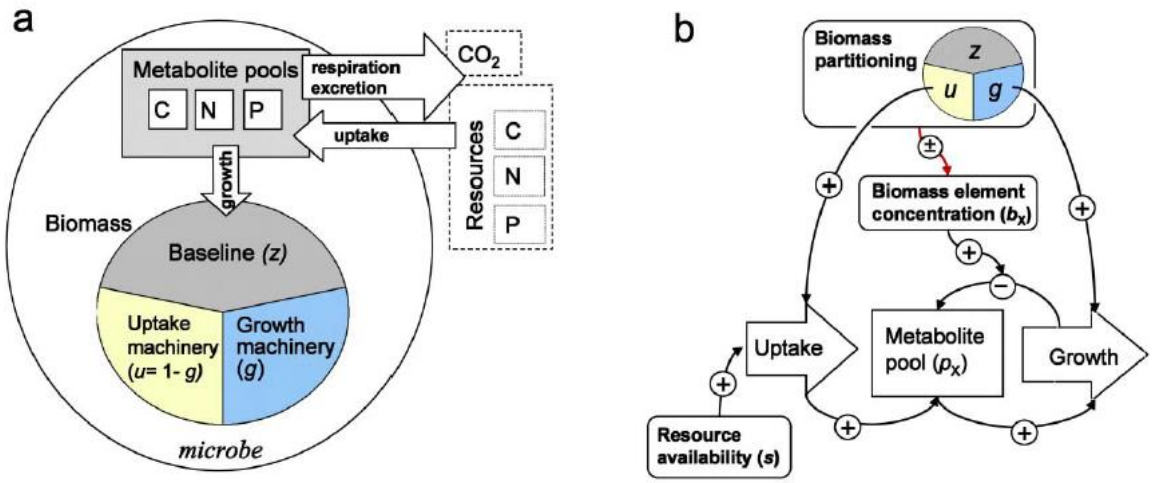

Figure 8 : Compartimentation cellulaire proposée par Franklin et al., (2011). a) Compartimentation et flux. b) Effet de la compartimentation de la biomasse sur les processus cellulaires en croissance limitée. Les flèches indiquent les effets positifs, négatifs ou variables. La composition de la biomasse (u, g et z) a de directs effets sur la croissance et le transport et un effet indirect, à travers la concentration de l'élément dans la biomasse, qui affecte la consommation métabolique du nutriment par unité de biomasse produite

A ces compartiments, viennent s'ajouter les pools des métabolites internes nécessaires à la croissance et à la respiration. Les fonctions structurelles de bases sont liées au maintien et à la synthèse de l'ADN, des membranes et parois cellulaires ainsi que des protéines essentielles. Le mécanisme de croissance est reflété principalement par les taux de ribosomes et d'ARN et enfin le mécanisme d'assimilation des ressources est corrélé à la quantité et à l'activité des protéines transmembranaires.

V.2. Le phosphore intracellulaire

Pour les bactéries, le phosphore est un nutriment essentiel minoritaire. Bien qu'il ne représente qu'un faible pourcentage de la masse sèche des cellules, son assimilation est nécessaire à la croissance. Il joue un rôle essentiel en termes d'énergie et d'équilibre redox pour la cellule.

Le taux de phosphore intracellulaire dépend du microorganisme et de ses conditions de croissance (Bremer et Dennis, 1996), comme la température, le pH et le taux de croissance. Le Tableau 8 illustre quelques taux de phosphore référencés dans la littérature et montre les gammes de variations observées par certains auteurs.

Tableau 8 : Taux de phosphore généraux de quelques microorganismes (calculés à partir des données)

Organismes	Variations P_{in} (g/100gX)	Références
Klebsiella aerogenes	1,3 - 3	(Neijssel et Tempest, 1976)
A. globiformis	1,2 - 2,8	(Veen et Paul, 1979)
E. aerogenes		
Acinetobacter spp.	1,4 - 4,5	(Hao et Chang, 1987)
Bactéries d'eau douce	0,8 - 2	(Vadstein et Olsen, 1989)
Bactéries marines	0,3 - 4,2	(Tezuka, 1990)
Bactérie d'eau douce	1,3 - 3,8	(Jurgens et Gude, 1990)
C. glutamicum	1,5 - 2,1	(Panhorst et al., 2011)

V.2.a *Les molécules phosphorées*

Le phosphore est un constituant des acides nucléiques, des lipopolysaccharides, des cofacteurs et intervient dans l'adressage et les modifications post-transcriptionnelles des protéines, par la phosphorylation de ces dernières pour permettre les processus d'adressage et de reconnaissance cellulaire notamment. Les principales molécules contenant du phosphore sont l'ADN, l'ARN, les phospholipides et les métabolites. Le phosphore est intégré dans les biomolécules sous forme d'esters orthophosphoriques organiques (molécules phosphorylés, phospholipides, AMP, ADN, ARN..) ou de phosphates organiques condensés (ATP, NAD/NADP, phosphoprotéines,…). Des polyphosphates existent aussi librement dans les cellules, notamment le pyrophosphate inorganique, ou sous forme de granules de polyphosphates inorganiques dans le cas des bactéries PAO (Polyphosphate Accumulating Organisms) (Panhorst et al., 2011). Le Tableau 9 récapitule les fractions de phosphore contenues dans les molécules phosphorées dans une cellule bactérienne.

Tableau 9 : Fractions de phosphore dans les molécules phosphorées d'une cellule bactérienne (Raven, 2013)

Molécules phosphorées	gP/100 g MS du composé
ARN	9,1
ADN	9,5
Phospholipides	4,1
Hexose-1(ou 6)-phosphate	12
Fructose-1,6-biphosphate	18
ATP	18
Ribulose-1,5-biphosphate	20
2-phosphoglycolate	22
Glycerate-1,3-biphosphoate	23
Phosphate inorganique	32

Document confidentiel

V.2.b *Répartition du phosphore intracellulaire : importance des pools d'ARN*

Selon les conditions environnementales, la fraction de chaque composé phosphoré peut varier. Comme illustré par la Figure 9, Fuhs (1969) propose de compartimenter les molécules phosphorées en 3 fractions regroupant les molécules :

- **1/ Structurelles** permettant de maintenir l'intégrité et la viabilité du microorganisme (ADN, lipides membranaires). Cette fraction n'est pas affectée par la concentration en phosphore soluble extracellulaire.
- **2/ Fonctionnelles** nécessaires à la machinerie de synthèse et les pools métaboliques (ARN, intermédiaires phosphorylés). La taille de cette fraction détermine le taux de croissance et inversement. Une relation linéaire entre le taux d'ARN et le taux de croissance a été largement déterminée par les auteurs (Karpinets et al., 2006).
- **3/ De stockage** en polyphosphates solubles et insolubles. Cette fraction a lieu lorsque le phosphore n'est pas limité et n'affecte pas matériellement le taux de croissance.

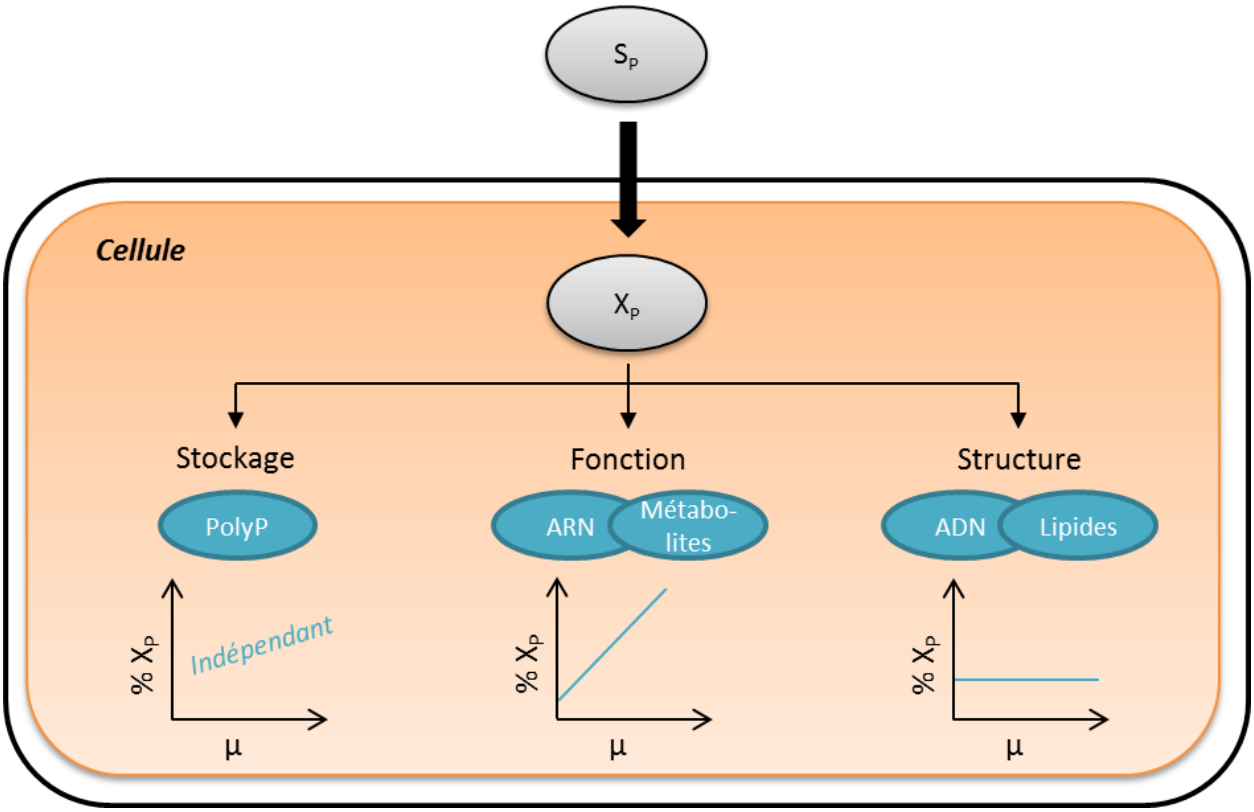

Figure 9 : Répartition des molécules phosphorées en 3 fractions (adaptée selon Fush (1969))

La fraction constituée des molécules fonctionnelles est donc dépendante du taux de croissance. Ce phénomène est appelé le « Growth Rate Hypothesis » (GRH) (Sterner et Elser, 2002). Le GRH est basé sur la corrélation observée, dans un grand nombre de microorganismes, de l'augmentation de la fraction d'ARN et également du ratio ARN/protéine dans la biomasse avec le taux de croissance (Elser et al., 2003; Sterner et Elser, 2002). Dans la littérature, les auteurs ont déterminés des corrélations linéaires entre l'ARN et le taux spécifique de croissance en chémostat. Karpinets et al. (2006), représente ces relations linéaires par le ratio ARN/protéines mais également par le ratio P/N selon le taux de croissance, mettant en évidence un facteur 5 en moyenne entre un faible et fort taux de croissance.

Le Tableau 10 se propose d'évaluer les pools majoritaires de phosphore dans la cellule sur les bases de données référencées et d'hypothèses. Le pool de métabolites dans la cellule est minoritaire et évalué à inférieur à 1% (arbitrairement). La teneur en phosphore dans les protéines (phosphorylation d'une part des protéines) est évaluée à moins de 1% (arbitrairement). Des calculs de taux de phosphore relatifs à chacun des pools identifiés ont été réalisés en considérant ces hypothèses. La composition cellulaire prise en compte est celle générale en phase exponentielle de croissance d'*E. coli.*

Tableau 10 : Principales molécules cellulaires et leur teneur en phosphore

Molécule	% (g/gX)	%P (gP/g)	%P rel. (g/gP)
ADN	3	9,1[a]	9
ARN	20	9,5[a]	63
Protéines	55	< 0,5	< 8
Phospholipides	8[b]	4,1	11
Métabolites	< 1	28[c]	< 9

La composition prise en compte est celle générale d'*E. coli*

[a] (Elser et al., 2000a) ; [b] (Ames, 1968) ; [c] (Franklin et al., 2011)

D'après les estimations réalisées, les pools de phosphore majoritaires seraient ceux de l'ARN, de l'ADN et des phospholipides, comme identifiés par Ehlers et al. (2010). De plus, les protéines, représentant plus de la moitié de la masse cellulaire, et les métabolites très riches en phosphore, peuvent également constituer des pools non négligeables de phosphore.

L'analyse de la stœchiométrie cellulaire en fonction des conditions de croissance est complexe et fait intervenir de nombreux mécanismes. La réponse des bactéries en termes de variations stœchiométriques a longtemps été analysée en termes de ratios intracellulaires (globaux) et non en dissociant différents pools (compartimentation). En effet, le pourcentage massique élevé de phosphore dans les acides nucléiques (9%), ainsi qu'une variation importante du taux d'ARN, induit une importante variation du taux de phosphore intracellulaire selon le taux de croissance (GRH).

Document confidentiel

V.3. Limitation phosphore et réponses intracellulaires

Les stratégies utilisées par les bactéries capables de s'adapter à la limitation phosphore comprennent : l'augmentation de la solubilité des composés contenant du phosphore et leur entrée et consommation facilitée, mais aussi la capacité à synthétiser des biomolécules avec moins de phosphore.

V.3.a *Concentration en phosphore extracellulaire et régulon pho*

L'assimilation du phosphore peut être faite au travers de différents composés, et se caractérise par un processus en deux étapes : le transport des composés phosphorés à travers la cellule et l'incorporation de phosphore à l'ATP (Vershinina et Znamenskaya, 2002).

La source de phosphore la plus commune est le phosphore inorganique (P_i), dont l'entrée dans la cellule est assurée par différents systèmes de transport en fonction de la concentration dans le milieu. Lorsque le P_i extracellulaire est en excès, le Pit (système de transport du phosphore inorganique) prend en charge le P_i, alors que dans des conditions limitantes en P_i extracellulaire, le Pts (système de transport spécifique de phosphate) prend le relais.

La Figure 10 représente la régulation de l'expression de l'opéron *pho* chez *E. coli.* Les gènes *pho* sont régulés par un système de transduction de signal, formé de deux protéines. Chez les bactéries Gram-, cette paire de protéines est PhoB-PhoR, alors que pour les Gram+ c'est PhoP-PhoR.

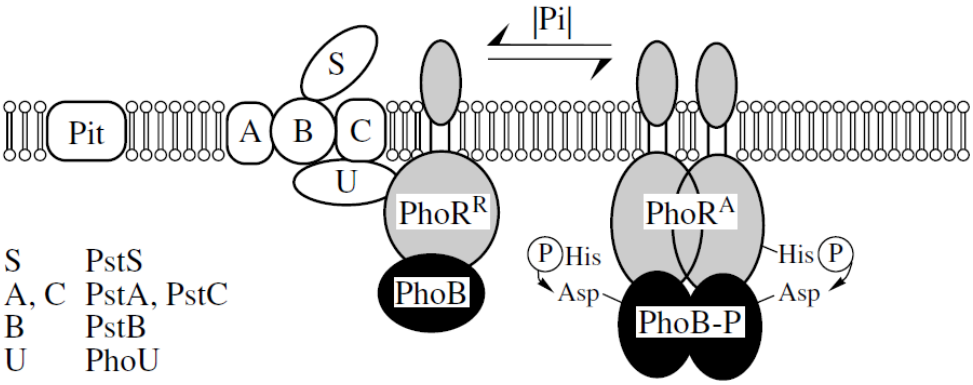

Figure 10 : Régulation de l'expression de l'opéron *pho* chez *E. coli* (Vershinina et Znamenskaya, 2002)

Les protéines PhoB et PhoR sont des régulateurs de transcription et se lient aux promoteurs des gènes *pho* pour les activer (gènes *psi*) ou les inhiber. PhoR est une histidine kinase sensible à la concentration du phosphore dans le milieu extracellulaire et qui en réponse, phosphoryle ou déphosphoryle le régulateur transcriptionnel, sachant que c'est la forme phosphorylée (PhoB~P) qui est active.

PhoR a un double rôle, assurer la transduction du signal et interagir avec PhoU. De plus, c'est une protéine transmembranaire, dont la majeure partie est exposée côté cytoplasmique, et une partie plus petite, côté périplasmique. Deux formes existent, $PhoR^R$ le répresseur et $PhoR^A$ l'activateur du régulateur

PhoB : (1) En excès de P_i, la protéine PtsS est saturée, ce qui perturbe le système Pts et permet à PhoR (via PhoU) d'adopter sa conformation de répresseur en formant un complexe avec les protéines du système Pts. L'expression des gènes du régulon Pho est réprimée. (2) En limitation de P_i, PstS n'est plus saturé, le système Pst reprend une configuration « normale » et PhoR adopte spontanément sa forme d'activateur. Ce système de régulation a pu être trouvé chez les bactéries Gram + et -, chez les levures, les cyanobactéries et les *Archaea*, et est donc considéré comme universel.

Une carence en phosphate induit un ensemble de gènes, les gènes *psi*. Ils font partie du régulon Pho et sont soumis au même contrôle physiologique et génétique. Ainsi, pour certaines bactéries :

- les phospholipides membranaires peuvent être partiellement remplacés par des lipides ne contenant pas de phosphore (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas fluorescens* et *Rhodobacter sphaeroides,* (Zavaleta-Pastor et al., 2010). Ce régulon est aussi responsable de l'induction de l'opéron *tua*ABCDEFGH qui code pour les enzymes nécessaires au remplacement de l'acide teichoïque (contenant du phosphate) des parois cellulaires par l'acide teichuronique, sans phosphate. Les opérons *tag*AB et *tag*DEF, responsables de la synthèse de l'acide teichoïque, sont eux réprimés (Hoi et al., 2006).
- de nouvelles sources de phosphore peuvent être utilisées, telles des sources organiques comme les glycérophosphodiesters ou des phosphonates. Les gènes codant pour les protéines nécessaires au transport de tels composés sont regroupés au sein d'opérons dont le(s) promoteur(s) sont sous le contrôle de PhoB.
- des enzymes bactériennes peuvent permettre la minéralisation de phosphore organique. C'est-à-dire qu'en cas de présence de matière organique (débris cellulaires), des phosphatases vont hydrolyser les esters de phosphates et générer des phosphates inorganiques (Larpent et Champiat, 1988).

Les promoteurs des gènes *pho* possèdent une séquence conservée en position -10, qui est nécessaire pour la fixation de la sous-unité σ^{70} de l'ARN polymérase, mais ne possèdent pas de telles séquences en position -35. Par contre, ils possèdent la *pho* box qui se situe 10 nucléotides en amont de la région -10 et qui est une séquence répétée de 7 nucléotides. La protéine PhoB phosphorylée interagit avec cette séquence et initie la transcription. Certains promoteurs, (*pst* et *ugp*) possèdent différentes *pho* box et leur niveau d'expression est maximal lorsque le régulateur interagit avec toutes. PhoB~P induit l'expression des gènes en augmentant l'affinité de l'ARN polymérase pour le promoteur.

Ainsi, la mise en place du régulon Pho peut permettre l'adaptation des microorganismes à des conditions de limitation en phosphore par le jeu d'un ensemble de régulation très abouties (Marzan et Shimizu, 2011; Vershinina et Znamenskaya, 2002). De nouvelles sources de phosphore peuvent être métabolisées,

Document confidentiel

et la structure de la membrane peut être modifiée de manière à privilégier la croissance cellulaire. Ces options offrent une certaine flexibilité et plasticité du phosphore intracellulaire selon les conditions opératoires et selon les populations microbiennes.

V.3.b *Les pools des molécules phosphorées en limitation phosphore*

Selon la composition de l'alimentation (limitation carbonée à phosphorée), la stœchiométrie d'une seule et même espèce microbienne peut varier de plus de 50% (Løvdal et al., 2008). Par exemple, il a été montré que la stœchiométrie de *Pseudomonas fluorescens* est différente selon le taux de dilution en chémostat (Chrzanowski et Grover, 2008).

Il semble tout de même intéressant de remarquer que pour les auteurs, les bactéries présentes en milieu naturel, souvent soumises à une limitation en phosphore, semblent capables d'importantes variabilités en termes de stœchiométrie pour le phosphore. Ceci a été montré dans le Tableau 8 avec les bactéries marines et d'eau douces qui présentent les plus grandes variations intracellulaires de phosphore (0,3 à 4,2%).

Selon la répartition des molécules phosphorées proposée par Fuhs (1969) et décrites précédemment, en limitation phosphore, la fraction de phosphore stockée serait consommée prioritairement, avant d'attaquer la fraction assurant les fonctions cellulaires et enfin celles de structures (Figure 11).

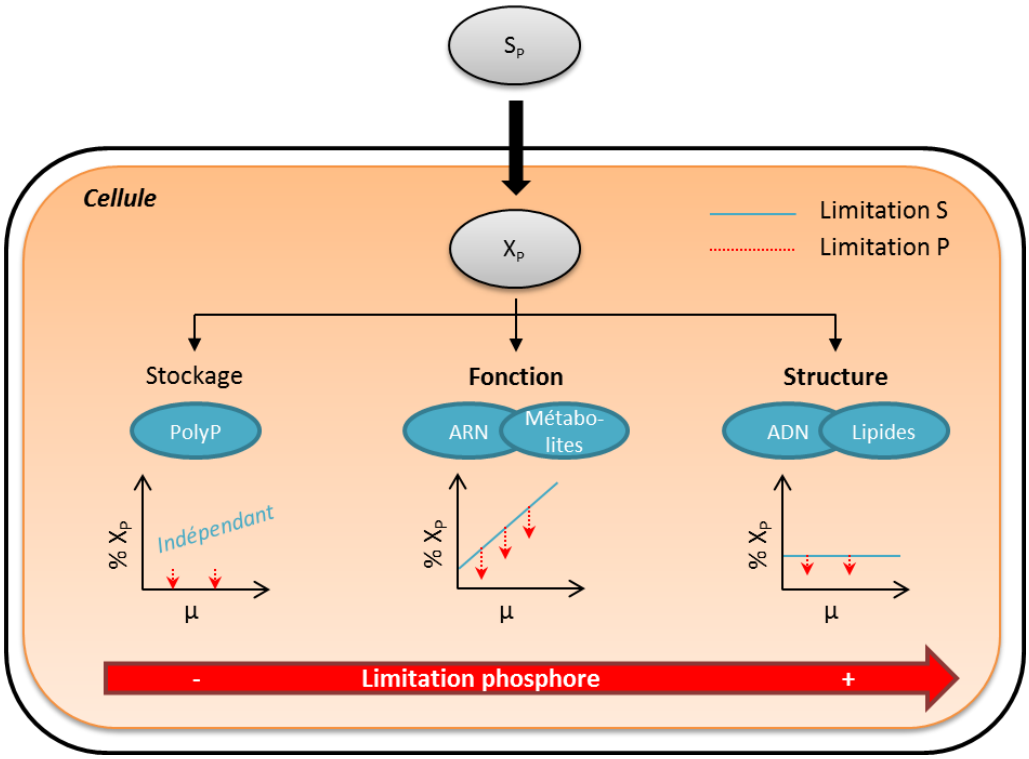

Figure 11 : Répartition des molécules phosphorées en 3 fractions et diminution du contenu phosphoré de chacune en fonction de la limitation phosphore selon Fush (1969)

L'hypothèse de compartimentation de la biomasse selon Franklin permet de modéliser l'hypothèse du taux de croissance en limitation de phosphore et vient appuyer l'importance du pool de phosphore contenu dans l'ARN (ARN-P) dans la cellule (Elser et al., 2000a). Le pool d'ARN-P deviendrait majoritaire en situation de limitation par le phosphore pour assurer la croissance cellulaire. Ainsi, l'ARN-P pourrait constituer 70 à 90% du phosphore cellulaire total en culture continue limitée par le phosphore alors qu'il constituerait 25 à 43% en culture non limitée (Makino et Cotner, 2004). En condition de forte limitation phosphore, seules les molécules phosphorées contenant l'ADN, les protéines sont nécessaires afin d'assurer une activité basale microbienne (Bertilsson et al., 2003), plus exactement la structure de la cellule (Figure 11). Une étude de Raven (2013) montre que la limitation phosphore a un effet variable selon le microorganisme sur la fraction d'ARN essentiellement, suggérant qu'il y a une variation génétique dans la façon dont la répartition du phosphore répond à une limitation nutritionnelle.

V.4. Les modèles définissant le phosphore intracellulaire

Les modèles cinétiques de la croissance microbienne limitée par le substrat, où celle-ci est directement liée à la concentration de substrat extracellulaire, tels que le modèle Monod, ne sont pas applicables à des substrats « conservés ». Quand un substrat « conservé » est limitant, tel que le phosphore, il n'existe pas de relation simple entre l'absorption du substrat et la croissance cellulaire. Le taux de croissance est ici contrôlé par la quantité de substrat intracellulaire, qui peut varier considérablement entre un taux de phosphore minimal assurant la croissance cellulaire (P_{in_crit}) et le taux de phosphore maximal nécessaire pour assurer une croissance exponentielle (P_{in_exp}). Ce type de modèle a été principalement développé sur les algues et les phytoplanctons (Flynn, 2002; Legović et Cruzado, 1997; Ross et Geider, 2009; Vadstein, 1998). Le Tableau 11 présente l'expression de la vitesse spécifique de croissance selon les modèles cinétiques.

Tableau 11 : Expression des vitesses spécifiques de croissance dans les modèles linéaires et non linéaires, pour un substrat conservé

Modèles cinétiques	Expressions	Références
Linéaire	$\mu_{max} \times \frac{P_{in} - P_{in_crit}}{P_{in_exp} - P_{in_crit}}$	Geider et al., 1998; Moore et al., 2001
Non linéaire	$\mu_{max} \times \frac{1 - \frac{P_{in_crit}}{P_{in}}}{1 - \frac{P_{in_crit}}{P_{in_exp}}}$	Droop, 1968
	$\mu'_{max} \times \frac{P_{in} - P_{in_crit}}{\left(P_{in} - P_{in_crit}\right) + K_q}$	Caperon et Meyer, 1972
	$\mu_{max} \times \frac{(1 + KQ) \times (P_{in} - P_{in_crit})}{\left(P_{in} - P_{in_crit}\right) + KQ \times (P_{in_exp} - P_{in_crit})}$	Flynn, 2002

Document confidentiel

La forme de la courbe du quota intracellulaire de l'élément limitant et le taux de croissance du microorganisme (μ) varie entre une allure linéaire et fortement hyperbolique, en fonction de l'élément limitant et du microorganisme (Flynn, 2008). Ainsi, les principaux modèles qui permettent de représenter la limitation de la croissance cellulaire par le P_{in} sont le modèle linéaire (Geider et al., 1998; Moore et al., 2001) et les modèle non linéaires (Caperon et Meyer, 1972; Droop, 1968). Flynn (2002) introduit dans le modèle de Caperon et Meyer un paramètre permettant de représenter ces deux types de modèles.

Les paramètres P_{in_crit} et P_{in_exp} correspondent aux quotas intracellulaires de phosphore pour lesquels la croissance est nulle et maximale, respectivement. Le paramètre μ_{max} est la vitesse spécifique maximale de croissance. Dans le cas du modèle de Caperon et Meyer (1972), il s'agit d'un paramètre (μ'_{max}) nécessitant une calibration pour chaque type d'élément limitant. Dans ce même modèle, K_q est un paramètre exprimé dans les mêmes unités que P_{in}, et défini l'allure de la courbe. Flynn introduit donc un paramètre KQ, adimensionnel, permettant de représenter :

- le modèle de Droop lorsque $KQ = \frac{P_{in_crit}}{P_{in_exp} - P_{in_crit}}$
- le modèle linéaire lorsque KQ > 5.

La Figure 12 représente la relation entre μ et P_{in} selon le modèle linéaire, de Droop et de Flynn.

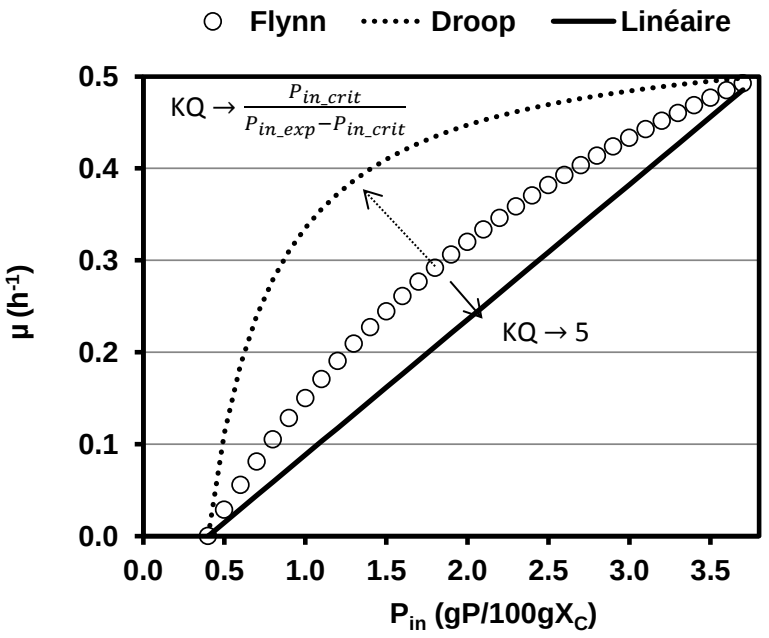

Figure 12 : Représentation des relations entre le taux spécifique de croissance et le Pin selon les modèles cinétiques. Paramètres choisis : μ_{max} = 0,5 h^{-1}, P_{in_exp} = 3,8%, P_{in_crit} = 0,4%, KQ = 1

Ainsi, le paramètre introduit par Flynn (2002) (KQ), permet de représenter différentes relations entre le μ et le P_{in} dans une même équation.

VI. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE, ENJEUX ET DEMARCHE

Cette étude bibliographique a permis de dresser un bilan succinct sur la structure des PHA et leurs propriétés associées. Il en ressort la possibilité d'obtenir une grande variété de motifs d'HydroxyAlcanoates en fonction du type de substrats et des microorganismes utilisés. L'exploitation de cette capacité permet de proposer une large gamme de matières plastiques aux propriétés diverses. L'incorporation de motifs de chaînes plus longues tels que l'HV à l'homopolymère composé d'HB est particulièrement intéressante. Cet aspect qui est relativement bien compris et maitrisé (Grousseau et al., 2014) sera traité comme une perspective d'amélioration de la qualité du biopolymère en vue d'une application industrielle intéressante.

L'enjeu de ce travail de thèse est avant tout d'étudier la production de PHA à partir de sous-produits de l'assainissement. Une étape préalable de traitement de la matière première par fermentation acidogène est nécessaire pour l'obtention de carbone assimilable par les microorganismes. Elle aboutit principalement, à la production d'acides gras volatils précurseurs directs pour la production de PHA. Le choix des substrats étudiés a été restreint à l'acide acétique et butyrique, les plus couramment obtenus après prétraitement des sous-produits organiques issus de l'assainissement. Nous étudierons donc les comportements des populations mixtes de nos cultures sur acide acétique puis sur un mélange acide acétique et butyrique. Nous analyserons l'effet du substrat sur la sélection microbienne et sur le stockage de PHB au travers d'analyses cinétiques et stœchiométriques. La spécificité de ce travail, nous le verrons, résidera dans l'utilisation d'une double limitation carbone et phosphore.

La production de PHA industrielle a été pendant longtemps effectuée uniquement par des cultures pures en raison de la fraction élevée de PHA obtenue, qui est essentiel pour la faisabilité économique. Cependant, les contraintes qu'impose ce type de culture (stérilité, pureté des substrats…) rendent les procédés de production de PHA, économiquement peu compétitifs face aux plastiques conventionnels. Récemment, des teneurs très élevées de PHA (90%) ont été atteintes par des cultures ouvertes via des procédés de type « feast & famine » dans des expériences de laboratoire et très récemment 70% en pilote industriel (Tamis et al., 2014a). Ces contenus en PHA sont comparables à ceux obtenus en cultures pures. Ils représentent une première étape vers la mise en œuvre industrielle de la production de PHA à partir de déchets avec des cultures microbiennes ouvertes.

En culture mixte, l'étape d'enrichissement en microorganismes producteurs est le facteur clé pour produire des PHA à des taux intracellulaires et des rendements élevés. Les microorganismes doivent être sélectionnés et enrichis dans des conditions appropriées, afin de permettre la production performante de PHA. Les procédés d'enrichissement recensés dans la littérature demandent une grande quantité de carbone consommée pour la production de biomasse dans le réacteur d'enrichissement. De plus, les

temps nécessaires pour la sélection microbienne sont souvent longs. L'enjeu est donc d'étudier les possibilités de production de PHA directement à partir de boues activées permettant ainsi de s'affranchir de cette étape couteuse d'enrichissement en microorganismes producteurs. Pour ce faire, deux systèmes sont envisagés dans ce travail : le fed-batch et le chémostat. L'enjeu ici sera d'optimiser la conduite des réacteurs avec pour objectif : (1) la compréhension du comportement de sélection des microorganismes producteurs et du métabolisme de stockage de PHB et (2) la maximisation de la production de PHB. Ces deux points n'ont pas été traités pour des cultures mixtes dans la littérature. Les aspects et la mise en œuvre des cultures ouvertes seront donc étudiés.

La production de PHA est déclenchée par une limitation nutritionnelle. Traditionnellement, la limitation azote est la plus utilisée car plus facile à mettre en place. Les études réalisées sous limitation phosphore, s'intéressent principalement au comportement des microorganismes par les variations des taux de phosphore intracellulaire et aux régulations associées dans certains cas (Chrzanowski et Kyle, 1996; Dicks et Tempest, 1966; Hao et Chang, 1987; Løvdal et al., 2008; Makino et al., 2003; Pengerud et al., 1987; Scott et al., 2012). Néanmoins, par les connaissances acquises en cultures pures, la limitation phosphore permet de maintenir une croissance cellulaire et d'améliorer la production de PHA (Aragao, 1996; Grousseau et al., 2013). En cultures mixtes, aucun travail approfondi n'a été recensé sur les mécanismes de phosphore intracellulaire impliqués dans les processus de stockage de PHB. De plus il est possible, dans les filières de traitement des effluents liquides, de disposer de procédés maîtrisés de déphosphatation physico-chimiques, permettant le contrôle du ratio carbone/phosphore. La limitation phosphore est donc choisie dans cette étude. L'influence du degré de limitation sur la physiologie des microorganismes et sur les cinétiques et rendements de production de PHA sera examinée.

En résumé, les enjeux scientifiques de ce travail sont, à partir de substrats de types AGV :

- Etudier et analyser les mécanismes contrôlant la production de PHB sous limitation de la croissance par le phosphore,
- Etudier les paramètres contrôlant la sélection de microorganismes producteurs selon le procédé et les conditions opératoires,
- Qualifier la sélection microbienne par l'identification de la communauté microbienne et la détermination des paramètres cinétiques.

A l'issu de ce travail de thèse, l'enjeu industriel est d'envisager et d'analyser les procédés de production de PHB en culture non axénique : fiabilité, robustesse et production (productivité et teneurs intracellulaires).

Ainsi pour répondre à ces enjeux, à partir d'un consortium microbien issu de boues activées, la démarche scientifique adoptée est la mise en place de 3 modes de réacteurs : fed-batch, chémostat et batch.

Le fed-batch est avant tout une stratégie de production de PHB en maitrisant les apports de substrats et notamment leur effet inhibiteur. Il peut également servir à sélectionner des populations productrices de PHA sous des conditions de limitation en carbone et phosphore et donc de croissance données.

La culture en chemostat, constitue un outil de choix pour l'étude du comportement microbien selon les conditions environnementales. Nous l'avons donc naturellement utilisée pour analyser l'effet des conditions opératoires (taux de dilution, degré de limitation de la croissance cellulaire par le phosphore et nature de la source de carbone) sur l'assimilation du phosphore, la teneur en phosphore intracellulaire, la production de PHB et les besoins de maintenance cellulaire. C'est également un outil de sélection microbienne imposé par l'effet dilution des microorganismes ayant un taux de croissance inférieur au taux de dilution imposé.

Le mode de culture batch mis en place, est un outil d'étude des réponses cinétiques en dynamique face à un excès de substrat carboné. Chaque culture batch est réalisée à partir d'inoculum issus des consortia microbiens obtenus en chémostat. Le régime dynamique permet d'étudier l'effet de l'état physiologique des microorganismes sur la conversion du carbone et de qualifier la sélection microbienne.

Basé sur l'ensemble des résultats macroscopiques et des modèles cinétiques existants, le développement d'un nouveau modèle cinétique est visé, en considérant la dilution du phosphore intracellulaire et son rôle dans le déclenchement de la production de PHA. L'intérêt de ce modèle est d'étudier et améliorer la compréhension des paramètres cinétiques clefs impliqués dans les processus de production de PHA. De plus, c'est un excellent outil prédictif qui permet d'explorer facilement une large gamme de conditions expérimentales, en vue de déterminer les conditions optimales d'un procédé.

Ainsi, après la présentation des matériels et méthodes utilisés (Partie II), les résultats sont décrits et discutés dans la partie III (Figure 13) selon l'ordre suivant. Le **chapitre 1** présente **l'ensemble des cultures réalisées en réacteurs fed-batch, chémostat et batch** et expose les **résultats macroscopiques obtenus**. Le but est de décrire les résultats majeurs des cultures réalisées afin d'amener la discussion des résultats pour tous les chapitres suivants :

Chapitre 2 : Etude des paramètres gouvernant la conversion du carbone sous limitation carbone et/ou phosphore. L'enjeu est de soulever les paramètres gouvernant le devenir du carbone selon les conditions environnementales permettant l'établissement d'un nouveau modèle cinétique.

Chapitre 3 : Etude des paramètres gouvernant le devenir du carbone en culture continue. Dans un premier temps, l'enjeu est de déterminer les paramètres cinétiques des populations sélectionnées par le modèle cinétique et par la suite, d'étudier l'influence des paramètres cinétiques et opératoires selon les conditions environnementales (taux de dilution, degré de limitation phosphore et source de carbone).

Document confidentiel

<u>Chapitre 4 :</u> Etude de la dynamique microbienne et détermination des paramètres influant la sélection de microorganismes producteurs de PHA. L'objectif est de montrer les dynamiques des populations selon les conditions opératoires et de mettre en évidence les paramètres opératoires gouvernant la sélection microbienne de populations productrices de PHA.

<u>Chapitre 5 :</u> Evaluation du potentiel de production de PHA au sein d'une filière industrielle. L'enjeu de ce chapitre est d'étudier et de discuter de l'ensemble des configurations de procédés de production de PHA envisageables sous contraintes industrielles, au vu de nos résultats obtenus puis de les comparer aux modes existants.

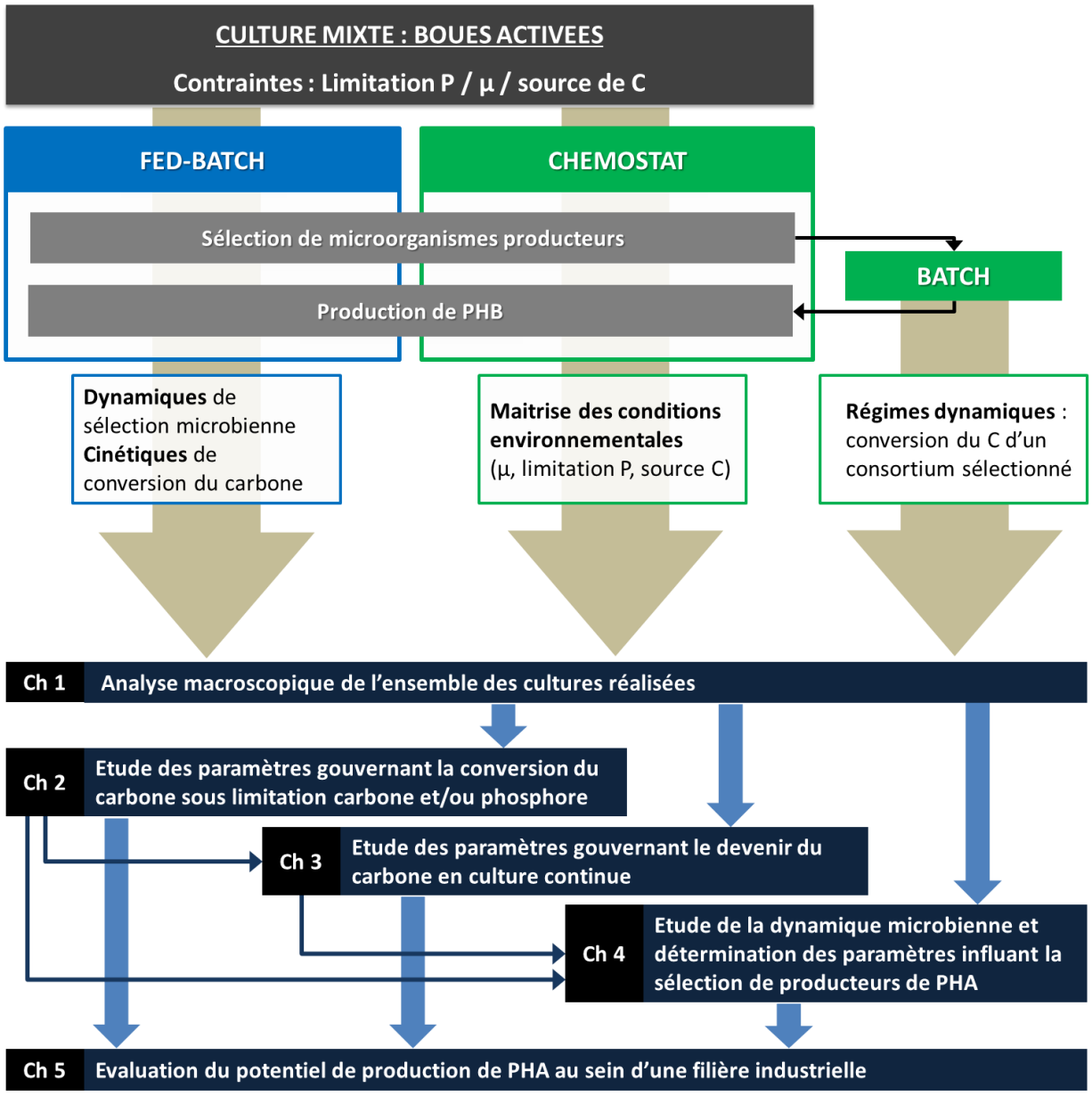

Figure 13 : Démarche expérimentale, des conduites des cultures et de l'organisation des chapitres

PARTIE II. Matériels et méthodes

I. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Pour ce travail, 3 modes de cultures ont été utilisés : **fed-batch**, **chémostat** et **batch**. A partir de boues activées de STEP, 2 modes de culture servant à la fois pour l'étude de la sélection de microorganismes producteurs et de la production de PHB ont été mis en place : fed-batch et chémostat. Quatre expérimentations en mode fed-batch (cultures nommées FB) ainsi que 13 expérimentations en mode chémostat (Cultures nommées A ou B selon la source de carbone utilisée) ont été réalisées. A partir des sélections microbiennes obtenues au cours des réacteurs chémostat, des cultures en batch ont été effectuées pour qualifier les performances des populations sélectionnées en étudiant leurs réponses cinétiques en dynamique face à un excès de carbone.

I.1. Les consortia microbiens

Pour l'ensemble des expérimentations menées, les boues activées ont été issues de 4 STEP différentes : M (France), T (France), C (France) et B (Belgique). Le Tableau 12 récapitule les consortia microbiens utilisés comme inoculum pour chaque expérimentation.

Tableau 12 : Consortia microbiens utilisés pour les expérimentations fed-batch et chémostat

STEP	Fed-Batch	Chemostat
M	FB1 et FB2	-
T	FB3	A6 et A7
C	FB4	-
B	-	A1 à A5 A8 et A9 B1 à B4

Tous les consortia utilisés sont issus de STEP traitant des eaux usées urbaines classiques. La STEP M traite actuellement 6 300 m^3/jour d'eaux usées urbaines. Sa configuration est proche d'un procédé Ludzack-Ettinger modifié. Les STEP T, C et B traitent respectivement 114 000, 34 400 et 275 000 m^3/jour d'eaux usées urbaines. Ces trois STEP sont des stations biologiques à boues activées dites « Forte charge » dans lesquelles un traitement physico-chimique particulier est mis en place pour l'azote et / ou le phosphore.

Pour les 4 cultures fed-batch, 3 boues activées ont été prélevées dans des STEP différentes de France. Pour FB1 et FB2, la boue a été prélevée dans la STEP M à deux périodes différentes de l'année. Pour FB2 et FB3, la boue a été prélevée dans les STEP T et C, respectivement. Avant de lancer les expérimentations, les boues ont été tamisées à 400 µm puis lavées 3 fois par centrifugation afin d'éliminer le P soluble dans le surnageant. En effet, après chaque centrifugation de 15 min à 4100 g, le culot récupéré a été remis en suspension dans un même volume d'eau physiologique (0,9% NaCl).

Pour les cultures en chemostat A6 et A7, le consortium utilisé est un inoculum issu de la boue activée de la STEP T et traité comme décrit précédemment. Celui-ci a alors été homogénéisé durant 15 min pour solubiliser le maximum de P dans le surnageant. Pour toutes les autres cultures en chémostat, les expérimentations ont été inoculées avec une boue activée de la STEP B, qui a été concentrée, centrifugée, aliquotée et finalement congelée à l'azote liquide pour enfin être conservée à -20°C. Avant de lancer les expérimentations, la boue est décongelée pendant 15 h à 4°C, puis le protocole de lavage évoqué précédemment est mis en place afin d'éliminer les résidus dans le surnageant tels que les débris cellulaires et le P soluble. Enfin, afin de réactiver les cellules, un fed-batch de 4 heures, avec de l'extrait de levure, est réalisé. Les consortia microbiens de chaque culture ont ensuite été inoculés à une concentration initiale d'approximativement 1 g/L de MVS. L'inoculum utilisé pour les cultures batch correspond à la communauté microbienne sélectionnée au cours du chémostat correspondant.

I.2. Les milieux de culture

Pour les cultures fed-batch, les solutions de substrat carboné (acide acétique) et de phosphore sont apportées séparément de manière à pouvoir contrôler le ratio C/P apporté. De plus, les solutions utilisées sont concentrées afin de ne pas faire varier significativement les volumes des réacteurs à chaque pulse (Tableau 13). Les sels et les oligoéléments sont apportés initialement puis régulièrement en s'assurant que seul le phosphore est l'élément limitant (Tableau 14).

Tableau 13 : Solutions concentrées de carbone et de phosphore pour les cultures fed-batch

Solution concentrée		Composé	Concentration (g/L)
Acide acétique		$C_2H_4O_2$	161
Phosphore	Di-hydrogénophosphate de potassium	KH_2PO_4	12
	Hydrogénophosphate de sodium	Na_2HPO_4, 12 H_2O	180

Tableau 14 : Solutions concentrées de sels et d'oligo-éléments pour les cultures fed-batch

Composés		Concentration
Oligo-éléments	H_3BO_3	6 mg/L
	$CoCl_2$, 6 H_2O	4 mg/L
	$ZnSO_4$, 7 H_2O	2 mg/L
	Mn_2Cl_2, 4 H_2O	0,6 mg/L
	Na_2MoO_4, 2 H_2O	0,6 mg/L
	$CuSO_4$, 5 H_2O	0,4 mg/L
	$NiCl_2$, 6 H_2O	0,2 mg/L
Sulfate d'ammonium	$(NH4)_2SO_4$	100 g/L
Ferrique ammonium citrate	$C_6H_8O_7FeNH_3$	1,2 g/L
Sulfate de magnésium	$MgSO_4$, 7 H_2O	10 g/L
Chlorure de calcium	CaCl	0,2 g/L

Document confidentiel

Pour les cultures chémostat, les réacteurs sont alimentés en continu avec une alimentation principale contenant la source de carbone, les sels minéraux ainsi que les oligo-éléments et une alimentation contenant le phosphore. Le Tableau 15 présente la composition des solutions d'alimentation utilisées pour les cultures. La solution de phosphore utilisée a été élaborée de la même façon que pour les cultures fed-batch (comme décrit dans le Tableau 13).

Tableau 15 : Composition des milieux d'alimentation des chémostats

	Solution	Concentration finale
Alimentation Principale	Acide acétique	3,5 g/L[1]
	Acide acétique/butyrique	30/70[2] soit 1,05/1,8 g/L[2]
	$C_6H_8O_7FeNH_3$	25 mg/L
	$MgSO_4$, 1 H_2O	50 mg/L
	KCl	17,5 g/L
	H_2SO_4 96%	0,035 mL/L
	H_3BO_3	0,03 mg/L
	$CoCl_2$, 6 H_2O	0,021 mg/L
	$ZnSO_4$, 7 H_2O	0,011 mg/L
	Mn_2Cl_2, 4 H_2O	0,004 mg/L
	Na_2MoO_4, 2 H_2O	0,003 mg/L
	$CuSO_4$, 5 H_2O	0,002 mg/L
	$NiCl_2$, 6 H_2O	0,001 mg/L
	NH_4OH 28%	1,4 mL/L
Elément limitant	Phosphore[3]	Selon la limitation imposée

[1] Cultures A1 à A9.
[2] Cultures B1 et B4, le ratio entre l'acide acétique et butyrique est exprimé en pourcentage Cmol.
[3] Comme décrit dans le Tableau 13.

Au démarrage de chaque expérimentation, de l'allylthiourée (20 mg/L) a été ajouté pour rapidement inhiber toute réaction de nitrification et ainsi lessiver les bactéries nitrifiantes.

Concernant les cultures en batch, l'inoculum issu des réacteurs chémostats, contient donc tous les sels nécessaires en excès pour les bactéries. Ainsi pour les études menées en condition de production de PHB (carence de P), uniquement des pulses de carbone sont ajoutés et pour des études en conditions de croissance cellulaire, des pulses de carbone et de phosphore sont effectués. La source de carbone est la même que celle utilisée lors de la sélection microbienne.

I.3. Les réacteurs

Les réacteurs utilisés pour toutes les expériences sont des réacteurs ouverts, agités et aérés. L'agitation est réalisée par un axe vertical muni de deux turbines Rushton au 1/3 et 2/3 de la hauteur de l'axe. Le réacteur est surmonté d'un condenseur pour éviter les pertes par évaporation (AGV et eau). La température a été régulée à 25°C par une double enveloppe. Dans les expérimentations en chémostat et

batch, le pH a été régulé par ajout de solutions basiques et acides (respectivement KOH 1M et HCl 1M), de manière à être compris entre 7,25 et 7,8. Pour les expérimentations menées en réacteur fed-batch, la régulation du pH est faite par le biais des pulses de substrats. Un logiciel d'acquisition permet le suivi en ligne de la température, du pH, de l'oxygène dissous et de sa consommation. La Figure 14 représente un schéma des réacteurs fed-batch et batch (A) et chémostat (B) utilisés lors des expérimentations.

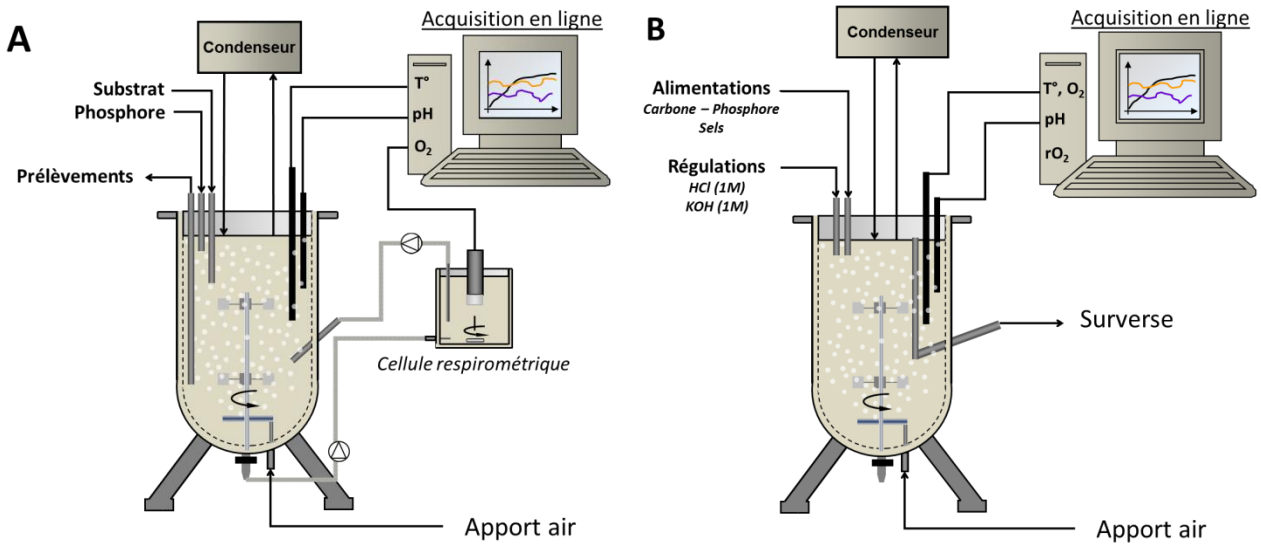

Figure 14 : Schéma des réacteurs fed-batch et batch (A) et chemostat (B)

Pour les cultures fed-batch, les volumes utiles initiaux des réacteurs sont 8 L pour FB1, 9 L pour FB2 et 6,5 L pour FB3 et FB4. La détermination de la consommation d'oxygène est réalisée par une cellule respirométrique (300 mL) connectée aux réacteurs équipée uniquement d'une sonde d'oxygène. Cette cellule permet d'effectuer des cycles de mesure de la vitesse de consommation d'oxygène tout en conservant un apport d'air continu au niveau réacteur. Séquentiellement une recirculation entre la cellule et le réacteur via une pompe péristaltique permet de renouveler le milieu de la cellule. Entre chaque recirculation, la cellule est un réacteur fermé et permet d'acquérir la concentration d'oxygène dissous au cours du temps. La vitesse de consommation d'oxygène ($r_{O2} = -\frac{dO_2}{dt}$) est déterminée après un temps de temporisation ainsi qu'une valeur seuil minimale fixée assurant le calcul pendant une décroissance linéaire.

Pour toutes les cultures chémostat, les volumes des réacteurs sont 6 L. La détermination de la vitesse de consommation de l'oxygène (r_{O2}) est réalisée directement dans le réacteur de manière séquentielle via le logiciel d'acquisition. Une valeur seuil maximale de l'oxygène dissous dans le réacteur est fixée permettant de couper l'aération et de calculer la vitesse de consommation d'oxygène. Le principe de calcul de la mesure est le même que celui de la cellule respirométrique. Lors de l'arrêt de l'aération,

Document confidentiel

l'aération de surface persiste et biaise le calcul du r_{O2}. Le k_La de surface étant bien inférieur au k_La au sein du réacteur, cette mesure reste représentative de l'activité microbienne en temps réel. Néanmoins, pour l'analyse des résultats, les r_{O2} sont recalculés en tenant compte de l'aération de surface (déterminée avec de l'eau au préalable).

Concernant les cultures batch, le volume des réacteurs est 2,5 L. La configuration est exactement la même que les réacteurs fed-batch, avec une cellule respirométrique externe.

I.4. Stratégie de production de PHA

Pour l'ensemble des cultures, la source de carbone utilisée est l'acide acétique et l'élément limitant est le P. De plus, en travaillant dans des conditions aérobies avec comme source de carbone l'acide acétique et butyrique, seul le polymère HB est visé.

Concernant les cultures fed-batch, différentes phases ont été appliquées tout au long des expérimentations. Après l'inoculation avec la boue activée, une première phase d'environ 10 h consistant à réaliser uniquement des pulses d'AA afin de désorber et consommer le P adsorbé aux cellules. Ensuite, la deuxième phase consiste à appliquer un ratio $(C/P)_{app}$ par pulses de solutions concentrées de P et C. Les pulses sont effectués suivant les paramètres pH et r_{O2}. Lorsque le pH atteint la valeur haute de 7,8 ou lorsqu'une chute significative du r_{O2} est constatée, un faible volume d'AA et de P est ajouté selon le $(C/P)_{app}$ désiré. Cependant, si une accumulation d'AA est observée dans le surnageant, aucun pulse supplémentaire n'est effectué jusqu'à ce que la concentration d'AA atteigne une valeur inférieure à 50 mg/L. Par conséquent, il est très important de différencier le $(C/P)_{app}$ du ratio consommé par les bactéries $(C/P)_{cons}$. Les différents $(C/P)_{app}$ pour les 4 cultures fed-batch sont récapitulés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Récapitulatif des conditions expérimentales imposées pour les cultures fed-batch

STEP	Culture	$(C/P)_{app}$ (Cmol/Pmol)
M	FB1	962 et 1961
	FB2	962 et 3226
T	FB3	Carence et 1961
C	FB4	Carence et 1961

Pour les cultures chémostat, les volumes et débits sont fixes et imposent le taux de dilution. Les conditions expérimentales des cultures diffèrent par le degré de limitation P, par la source de carbone et par le taux de dilution (D). Ce dernier est notamment à l'origine du lessivage des populations non-performantes et permet ainsi d'amener à une sélection microbienne.

Les expérimentations ont ainsi été menées comme présenté dans la Figure 15, en augmentant progressivement la limitation appliquée au cours du temps. Chaque changement de limitation P a été effectué après l'obtention d'un régime pseudo-stabilisé (paramètres stables obtenus au-delà de 5 TSH).

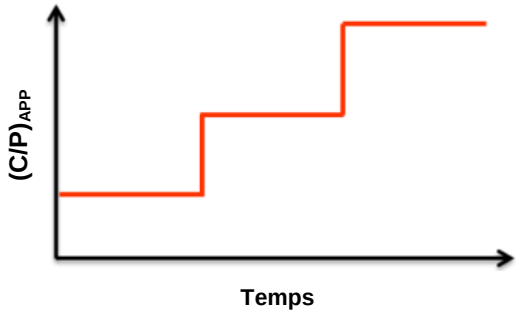

Figure 15 : Stratégie de degré de limitation en phosphore imposée au cours des expérimentations chémostat

Cette stratégie a permis à la fois l'étude des dynamiques de sélections ainsi que du devenir du carbone pour des populations sélectionnées et productrice de PHB (le cas échéant).

II. TECHNIQUES ANALYTIQUES

Des échantillonnages sont effectués tout au long des expériences pour suivre les paramètres cinétiques et moléculaires. La fréquence des prélèvements est fonction du mode (fed-batch/chémostat) ainsi que de la période de la culture (régime transitoire/permanent). A chaque prélèvement, des analyses sont effectuées sur l'échantillon total, sur le surnageant après centrifugation à 7000 g pendant 30 min et sur ce dernier surnageant, filtré à 0,45 µm. Pour les analyses moléculaires, les prélèvements de 0,5 mL sont congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C, pour une analyse *a posteriori*.

II.1. Mesure des substrats

II.1.a *Dosage des Acides Gras Volatils*

Les acides gras volatils (AGV) ont été dosés par chromatographie phase gazeuse (CPG) sur le surnageant de culture filtré. Le système chromatographique CPG Varian 3900 utilisé est constitué d'un injecteur 1177 split/splitless, d'un four à température programmable, équipé d'une colonne CP-Wax 58 (FFAP) CB, d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les conditions opératoires utilisées sont les suivantes :

- gaz vecteur : azote (débit 25 mL/min).
- température de l'injecteur : 250°C
- température du détecteur : 275°C
- gradient de température du four (colonne) : 90 → 115°C à une vitesse de 30°C/min puis 115 → 130°C à une vitesse de 1,5°C/min et 130 → 230°C à une vitesse de 70°C/min.

Document confidentiel

L'étalon interne utilisé est l'acide éthyl-2-butyrique à 1 $g.L^{-1}$ dans de l'acide orthophosphorique à 5%. Le mélange échantillon/étalon interne est réalisé dans des proportions 2/1. La gamme étalon utilisé est comprise entre 0 et 1 $g.L^{-1}$. Les temps de rétention des composés analysés sont 2,81 min pour l'acide acétique et 7,88 min pour l'acide éthyl-2-butyrique.

II.1.b *Dosage des orthophosphates*

Les orthophosphates sont dosés dans le surnageant de culture filtré, par colorimétrie selon la méthode référencée NFT 90-023. En milieu acide et en présence de molybdate d'ammonium, les orthophosphates donnent un complexe phosphomolybdique qui, réduit par l'acide ascorbique, développe une coloration bleue évaluée par dosage spectrophotométrique. Le développement de la coloration est accéléré par l'utilisation d'un catalyseur, le tartrate double d'antimoine et de potassium. Huit mL d'échantillon sont mélangés à 1,6 mL de réactif (acide sulfurique à 7,5%, molybdate d'ammonium à 6 g/L, tartrate double d'antimoine et de potassium à 0,14g/L) et 0,4 mL d'acide ascorbique à 20 g/L. Après stabilisation de la coloration (30 min), l'absorbance est mesurée à 700 nm. La courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions à partir de solutions de KH_2PO_4 dans la gamme 0 – 1 mg/L.

II.1.c *Dosage de l'azote ammoniacal*

L'azote ammoniacal est dosé dans le surnageant de culture filtré, par la méthode de Nessler référencée NFT 90-015-2. Il s'agit d'une méthode spectrophotométrique : le réactif de Nessler réagit avec les ions NH_4^+ en présence de KOH ou de NaOH (milieu basique); il se forme un composé brun/orangé. La concentration en ions est calculée à partir de la mesure de l'absorbance à 410 nm effectuée avec un spectrophotomètre. Le développement de la coloration est accéléré par l'utilisation d'un catalyseur, le tartrate double de potassium et de sodium. La courbe d'étalonnage est réalisée à partir de solutions de NH_4Cl dans la gamme 0 – 10 mg N-NH_4/L.

II.2. Mesure de la DCO

Le dosage de la demande chimique en oxygène est réalisé sur l'échantillon total, le surnageant non filtré et filtré par la méthode au dichromate de potassium (AFNOR T90-101, 1969). Les matières oxydables dans l'échantillon (2 mL d'échantillon pur ou dilué) sont oxydées par un excès de dichromate de potassium en milieu acide (H_2SO_4) à chaud (2 h à 150°C). L'excès de dichromate de potassium résiduel est dosé par une solution de sel de Mohr en présence d'un indicateur coloré (ferroïne). Le dosage de la DCO est réalisée par micro-méthode : kit HANNA Instruments COD reagent LR et MR pour des gammes de DCO de respectivement 0 – 150 mg/L et 0 – 1500 mg/L.

II.3. Mesure de l'azote total

La mesure de l'azote total est effectuée par l'analyseur Shimadzu TOC-V CSN. Elle est effectuée sur l'échantillon total, le surnageant de culture non filtré et filtré. Le gaz porteur (air purifié) est transmis à un débit contrôlé de 150 mL/min à travers un tube de combustion qui est rempli avec un catalyseur de décomposition thermique et chauffé à 720°C. Lorsque le système injecte l'échantillon dans le tube de combustion, l'azote total contenu dans l'échantillon se décompose thermiquement pour créer du monoxyde d'azote. Le gaz porteur portant le monoxyde d'azote à partir du tube de combustion est refroidi et déshumidifié dans le déshumidificateur avant de passer dans un détecteur de chimioluminescence, où le monoxyde d'azote est détecté. Le détecteur de chimioluminescence utilise la chimioluminescence en phase gazeuse du monoxyde d'azote et l'ozone, de telle sorte que le signal analogique du monoxyde d'azote forme un pic détectable. La confrontation de l'air du signal obtenu est réalisée avec une courbe de calibration réalisée à partir de solutions de KNO_3 (0 – 200 mgN/L), pour ainsi déterminer la concentration de l'azote total de l'échantillon.

II.4. Extraction et dosage du PHB

Les PHA sont extraits et dosés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) suivant une méthode de butanolyse adaptée du protocole proposée par Werker et al., (2008). Un volume suffisant de milieu de culture est séché à 70°C pendant 48 h ou 72 h dans un tube en pyrex. Ensuite, un volume de 0,5 mL d'HCl à 37%, de 1,5 mL de butanol et de 0,05 mL d'acide benzoïque (à 20 g/L dans du butanol) sont ajoutés. Les tubes sont placés dans un minéralisateur sec chauffé à 100°C pendant 8 h. Après refroidissement, un volume de 2,5 mL d'hexane et de 4 mL d'eau ultrapure sont ajoutés. Le contenu de chaque tube est homogénéisé pendant 30 s. La phase aqueuse (phase inférieure) est retirée puis jetée. L'ajout d'eau ultrapure suivi de l'étape d'homogénéisation est répété. La phase organique est prélevée puis analysée par CPG. Une gamme étalon (0 à 15 mg) est préparée dans les mêmes conditions que les échantillons. L'appareillage utilisé est une CPG de modèle Varian 430 qui est composé d'un injecteur 1177 split/splitless, d'un four à température programmable équipé d'une colonne Stabilwax-DA (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm), d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les conditions opératoires utilisées sont :

- gaz vecteur : azote (1,1 mL/min)
- température de l'injecteur : 250°C
- température du détecteur : 300°C
- gradient de température dans le four (colonne) : 70°C pendant 3 minutes ; augmentation jusqu'à 230°C avec une vitesse de 5°C/min ; maintien de la température à 230°C pendant 5 minutes.

Les temps de rétention sont respectivement de 22,25 min et 26 min pour le PHB et l'étalon interne.

Document confidentiel

II.5. Visualisation des cellules

Afin de visualiser les microorganismes, des observations sont réalisées au microscope optique à contraste de phase à l'objectif x100 sous immersion d'huile :

- Sur des suspensions fraîches (états frais)
- Après une méthode spécifique de coloration des granules de PHA

La coloration des granules de PHA est réalisée par un colorant : le noir de Soudan**.** La méthode de coloration a été adaptée à partir du protocole décrit par Pandolfi et al., (2007). Premièrement, une goutte de suspension bactérienne est étalée puis séchée à température ambiante sur une lame. Une solution de noir de Soudan (0,3 g/L à 70% (v/v) d'éthanol) est déposée pendant 10 min sur la totalité de la lame. Après avoir enlevé l'excès de solution, la lame est rincée dans une solution d'éthanol à 70% puis séchée à température ambiante. Enfin, une solution de safranine est déposée et laissée en contact avec la lame pendant 10 s. L'échantillon est finalement rincé abondamment avec de l'eau distillée, séché et observé au microscope. Les granules de PHA sont colorées en bleu/noir et le cytoplasme des cellules en rose.

II.6. Approche moléculaire

Une analyse moléculaire permettra l'évaluation qualitative de la diversité microbienne grâce à l'utilisation d'outils moléculaires spécifiques. Au cours des différentes cultures, la diversité microbienne a été évaluée en ciblant le gène universel codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal (*ADNr16S*). Ce gène permettra donc de cibler la totalité de la population bactérienne. De plus, il a l'avantage de porter à la fois des régions universelles et spécifiques : une séquence conservée chez tous les procaryotes permet de cibler la communauté bactérienne totale alors que les régions variables permettent de différentier les différentes populations présentes. Dans le cas des cultures fed-batch, l'étude de la diversité est réalisée à partir des transcrit de ce gène (l'ARNr) par pyroséquançage 454 GS FLX tandis que pour les cultures chemostat, seuls les ADNr 16S sont analysés, par la technique de séquençage Illumina MiSeq effectué à la plate-forme génomique et transcriptomique de l'INRA (Auzeville, France).

II.6.a *Extraction et purification des acides nucléiques*

La lyse cellulaire est réalisée par l'instrument FastPrep (2 x 30 secondes à 4 ms^{-1}). Le kit « PowerMicrobiome RNA Isolation Kit »(MoBio) est utilisé selon les instructions et permet de co-extraire les ADN et les ARN. Par la suite, la purification des ADN/ARN est réalisée via le kit « AllPrep DNA/RNA mini kit » (QIAGEN) suivant les instructions du fabricant. La qualité et la quantité des extraits d'ADN et d'ARN sont déterminées par électrophorèse en gel d'agarose ainsi que par le spectrophotomètre NanoDrop 1000 (Thermo scientific).

II.6.b *Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)*

Dans le cas des cultures fed-batch, les ARN ont été rétrotranscrits en ADNc à l'aide d'amorces aléatoires (Roche). Une étape de dénaturation des ARN et des oligo-hexamères a été réalisée dans un volume de 10 µL contenant 50 µM d'hexamères et 20 ng d'ARN (mix 1). Cette étape s'est déroulée à 65°C pendant 3 min. Les échantillons ont ensuite été placés dans la glace avant l'étape de transcription reverse. Pour cela, une solution de tampon 1X, 2,5 mM de chaque désoxynucléotide (dNTP) et la reverse transcriptase sont ajoutés, dans un volume de 15 µl (mix 2). Les 2 mix ont été mélangés et mis à incuber 2 h à 42°C avant d'être transféré dans la glace.

II.6.c *Amplification par PCR*

- Pyroséquençage 454

Le suivi de l'évolution de la diversité microbienne en réacteur fed-batch, a été réalisé par pyroséquençage 454. Des échantillons prélevés à 0, 23, 38, 50 et 71 heures pour FB3 et 0, 23, 50 heures pour FB4 ont été traités chacun avec un tag (index) différent permettant d'identifier leurs séquences. Les amorces utilisées pour le pyroséquençage ont été le 27F (5'-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et le 519R (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3') encadrant les régions V1-V3 des ARNr 16S (Kumar et al., 2011). Une seule étape de PCR de 30 cycles a été mise en place, avec le kit HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA), sous les conditions suivantes : 3 minutes à 94°C suivi de 28 cycles de 30 secondes à 94°C ; 40 secondes à 53°C puis 1 minute à 72°C ; après cela une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 minutes a été réalisée. Ce programme a été réalisé avec un thermocycleur Eppendorf Mastercycler pro S. La taille du fragment est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose (2% dans du TBE 1X).

Après la PCR, tous les produits de l'amplification des différents échantillons ont été purifiés puis mélangés à de concentrations équimolaires. Le pyroséquençage a été réalisé sur le système 454 GS FLX conformément aux instructions du fabricant (Roche). Les amorces, les courtes séquences (< 200 pb) avec des bases ambigües ou encore les séquences avec des homopolymères de plus de 6 pb ont été enlevées des séquences obtenues.

- Séquençage Illumina MiSeq

Le suivi de l'évolution de la diversité microbienne dans les réacteurs chémostat, a été réalisé par séquençage Illumina MiSeq effectué à la plate-forme de génomique et transcriptomique à l'INRA (Auzeville, France). Le séquençage Illumina a été préférée par la suite car elle permet d'obtenir un plus grand nombre de séquences, de meilleure qualité et à moindre coût. À partir d'échantillons d'ADN génomique, 440 pb de la région V3-V4 très variable du gène de l'ADNr 16S ont été amplifiés, en utilisant des amorces bactériennes universelles F343 (5'-CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTACGGRAGG

CAGCAG-3') et R784 (5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT-3'). Une première étape de PCR a été mise en place, sous les conditions suivantes : 1 minute à 94°C suivi de 30 cycles de 60 secondes à 94°C ; 60 secondes à 65°C puis 60 secondes à 72°C ; après cela une étape finale d'élongation à 72°C pendant 10 minutes a été réalisée. Une seconde étape de PCR de 12 cycles avec les amorces FP2 (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC-3') et RP2 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT-3') permet d'ajouter un index propre à chaque échantillon et les adaptateurs de séquençage Illumina.

Les produits de PCR résultants ont été purifiés, chargés sur la cartouche Illumina MiSeq selon les instructions du fabricant et séquencés. La qualité du séquençage a été contrôlée avec l'Illumina Sequencing Analysis Viewer. Les lectures ne répondant pas aux filtres internes du séquenceur Illumina ont été éliminées. Les réactifs de MiSeq v2 permettant de jumeler des lectures de 250 pb, chaque paire de lectures, chevauchantes sur 20 pb, a été rassemblée avec Flash v1.2.6 en une séquence unique de la région V3-V4, de 460 pb environ. Chaque séquence a été affectée à son échantillon original grâce à l'index intégré pendant la 2ème PCR.

II.6.d *Analyse des données de séquençage*

Les séquences ont ensuite été traitées à l'aide d'un pipeline reposant sur les outils proposés par Mothur v 1.33.1 (Schloss et al., 2009). Après avoir passé des filtres qualités, les séquences chimériques ont été retirées en utilisant la fonction Uhime de Mothur. Les unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) ont alors été définies en utilisant toutes les séquences dans le cas du séquençage 454, ou un sous-échantillon aléatoire de 10 000 séquences par échantillon en MiSeq, regroupant les séquences ayant au moins 97% de similarité (ou 3% de divergence, (Dowd et al., 2008a, 2008b, 2011; Edgar, 2010; Eren et al., 2011; Swanson et al., 2011) avec les paramètres par défaut de Mothur. Les OTUs représentant moins de 10 séquences ont été filtrées. L'affiliation taxonomique des OTUs a été réalisée en utilisant l'approche bayésienne naïve implémentée dans Mothur et la banque de référence LTPs115. La taxonomie des OTUs principaux a été vérifiée et affinée en utilisant BLASTn dans une base de données de GenBank. Les tables d'abondances relatives ont été générées par Mothur pour chaque niveau taxonomique.

III. CALCULS OPERATOIRES

III.1. Facteurs de conversion

L'ensemble des résultats est obtenus en gDCO/L. Au cours de ce travail, on raisonnera principalement en Cmol/L et g/L. Afin d'exprimer les paramètres en g, Cmol, des facteurs de conversion ont été appliqués et sont présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Facteurs de conversion appliqués

	gDCO/g	g/Cmol
Acide acétique	1,067	30
Acide butyrique	1,82	22
Biomasse catalytique (X_C)	1,42	25,1
PHB	1,674	21,5

III.2. Détermination de la biomasse totale (PHB + X_C)

La DCO particulaire (DCO_P) est déterminée par différence entre la DCO totale et la DCO soluble filtrée. La concentration en biomasse catalytique (X_c) est déterminée par différence entre la DCO_P et le PHB. Par conséquent, X_c représente la communauté bactérienne totale incluant les microorganismes producteurs et non producteurs de PHA.

La détermination de l'azote particulaire (N_P) contenu dans X_C est la différence entre l'azote total (Shimadzu TOC-V CSN) et l'azote ammoniacal du surnageant de culture. La détermination de X_C est également effectuée en estimant que l'azote particulaire représente 12% de X_C. Cette estimation a donné des valeurs proches comparée à l'estimation via la DCO et le PHB précédemment expliquée. Cela signifie que notre détermination de X_C est plutôt précise et aucun autre métabolite que le PHB n'a été produit. De plus, les bilans DCO ont montré que le PHB était le composé majoritairement stocké.

La teneur intracellulaire en PHB est exprimée en pourcentage Cmol selon l'équation 1.

$$PHB_{in} = \frac{PHB}{PHB+X_C} x100 \qquad \textbf{\textit{Equation 1}}$$

III.3. Etablissement des bilans et calcul des vitesses de réaction

Le bilan matière pour une variable d'état A est calculé à partir de l'équation 2.

$$V\frac{dA}{dt} + A\frac{dV}{dt} = Q_{entrée} \times A_{entrée} - Q_{sortie} \times A_{sortie} + r_A \times V \qquad \textbf{\textit{Equation 2}}$$

Avec :

A : Concentration de la variable d'état dans le réacteur
V : Volume de liquide dans le réacteur
$Q_{entrée}$: Débit d'alimentation
Q_{sortie} : Débit de sous-tirage
r_A : Vitesse de conversion de A (< 0 si A est consommé, > 0 si A est produit)

Document confidentiel

III.3.a *Réacteurs batch*

Le bilan matière pendant le batch est calculé de la manière suivante :

$$V\frac{dA}{dt} + A\frac{dV}{dt} = Q_{entrée} \times A_{entrée} - Q_{sortie} \times A_{sortie} + r_A \times V$$

Le réacteur batch étant un réacteur fermé homogène à volume constant, la vitesse nette de conversion se calcule de la manière suivante : $\frac{dA}{dt} = r_A$ (négative pour une variable consommée et positive pour une variables produite). La vitesse spécifique de conversion de la variable A est calculée en ramenant la vitesse nette de réaction à une unité de biomasse (pour la biomasse, la vitesse spécifique est notée μ) : $q_A = \frac{r_A}{X}$.

III.3.b *Réacteurs fed-batch*

Le bilan matière sur le fed-batch s'écrit de la manière suivante. Dans ce cas, le volume dans le réacteur n'est pas constant :

$$\frac{dAV}{dt} = Q_{entrée} \times A_{entrée} - Q_{sortie} \times A_{sortie} + r_A \times V$$

Pour les variables, le calcul des vitesses est présenté dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Equations pour le calcul des vitesses pour le réacteur fed-batch

Variables d'état	Vitesses nettes de réaction	Vitesses spécifiques de réaction
S_C	$r_{Sc} = \frac{1}{V}\left(Q_{entrée} \times S_{entrée} - \frac{d(V.S_C)}{dt}\right)$	$q_{Sc} = \frac{r_{Sc}}{X_C}$
N	$r_N = \frac{1}{V}\left(Q_{entrée} \times N_{entrée} - \frac{d(V.N)}{dt}\right)$	$q_N = \frac{r_N}{X_C}$
PHB	$r_{PHB} = \frac{1}{V}\left(\frac{d(V.PHB)}{dt}\right)$	$q_{PHB} = \frac{r_{PHB}}{X_C}$
X	$r_{Xc} = \frac{1}{V}\left(\frac{d(V.X_C)}{dt}\right)$	$\mu = \frac{r_{Xc}}{X_C}$

III.3.c *Réacteur chémostat*

Le bilan matière pendant le chémostat est calculé de manière suivante :

$$V\frac{dA}{dt} + A\frac{dV}{dt} = Q_{entrée} \times A_{entrée} - Q_{sortie} \times A_{sortie} + r_A \times V$$

En considérant le volume constant l'équation 2 devient :

$$V\frac{dA}{dt} = Q_{entrée} \times A_{entrée} - Q_{sortie} \times A_{sortie} + r_A \times V$$

En régime dynamique, le terme d'accumulation ne peut pas être négligé, le calcul des vitesses est

exprimé dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Equations pour le calcul des vitesses pour le réacteur chémostat en régime dynamique

Variables d'état	Vitesses nettes de réaction	Vitesses spécifiques de réaction
S_C	$r_{Sc} = \frac{1}{V}\left(-Q_{entrée} \times S_{entrée} + Q_{sortie} \times S_C + V\frac{dS_C}{dt}\right)$	$q_{Sc} = \frac{r_{Sc}}{X_C}$
N	$r_N = \frac{1}{V}\left(-Q_{entrée} \times N_{entrée} + Q_{sortie} \times N + V\frac{dN}{dt}\right)$	$q_N = \frac{r_N}{X_C}$
PHB	$r_{PHB} = \frac{1}{V}\left(Q_{sortie} \times PHB + V\frac{dPHB}{dt}\right)$	$q_{PHB} = \frac{r_{PHB}}{X_C}$
X	$r_{Xc} = \frac{1}{V}\left(Q_{sortie} \times X_C + V\frac{dX_C}{dt}\right)$	$\mu = \frac{r_{Xc}}{X_C}$

Au régime permanent, le terme d'accumulation s'annule, le calcul de la vitesse nette de réaction s'obtient à partir de :

$$r_A = \frac{1}{V}(Q_{sortie} \times A - Q_{entrée} \times A_{entrée})$$

Avec $Q_{entrée} = Q_{sortie}$ et D = Q/V, le Tableau 20 montre les équations pour le calcul des vitesses en régime permanent des variables indiquées.

Tableau 20 : Equations pour le calcul des vitesses pour le réacteur chémostat en régime permanent

Variables d'état	Vitesses nettes de réaction	Vitesses spécifiques de réaction
S_C	$r_{Sc} = D \times (S_C - S_{entrée})$	$q_{Sc} = \frac{r_{Sc}}{X_C}$
N	$r_N = D \times (N - N_{entrée})$	$q_N = \frac{r_N}{X_C}$
PHB	$r_{PHB} = D \times PHB$	$q_{PHB} = \frac{r_{PHB}}{X_C}$
X	$r_{Xc} = D \times X_C$	$\mu = \frac{r_{Xc}}{X_C}$

III.3.d *Vérification des bilans*

En effectuant le bilan DCO, avec les dosages des substrats solubles en entrée, dans le surnageant de culture et de la DCO_P, et enfin avec le calcul du rO_2, le bilan DCO est vérifié pour l'ensemble des expérimentations.

En effectuant le bilan N, avec le dosage de l'azote ammoniacal en entrée, de l'azote dans le surnageant de culture (Nessler), et de l'azote particulaire (Shimadzu TOC-V CSN), le bilan N est vérifié pour l'ensemble des expérimentations.

Document confidentiel

III.3.e *Calcul des rendements*

Les rendements théoriques limites notés Y, choisis pour ce travail sont tirés de la thèse d'Estelle Grousseau (2012), déterminée par un modèle métabolique développé avec la souche *C. necator*. Le Tableau 21 représente les valeurs des rendements théoriques limites ainsi que l'expression des rendements observés notés R.

Tableau 21 : Valeur des rendements théoriques limites (Y) et expression des rendements observés (R)

		Croissance	Production de PHA
Rendements théoriques limites (Y)	Acide acétique	$Y_{Xc/S} = 0{,}50\ Cmol_{Xc}/Cmol_{Sc}$	$Y_{PHB/S} = 0{,}66\ Cmol_{PHB}/Cmol_{Sc}$
	Acide butyrique	$Y_{Xc/S} = 0{,}65\ Cmol_{Xc}/Cmol_{Sc}$	$Y_{PHB/S} = 0{,}88\ Cmol_{PHB}/Cmol_{Sc}$
Rendements observés (R)	Acide acétique Acide butyrique	$R_{Xc/S} = {r_{Xc}}/{r_{Sc}}$	$R_{PHB/S} = {r_{PHB}}/{r_{Sc}}$

III.4. Détermination des degrés de limitation en phosphore et du phosphore intracellulaire

Il est important de différencier la limitation phosphore appliquée $(C/P)_{app}$ de la limitation phosphore consommée $(C/P)_{cons}$ par les microorganismes. $(C/P)_{app}$ est calculée en divisant le flux de phosphore par le flux de carbone imposé et est exprimé en Cmol/Pmol. $(C/P)_{cons}$ est calculée en divisant le flux de phosphore par le flux de carbone consommé par les microorganismes. Le Tableau 22 récapitule l'expression de la limitation phosphore.

Tableau 22 : Expressions de la limitation phosphore appliquée et consommée

Limitation phosphore	Expressions
Appliquée : $(C/P)_{app}$	$\left(\frac{C}{P}\right)_{app} = \frac{Q_{entrée} \times S_{entrée}}{Q_{entrée} \times P_{entrée}}$
Consommée : $(C/P)_{cons}$	$\left(\frac{C}{P}\right)_{cons} = \frac{r_{Sc}}{r_{Phos}}$

Le phosphore intracellulaire, exprimé comme un rendement observé $R_{Xc/P}$ est exprimé en Cmol/Pmol $R_{Xc/P} = \frac{r_{Xc}}{r_{Phos}}$. Ce paramètre est également calculé en pourcentage massique de la biomasse catalytique : $P_{in} = \frac{r_P}{r_{Xc}} x100$.

PARTIE III. Résultats et discussion

Chapitre 1. Analyse macroscopique de l'ensemble des cultures réalisées en bioréacteurs

I. INTRODUCTION

Afin d'étudier les facteurs gouvernant la sélection microbienne de producteurs et la production de PHB, ce premier chapitre expose les différents moyens mis en place ainsi que les résultats macroscopiques obtenus pour les 3 modes de cultures définis.

Les cultures fed-batch sont à la fois un outil de sélection de microorganismes producteurs et de production de PHA. Elles ont été menées sous des conditions de limitation en carbone et phosphore maitrisées et donc de croissance données. Ainsi, dans notre travail, ce mode de culture a été utilisé :

- pour évaluer le taux de producteurs de PHB présents initialement dans des boues activées,
- pour produire du PHB directement à partir de boues activées sans étape préalable de sélection microbienne (un enrichissement a lieu au cours de la culture fed-batch),
- pour étudier l'effet de la limitation en phosphore sur le comportement microbien. Ce dernier point sera repris plus en détail lors de l'analyse métabolique du chapitre 2.

La culture en chémostat est un excellent outil pour l'étude du métabolisme cellulaire dans un environnement contrôlé. Nous l'avons donc naturellement utilisée pour analyser l'effet des conditions opératoires (taux de dilution, degré de limitation de la croissance cellulaire en phosphore et nature de la source de carbone) sur le devenir du substrat carboné. Ainsi, l'objectif est de déterminer les capacités de réorganisation du phosphore intracellulaire et les paramètres gouvernant la production de PHB. Ce type de culture continue a également été utilisé comme outil de sélection microbienne profitant alors de l'effet dilution des microorganismes ayant un taux de croissance inférieur au taux de dilution imposé. Au final, l'objectif de l'ensemble des cultures réalisées en chémostat est toujours double : étudier les paramètres gouvernant la sélection microbienne et la production de PHB. La culture continue est enfin un procédé de production qui sera évalué en tant que tel notamment pour son intérêt pour l'utilisation de substrats dilués et sa robustesse.

Le mode de culture batch mis en place dans les travaux est toujours réalisé à partir d'un consortium sélectionné en chémostat. Il s'agit tout d'abord d'un outil d'étude des réponses cinétiques en dynamique face à un excès de substrat carboné. Ainsi, le régime dynamique permet d'étudier l'effet de l'état physiologique des microorganismes (imposé par les conditions opératoires du chémostat) sur le devenir du carbone. Ensuite, ce mode de culture permet d'évaluer le caractère surproducteur de la population microbienne sélectionnée en chémostat par la détermination des q_{PHBmax} observés. Il vient donc préciser la qualité de la sélection microbienne effectuée.

Pour chaque type de culture, sera présenté d'abord le mode de conduite mis en place puis l'ensemble des résultats macroscopiques obtenus.

II. CULTURES FED-BATCH

II.1. Mode de conduite des cultures fed-batch

Quatre cultures fed-batch ont été effectuées avec comme inoculum des boues activées de différentes origines. Toutes les cultures ont été réalisées en deux phases successives :

- Phase 1 : Alimentation unique en carbone (AA) sur une courte période après inoculation afin de conditionner les populations microbiennes à une limitation phosphore par la suite. Cette étape sert également à consommer le phosphore résiduel dans le surnageant en vue de maitriser le degré de limitation C/P apporté au cours du temps.
- Phase 2 : Alimentation contrôlée en carbone (AA) et phosphore afin d'appliquer un ratio de limitation (C/P) désiré.

Le Tableau 23 récapitule les conditions opératoires appliquées au cours des cultures fed-batch FB1, FB2, FB3 et FB4, avec l'origine des inocula utilisés ainsi que les degrés de limitation en phosphore appliqués. L'effet d'une application d'un degré de limitation en phosphore progressive est analysé par les cultures FB1 et FB2. Avec les cultures FB3 et FB4, l'effet d'une carence en phosphore initiale ainsi que l'origine des boues est étudié.

Tableau 23 : Récapitulatif de la conduite des cultures fed-batch FB1, FB2, FB3 et FB4 en termes d'inoculum et de degré de limitation phosphore appliqué

STEP	Cultures	Temps	(C/P)app (Cmol/Pmol)
M	FB1	0 – 5 h	Alimentation C
		10 – 58 h	1000
		60 – 68 h	1950
	FB2	0 – 5 h	Alimentation C
		12 – 30 h	1000 +/- 150
		35 – 80 h	3500 +/- 500
T	FB3	0 – 21 h	Alimentation C
		21 – 68 h	1960
C	FB4	0 – 85 h	Alimentation C
		21 – 72 h	1960

II.2. Analyse macro-cinétique des cultures fed-batch

II.2.a *Cas des cultures FB1 et FB2*

Les deux premières cultures FB1 et FB2 ont été réalisées à partir de boues activées de la station d'épuration M prélevées à 2 périodes différentes au cours de l'année (février et mai). La Figure 16

montre l'évolution, au cours du temps de culture, de la quantité produite cumulée de X_C, du contenu intracellulaire en PHB (PHB_{in}) et des ratios (C/P) appliqués et consommés pour les 2 boues activées (Figure 16A pour la culture FB1 et Figure 16B pour la culture FB2). Ces deux cultures se distinguent par le degré de limitation phosphore appliqué au cours du temps de culture.

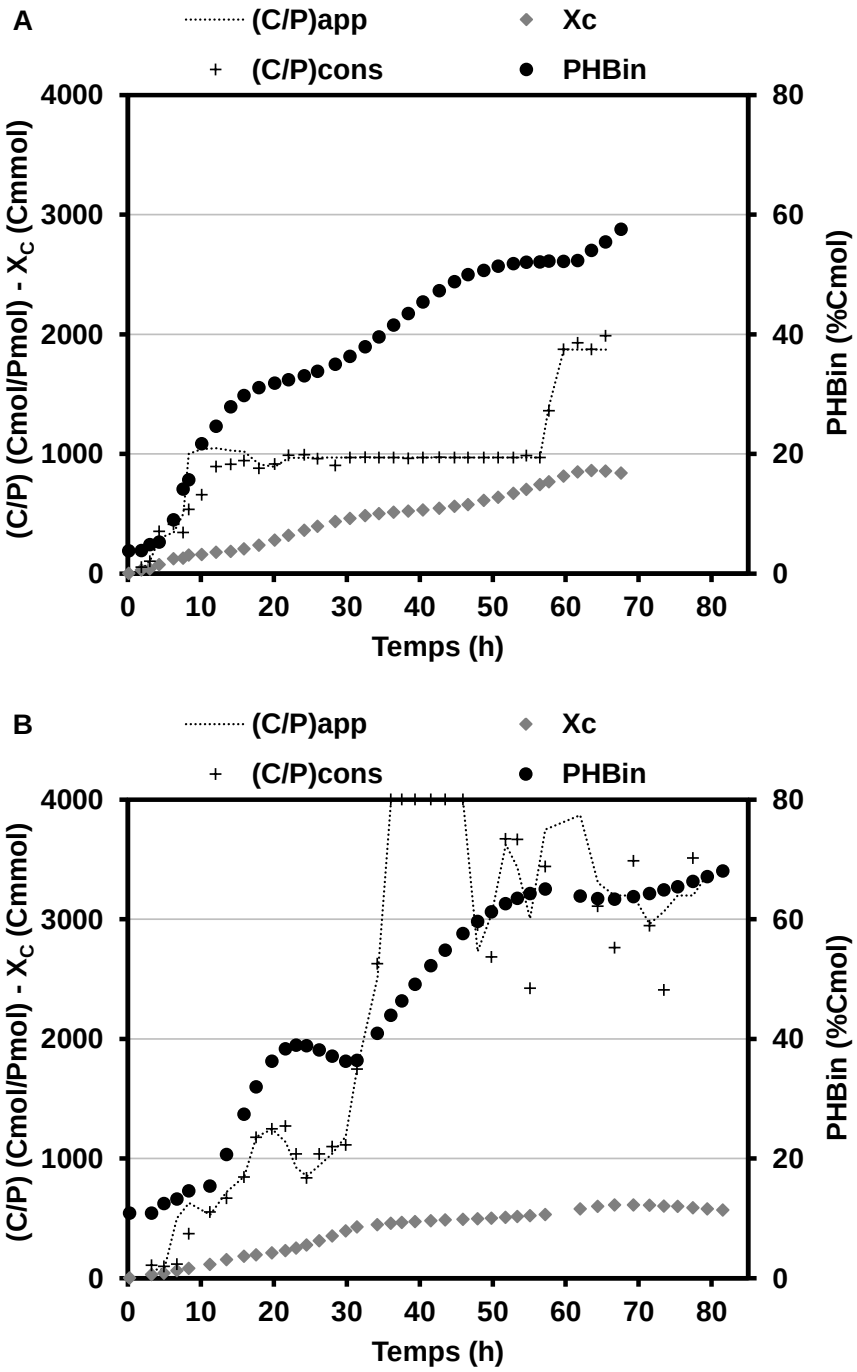

Figure 16 : Evolution du degré de la limitation en P appliqué et consommé, de la quantité cumulée de biomasse catalytique produite et du taux intracellulaire de PHB au cours du temps pour les cultures inoculées avec la boue activée de la station d'épuration M prélevée à 2 périodes différentes : FB1 (A) et FB2 (B)

Après la phase 1 de la culture (durant 5 h), correspondant à l'épuisement du phosphore soluble présent dans le surnageant de culture dans ce cas, la phase 2 peut être facilement identifiée par l'application de la limitation phosphore ($(C/P)_{app}$) progressive. Pour la culture FB1 (Figure 16A), rapidement la production de PHB a eu lieu se traduisant par une augmentation du contenu intracellulaire en PHB pour atteindre environ 30%. La première limitation phosphore de 1000 Cmol/Pmol appliquée jusqu'à 58 h a permis simultanément la production de PHB (53%) et de cellules catalytiques (800 Cmmol). L'augmentation de la teneur intracellulaire en PHB était plus lente que dans la première phase, car la division cellulaire a induit une dilution de PHB dans les cellules produites. Par la suite, la deuxième limitation de 1950 Cmol/Pmol a été appliquée pendant quelques heures à partir de 60 h, ralentissant la croissance microbienne et augmentant le taux de PHB intracellulaire jusqu'à 58%.

A partir de ces résultats, il peut être conclu que la culture fed-batch conduite sous un degré de limitation phosphore de 1000 Cmol/Pmol a permis l'obtention d'une forte teneur en PHB directement (sans enrichissement) avec une boue activée. De plus, l'alimentation continue d'un milieu imposant une limitation P a conduit au maintien la croissance cellulaire et, par augmentation de la quantité en biomasse catalytique, a permis une augmentation de la quantité globale de PHB dans le réacteur. Un degré de limitation phosphore plus élevé (1960 Cmol/Pmol) a conduit à la production uniquement de PHB (et non de X_C), indiquant que le carbone a été consommé pour le stockage de PHB par les bactéries productrices. Compte tenu d'une teneur en PHB de 50% (Cmol/Cmol) pour l'ensemble de la biomasse avant que cette forte limitation ait été appliquée, il est possible que l'arrêt de la croissance cellulaire résulte d'une teneur trop faible de P intracellulaire en raison de la limitation en P excessive.

Pour la culture FB2, en utilisant un inoculum de la même boue activée (Figure 16B) mais avec un degré de limitation en phosphore supérieur imposé sur une plus longue période, on vise à évaluer l'influence du degré de limitation sur la croissance cellulaire et la synthèse de PHB. Les évolutions initiales des teneurs intracellulaires en PHB et de quantité de X_C sont semblables à celles observées lors de la culture précédente FB1. Un plus fort taux intracellulaire en PHB a été obtenu (40%), pouvant être expliqué par un taux plus élevé au lancement de l'expérience. Comme prévu, l'augmentation du degré de la limitation au-delà de 1000 Cmol/Pmol a entraîné un fort ralentissement de la croissance catalytique et une augmentation de la production de PHB. Contrairement à la culture FB1, le ratio C/P appliqué a été différent du ratio C/P consommé signifiant une accumulation de carbone (AA) dans le surnageant de culture. Par conséquent, on peut conclure qu'une trop forte limitation phosphore conduit à l'accumulation d'AA dans le surnageant et donc une difficulté à gérer le système.

Ainsi, la conduite de ces deux procédés sous un niveau de limitation phosphore, a permis d'atteindre des teneurs élevées en PHB finales (jusqu'à 68% avec la culture FB2).

II.2.b *Cas des cultures FB3 et FB4*

La Figure 17 montre l'évolution au cours du temps de culture de la quantité produite cumulée de X_C, du contenu intracellulaire en PHB et des ratios (C/P) appliqués et consommés pour les boues activées de la station d'épuration T (Figure 17A, culture FB3) et C (Figure 17B, culture FB4).

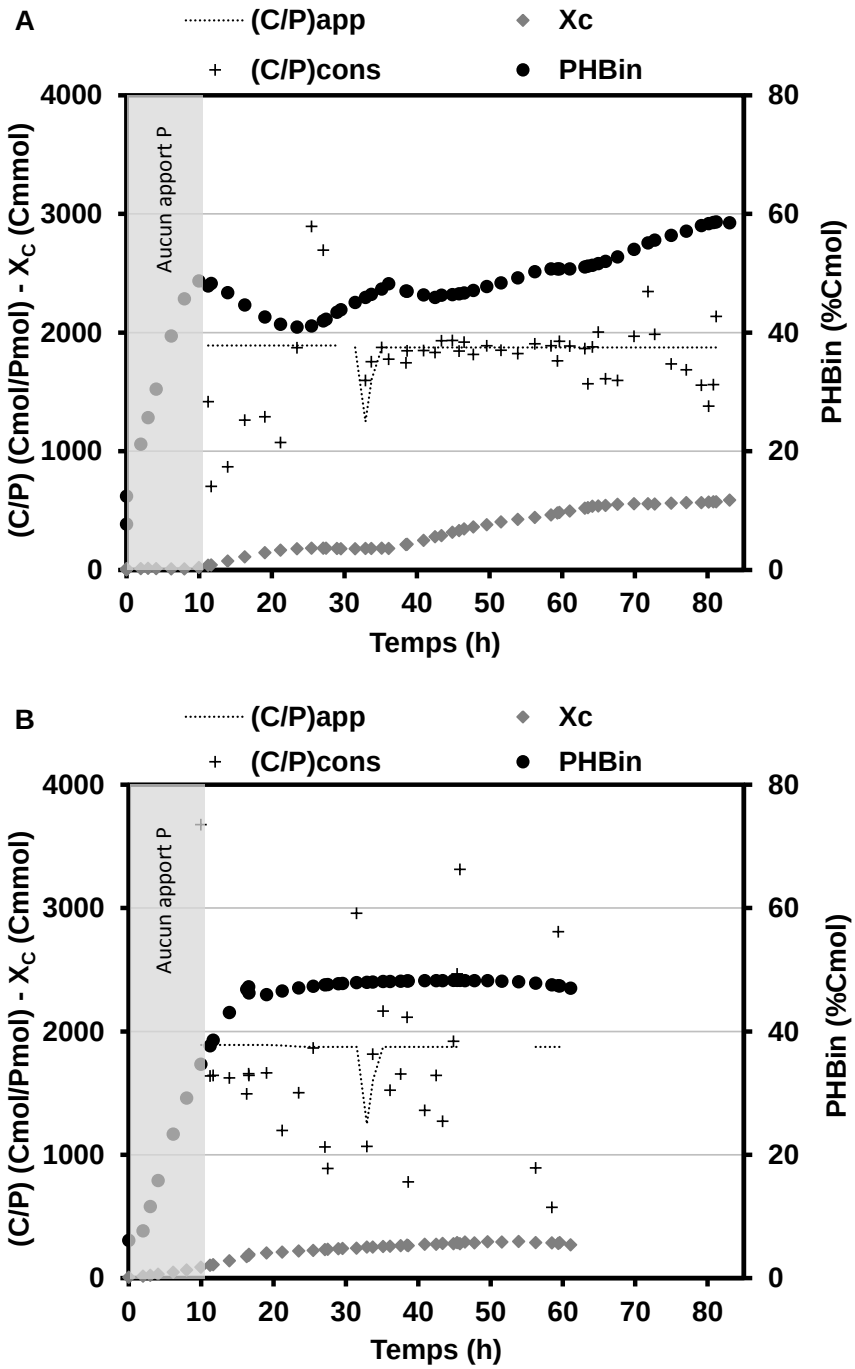

Figure 17 : Evolution de la limitation P, de la quantité cumulée de biomasse catalytique produite et du taux intracellulaire de PHB au cours du temps des cultures inoculées avec la boue activée de la station d'épuration T et C : FB3 (A) et FB4 (B), respectivement

Pour ces deux cultures, aucun phosphore n'a été apporté pendant les 11 premières heures des cultures engendrant une période poussée de carence en phosphore. Cette étape a été réalisée afin de diminuer très rapidement le taux de phosphore intracellulaire et ainsi étudier l'effet d'une carence en phosphore sur le comportement cinétique et microbiologique des cultures. Au cours de la phase 2 des cultures, un degré de limitation phosphore de 1960 Cmol/Pmol a été appliqué. Dès le début de cette phase, le ratio C/P consommé est inférieur au ratio C/P appliqué en raison de l'accumulation d'AA dans le surnageant. Une diminution du degré de la limitation phosphore à 31 h de culture a été réalisée afin de permettre une consommation de l'AA précédemment accumulé.

Bien que les comportements cinétiques des 2 cultures semblent être affectés par la période de carence en phosphore, ces expériences ont permis de confirmer la capacité de production de PHB à partir de boues activées sous contrainte de limitation en phosphore.

Pour la culture FB3, une accumulation rapide de PHB (50%) sans croissance cellulaire significative a été observée au cours de la période de carence en phosphore. Dès le début de la phase 2, l'apport de phosphore a permis une augmentation de la biomasse catalytique (150 Cmmol) engendrant une diminution de la teneur en PHB par dilution de la croissance cellulaire. En outre, la concentration élevée d'AA accumulé dans le surnageant (1,5 g/L) à partir de 20 h, se traduisant par un ratio C/P consommé inférieur au ratio C/P appliqué, a conduit à un fort ralentissement de la synthèse de PHB et de la croissance catalytique et confirme le caractère inhibiteur de l'acide acétique sur le métabolisme bactérien.

Pour la culture FB4, une accumulation rapide de PHB concomitante à une croissance cellulaire a été déclenchée au cours de la période de carence en phosphore et a été poursuivie pendant les 8 heures suivantes (47% de PHB intracellulaire et 180 Cmmol de biomasse catalytique formée). A partir de ce moment-là, une forte accumulation d'AA a été constatée (1 g/L) et aucune autre augmentation de la teneur intracellulaire en PHB n'a été observée malgré la diminution du degré de limitation phosphore appliqué à 31 h de culture. Pendant les dernières heures de la culture fed-batch, la teneur intracellulaire en PHB et la quantité de cellules ont légèrement diminué. Une période poussée de carence en phosphore au début de la culture semble avoir un effet négatif autant sur la croissance cellulaire que sur l'accumulation de PHB.

En conclusion, les cultures fed-batch ont démontré la faisabilité de la production de PHB directe à partir de boues activées de différentes origines. Il a ainsi été mis en évidence qu'un pourcentage élevé d'organismes producteurs de PHA étaient présents à l'origine dans les boues activées, offrant la capacité d'un enrichissement en producteurs et ainsi la capacité d'obtenir de bonnes performances en cultures mixtes sans étape d'enrichissement préalable. L'estimation du taux de producteurs initialement dans la

boue activée, ainsi que le facteur d'enrichissement déterminé pour chaque expérimentation est montré dans l' Annexe A : Estimation du taux de microorganismes producteurs lors des expérimentations fed-batch L'évolution de la diversité des populations microbiennes actives au cours du temps (étudiés par le pyroséquençage de l'ARN16S) est exposée dans l'Annexe B : Evolution de la diversité microbienne au cours des expérimentations FB3 et FB4. Les points clefs d'une culture fed-batch conduites sous limitation phosphore sont :

- La limitation phosphore déclenche la production de PHB.
- La maitrise du degré de la limitation phosphore limitant la croissance cellulaire est indispensable afin de conduire à des performances élevées en mode fed-batch. Un taux de PHB de 70% a été obtenu en 80 h de culture, le meilleur résultat de la littérature, sur une culture sans enrichissement préalable.
- Un apport minimal et contrôlé en phosphore est donc nécessaire afin d'assurer la croissance cellulaire des microorganismes producteurs pour un enrichissement spécifique en vue d'augmenter le taux intracellulaire en PHB final.

Ainsi, à partir de ces résultats, il convient d'étudier plus en détails l'importance du degré de la limitation en phosphore sur les réponses métaboliques et le devenir du carbone consommé par les populations microbiennes.

III. CULTURES CHEMOSTAT

Afin d'approfondir les problématiques liées à la conversion du carbone selon le degré de limitation et le taux de croissance en culture mixte, révélées par les expérimentations du type fed-batch, le choix de la mise en œuvre s'est orienté vers les cultures chémostat. Cela permet, après sélection microbienne, de stabiliser les microorganismes dans un environnement donné et d'étudier le devenir du phosphore intracellulaire et en conséquence les flux de répartition du substrat carboné entre croissance, stockage et maintenance cellulaire.

III.1. Démarche expérimentale menée en réacteur chémostat

Contrairement au mode de culture fed-batch, la pression environnementale supplémentaire imposée (par le taux de dilution) assure une très forte sélection microbienne. De ce fait, à partir d'un consortia microbien mixte, la sélection de microorganismes producteurs doit d'abord être atteinte avant l'obtention de régimes macro-cinétiques pseudo-stables. On considère donc toujours 2 périodes pour les cultures continues : la période de sélection microbienne et la période d'étude du métabolisme sous des régimes pseudo-stabilisés selon les conditions de limitation en phosphore (qui sont intensifiées par palier

au cours du temps). La Figure 18 récapitule les conditions expérimentales testées au cours du plan d'expérience : nature de la source de carbone (également donneur d'électrons), taux de dilution et type de limitation en nutritionnelle appliqués (carbone, carbone et phosphore ou phosphore). Les cultures nommées A sont conduites sous acide acétique et les cultures nommées B sont conduites sous un mélange d'acide butyrique et acide acétique (70/30 ratio Cmol).

A partir de boues activées, un taux de dilution ainsi qu'un type de limitation nutritionnelle (conditions différenciées dans la Figure 18 par des couleurs différentes) ont été imposés initialement. Par la suite, si un changement de conditions tels que le taux de dilution ou le type de limitation nutritionnelle a eu lieu, il est indiqué par un nouveau taux de dilution ou un changement de couleur respectivement. Pour les expériences A1, A2, A3, A6, A7, le degré de limitation en phosphore imposé a été progressif permettant de balayer les zones de double limitation carbone et phosphore jusqu'à atteindre la zone de limitation phosphore. Dans le cas des expériences A3, A7, B1 et B2, une diminution du taux de dilution en cours de culture a été effectuée. Ce changement a été réalisé en vue d'étudier les réponses métaboliques lors de la diminution du taux de dilution et/ou d'évaluer la capacité à atteindre une teneur intracellulaire en PHB supérieure. Les expériences A4, A5, B3 et B4 ont été conduites sous des conditions de double limitation sans changement de taux de dilution. Une condition de limitation phosphore unique a été imposée tout au long de la culture A9. L'expérience A8 constitue une tentative originale d'exploration de l'effet du type de limitation avec pour but d'évaluer surtout son effet sur la sélection microbienne : la culture est initiée avec une condition de limitation en phosphore puis en carbone et enfin une condition de double limitation.

Pour rappel, les cultures A6 et A7 ont été inoculées avec un consortium différent des autres cultures (boues de la station d'épuration T).

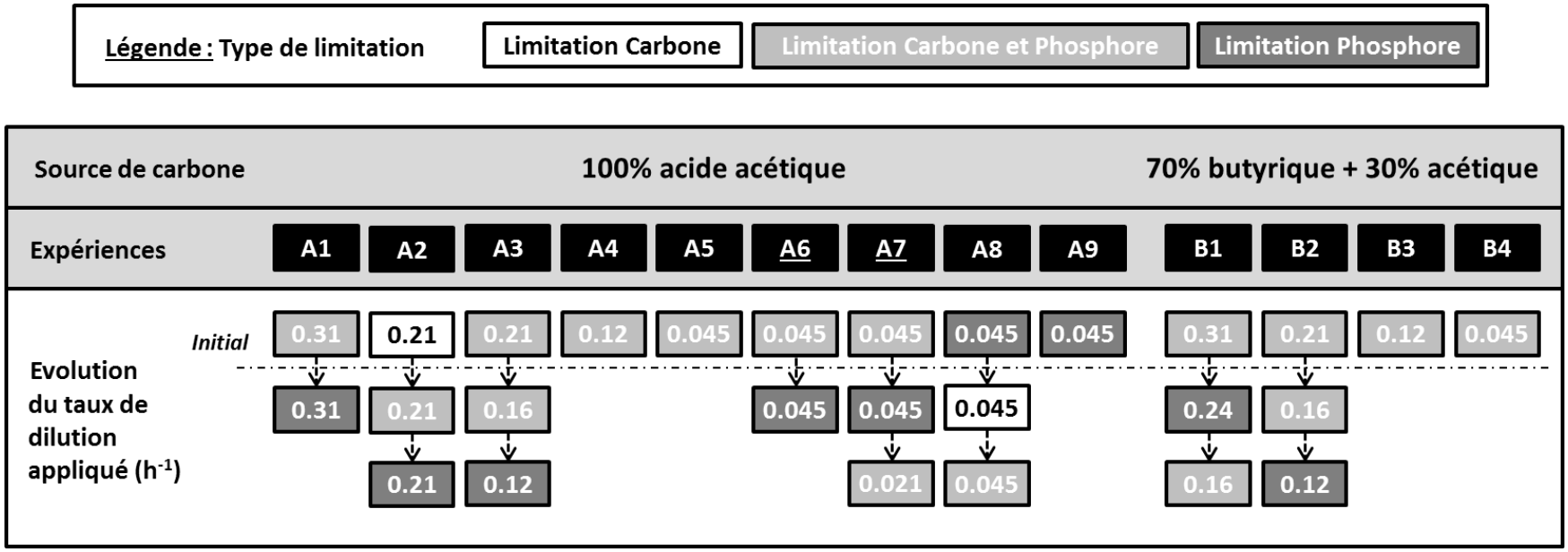

Figure 18 : Récapitulatif des conditions expérimentales imposées au cours des cultures en chémostat : Source de carbone, taux de dilution et type de limitation nutritionnelle ; Les <u>expériences soulignées</u> ont été inoculées avec une boue activée de la station d'épuration T alors que les autres ont été menées avec la boue activée de la station d'épuration B

III.1.a *Mise en place de la sélection microbienne*

Bien que l'analyse de la dynamique de la sélection microbienne soit réalisée dans un chapitre suivant, la sélection systématique de microorganismes largement dominants et producteurs de PHB a été mise en évidence. Ce point est tout à fait remarquable et posera la question de la cause du caractère systématique de cette nature de sélection microbienne. En effet, tous les résultats obtenus en culture continue sous limitation en phosphore ont montré une sélection rapide de producteurs de PHA à partir d'un inoculum provenant de boues activées. Pour tous les taux de dilution et les différents degrés de limitation en phosphore appliqués en chémostat, une ou deux espèces microbiennes dominantes ont toujours été sélectionnées. Néanmoins, les variations dynamiques des espèces microbiennes peuvent se produire au cours d'une expérience lors de la modification du taux de dilution par exemple. En outre, différents microorganismes peuvent être sélectionnés d'une expérience à l'autre, malgré le même inoculum de départ. Par conséquent, cette étude a démontré que, en dépit de variations génotypiques, une stabilité phénotypique assurant la fonction de production de PHB a été sélectionnée et maintenue quelles que soient les conditions opératoires appliquées. Cette stabilité fonctionnelle paraît assurée par la pression de sélection appliquée au chémostat, à savoir, conjointement, le degré de limitation en phosphore et la nature de la source carbonée (AGV).

III.1.b *Exemple de réponses microbiennes types à l'augmentation du degré de limitation en phosphore*

A titre d'exemple, les réponses microbiennes des populations sélectionnées en culture chemostat (régimes pseudo-stables) à une augmentation progressive de la limitation en phosphore sont présentées dans la Figure 19 pour un taux de dilution de 0,045 h^{-1} (Expérience A6). Les évolutions de la concentration en biomasse catalytique (X_C), la teneur intracellulaire en PHB (PHB_{in}) et les degrés de limitation en phosphore appliqués et consommés ($(C/P)_{app}$ et $(C/P)_{cons}$, respectivement) sont présentées en fonction du nombre de TSH dans la figure A. Les évolutions des concentrations des composés solubles ($P\text{-}PO_4^{3-}$, $N\text{-}NH_4^+$ et AA) dans le surnageant sont présentées en fonction de nombre de TSH dans la figure B.

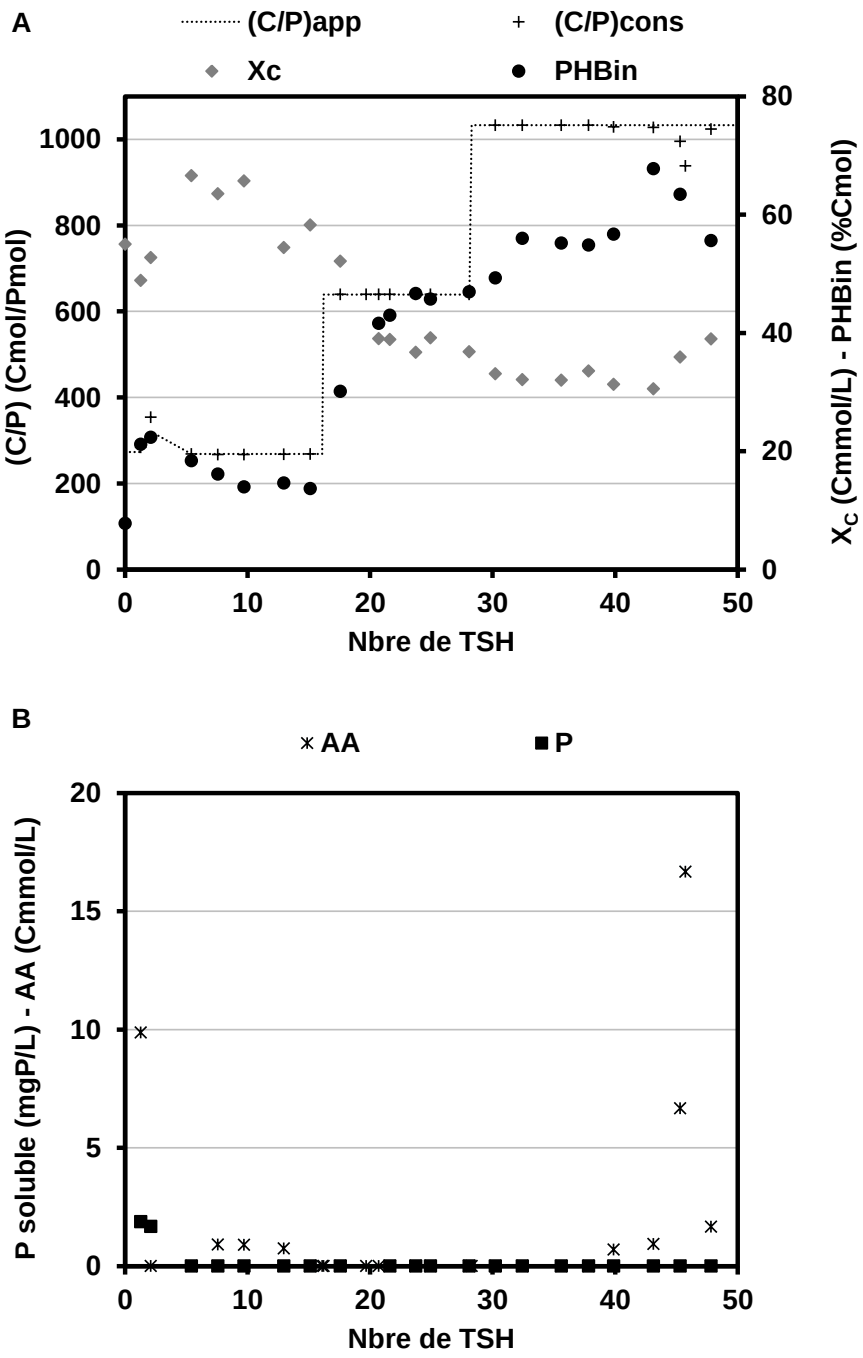

Figure 19 : Evolution des degrés de limitation appliqués ($(C/P)_{app}$) et consommés ($(C/P)_{cons}$), de la concentration en biomasse catalytique (X_C) et du taux de PHB intracellulaire (PHB_{in}) (Figure 19A), ainsi que des composés solubles dans le surnageant ($P\text{-}PO_4^{3-}$ et AA) (Figure 19B) en fonction du nombre de temps de séjour hydraulique (TSH) pour un taux de dilution de 0,045 h^{-1} (expérience A6)

A la fin de cette première étape de sélection microbienne (soit 12 TSH pour cette expérience), la concentration en biomasse catalytique et le taux de PHB intracellulaire ont augmenté jusqu'à atteindre des valeurs stables (X_C = 48 Cmmol/L et PHB_{in} = 12%). L'absence de phosphore soluble et d'AA dans le surnageant met en évidence une conduite du système sous double limitation carbone et phosphore. Par

la suite, deux autres niveaux de limitation en phosphore ont été successivement imposés, à savoir 667 et 1024 Cmol/Pmol. Cette augmentation a été effectuée en changeant seulement la concentration de phosphore dans l'alimentation. L'objectif était d'analyser la variation de l'utilisation de la source de carbone entre la croissance, le stockage de PHB et la maintenance cellulaire pour déterminer les degrés de limitation critiques pour chaque taux de dilution imposé. Cette limite correspond à la frontière entre la zone de double limitation carbone et phosphore et la zone de limitation phosphore uniquement. Elle est obtenue lorsque la source de carbone (AA dans notre cas) s'accumule dans le surnageant de culture. Du fait du caractère inhibiteur de l'AA, la zone de limitation phosphore n'est pas une zone de fonctionnement adéquate. La présence de substrat résiduel dans le surnageant de culture conduit à une inhibition de la croissance microbienne conduisant à l'élimination des cellules par dilution (wash out).

Lorsqu'un degré de limitation en phosphore de 667 Cmol/Pmol a été imposé, une forte augmentation de la production de PHB et une baisse consécutive de la concentration en biomasse catalytique a été observée. L'augmentation de la teneur intracellulaire en PHB a été progressive jusqu'à atteindre une valeur de 44% stable pendant 8 TSH. Une fois de plus, l'absence de phosphore soluble et d'AA dans le surnageant de culture confirme le maintien de la conduite du système sous double limitation carbone et phosphore.

L'augmentation du degré de la limitation phosphore de 290 à 667 Cmol/Pmol (correspondant à un facteur de 2,3 uniquement lié à la diminution de la concentration en P) a multiplié par 2,7 la teneur intracellulaire en PHB tout en diminuant la concentration en biomasse catalytique par un facteur 1,3.

La diminution du phosphore dans l'alimentation n'a pas engendré le même facteur de division sur la biomasse catalytique que de multiplication sur le degré de limitation dans l'alimentation, laissant supposer une nette diminution du taux de phosphore dans la biomasse catalytique. De plus, l'augmentation du degré de limitation en phosphore a conduit à diriger le flux de carbone vers le stockage de PHB au dépend de la production de biomasse catalytique. Le taux de croissance spécifique est toutefois maintenu étant donné qu'aucun lessivage de la culture mixte sélectionnée n'a été observé. Ainsi, une nouvelle augmentation du degré de la limitation en phosphore (1 024 Cmol/Pmol) a logiquement rapidement augmenté la teneur intracellulaire en PHB jusqu'à 58% et diminué la concentration en biomasse catalytique jusqu'à 30 Cmmol/L. Une augmentation d'un facteur 1,54 dans le rapport C/P appliqué a conduit dans ce cas à une teneur intracellulaire en PHB multipliée par 1,23 et à une diminution de 1,25 en biomasse catalytique.

Dix TSH après le dernier changement du degré de limitation appliqué, une faible concentration d'AA a été détecté dans le surnageant, puis la teneur en PHB a soudainement augmenté jusqu'à 72%. En même temps, une plus forte accumulation d'AA dans le surnageant de culture (supérieure à 500 mg/L)

obligeant à interrompre l'alimentation pour éviter le lessivage des cellules microbiennes et permettre au substrat préalablement accumulé d'être consommé. Ces derniers évènements expliquent l'écart entre le degré de limitation en phosphore appliqué et consommé constaté au cours de cette période. De plus, la forte instabilité observée après l'imposition du degré de limitation en phosphore de 1024 Cmol/Pmol a montré que la limite de fonctionnement du système continu a été atteinte pour ce taux de dilution de 0,045 h^{-1}.

III.2. Analyse macro-cinétique de l'ensemble des cultures chémostat

La même stratégie d'expérimentation a été réalisée avec différents taux de dilution en réacteur chémostat couvrant le domaine d'intérêt pour une étude de la production de PHB par des bactéries hétérotrophes ($0,05 \times \mu_{max} < \mu < 0,8 \times \mu_{max}$). Une augmentation progressive du degré de la limitation en phosphore a été effectuée pour chaque expérimentation (Figure 18). Ainsi, la stratégie d'analyse se scinde en 2 parties : (1) les régimes dynamiques (initiaux mais aussi observés en cours de culture lors des changements de conditions opératoires) principalement liés à la compétition microbienne et à la mise en place de la sélection microbienne ; (2) les régimes pseudo-stables identifiés par les paramètres macro-cinétiques stables sur une durée de 5 fois le TSH.

III.2.a *Les régimes dynamiques*

A partir d'un consortium microbien mixte, les pressions de sélection imposées par les différentes conditions expérimentales conduisent à une dynamique des populations pour aboutir à la dominance de souches microbiennes. Néanmoins, des variations dynamiques des espèces microbiennes ont été observées dans certains cas, comme par exemple, lors du changement du taux de dilution ou encore l'accumulation significative de substrat carboné. Par le séquençage de l'ADN 16S, l'étude de l'implantation et des variations dynamiques des souches microbiennes selon les pressions de sélection sera effectuée (Partie III - Chapitre 4). Cependant, pour une première visualisation, la Figure 20 représente les principales dynamiques et sélections de populations bactériennes observées au cours des expériences en chémostat.

Une population du genre *Acinetobacter* tout le temps présente initialement s'implante dans le cas d'une non limitation P et à D élevé seulement lorsque la source de carbone AA est utilisée seule. Cette population ne s'implante jamais en présence d'AB. Elle semblerait avoir une très forte affinité pour l'AA.

Une population du genre *Malikia* s'implante fortement et de manière robuste en présence de butyrate mais ne persiste pas lorsque un D inférieur à 0,21 h^{-1} est imposé initialement.

Une population du genre *Zoogloea* s'implante fortement et de manière robuste pour les deux sources de carbone, lorsque un D de 0,12 h^{-1} est imposé.

Pour des D inférieurs à 0,12 h^{-1}, les réacteurs sélectionnant de manière forte et robuste une seule population microbienne sont les réacteurs A6, A7 (population du genre *Brachymonas*) et A9 (population non référencée de la classe des β-proteobacteria). Les conditions opératoires des réacteurs A6 et A7 sont une alimentation séquentielle en acide acétique et pour le réacteur A9, il s'agit d'une limitation nutritionnelle en phosphore uniquement. Ce sont des conditions qui visiblement, surimposent des pressions de sélections comparé aux autres conditions opératoires dans les réacteurs. En effet, les autres cultures menées à un D de 0,045 h^{-1}, souvent deux souches microbiennes sont sélectionnées et sont en compétition au fur et à mesure du temps de culture.

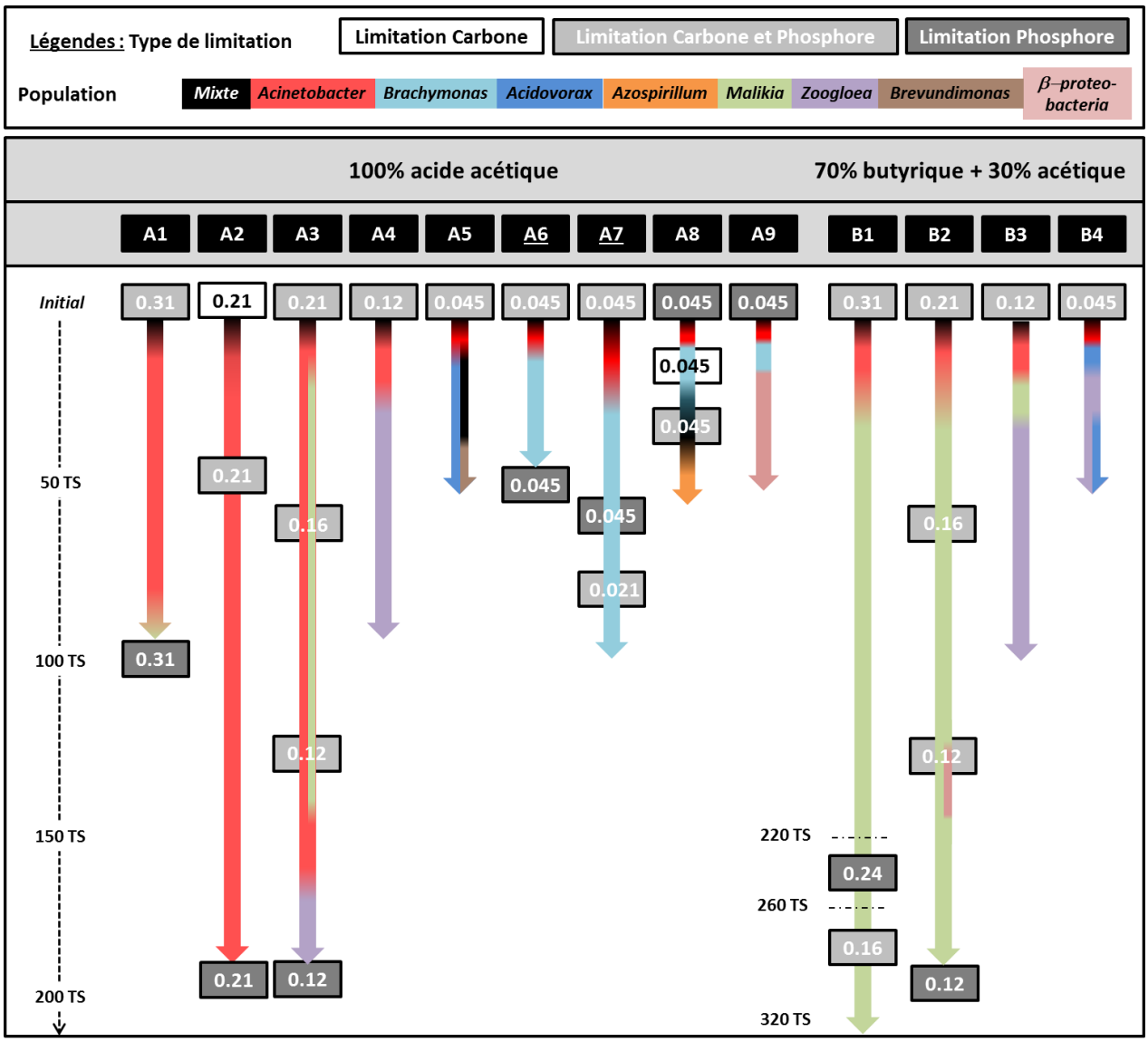

Figure 20 : Principales observations des dynamiques de populations bactériennes au cours des expériences en chémostat

En conclusion, un fort D augmenterait les pressions de sélection en aboutissant d'autant plus à une monoculture. Un faible D, réduit les pressions de sélection offrant à un plus grand nombre de microorganismes la possibilité se développer. Ce n'est qu'en rajoutant des pressions de sélections supplémentaires qu'une mono-souche est sélectionnée (par le type d'alimentation ou par la nature de la limitation nutritionnelle). L'enjeu de l'étude de la sélection microbienne sera de les comparer les unes aux autres en termes de paramètres et donc de comportements cinétiques, classement génotypique. Un lien entre type de sélection microbienne et conditions opératoires de sélection sera discuté dans le chapitre 4.

III.2.b *Les régimes stabilisés*

Les résultats de ce travail ont montré une sélection rapide des producteurs de PHB à partir d'un inoculum de boues activées. En effet, pour tous les taux de dilution et les $(C/P)_{app}$, très peu d'espèces microbiennes dominantes ont été sélectionnées, généralement une ou deux. La stabilité fonctionnelle retrouvée pour toutes les expériences donne potentiellement l'occasion d'étudier les cultures mixtes sélectionnées comme un seul microorganisme virtuel. Cette approche a déjà été utilisée pour le contrôle des produits de fermentation lors des transformations anaérobies (Rodriguez et al., 2006). Pour ces raisons, nous évaluerons l'intérêt et les restrictions d'une analyse comparative des réponses métaboliques globales obtenues selon les taux de croissance et les degrés de limitation phosphore. Cette hypothèse sera remise à l'étude et discutée dans le chapitre 3.

Le Tableau 24 résume les valeurs de teneurs intracellulaires en PHB (PHB_{in}), des rendements observés $R_{Xc/S}$, $R_{PHB/S}$, $R_{Xc/P}$ pour les états stables obtenus. Les résultats sont présentés par ordre décroissant de taux de dilutions et croissant de ratios C/P appliqués pour chaque taux de dilution. Le paramètre $R_{Xc/P}$ correspondant au ratio C/P de la biomasse catalytique et par conséquent à la teneur en phosphore intracellulaire exprimée en Cmol/Pmol.

A partir des résultats présentés dans le Tableau 24, l'augmentation progressive de la teneur en PHB et la diminution de la concentration de cellules avec l'augmentation du degré de la limitation en phosphore ont été confirmées. La teneur intracellulaire en PHB a varié de 0 à 80% en fonction des conditions opératoires. Quant au taux de phosphore intracellulaire, celui-ci a varié de 37 à 211 Cmol/Pmol. Un degré de limitation phosphore élevé ne peut être imposé en régime stable que pour un taux de dilution appliqué faible. Les régimes stables non obtenus sont causés par l'accumulation trop rapide d'AA dans le surnageant et l'inhibition par ce dernier de la croissance microbienne. Concernant la culture A8, aucun régime stable n'a pu être obtenu. La conduite sous limitation phosphore uniquement a engendré des accumulations de substrat carboné et une grande difficulté à maintenir le système. Cette culture servira uniquement à traiter l'aspect sélection microbienne par la suite.

Tableau 24 : Paramètres cinétiques et stœchiométriques déterminés à partir des régimes stables selon le taux de dilution et le degré de limitation en phosphore appliqués avec AA comme source de carbone

D	$(C/P)_{app}$	$(C/P)_{cons}$	PHB_{in} (±ec)	$R_{Xc/S}$ (±ec)	$R_{PHB/S}$ (±ec)	$R_{Xc/P}$ (±ec)	Experi-ences
h^{-1}	(CmolS/Pmol)		(CmolPHB/ CmolXtot)	(CmolXc/ CmolS)	(CmolPHB/ CmolS)	(CmolXc/ Pmol)	
0.31	78	78	< 1	0.47 ± 0.01	nc	37 ± 1	A1
0.31	98	98	< 1	0.48 ± 0.01	nc	46 ± 1	A1
0.31	118	117	2.2 ± 0.2	0.48 ± 0.03	0.01 ± 0.00	55 ± 3	A1
0.21	66	95	< 1	0.41 ± 0.02	nc	38 ± 2	A2
0.21	92	92	< 1	0.40 ± 0.02	nc	37 ± 2	A2
0.21	144	144	< 1	0.39 ± 0.01	nc	57 ± 0	A2
0.21	145	145	3.8 ± 0.6	0.39 ± 0.02	0.02 ± 0.00	56 ± 3	A3
0.21	206	206	5.5 ± 0.6	0.39 ± 0.02	0.02 ± 0.00	56 ± 3	A2
0.21	251	251	6.5 ± 1	0.38 ± 0.02	0.03 ± 0.01	96 ± 6	A2
0.21	276	267	10.3 ± 0.5	0.37 ± 0.02	0.04 ± 0.01	98 ± 7	A2
0.16	147	147	3.7 ± 0.1	0.38 ± 0.02	0.01 ± 0.00	56 ± 3	A3
0.16	177	177	8.3 ± 0.8	0.36 ± 0.02	0.03 ± 0.01	64 ± 3	A3
0.12	154	154	4.1 ± 0.1	0.37 ± 0.01	0.02 ± 0.00	61 ± 1	A4
0.12	222	222	6.6 ± 0.5	0.36 ± 0.01	0.03 ± 0.00	84 ± 4	A4
0.12	282	282	13.4 ± 0.5	0.33 ± 0.03	0.05 ± 0.00	97 ± 8	A4
0.12	402	Régime stable non obtenu					A3
0.045	58	245	< 1	0.37 ± 0.01	nc	90 ± 5	A8
0.045	264	264	< 1	0.37 ± 0.01	nc	96 ± 3	A8
0.045	312	312	12.6 ± 1.4	0.33 ± 0.04	0.05 ± 0.01	103 ± 11	A6
0.045	385	385	20.4 ± 2.9	0.29 ± 0.01	0.08 ± 0.02	113 ± 4	A7
0.045	530	530	31 ± 0.3	0.26 ± 0.01	0.12 ± 0.00	137 ± 3	A5
0.045	626	626	39.9 ± 0.6	0.23 ± 0.03	0.15 ± 0.02	142 ± 20	A7
0.045	667	667	43.8 ± 1.6	0.22 ± 0.01	0.17 ± 0.02	145 ± 6	A6
0.045	706	706	44.5 ± 1.7	0.21 ± 0.02	0.17 ± 0.03	147 ± 14	A5
0.045	1044	1044	56 ± 0.6	0.17 ± 0	0.22 ± 0.01	175 ± 0	A6
0.045	1100	Régime stable non obtenu					A7
0.023	1943	1943	74.2 ± 3.4	0.09 ± 0.02	0.27 ± 0.02	183 ± 44	A7
0.023	2850	2850	79.8 ± 1.8	0.07 ± 0.01	0.29 ± 0	211 ± 24	A7

ec : écart-type
nc : non calculé

Le Tableau 25 résume les résultats obtenus lorsque le mélange acide butyrique et acide acétique a été testé comme source de carbone.

Tableau 25 : Paramètres cinétiques et stœchiométriques déterminés à partir des régimes stables selon le taux de dilution et le degré de limitation en phosphore appliqués avec un mélange AA et AB comme source de carbone

D	$(C/P)_{app}$	$(C/P)_{cons}$	PHB_{in} (±ec)	$R_{Xc/S}$ (±ec)	$R_{PHB/S}$ (±ec)	$R_{Xc/P}$ (±ec)	Experi-ences
h^{-1}	(CmolS/Pmol)		(CmolPHB/ CmolXtot)	(CmolXc/ CmolS)	(CmolPHB/ CmolS)	(CmolXc/ Pmol)	
0.31	78	78	1.2 ± 0.2	0.55 ± 0.01	0.01 ± 0	43 ± 1	B1
0.31	98	98	5.1 ± 0.2	0.53 ± 0.01	0.03 ± 0	52 ± 1	B1
0.31	104	104	5.9 ± 0.2	0.52 ± 0.03	0.03 ± 0	55 ± 3	B1
0.31	113	113	8.2 ± 0.2	0.51 ± 0.02	0.05 ± 0	57 ± 2	B1
0.31	120	120	9.4 ± 0.2	0.51 ± 0.02	0.05 ± 0	61 ± 2	B1
0.24	237	Régime stable non obtenu					B1
0.21	145	144	1.5 ± 0.6	0.54 ± 0.02	0.01 ± 0	78 ± 3	B2
0.16	133	132	2.1 ± 0.2	0.53 ± 0	0.01 ± 0	69 ± 0	B2
0.16	157	156	8.6 ± 1	0.51 ± 0.02	0.05 ± 0	80 ± 6	B2
0.16	195	195	18.2 ± 0.5	0.46 ± 0.02	0.1 ± 0	90 ± 7	B1
0.12	149	149	3.2 ± 0.1	0.53 ± 0.02	0.02 ± 0	79 ± 3	B3
0.12	330	330	30.3 ± 0.1	0.44 ± 0.01	0.19 ± 0	146 ± 1	B3
0.12	339	328	24.8 ± 0.8	0.46 ± 0.02	0.15 ± 0.01	151 ± 3	B2
0.045	410	410	11.1 ± 0.5	0.44 ± 0.01	0.05 ± 0	180 ± 4	B4
0.045	527	527	25.8 ± 0.5	0.4 ± 0.03	0.14 ± 0	210 ± 8	B4
0.045	707	707	40.2 ± 0.5	0.36 ± 0.03	0.24 ± 0	251 ± 8	B4

ec : écart-type
nc : non calculé

Avec une autre source de carbone (le mélange acide acétique et acide butyrique), les mêmes comportements des cultures continues en termes de réponses à une augmentation du degré de limitation en phosphore pour différents D ont été observés. La teneur intracellulaire en PHB varie entre 0 et 40% et celle du phosphore de 43 à 251 Cmol/Pmol. Bien que la gamme testée de degré de limitation en phosphore a été nettement plus étroite qu'avec l'acide acétique comme unique source de carbone (78 à 707 Cmol/Pmol contre 78 à 2850 Cmol/Pmol), on observe qu'à même ratio $(C/P)_{cons}$, le ratio C/P intracellulaire est supérieur dans le cas du mélange Butyrate/acétate (un facteur 1,2 fois plus grand est trouvé). On peut donc supposer que la nature de la source de carbone influence le rendement $R_{Xc/P}$.

En conclusion, les cultures en chémostat ont démontré qu'en dépit de variations génotypiques une stabilité fonctionnelle du stockage de PHB a été systématiquement sélectionnée puis toujours maintenue au sein de la culture continue quelles que soient les conditions opératoires appliquées (celles conduisant à un état stable bien sûr). Cette observation est tout à fait nouvelle et aucun résultat

bibliographique n'a rapporté une telle capacité de sélection de microorganismes producteurs de PHA à partir d'un inoculum très diversifié tel que les boues activées. Seul les systèmes « feast & famine » (Albuquerque et al., 2012; Jiang et al., 2011c) ou avec alternance anaérobie/aérobie (Bengtsson, 2009) avaient montré cette capacité de sélection de producteurs de PHB. A partir de ces résultats obtenus en chémostat, il convient d'étudier plus en détails le rôle et l'effet des conditions environnementales (taux de croissance, degré de limitation en phosphore, nature de la source de carbone) sur les réponses métaboliques et le devenir du carbone (chapitres 2 et 3) mais aussi sur les dynamiques des populations microbiennes et les sélections microbiennes finales (chapitre 4).

IV. CULTURES BATCH

Les cultures batch ont été mises en place afin d'étudier les réponses dynamiques de conversion du carbone selon les populations microbiennes sélectionnées et selon les degrés de limitation de la croissance appliqués (par le phosphore et par le taux de dilution) et le rôle de la nature des sources de carbone sur cette conversion. Ainsi, l'objectif de ce mode de culture est :

(1) de qualifier la sélection microbienne par la détermination des vitesses spécifiques instantanées de production de PHB et de croissance cellulaire et par la teneur maximale de PHB pouvant être atteinte. En effet, on vise la sélection de microorganisme ayant un q_{PHBmax} le plus élevé possible.

(2) d'étudier le lien entre un état physiologique défini par un régime stable en réacteur chémostat et la dynamique en réacteur batch. En effet, ce lien nous renseigne sur le potentiel métabolique des cellules en fonction des conditions d'opération du chémostat. Cela nous permet donc de mieux comprendre le comportement du phosphore intracellulaire et la bascule croissance/stockage de PHB.

(3) d'analyser et comparer les comportements métaboliques selon les sources de carbone. Une étude croisée entre le chémostat et le batch permet d'identifier l'effet mémoire qui peut s'établir vis-à-vis d'une source de carbone.

IV.1. Démarche expérimentale menée au cours des réacteurs batch

L'inoculum utilisé pour les cultures batch est issu directement de la culture chémostat. La Figure 21 récapitule les différentes expérimentations en batch en indiquant les inocula issus des réacteurs continus.

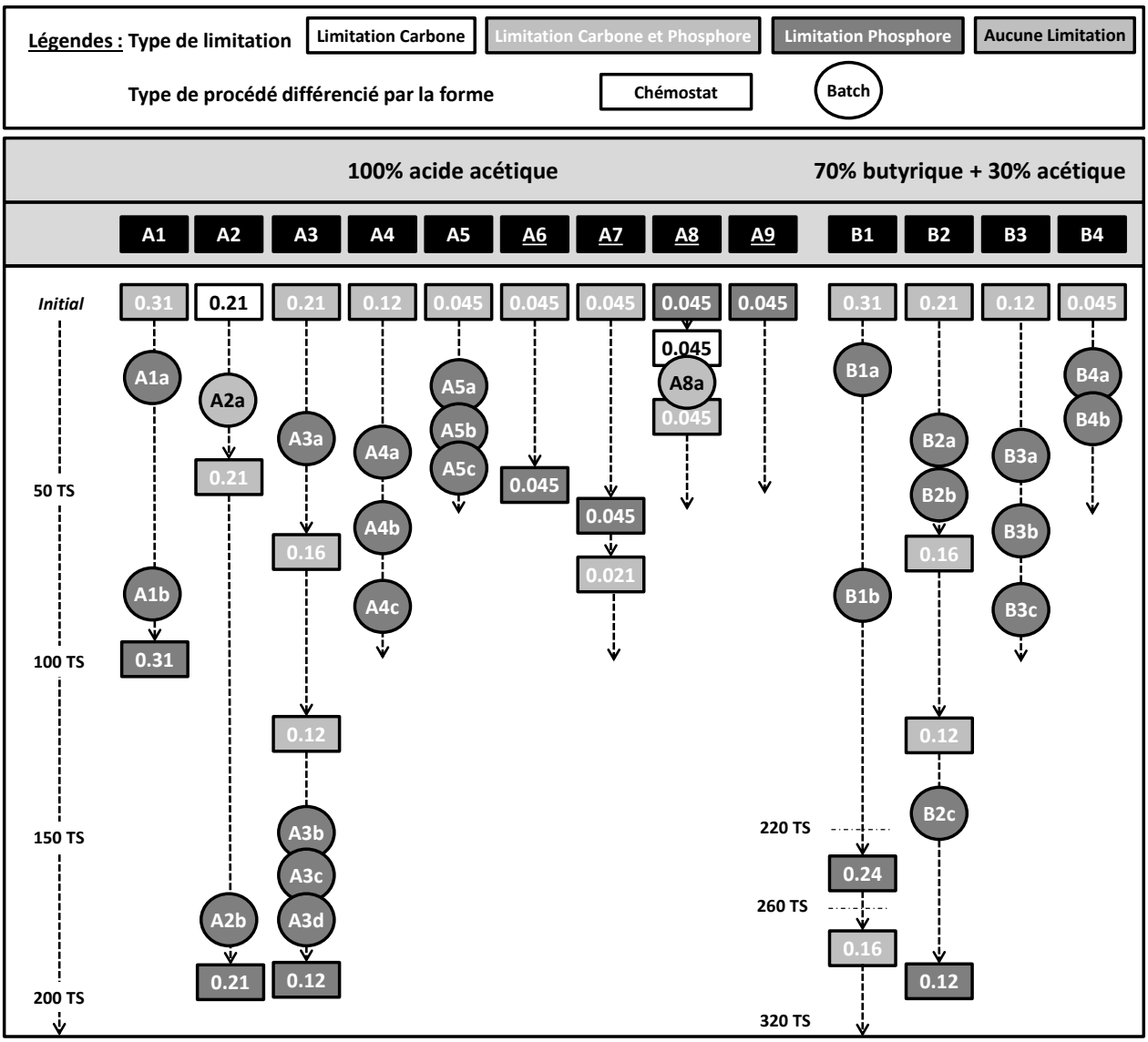

Figure 21 : Récapitulatif des expérimentations réalisées en batch à partir des cultures en chémostat selon le nombre de temps de séjour de la culture chémostat.

De manière générale, les réponses cinétiques sont étudiées sur la globalité du batch. Les évolutions au cours du temps des vitesses spécifiques de consommation des substrats, de production de PHB et de croissance cellulaire sont analysées. L'objectif est d'étudier le lien entre l'état physiologique et la composition cellulaire de l'inoculum et les réponses cinétiques dynamiques observées. L'état initial de l'inoculum du batch peut, en effet, se différencier par :

- la diversité de la population microbienne
- la source de carbone préalablement consommée (effet mémoire)
- le niveau de limitation nutritionnelle de la croissance déterminé à la fois par le taux de croissance et le $(C/P)_{app}$ préalablement imposés en chémostat.

IV.2. Analyse macro-cinétique des cultures batch

L'analyse des cultures en batch est effectuée en 2 étapes : une 1ère analyse instantanée réalisée sur la 1ère heure de la culture, puis une 2ème étape avec une analyse globale de l'évolution des paramètres tout au long de la culture batch. A titre d'exemple, la culture A2a est présentée sur la Figure 22.

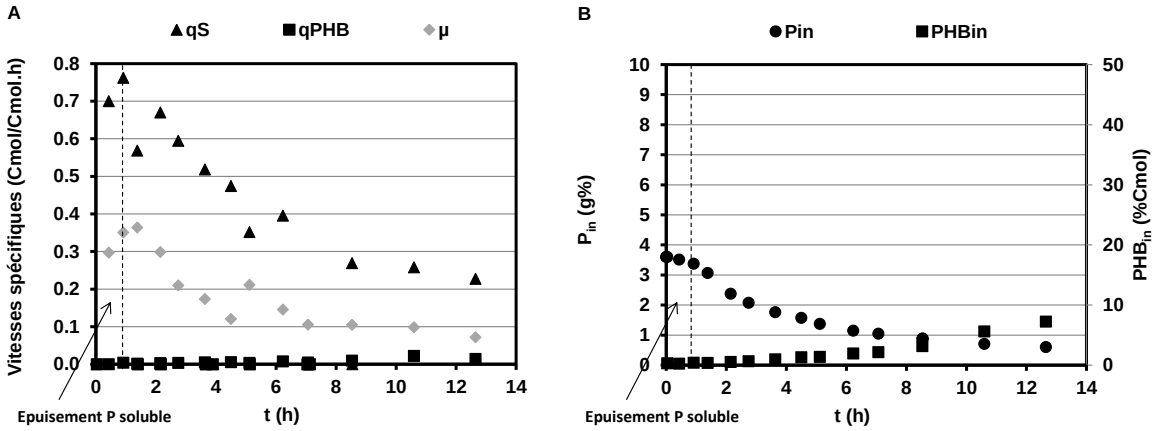

Figure 22 : Evolution des vitesses spécifiques (A) et du taux de phosphore intracellulaire (P_{in}) et du taux de PHB intracellulaire (PHB_{in}) (B) au cours du batch A2a

Il s'agit d'une culture où initialement un excès de phosphore est présent dans le surnageant. Ainsi, la première réponse est en fait une croissance cellulaire avec un taux de croissance maximal mesuré de 0,38 h^{-1} et une vitesse maximale d'assimilation du substrat (AA) de 0,87 h^{-1}. Dès l'entrée en limitation phosphore, un maintien de la croissance cellulaire est observé avec une chute du P_{in} progressive tendant vers une valeur minimale de 0,5%. Aucun déclenchement drastique de PHB n'est observé. Un q_{PHBmax} de 0,03 h^{-1} est mesuré. Pour montrer un exemple contraire, l'évolution des paramètres mesurés au cours de la culture batch B1a est représentée sur la Figure 23.

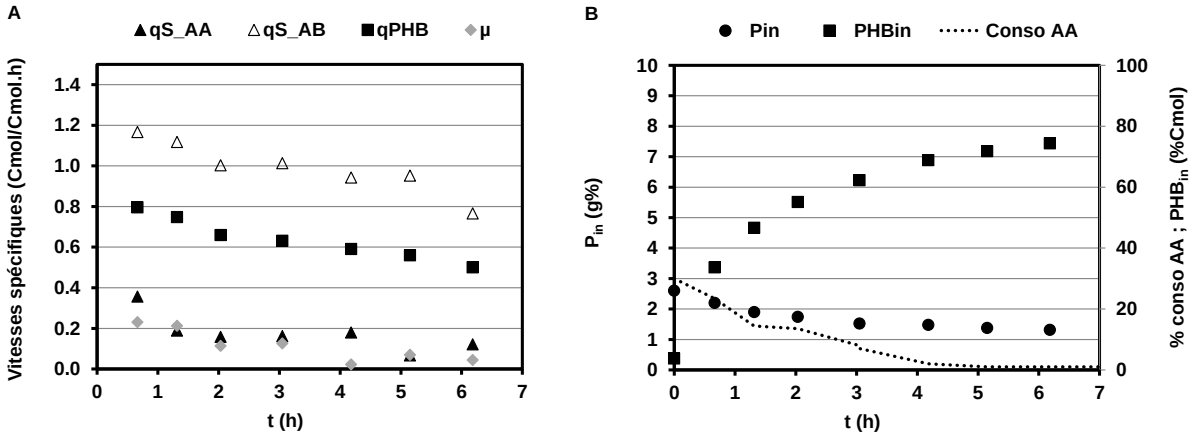

Figure 23 : Evolution des vitesses spécifiques (A) et du taux de phosphore intracellulaire (P_{in}), du taux de PHB intracellulaire (PHB_{in}) et de la proportion de consommation du substrat AA par rapport à la totalité des substrats (B) au cours du batch A7a

Les paramètres cinétiques maximaux sont mesurés durant la première heure de la culture expliquant la première analyse instantanée réalisée au cours de toutes les expérimentations en batch. Une vitesse spécifique maximale de production de PHB est mesurée de 0,8 h^{-1}, initialement puis décroissante pendant les 7 h de culture jusqu'à une valeur de 0,45 h^{-1}. La teneur intracellulaire en PHB tend vers une valeur maximale de 90%. La croissance cellulaire diminue tout au long de la culture avec une diminution progressive du P_{in}, comme observée précédemment. Le mélange de substrat carboné (AA + AB), présent en excès dans le milieu de culture, est consommé dans les mêmes proportions que dans la culture continue mettant en évidence l'effet mémoire des voies métaboliques des populations. En 4 h, la proportion de la consommation de l'AA chute de 30 à 0% progressivement montrant l'affinité supérieure pour l'acide butyrique, dans ces conditions opératoires, pour ces populations microbiennes sélectionnées.

En conclusion, les régimes dynamiques permettent de renseigner sur l'état physiologique des populations microbiennes imposé par les conditions dans les réacteurs chémostat. Ainsi, les liens seront surtout analysés et établis entre les vitesses spécifiques de production de PHB et de consommation des substrats, les populations microbiennes sélectionnées et leurs paramètres intracellulaires associés. Par cette première étude, des réponses métaboliques très différentes ont été observées. Il sera étudié par la suite en détail les raisons de ces différences observées.

V. CONCLUSION

Dans cette première partie, l'ensemble des expérimentations ont été décrites et analysées. Le fed-batch permet d'étudier les dynamiques de croissance et de production de PHA et d'aller aux limites du système en termes d'accumulation intracellulaire de PHB. Quant au chemostat, il permet de s'affranchir de l'historique cellulaire et de stabiliser les microorganismes dans un état physiologique choisi. Le plan d'expérience mis en place permet de balayer une grande plage de ces différents états qui montrent des performances de productivités et de teneurs intracellulaires de PHB très élevées. Ils pourront être utilisés pour évaluer la pertinence de ce mode de production à une échelle industrielle.

Les cultures fed-batch ont permis de dégager de premiers indices concernant les problématiques du phosphore en tant qu'élément limitant sur la sélection microbienne de microorganismes producteurs ainsi que sur les réponses intracellulaires du devenir du carbone. Cependant il est difficile de savoir au sein d'une population productrice les comportements intracellulaires du fait de la diversité microbienne (au sein des producteurs et des non producteurs de PHA), de la dynamique de cette diversité au cours des cultures et de l'historique cellulaire. On voit ici les limites d'un mode fed-batch en culture mixte pour étudier de manière approfondie les paramètres cinétiques impliqués dans la production de PHB.

La mise en œuvre des cultures continues a confirmé l'importance et le rôle essentiel de la limitation phosphore à la fois sur l'enrichissement et la sélection de producteurs, et sur le stockage de PHB. L'intensité du degré de limitation joue clairement un rôle essentiel sur la conversion du substrat carboné en PHB et biomasse catalytique.

Les cultures en batch réalisées à partir des sélections microbiennes obtenues en chémostat ont montré la forte réponse dynamique de stockage de PHB lors de condition de carence en phosphore et d'excès de carbone. Cependant, l'intensité de cette réponse est tout de même souches sélectionnées dépendantes.

Par une analyse plus détaillée des réponses métaboliques de ces trois modes de cultures, les prochains chapitres permettront d'étudier le rôle, l'importance de la limitation phosphore sur la conversion du carbone et les conséquences engendrées sur les réponses métaboliques et les réorganisations intracellulaires associées. Cette analyse s'appuiera sur l'utilisation d'un modèle cinétique, établi à partir des mécanismes observés.

Chapitre 2. Etude des paramètres gouvernant la conversion du carbone sous limitation carbone et/ou phosphore

I. INTRODUCTION

L'analyse des paramètres macro-cinétiques a révélé des cinétiques de conversion du substrat carboné en PHB et biomasse catalytique dépendantes du degré de limitation en phosphore et du taux spécifique de croissance. En cohérence avec la notion de double limitation proposée par Egli (1999), nous avons recherché les frontières entre les zones définies par la nature de la limitation de la croissance avec l'acide acétique comme unique source de carbone : zone de limitation unique par le C, zone de double limitation C&P, zone de limitation par le P uniquement. Dans chacune de ces zones, la répartition de la conversion du carbone est étudiée à travers l'analyse des rendements observés de biomasse catalytique et de production de PHB. Ensuite, le comportement du taux de phosphore intracellulaire selon le degré de limitation et selon le taux de dilution est analysé. A partir de ces observations et d'observations rapportées par quelques travaux de la littérature, nous avons construit un modèle cinétique dont l'objectif est d'aider à la compréhension des processus de dilution intracellulaire du phosphore et de stockage de PHB. Ce modèle a également pour ambition de comprendre et prédire les comportements microbiens d'organismes producteurs et non producteurs selon les conditions opératoires en réacteur continu ou discontinu.

II. LES ZONES DE LIMITATION NUTRITIONNELLES

II.1. Mise en évidence et définition des zones de limitation selon le taux de dilution

La conduite des cultures en réacteur continu à différents $(C/P)_{app}$ a permis de déterminer les différentes gammes possibles de limitations nutritionnelles de la croissance selon le taux de dilution appliqué et pour la population mixte sélectionnée.

II.1.a *Exemple de résultats pour D = 0,21h^{-1} et 0,045 h^{-1}*

A titre d'exemple, les zones caractérisées par les trois types de limitation nutritionnelle sont présentées pour les expériences réalisées aux taux de dilution de 0.21 h^{-1} et 0.045 h^{-1}. Ainsi, la Figure 24 montre les concentrations résiduelles en phosphore et en AA obtenues à chaque régime stable pour D = 0,21 h^{-1} (A) et D = 0,045 h^{-1} (B) représentés en fonction du degré de limitation phosphore appliqué ($(C/P)_{app}$). La zone de double limitation C&P de la croissance est matérialisée en gris sur le graphique.

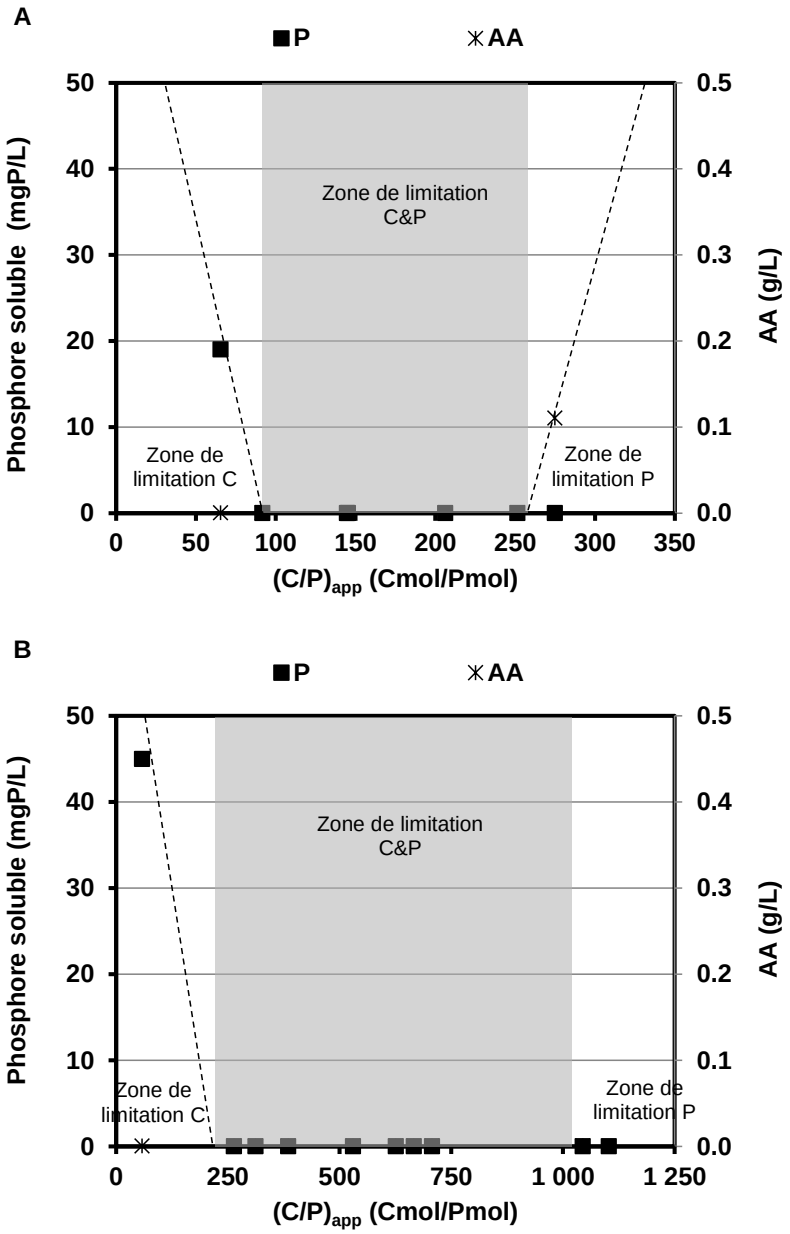

Figure 24 : Concentrations résiduelles en phosphore et en carbone (AA) selon le degré de limitation appliqué pour les taux de dilution de 0,21 h^{-1} (A) et 0,045 h^{-1} (B)

Pour chaque taux de dilution, un comportement typique a été mis en évidence :

(1) $(C/P)_{app} < (C/P)_{cons}$: une zone de limitation de la croissance par la source de carbone à faible ratio C/P avec une diminution progressive du P résiduel dans le surnageant lors de l'augmentation du $(C/P)_{app}$;

(2) $(C/P)_{app} = (C/P)_{cons}$: une gamme de $(C/P)_{app}$ où ni phosphore ni carbone (AA) n'est détecté dans le surnageant, gamme que nous identifions alors comme une zone de double limitation nutritionnelle ;

(3) $(C/P)_{app} > (C/P)_{cons}$: une zone de limitation phosphore caractérisée par la présence d'AA résiduel dans le surnageant de culture à une concentration supérieure à la limite de détection.

Document confidentiel

Dans le cas du D = 0,045 h^{-1} (Figure 24B), aucune évolution du carbone résiduel ne peut être représentée dans la zone de limitation phosphore unique. Comme expliqué précédemment (Figure 19), aucun régime stable dans cette zone n'a pu être atteint du fait de l'inhibition de la croissance cellulaire par le substrat carboné.

II.1.b *Illustration pour tous les taux de dilution*

Afin de définir la zone de double limitation carbone et phosphore, les ratios C/P consommés ont été calculés et sont représentés dans la Figure 25 selon les taux de dilution. Ces résultats regroupent donc toutes les valeurs obtenues pour les différentes sélections microbiennes stabilisées en réacteur continu. A titre de comparaison, les résultats de la thèse de (Frank, 1999) obtenus avec *Acinetobacter spp.* représentant les frontières entre les zones pour les taux de dilution de 0,185 h^{-1} et 0,1 h^{-1} ont été ajoutés au graphique. Ainsi, en considérant un comportement de cette population similaire au comportement des populations sélectionnées au cours de nos travaux, il est possible de délimiter cette zone de double limitation de la croissance. Avec *Acinetobacter spp.,* Hao et Chang (1987) ont étudié quatre concentrations différentes de phosphore dans l'alimentation, donc 4 niveaux de limitation en phosphore à 9 taux de dilution (de 0,042 à 0,67 h^{-1}) avec AA comme source de carbone. A partir de ces résultats, ils ont obtenu des conditions de croissance limitées par le carbone et le phosphore représentées sur la Figure 25.

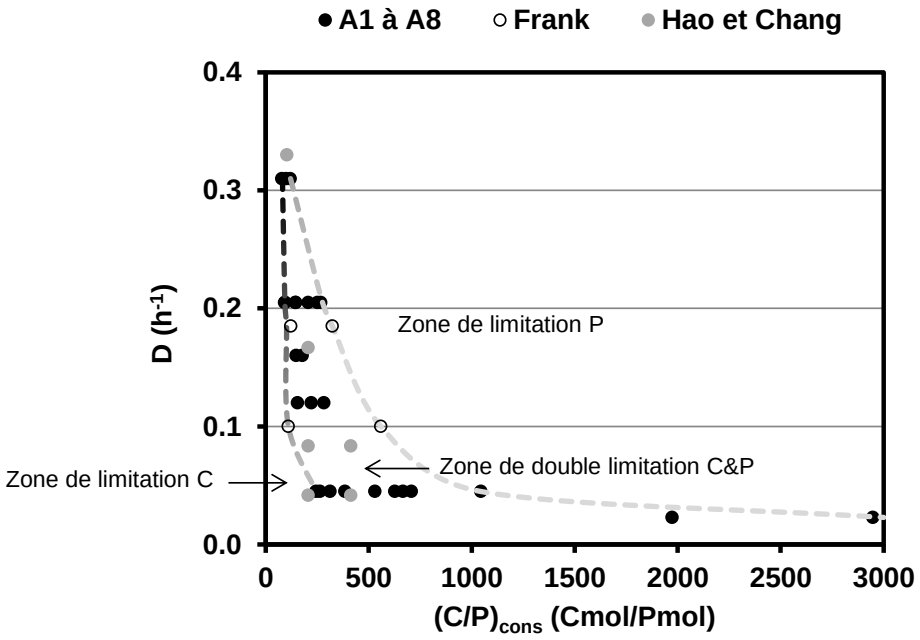

Figure 25 : Forme de la zone de double limitation carbone et phosphore obtenue à partir des données issues des régimes stables en chémostat (cercles noirs) ; Cercles blancs = résultats tirés de la Thèse de Frank (1999) ; Cercles gris résultats tirés des travaux de Hao et chang (1987)

La zone de double limitation devient d'autant plus large que le taux de dilution diminue. Au contraire, cette zone rétrécit à taux de dilution élevé et est non détectable lorsque le taux de dilution est proche du taux de croissance maximum, ce qui donne une forme « banane », telle qu'observée par Zinn et al. (2004) avec d'autres types de limitation.

II.2. Caractéristiques de la zone de double limitation

Les résultats obtenus à partir de cultures mixtes (non axéniques) via une large gamme de taux de dilution ont démontré l'existence d'une zone de croissance de double limitation similaire à celles observées en culture pure. En outre, la zone de DLN identifiée dans notre travail, a été observée dans le cas d'une limitation C&P contrairement à celle classiquement mis en évidence pour une double limitation C&N (Durner et al., 2000; Egli, 1991; Huijberts et Eggink, 1996; Preusting et al., 1991; Zinn et al., 2004).

Comme le montre la Figure 25, avec AA comme substrat carboné, des frontières entre les zones cohérentes avec celles de nos travaux ont été observées par Frank, (1999) avec *Acinetobacter spp.*, pour des taux de dilution de 0,185 h^{-1} et 0,1 h^{-1}. Quelques autres résultats de dépendance entre D et $(C/P)_{cons}$ ont été rapportés sous double limitation C&P mais avec un nombre limité de taux de dilution et pour des bactéries du genre *Acinetobacter* (Bonting et al., 1992; Hao et Chang, 1987) ou *Pseudomonas* (Pengerud et al., 1987; Zinn et al., 2011). Toutes les conditions obtenues au cours des travaux de Hao et Chang se situent à l'intérieur de la zone de double limitation. Pour un D = 0,045 h^{-1}, la frontière entre la zone de limitation C et C&P a été calculée à 245 Cmol/Pmol via l'expérimentation A8.

En outre, la largeur de la zone de double limitation dépend également de la nature des éléments nutritifs limitants. Par exemple, dans le cas d'une limitation de la croissance par le carbone et l'azote, la zone de double limitation varie entre 6 et 30 Cmol/Nmol selon le taux de dilution alors que dans le cas d'une limitation carbone et phosphore, la plage de degré de limitation C/P qui peut être appliquée est au moins de 80 à 3000 Cmol/Pmol. Par conséquent, la capacité d'adaptation des souches face à une limitation C&P est 7 fois plus importante que sous une limitation C&N. Cela peut être expliqué par la différence entre les besoins en azote et en phosphore pour assurer la croissance cellulaire. La limitation en azote affecte la synthèse des protéines alors que la limitation en phosphore retarde seulement la synthèse des acides nucléiques et/ou la production d'énergie (Cooney et Wang, 1976). Ainsi, la limitation phosphore offre une plus grande flexibilité à la croissance cellulaire par rapport à la limitation azote.

Pour les autres études précédemment citées, il est plus compliqué de comparer les résultats de $(C/P)_{cons}$ en fonction du D avec les nôtres car la source de carbone et d'énergie est différente. Comme formulée par Zinn et al. (2004), la nature de cette source de carbone et d'énergie influence le rendement cellulaire, et ainsi, déplace la zone de double limitation d'autant plus vers la droite sur la Figure 25 que le degré d'oxydation du substrat est élevé.

En conclusion, dans des conditions de croissance limitées par le carbone et le phosphore, les cellules sélectionnées ont une certaine plasticité vis-à-vis du phosphore, et ainsi, une capacité à réorganiser le contenu intracellulaire afin d'assurer une division cellulaire aussi maximale que possible. Cette plasticité est toutefois considérablement réduite lorsque le taux de dilution appliqué est proche de la vitesse de croissance spécifique maximale. Il convient donc, pour la suite, d'étudier sous double limitation carbone et phosphore, selon le degré de limitation en phosphore et le taux de croissance : (1) la répartition du carbone consommé entre croissance, stockage de PHB et maintenance cellulaire, (2) la plasticité du phosphore intracellulaire au travers de l'évolution du taux de phosphore intracellulaire.

III. ANALYSE STŒCHIOMETRIQUE SOUS DOUBLE LIMITATION CARBONE ET PHOSPHORE

III.1. Rendements observés dans les zones de limitation nutritionnelle

Egli (1991) a souligné que, dans une condition de limitation de la croissance par un élément unique, les cellules présentaient une composition cellulaire globale assez constante (N, protéines et produits de stockage contenus), alors que pour une condition de double limitation, leur composition dépendait fortement du ratio des substrats limitants et s'ajustait à la disponibilité réelle des deux éléments nutritifs. La Figure 26 montre l'évolution des rendements observés de X_C et de PHB par rapport au substrat ($R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$, respectivement) et de X_C par rapport au phosphore ($R_{Xc/P}$) avec D = 0,045 h^{-1}. Le rendement $R_{Xc/P}$ représente l'inverse du taux de phosphore intracellulaire (P_{in}).

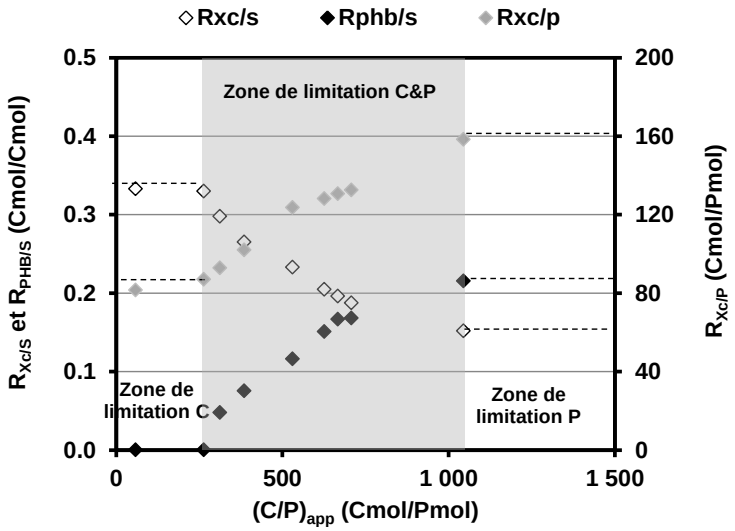

Figure 26 : Rendements observés de X_C et du PHB par rapport au substrat ($R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$, respectivement) et de la X_C par rapport au phosphore ($R_{Xc/P}$) en fonction du degré de limitation phosphore appliqué ($(C/P)_{app}$) pour une culture continue conduite à D = 0,045 h^{-1} ; la zone de DLN est représentée en gris ; les lignes pointillées simulent les évolutions des rendements observés théoriques dans les zones de limitation carbone ou phosphore

L'augmentation du degré de limitation en phosphore a entraîné la diminution du rendement de croissance observé, une augmentation du rendement observé en PHB par rapport au substrat, et une augmentation du rendement de la biomasse catalytique par rapport au phosphore.

Cette dernière observation traduit donc une diminution du taux de phosphore intracellulaire et donc un changement dans la composition élémentaire en phosphore de la biomasse catalytique. En parallèle de cette augmentation de $R_{Xc/P}$ lors de l'augmentation du degré de limitation en phosphore, la conversion du carbone est plus orientée vers la production de PHB au dépend de la production de cellules catalytiques. De plus, de manière remarquable, l'efficacité de conversion globale du substrat carboné en carbone particulaire (X_c + PHB) est relativement constante quel que soit le degré de limitation en carbone, comme souligné par Egli (1991).

Il est utile de rappeler que ce comportement a été observé au cours de nos travaux pour des souches sélectionnées différentes et pour une croissance limitée par le C&P. Ces évolutions montrent donc un comportement relativement généralisé de la réponse de bactéries qui stockent du PHB face à une limitation nutritionnelle. Cependant, l'amplitude de cette réponse dépend de la nature et du degré de limitation de l'élément qui limite la croissance ainsi que du taux spécifique de croissance. Des paramètres cinétiques de chaque souche sélectionnée pourraient alors avoir une influence non pas sur la nature des réponses cinétiques mais sur leurs amplitudes de variations.

III.2. Devenir du carbone dans la zone de double limitation C&P

III.2.a *Répartition du carbone entre croissance et production de PHB*

La Figure 27 montre l'évolution des rendements observés de la croissance et la production de PHB selon le degré de limitation phosphore pour 2 taux de dilution (0,21 et 0,31 h^{-1}).

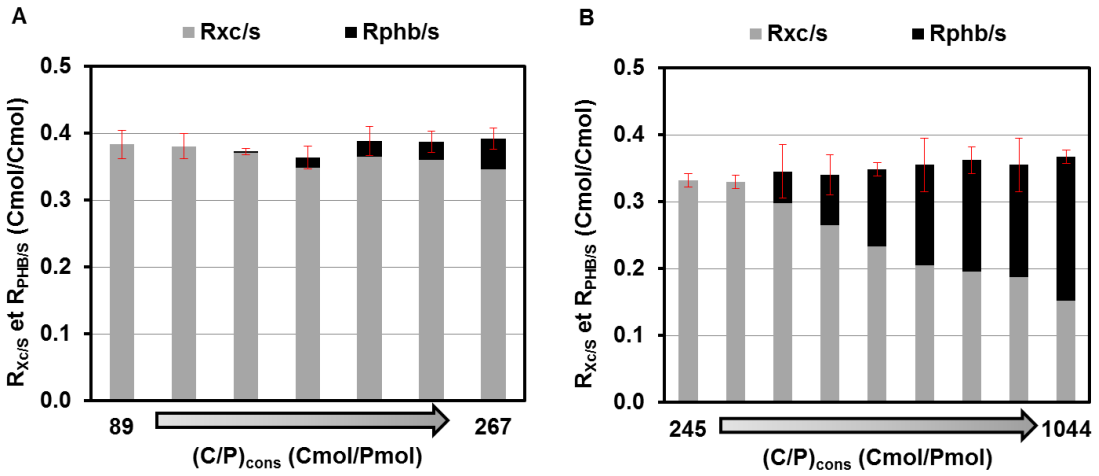

Figure 27 : Evolution des rendements observés en biomasse catalytique et PHB par rapport au substrat carboné selon le degré de limitation en phosphore pour D = 0,21 h^{-1} (A) et D = 0,045 h^{-1} (B)

Document confidentiel

L'augmentation du degré de limitation en phosphore induit une redirection du carbone vers la production de PHB au dépend de la production de cellules catalytiques avec un rendement particulaire total (X_C + PHB) d'environ 0,38 Cmol/Cmol avec D = 0,21 h^{-1} et variant de 0,33 à 0,37 Cmol/Cmol avec D = 0,045 h^{-1}.

Pour une vision globale de l'ensemble des résultats, les évolutions des rendements observés $R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$ obtenus pour les taux de dilution testés en chémostat ont été tracés en fonction du degré de limitation consommé ($(C/P)_{cons}$) sur la Figure 28.

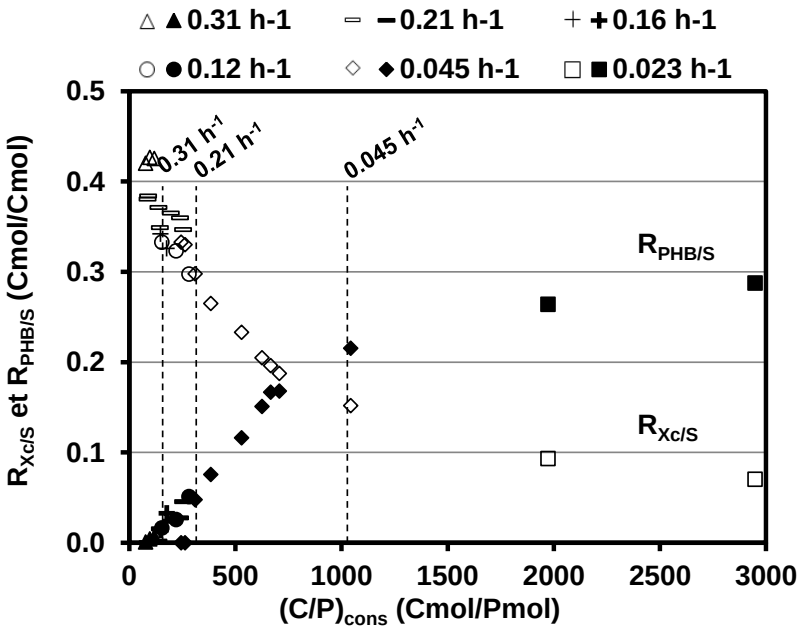

Figure 28 : Evolution des rendements observés de biomasse catalytique et du PHB par rapport au substrat ($R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$, respectivement) en fonction du degré de limitation phosphore consommé ($(C/P)_{cons}$) pour tous les taux de dilution testés ; les traits en pointillés représentent les limites de la zone de double limitation selon le D

Comme attendu, une valeur élevée de $R_{Xc/S}$, proche du rendement théorique limite de croissance de *C. necator* (0,5 Cmol/Cmol déterminée sur la base d'un modèle métabolique par Grousseau (2012)), a été mesurée à D = 0,31 h^{-1}, condition qui correspond à un très faible degré de limitation en phosphore sans quantité significative de PHB produit. Ensuite, une diminution des valeurs de $R_{Xc/S}$ et une augmentation des valeurs de $R_{PHB/S}$ ont été observées avec l'incrémentation du niveau de la limitation en phosphore et la diminution du taux de dilution. Compte tenu des allures des courbes de $R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$ de la Figure 28, une forte diminution de $R_{Xc/S}$ concomitante à une forte augmentation de $R_{PHB/S,}$ pour une petite diminution du niveau de limitation en phosphore n'a été observée que pour des taux de dilution élevés et des faibles valeurs de $(C/P)_{cons}$ (< 500 Cmol/Pmol).

Une caractéristique inverse a été observée pour des valeurs faibles de D et des degrés de limitation supérieurs à 1000 Cmol/Pmol. Donc, plus le taux de dilution est élevé, plus une petite augmentation du

degré de limitation en phosphore se traduit par une forte augmentation de la production de PHB. A un taux de dilution de 0,021 h^{-1}, pour un degré de limitation très élevé, le $R_{Xc/S}$ a chuté jusqu'à 0,08 Cmol/Cmol, correspondant à une teneur en PHB intracellulaire de 78% (Cmol/Cmol). En raison de la tendance asymptotique de la courbe $R_{Xc/S} = f((C/P)_{cons})$, du D faible appliqué et du $(C/P)_{app}$ élevé, la valeur de 0,08 Cmol/Cmol est probablement proche de la valeur de $R_{Xc/S}$ minimale qui peut être atteint dans un réacteur chemostat. En effet, la teneur en PHB de 78% intracellulaire est proche de la teneur intracellulaire maximale reportée.

Pour un même niveau de limitation en phosphore, la valeur de $R_{PHB/S}$ peut être différente selon le taux de dilution. En effet, pour un même niveau de limitation en phosphore de 270 Cmol/Pmol, la valeur de $R_{PHB/S}$ est nulle à D = 0,045 h^{-1} alors qu'elle est de 0,03 Cmol/Cmol (10% de teneur en PHB intracellulaire) à D = 0,21 h^{-1}. Ce résultat traduit un effet du taux de croissance sur le déclenchement de la production de PHB. Il existe donc une dépendance entre le taux de croissance imposé et la réponse métabolique conduisant au stockage de PHB face à la limitation en phosphore qui sera analysée en détail par la suite.

III.2.b *Notions de maintenance cellulaire*

Une distribution des valeurs de $R_{Xc/S}$ à faible valeur de $(C/P)_{cons}$ pour chaque taux de dilution est constatée : 0,43 Cmol/Cmol lorsque D = 0,31 h^{-1} ; 0,38 Cmol/Cmol lorsque D = 0,21 h^{-1} et 0,33 Cmol/Cmol lorsque D = 0,045 h^{-1} (Figure 27). Aucune production de PHB n'est détectée pour ces régimes.

La diminution de $R_{Xc/S}$ avec la diminution du taux de dilution résulte de l'effet classique des exigences de maintenance, comme décrit par Pirt, 1975; Tempest, 1978. Avec un rendement théorique limite de 0,5 Cmol/Cmol sur acide acétique (Grousseau, 2012), le rendement observé à D = 0,31 h^{-1} représente 94%, alors qu'à D = 0,045 h^{-1}, il représente 76% du rendement théorique limite. Des résultats similaires ont été rapportés par Frank (1999) et Durner et al. (2000). Par exemple, sous limitation unique de carbone avec *A. johnsonii* et AA comme source de carbone, Frank (1999) a observé que la valeur la plus basse de $R_{Xc/S}$ (mesurées à D = 0,07 h^{-1}) représentait 60% de la valeur maximale (0,49 Cmol/Cmol) mesurée à D = 0,55 h^{-1}, valeur proche du taux de croissance maximale des bactéries.

Pour un même taux de dilution, une légère augmentation du rendement total (X_C + PHB) est constatée avec l'augmentation du degré de limitation phosphore, comme le montre la Figure 27.

En représentant le coefficient de maintenance pour le taux de dilution 0,045 h^{-1}, selon le degré de limitation en phosphore, et le $R_{Xc/P}$ correspondant (Figure 29), la valeur de ce coefficient varie linéairement entre 0,045 et 0,11 Cmol/Cmol.h dans la zone de double limitation nutritionnelle. La limitation phosphore augmente d'un facteur 2,5 le coefficient de maintenance cellulaire.

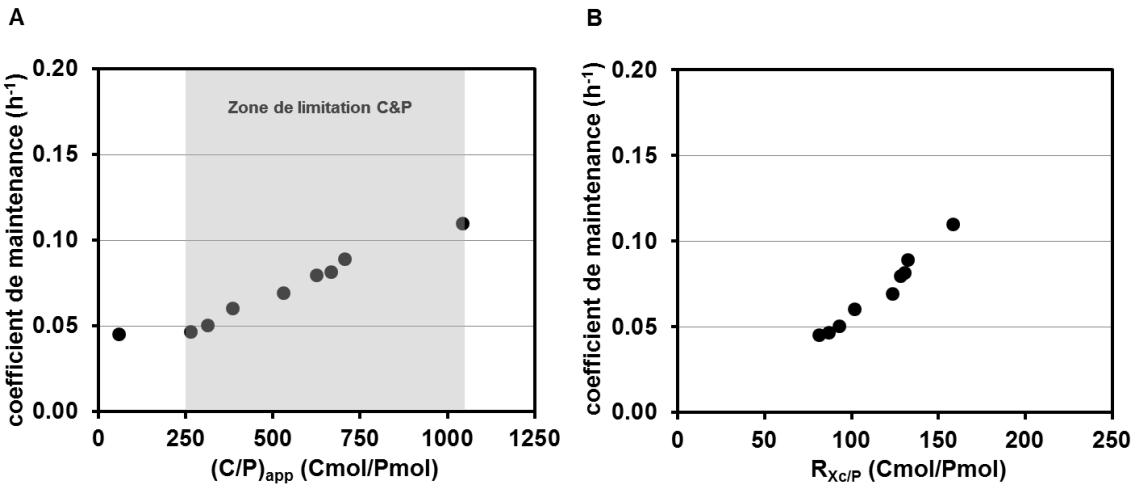

Figure 29 : Evolution du coefficient de maintenance selon le $(C/P)_{app}$ (A) et le $R_{Xc/P}$ (B) pour tous les régimes obtenus lorsque D = 0,045 h-1

Neijssel et Tempest, 1976 montrent que la vitesse spécifique de consommation d'oxygène sous limitation phosphore est nettement plus importante (facteur 6) que sous limitation carbone à faibles taux de dilution. Comme peu d'études ont balayé des gammes de taux de dilution en limitation phosphore pour la production de PHB, il est difficile de calculer et de comparer les coefficients de maintenance avec nos résultats.

En conclusion, l'étude du devenir du carbone selon les conditions opératoires à partir d'acide acétique comme source de carbone a ainsi révélé :

(1) l'effet du degré de limitation en phosphore. La production de PHB est d'autant plus favorisée, au dépend de la croissance microbienne, que le degré de limitation de la croissance par le phosphore est important. La maintenance cellulaire augmente d'un facteur 2,5 en condition de limitation phosphore uniquement.

(2) l'effet du taux spécifique de croissance. En chémostat, le potentiel de redirection du carbone vers la production de PHB au dépend de la biomasse catalytique est d'autant plus important que le taux de dilution est faible. Cette répartition est taux de dilution dépendante et donc taux spécifique de croissance dépendant.

Le phosphore intracellulaire semble être la clé de la compréhension de la bascule croissance/stockage de PHB. C'est pourquoi le devenir du phosphore intracellulaire selon les conditions opératoires est étudié en détail.

III.3. Etude de la dilution intracellulaire du phosphore en conditions de limitation de la croissance

La Figure 30 représente l'évolution du rendement observé $R_{Xc/P}$ (inverse du taux de phosphore intracellulaire) pour tous les taux de dilution testés.

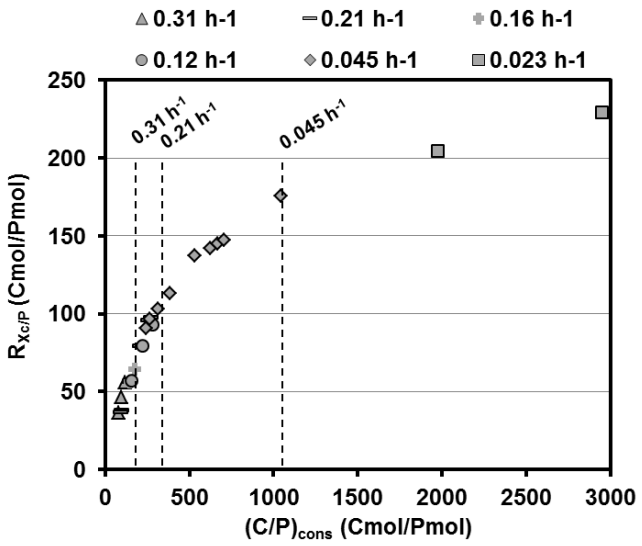

Figure 30 : Evolution du rendement observé de la biomasse catalytique par rapport au phosphore ($R_{Xc/P}$) selon le ratio C/P consommé pour l'ensemble des taux de dilution appliqués ; les traits en pointillés représentent la frontière entre la zone de double limitation et de limitation phosphore pour chaque D indiqué

Pour D = 0,31 h^{-1}, la zone de double limitation révèle un $R_{Xc/P}$ variant de 37 à 55 Cmol/Pmol (correspondant à P_{in} = 3,8 et 2,5%) alors que pour un D = 0,045 h^{-1}, celui-ci varie de 90 à 175 Cmol/Pmol (correspondant à P_{in} = 1,5 et 0,8%). A chaque taux de dilution, une réorganisation intracellulaire du phosphore est mise en évidence selon le degré de limitation en phosphore et dépend du taux de dilution imposé. Cela implique que :

- la réorganisation intracellulaire potentielle du phosphore est d'autant plus importante que le taux de dilution est faible, rappelant l'élargissement de la zone de double limitation pour les taux de dilution plus faibles,
- le besoin en P est taux de croissance dépendant, que l'on nommera par la suite le P_{in_max},
- il existe un besoin minimal en phosphore pour qu'une division cellulaire puisse avoir lieu, que l'on nommera par la suite le P_{in_min}.

À un niveau très élevé de degré de limitation en phosphore (lorsque le taux de dilution est le plus faible), le $R_{Xc/P}$ atteint 230 Cmol/Pmol, une asymptote (correspondant à 0,6% de taux de phosphore intracellulaire). Cette valeur est sans doute proche de la plus faible teneur en phosphore assurant une vitesse de croissance cellulaire non nulle. Elle sera par la suite appelée **Pin_crit** et estimée à 300

Cmol/Pmol soit environ 0,004 gP/gX_C. Bien que des valeurs plus faibles de taux de phosphore intracellulaire critiques aient été rapportées, ces dernières n'ont pas été obtenues en culture continue. Par exemple, en culture fed-batch, Grousseau (2012) rapporte des valeurs comprises entre 65 et 500 Cmol/Pmol selon le degré de limitation phosphore appliquée avec *C. necator*. La valeur de 500 Cmol/Pmol a été calculée pour une culture sans apport de phosphore (carence). Des résultats similaires (515 Cmol/Pmol) ont été rapportés (Makino et Cotner, 2004; Tezuka, 1990), mais dans ces cas, il n'est pas clair si les auteurs ont exclu les composés de stockage de la biomasse totale en vue d'examiner seulement la biomasse catalytique.

IV. ANALYSE CINETIQUE SELON LA LIMITATION NUTRITIONNELLE

Cette partie d'analyse cinétique a pour objectif de déterminer les lois cinétiques qui régissent les comportements de croissance et stockage selon les degrés de limitation en P_{in}. Pour cela, nous allons définir tout d'abord les besoins en phosphore selon le taux de croissance. Cette étude nous conduira à qualifier les bornes minimales et maximales de ces besoins. Ensuite, nous verrons comment le carbone est orienté de la croissance cellulaire vers le stockage selon la teneur intracellulaire en phosphore. Cette réorientation en flux sera étudiée au travers des valeurs des q_{PHB} observés en régime dynamique lors des expérimentations en batch utilisant les inocula produits par les expérimentations en chémostat.

IV.1. Besoin en phosphore selon le taux de croissance

La Figure 31 récapitule les valeurs de P_{in_min} et P_{in_max} observées pour les taux de dilution appliqués.

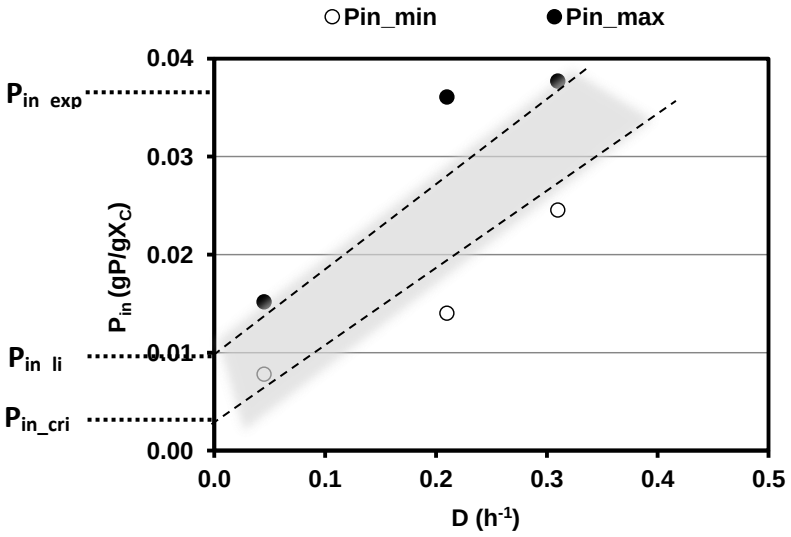

Figure 31 : Représentation des taux de phosphore intracellulaires minima et maxima, observés respectivement en conditions de limitation phosphore et en condition de limitation en carbone, en fonction des taux de dilution appliqués ; les traits en pointillés ainsi que la zone grise montrent une estimation de la zone de DLN.

D'après la Figure 31, le P_{in_min} et P_{in_max} dépend de la nature et du degré de la limitation de la croissance. Ces deux taux sont d'autant plus faibles que le taux de croissance est faible. L'assimilation du phosphore dépend donc des besoins en phosphore pour la croissance cellulaire et des conditions environnementales. En effet, en limitation carbone uniquement, le $R_{Xc/P}$ à D = 0,31 h^{-1} est de 33 Cmol/Pmol (P_{in} = 3,8%) alors qu'à un D = 0,045 h^{-1}, il est de 85 Cmol/Pmol (P_{in} = 1,5%), soit un taux de phosphore intracellulaire 2,5 fois plus faible. Ainsi, ce résultat met en évidence que le taux de phosphore maximal (noté $\mathbf{P_{in_max}}$) est D dépendant, valeur d'autant plus grande que le D est élevé. La littérature indique que le taux de croissance spécifique élevé nécessite une teneur élevée en ARN et inversement, phénomène appelé le « growth rate hypothesis » (Ehlers et al., 2010; Elser et al., 2000b; Løvdal et al., 2008). Le pourcentage massique élevé de P dans les acides nucléiques (9%), ainsi qu'une variation importante du taux d'ARN, induit donc une importante variation du P_{in} selon le taux de croissance.

Basé sur la compartimentation du phosphore particulaire de Fush (1969), une limitation en phosphore affecte théoriquement en premier les composés de stockage, puis les composés fonctionnels et de structure engendrant une diminution du taux de croissance et une variation du taux de phosphore intracellulaire entre une valeur maximale et minimale (constantes). Pour voir spécifiquement la variation de phosphore intracellulaire liée aux pools d'ARN, les composés de stockage doivent être exclus. L'expérimentation A8, ayant mis en évidence ce besoin moindre en phosphore à un faible taux de croissance (0,045 h^{-1}) a été conduite sous une dynamique de limitation phosphore imposée. En effet, cette expérience a été menée, dans un premier temps sous forte limitation phosphore, puis sous limitation carbone unique. Une telle dynamique du degré de limitation phosphore favorise une organisation du phosphore intracellulaire qui exclue l'accumulation de composés de stockage du phosphore. Ce comportement a été observé par Hao et Chang (1987). Dans leur étude, lorsque le chémostat est conduit sous excès de phosphore, le taux de phosphore intracellulaire varie entre 3,5 et 4,5%. Au contraire, lorsque les cellules sont conduites sous une condition de limitation phosphore décroissante, le taux de phosphore à partir duquel ils détectent du phosphore dans le surnageant est bien plus faible que le taux de phosphore déterminé en condition non limitante de phosphore. Ce décalage est expliqué par l'absence de molécules de phosphore dites de stockage.

Ainsi, nos expérimentations ont permis de mettre en évidence les variations des P_{in_min} et P_{in_max}, principalement associées aux pools d'ARN assurant la fonction de la cellule. Ce $\mathbf{P_{in_max}}$ varie entre une valeur de P_{in} nécessaire lorsque $\mu = \mu_{max}$ ($\mathbf{P_{in_exp}}$) estimée à 3,8% et une valeur limite ($\mathbf{P_{in_lim}}$) lorsque μ tend vers 0, estimée à 1% (Franklin et al., 2011). Sous limitation P uniquement, à chaque D appliqué, un minimum de phosphore intracellulaire ($\mathbf{P_{in_min}}$) est nécessaire afin d'assurer la croissance cellulaire imposée par le procédé. Cette valeur est donc taux de croissance dépendante et tend vers une valeur critique ($\mathbf{P_{in_crit}}$) estimée à 0,4% lorsque le μ tend vers 0. Ces 3 valeurs sont représentées sur la Figure 31.

IV.2. Capacité de production de PHB selon le taux de phosphore intracellulaire

Pour montrer la relation de la conversion du carbone vers la production de PHB, la réponse dynamique sur la première heure des cultures réalisées en batch est étudiée. Les populations microbiennes productrices des expériences en batch choisies pour analyser cette relation représente plus de 70% de la communauté microbienne totale, permettant de faire l'hypothèse d'une culture mono-souche productrice. Il s'agit des expérimentations batch A3d, A4a,c, B1b, B2a,b,c,d, B3a,b,c, B4b. Les vitesses spécifiques initiales de production de PHB calculées (notées q_{PHBmax} observés) sont représentées selon le taux de phosphore intracellulaire (Figure 32).

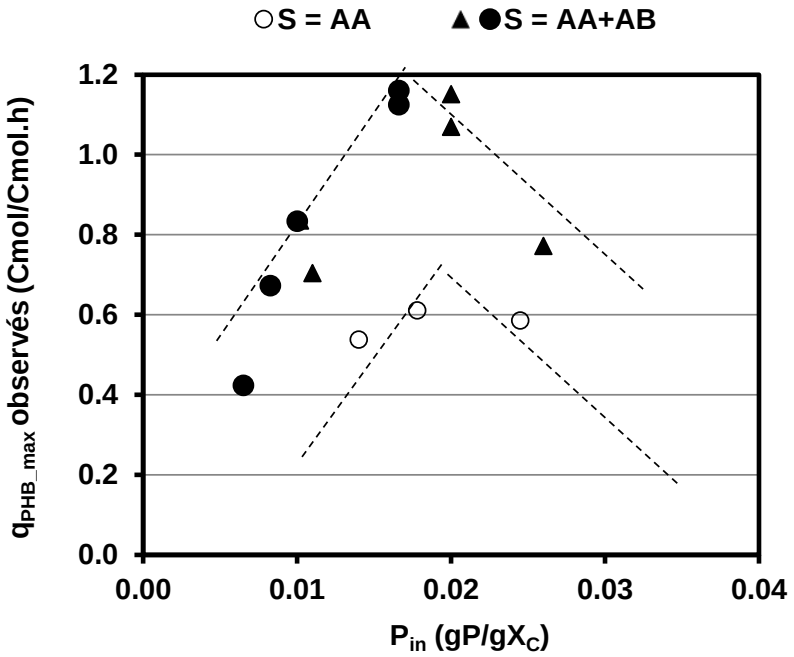

Figure 32 : Evolution de la vitesse spécifique de production de PHB en fonction du taux de phosphore intracellulaire en réacteur batch avec les populations microbiennes sélectionnées en chémostat sous AA et AA+AB : symboles ronds = *Zoogloea spp.* (sélectionnée à D = 0,12 h^{-1} et 0,045h^{-1}) et symboles triangles = *Malikia spp.* (sélectionnée à D = 0,31 h^{-1} et 0,21 h^{-1}) ; les lignes pointillées simulent les évolutions des q_{PHBmax} observés selon le P_{in} et la source de carbone

Tout d'abord quel que soit le taux de phosphore intracellulaire, la bascule de la croissance vers le stockage de PHB en condition de carence en phosphore est immédiate. Une valeur maximale est observée pour un P_{in} compris entre 1,8 et 2% (0,6 et 1,2 Cmol/Cmol.h pour AA et le mélange AA+ AB, respectivement). En deçà et au-delà de cette valeur, les q_{PHBmax} observés chutent drastiquement (surtout observée lorsque le substrat est le mélange acide acétique et butyrique). Lorsque P_{in} tend vers P_{in_exp}, le taux spécifique de production diminue également supposant que le microorganisme privilégie alors sa

croissance au-delà de 2% de P_{in}. De même, lorsque P_{in} tend vers P_{in_crit}, supposant qu'une trop faible teneur en phosphore limite la redirection du carbone vers le stockage de PHB. Il y aurait une répartition du phosphore intracellulaire optimale permettant de maximiser les flux de conversion du carbone vers la production de PHB. Cette valeur élevée de P_{in} pour un q_{PHBmax}, milite pour un effet du niveau d'activité du métabolisme élevé pour être capable d'atteindre une vitesse spécifique élevée.

Les vitesses spécifiques de production de PHB observées avec le mélange AA+AB sont supérieures comparées à celles obtenues avec l'AA comme source de carbone unique quel que soit le P_{in}. Il est évident que l'effet observé provient d'un effet source de carbone et non de population microbienne : le q_{PHBmax} obtenu avec AA est 0,6 Cmol/Cmol.h alors qu'avec le mélange AA+AB, il est de 1,2 Cmol/Cmol.h pour un même P_{in}. L'effet AB joue un rôle déterminant sur la production de PHB comme le montre Marang et al. (2013). Avec la souche *Plasticumulans acidovorans* sélectionnée en conditions de « feast & famine », l'utilisation de butyrate ou d'un mélange acétate/butyrate (1:1) multiplie par 2 la vitesse de production maximale de PHB (3,7 contre 1,75 Cmol/Cmol.h).

Il est utile de rappeler que cette relation est montrée pour deux populations différentes sélectionnées sous 4 conditions de taux de dilution différentes et avec différentes sources de carbone.

V. ETABLISSEMENT D'UN MODELE CINETIQUE

Cette partie vise à établir un modèle cinétique à partir des données de la littérature et des observations expérimentales exposées et discutées précédemment. Ainsi, en résumé, les points clefs à représenter par ce modèle sont les suivants :

(1) Les besoins en phosphore pour la croissance catalytique (attribués principalement aux pools d'ARN) sont dépendants du taux spécifique de croissance cellulaire. Ces besoins évoluent entre un P_{in_min} et un P_{in_max} selon le degré de limitation phosphore imposé.

(2) La limitation phosphore entraine une dilution du phosphore intracellulaire qui se traduit par une augmentation de $R_{Xc/P}$ ou une diminution du P_{in}.

(3) Il résulte des processus cités précédemment que le taux spécifique de consommation de phosphore (q_P) doit être taux de croissance dépendant et degré de limitation en phosphore dépendant.

(4) Lorsque la croissance est limitée par le phosphore, l'overflow de carbone est redirigé vers le stockage intracellulaire de PHB à une vitesse spécifique maximale lorsque P_{in} = 2% et inférieure lorsque l'on s'écarte de cette valeur.

Ainsi, l'enjeu est de représenter la bascule entre la croissance catalytique et la production de PHB gouvernée par le taux de phosphore intracellulaire. Dans les parties suivantes, l'expression des vitesses

cinétiques est établie étape par étape en se basant sur les résultats préalablement présentés à la fois en batch (régimes dynamiques) et en chémostat (régimes stabilisés). Nous allons tout d'abord faire l'hypothèse que ces processus sont représentatifs de tous les microorganismes dominants sélectionnés. Nous affinerons ensuite pour prendre en compte des spécificités des souches (en termes de valeurs de paramètres cinétiques) dans le chapitre suivant. Le modèle cinétique nous permettra de tester des cas d'étude non couverts expérimentalement et ainsi d'aider la compréhension des processus de dilution du phosphore, croissance cellulaire et stockage de PHB.

V.1. Construction du modèle cinétique

La biomasse totale est divisée en 2 compartiments : la biomasse catalytique (X_C) et le PHB (X_{PHB}). Le phosphore particulaire correspond à la variable X_P, permettant d'exprimer le taux de phosphore intracellulaire P_{in}, égal au rapport X_P sur X_C. La Figure 33 représente les différents processus définis dans la construction du modèle cinétique. Le Tableau 26 récapitule les 6 variables d'état définies dans le modèle et les coefficients stœchiométriques associés à chaque processus.

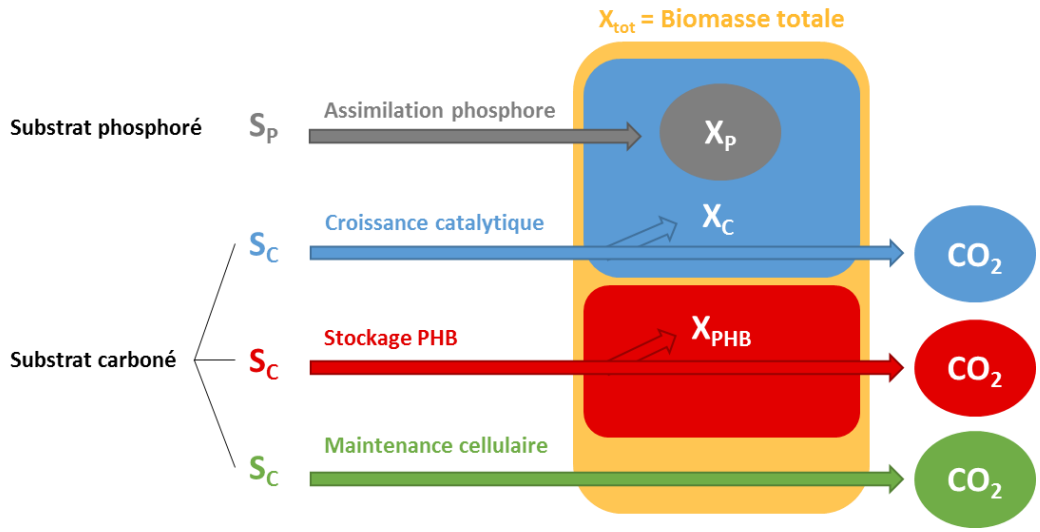

Figure 33 : Représentation des 4 processus établis pour le modèle cinétique

Tableau 26 : Représentation de la matrice stœchiométrique du modèle cinétique

Processus	Variables d'état					
	S_P	S_C	X_P	X_C	X_{PHB}	CO_2
Assimilation du phosphore	-1		1			
Croissance catalytique		$-\frac{1}{Y_{Xc/Sc}}$		1		$\frac{1-Y_{Xc/Sc}}{Y_{Xc/Sc}}$
Stockage de PHB		$-\frac{1}{Y_{Xphb/Sc}}$			1	$\frac{1-Y_{Xphb/Sc}}{Y_{Xphb/Sc}}$
Maintenance cellulaire		-1				1

V.2. Définition des processus et écriture des vitesses cinétiques

V.2.a *Processus d'assimilation du phosphore extracellulaire*

Comme vus dans la partie bibliographique, les modèles attribuent dans des conditions d'excès de phosphore, un taux de phosphore intracellulaire maximal constant assimilé au P_{in_exp}. Cependant, dans notre cas, en ne considérant pas les processus de stockage, les besoins en phosphore intracellulaire ne sont pas les mêmes selon le taux de croissance, qu'il soit fixé en chémostat par le taux de dilution, ou qu'il soit dynamique en réacteur discontinu. Les études en chémostat ont mis en évidence une corrélation entre le taux de phosphore intracellulaire en limitation carbone (**P_{in_max}**) et le taux de croissance variant entre le **P_{in_lim}** et **le P_{in_exp}**. Etant donnée la corrélation linéaire entre le taux d'ARN et le taux de croissance détaillée dans la partie bibliographique, la variation entre le taux de phosphore maximal (P_{in_max}) et le taux de croissance est donc supposée linéaire (Equation 3) :

$$\boldsymbol{P_{in_max} = (P_{in_exp} - P_{in_lim}) \times \frac{\mu}{\mu_{max}} + P_{in_lim}} \qquad \textit{Equation 3}$$

La vitesse d'assimilation du phosphore est limitée par la concentration extracellulaire en phosphore selon la représentation de Monod ; elle est maximale quand le P_{in} tend vers P_{in_crit} (Bougaran et al., 2010) et enfin tend vers 0 lorsque le Pin tend vers P_{in_max}. Ainsi, la vitesse cinétique d'assimilation du phosphore est exprimée par l'équation 4.

$$r_P = q_{Pmax} \times \frac{S_P}{S_P + K_P} \times \frac{P_{in_max} - P_{in}}{P_{in_max} - P_{in_crit}} \times X_C \qquad \textit{Equation 4}$$

V.2.b *Dépendance de la croissance catalytique vis-à-vis du P_{in}*

La vitesse de la croissance cellulaire est limitée par la concentration extracellulaire en substrat carboné selon la représentation de Monod et par le taux de phosphore intracellulaire. Les principaux modèles qui permettent de représenter la limitation de la croissance cellulaire par le P_{in} sont le modèle linéaire (Geider et al., 1998; Moore et al., 2001) et les modèles non linéaires (Caperon et Meyer, 1972; Droop, 1968). D'après nos premières observations en chémostat, le modèle linéaire est choisi pour décrire la limitation de la croissance par le P_{in} (Annexe D : Choix du modèle linéaire pour représenter la limitation de la croissance par le P_{in}). Ainsi la vitesse de la croissance cellulaire est exprimée par l'équation 5.

$$\mu_{max} \times \frac{S_C}{S_C + K_C} \times \frac{P_{in} - P_{in_crit}}{P_{in_exp} - P_{in_crit}} \times X_C \qquad \textit{Equation 5}$$

V.2.c *Processus de production de PHB*

Les expériences menées en réacteur batch ont mis en évidence que la vitesse de production maximale de PHB est fonction du taux de phosphore intracellulaire. L'influence négative d'une concentration en P_{in} croissante est représentée par une fonction de type Haldane. La structure mathématique de cette fonction a été modifiée par Guo et Vanrolleghem, (2014) qui proposent l'écriture suivante :

$\frac{P_{in}}{K_{Pin}+\alpha P_{in}+\frac{P_{in}^2}{KI_{Pin}}}$ avec $\alpha = 1 - 2 \times \sqrt{\frac{K_{Pin}}{KI_{Pin}}}$ et K_{Pin}, K_{IPin}, les constantes cinétiques.

Les constantes cinétiques sont déterminées à partir des résultats présentés sur la Figure 32 avec 2 types de substrats carbonés (AA et le mélange AA+AB). La Figure 34 représente l'évolution du q_{PHB} en fonction du P_{in} établie par la fonction de type Haldane par rapport aux points expérimentaux selon l'équation 6.

$$q_{PHB} = q_{PHB_max} \times \frac{P_{in}}{K_{Pin}+\alpha P_{in}+\frac{P_{in}^2}{KI_{Pin}}} \qquad \textit{Equation 6}$$

Avec $K_{Pin} = 0{,}025\ gP/gXc \quad et \quad K_{IPin} = 0{,}015\ gP/gX_C$

$q_{PHB_max} = 0{,}6\ Cmol/Cmol.h$ lorsque S_C = Acide acétique

$q_{PHB_max} = 1{,}2\ Cmol/Cmol.h$ lorsque S_C = Acide acétique + butyrique

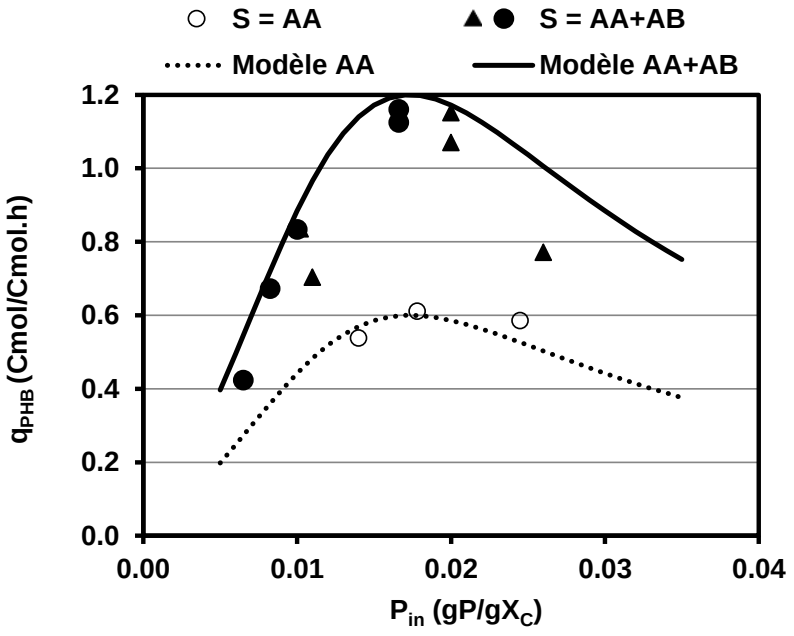

Figure 34 : Relation entre le q_{PHB} et le P_{in} établie par la fonction d'Haldane avec S = AA et S = AA+AB à partir des résultats présentés sur la Figure 32. Symboles ronds = *Zoogloea spp.* (sélectionnée à D = 0,12 h^{-1} et 0,045h^{-1}) et symboles triangles = *Malikia spp.* (sélectionnée à D = 0,31 h^{-1} et 0,21 h^{-1})

De plus, la vitesse de production de PHB est activée par une faible concentration S_P extracellulaire (ou désactivée par S_P élevée), et dépend de S_C selon la représentation de Monod. De plus, la vitesse est impactée par la teneur intracellulaire en PHB, le phénomène d'encombrement stérique. La vitesse de production de PHB s'écrit donc selon l'équation 7.

$$r_{PHB} = q_{PHB_max} \times \frac{P_{in}}{K_{Pin}+\alpha P_{in}+\frac{{P_{in}}^2}{KI_{Pin}}} \times \frac{S_C}{S_C+K_C} \times \frac{K_{PHB}}{K_{PHB}+S_P} \times \left(1-\left(\frac{PHB_{in}}{PHB_{in_max}}\right)^n\right) \times X_C \qquad \textbf{\textit{Equation 7}}$$

avec $K_{Pin} = 0{,}025\ gP/gX_C, K_{IPin} = 0{,}015\ gP/gX_C$

$q_{PHB_max} = 0{,}55\ Cmol/Cmol.h$ lorsque S_C = Acide acétique

$q_{PHB_max} = 1{,}1\ Cmol/Cmol.h$ lorsque S_C = Acide acétique + butyrique

n = 3

V.2.d ***Processus de maintenance cellulaire***

Lors de nos expériences en culture continue, une augmentation du coefficient de maintenance est observée. La valeur de m augmente d'autant plus que la croissance est limitée en phosphore. (Thingstad, 1987) montre que la consommation d'énergie sous condition de limitation phosphore augmente d'autant plus que le taux de phosphore intracellulaire diminue. Il propose d'écrire le terme de maintenance selon l'équation 8.

$$m \times \left(1+\delta\frac{P_{in_exp}-P_{in}}{P_{in_exp}-P_{in_crit}}\right) \qquad \textbf{\textit{Equation 8}}$$

Avec δ, le facteur d'amplification en carence de phosphore (c'est-à-dire lorsque P_{in} = P_{in_crit}) et m, le coefficient de maintenance en condition non limitantes de phosphore. Nos résultats expérimentaux ont montré une augmentation de la consommation d'énergie uniquement liée à la limitation interne en phosphore intracellulaire, soit, lorsque le P_{in} est inférieur au P_{in_max}. Ainsi, la formule suivante a été choisie pour représenter le lien entre le P_{in} et le processus de maintenance :

$$m \times \left(1+\delta \times (P_{in_max}-P_{in})\right)$$

Cette modification est très importante pour la simulation de nos résultats puisque P_{in_max} varie avec le taux de dilution appliqué alors que P_{in_exp} est une constante. Nos résultats en chémostat en conditions non limitantes de phosphore ont permis de déterminer le coefficient de maintenance m = 0.045 Cmol/Cmol.h. La détermination du facteur d'amplification δ est réalisée à partir des résultats obtenus avec un taux de dilution de 0,045 h^{-1}, rassemblant le plus grand nombre de régimes stables et correspond à 170 (Figure 29).

La vitesse de consommation du substrat carboné liée à maintenance cellulaire est limitée par le substrat carboné (Michaelis-Menten), et augmentée par la limitation phosphore. Ainsi, l'écriture du processus de maintenance cellulaire est exprimée par l'équation 9.

$$r_m = m \times \frac{S_C}{S_C + \varepsilon} \times \left(1 + \delta \times \left(P_{in_max} - P_{in}\right)\right) \times X_C \qquad \textbf{\textit{Equation 9}}$$

Avec $\delta = 170$,

$\varepsilon = 1.10^{-16}$ Cmmol/L

m = 0,045 Cmol/Cmol.h

V.3. Etude de la capacité prédictive du modèle cinétique

A partir des résultats obtenus en réacteurs chémostat et batch, la capacité du modèle à représenter correctement les différents processus et leur dynamique est évaluée. Un calage du modèle est réalisé à partir d'un jeu de données obtenues en réacteur continu que nous avons organisé comme s'il s'agissait d'une même culture avec des évènements successifs. Après obtention du jeu de paramètres permettant de représenter les processus en réacteur continu, nous avons choisi deux cultures discontinues au cours desquelles, les profils dynamiques de dilution du P_{in}, de la croissance et de la production de PHB étaient contrastés. Les conditions opératoires des cultures discontinues (excès de carbone et carence de phosphore) permettent de s'affranchir des paramètres stœchiométriques (K_C, K_P et K_{PHB}). Le Tableau 27 récapitule les paramètres constants et les paramètres à estimer lors de la confrontation du modèle aux cultures en continu et en discontinu.

Tableau 27 : Récapitulatif des paramètres et de leurs valeurs (déterminées ou non) pour le modèle cinétique

Paramètres	Unités	Valeurs/Détermination
μ_{max}	h-1	A estimer (via batch)
q_{PHBmax}	Cmol/Cmol.h	
q_{Pmax}	Mol/Cmol.h	0,1 x μ_{max}
K_C	Cmmol/L	A estimer (via chémostat)
K_P	Cmmol/L	
K_{PHB}	Cmmol/L	
P_{in_exp}	%g	0,038
P_{in_crit}	%g	0,0045

V.3.a *Représentation des régimes stabilisés des cultures en continu*

De manière à représenter l'ensemble des résultats obtenus en régime permanent au cours des expérimentations en chémostat, ces derniers ont été compilés sur une expérience théorique considérant un taux de dilution décroissant (de 0,31 à 0,023 h^{-1}) et une augmentation progressive du degré de

limitation phosphore pour chaque D. Chaque condition opératoire (D et $(C/P)_{app}$) représente une durée de temps de 250 h. Les conditions initiales sont 1 g/L de biomasse contenant 20% de PHB et 2% de phosphore intracellulaire. La confrontation au modèle cinétique a permis d'estimer les paramètres suivants : K_C = 0,1 Cmmol/L, K_P = 0,001 Pmmol/L, K_{PHB}= 0,0005 Pmmol/L, μ_{max} = 0,7 h^{-1} et q_{PHBmax} = 0,12 Cmol/Cmol.h. Les résultats expérimentaux obtenus en régime stabilisés (symboles) et simulés (traits) sont présentés sur la Figure 35.

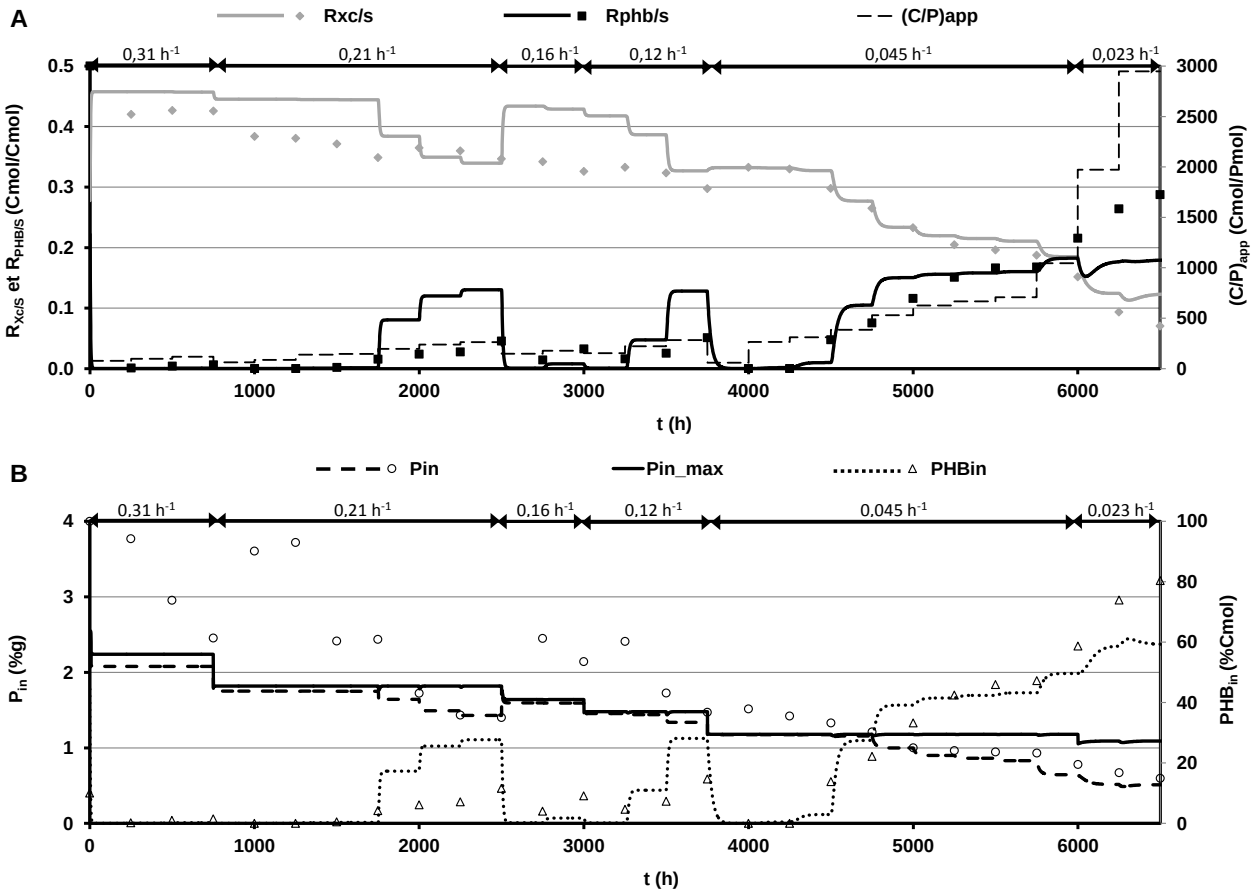

Figure 35 : Evolution des rendements observés $R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$ et du degré de limitation phosphore appliqué (A) et des P_{in}, P_{in_max} et PHB_{in} (B) au cours du temps pour une expérience théorique : comparaison courbes simulées par le modèle après calage et points expérimentaux. Les taux de dilution appliqués (de 0,31 h^{-1} à 0,023 h^{-1}) sont indiqués au-dessus des graphiques.

Le modèle cinétique permet de représenter la bascule entre croissance et production de PHB, montrée par une diminution du $R_{Xc/S}$ concomitante à une augmentation du $R_{PHB/S}$, phénomène d'autant plus marqué que le taux de dilution est faible. De plus, la limitation phosphore engendre une diminution du taux de phosphore intracellulaire, s'éloignant progressivement du P_{in_max}, et ceci à chaque D imposé. Notons que la valeur de P_{in_max} est d'autant plus faible que le taux de dilution est faible rappelant le besoin moindre en phosphore à faible taux spécifique de croissance.

Document confidentiel

De manière générale, les principaux processus cinétiques mis en évidence, à savoir la dilution du phosphore, le déclenchement de la production de PHB à des taux de P_{in} µ-dépendant, sont bien pris en compte par le modèle cinétique. Cependant, les courbes simulées à partir du jeu de de paramètres estimés ne permettent pas de décrire avec suffisamment de justesse les observations expérimentales pour toutes les conditions opératoires. En particulier, le modèle tel que calibré a du mal à représenter les comportements cellulaires à fort taux de dilution.

V.3.b *Représentation des régimes dynamiques*

La réponse du modèle cinétique est étudiée ici en régime dynamique, tel que calibré précédemment, pour simuler les résultats de deux expériences en batch réalisées avec des inocula sélectionnés dans des conditions différentes avec la même source de carbone. Nous avons choisi les résultats expérimentaux du batch A2b (inoculum sélectionné à D = 0,21 h^{-1}) et du batch A5a (inoculum sélectionné à D = 0,045 h^{-1}) (Figure 36). Bien que les taux de dilution appliqués soient relativement différents, la croissance était limitée par le phosphore, imposant un taux de phosphore de 1,4 et 1,3%, des P_{in} initiaux très proches.

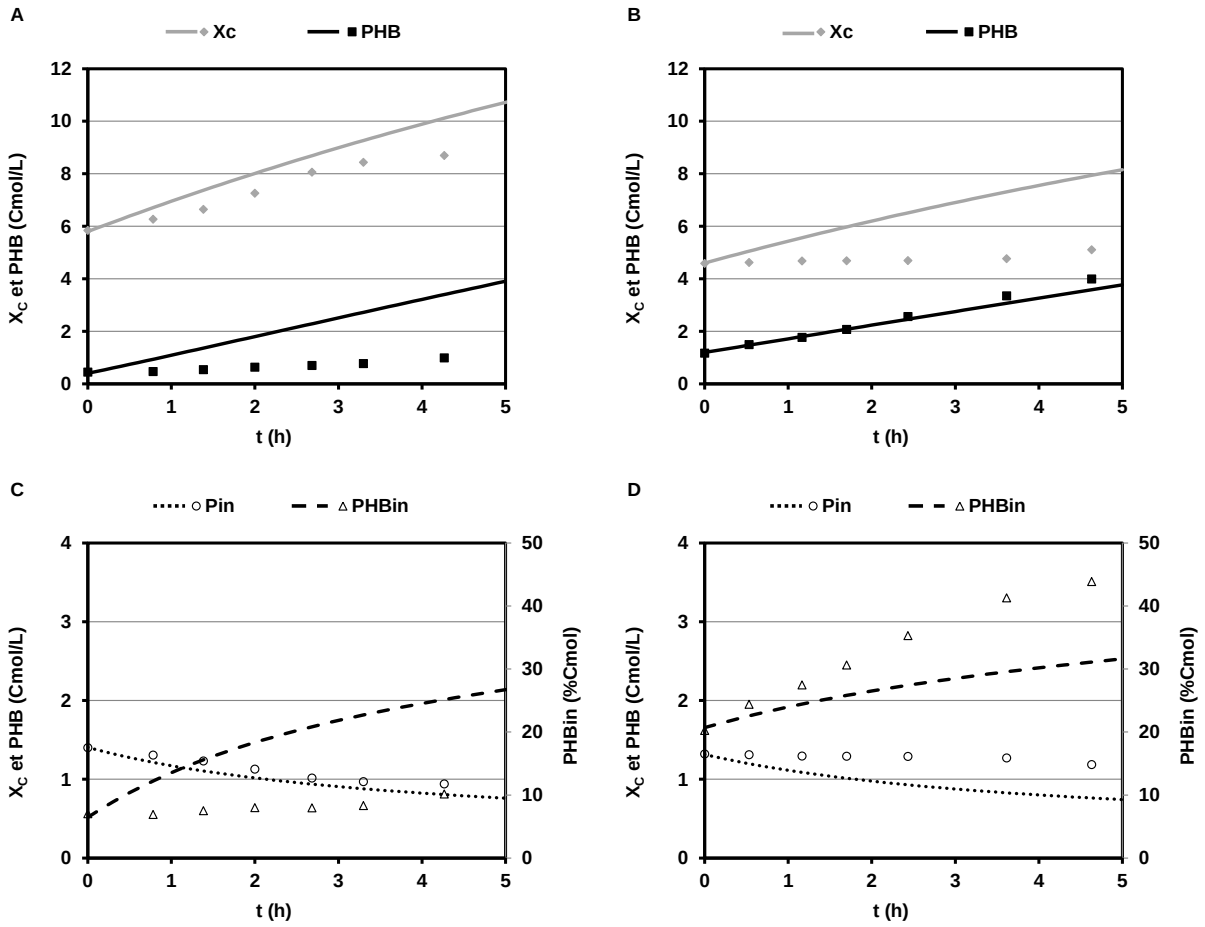

Figure 36 : Evolution des concentrations X_C et PHB au cours des batch A2b (A) et A5a (B) ; Evolution des P_{in} et PHB_{in} au cours du batch A2b (C) et A5a (D). Symboles = expérimentation ; Trait continu = simulation.

Une dilution du phosphore intracellulaire est bien observée concomitante à une production de PHB, conséquence de la carence en phosphore. Néanmoins, pour ces deux expériences en batch, la concentration X_C est surestimée, entrainant une surestimation de la dilution du phosphore intracellulaire. La production de PHB est surestimée d'un facteur 4 dans le cas du batch A2b alors que pour le batch A5a, le modèle permet de prédire correctement l'évolution de celle-ci.

V.3.c *Evaluation de la capacité prédictive du modèle*

En résumé, la confrontation du modèle calé à des expériences contrastées issues de cultures continues et discontinues montre une bonne aptitude à représenter les processus majeurs visés. Néanmoins, un manque de justesse du modèle est mis en évidence. Nous rappelons ici que nous avons considéré, en première approche, qu'un seul et même microorganisme était présent pour l'ensemble des cultures. Sur l'aspect de la réponse qualitative des microorganismes à une limitation en phosphore et la conséquence sur la production de PHB, cette hypothèse paraît vérifiée. En revanche, d'un point de vue quantitatif, il semble que des différences significatives de valeurs de paramètres cinétiques soient observées entre les microorganismes sélectionnés. Ces différences pourraient résulter du mode de sélection et concerner les paramètres tels que μ_{max}, q_{PHBmax}, mais aussi les paramètres liés à la plasticité cellulaire vis-à-vis du phosphore. Dans le paragraphe suivant nous montrons par une étude de sensibilité les paramètres les plus influant sur les réponses du modèle.

V.4. Etude de sensibilité sur les paramètres du modèle

L'analyse de la sensibilité est réalisée pour des cultures en batch et en chémostat permettant de couvrir des domaines expérimentaux larges. L'objectif de l'analyse de la sensibilité est d'étudier l'impact de chaque facteur en quantifiant leur contribution à la variabilité de la sortie du modèle. Ainsi, l'intérêt pratique est donc d'identifier les paramètres et les variables d'entrée qui influencent fortement ou au contraire, qui n'ont pas d'influence sur les différentes sorties du modèle. Cette étude est menée en faisant varier la valeur des paramètres P_{in_exp}, P_{in_crit}, μ_{max}, q_{PHBmax}, K_C, K_P, K_{PHB} de 100% par rapport à la valeur obtenue lors de la calibration. Les domaines couverts en chémostat sont les 3 zones de limitation nutritionnelles et le domaine couvert en batch est la carence de phosphore.

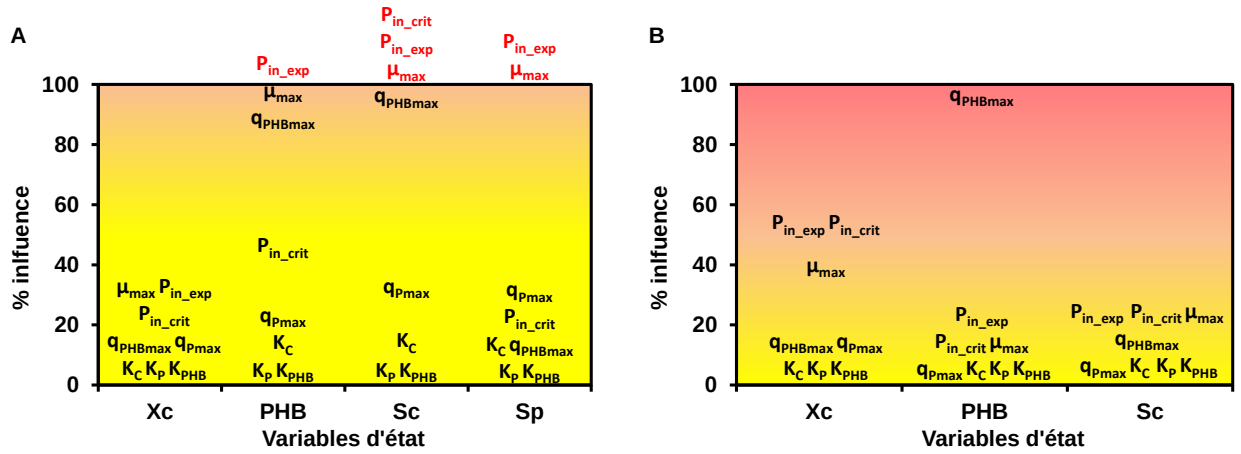

Figure 37 : Etude de l'influence des paramètres du modèle sur les variables d'état X_C, PHB, S_C et S_P sur l'ensemble des conditions opératoires des cultures en chémostat (A) et en batch (B)

Les résultats montrent la forte influence des mêmes paramètres (P_{in_exp}, P_{in_crit}, μ_{max} et q_{PHBmax}) sur les variables d'état. De manière logique, on confirme que μ_{max} et X_C sont fortement liés, de même que q_{PHBmax} et PHB_{in}. Concernant les variables S_C et S_P, déterminant les frontières de la zone de double limitation, celles-ci sont également très sensibles aux paramètres μ_{max} et q_{PHBmax} avec une influence de plus de 100% sur ces variables. Il est donc possible, voire même fortement probable, que les populations sélectionnées (*Acinetobacter*, *Zooglea*…) aient des valeurs de ces paramètres différents, expliquant les décalages entre les simulations et les expériences.

VI. CONCLUSION

Pour les souches sélectionnées dans ce travail, l'hypothèse d'un comportement métabolique similaire face à une dilution du P_{in} entrainant une bascule du carbone entre croissance et stockage de PHB a été faite dans ce chapitre. Cette hypothèse nous a permis d'étudier l'ensemble des processus comme s'il s'agissait d'une mono-souche théorique. Dans ce cadre, un certain nombre d'observations originales a pu être dégagé :

(1) Une zone de double limitation nutritionnelle calculée et extrapolée a été mise en évidence avec une forme semblable à celle observée lorsque l'azote est utilisé comme élément limitant la croissance. La forme de cette zone est d'autant plus large que le taux de dilution appliqué est faible. Une plus grande plasticité intracellulaire est donc observée à faible µ avec la redirection du carbone vers la production de PHB au détriment de la biomasse catalytique. Ce comportement implique cependant, une augmentation de la perte de carbone par les processus de maintenance cellulaire.

(2) Les besoins en phosphore varient selon le taux de dilution et donc le µ du microorganisme. Nous avons donc quantifié le P_{in_max} nécessaire lorsque la croissance du microorganisme n'est pas limitée en

phosphore. Du fait de la plasticité cellulaire, pour un taux spécifique de croissance imposé, les microorganismes sélectionnés dans notre étude, peuvent maintenir le niveau de division cellulaire à plus faible teneur en P_{in}. La valeur de P_{in} peut alors évoluer entre une valeur P_{in_max} et une valeur P_{in_min} que nous avons déterminée. La valeur P_{in_crit} représente la teneur minimale en phosphore pour permettre une division cellulaire. Une valeur de 0,004 gP/gX_C a été estimée.

(3) Une représentation des valeurs de q_{PHBmax} observés, mesurés lors des cultures discontinues, en fonction de la teneur P_{in} montre qu'il existe une teneur en P_{in} optimale (autour de 0,02 gP/gX_C) pour obtenir une vitesse spécifique de stockage de PHB la plus élevée. La valeur de q_{PHBmax} observé chute rapidement en deçà et au-delà de cette valeur. Un lien entre P_{in} et taux de stockage est donc mis en évidence. De même, l'utilisation d'un mélange AA+AB conduit à des valeurs de q_{PHBmax} observé nettement supérieures à celles déterminées avec l'AA seul. Sur mélange AA+AB, une valeur de q_{PHBmax} observé proche de 1,2 Cmol/Cmol.h a été obtenue. Cette valeur est élevée au regard des résultats de la littérature mais n'est pas la plus élevée rapportée.

(4) A partir de ces observations, un modèle cinétique a été développé basé sur l'importance du P_{in} sur les vitesses de croissance, de production de PHB, d'assimilation du phosphore et également sur les processus de maintenance cellulaire. Ce modèle a été calibré sur un nombre élevé d'expériences couvrant des situations fortement contrastées. Les simulations montrent que le modèle décrit bien les processus métaboliques identifiés. Néanmoins, des spécificités de valeurs de paramètres propres aux souches sélectionnées seront à prendre en compte pour être capable de représenter l'ensemble du domaine expérimental étudié.

Dans le chapitre suivant, nous allons, tout d'abord, nous intéresser à définir les paramètres des souches sélectionnées permettant une bonne adéquation entre simulations et expériences. Puis au travers de l'utilisation du modèle, nous chercherons à mieux comprendre l'influence de paramètres spécifiques des microorganismes sélectionnés sur le comportement métabolique.

Document confidentiel

Chapitre 3. Etude des paramètres gouvernant le devenir du carbone en culture continue

I. INTRODUCTION

Le chapitre 2 considère le comportement de toutes les populations sélectionnées comme un comportement d'une population unique, ce qui a permis de dégager les premières conclusions des facteurs déterminant et gouvernant le devenir du carbone, mais aussi d'établir un modèle cinétique. Cependant, plusieurs populations ont été sélectionnées dans des conditions différentes, ce qui implique qu'elles peuvent logiquement être caractérisées par des paramètres cinétiques et stœchiométriques différents. Ainsi, ce chapitre, étroitement lié au chapitre précédent, se base sur le modèle cinétique préalablement établi pour :

(1) Etudier les différences probables des paramètres cinétiques et stœchiométriques des différentes populations sélectionnées,

(2) Améliorer les compréhensions des phénomènes impliqués dans le devenir du carbone selon les conditions opératoires et les paramètres des populations microbiennes sélectionnées.

Dans cette deuxième partie, pour représenter des populations contrastées en termes de fonctions métaboliques et de paramètres cinétiques, nous considèrerons au travers de jeux de paramètres de μ_{max} et q_{PHBmax}, 4 souches microbiennes différentes. Un domaine de populations non stockeuses de PHB, faiblement stockeuses de PHB et fortement stockeuses pourra ainsi être balayé.

Les résultats de simulation seront analysés selon les conditions opératoires et selon la source de carbone (AA et le mélange AA+AB). Ainsi, les zones de double limitation nutritionnelle (DLN) sont discutées en termes de position et d'extension selon le taux de dilution. Le devenir du carbone entre croissance cellulaire et stockage de PHB est analysé par l'étude des rendements observés dans la zone de DLN. L'importance du paramètre P_{in}, soulevée dans le chapitre précédent, est analysée en détail et discutée au travers des vitesses spécifiques de production de PHB.

II. DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES ET STŒCHIOMETRIQUES SELON LA SELECTION MICROBIENNE

II.1. Démarche adoptée

La stratégie mise en place ici est de catégoriser les différentes populations en termes de capacité cinétique. Cette classification se base sur les observations de la diversité microbienne décrites dans le chapitre 1, et tenant compte des conditions opératoires de la sélection. Nos résultats montrent, tout d'abord, que des microorganismes très similaires en termes de paramètres cinétiques peuvent être sélectionnés sous les mêmes conditions, et par voie de conséquence, des conditions très différentes vont

potentiellement sélectionner des organismes éloignés en termes de capacité cinétique. Par exemple, au cours des expérimentations en chémostat menées à un taux de dilution de 0,31 et 0,21 h^{-1} sur AA (A1 et A2), la population du genre *Acinetobacter* a été sélectionnée. Bien que les expérimentations soient différentes, les deux populations sélectionnées présentent 99% de similarité entre leurs séquences ADN 16S (V3-V4). De la même manière, parmi toutes les espèces sélectionnées du genre *Zoogloea,* ces dernières ont plus de 97% de similarité. Et pour les espèces du genre *Malikia*, la similarité entre leurs séquences ADN 16S est de 100%, signifiant que ce sont toutes les mêmes espèces (*Malikia spinosa*) ayant été sélectionnées sur des sources de carbone et des taux de dilution différents. Concernant les expérimentations en chémostat menées à un taux de dilution de 0,045 h^{-1} (A5, 6, 7 et 8 et B4), plusieurs populations ont été sélectionnées. Les résultats ont également montré une réponse universelle face à la limitation phosphore de toutes ces souches (en terme de conversion du carbone, dilution du P_{in}). Ainsi, nous faisons le postulat que, parmi les conditions de sélections qui influent fortement sur les capacités des populations, on trouve : le taux de dilution, la nature de la source de carbone et le degré de limitation (trajectoire et degré de limitation final imposé). C'est pourquoi, considérant l'ensemble des cultures en chémostat (réalisées sur AA et AA+AB), quatre catégories de populations semblent se dégager :

(1) Population dite «*Acinetobacter*», sélectionnée sous AA au cours des expérimentations A1, A2 et A3,

(2) Population dite «*Malikia*» population sélectionnée sous co-substrats AA et AB au cours des expérimentations B1 et B2 et également sous AA pour A3,

(3) Population dite «*Zoogloea*», population sélectionnée sous AA au cours des expérimentations A3 et A4 et également sous co-substrats AA et AB pour B3 et B4,

(4) Population dite «Autres souches sélectionnées» à D = 0,045 h^{-1} parmi lesquelles : *Acidovorax*, *brachymonas*, *brevundimonas* (expérimentations A5, A6, A7, A8, B4).

L'étude de la sensibilité a montré la forte influence des paramètres μ_{max} et q_{PHBmax} sur l'ensemble des variables d'état. A partir des expériences en batch, s'affranchissant de nombreuses constantes stœchiométriques, chaque groupe de populations est analysé afin de déterminer leur μ_{max} et q_{PHBmax}. A partir de ces estimations de paramètres, les résultats expérimentaux sont confrontés aux résultats simulés en chémostat, permettant de déterminer les pseudo-constantes d'affinité (K_S…). Au travers de cette étude, les paramètres P_{in_exp} et P_{in_crit} tout comme les processus de maintenance cellulaire sont considérés comme similaires pour toutes ces catégories de populations. Ces hypothèses seront discutées dans ce chapitre au paragraphe II.3. En ce qui concerne le processus d'assimilation du phosphore extracellulaire, le q_{Pmax} est considéré proportionnel au μ_{max} d'un facteur 0,1 (Tableau 27).

II.2. Détermination des paramètres des populations

II.2.a *Sur acide acétique*

Les 3 catégories de populations sélectionnées et étudiées en batch lorsque l'acide acétique est utilisé comme source carbonée sont « *Acinetobacter* », « *Zoogloea* » et le groupe rassemblant plusieurs populations sélectionnées à D faible «Autres souches sélectionnées». Les rendements théoriques limites $Y_{Xc/S}$ et $Y_{PHB/S}$ sont 0,5 et 0,66 Cmol/Cmol (Grousseau, 2012). La Figure 38 représente les résultats expérimentaux et simulés pour toutes les expérimentations en batch réalisées avec ces sélections microbiennes. Ces expérimentations se différencient par l'état physiologique initial des populations notamment au niveau des contenus P_{in} et PHB_{in}. La confrontation avec les résultats expérimentaux obtenus en culture continue lors de régimes stabilisés est montrée sur la Figure 39. Le Tableau 28 récapitule l'ensemble des paramètres cinétiques et stœchiométriques déterminés pour chaque groupe de population sur acide acétique.

Tableau 28 : Récapitulatif des paramètres cinétiques et stœchiométriques des différentes catégories de populations microbiennes avec AA comme source de carbone

Paramètres	«Autres souches sélectionnées»	*« Zoogloea »*	*« Acinetobacter »*
μ_{max}	0,25	0,35	0,55
q_{PHBmax}	0,15	0,55	0,03
q_{Pmax}	0,025	0,035	0,055
K_P	0,01	0,01	0,01
K_{PHB}	0,0005	0,0005	0,0005
K_C	0,1	0,1	0,1

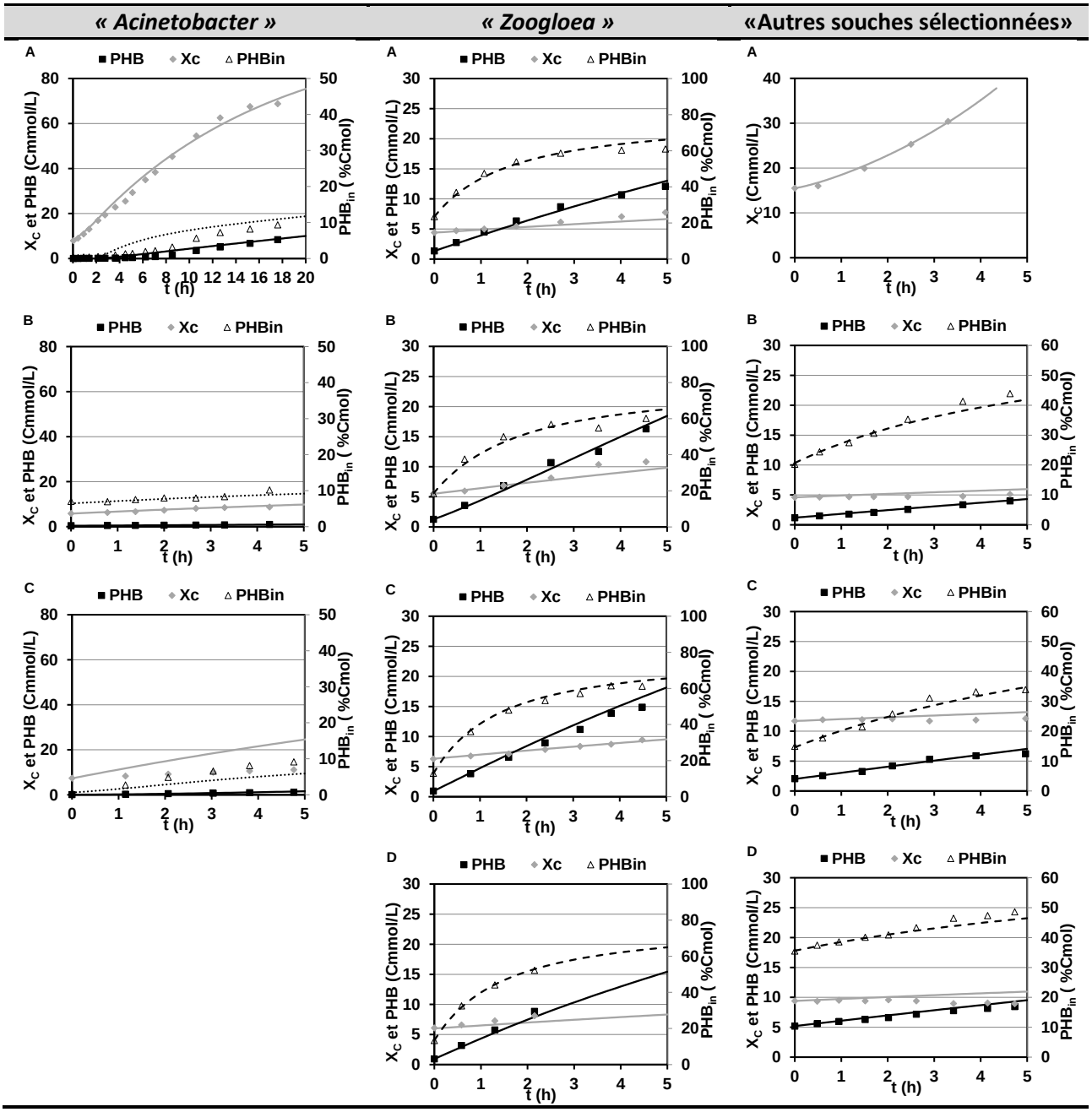

Figure 38 : Résultats expérimentaux et simulés de l'évolution des concentrations en X_C et PHB et de PHB_{in} pour les cultures en batch : Pour la catégorie « *Acinetobacter* » (A2a (A), A2b (B) et A1a (C)) ; Pour la catégorie « *Zoogloea* » (A3d (A), A4a (B), b (C) et c (D)) ; Pour la catégorie «Autres souches sélectionnées» ((A8a (A), A5a (B), b (C) et c (D)). Durant le batch A2a, une condition de non limitation P est imposée pendant la 1ère phase de la culture. Le Batch A8a a été mené sans limitation P. Symboles = expérimentation ; Trait continu = simulation.

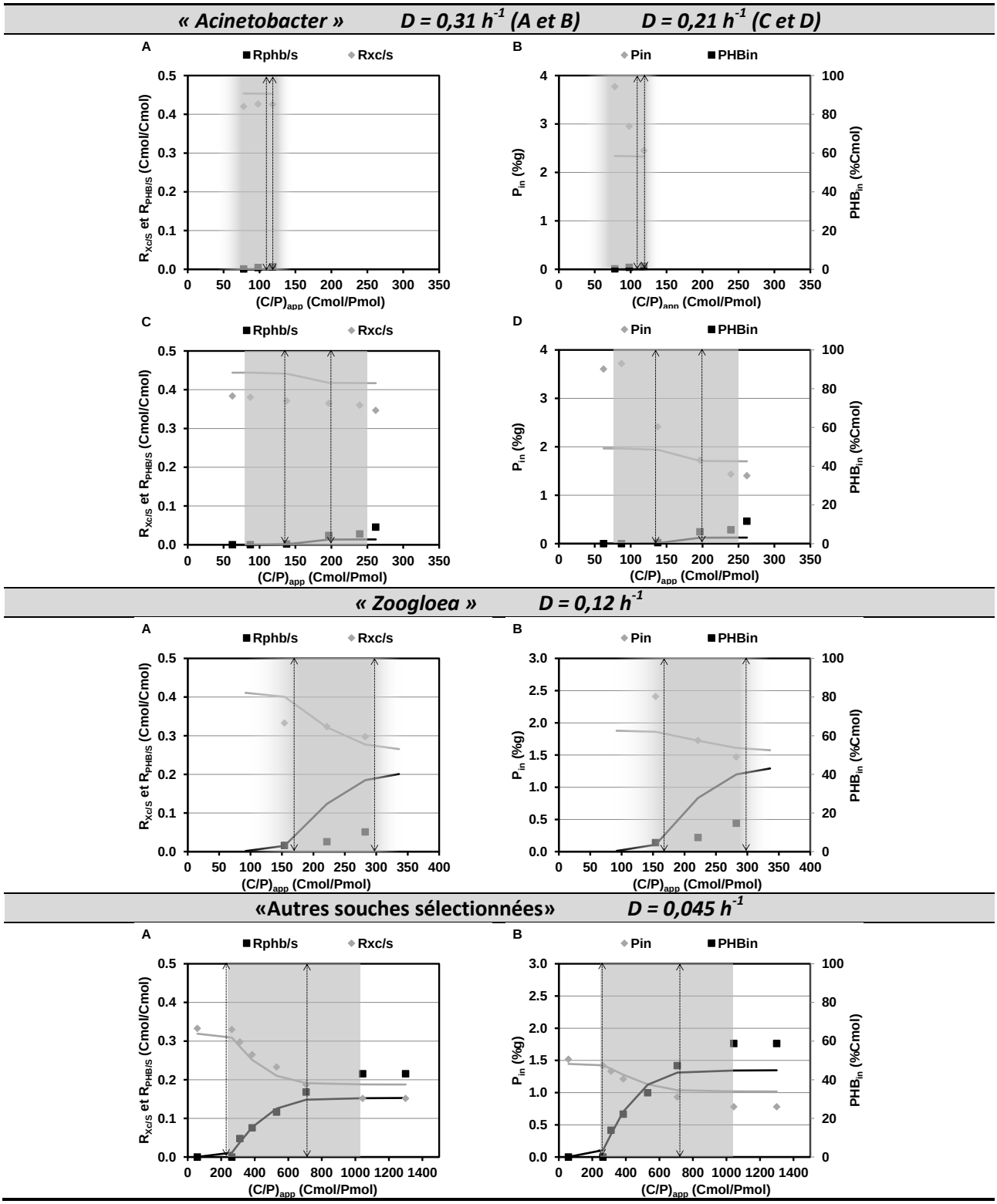

Figure 39 : Evolution des rendements observés (A et C) et des taux de phosphore et PHB intracellulaires (B et D) en fonction du degré de limitation appliqué en chémostat pour chaque catégorie de populations. La zone grise représente la zone de double limitation C&P observée expérimentalement; les traits en pointillé représentent les limites de la zone de double limitation C&P simulée. Symboles = expérimentation ; Trait continu = simulation.

Les résultats présentés montrent les paramètres des différentes catégories de populations déterminés par simulation. Les principales observations sont résumées ci-dessous.

(1) Une différence nette de la valeur estimée de μ_{max} entre les catégories de populations. Le μ_{max} est d'autant plus élevé que la sélection microbienne a été opérée à un taux de dilution grand.

(2) La valeur de q_{PHBmax} semble également dépendre du taux de dilution appliqué dans le chémostat. Cependant, les populations du genre *Acinetobacter* s'avèrent être des productrices médiocres de PHB. Ce résultat conforte les observations de Rees et al. (1993) qui ont étudiés les capacités de production de PHB de deux souches d'*Acinetobacter* isolées de boues activées. Que ce soit sous une limitation phosphore ou azote, une teneur inférieure à 10% en PHB a été atteinte.

(3) Les zones de double limitation simulées sont plus étroites que celles déterminées expérimentalement pour les populations de la catégorie « *Acinetobacter* ». Les conditions de sélection dans le chémostat A2 (D = 0,21 h^{-1}) ont été opérées dans des conditions de non limitation phosphore. Les populations ont montré des granules de polyP intracellulaires sous conditions de limitation C par la coloration spécifique de Neisser (Annexe C : Photographies des sélections microbiennes obtenues lors des expérimentations, Figure 65), surestimant le P_{in_max} et ainsi la taille de la zone de DLN.

(4) La production de PHB pour les populations de la catégorie « *Zoogloea* » est surestimée dans la zone de DLN. La teneur intracellulaire maximale de PHB simulée est de 41% contre 18%. La cause de ce phénomène peut être liée à une redirection du carbone vers un autre métabolite secondaire non pris en compte dans le modèle cinétique. En effet, les observations microscopiques après coloration spécifique au noir de Soudan montrent la présence d'une gaine extracellulaire pour cette sélection microbienne, évoquant la production d'exopolysaccharides (Annexe C : Photographies des sélections microbiennes obtenues lors des expérimentations, Figure 67 - A4).

II.2.b ***Sur acide butyrique***

Le modèle cinétique établi ne prend pas en compte la présence de multi-substrats. Ainsi, les paramètres cinétiques et stœchiométriques recherchés seront donc des paramètres moyens observés pour un mélange d'acide acétique/butyrique (30/70 ratio Cmol). D'après Grousseau (2009), les rendements théoriques limites sur substrat pur acide butyrique sont $Y_{Xc/S}$ = 0,65 Cmol/Cmol et $Y_{PHB/S}$ = 0,88 Cmol/Cmol. Tenant compte des proportions de chaque substrat, les rendements théoriques limites de ce mélange calculés et pris en compte dans le modèle cinétique sont $Y_{Xc/S}$ = 0,61 Cmol/Cmol et $Y_{PHB/S}$ = 0,81 Cmol/Cmol. La démarche adoptée et présentée à partir des résultats obtenus sur AA a été effectuée avec les résultats obtenus sur le mélange acide acétique/butyrique (Figure 70 et Figure 71 dans l'Annexe E : Résultats des simulations sur AA + AB). Le Tableau 29 récapitule l'ensemble des paramètres cinétiques et stœchiométriques déterminés pour chaque catégorie de population sur le mélange AA+AB.

Tableau 29 : Récapitulatif des paramètres cinétiques et stœchiométriques des différentes catégories de populations microbiennes avec un mélange AA et AB comme source de carbone

Paramètres	*« Zoogloea »*	*« Malikia »*
μ_{max}	0,35	0,55
q_{PHBmax}	1,1	1,1
q_{Pmax}	0,035	0,055
K_P	0,01	0,01
K_{PHB}	0,0001	0,0001
K_C	0,1	0,1

Les principales observations faites à partir de ces deux catégories de populations sont résumées ci-dessous.

(1) Tout comme les résultats sur AA, un effet net de la valeur estimée de μ_{max} est mis en évidence, effet croissant avec le taux de dilution appliquée pour la sélection microbienne.

(2) Toutes les populations montrent une grande capacité de production de PHB avec un q_{PHBmax} de 1,1 Cmol/Cmol.h. Ici l'effet conditions de sélection n'est pas montré.

En comparant les résultats obtenus selon les sources de carbone, on peut remarquer que les populations du genre *Acinetobacter* ne sont pas sélectionnées contrairement aux populations du genre *Malikia*. De plus, un q_{PHBmax} 2 fois plus élevé est obtenu sur le mélange acide acétique/butyrique. Cela soulève l'effet substrat sur la sélection des souches mais aussi sur les paramètres cinétiques des souches qui sera un point abordé dans le chapitre suivant.

II.3. Discussion sur le modèle cinétique

Le calage des paramètres μ_{max} et q_{PHBmax} selon les catégories de populations identifiées, a permis de représenter avec plus de justesse l'ensemble des expérimentations obtenus en batch et en chémostat. Des comportements simulés parfois pas tout à fait fidèles aux résultats expérimentaux, ont été mis en évidence. Les différences sont observées au niveau de la zone de double limitation souvent plus restreinte, ou de la répartition de la conversion du carbone surestimant ou sous-estimant la biomasse catalytique ou le PHB. Cependant les limites dans le calage de ce modèle cinétique sont discutées ci-dessous.

(1) L'estimation des paramètres P_{in_exp} et P_{in_crit} identiques pour toutes les populations sélectionnées est une des limites majeures de notre approche, ceci étant d'autant plus vrai que leur degré d'influence sur les variables d'état est élevé. L'étude bibliographique a montré des variations de P_{in} différentes selon les populations, bien qu'elles se situent toujours dans les mêmes gammes. Il est clairement montré que les bactéries ont des taux de phosphore en phase exponentielle variables (Ehlers et al., 2010). Par exemple, dans le cas de nos simulations, une valeur de P_{in_exp} plus faible permettrait d'élargir la zone de double

limitation et d'augmenter la dilution du P_{in} engendrant une meilleure répartition du carbone par rapport aux résultats expérimentaux.

(2) L'étude de la sensibilité du modèle, réalisée dans le chapitre précédent, a été effectuée sur les trois domaines de limitation nutritionnelle à la fois. Cependant, en étudiant plus en détails, l'influence des paramètres K_C, K_P et K_{PHB} dépend logiquement de chaque condition opératoire du chémostat, à savoir le type de limitation nutritionnelle (carbone, carbone et phosphore, phosphore). Dans notre étude, les paramètres K_C et K_P ont été imposés pour ensuite caler le paramètre K_{PHB}. Une étude plus approfondie des souches selon les conditions du chémostat devrait être effectuée pour caler ces paramètres précisément.

(3) Les paramètres μ_{max} et q_{PHBmax} ont été estimés en prenant en considération le même processus de maintenance cellulaire pour les souches. Les coefficients de maintenance cellulaire sont fonction des voies métaboliques empruntées et donc des souches microbiennes.

(4) En ce qui considère l'assimilation du phosphore, deux estimations ont été faites : la valeur du q_{Pmax} proportionnelle au μ_{max} (facteur 0,1) et un besoin linéaire en phosphore avec le taux de croissance.

En conclusion, le postulat de différences de paramètres cinétiques différents pour les populations sélectionnées nous paraît réaliste et fondé, malgré les limites montrées du modèle. Le taux de dilution du chémostat, la nature du substrat carboné et le degré de limitation sont des conditions discriminantes. Le classement en 4 groupes apparaît suffisant pour représenter nos résultats en se bornant bien sûr au cas de la limitation en phosphore et pour le domaine expérimental défini par nos expériences. Le modèle peut donc être utilisé pour améliorer notre compréhension des comportements des populations microbiennes soumises à une limitation en phosphore.

III. ETUDE DE LA CONVERSION DU CARBONE SELON LES PARAMETRES CINETIQUES (μ_{MAX}, Q_{PHBMAX}) ET OPERATOIRES : *IDENTIFICATION DES PARAMETRES CINETIQUES IMPLIQUES*

Cette partie vise à utiliser le modèle cinétique préalablement établi pour prospecter sur les comportements des populations microbiennes en termes de devenir du carbone, dilution du P_{in}, limites de concentrations en P intracellulaires selon leurs paramètres cinétiques μ_{max} et q_{PHBmax}. Pour cela, un plan d'expérience est bâti pour le modèle. Il se base sur 4 jeux de valeurs pour le couple μ_{max} et q_{PHBmax} (Tableau 30).

Tableau 30 : Valeurs des couples (μ_{max} ; q_{PHBmax}) choisies

	Souche 1p	Souche 1np	Souche 2p	Souche 2fp
μ_{max} (h^{-1})	0,35	0,35	0,55	0,55
q_{PHBmax} (h^{-1})	0,55	0	0,55	0,05
Producteur PHB	Oui	Non	Oui	Faible

Notons qu'une souche non stockeuse de PHB est considérée. Cela permet de visualiser l'effet du stockage de PHB sur la forme de la zone de DNL. Pour les simulations, les paramètres K_P, K_{PHB} et K_C sont les mêmes que ceux déterminés pour l'ensemble des catégories de populations sur AA. De la même manière, la valeur du q_{Pmax} correspond à 0,1 x μ_{max}. L'étude est effectuée sur un seul substrat, l'acide acétique, dans un premier temps. L'effet source de carbone (présence de butyrate) sera abordé par la suite (changement des rendements théoriques limites).

III.1. Influence du μ_{max} et q_{PHBmax} sur l'extension de la zone de DLN

Avant d'étudier en détail l'effet des paramètres cinétiques μ_{max} et q_{PHBmax} à l'intérieur de la zone de DLN, les frontières de la zone de double limitation C&P sont analysées à partir des résultats simulés avec les paramètres des 4 souches (Figure 40).

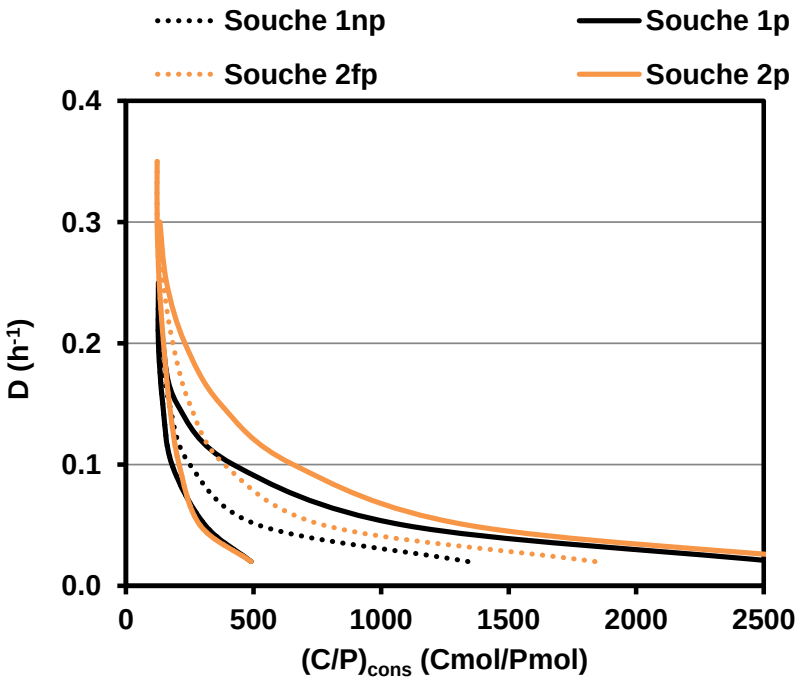

Figure 40 : Frontières simulées entre les zones de limitation nutritionnelle avec AA selon les paramètres cinétiques et stœchiométriques des souches 1p, 1np, 2p et 2fp

Les allures des 4 zones de limitations sont similaires et de forme classique. Cependant des petites variations sont notées selon la souche. Au-dessus d'un taux de dilution de 0,12 h^{-1}, les zones de limitation sont plus larges pour les souches 2, qui ont le μ_{max} le plus élevé et ce malgré une capacité de

stockage très différente. Ce résultat montre l'importance de la valeur de μ_{max} sur l'extension de la zone de double limitation à fort taux de dilution. En-dessous d'un taux de dilution de 0,12 h^{-1}, une zone plus large est obtenue avec les souches 1p et 2p qui ont le q_{PHBmax} le plus élevé, montrant l'importance prépondérante de ce paramètre à plus faible D.

III.2. Etude du devenir du carbone selon les zones de DLN

L'enjeu est d'étudier le point de bascule entre croissance et stockage de PHB selon les paramètres μ_{max} et q_{PHBmax} et de comprendre ainsi les paramètres gouvernant le devenir du carbone. Pour cela, une première comparaison des rendements observés ($R_{Xc/S}$, $R_{PHB/S}$ et $R_{Xc/P}$) est réalisée en fonction du degré de limitation phosphore consommé avec les paramètres cinétiques des souches 1 (qui ont un q_{PHBmax} différents). L'analyse des limites intracellulaires en termes de P_{in} (min et max), de PHB_{in} (max), selon le taux de croissance pour les 4 souches, est effectuée.

III.2.a *Analyse des rendements carbone et phosphore*

La Figure 41 représente l'évolution des rendements observés $R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$ pour la souche 1p (A) et 1np (B) selon le degré de limitation phosphore consommé pour 5 D simulés.

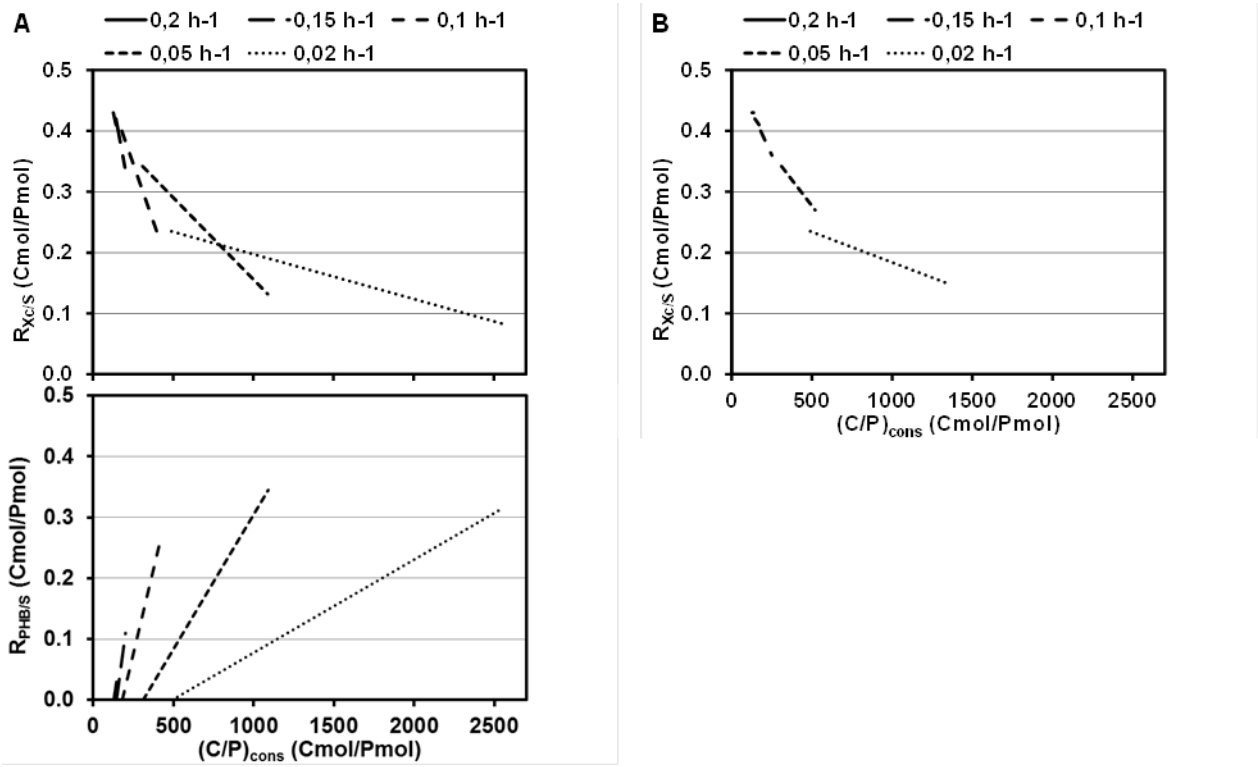

Figure 41 : Evolution des rendements observés $R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$ pour la souche 1p (A) et 1np (B) selon le degré de limitation phosphore consommé pour 5 D appliqués

En comparant ces deux souches le rendement observé en biomasse catalytique présente la même allure mais lorsque la souche est capable de stocker du PHB, la plage de variation possible pour chaque taux de dilution est plus étendue. En effet, les deux processus, croissance et stockage consomment le carbone. Logiquement, un rendement de croissance est d'autant plus faible que la production de PHB est élevée, entrainant un élargissement de la zone DLN comme mis en évidence précédemment.

Ainsi la production de PHB est d'autant plus déclenchée que le q_{PHBmax} est élevé et impactera d'autant plus le rendement de la croissance cellulaire observé au fur et à mesure de l'augmentation de la limitation phosphore.

La Figure 42 représente l'évolution du rendement phosphore ($R_{Xc/P}$) selon le degré de limitation phosphore consommé pour les souches 1p (A) et 1np (B).

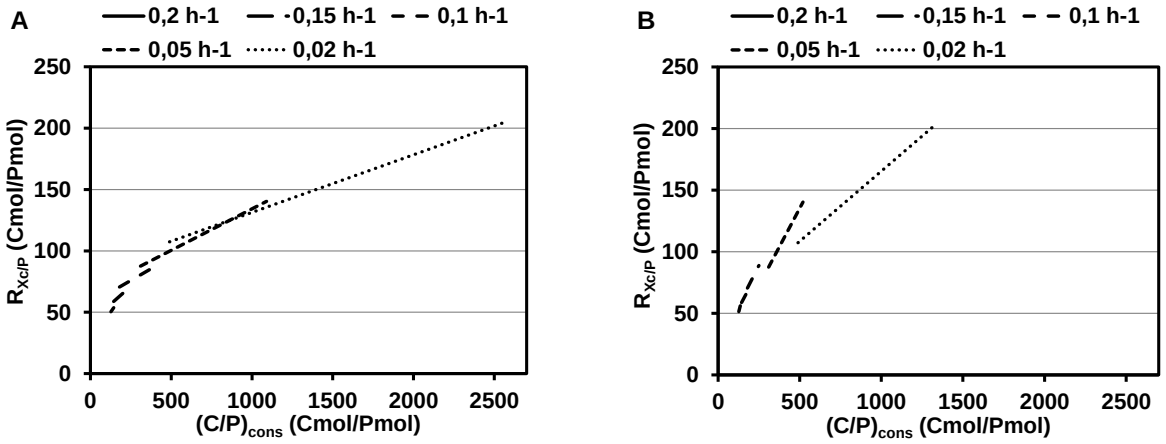

Figure 42 : Evolution du rendement phosphore ($R_{Xc/P}$) selon le degré de limitation phosphore consommé pour la population 1p (A) et 1np (B) selon le degré de limitation phosphore consommé pour 5 D appliqués

Pour un taux de dilution de 0,02 h^{-1} par exemple, le $R_{Xc/P}$ varie entre 105 et 200 Cmol/Pmol pour les 2 souches mais sur une gamme de degré de limitation phosphore plus grande lorsque la souche est productrice. Que la souche soit productrice ou non, les gammes de dilution du P_{in} sont identiques (comprise entre 50 et 200 Cmol/Pmol), ce qui montre que le rendement phosphore est uniquement impacté par le μ_{max}. Ce résultat est logique car la dilution du phosphore intracellulaire est liée à la vitesse de croissance cellulaire. La production de PHB, elle, impacte uniquement la largeur de la zone de DLN et donc la plage dans laquelle la dilution du P_{in} peut avoir lieu pour un taux de dilution donné.

III.2.b *Analyse des limites intracellulaires aux frontières de la zone de DLN*

Nous avons montré que les plages possibles de dilution du P_{in} sont indépendantes du q_{PHBmax}. L'évolution des valeurs limites P_{in_min} et P_{in_max} et de PHB_{in_max} est représentée sur la Figure 43 en fonction du taux spécifique de croissance en chémostat pour les paramètres cinétiques et stœchiométriques des souches 1 et 2.

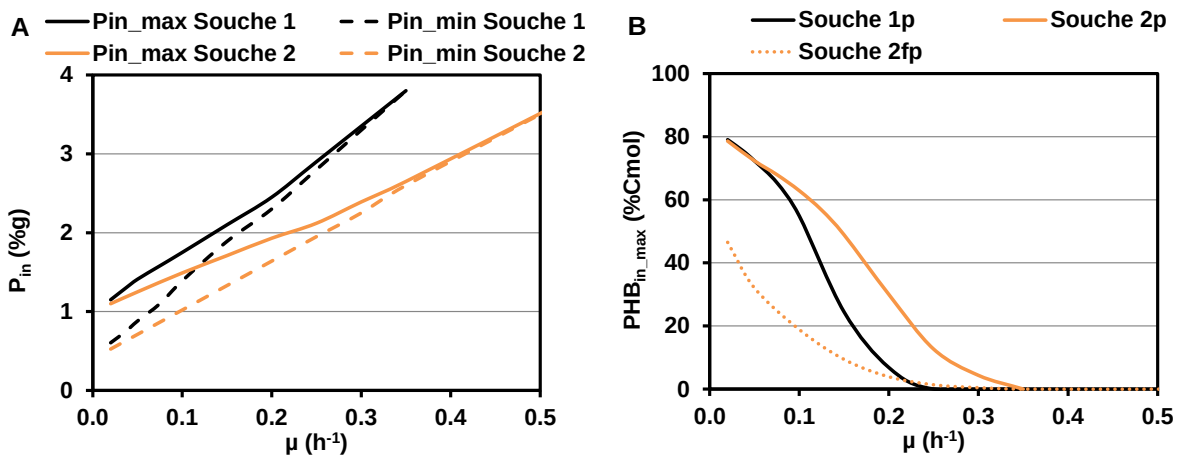

Figure 43 : Evolution des P_{in_min} et P_{in_max} (A) et PHB_{in_max} (B) selon le taux spécifique de croissance d'après les résultats simulés en chémostat avec les paramètres cinétiques et stœchiométriques des souches 1p, 2p et 2fp

Sur la Figure 43A, les allures des courbes P_{in_max} et du P_{in_min} en fonction de μ sont bien linéaires avec la zone DLN et sont d'autant plus étroites que l'on se rapproche de μ_{max}. En revanche les pentes des droites sont d'autant plus faibles que le μ_{max} est élevé.

Sur la Figure 43B, on note l'allure sigmoïdale du taux de PHB_{in_max} en fonction de μ mais décalée vers les valeurs plus élevée de μ pour la souche ayant un μ_{max} plus grand. La production de PHB est déclenchée pour un μ correspondant à 70% du μ_{max}.

En conclusion, ces simulations montrent que les limites intracellulaires en phosphore (maximales et minimales) selon le taux de croissance sont imposées par les valeurs de μ_{max} et celles du PHB_{in} résultent de la valeur des paramètres q_{PHBmax} et μ_{max}. A un taux spécifique de croissance donné, la population qui a le μ_{max} le plus élevé présente un plus faible P_{in}, résultant d'une plus grande limitation interne, et possède un PHB_{in} plus élevé.

III.3. Etude de la conversion du carbone selon les conditions opératoires : mise en évidence des paramètres gouvernant la production de PHB

L'enjeu de cette partie est de mettre en évidence le rôle du P_{in} et d'améliorer la compréhension sur les potentialités de production de PHB selon les paramètres cinétiques des souches (q_{PHBmax} et μ_{max}). C'est pourquoi les cinétiques de production de PHB sont étudiées selon le taux de croissance puis selon le P_{in}.

III.3.a *Etude en réacteur chémostat : influence du taux de dilution*

A partir des résultats simulés avec les paramètres cinétiques des souches 1p et 2p (μ_{max} différents), la plage de variation du q_{PHB} (barres verticales) pouvant être obtenue selon le D appliqué est représentée sur la Figure 44. Pour relier au P_{in}, le P_{in_min} obtenu à chaque taux de croissance est représenté.

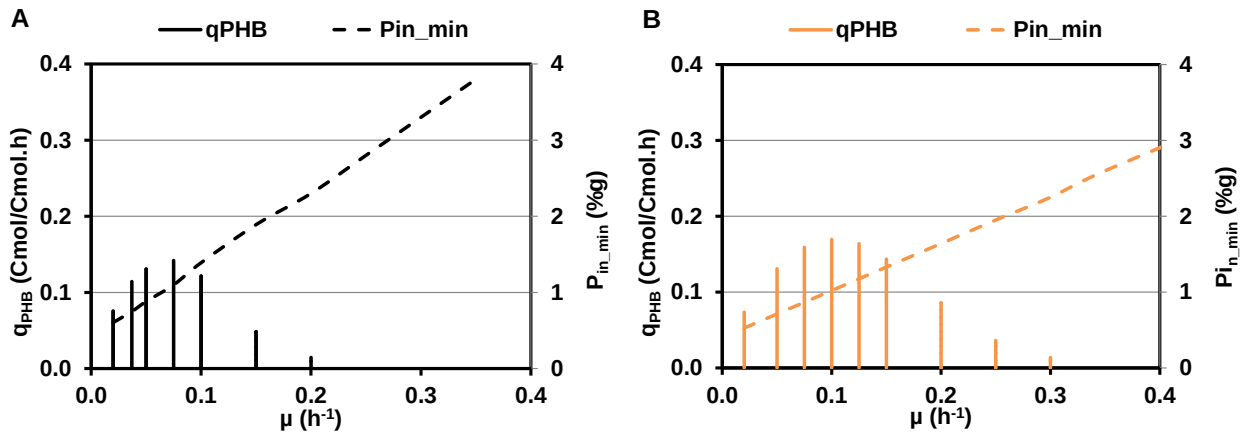

Figure 44 : Evolution des gammes de q_{PHB} et des P_{in_min} selon les taux de croissance appliqués avec les paramètres cinétiques μ_{max} et q_{PHBmax} des souches 1p (A) et 2p (B) d'après les résultats simulés

Une plus grande variation du q_{PHB} est observée pour la souche 2p, par rapport à la souche 1p (0,17 h^{-1} contre 0,14 h^{-1}) et cette valeur est obtenue pour un μ légèrement plus élevé à μ = 0,2 x μ_{max}. A même taux de dilution, un q_{PHB} observé sera plus élevé avec un plus fort μ_{max}.

III.3.b *Le P_{in}, un paramètre déterminant, gouvernant le devenir du carbone*

Pour analyser en détail l'implication du taux de phosphore intracellulaire dans la conversion du carbone et la production de PHB, les vitesses spécifiques de production de PHB sont représentées en fonction du P_{in} (Figure 45) pour les souches 1p (A) et 2p (B).

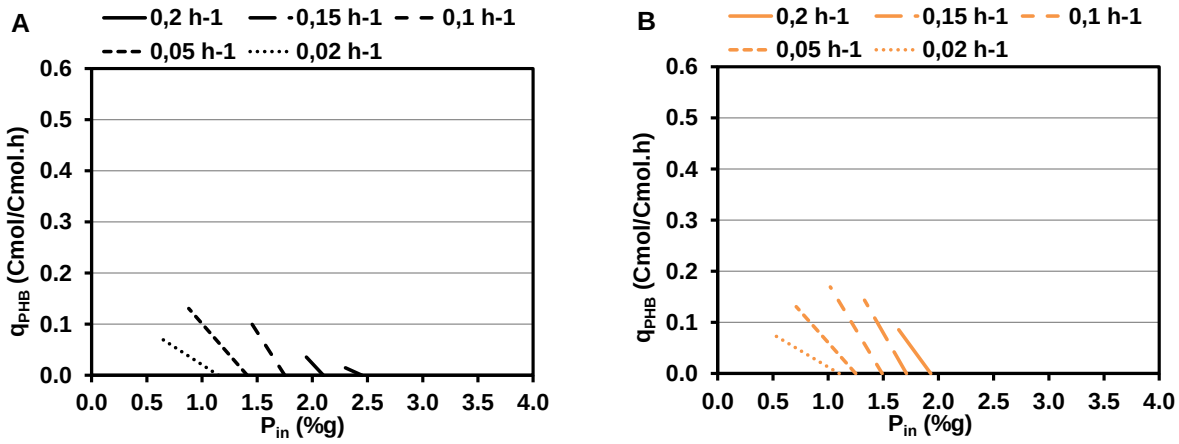

Figure 45 : Evolution des q_{PHBmax} observés selon le P_{in_min} d'après les résultats simulés en réacteur chémostat (régimes permanents) ; Evolution des q_{PHBmax} observés selon le P_{in} d'après les résultats simulés en réacteur chémostat (régimes permanents) des souches 1p (A) et 2p (B) d'après les résultats simulés

En régime permanent, à chaque taux de dilution, la vitesse spécifique de production de PHB augmente linéairement avec la diminution du P_{in}. Par exemple, pour les résultats simulés avec la souche 1p, avec un D = 0,05 h^{-1}, le q_{PHB} est nul pour un P_{in} = 1,41% et vaut 0,13 Cmol/Cmol.h pour un P_{in} = 0,88%. Ces valeurs de P_{in} correspondent en fait aux valeurs de P_{in_max} et P_{in_min}, respectivement, pour ce D appliqué.

La Figure 46 représente les valeurs maximales de q_{PHB} observées (A) et les teneurs maximales de PHB_{in} pouvant être atteintes (B) pour ces deux souches selon le P_{in}.

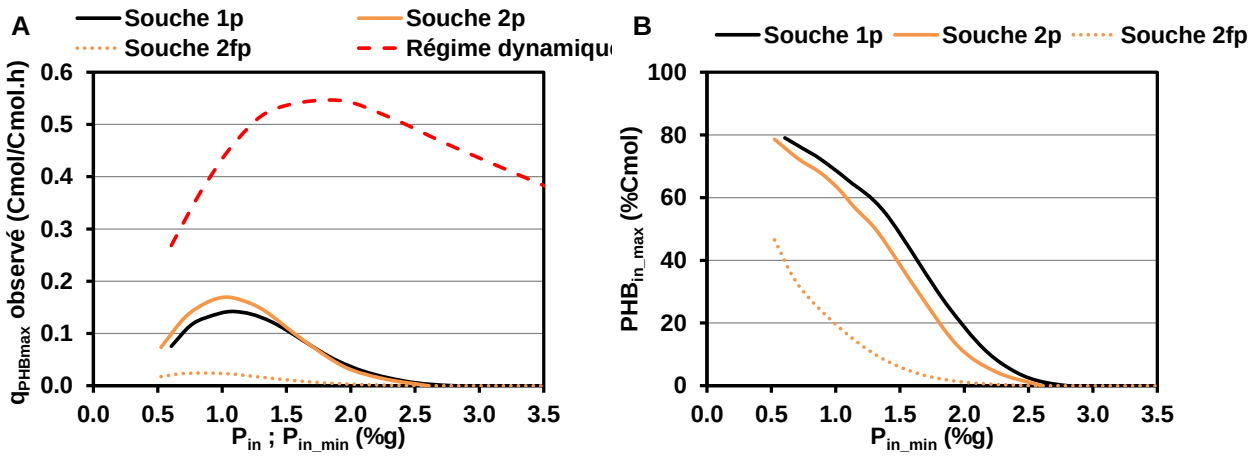

Figure 46 : Evolution du q_{PHBmax} observé en fonction du P_{in_min} d'après les résultats simulés en chémostat avec les souches 1p, 2p et 2fp et du q_{PHBmax} observé en fonction du P_{in} d'après les résultats simulés en batch (régime dynamique) avec les souches 1p et 2p (A) ; Evolution du PHB_{in_max} en fonction du P_{in_min} d'après les résultats simulés en chémostat avec les souches 1p, 2p et 2fp (B)

Comme le montre la Figure 46A, pour les deux souches microbiennes (1p et 2p), se différenciant par la valeur du paramètre μ_{max}, en régimes permanents en réacteur chémostat :

- la vitesse maximale observée de q_{PHB} est atteinte lorsque le P_{in_min} vaut environ 1,1%,
- la production de PHB est déclenchée en-deçà d'une valeur de 2,5% de phosphore intracellulaire.

En ce qui concerne les résultats simulés en régime dynamique (réacteur batch), le q_{PHBmax} est atteint pour un P_{in} de 2% quelle que soit la valeur du μ_{max} des souches, comme observé expérimentalement. Des valeurs beaucoup plus faibles de q_{PHB} sont observées en régimes permanents (chémostat). La vitesse maximale de PHB est impactée par le taux de phosphore intracellulaire, et par un terme supplémentaire d'encombrement stérique (n).

- Le taux de phosphore intracellulaire, lorsque le q_{PHB} tend vers sa valeur maximale, est 2%, au-delà et en-deçà de cette valeur, la vitesse de production de PHB est inférieure à la vitesse maximale.
- Les phénomènes liés à l'encombrement stérique interviennent pour des teneurs intracellulaires supérieures à 50 % soit pour un taux de dilution de 0,1 h^{-1} pour la souche 1p et 0,15 h^{-1} pour la souche 2p.

La Figure 46B montre que, pour deux souches productrices ayant un μ_{max} différent, un léger décalage est observé sur le PHB_{in_max} à même P_{in_min} obtenu en régime permanent. Ce léger décalage s'explique car le

PHB_{in} est une résultante du q_{PHB} et du μ avec : $\mathrm{PHB_{in}} = \frac{q_{PHB}}{q_{PHB}+\mu}$. Pour un même q_{PHB}, un μ plus faible entrainera un PHB_{in} plus élevé. Cependant, la valeur du μ_{max} des souches n'a pas un effet drastique sur la teneur intracellulaire en PHB.

Tous ces résultats montrent l'importance de la teneur intracellulaire en phosphore sur la production de PHB, puisque quel que soit le μ_{max} des souches sélectionnées, les q_{PHBmax} observés et les PHB_{in_max} calculés sont quasi invariants pour un même P_{in}.

III.3.c *Conclusions sur les paramètres gouvernant la redirection du carbone*

Pour résumer les réponses de la production de PHB en chémostat et les paramètres impliqués :

(1) Un taux de dilution couplé à une double limitation nutritionnelle impose un μ et un besoin en phosphore compris entre un P_{in_min} et P_{in_max} qui eux, sont d'autant plus faibles que le μ_{max} est élevé.

(2) Le P_{in} gouverne la redirection du carbone vers le stockage de PHB. Celui-ci est d'autant plus important que le P_{in} tend vers 2% et que le q_{PHBmax} de la souche est élevé.

(3) Les capacités de production de PHB sont proportionnelles aux q_{PHBmax} des souches.

(4) Le μ_{max} de la souche a, avant tout, un effet sur la productivité car il permet d'obtenir les mêmes capacités de production (P_{in} et donc q_{PHB}) à des D supérieurs.

En conclusion, c'est donc le degré de limitation en phosphore ainsi que le D qui vont imposer le P_{in} et en conséquence la concentration en biomasse catalytique et en PHB. De plus, le q_{PHB_max} va influer sur le potentiel de redirection du carbone vers le PHB. Il conviendra donc de viser des souches aux potentielles de production maximales (q_{PHBmax}) mais également de μ_{max} élevé pour optimiser la productivité.

III.4. Effet de la source de carbone : la présence de butyrate

La conversion du carbone par l'acide butyrique améliore les rendements observés de par des rendements théoriques limites plus élevés. L'effet de la source de carbone est alors abordé par l'étude du rôle et de l'impact des rendements théoriques limites sur les zones de DLN, le devenir du carbone et l'importance du paramètre P_{in}. Bien qu'il ait été mis en évidence que la présence de butyrate améliore la production de PHB par des valeurs de q_{PHBmax} plus élevées, il a été choisi de prendre en considération uniquement les rendements théoriques limites dans un premier temps. Les paramètres cinétiques et stœchiométriques de la souche 1 sont choisis, et uniquement les rendements théoriques limites sont remplacés par ceux calculés avec le mélange AA+AB : ($Y_{Xc/S}$ = 0,61 Cmol/Cmol et $Y_{PHB/S}$ = 0,81 CmolC/mol).

III.4.a *Influence des rendements Y sur l'extension de la zone de DLN*

Comme observé expérimentalement (Annexe F : Résultats des expérimentations sur AA + AB, Figure 72), la présence de butyrate réduit légèrement les zones de DLN pour chaque taux de dilution comparés à celles obtenues sous AA (Figure 47). En effet, des rendements théoriques limites plus élevés améliorent l'efficacité de conversion du carbone. Une quantité moindre de carbone est donc consommée pour produire autant de PHB ou de X_C par rapport au substrat carboné.

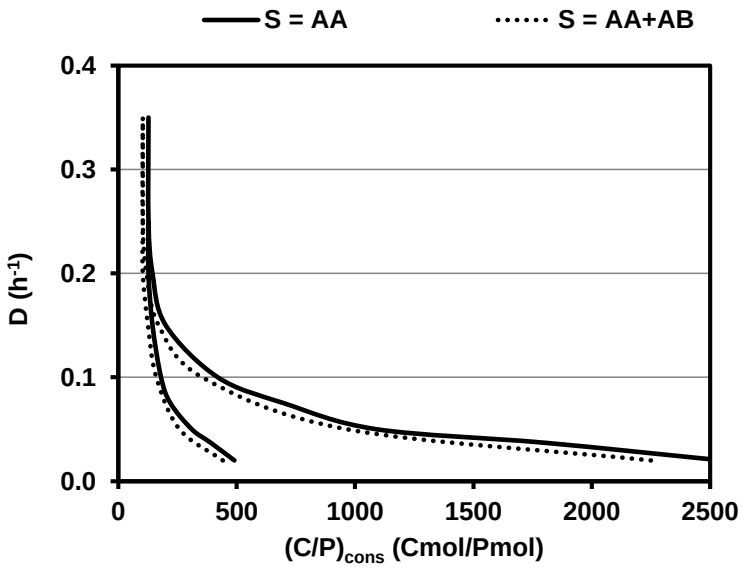

Figure 47 : Zones de double limitation nutritionnelles pour chaque taux de dilution lorsque l'AA ou le mélange AA+AB est utilisé comme source de carbone

III.4.b *Evolution des rendements observés dans la zone DLN*

La Figure 48 compare les rendements observés obtenus dans la zone de DLN pour 5 taux de dilution lorsque AA et le mélange AA+AB est utilisé comme source de carbone.

Pour un même niveau de limitation phosphore, de meilleurs rendements sont obtenus pour les trois rendements observés ($R_{Xc/S}$, $R_{PHB/S}$ et $R_{Xc/P}$),. Ce résultat était attendu, car des rendements théoriques limites supérieurs :

- améliorent la conversion du carbone de manière générale,
- augmentent la plasticité du phosphore intracellulaire,
- réduisent la zone de DLN pour chaque D.

Il est important de souligner que ces résultats simulés sont en accord avec les résultats expérimentaux ((Annexe F : Résultats des expérimentations sur AA + AB, Figure 73, Figure 74 et Figure 75)).

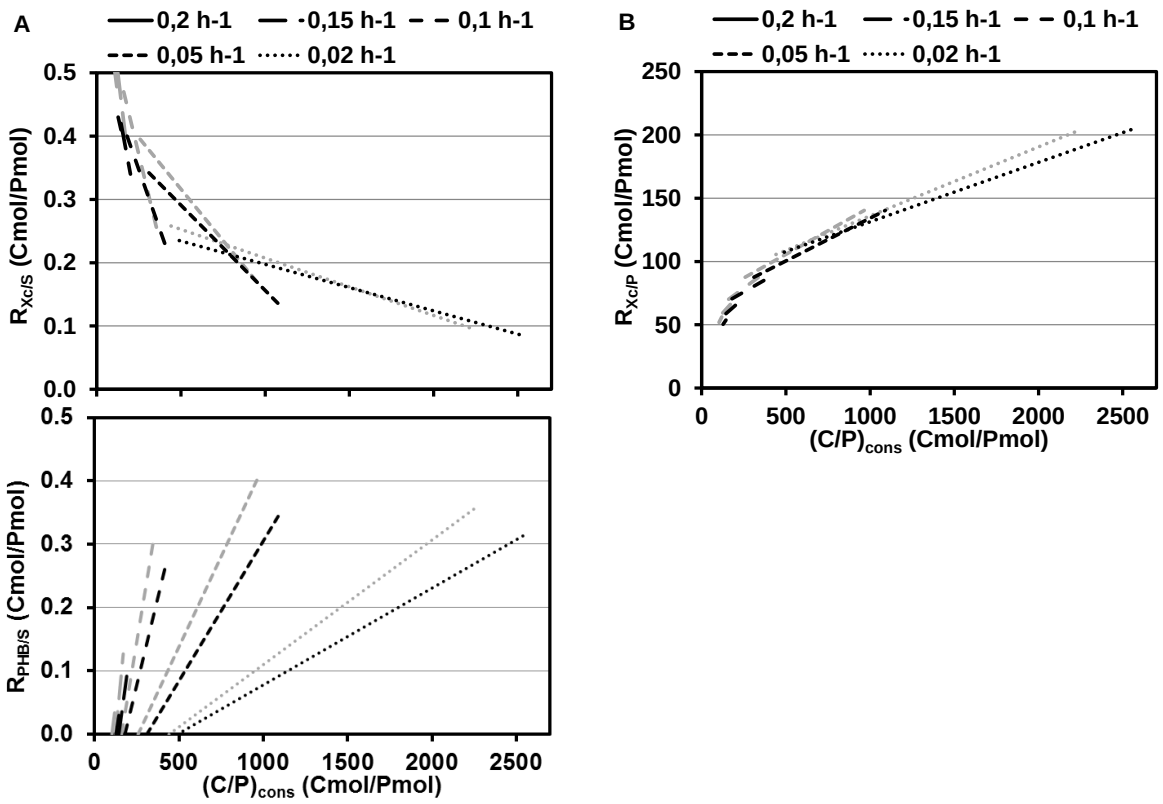

Figure 48 : Evolution des rendements observés en fonction du $(C/P)_{cons}$: comparaison des résultats simulés obtenus avec les paramètres cinétiques de la souche 1p avec des rendements théoriques limites d'AA (en noir) et du mélange AA+AB (en gris)

III.4.c *Influence du paramètre P_{in} selon les sources de carbone sur les cinétiques de production de PHB*

Pour un même degré de limitation phosphore, et un même taux de dilution, les résultats simulés ont mis en évidence une dilution du phosphore intracellulaire supérieure lorsque le butyrate est présent en tant que source de carbone. Pour étudier l'effet de ce comportement intracellulaire du phosphore, les q_{PHBmax} observés par la simulation des résultats à chaque P_{in_min} obtenus en réacteur chémostat (régime permanent) sont représentés sur la Figure 49.

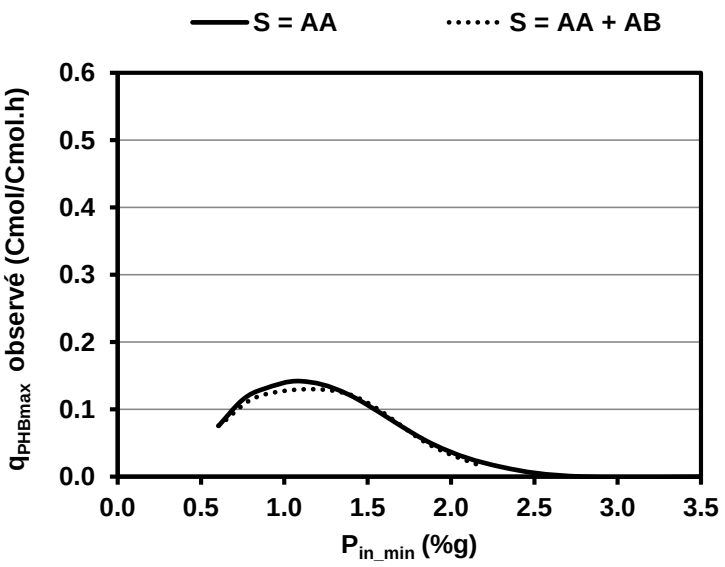

Figure 49 : Evolution du q_{PHBmax} observé selon le P_{in_min} obtenu en réacteur chémostat lorsque l'AA et un mélange AA+AB est utilisé comme source de carbone, d'après les résultats simulés

Aucune différence n'est constatée à partir des résultats simulés sur AA et sur le mélange AA+AB. La présence de butyrate n'impacterait pas les cinétiques de production de PHB selon le taux de phosphore intracellulaire. Ainsi pour un même niveau de limitation, l'amélioration de la redirection du carbone vers la production de PHB s'annule par la meilleure efficacité de conversion du carbone en X_C, induisant une même vitesse spécifique de production de PHB.

Ce résultat vient surtout confirmer l'effet et le rôle déterminant du P_{in} sur la conversion du carbone et sur l'indice de limitation interne pour la redirection du carbone vers la production de PHB.

En réalité, les résultats expérimentaux des paramètres cinétiques des populations sélectionnées en présence de butyrate ont montré des q_{PHBmax} largement supérieurs à ceux obtenus sur AA uniquement (1,1 face à 0,55 Cmol/Cmol.h). Ainsi, un q_{PHBmax} plus élevé devrait élargir la zone de DLN, augmenter les cinétiques de production de PHB maximales observées. Cependant, l'identification des paramètres stœchiométriques par le modèle cinétique a conclu à un paramètre K_{PHB} plus faible en présence de AB. Cela traduit, qu'en présence de ce substrat, il est nécessaire d'avoir une concentration en phosphore plus faible dans le surnageant pour rediriger une production de PHB équivalente à celle de l'AA.

Il a été choisi de modifier ce paramètre pour caler sur les valeurs expérimentales. Cependant, il se pourrait également que :

- l'affinité pour le substrat soit inférieure (K_C > 0,1 Cmmol/L)
- l'affinité pour le phosphore soit supérieure (K_P < 0,01 mmol/L)
- il y ait un antagonisme entre les deux substrats réduisant la répartition du carbone vers la production de PHB en chémostat comme démontré par Grousseau (2012).

IV. CONCLUSION

Pour améliorer la compréhension des mécanismes mis en évidence précédemment, l'ensemble des résultats expérimentaux est confronté aux simulations du modèle cinétique. Celui-ci, préalablement construit à partir d'une mono-souche, a permis d'étudier :

- l'influence des conditions de sélection sur les potentialités des souches,
- le rôle des paramètres cinétiques des souches, tels que μ_{max} et q_{PHBmax}, sur le devenir du carbone selon les conditions opératoires (D, C/P, source de carbone)

Le calage de ces paramètres cinétiques (en dynamique via les résultats des batch) puis des constantes d'affinité (en régime continu), a été effectué avec succès pour chaque population catégorisée selon les conditions de sélections.

Ce résultat montre le bon comportement du modèle élaboré lorsque celui-ci est adapté à chaque catégorie de population. Ceci appuie les limites d'un modèle totalement universel présenté dans le chapitre précédent par rapport à l'hypothèse mono-souche.

Par le calage du jeu de paramètres μ_{max} et q_{PHBmax}, il a ainsi été mis en évidence que :

- des conditions de sélection à fort taux de dilution favorisent une sélection de souches ayant des μ_{max} élevés,
- la présence de butyrate au cours de la sélection favorise les producteurs de PHB à fort q_{PHBmax}.

En étudiant le rôle des paramètres cinétiques différenciés de chaque souche (μ_{max} et q_{PHBmax}) sur le devenir du carbone, l'importance de taux de phosphore intracellulaire a été montrée. Le P_{in} gouverne la redirection du carbone vers le stockage de PHB. Celui-ci est d'autant plus important que le P_{in} tend vers 2% et que le q_{PHBmax} de la souche est élevé.

Selon les conditions de limitations, le couple µmax et D impose une gamme de P_{in} comprise entre un P_{in_min} et P_{in_max}. La production de PHB sera maximisée d'autant plus que le P_{in} tendra vers le P_{in_min}.

Le μ_{max} de la souche a, avant tout, un effet sur la productivité car il permet d'obtenir les mêmes capacités de production (P_{in} et donc q_{PHB}) à des D supérieurs. De plus, l'effet montré de la présence de butyrate sur l'amélioration des rendements appuie l'intérêt de l'utiliser comme source de carbone principale et de donc maximiser sa production en amont (via l'acidogénèse).

Ainsi, en réacteur chémostat, le P_{in} contrôle la redirection du carbone vers la production de PHB selon le taux de croissance imposé déterminant la valeur du q_{PHB} et donc du PHB_{in}.

En conclusion, c'est donc le degré de limitation en phosphore ainsi que le D qui vont imposer le P_{in} et en conséquence la concentration en biomasse catalytique et en PHB. De plus, le q_{PHB_max} va influer sur le potentiel de redirection du carbone vers le PHB. Il conviendra donc de viser des souches aux potentielles de production maximales (q_{PHBmax}) mais également de μ_{max} élevé pour optimiser la productivité. La Figure 50 est schéma simplifié montrant les paramètres impliqués sur la redirection du carbone vers la production de PHB sous limitation phosphore.

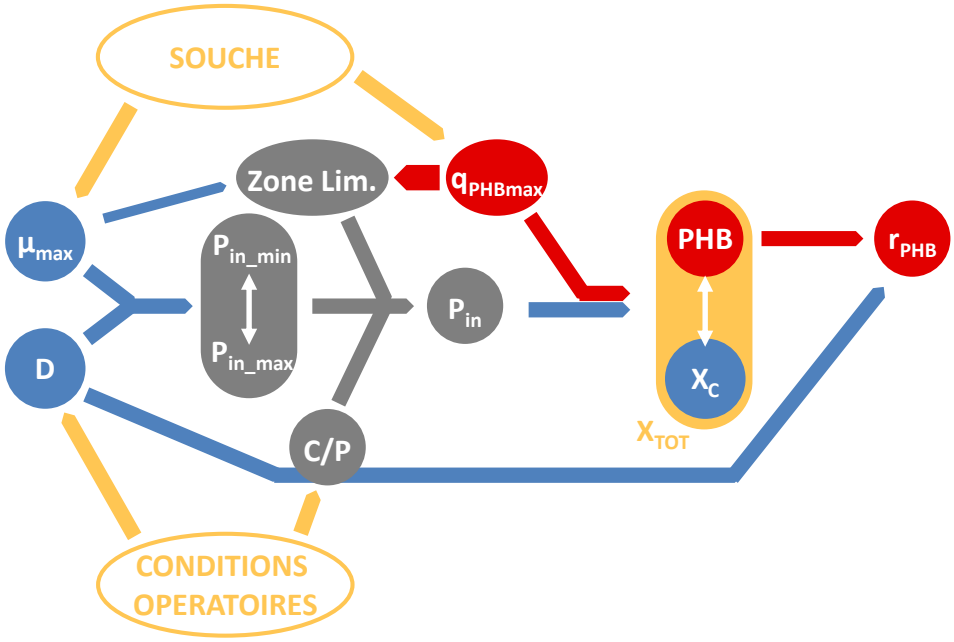

Figure 50 : Paramètres déterminants et impliqués dans la conversion du carbone et la distribution entre X_C et PHB sous limitation phosphore

Chapitre 4. Etude de la dynamique microbienne et détermination des paramètres influant la sélection de producteurs de PHA

I. INTRODUCTION

Les chapitres précédents ont montré qu'une boue activée traitant une eau résiduaire urbaine présentait des microorganismes ayant un potentiel de production de PHA, ces microorganismes pouvant être sélectionnés par une stratégie de limitation en phosphore en culture continue. Cette stratégie de limitation nutritionnelle doit être liée à une stratégie de conduite de réacteurs pour un enrichissement optimum des communautés microbiennes. Ce sont ces aspects de sélection microbienne qui sont discutés dans ce chapitre.

Il est important de sélectionner des microorganismes producteurs afin de minimiser les contaminations par les microorganismes non producteurs et ainsi d'obtenir des teneurs et des concentrations élevées en PHA. L'objectif est de sélectionner :

- la bactérie correspondant aux critères de performances fixés : μ_{max} et q_{PHBmax} élévés,
- des populations microbiennes assurant une robustesse du procédé de sélection,
- une bactérie permettant d'obtenir la qualité du polymère souhaitée. Pour cet aspect, nous avons considéré que les connaissances sur l'obtention d'un copolymère HB-HV sont suffisantes et que les bactéries sélectionnées seront capables de transformer le propionate ajouté en module HV.

La sélection microbienne en réacteur continu comprend :

(1) une période de forte diminution de la diversité microbienne en début de culture puisque toute cellule n'étant pas capable de se multiplier suffisamment vite pour compenser la dilution est éliminée du système,

(2) une période dynamique avec des oscillations entre quelques populations microbiennes,

(3) une période où une ou quelques populations dominantes s'installent durablement dans le procédés tant que les conditions opératoires ne sont pas significativement modifiées.

Dans ce chapitre, l'analyse de la dynamique et du résultat de la sélection microbienne vise à mieux comprendre l'effet des paramètres de procédé gouvernant la sélection de microorganismes surproducteurs de PHA. Ce travail doit aboutir à dégager les stratégies de conduite du procédé. Toutefois, l'analyse de la dynamique de la compétition microbienne est une étude à part entière. C'est pourquoi, celle-ci ne sera traitée ici qu'avec l'objectif d'identifier les principaux paramètres permettant une sélection robuste de surproducteurs pour maximiser la production de PHA.

Par le biais du séquençage de l'ADNr 16S, la démarche adoptée repose sur les points suivants :

- l'analyse de l'effet de la nature de la limitation nutritionnelle (carbone, phosphore, carbone & phosphore) et de sa dynamique en réacteur de type chémostat,
- l'analyse des populations microbiennes obtenues selon les taux de dilution appliqués et selon la source de carbone,
- La confrontation des analyses phylogéniques et des capacités fonctionnelles observées pour les cultures continues et batch.

La quantification et la qualification des populations microbiennes sélectionnées est donc réalisée au cours de cette analyse phylogénétique. Une évaluation de la robustesse de la sélection est enfin discutée.

II. PRESENTATION DES RESULTATS

Cette partie présente l'ensemble des résultats obtenus sur la diversité microbienne au cours des expérimentations chémostat. L'évolution de la dynamique des populations microbiennes est analysée par l'étude des populations majoritaires mis en évidence au cours des expérimentations selon le taux dilution appliqué, la nature de la source de carbone, le degré de limitation et la conduite du réacteur à partir d'un inoculum de boue activée en réacteur chémostat. Les populations minoritaires, quant à elles, sont regroupées dans un groupe appelé « autres », représentant moins de 5% des OTUs totaux. La structure des communautés de boues activées est donnée dans l'Annexe G : Diversité initiale de la boue activée.

II.1. Effet du taux de dilution et de la nature de la source de carbone sur les dynamiques de sélections microbiennes

Dans nos expériences, pour chaque taux de dilution et pour les deux sources de carbone (AA et AA+AB), les cultures ont été menées dans des conditions de double limitation, carbone et phosphore, avec une stratégie similaire d'augmentation progressive du degré de limitation C/P.

La Figure 51 représente l'évolution de la dynamique des populations au cours des expériences menées respectivement avec l'acide acétique uniquement (A), expérimentations A1 et A3, et avec le mélange acide acétique/butyrique (B), expérimentations B1 et B2, à un D élevé de 0,31 h^{-1} et 0,21 h^{-1}.

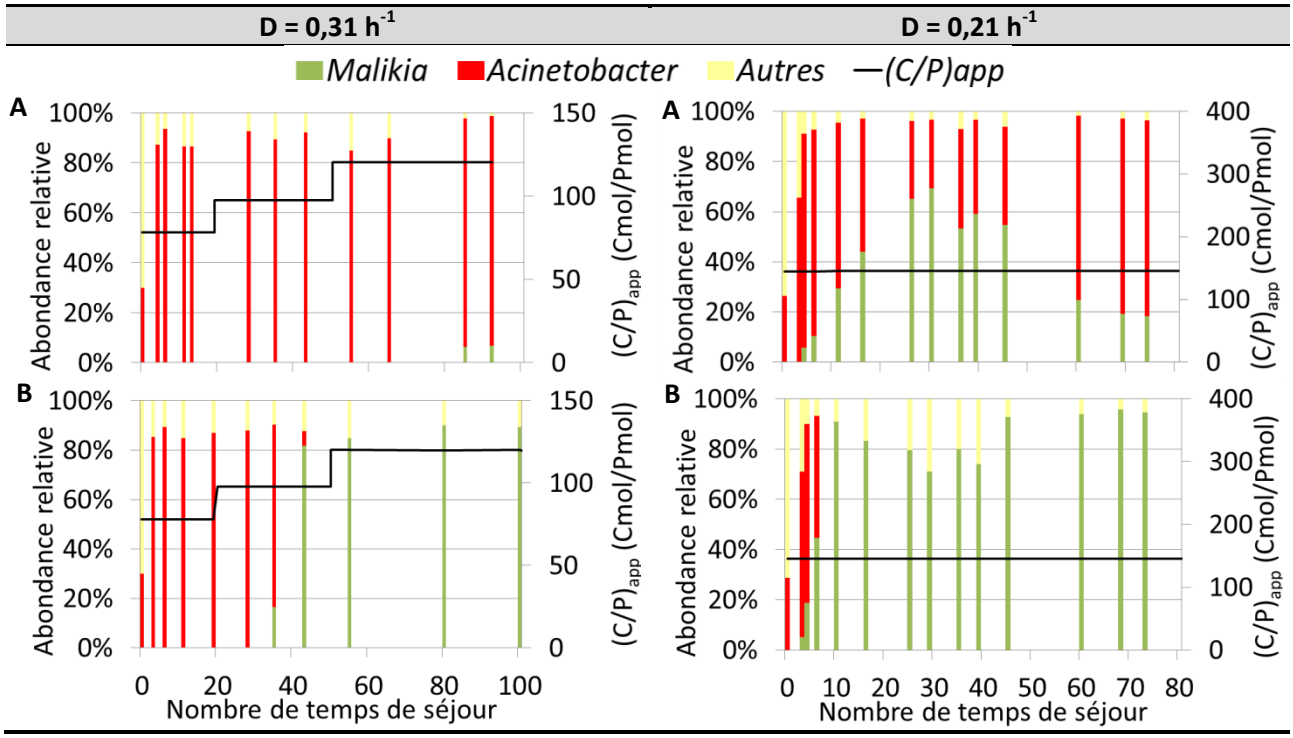

Figure 51 : Evolution de la dynamique des populations selon le nombre de temps de séjour au cours des expériences A1 et A3 (A) sur AA et B1 et B2 (B) sur AA+AB pour les taux de dilution appliqués de 0,31 h^{-1} et 0,21 h^{-1}. La catégorie « autres » regroupe toutes les populations minoritaires (OTUs < 5%).

D'après l'évolution de ces dynamiques de populations au cours de ces quatre expérimentations à des taux de dilution moyens à élevés (et par comparaison avec les résultats obtenus à plus faibles D qui seront présentés en suivant), on peut observer que :

- La population du genre *Acinetobacter*, fortement présente en dynamique pendant les premiers temps de séjour (85% de la communauté microbienne totale), est favorisée à fort D et en présence d'acide acétique ;
- La présence de butyrate ainsi qu'un taux de dilution appliqué de 0,21 h^{-1} (moyen par rapport à notre domaine d'étude) favorise la sélection de la population du genre *Malikia*) ;
- Les populations minoritaires regroupées dans le groupe nommé « autres » représentaient entre 5 et 10% de la communauté totale ; une proportion qui est donc assez faible et montre que la sélection microbienne a été forte.
-

La Figure 52 représente l'évolution de la dynamique des populations au cours des expériences menées respectivement avec l'acide acétique uniquement (A), expérimentations A4 et A5 et avec le mélange AA et AB (B), expérimentations B3 et B4, à un D de 0,12 h^{-1} et 0,045 h^{-1}.

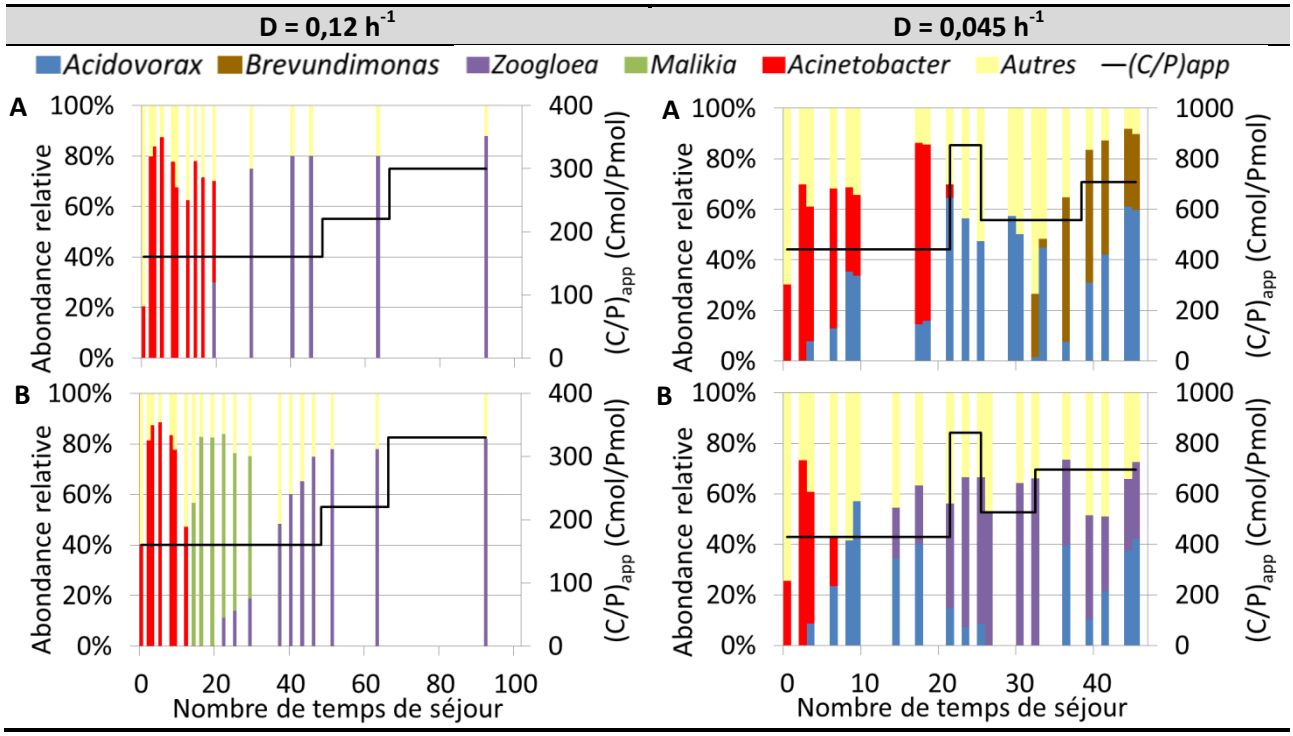

Figure 52 : Evolution de la dynamique des populations selon le nombre de temps de séjour au cours des expériences A4 et A5 (A) acide acétique et B3 et B4 (B) acide acétique/butyrique pour les D appliqués de 0,12 h^{-1} et 0,045 h^{-1}. La catégorie « autres » regroupe toutes les populations minoritaires (OTUs < 5%).

Ces résultats menés à des D plus faibles et sur les deux sources de carbone confirment :

- Pour le régime transitoire : (1) la dynamique initiale d'implantation de la population du genre *Acinetobacter* favorisée d'autant plus que la source de carbone AA est présente ; cette sélection n'est pas durable ; (2) la dynamique transitoire de sélection de la population du genre *Malikia* en présence de butyrate à D=0,12 h^{-1}.
- Pour le résultat de la sélection microbienne : (1) l'implantation de nouveaux genres de populations avec *Zoogloea* à un D de 0,12 h^{-1} et *Acidovorax* à un D = 0,045 h^{-1} ; (2) une augmentation des populations minoritaires avec une proportion du groupe nommé « autres » comprise entre 10 et 40% par rapport à la communauté totale ; (3) un nombre de populations majoritaires plus élevé à D = 0,045 h^{-1} que pour les D plus élevés.

II.2. Effet du degré de la limitation en phosphore sur les dynamiques de sélections microbiennes

L'effet du degré de la limitation en P est étudié au travers des expérimentations en chémostat menées avec AA comme unique source de carbone à un D imposé de 0,045 h^{-1}. La Figure 53 représente les dynamiques des populations au cours des expériences menées sous limitation P (forte) uniquement (A), expérience A9, et lors des augmentations séquentielles du degré de limitation P (B), expérience A8.

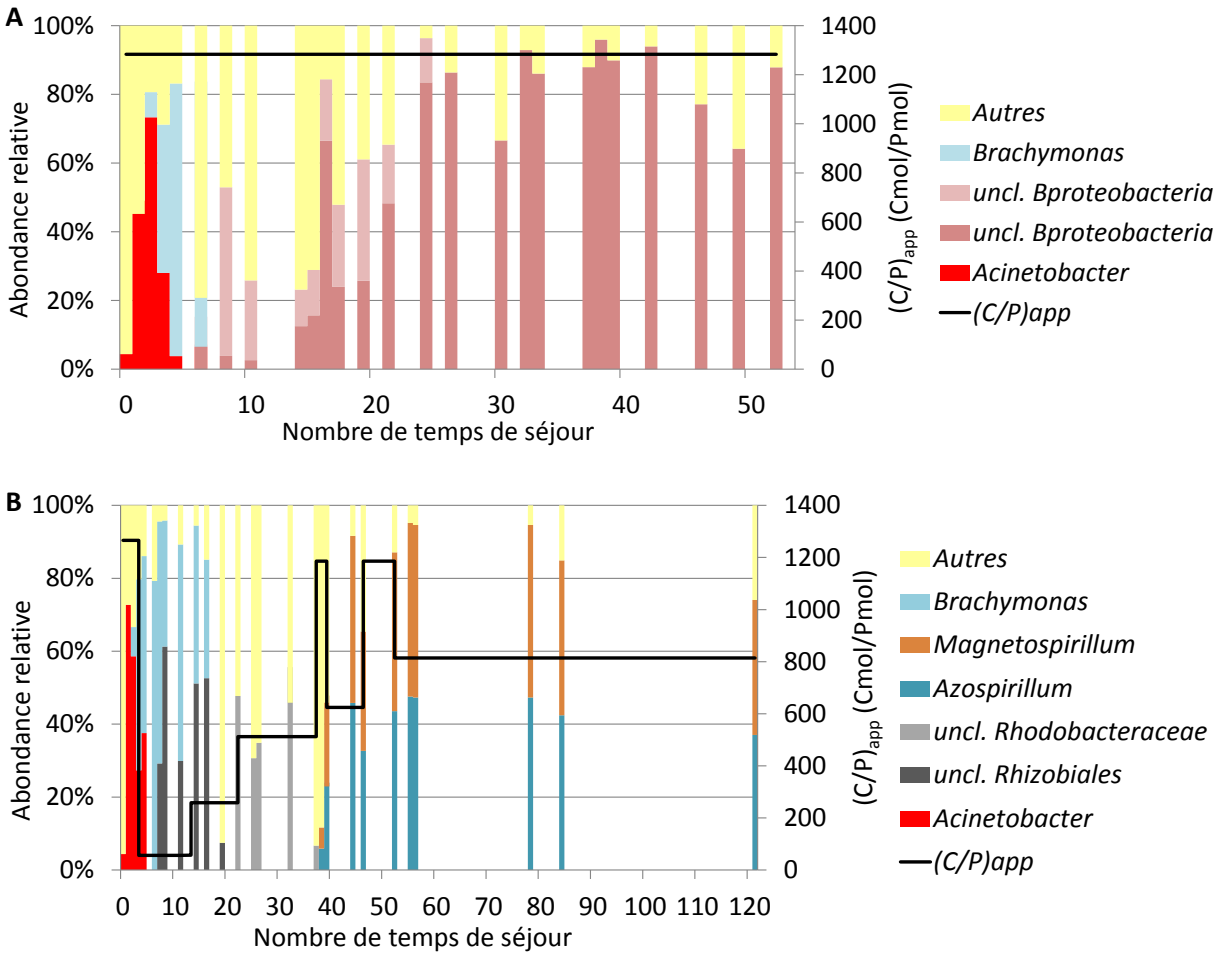

Figure 53 : Evolution de la dynamique des populations selon le nombre de temps de séjour au cours de l'expérience A9 (A), menée sous limitation phosphore uniquement et A8 (B), menée sous une dynamique en terme de degré de limitation phosphore appliqué. La catégorie « autres » regroupe toutes les populations minoritaires (OTUs < 5%).

Ces deux cultures ont été menées en parallèle. Durant les 3 premiers temps de séjour, les conditions opératoires imposées, sur ce même inoculum, ont été identiques : C/P de 1200 Cmol/Pmol et un D de 0,045 h^{-1}. Les mêmes dynamiques de populations ont été observées : *Acinetobacter* puis *Brachymonas*, montrant une reproductibilité de la dynamique des populations opérée dans nos réacteurs.

L'imposition de cette très forte limitation phosphore (1200 Cmol/Pmol) à ce D se situe dans la zone de limitation phosphore uniquement). Au cours de ces deux expériences, le maintien de ce niveau de limitation et la dynamique de limitation imposée ont conduit à une forte augmentation de la catégorie de populations minoritaires (plus de 80% de la communauté totale) montrant une grande diversité microbienne en dynamique.

Le maintien de la forte limitation a finalement sélectionné une population non classifiée appartenant à la classe βproteobacteria (identifiée à 98% de similarité comme la souche *Paucibacter toxinivorans* dans la

base de données GenBank), population productrice de PHB. Cependant, ces conditions de sélection ont :

- abouti à une souche surproduisant des exoplysaccharides (Annexe C : Photographies des sélections microbiennes obtenues lors des expérimentations, Figure 67 – A9)
- entrainé des difficultés à conduire le procédé (accumulation AA), obligeant à diminuer les flux de substrats initialement.

La dynamique de degré de limitation phosphore imposée sur l'autre culture a conduit à une sélection de deux souches dominantes au bout de 50 TSH, souches du genre *Magnetospirillum* et *Azospirillum*.

Ainsi, l'étude du niveau de limitation nutritionnelle sur les dynamiques de populations microbiennes a mis en évidence :

- Une absence de limitation en phosphore sélectionne de manière robuste et rapide des populations du genre *Acinetobacter*,
- Une limitation en phosphore uniquement (et forte), sélectionne également de manière robuste des populations de la classe des β–proteobacteria, mais induit une qualité de sélection médiocre (redirection du carbone aussi vers un autre produit de stockage) et une conduite de procédé difficile (accumulation d'AGV) ;
- Une double limitation phosphore initialement imposée sur une boue activée, sélectionne, entre 10 et 20 temps de séjours, des surproducteurs de PHA et ce de manière robuste.

III. DISCUSSION : EFFET DES CONDITIONS OPERATOIRES SUR LA SELECTION MICROBIENNE FINALE

Nos résultats, présentés de manière synthétique, ont clairement mis en évidence un effet de la nature de la source de carbone, du degré de limitation en phosphore ainsi que du taux de dilution appliqué sur la dynamique et le résultat final de la sélection microbienne. Cette partie vise à discuter ce lien entre les conditions opératoires appliquées et les dynamiques et résultats finaux de sélection microbienne. On utilisera pour cette analyse les valeurs des paramètres cinétiques des souches préalablement identifiés (chapitre 3). *In fine* nous donnerons les conditions opératoires et les séquences à adopter pour mener à bien une sélection robuste de microorganismes surproducteurs de PHB.

III.1. La source de carbone

Notre étude s'est bornée à la mise en œuvre de cultures sur acide acétique seul ou sur mélange acide acétique et butyrique pour un ratio constant. L'effet de la source de carbone utilisée a été mis en évidence de manière prononcée lors de la sélection des populations du genre *Acinetobacter* et *Malikia*.

L'acide acétique a généré, de manière reproductible, une dynamique de la population en faveur du genre *Acinetobacter*. L'expérimentation A2, menée sous acide acétique sans limitation phosphore, a sélectionné ce même genre de population de manière robuste (Annexe H : Dynamique de sélection sous limitation carbone – Expérimentation A2). Il est probable que cette population ait une forte affinité pour ce substrat. Frank (1999) détermine un taux de croissance maximal de la souche *Acinetobacter johnsonii* sur acide acétique de 0,65 h^{-1} et de 0,25 h^{-1} sur acide butyrique. Cette différence pourrait conforter nos observations. A noter que l'implantation de ces populations du genre *Acinetobacter* est d'autant plus importante et robuste que le taux de dilution est élevé. D'autres études montrent la forte affinité des populations du genre *Acinetobacter* pour l'acide acétique. De plus, l'abondance relative de cette population dans l'inoculum initial peut expliquer la présence de ces genres de microorganismes lors des phases de lancement et de mise en régime des cultures sur acide acétique quel que soit le taux de dilution appliqué.

L'implantation de la population du genre *Malikia* à un taux de dilution élevé sur le mélange acide acétique et butyrique souligne le fort potentiel de croissance sur acide butyrique de cette population. La présence de double substrat carboné aurait pu favoriser une augmentation de la diversité microbienne comparée au cas de l'utilisation d'une seule source de carbone. Les résultats n'ont pas mis en évidence ce phénomène, au contraire. D'autres essais sur des sources de substrats différentes, notamment combinant d'autres types d'AGV ou d'autres molécules que l'on retrouve dans les effluents (éthanol, glucose…), seraient à réaliser pour une meilleure description des effets « substrats ».

III.2. Le taux de dilution

En ce qui concerne la sélection microbienne, à fort taux de dilution, l'effet « μ_{max} » (stratégie μ_{max} dépendante) est important, bien sûr, devant les effets « constante de Monod » (stratégie K_S). Nous pensons que ce principe explique l'implantation préférentielle des genres *Acinetobacter* et *Malikia* aux taux de dilution appliqués élevés. En revanche, les populations ayant un plus faible K_S ou K_P (paramètres de sélection sous des conditions de limitation carbone et phosphore), du genre *Zoogloea*, *Brevundimonas*, *Acidovorax*, dominent à faibles D.

Malgré la double limitation nutritionnelle systématiquement imposée, l'augmentation de la proportion des populations minoritaires et majoritaires à plus faibles taux de dilution laisse supposer que les microorganismes de l'environnement sont plus contraints par un taux de dilution élevé que par une limitation en substrats, ce qui peut se comprendre.

Ayant présenté les résultats de sélection en fonction du nombre de temps de séjour appliqué, il est évident que le temps de sélection sera d'autant plus rapide que le taux de dilution appliqué sera élevé. Jusqu'à 50 temps de séjour sont nécessaires pour obtenir une sélection stable et robuste.

En conclusion, le rôle essentiel du taux de dilution pour assurer une sélection microbienne de bactéries performantes en termes de stockage de PHA est donc clair ; Ceci d'autant plus que nous avons vu qu'un D élevé pourrait favoriser la sélection de microorganismes ayant un q_{PHBmax} élevé.

III.3. Le niveau de limitation phosphore

(1) Effet d'une très forte limitation en P imposée dès le début de la culture

Ces conditions ont conduit à une sélection de souche surproductrice d'exo-polysaccharides, des difficultés à piloter le procédé du fait de l'accumulation du substrat inhibiteur pour la croissance. Aucune population parmi celles présentes, n'a eu la capacité de consommer la source de carbone suffisamment, obligeant à diminuer les flux de carbone et de phosphore en entrée. Ceci confirme les limites de la plasticité du phosphore intracellulaire des souches. En effet, pour être compétitif et augmenter la concentration en X_C dans le réacteur, le µ d'une souche doit être supérieur au D, impliquant alors de diluer d'autant plus le P_{in} que la souche croit rapidement ; C'est pourquoi, sous ces conditions extrêmes de forte limitation en P dès le début de culture, la sélection microbienne est très forte. Ces conditions drastiques pourraient expliquer la production de PHB réduite et la redirection du carbone vers la fabrication d'une autre substance de réserve.

(2) Effet d'une imposition séquentielle de la limitation en phosphore

En parallèle de l'expérience qui vient d'être présentée, une culture a été opérée avec des conditions croissantes de limitation en phosphore, appliquées après une courte séquence suivante : (1) forte limitation en phosphore (3 x TSH) ; (2) limitation carbone (10 x TSH). Cette séquence de niveau de limitation a entrainé une forte dynamique de populations microbiennes. Ce résultat montre la forte dépendance de la nature de la sélection avec le niveau de limitation. La levée momentanée de la limitation en P conduit à sélectionner des bactéries qui s'avèrent faiblement productrices. Cependant, cette étape n'a pas été tenue suffisamment longtemps pour confirmer de manière sûre cette faible aptitude. (3) Par la réimposition de niveaux de limitation croissants, on sélectionne de nouveau un fort producteur de PHB.

(3) Effet de l'absence de limitation en phosphore

L'expérience A2 montre qu'en absence de limitation en phosphore, au moins lorsque l'acide acétique est source de carbone, c'est le genre *Acinetobacter* qui est sélectionné, un microorganisme faiblement producteur.

En conclusion, seules une condition de double limitation phosphore a permis d'obtenir une sélection de surproducteurs de PHB, de manière robuste, et qui se maintient malgré l'augmentation du degré de limitation. Une question se pose alors : y aurait-il un lien entre limitation en phosphore et stockage de

PHB, lien qui pourrait expliquer que nous sélectionnions systématiquement des bactéries accumulatrices dans ces conditions de double limitation ? Un élément de réponse peut être donné en étudiant un résultat de la littérature. Les travaux de Schembri et al. (1995) portaient sur l'étude des liens possibles entre la synthèse de PHB et la limitation en phosphore chez *Acinetobacter*. Contrairement à la régulation classiquement décrite chez *Cupriavidus necator* où la régulation de la production de PHB se fait au travers de l'inhibition de l'enzyme β-ketothiolase, ces auteurs suggèrent une régulation génique entre les gènes impliqués dans la régulation du phosphore (régulon Pho) et les gènes impliqués dans la synthèse de PHA chez une souche d'*Acinetobacter.*

III.4. Qualification de la sélection microbienne

Nous avons vu que de manière plutôt systématique, des producteurs de PHB ont été sélectionnés sous des conditions de double limitation en phosphore et carbone, avec des AGV comme source de carbone et sous tous les taux de dilutions appliqués.

(1) Le mode de sélection privilégie-t-il une famille de microorganismes en particulier?

Il est remarquable que les souches majoritaires sélectionnées dans notre étude appartiennent principalement à la famille des Comamonadaceae : *Zoogloea, Brachymonas, Malikia, Acidovorax*, toutes des βproteobacteria et toutes surproductrices de PHA. Il existe cependant une exception notable : la sélection de la population du genre *Acinetobacter* qui fait partie de la classe des γproteobacteria et qui est qualifiée comme faible productrice de PHB. Les conditions de sélection sous double limitation C&P privilégient donc peut être ces populations de la famille Comamonadaceae par rapport à toutes les autres présentes dans une boue activée sauf lorsqu'on impose un taux de dilution trop élevé avec une alimentation contenant uniquement de l'acide acétique.

Les cultures continues ont toutes été ensemencées avec un inoculum congelé provenant d'un même prélèvement sur une station d'épuration. On pourrait alors penser qu'un effet origine de l'inoculum est prépondérant devant les effets conditions opératoires. Cependant, les cultures en mode fed-batch ont montré les mêmes tendances de sélection microbienne. Les conditions d'opérations influenceraient donc très majoritairement le résultat de la sélection microbienne à partir du moment bien sûr où la diversité microbienne initiale est suffisamment large.

Bien que Gebremariam et al., (2011) soulève que deux populations phylogénétiquement très proches peuvent avoir des comportements cinétiques voire métabolique totalement différents, dans notre étude, une similitude fonctionnel est cependant toujours observée. Nous avons vu que les deux paramètres, limitation en phosphore et nature de la source de carbone, pourraient expliquer ces observations. Freguia et al. (2010) étudient et comparent les communautés microbiennes de boues

activées alimentées par des AGV et montrent que les populations dominantes sont des proteobacteria appartenant aux genres *Geobacter*, *Comamonas*, *Pseudomonas* et *Pelobacter*. Ces auteurs concluent donc que la structure de la communauté microbienne sera déterminée par le type d'alimentation plutôt que l'inoculum initial. Ceci corrobore nos observations.

(2) Quel est le rôle des conditions de sélection sur les capacités cinétiques des souches ?

Le chapitre 2 a révélé un comportement de plasticité cellulaire du phosphore, relativement identique chez l'ensemble des souches sélectionnées. De plus, le chapitre 3 a mis en évidence une dépendance entre les conditions de sélection et les paramètres cinétiques de ces souches avec :

- un $qPHB_{max}$ supérieur en présence de byturate comparé sous AA uniquement,
- un μ_{max} des souches sélectionnées qui augmente avec le taux de dilution imposé.

Quelques résultats de la littérature confirment ces observations. Chua et al. (2003) ont étudié les potentialités de production de PHB d'une boue activée acclimatée à différents TSH (3 à 10 jours). Les auteurs ont obtenu les meilleurs résultats pour le plus faible TSH donc le plus fort D. De même, la sélection des microorganismes les plus performants dans le procédé de type « feast & famine » se fait à faible TSH. En outre, les paramètres qui contrôlent la valeur du q_{PHBmax} semblent moins connus et mériteraient une attention particulière.

III.5. Trajectoire à adopter pour sélectionner des microorganismes producteurs

Nos résultats ont montré qu'il faut alors éviter les conditions opératoires favorisant le développement de la population du genre *Acinetobacter*, faible productrice de PHB. De ce fait, les conditions optimales conduisant à une sélection robuste de microorganismes surproducteurs de PHB sont :

- un taux de dilution élevé (0,3 h^{-1} dans notre étude, mais il pourrait tout à fait être supérieur, on pourrait s'imposer par exemple un ratio D/μ_{max} de 0,6).
- une condition opératoire assurant une double limitation carbone et phosphore.
- la présence de butyrate majoritaire comme source de carbone dans l'alimentation.

Il est important d'imposer ces conditions opératoires dès le début de la culture. En effet,

- une augmentation du D en cours de sélection entrainerait un lessivage des populations précédemment sélectionnées (ayant un μ_{max} inférieur au nouveau D)
- une diminution du D « ouvre » le système et change les conditions pour de nouvelles compétitions microbiennes (Annexe I : Conséquences d'un changement de taux de dilution sur la dynamique de sélection).

IV. CONCLUSION

La source de carbone est un facteur clé dans la sélection microbienne. La présence de butyrate dans l'alimentation a montré une sélection robuste et reproductible de population notamment du genre *Malikia* surproductrices avec un q_{PHBmax} de 1,1 Cmol/Cmol.h. En présence d'acide acétique, l'identification redondante de populations du genre *Acinetobacter* faiblement productrices a été remarquée suggérant une forte affinité de ce genre bactérien pour ce substrat.

Le taux de dilution est aussi un paramètre essentiel dans le processus de sélection microbienne. Un taux de dilution élevé favorise la sélection de populations ayant une activité métabolique élevée (par un μ_{max} élevé et potentiellement un q_{PHBmax} élevé). La relation entre D et q_{PHBmax} reste à déterminer plus précisément.

Enfin, il a été mis en évidence l'importance du degré de limitation en phosphore à appliquer pour l'obtention d'une sélection de souches productrices performantes. A partir du moment où une limitation phosphore est appliquée en synergie avec la limitation en carbone, une sélection de souches surproductrices a lieu. Cependant, une limitation trop élevée ou une dynamique appliquée générera une instabilité de la sélection microbienne et une difficulté dans la gestion du procédé par une atteinte des limites de la plasticité du phosphore intracellulaire. L'idéal est ainsi de se placer initialement et de façon stable dans la zone de DLN, assurant une sélection et une production de PHB.

Ainsi, ce chapitre a permis de dégager une stratégie de conduite du procédé continu afin d'assurer une sélection robuste de microorganismes producteurs :

(1) des conditions de sélection correspondant aux conclusions précédentes :

- Un taux de dilution élevé
- Une double limitation carbone et phosphore
- La présence de butyrate comme source de carbone dans l'alimentation

Soit donc des conditions favorisant l'implantation de souches surproductrices de PHB et défavorisant la croissance de populations du genre *Acinetobacter*.

(2) une mise en place de ces paramètres opératoires dès le lancement de la sélection microbienne sur un consortium mixte pour minimiser les perturbations du système et en maximiser sa robustesse.

Ces conditions restent à valider en conditions réelles sur effluent réel et en système avec une entrée de microorganismes dans le réacteur de sélection.

Chapitre 5. Evaluation du potentiel de production de PHA au sein d'une filière industrielle

I. INTRODUCTION

L'ensemble de nos résultats permettent d'envisager un ou plusieurs procédés innovants pour sélectionner et enrichir des populations productrices de PHA à partir de boues activées par la mise ne place d'une stratégie de culture basée sur le contrôle de la croissance par la limitation phosphore. La faisabilité industrielle de ces procédés est discutée dans ce chapitre qui a par conséquent pour ambition de donner un éclairage sur les aspects importants permettant de mener à bien un procédé de sélection et de production de PHA robuste et performant. La faisabilité de l'industrialisation est analysée à partir de critères conventionnels de performances de procédés : titre et teneur intracellulaire en PHB, productivité volumique, rendement réel, taux d'épuisement du ou des substrats, facilité de récupération des cellules, cassage des cellules, qualité et pureté du produit… les notions de robustesse et rusticité du procédé seront prises en compte.

Pour cela, une première partie résume les performances obtenues en termes de q_{PHB} et rendements pouvant être atteints selon des configurations des procédés discontinus et continus. On étudiera donc les différentes stratégies de production de PHB en fed-batch et en chémostat (simple et double étage) à partir des résultats obtenus via les expérimentations et les résultats simulés au cours de cette étude. Pour les stratégies en continu, le modèle établi dans le chapitre 2 avec les paramètres de la souche *Malikia* déterminés dans le chapitre 3 est utilisé pour balayer des zones de travail afin de définir les conditions opératoires optimales (rendements, taux intracellulaire, productivités) pouvant être atteintes en simple et double étage.

II. RESUME DES PERFORMANCES DES PROCEDES DE PRODUCTION DE PHA

II.1. Les réacteurs discontinus

La stratégie directe pour la production de PHB surmonte la nécessité de procéder à une étape d'enrichissement. Au cours de notre étude, des réacteurs de type fed-batch ont été utilisés et menés sous différents niveaux de limitation phosphore : degré de limitation C/P progressif (cas des cultures FB1 et FB2), carence en phosphore initiale (cas de la culture FB4), carence en phosphore puis fort degré de limitation C/P (cas de la culture FB3). Les résultats obtenus sont récapitulés dans le Tableau 31.

Tableau 31 : Performances (q_{PHB} moyen, $R_{PHB/S}$ et PHB_{in}) calculées à partir des expérimentations fed-batch

Stratégie de production	Fed-batch	q_{PHB} moyen (Cmol/Cmol.h) ***(gDCO/gDCO.h)***	$R_{PHB/S}$ (Cmol/Cmol) ***(gDCO/gDCO)***	PHB_{in} final (%)	Temps de culture (h)
Degré de limitation en phosphore progressive et contrôlée	FB1	0,072 ***0,08***	0,28 ***0,32***	57	67
	FB2	0,072 ***0,08***	0,21 ***0,24***	67	80
Carence puis forte limitation en phosphore	FB3	0,108 ***0,12***	0,26 ***0,29***	57	85
	FB4	0,09 ***0,10***	0,31 ***0,35***	45	30

En ce qui concerne la production de PHA directement à partir de boues activées, à ce jour, très peu d'études utilisant un mode fed-batch ont été publiées. Sous une limitation nutritionnelle par l'azote, un stockage maximum de 56% (en MS) a été atteint (Mengmeng et al., 2009). Les résultats obtenus au cours de notre étude sont donc les meilleurs constatés à partir d'une boue activée, avec une teneur en PHB maximum de 67% et des rendements de PHB allant de 0,21 à 0,31 $Cmol_{PHB}/Cmol_S$). Une optimisation de la conduite de la culture permettrait sans doute d'accroître encore la teneur en PHB.

Deux stratégies de production peuvent être envisagées pour la production de PHA directement à partir d'une boue activée. La première consiste à ensemencer directement avec une boue activée et à enrichir en cellules productrices de façon concomitante à une production de PHA, comme cela a été fait pour les cultures FB1 et FB2 par exemple. Dans ce cas, la stratégie d'imposition du degré de la limitation phosphore doit être parfaitement maitrisée. En effet, la conduite du degré de limitation en phosphore est un facteur clé à la fois pour favoriser la croissance des organismes producteurs de PHA (en limitant celle des non producteurs) et pour synthétiser une quantité élevée en PHA. Ainsi, dans ce cas, un compromis doit être fait entre temps de culture, enrichissement des producteurs et concentrations en PHB pour assurer la productivité la plus élevée possible tout en conservant un rendement $R_{PHA/S}$ élevé.

La seconde stratégie consiste à concentrer la boue activée (par exemple par centrifugation) avant d'inoculer le réacteur de production (cas des cultures FB3 et FB4). La production de PHA est immédiatement induite par une forte limitation de phosphore (carence en phosphore) limitant au maximum la croissance cellulaire. Dans ce cas, le potentiel direct de la boue activée est utilisé, basé sur les microorganismes producteurs de PHA initiaux seulement. Par une absence significative de croissance cellulaire, la majorité du carbone ajouté est dirigée vers le stockage de PHA. En comparaison avec la première stratégie, les rendements observés en PHA sont plus élevés (0,31 Cmol/Cmol pour FB4 contre 0,21 Cmol/Cmol pour FB2). Toutefois, la teneur globale de PHA obtenue est en fait plus faible en raison de l'absence d'enrichissement en microorganisme producteurs (45% contre 67%).

Les productivités volumiques de PHB ne sont pas exprimées dans ce travail, car elles sont directement proportionnelles à la quantité de PHB produit qui elle-même dépend de la concentration de cellules. En effet, la concentration maximale de la biomasse est en fait déterminée par la capacité maximale de transfert d'oxygène (faible dans nos réacteurs en laboratoire), déterminant la productivité globale du procédé (Jiang et al., 2012).

II.2. Les réacteurs continus

Deux types de réacteur sont étudiés : (1) le réacteur simple étage qui vise une sélection stable de producteurs et une production maximale de PHA simultanées et (2) le réacteur double étage qui sépare ces deux objectifs dans les deux étages. Le modèle cinétique établi est utilisé comme un outil de prédiction pour comparer les procédés entre eux. Les résultats sont simulés à partir des paramètres cinétiques et stœchiométriques obtenus avec la population du genre *Malikia* sous le mélange acide acétique et butyrique, (représentant les meilleurs résultats obtenus dans ce travail). Ces résultats sont conformes aux résultats observés expérimentalement.

II.2.a *Simple étage*

Les résultats simulés avec la population du genre *Malikia* pour un réacteur mono-étagé sont représentés sur la Figure 54.

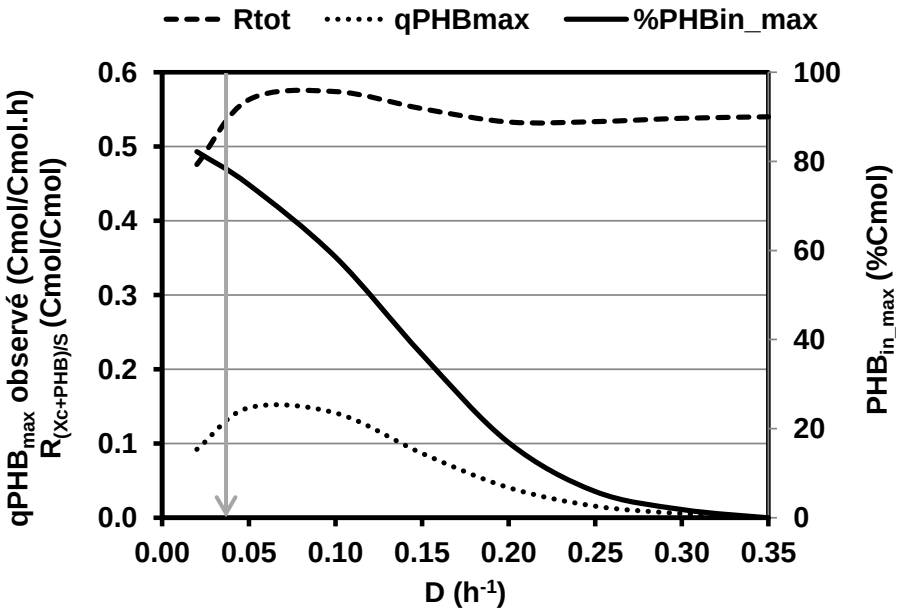

Figure 54 : Evolution du q_{PHBmax} observé, du rendement en carbone total (R_{tot}) observé ($R_{Xc/S}$ + $R_{PHB/S}$) et du PHB_{in_max} selon le taux de dilution pour un réacteur chémostat simple étage

Pour ce type de procédé simple étage, le compromis choisi afin d'avoir une teneur en PHB intracellulaire élevée est : D = 0,04 h^{-1}, q_{PHBmax} observé = 0,13 h^{-1} et $R_{(Xc+PHB)/S}$ = 0,55 Cmol/Cmol et PHB_{in_max} = 80%.

II.2.b *Double étage*

L'enjeu d'un réacteur double étage continu est d'augmenter les productivités globales du procédé. Pour cela, le premier étage mené à un taux de dilution élevé doit avant tout assurer une sélection microbienne. Ceci a été démontré avec la culture B1 : une double limitation C&P ainsi qu'un fort D (0,31 h^{-1}) a permis d'obtenir une sélection robuste de la population du genre *Malikia* sans production de PHB significative. Puis, l'étude en batch a conclu à une population surproductrice de PHB avec un q_{PHBmax} observé de 1,1 Cmol/Cmol.h. De plus, les résultats ont montré l'importance du taux de phosphore intracellulaire sur les flux de conversion du carbone vers le stockage de PHB avec des vitesses spécifiques de production de PHB maximales pour une valeur de P_{in} de 2%. Dans cette partie on cherche à étudier la configuration optimale du 1er et du 2ème étage afin de maximiser les performances de productions de PHB.

Tout d'abord, l'effet du P_{in} dans le premier étage (entrée dans le 2ème étage) ainsi que le temps de séjour hydraulique appliqué (TSH) dans le deuxième étage sur les capacités de production est représentée sur la Figure 55. Pour cela, quatre valeurs de P_{in} du premier étage sont comparées.

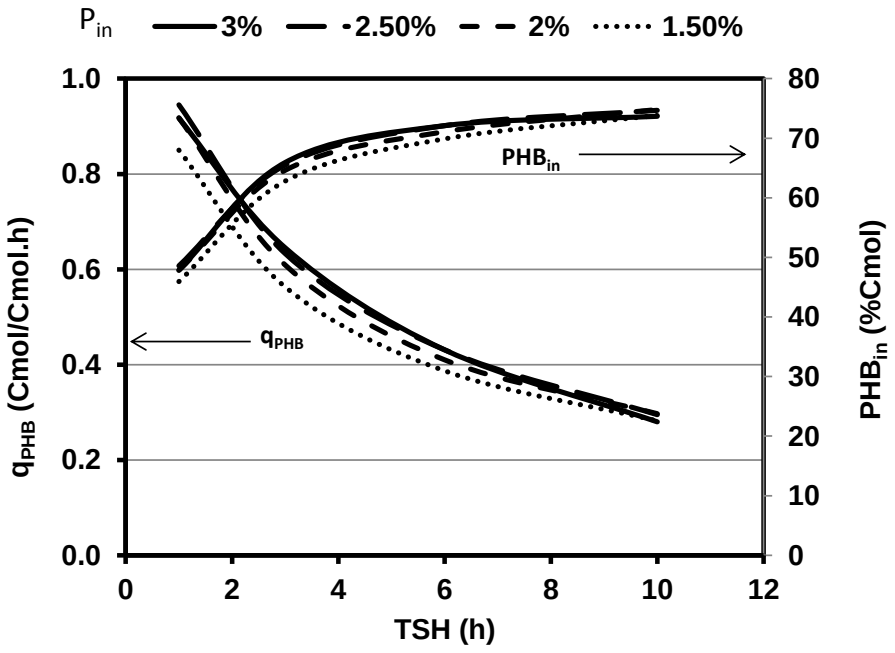

Figure 55 : Evolution du q_{PHB} et du PHB_{in} obtenus en chémostat en réacteur chémostat double étage selon le P_{in} du 1er étage et le temps de séjour du 2ème étage

En comparant chaque taux de phosphore dans le 1er étage, seul une valeur de P_{in} de 1,5% (la plus faible) se détache plus franchement par des q_{PHB} et des PHB_{in} inférieurs à chaque temps de séjour appliqué. Comme expliqué précédemment, le 1er étage doit assurer une sélection microbienne robuste et une productivité élevée. Au vue de nos résultats, le choix d'un taux de dilution de 0,3 h^{-1}, permettant

d'obtenir un taux de phosphore de 2,5%, semble être un bon compromis pour optimiser la production de PHB dans le 2ème étage. On pourrait travailler à un D plus élevé, ce qui permettrait d'augmenter les productivités.

En ce qui concerne le taux intracellulaire de PHB final, deux allures se distinguent selon le temps de séjour appliqué dans le 2ème étage. En dessous d'un TSH de 3 h, le PHB_{in} est inférieur à 65% et au-delà, une faible variation du TSH impacte fortement le PHB_{in}. Au-delà d'un TSH de 3 h, le PHB_{in} tend vers 80%.

On comparera donc pour le 2ème étage un TSH de 3 h et 10 h pour étudier la conséquence d'une augmentation significative du TSH (permettant un gain de 68 à 78% de PHB_{in}) sur le rendement de l'extraction, ou les productivités par exemple. Le Tableau 32 récapitule les résultats obtenus dans notre travail.

Tableau 32 : Récapitulatif des conditions opératoires et des paramètres cinétiques calculés en chémostat simple et double étage

	Chémostat simple étage	Chémostat double étage		
		1er étage	2ème étage	2ème étage
D (h^{-1})	0,04	0,3	0,33	0,1
TSH (h)	***25***	***3,33***	***3***	***10***
PHB_{in} (%)	80	2	70	78
q_{PHB} (Cmol/Cmol.h)	0,134	0,006	0,633	0,295
($gDCO_{PHB}/gDCO_{Xc}.h$)	***0,154***	***0,006***	***0,73***	***0,34***
$R_{Xc/S}$ (Cmol/Cmol)	0,125	0,528	0,122	0,086
($gDCO_{Xc}/gDCO_S$)	***0,115***	***0,484***	***0,112***	***0,079***
$R_{PHB/S}$ (Cmol/Cmol)	0,42	0,01	0,5	0,398
($gDCO_{PHB}/gDCO_S$)	***0,444***	***0,01***	***0,53***	***0,42***
$R_{O2/Xc}$[1] ***($gO_2/gDCO_{Xc}$)***	***3,86***	***1,045***	***1,49***	***4,05***
q_{O2} ***($gO_2/gDCO_{Xc}.h$)***	***0,154***	***0,314***	***0,45***	***0,26***

[1] calculés à partir des rendements observés $R_{Xc/S}$ et $R_{PHB/S}$, exprimés en DCO selon l'équation 10.

$$R_{O2}/_{Xc} = \frac{1 - R_{PHB}/_S - R_{Xc}/_S}{R_{Xc}/_S}$$ ***Equation 10***

III. DISCUSSION : ARGUMENTATION D'UN CHOIX DE PROCEDE DE FERMENTATION

La mise en place d'une filière de production de PHA doit prendre en considération un certain nombre de facteurs environnants, de la synthèse des substrats carbonés à l'applicabilité du produit généré. La Figure 56 est un schéma récapitulatif de la filière de production de PHA, avec les questions clés associées aux différentes étapes.

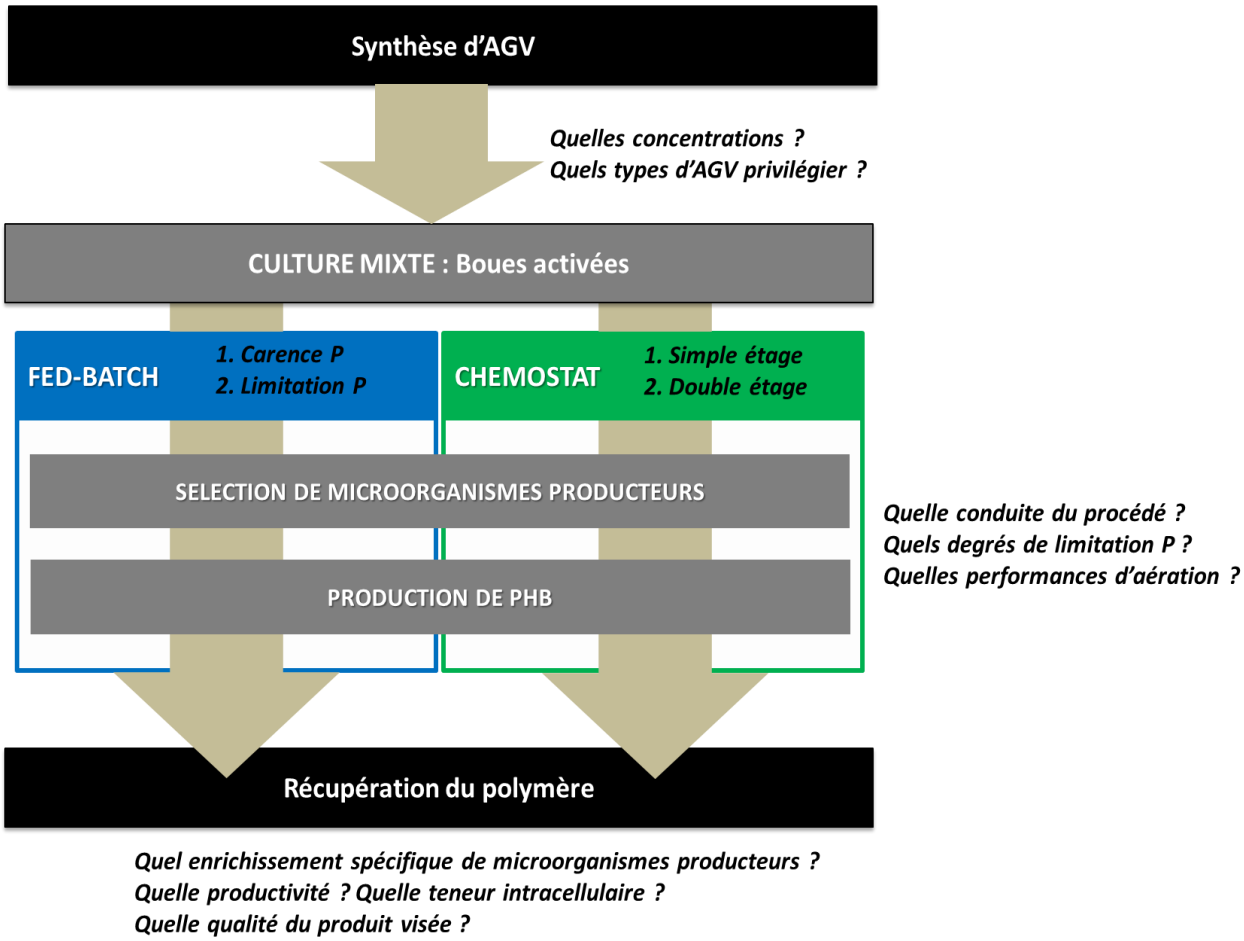

Figure 56 : Procédés de production de PHA envisagés et les questions associées à chaque étape

(1) La qualité de l'effluent a une importance majeure car elle influe directement sur la qualité du produit et sur la performance des processus dans les étapes suivantes de la chaîne de production (Albuquerque et al., 2011). Les questions essentielles sur la qualité de l'effluent concernent : la concentration des AGV, le pourcentage d'AGV par rapport à la DCO totale (il existe des substrats n'induisant pas de stockage et une quantité de MES dans les effluents liquides qui diluent les organismes producteurs et abaissent le titre en PHA), la proportion entre AGV (Acide acétique, butyrique, propionique et valérique).

(2) La configuration du procédé déterminera les performances de production de PHA. Ici, on envisagera les procédés de type fed-batch et chémostat. Les questions clés sont : la conduite du procédé, les conditions opératoires (degrés de limitation en phosphore, taux de dilution), les besoins en aération que nous verrons déterminantes par la suite (Jiang et al., 2012).

(3) La récupération du produit représente un coût non négligeable (jusqu'à 70% des couts de fonctionnement dans un procédé de production de PHA (Fernández-Dacosta et al., 2015; Gurieff et Lant, 2007). Les questions liées à la récupération et à la qualité du polymère final telles que les teneurs intracellulaires, et tous les paramètres pouvant les influencer sont posées.

La discussion est organisée en ciblant les critères de choix : la teneur intracellulaire, la productivité volumique, les rendements carbones, la qualité du produit et la robustesse du procédé. Chacun de ses critères est discuté permettant de guider le choix de la configuration optimale d'un procédé de production de PHA.

III.1. Une teneur intracellulaire élevée

La teneur intracellulaire en PHB la plus élevée possible est primordiale par le coût élevé que peut représenter l'étape de récupération du produit. En effet, l'efficacité de la récupération du produit est l'un des freins principaux à une filière de production de PHA (Reddy et al., 2003) par la grande consommation d'énergie que nécessite cette étape. Selon une analyse économique de Fernández-Dacosta (2015), en comparant trois techniques de récupération des PHA, les coûts d'extraction dans la filière de production de PHA représentent entre 70 et 80%. Au vu des résultats obtenus par les cultures discontinus, leurs teneurs intracellulaires finales inférieures à 70% démontrent la faible applicabilité de ce type de procédé. L'enrichissement en microorganismes producteurs est vraiment l'étape clé pour maximiser la teneur intracellulaire dans une culture non axénique (Dias et al., 2006; Johnson et al., 2009; Serafim et al., 2008).

La présence de MES ou de DCO biodégradable dans l'effluent réel qui n'induirait pas de stockage de PHA, impactera la teneur finale en PHB (Albuquerque et al., 2012; Bengtsson et al., 2008; Jiang et al., 2012). Par exemple, des études à l'échelle pilote réalisées par Tamis et al. (2015), montrent des teneurs intracellulaires en PHB de 70% au lieu des teneurs de 90% obtenues sur effluents synthétiques. Une étape de séparation des MES en amont de la production de PHB serait nécessaire afin de palier à ce phénomène. De même, il faudrait optimiser la production d'AGV lors de l'acidogénèse.

III.2. Une productivité volumique maximale

La productivité d'un procédé de production de PHB dépend à la fois des processus biologiques et physiques intervenant au sein du bioréacteur. En effet, cette productivité est proportionnelle à la concentration de PHB et à la cinétique de production de PHB, qui sont directement liées à la concentration en biomasse catalytique. Le facteur limitant cette concentration est la capacité de transfert de l'oxygène dans le liquide pour des procédés aérobies (Garcia-Ochoa et Gomez, 2009). Ce sont donc les processus physiques qui sont limitants dans un procédé non axénique, de production de PHA dans notre cas. On s'intéresse donc dans cette sous-partie, au lien entre la capacité de transfert d'O_2 et la concentration en PHB et donc la productivité globale d'un procédé. Pour cela, on se base sur les calculs des vitesses spécifiques de consommation d'oxygène préalablement déterminées dans le Tableau 32, pour les régimes permanents définis en simple et double étages.

Le bilan sur l'oxygène dans un réacteur chémostat, s'écrit selon l'équation 11.

$$V\frac{dO_2}{dt} = -r_{O_2} \times V + k_L a\,.\left(C^*_{o_2.L} - C_{o_2.L}\right) \times V + Q_L \times C_{o_2.L,e} - Q_L \times C_{o_2.L} \qquad \textbf{\textit{Equation 11}}$$

Avec : V *Volume du liquide du réacteur (L)*
r_{O2} *Vitesse de consommation de l'O_2 par les bactéries (mgO_2/L.h)*
$k_L a$ *Coefficient de transfert de l'O_2 du réacteur (h^{-1})*
$C^*_{O2.L}$ *Concentration de saturation de l'O_2 dans le liquide (9,07 mgO_2/L à 20°C)*
$C_{O2.L}$ *Concentration de l'O_2 dans le liquide*
$C_{O2.L,e}$ *Concentration de l'O_2 dans l'alimentation en entrée du réacteur*
Q_L *Débit de l'alimentation en entrée (L/h)*

En négligeant les termes convectifs d'entrée et sortie d'O_2 en phase liquide, à partir du bilan sur l'oxygène, on obtient l'équation 12 en régime permanent.

$$r_{O_2} = k_L a\,.\,(C^*_{o_2.L} - C_{o_2.L}) \qquad \textbf{\textit{Equation 12}}$$

Cela signifie qu'en régime stationnaire, la vitesse de consommation d'oxygène par les cellules est égale à la vitesse de transfert du gaz vers le liquide. La concentration $C_{o_2.L}$ est fixée à 2 mgO_2/L pour éviter la limitation par l'oxygène. Les consommations spécifiques d'oxygène préalablement déterminées en simple et double étage), permettent d'étudier les productivités pouvant être atteintes, selon le K_La du réacteur (Figure 57).

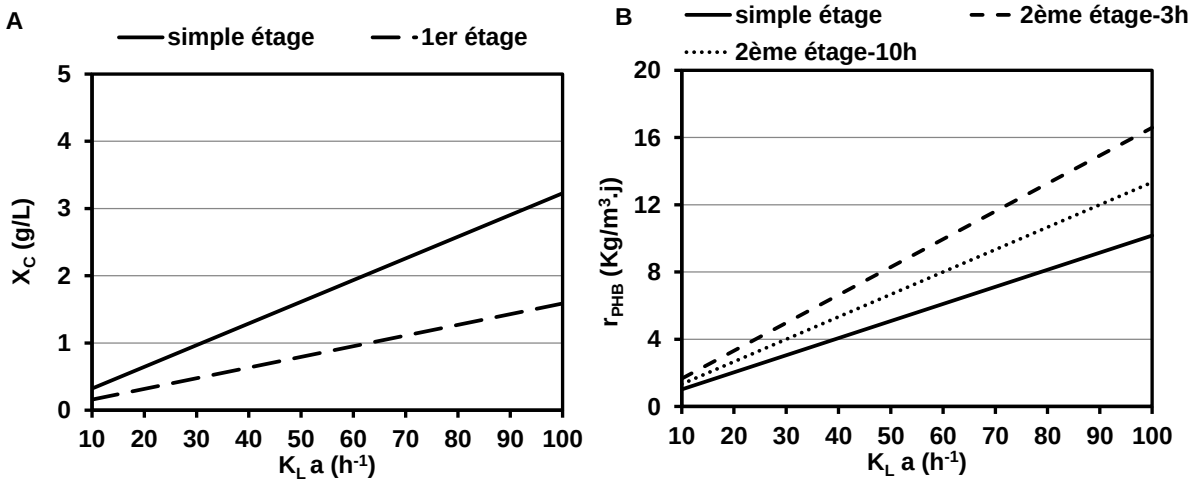

Figure 57 : Concentration en biomasse catalytique et productivités volumiques de PHB pouvant être atteintes selon le k_La du réacteur et la configuration du procédé

Pour un k_La de 100 h^{-1}, valeur admissible en réacteur industriel « rustique » ou « low cost » (Van't Riet, 1983), la concentration maximale en biomasse catalytique est estimée à 3,2 g/L pour une configuration simple étage et à 1,6 g/L pour le 1er étage d'une configuration double étage. Ainsi, une productivité volumique en PHB de 10 kg/m^3.j peut être atteinte en simple étage et de 16 kg/m^3.j en double étage.

En culture pure, les productivités atteintes sont largement supérieures, à cause des concentrations de X_c atteintes et des performances d'aération que possèdent les réacteurs. Par exemple, Wang et Lee, (1997) ont une productivité de 4,94 gPHB/L.h (soit 118 kg/m^3.j), avec une concentration en biomasse catalytique de 112 g/L et une teneur intracellulaire de 88%. Ce sont effectivement des productivités très élevées par rapport à nos résultats. Cependant, dans notre cas (procédés de production non axéniques de PHA à partir d'effluents de boues fermentées), nous nous fixons volontairement des limites très différentes de celles des cultures pures. En effet, en passant outre les limites physiques imposées pour le transfert d'oxygène, des productivités et concentrations en PHB du même ordre de grandeur pourraient tout à fait être atteintes.

Concernant les cultures non axéniques, il est difficile d'obtenir des productivités dans la littérature. Il serait possible de les recalculer dans certains cas, notamment pour les procédés de type « feast & famine » qui montrent à l'heure actuelle des performances intéressantes. Mais une fois de plus, ce mode de culture nécessite des conditions d'exploitation difficilement applicable à partir d'effluents dilués (conditions réelles) sans que la productivité ne soit lourdement impactée.

Enfin, un paramètre à prendre en compte pour fixer le k_La est le coût d'aération qu'implique le procédé. D'après l'étude détaillée sur les transferts d'oxygène lors du scale-up dans les bioprocédés, Garcia-Ochoa et Gomez (2009) propose une relation entre le K_La et la puissance volumique dissipée dans le milieu. Ces expressions permettent de corréler des valeurs du coefficient k_La avec un coût d'aération moyen dans une installation standard estimé à 0,08 €/kWh (Figure 58).

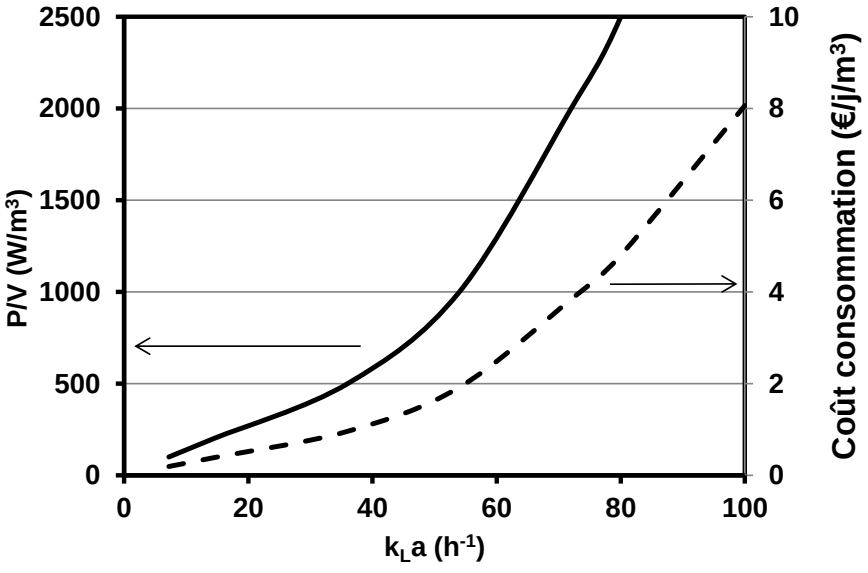

Figure 58 : Evolution de la puissance volumique dissipée et le coût exprimé en €/j/m^3 selon le K_La du réacteur d'après Garcia-Ochoa et Gomez (2009) et extrapolation du coût en €/h selon le coefficient de transfert de l'oxygène (K_La) d'un procédé (0,08 €/kWh)

Ainsi, d'après la corrélation de Garcia-Ochoa et Gomez (2009), la puissance volumique dissipée ainsi que les coûts engendrés selon le k_La imposé dans un réacteur suivent une évolution exponentielle. La différence de prix des coûts liés à l'aération pour un k_La entre 40 et 100 h^{-1} représente un facteur 8. Le coût d'aération étant réellement impactant, il est parfois préférable d'augmenter les volumes au détriment de la productivité globale du procédé (Van't Riet, 1983).

L'hypothèse de fixer un k_La économiquement acceptable va imposer les performances maximales du procédé (à travers la consommation maximale de l'oxygène). Connaissant ainsi les concentrations maximales en biomasse catalytique pouvant être maintenues et les rendements observés par rapport au substrat, il est possible de déterminer les concentrations nécessaires des AGV en entrée. La Figure 59 représente la relation entre la concentration nécessaire en entrée des AGV de l'effluent fermenté et les caractéristiques physiques du réacteur (le k_La) pour les résultats simulés. Ceux-ci correspondent à un rendement donné, il est important de noter que ces concentrations nécessaires en AGV seront d'autant plus faibles que les rendements seront élevés.

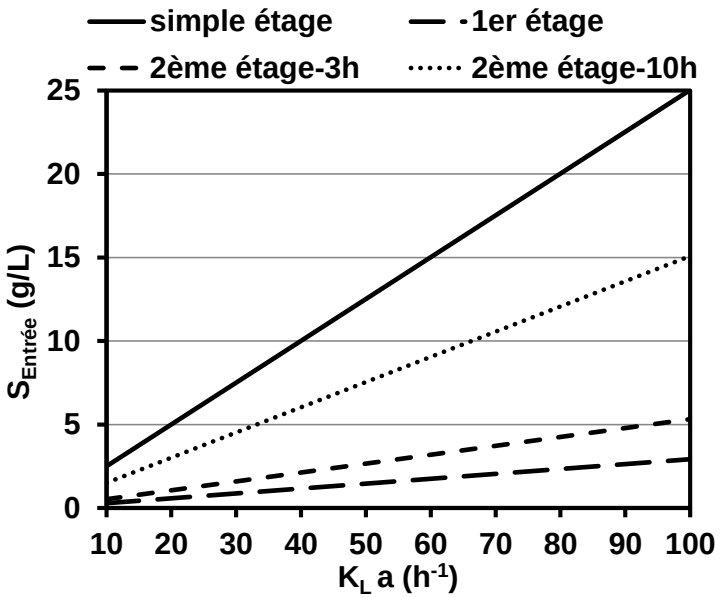

Figure 59 : Relation entre la concentration en entrée de l'effluent fermenté et le k_La du réacteur

A partir de ces données, nous observons que la concentration en AGV n'est pas un facteur limitant puisque les gammes nécessaires calculées sont comprises entre 0 et 25 g/L. Ces concentrations sont tout à fait en adéquation avec celles pouvant être obtenues après une fermentation acidogène des boues.

Dans le cas d'un double étage, nous remarquons que les concentrations nécessaires de substrat sont différentes entre les deux étages : il conviendra donc si nécessaire de diluer les AGV, dans le 1er étage.

Ainsi, un coût admissible maximal lié à l'aération peut être défini, imposant les conditions du procédé : volumes des réacteurs, concentrations des effluents, débits et au final les productivités volumiques.

En conclusion, le choix des conditions opératoires à imposer doit tenir compte d'une analyse multicritères prenant en considération à la fois la productivité du procédé, les coûts de fonctionnement de la fermentation (notamment liés à l'aération) et les coûts liés à la récupération du produit qui sont prédominants. Ainsi, par une estimation du prix de vente du produit, une évaluation de la rentabilité du procédé peut être faite selon les conditions opératoires déterminant le meilleur compromis.

III.3. Des rendements carbones optimaux

On vise à maximiser les rendements carbones pour la production de PHB et donc à minimiser les pertes de carbone pour la biomasse et pour la maintenance. La Figure 60 compare un procédé de « feast & famine » (A), un procédé continu simple étage (B) et deux procédés continus double étage avec un temps de séjour dans le 2ème étage de 3 h (C) et de 10 h (D) au travers l'étude du devenir d'1 kg de DCO.

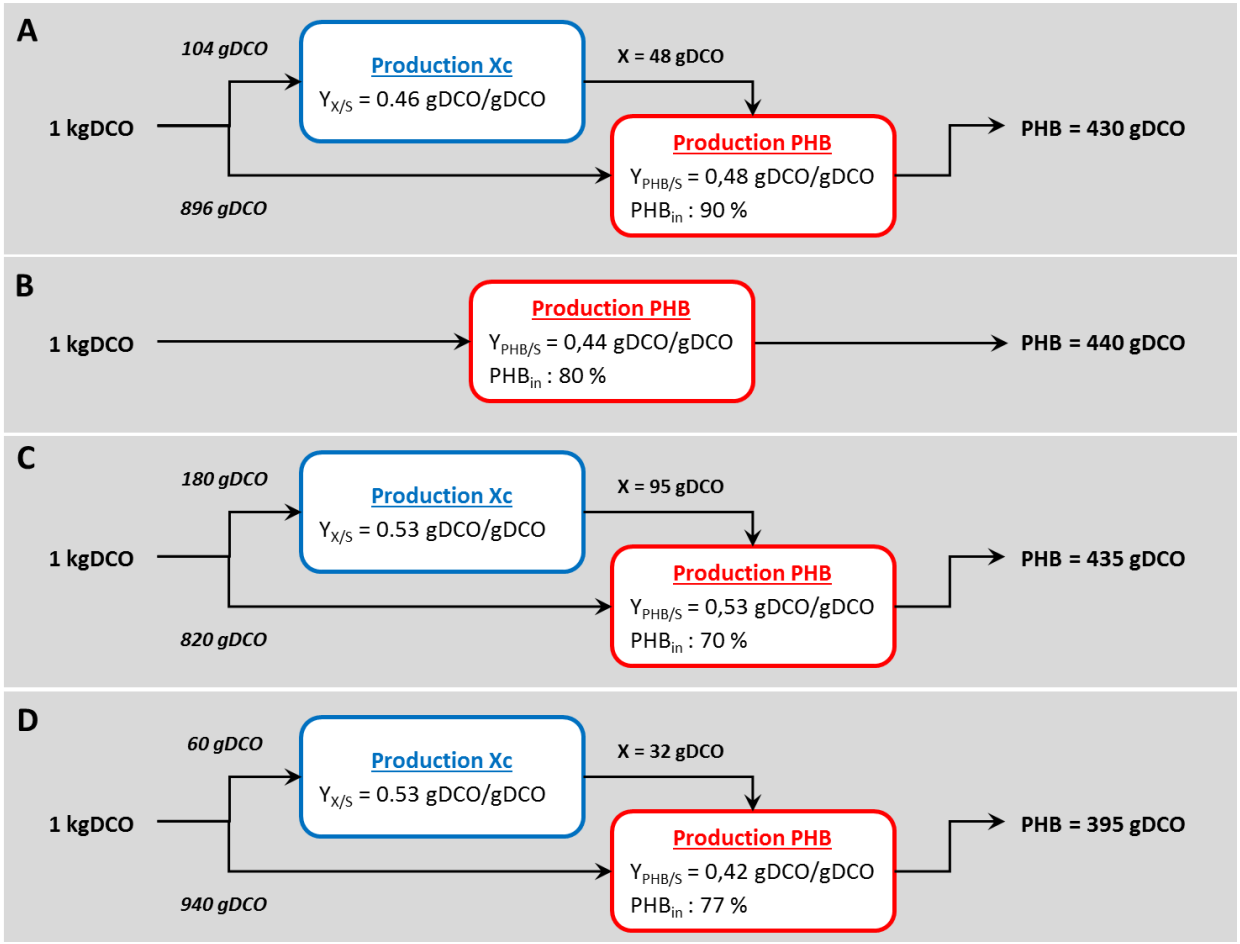

Figure 60 : Comparaison du devenir du carbone pour la production de PHB selon quatre configurations de procédés : un procédé type « feast & famine » (Johnson et al., 2009) (A), et les procédés envisagés dans cette étude, continu simple étage (B), continu double étage avec un TSH du 2ème étage de 3 h (C) et de 10 h (D)

Le « feast &famine » nécessite une étape de production de la biomasse (enrichissement de microorganismes producteurs) comparable à notre configuration pour un continu double étage.

Les procédés envisagés dans cette étude (continus) ont des résultats quasi-similaires aux procédés existant de type « feast & famine », présentant des rendements de conversion globaux du substrat en PHB très proches (0,44 gDCO/gDCO). Ainsi, le rendement global n'est pas un critère discriminant dans le choix d'un de ces procédés.

D'autre part, il a été mis en évidence, lors de cette thèse, la valeur ajoutée d'avoir une proportion élevée d'acide butyrique dans l'alimentation sur la qualité de la sélection microbienne en termes de capacité élevée de production de PHB (par le q_{PHBmax} et les rendements de conversion du carbone, (Marang et al., 2013; Shi et al., 1997). Albuquerque et al., (2007) montre qu'une diminution du pH lors de la fermentation acidogène augmente les proportions de butyrate d'un facteur quasiment 4. Cette observation montre l'intérêt de piloter et d'optimiser l'étape de production des AGV en amont pour maximiser la production de PHB (via les rendements).

Enfin, tout comme expliqué précédemment pour la teneur intracellulaire en PHB, la proportion de DCO biodégradable dans l'alimentation par la présence de MES ou de substrats non AGV, impacte négativement les rendements observés (notamment par la production d'autres molécules que le PHB).

En conclusion, le rendement carbone représente un paramètre important à maximiser. Ainsi, la présence significative de butyrate dans l'effluent fermenté améliore les performances globales du procédé de production de PHA quel qu'il soit. Par contre, étant donné la similitude obtenue, le rendement carbone n'est pas un critère de choix discriminant entre un procédé de type « feast & famine », continu simple étage et double étage.

III.4. Une qualité du produit visée

La production d'AGV est traditionnellement réalisée par fermentation anaérobie en inhibant la méthanogénèse par un fort taux de dilution ou de faibles valeurs de pH. Au cours de cette étape de fermentation, le pH influence très fortement les spectres d'AGV (Fang et Liu, 2002; Horiuchi et al., 2002; Temudo et al., 2007), mais aussi les concentrations de chacun (Rodriguez et al., 2006). Ce résultat indique que la composition polymère PHA peut être optimisée si on est capable de contrôler le pH de fonctionnement dans le réacteur de fermentation acidogène.

Le rôle de l'acide propionique sur la sélection et sur la production de PHA n'a pas été abordé au cours de ce travail. Cependant, de nombreux travaux ont montré la nécessité incontournable de ce type de substrat (possédant un nombre de carbone impair) pour la formation du co-polymère P(HB-HV) dont l'intérêt pour diverses applications industrielles a été largement documenté. Un premier travail sur le

devenir du co-substrat butyrate/propionate a été effectué sous limitation phosphore par Grousseau et al. (2014) avec la souche *C. necator.* Les auteurs montrent qu'une carence en phosphore ralentit la production de monomère de 3HB tout en maintenant une production de 3HV (augmentant la proportion de celle-ci), contrairement à la limitation azote. De plus, la proportion maximale de HV est directement corrélée à la proportion d'acide propionique dans l'alimentation.

III.5. La conduite du procédé et ses limites

La concentration en phosphore dans l'effluent est déterminante et dépend du type de procédé mis en place. Dans tous les cas, une étape préalable d'élimination ou de réduction du phosphore est nécessaire et facilement applicable, notamment par des procédés biologiques ou chimiques. Celle-ci a pour objectif d'imposer le bon ratio C/P, permettant d'imposer des conditions de double limitation nutritionnelle de la croissance.

De par la nécessité d'avoir des effluents concentrés en AGV et la faible teneur intracellulaire en PHB pouvant être atteinte dans les cultures de type fed-batch, celles-ci n'ont pas été envisagées dans le cadre d'une application industrielle.

Dans le cas des cultures de type « feast & famine », il est possible d'atteindre, après enrichissement en microorganismes producteurs, des taux de PHB semblables à ceux pouvant être obtenus en cultures pures. Cependant, ces procédés étant réalisés via des batch, il est indispensable d'apporter des concentrations élevées en substrat pour avoir une productivité volumique intéressante. Ainsi, sous la contrainte d'utilisation d'effluents réels (dilués), ce type de configuration devient difficilement transposable à l'échelle industrielle.

Pour les procédés continus évalués dans cette étude, avant de produire du PHA en régime stabilisé, la sélection microbienne de producteurs de PHA doit être atteinte. La mise en œuvre rapide de l'enrichissement et de la sélection microbienne doit être opérée :

- sous des conditions de double limitation nutritionnelle,
- sous une stratégie croissante du niveau de la limitation phosphore,
- sous le même taux de dilution auquel la production en continue est visée.

En effet, il a été mis en évidence un besoin d'avoir la limitation phosphore initialement et d'avoir une stratégie d'imposition de la limitation phosphore progressive sans changer le taux de dilution. Ces conditions minimisent les dynamiques de populations et assurent une sélection de microorganismes producteurs robuste. Afin de produire en continu de la biomasse contenant une forte teneur intracellulaire en PHA, deux configurations de procédés de production continue ont été envisagées.

(1) Dans le cas d'un chémostat simple étage, pour atteindre de fortes teneurs en PHA, un faible taux de dilution et un fort degré de limitation sont nécessaires. Ce procédé présente l'avantage d'être robuste face à une variation de phosphore. En effet, la zone de DLN est d'autant plus large que le D est faible. Toutefois, il convient de ne pas se placer aux bornes du système au risque de générer une accumulation d'AGV (inhibiteurs de la croissance) et un lessivage de la sélection microbienne. Pour une teneur intracellulaire en PHB d'environ 80%, les conditions optimales de production ont été déterminées pour un D de 0,04 h^{-1} et un C/P de 1500 Cmol/Pmol.

(2) Pour un procédé double étage, la sélection de microorganismes producteurs est effectuée dans le premier étage à fort D, restreignant la zone de DLN, suivi d'un 2ème étage en carence de phosphore. Pour obtenir une teneur en PHA proche de 80%, par exemple, le 1er étage doit être conduit à un D de 0,31 h^{-1} et un C/P de 120 Cmol/Pmol (condition de double limitation assurant la sélection de bons microorganismes producteurs) puis dans le 2ème étage, une condition de carence ou de forte limitation en phosphore, avec un TSH de 10 h, doit être imposée pour maximiser le taux de PHA intracellulaire.

Comme défendu par (Koller et Muhr, 2014), les procédés continus présentent de nombreux avantages biologiques et économiques, et sont les plus envisageables pour la production de PHA. Le Tableau 33 récapitule les quatre configurations envisagées d'un procédé de production de PHA, avec leurs conduites et les avantages et inconvénients associés.

Tableau 33 : Récapitulatif des configurations de procédés de production de PHA envisagées, leurs conduites, les avantages et les inconvénients

Type de procédé		Conduite	Avantage global	Limites biologiques	Limites économiques
Fed-batch	Concentration	Carence en P	Utilisation du potentiel direct de la boue activée	Diversité dans la boue (au sein des producteurs et des non producteurs)	Nécessite des effluents concentrés[1]
	Enrichissement	Degré de limitation contrôlé			
Simple étage (sélection et production simultanée)		Faible D et C/P élevé	Utilisation d'effluents dilués[1] Zone de DLN large[2] Mise en œuvre d'un unique réacteur	Contaminations possibles[4]	Faible D réduit la productivité
Double étage	1er étage (sélection)	Fort D et faible C/P	Utilisation d'effluents dilués[1] Qualité de la sélection[3] Pressions de sélection importantes[4] Productivités élevées	Faible zone de DLN[2] Fort D[5]	--
	2ème étage (production)	Carence en P		--	Forts PHB_{in} demandent à augmenter le TSH et réduit la productivité

[1] Dans notre cas, la contrainte imposée par les effluents issus de la fermentation des boues sont leur dilution en substrat.
[2] La largeur de la zone de DLN déterminera le degré de robustesse du système, par la marge de C/P variables que l'on peut s'accorder en entrée.
[3] En termes de paramètres cinétiques (μ_{max} et q_{PHBmax}).
[4] Le fort D restreint le développement d'autres populations contaminantes et inversement.
[5] Le fort taux de dilution entraine un renouvellement fréquent du volume du réacteur et donc un risque de lessivage de la biomasse.

IV. CONCLUSION

L'implantation de différentes configurations de production de PHA a été discutée, en soulevant les points clés à prendre en compte dans une filière de production de PHA, de la synthèse des AGV à la récupération du produit.

L'étude des performances des réacteurs par le biais des résultats expérimentaux obtenus et par le modèle cinétique établi, ont permis de dégager les conditions opératoires permettant une production avec des teneurs en PHB intracellulaires élevées.

Les analyses économiques montrent le fort coût lié à la récupération du produit (jusqu'à 70% des coûts de fonctionnement), c'est pourquoi on privilégiera toujours une teneur intracellulaire élevée en PHB. De ce fait, le mode de production de PHB via un procédé fed-batch, directement à partir de boues activées, a été abandonné.

La productivité du procédé choisi est évidemment essentielle. Celle-ci dépendra des phénomènes physiques de transfert liés aux capacités d'aération maximales du procédé et des phénomènes biologiques à travers les rendements globaux de conversion du substrat. Un k_La de 100 h^{-1}, pour un procédé simple étage, a permis de calculer une productivité de 10 kgPHB/m^3.j, et une concentration en substrat nécessaire de 25 g/L. De plus pour un procédé double étage, une productivité de 16 kgPHB/m^3.j. a été obtenue avec une concentration en substrat nécessaire de 20 g/L dans le 2ème étage. L'ensemble de nos résultats ont montré un moyen innovant de sélectionner et d'enrichir des populations productrices de PHA par la mise en place d'une limitation phosphore.

Dans une chaine de production de PHA, la composition de l'effluent fermenté produit dans l'étage de digestion anaérobie, déterminera fortement la composition et la qualité du polymère, mais aussi les productivités volumiques pouvant être atteintes. La valeur ajoutée d'avoir une proportion élevée d'acide butyrique dans l'alimentation a été montrée sur la qualité de la sélection microbienne en termes de sélection de microorganismes producteurs, et sur les capacités élevées de production de PHB. Cette composition peut être contrôlée par le pH lors de la fermentation acidogène des boues. La proportion de DCO biodégradable non AGV est un facteur à prendre en compte. Cette fraction est à minimiser en vue de réduire le développement des contaminants et la production de molécules autres que PHB. C'est également pourquoi, il faut maximiser les pressions de sélection sur les microorganismes producteurs, par le D et par la limitation phosphore.

Ainsi, pour mener à bien un procédé de production de PHA, l'effluent permettant la synthèse d'un polymère de qualité tout en assurant le maintien de cette sélection doit :

- être riche en AGV, contenir une proportion de butyrate significative,
- avoir des proportions en type d'AGV en accord avec la qualité du produit visée,
- avoir une concentration en phosphore qui doit être contrôlée et ajustée selon la configuration du procédé.

Les choix de la configuration de la filière de production de PHA sont donc issus d'un compromis de multi-facteurs en vue de la rentabilité maximale du produit.

Conclusion générale

I. RAPPEL DU CADRE DE L'ETUDE ET DESCRIPTION DE L'APPROCHE SCIENTIFIQUE

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans un contexte de valorisation du carbone issu des déchets notamment de boues biologiques de station d'épuration. C'est sous un cadre économique et environnemental plus contraignant que les acteurs de l'assainissement tentent de passer d'une logique d'épuration à une logique de valorisation des effluents. De manière conventionnelle, après fermentation anaérobie des boues, la DCO biodégradable contenant majoritairement des AGV est valorisée en méthane et en CO_2. Ce biogaz peut être appliqué en tant que source d'énergie pour la production de chaleur et/ou d'électricité. L'un des principaux inconvénients de ce procédé est que son produit a une valeur économique très limitée. Par conséquent, en général, la conversion des flux résiduels pour la production d'énergie seule n'est pas économiquement rentable. Dans ce travail, une autre approche est évaluée, celle de la valorisation du carbone en PHA, un produit à plus haute valeur ajoutée. En effet, ce sont des polymères totalement biodégradables et biocompatibles, présentant des propriétés similaires à certains plastiques conventionnels. La production de ces PHA est actuellement effectuée en culture pure. Les contraintes qu'impose ce genre de procédé (stérilité, pureté des substrats, réacteur couteux) rendent les filières de production de PHA insuffisamment compétitive face aux plastiques conventionnels d'origine pétrolière. L'utilisation de cultures mixtes pourrait permettre d'abaisser le coût des PHA puisqu'elles ne nécessitent pas de stérilisation préalable et peuvent être alimentées par des jus de fermentation de déchets et effluents. Il convient cependant, d'optimiser ces cultures et notamment de permettre une sélection de microorganismes producteurs de PHA. Ce travail de thèse a ainsi été réalisé en coopération avec le centre VERI dans le cadre d'un contrat CIFRE avec pour objectif de mettre au point un système de production de PHB ou P-(HB-co-HV) à partir d'AGV issus de la fermentation de boues biologiques.

Les recherches sur la production de PHA en cultures non axéniques ou cultures « ouvertes » se sont tournées principalement vers des procédés de types « feast & famine », sélectionnant et enrichissant des microorganismes naturellement présents dans les boues activées. Ce mode de culture a montré des résultats très encourageants concernant la capacité d'enrichissement et la qualité de la sélection microbienne, en laboratoire mais aussi à l'échelle pilote. Cependant, de nombreuses contraintes pour ce mode de production ont été identifiées : les temps de sélection relativement longs, les besoins en carbone pour maintenir cette sélection dans le réacteur d'enrichissement, et l'utilisation d'un étage de production en mode fed-batch qui, pour atteindre des teneurs en PHA élevées, nécessite une alimentation par des concentrations élevées en carbone en imposant souvent une limitation en azote poussée.

Des travaux antérieurs ont montré la faisabilité de production de PHA à partir de limitation nutritionnelle en phosphore en culture pure, permettant ainsi de maintenir une croissance résiduelle et améliorant la production de PHA, mais aussi la qualité du polymère en présence de propionate. L'originalité du travail effectué, concerne donc l'utilisation de cultures mixtes placées en condition de limitation nutritionnelle par le phosphore pour la production de PHB.

Dans ce contexte, l'objectif majeur de cette thèse a été d'étudier, sous contraintes de limitation phosphore et en utilisant des AGV comme source de carbone (1) les capacités de sélection et d'enrichissement de microorganismes producteurs ; (2) la qualité de la sélection microbienne vis-à-vis du stockage de PHB (paramètres cinétiques, rendements observés, devenir du carbone) ; (3) les mécanismes cellulaires de dilution du phosphore et leur rôle dans le déclenchement du stockage de PHB.

L'approche qui a été adoptée au cours de la thèse repose sur l'analyse cinétique et stœchiométriques de cultures réalisées selon divers modes : fed-batch, continu, batch ; chaque mode apportant une spécificité utile pour caractériser les comportements microbiens.

En particulier, un plan d'expérience étoffé, basé sur un procédé chémostat, a été développé afin d'analyser l'effet du taux de dilution et du degré de limitation en phosphore sur la sélection microbienne et sur le stockage de PHB. Les études ont été menées sous acide acétique uniquement dans un premier temps, puis l'effet de la présence de butyrate dans la source d'alimentation a été analysé. Des cultures de types batch ont eu alors pour objectif de qualifier la sélection microbienne opérée en réacteur chémostat afin de dégager les paramètres cinétiques de production des souches selon la sélection microbienne d'une part mais aussi selon l'état physiologique du microorganisme. Le développement d'un modèle cinétique basé sur les résultats obtenus dans ce travail et l'étude bibliographique, a eu pour ambition de mieux comprendre les processus impliqués dans la dilution du phosphore intracellulaire et le lien avec la production de PHA, selon les populations sélectionnées.

II. PRINCIPAUX RESULTATS

Les cultures fed-batch ont permis de dégager de premiers indices concernant les problématiques du phosphore en tant qu'élément limitant sur la sélection microbienne de microorganismes producteurs ainsi que sur les réponses intracellulaires du devenir du carbone. L'importance du degré de la limitation en phosphore a été soulevée sur les cinétiques de production de PHA ainsi que sur les dynamiques des populations et en particulier l'enrichissement en microorganismes producteurs. Ainsi, une teneur intracellulaire en PHB de 70% a été atteinte lorsque la limitation phosphore est maitrisée, montrant le potentiel de production de PHA des boues activées sans étape d'enrichissement. Ce résultat constitue une première démonstration de ce niveau de performance en culture mixte.

Document confidentiel

L'étude du comportement microbien face à une limitation en phosphore a nécessité la mise en œuvre de cultures continues selon un plan d'expérience couvrant l'ensemble du domaine de limitations (C ; C&P et P) pour différents taux de dilution. Les résultats de ces cultures ont tout d'abord confirmé l'importance et le rôle essentiel de la limitation phosphore à la fois sur la sélection de producteurs, et sur le stockage de PHB.

Concernant la sélection microbienne, on a pu constater un enrichissement systématique de souches majoritaires productrices de PHB, et ce, sur l'ensemble de notre plan d'expérience. Cette unité fonctionnelle nous a tout d'abord conduit à considérer les populations microbiennes comme une population homogène ayant un comportement métabolique similaire.

Pour ces populations, la bascule progressive du carbone entre croissance et stockage lorsque le degré de limitation en P augmente a été évaluée dans la zone de double limitation, selon le taux de dilution appliqué. Les résultats confirment que les besoins en phosphore intracellulaire dépendent du taux spécifique de croissance comme il est prédit par l'hypothèse du « growth rate hypothesis ». De manière plus originale, ils mettent en lumière que ces besoins diffèrent selon le degré de limitation et quantifie la dilution possible du phosphore intracellulaire pour les différentes conditions opératoires. Nous avons pu alors définir la zone de variation du P_{in} (entre une valeur P_{in_max} et une valeur P_{in_min}), zone qui est μ-dépendant. La valeur minimale critique (P_{in_crit}) a également été estimée à 0,4 % en masse. La plasticité cellulaire a pu être confirmée pour les différentes populations microbiennes sélectionnées.

Les cultures en batch réalisées à partir des sélections microbiennes obtenues en chémostat, ont eu pour principal objectif de caractériser le potentiel d'accumulation de PHB des populations et ainsi de qualifier la condition de sélection optimale vis-à-vis de l'enjeu de production de PHB. Les résultats de ces cultures ont montré la forte réponse de stockage de PHB lors de conditions de carence en phosphore et d'excès de carbone. Les vitesses spécifiques de production de PHB sont maximales pour un taux de phosphore intracellulaire initial de 2%, et ce pour toutes les sélections microbiennes obtenues. Puisqu'il n'y a pas de phosphore dans le PHB, ce résultat montre l'importance de l'état physiologique du microorganisme sur la cinétique de conversion du carbone vers la production de PHB. Cependant, la valeur de q_{PHBmax} observée est tout de même souche sélectionnée dépendante.

A partir de l'ensemble de ces observations et de l'étude bibliographique, un modèle cinétique a été développé. Ce modèle avait pour objectif d'aider à la compréhension du comportement cinétique des populations microbiennes sélectionnées et ainsi, *in fine*, d'aider au choix des conditions optimales de production de PHB.

Ce modèle intègre l'assimilation du phosphore soluble, la croissance de X_c, la production de PHB et les besoins en énergie de maintenance. Il considère (1) une assimilation du phosphore fonction du ratio μ/μ_{max} et conduisant à un P_{in} compris entre une borne minimale (P_{in_min}) et une borne maximale (P_{in_max}) qui sont μ dépendantes ; (2) une dépendance entre le taux spécifique de croissance et le taux de phosphore intracellulaire en tenant compte de la plasticité cellulaire vis-à-vis de P_{in}, plasticité qui dépend du μ; (3) des besoins de maintenance cellulaire fonction du degré de limitation en phosphore ; (4) un taux spécifique de production de PHB influencé négativement par P_{in}. Il existe une teneur en P_{in} optimale (autour de 0,02 gP/gXc) pour obtenir un taux spécifique de stockage de PHB le plus élevé et en deçà ou au-delà duquel ce taux diminue.

Ce modèle a été calibré sur un nombre élevé d'expériences couvrant des situations fortement contrastées obtenues en culture continue et discontinue. Les simulations montrent que le modèle décrit bien les processus métaboliques identifiés. Néanmoins, des spécificités de valeurs de paramètres propres aux souches sélectionnées ont dû être prises en compte pour être capable de représenter fidèlement l'ensemble du domaine expérimental étudié. Ce résultat paraît tout à fait logique.

Sur la base de ce modèle, les simulations permettent de quantifier l'effet des valeurs μ_{max} et q_{PHBmax} sur le devenir du carbone selon les conditions opératoires (D, C/P, source de carbone). Le μ_{max} de la souche a, avant tout, un effet sur la productivité car il permet d'obtenir les mêmes capacités de production (P_{in} et donc q_{PHB} optimum) à des D supérieurs.

D'un point de vue compréhension, c'est donc le degré de limitation en phosphore ainsi que le D qui vont imposer le P_{in} et en conséquence la concentration en biomasse catalytique et en PHB. De plus, le q_{PHB_max} va influer sur le potentiel de redirection du carbone vers le PHB. Il conviendra donc de viser des souches aux potentielles de production maximales (q_{PHBmax}) mais également de μ_{max} élevé pour optimiser la productivité du système.

Un effet très significatif de la nature de la source de carbone a été mis en évidence. La présence majoritaire de butyrate en association avec l'acétate conduit, de manière prévisible, à une amélioration substantielle des rendements. Il sera donc nécessaire de privilégier sa formation lors de la fermentation des boues biologiques (contrôle de l'acidogénèse par le pH).

Si un enrichissement systématique de souches majoritaires productrices de PHB a été constaté sur l'ensemble de notre plan d'expérience, l'identification phylogénétique indique l'obtention de genres différents selon les conditions de sélection. Il est remarquable de constater que, mis à part les bactéries du genre *Acinetobacter*, tous les autres genres bactériens dominants sélectionnés sous double limitation C&P, font partie de la famille des *Comamonadaceae* (classe des βproteobacteria). De plus, la confrontation des simulations par le modèle aux résultats expérimentaux montre que le comportement

métabolique de ces souches est similaire mais que leurs paramètres cinétiques et stœchiométriques diffèrent. Ce point explique certainement que ce ne soit pas la même souche qui domine sur l'ensemble du domaine expérimental couvert. Ces souches sont néanmoins supplantées lorsque l'AA est seule source de carbone et à fort taux de dilution, surtout si la limitation en phosphore est absente ou trop faible. De même, à très fort degré de limitation en phosphore imposé en début de culture continue, une souche dominante, capable de stocker un autre produit (vraisemblablement un polysaccharide) en plus du PHB, est mise en évidence.

Nos résultats permettent donc d'envisager de manière confiante la sélection de surproducteurs de PHB dans des conditions intéressantes industriellement, comme par un chémostat simple ou double étage. En effet, en imposant un degré de limitation par le phosphore intermédiaire, un taux de dilution élevé, la sélection de populations surproductrices de PHB ayant une activité métabolique élevée (μ_{max} élevé et potentiellement un q_{PHBmax} élevé) sera favorisée. Dans notre cas, cette population a été identifiée sous le genre *Malikia spinosa*. La relation entre D et q_{PHBmax} n'a cependant pas été élucidée clairement et reste à déterminer plus précisément.

III. PERSPECTIVES

Les perspectives de ce travail sont nombreuses.

Tout d'abord, sur le point de la compréhension de la plasticité vis-à-vis du phosphore, il serait intéressant de quantifier les pools de molécules intracellulaires contenant du phosphore, (notamment le P-ARN par exemple), pour analyser leur évolution selon le degré de limitation et donc le niveau de P_{in}. Nous pourrions alors mieux :

- comprendre et donc mieux maitriser les mécanismes d'adaptation des cellules à une limitation en phosphore,
- comprendre l'impact de la réorganisation sur les besoins en énergie de maintenance.
- cerner plus précisément les limites de plasticité pour les souches sélectionnées.

Ensuite, concernant le lien entre la limitation en phosphore, le taux de dilution et le stockage de PHB, il serait pertinent de :

- rechercher des conditions pour maximiser le q_{PHBmax} en tentant de comprendre quels paramètres dépendent de cette valeur,
- étudier si un lien existe au niveau génétique entre l'activation de la production de PHB et la capacité à faire face à une limitation en phosphore.

Concernant les potentialités cinétiques des souches sélectionnées, nous devrons :

- tester des taux de dilution plus élevés pour confirmer ou pas la relation entre taux spécifique maximum de stockage et taux spécifique maximum de croissance,
- étudier ces potentialités dans le cas de sources de carbone plus complexes.

Enfin, au niveau du procédé industriel, nous devrons vérifier la faisabilité et le réalisme de plusieurs choix pour un procédé continu (taux de dilution, C/P, …), bien que celui-ci les résultats en termes de productivités, teneurs intracellulaires, sont très encourageants. Des critères d'évaluation plus complets devront alors être pris en compte. Par exemple, nous devrons mieux connaître l'influence de la concentration et de la teneur en PHA sur la mise en œuvre de la récupération du polymère, étape cruciale pour l'économie de la filière.

Etant donné les performances obtenues dans ce travail, la production de PHA à partir de cultures mixtes sur effluent ou déchets fermentés apparaît intéressante même en comparaison des performances obtenues en culture pure. En effet, l'utilisation de réacteur « low cost », impliquant notamment une limite en termes de capacité de transfert d'oxygène, implique une faible concentration de cellules dans les réacteurs et donc une faible productivité ; Cependant en terme de coût, la chute de productivité pourrait être compensée par une forte économie sur le coût du réacteur. Ceci devra être estimé très précisément pour rendre cette comparaison objective.

Document confidentiel

Références bibliographiques

Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R., and Reis, M.A.M. (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. Journal of Biotechnology *130*, 411–421.

Albuquerque, M.G.E., Torres, C.A.V., and Reis, M.A.M. (2010). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. Water Res. *44*, 3419–3433.

Albuquerque, M.G.E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., and Reis, M.A.M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. J. Biotechnol. *151*, 66–76.

Albuquerque, M.G.E., Carvalho, G., Kragelund, C., Silva, A.F., Barreto Crespo, M.T., Reis, M.A.M., and Nielsen, P.H. (2012). Link between microbial composition and carbon substrate-uptake preferences in a PHA-storing community. ISME J. 1–12.

Ames, G.F. (1968). Lipids of Salmonella typhimurium and Escherichia coli: Structure and Metabolism. J Bacteriol *95*, 833–843.

Anderson, A.J., and Dawes, E.A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol. Rev. *54*, 450–472.

Anderson, A.J., Haywood, G.W., and Dawes, E.A. (1990). Biosynthesis and composition of bacterial poly(hydroxyalkanoates). International Journal of Biological Macromolecules *12*, 102–105.

Aragao, G.M.F. (1996). Production de polyhydroxyalcanoates par Alcaligenes eutrophus : caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures. Thesis. Institut National des Sciences Appliquées.

Babel, W., Ackermann, J.-U., and Breuer, U. (2001). Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). In Biopolyesters, P.D.W. Babel, and P.D.A. Steinbüchel, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 125–157.

Bengtsson, S. (2009). The utilization of glycogen accumulating organisms for mixed culture production of polyhydroxyalkanoates. Biotechnol. Bioeng. *104*, 698–708.

Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., and Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. Bioresour. Technol. *99*, 509–516.

Bertilsson, S., Berglund, O., Karl, D.M., and Chisholm, S.W. (2003). Elemental composition of marine Prochlorococcus and Synechococcus: Implications for the ecological stoichiometry of the sea. Limnol. Oceanogr. *48*, 1721–1731.

Beun, J.J., Verhoef, E.V., Van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. (2000). Stoichiometry and kinetics of poly-b-hydroxybutyrate metabolism under denitrifying conditions in activated sludge cultures. Biotechnol. Bioeng *68*, 496–507.

Beun, J.J., Dircks, K., Van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. (2002). Poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures. Water Res. *36*, 1167–1180.

Bonting, C.F.C., Veen, H.W. van, Taverne, A., Kortstee, G.J.J., and Zehnder, A.J.B. (1992). Regulation of polybetahydroxybutyrate (PHB) and polyphosphate synthesis in Acinetobacter johnsonii 210A. p. 207.

Bougaran, G., Bernard, O., and Sciandra, A. (2010). Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. Journal of Theoretical Biology *265*, 443–454.

Braunegg, G., Lefebvre, G., and Genser, K.F. (1998). Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. J. Biotechnol. *65*, 127–161.

Bremer, H., and Dennis, P. (1996). Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell by Growth Rate.

Caperon, J., and Meyer, J. (1972). Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton—II. Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton. In Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts, (Elsevier), pp. 619–632.

Chee, J.-Y., Yoga, S.-S., Lau, N.-S., Ling, S.-C., Abed, M., Sudesh, K., and Raeid, M. (2010). Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting renewable resources into bioplastics. In Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, pp. 1395–1404.

Chen, G.-Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. Chem Soc Rev *38*, 2434–2446.

Choi, J., and Lee, S.Y. (1999). Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. Appl Microbiol Biotechnol *51*, 13–21.

Chrzanowski, and Kyle (1996). Ratios of carbon, nitrogen and phosphorus in Pseudomonas fluorescens as a model for bacterial element ratios and nutrient regeneration. Aquat Microb Ecol *10*, 115–122.

Chrzanowski, T.H., and Grover, J.P. (2008). Element content of Pseudomonas fluorescens varies with growth rate and temperature: A replicated chemostat study addressing ecological stoichiometry. Limnol. Oceanogr. *53*, 1242–1251.

Chua, A.S.M., Takabatake, H., Satoh, H., and Mino, T. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. Water Res. *37*, 3602–3611.

Ciggin, A.S., Insel, G., Majone, M., and Orhon, D. (2012). Respirometric evaluation and modelling of acetate utilization in sequencing batch reactor under pulse and continuous feeding. Bioresource Technology *107*, 61–69.

Cooney, C.L., and Wang, D.I. (1976). Transient response of Enterobacter aerogenes under a dual nutrient limitation in a chemostat. Biotechnol. Bioeng. *18*, 189–198.

Dias, J.M., Oehmen, A., Serafim, L.S., Lemos, P.C., Reis, M.A., and Oliveira, R. (2008). Metabolic modelling of polyhydroxyalkanoate copolymers production by mixed microbial cultures. BMC Systems Biology *2*, 59.

Dias, J.M.L., Serafim, L.S., Lemos, P.C., Reis, M.A.M., and Oliveira, R. (2005). Mathematical modelling of a mixed culture cultivation process for the production of polyhydroxybutyrate. Biotechnol. Bioeng. *92*, 209–222.

Dias, J.M.L., Lemos, P.C., Serafim, L.S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M.G.E., Ramos, A.M., Oliveira, R., and Reis, M.A.M. (2006). Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. Macromol. Biosci. *6*, 885–906.

Dicks, J.W., and Tempest, D.W. (1966). The Influence of Temperature and Growth Rate on the Quantitative Relationship Between Potassium, Magnesium, Phosphorus and Ribonucleic Acid of Aerobucter aerogenes Growing in a Chemostat. J. Gen. Microbiol. 547–557.

Dowd, S.E., Callaway, T.R., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R.G., and Edrington, T.S. (2008a). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). BMC Microbiology *8*, 125.

Dowd, S.E., Sun, Y., Wolcott, R.D., Domingo, A., and Carroll, J.A. (2008b). Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned Salmonella-infected pigs. Foodborne Pathogens and Disease *5*, 459–472.

Dowd, S.E., Delton Hanson, J., Rees, E., Wolcott, R.D., Zischau, A.M., Sun, Y., White, J., Smith, D.M., Kennedy, J., and Jones, C.E. (2011). Survey of fungi and yeast in polymicrobial infections in chronic wounds. J. Wound Care *20*, 40–47.

Droop, M.R. (1968). Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in Monochrysis lutheri. J. Mar. Biol. Assoc. UK *48*, 689–733.

Durner, R., Witholt, B., and Egli, T. (2000). Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in Pseudomonas oleovorans during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates. Appl. Environ. Microbiol. *66*, 3408–3414.

Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics *26*, 2460–2461.

Egli, T. (1991). On multiple-nutrient-limited growth of microorganisms, with special reference to dual limitation by carbon and nitrogen substrates. Antonie Van Leeuwenhoek *60*, 225–234.

Ehlers, K., Bakken, L.R., Frostegård, Å., Frossard, E., and Bünemann, E.K. (2010). Phosphorus limitation in a Ferralsol: Impact on microbial activity and cell internal P pools. Soil Biol. Biochem. *42*, 558–566.

Elser, J. j., Sterner, R. w., Gorokhova, E., Fagan, W. f., Markow, T. a., Cotner, J. b., Harrison, J. f., Hobbie, S. e., Odell, G. m., and Weider, L. w. (2000a). Biological stoichiometry from genes to ecosystems. Ecology Letters *3*, 540–550.

Elser, J. j., Sterner, R. w., Gorokhova, E., Fagan, W. f., Markow, T. a., Cotner, J. b., Harrison, J. f., Hobbie, S. e., Odell, G. m., and Weider, L. w. (2000b). Biological stoichiometry from genes to ecosystems. Ecology Letters *3*, 540–550.

Elser, J.J., Acharya, K., Kyle, M., Cotner, J., Makino, W., Markow, T., Watts, T., Hobbie, S., Fagan, W., Schade, J., et al. (2003). Growth rate–stoichiometry couplings in diverse biota. Ecology Letters *6*, 936–943.

Eren, A.M., Zozaya, M., Taylor, C.M., Dowd, S.E., Martin, D.H., and Ferris, M.J. (2011). Exploring the Diversity of Gardnerella vaginalis in the Genitourinary Tract Microbiota of Monogamous Couples Through Subtle Nucleotide Variation. PLoS ONE *6*, e26732.

Fang, H.H., and Liu, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. Bioresource Technology *82*, 87–93.

Fernández-Dacosta, C., Posada, J.A., Kleerebezem, R., Cuellar, M.C., and Ramirez, A. (2015). Microbial community-based polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater: Techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment. Bioresource Technology *185*, 368–377.

Flynn, K.J. (2002). Toxin production in migrating dinoflagellates: a modelling study of PSP producing Alexandrium. Harmful Algae *1*, 147–155.

Flynn, K.J. (2008). The importance of the form of the quota curve and control of non-limiting nutrient transport in phytoplankton models. J. Plankton Res. *30*, 423–438.

Frank, S. (1999). Growth characteristics of Acinetobacter johnsonii 210A under single and dual nutrient limitation, with special reference to carbon, nitrogen and phosphorus. PhD thesis No 13407. Swiss Federal Institute of Technology.

Franklin, O., Hall, E.K., Kaiser, C., Battin, T.J., and Richter, A. (2011). Optimization of biomass composition explains microbial growth-stoichiometry relationships. Am. Nat. *177*, E29–42.

Freguia, S., Teh, E.H., Boon, N., Leung, K.M., Keller, J., and Rabaey, K. (2010). Microbial fuel cells operating on mixed fatty acids. Bioresource Technology *101*, 1233–1238.

Fuhs, G.W. (1969). Phosphorus content and rate of growth in the diatoms Cyclotella nana and Thalassiosira fluviatilis. Journal of Phycology *5*, 312–321.

Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., De Eugenio, L.I., Escapa, I.F., Sanz, J.M., García, J.L., and Prieto, M.A. (2011). Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in Pseudomonas putida KT2442. Mol. Microbiol. *79*, 402–418.

Garcia-Ochoa, F., and Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. Biotechnol. Adv. *27*, 153–176.

Gebremariam, S.Y., Beutel, M.W., Christian, D., and Hess, T.F. (2011). Research advances and challenges in the microbiology of enhanced biological phosphorus removal—a critical review. Water Environment Research *83*, 195–219.

Geider, R.J., MacIntyre, H.L., and Kana, T.M. (1998). A dynamic regulatory model of phytoplanktonic acclimation to light, nutrients, and temperature. Limnology and Oceanography *43*, 679–694.

Grousseau, E. (2012). Potentialités de production de Poly-Hydroxy-Alcanoates chez Cupriavidus necator sur substrats de type acides gras volatils : études cinétiques et métaboliques. Thèse. Institut National des Sciences Appliquées.

Grousseau, E., Blanchet, E., Deleris, S., Albuquerque, M.G.E., Paul, E., and Uribelarrea, J.-L. (2013). Impact of sustaining a controlled residual growth on polyhydroxybutyrate yield and production kinetics in Cupriavidus necator. Bioresour. Technol. *148*, 30–38.

Grousseau, E., Blanchet, E., Deleris, S., Albuquerque, M.G.E., Paul, E., and Uribelarrea, J.-L. (2014). Phosphorus limitation strategy to increase propionic acid flux towards 3-hydroxyvaleric acid monomers in Cupriavidus necator. Bioresour. Technol. *153*, 206–215.

Guo, L., and Vanrolleghem, P.A. (2014). Calibration and validation of an activated sludge model for greenhouse gases no. 1 (ASMG1): prediction of temperature-dependent N_2O emission dynamics. Bioprocess Biosyst Eng *37*, 151–163.

Gurieff, N., and Lant, P. (2007). Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. Bioresour. Technol. *98*, 3393–3403.

Hao, O., and Chang, C. (1987). Kinetics of Growth and Phosphate-Uptake in Pure Culture Studies of Acinetobacter Species. Biotechnol. Bioeng. *29*, 819–831.

Hoi, L.T., Voigt, B., Jürgen, B., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., Evers, S., Feesche, J., Maurer, K.-H., Hecker, M., and Schweder, T. (2006). The phosphate-starvation response of Bacillus licheniformis. PROTEOMICS *6*, 3582–3601.

Horiuchi, J.-I., Shimizu, T., Tada, K., Kanno, T., and Kobayashi, M. (2002). Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. Bioresource Technology *82*, 209–213.

Huijberts, G.N.M., and Eggink, G. (1996). Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by Pseudomonas putida KT2442 in continuous cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. *46*, 233–239.

Jiang, Y., Hebly, M., Kleerebezem, R., Muyzer, G., and Van Loosdrecht, M.C. (2011a). Metabolic modeling of mixed substrate uptake for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. Water Research *45*, 1309–1321.

Jiang, Y., Marang, L., Kleerebezem, R., Muyzer, G., and Van Loosdrecht, M. (2011b). Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture. Biotechnology and Bioengineering *108*, 2022–2035.

Jiang, Y., Marang, L., Kleerebezem, R., Muyzer, G., and Van Loosdrecht, M.C. (2011c). Effect of temperature and cycle length on microbial competition in PHB-producing sequencing batch reactor. The ISME Journal *5*, 896–907.

Jiang, Y., Marang, L., Tamis, J., Van Loosdrecht, M.C.M., Dijkman, H., and Kleerebezem, R. (2012). Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. Water Res. *46*, 5517–5530.

Johnson, K., Jiang, Y., Kleerebezem, R., Muyzer, G., and Van Loosdrecht, M.C.M. (2009). Enrichment of a Mixed Bacterial Culture with a High Polyhydroxyalkanoate Storage Capacity. Biomacromolecules *10*, 670–676.

Johnson, K., Kleerebezem, R., and Van Loosdrecht, M.C. (2010a). Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. Journal of Biotechnology *147*, 73–79.

Johnson, K., Van Geest, J., Kleerebezem, R., and Van Loosdrecht, M.C. (2010b). Short-and long-term temperature effects on aerobic polyhydroxybutyrate producing mixed cultures. Water Research *44*, 1689–1700.

Jurgens, K., and Gude, H. (1990). Incorporation and release of phosphorus by planktonic bacteria and phagotrophic flagellates. Marine Ecology Progress Series *59*, 271–284.

Karpinets, T.V., Greenwood, D.J., Sams, C.E., and Ammons, J.T. (2006). RNA:protein ratio of the unicellular organism as a characteristic of phosphorous and nitrogen stoichiometry and of the cellular requirement of ribosomes for protein synthesis. BMC Biol *4*, 30.

Khanna, S., and Srivastava, A.K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Process Biochemistry *40*, 607–619.

Kleerebezem, R., and Van Loosdrecht, M.C. (2007). Mixed culture biotechnology for bioenergy production. Curr. Opin. Biotechnol. *18*, 207–212.

Koller, M., and Muhr, A. (2014). Continuous Production Mode as a Viable Process-Engineering Tool for Efficient Poly(hydroxyalkanoate) (PHA) Bio-Production. Chem. Biochem. Eng. Q. *28*, 65–77.

Koller, M., Salerno, A., Dias, M., Reiterer, A., and Braunegg, G. (2010). Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. Food Technol. Biotechnol. *48*, 255–269.

Kumar, P.S., Brooker, M.R., Dowd, S.E., and Camerlengo, T. (2011). Target Region Selection Is a Critical Determinant of Community Fingerprints Generated by 16S Pyrosequencing. PLOS One *6*.

Larpent, J.-P., and Champiat, D. (1988). Biologie des eaux: méthodes & techniques (Masson).

Lee, S.Y. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnol. Bioeng. *49*, 1–14.

Lee, S.Y., and Choi, J. (1999). Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. Waste Manag. *19*, 133–139.

Legović, T., and Cruzado, A. (1997). A model of phytoplankton growth on multiple nutrients based on the Michaelis-Menten-Monod uptake, Droop's growth and Liebig's law. Ecological Modelling *99*, 19–31.

Loo, C.Y., and Sudesh, K. (2007). Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties.

Løvdal, T., Skjoldal, E.F., Heldal, M., Norland, S., and Thingstad, T.F. (2008). Changes in Morphology and Elemental Composition of Vibrio splendidus along a Gradient from Carbon-Limited to Phosphate-Limited Growth. Microbial Ecology *55*, 152–161.

Makino, W., and Cotner, J.B. (2004). Elemental stoichiometry of a heterotrophic bacterial community in a freshwater lake: implications for growth- and resource-dependent variations. Aquatic microbial ecology *34*, 33–41.

Makino, W., Cotner, J.B., Sterner, R.W., and Elser, J.J. (2003). Are bacteria more like plants or animals? Growth rate and resource dependence of bacterial C : N : P stoichiometry. Funct. Ecol. *17*, 121–130.

Marang, L., Jiang, Y., Van Loosdrecht, M.C.M., and Kleerebezem, R. (2013). Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. Bioresource Technology *142*, 232–239.

Marzan, L.W., and Shimizu, K. (2011). Metabolic regulation of Escherichia coli and its phoB and phoR genes knockout mutants under phosphate and nitrogen limitations as well as at acidic condition. Microbiol. Cell Fact. *10*, 39.

Mengmeng, C., Hong, C., Qingliang, Z., Shirley, S.N., and Jie, R. (2009). Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation. Bioresour. Technol. *100*, 1399–1405.

Moore, C.J. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. Environmental Research *108*, 131–139.

Moore, J.K., Doney, S.C., Kleypas, J.A., Glover, D.M., and Fung, I.Y. (2001). An intermediate complexity marine ecosystem model for the global domain. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography *49*, 403–462.

Neijssel, O.M., and Tempest, D.W. (1976). Bioenergetic aspects of aerobic growth of Klebsiella aerogenes NCTC 418 in carbon-limited and carbon-sufficient chemostat culture. Arch. Microbiol. *107*, 215–221.

Oshiki, M., Satoh, H., and Mino, T. (2010). Acetate uptake by PHA-accumulating and non-PHA-accumulating organisms in activated sludge from an aerobic sequencing batch reactor fed with acetate. Water Sci. Technol. *62*, 8–14.

Oshiki, M., Onuki, M., Satoh, H., and Mino, T. (2013). Microbial community composition of polyhydroxyalkanoate-accumulating organisms in full-scale wastewater treatment plants operated in fully aerobic mode. Microbes Environ. *28*, 96–104.

Pandolfi, D., Pons, M.-N., and Motta, M. (2007). Characterization of PHB storage in activated sludge extended filamentous bacteria by automated colour image analysis. Biotechnol. Lett. *29*, 1263–1269.

Panhorst, M., Sorger-Herrmann, U., and Wendisch, V.F. (2011). The pstSCAB operon for phosphate uptake is regulated by the global regulator GlxR in Corynebacterium glutamicum. J. Biotechnol. *154*, 149–155.

Pardelha, F., Albuquerque, M.G.E., Reis, M.A.M., Oliveira, R., and Dias, J.M.L. (2014). Dynamic metabolic modelling of volatile fatty acids conversion to polyhydroxyalkanoates by a mixed microbial culture. New Biotechnology *31*, 335–344.

Pengerud, B., Skjoldal, E., and Thingstad, T. (1987). The Reciprocal Interaction Between Degradation of Glucose and Ecosystem Structure - Studies in Mixed Chemostat Cultures of Marine-Bacteria, Algae, and Bacterivorous Nanoflagellates. Mar. Ecol.-Prog. Ser. *35*, 111–117.

Pirt, S.J. (1975). Principles of microbe and cell cultivation (Wiley).

PlasticsEurope (2015). Plastics - The Facts 2014/2015. An analysis of European plastics production, demand and waste data.

Preusting, H., Kingma, J., and Witholt, B. (1991). Physiology and polyester formation of Pseudomonas oleovorans in continuous two-liquid-phase cultures. Enzyme and Microbial Technology *13*, 770–780.

Raven, J.A. (2013). RNA function and phosphorus use by photosynthetic organisms. Front Plant Sci *4*.

Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, and Kalia, V.C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresource Technology *87*, 137–146.

Rees, G.N., Vasiliadis, G., May, J.W., and Bayly, R.C. (1993). Production of poly-$\backslash$-hydroxybutyrate in Acinetobacter spp. isolated from activated sludge. Applied Microbiology and Biotechnology *38*, 734–737.

Rehm, B.H.A. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. Biochem J *376*, 15–33.

Rehm, B.H.A. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nature Reviews Microbiology *8*, 578–592.

Van’t Riet, K. (1983). Mass transfer in fermentation. Trends in Biotechnology *1*, 113–119.

Rodriguez, J., Kleerebezem, R., Lema, J.M., and Van Loosdrecht, M.C.M. (2006). Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations. Biotechnol. Bioeng. *93*, 592–606.

Ross, O.N., and Geider, R.J. (2009). New cell-based model of photosynthesis and photo-acclimation: accumulation and mobilisation of energy reserves in phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser *383*, 53–71.

Salehizadeh, H., and Van Loosdrecht, M.C.M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. Biotechnol. Adv. *22*, 261–279.

Satoh, H., Ramey, W.D., Koch, F.A., Oldham, W.K., Mino, T., and Matsuo, T. (1996). Anaerobic substrate uptake by the enhanced biological phosphorus removal activated sludge treating real sewage. Water Sci. Technol. *34*, 9–16.

Schembri, M., Bayly, R., and Davies, J. (1995). Phosphate Concentration Regulates Transcription of the Acinetobacter Polyhydroxyalkanoic Acid Biosynthetic Genes. J. Bacteriol. *177*, 4501–4507.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. *75*, 7537–7541.

Scott, J.T., Cotner, J.B., and Lapara, T.M. (2012). Variable stoichiometry and homeostatic regulation of bacterial biomass elemental composition. Front Microbiol *3*, 42.

Serafim, L., Lemos, P., Albuquerque, M., and Reis, M. (2008). Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. App. Microbiol. Biotechnol. *81*, 615–628.

Serafim, L.S., Lemos, P.C., Oliveira, R., and Reis, M.A.M. (2004). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. Biotechnol. Bioeng. *87*, 145–160.

Shi, H., Shiraishi, M., and Shimizu, K. (1997). Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly(β-hydroxybutyric acid) in Alcaligenes eutrophus from various carbon sources. Journal of Fermentation and Bioengineering *84*, 579–587.

Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., and Foglia, T.A. (2000). Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. Appl Microbiol Biotechnol *53*, 690–694.

Stal, L.J. (1992). Poly(hydroxyalkanoate) in cyanobacteria: an overview. FEMS Microbiology Letters *103*, 169–180.

Sterner, R.W., and Elser, J.J. (2002). Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere (Princeton University Press).

Swanson, K.S., Dowd, S.E., Suchodolski, J.S., Middelbos, I.S., Vester, B.M., Barry, K.A., Nelson, K.E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, P.M., et al. (2011). Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. ISME J *5*, 639–649.

Takabatake, H., Satoh, H., Mino, T., and Matsuo, T. (2000). Recovery of biodegradable plastics from activated sludge process. Water Sci. Technol. *42*, 351–356.

Tamis, J., Lužkov, K., Jiang, Y., Loosdrecht, M.C.M. van, and Kleerebezem, R. (2014a). Enrichment of Plasticicumulans acidivorans at pilot-scale for PHA production on industrial wastewater. Journal of Biotechnology *192, Part A*, 161–169.

Tamis, J., Marang, L., Jiang, Y., Van Loosdrecht, M.C.M., and Kleerebezem, R. (2014b). Modeling PHA-producing microbial enrichment cultures--towards a generalized model with predictive power. N Biotechnol *31*, 324–334.

Tempest, D. (1978). Biochemical Significance of Microbial-Growth Yields - Reassessment. Trends Biochem.Sci. *3*, 180–184.

Temudo, M.F., Kleerebezem, R., and Van Loosdrecht, M. (2007). Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: a chemostat study. Biotechnology and Bioengineering *98*, 69–79.

Tezuka, Y. (1990). Bacterial Regeneration of Ammonium and Phosphate as Affected by the Carbon: Nitrogen: Phosphorus Ratio of Organic Substrates. Microbial Ecology *19*, 227–238.

Thingstad, T.F. (1987). Utilization of N, P, and organic C by heterotrophic bacteria. I. Outline of a chemostat theory with a consistent concept of “maintenance” metabolism. Mar. Ecol. Prog. Ser *35*, 99–109.

Third, K.A., Newland, M., and Cord-Ruwisch, R. (2003). The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures. Biotechnol. Bioeng. *82*, 238–250.

Thompson, R.C., Moore, C.J., Saal, F.S. vom, and Swan, S.H. (2009). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. Phil. Trans. R. Soc. B *364*, 2153–2166.

Vadstein, O. (1998). Evaluation of competitive ability of two heterotrophic planktonic bacteria under phosphorus limitation. Aquatic Microbial Ecology *14*, 118–127.

Vadstein, O., and Olsen, Y. (1989). Chemical Compositon and Phosphate Uptake Kinetics of Limnetic Bacterial Communities Cultured in Chemostats Under Phosphorus Limitation. Limnology and Oceanography *34*, 939–946.

Van Aalst-van Leeuwen, M.A., Pot, M.A., Van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. (1997). Kinetic modeling of poly(β-hydroxybutyrate) production and consumption by Paracoccus pantotrophus under dynamic substrate supply. Biotechnol. Bioeng. *55*, 773–782.

Van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. (2002). Modelling of activated sludge processes with structured biomass. Water Sci. Technol. *45*, 13–23.

Veen, J.A. van, and Paul, E.A. (1979). Conversion of Biovolume Measurements of Soil Organisms, Grown Under Various Moisture Tensions, to Biomass and Their Nutrient Content. Appl. Environ. Microbiol. *37*, 686–692.

Venkateswar Reddy, M., and Venkata Mohan, S. (2012). Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment. Bioresour. Technol. *114*, 573–582.

Vershinina, O.A., and Znamenskaya, L.V. (2002). The Pho Regulons of Bacteria. Microbiology *71*, 497–511.

Villano, M., Beccari, M., Dionisi, D., Lampis, S., Miccheli, A., Vallini, G., and Majone, M. (2010). Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. Process Biochem. *45*, 714–723.

Wallen, L.L., and Rohwedder, W.K. (1974). Poly-.beta.-hydroxyalkanoate from activated sludge. Environ. Sci. Technol. *8*, 576–579.

Wang, F., and Lee, S.Y. (1997). Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of Alcaligenes latus under Nitrogen Limitation. Appl Environ Microbiol *63*, 3703–3706.

Werker, A., Lind, P., Bengtsson, S., and Nordstrom, F. (2008). Chlorinated-solvent-free gas chromatographic analysis of biomass containing polyhydroxyalkanoates. Water Res. *42*, 2517–2526.

Zavaleta-Pastor, M., Sohlenkamp, C., Gao, J.-L., Guan, Z., Zaheer, R., Finan, T.M., Raetz, C.R.H., López-Lara, I.M., and Geiger, O. (2010). Sinorhizobium Meliloti Phospholipase C Required for Lipid Remodeling During Phosphorus Limitation. PNAS *107*, 302–307.

Zhao, Y.H., Li, H.M., Qin, L.F., Wang, H.H., and Chen, G.-Q. (2007). Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in Aeromonas hydrophila reduces its survival ability under stress conditions. FEMS Microbiology Letters *276*, 34–41.

Zinn, M., Witholt, B., and Egli, T. (2004). Dual nutrient limited growth: models, experimental observations, and applications. J. Biotechnol. *113*, 263–279.

Zinn, M., Durner, R., Zinn, H., Ren, Q., Egli, T., and Witholt, B. (2011). Growth and accumulation dynamics of poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) in Pseudomonas putida GPo1 cultivated in continuous culture under transient feed conditions. Biotechnology Journal *6*, 1240–1252.

Annexes

Table des annexes

Annexe A : Estimation du taux de microorganismes producteurs lors des expérimentations fed-batch I

1. Estimation du taux de producteurs dans une boue activée I
2. Taux de producteurs initialement présents I
3. Enrichissement en microorganismes producteurs II

Annexe B : Evolution de la diversité microbienne au cours des expérimentations FB3 et FB4 V

Annexe C : Photographies des sélections microbiennes obtenues lors des expérimentations VII

Annexe D : Choix du modèle linéaire pour représenter la limitation de la croissance par le P_{in} X

Annexe E : Résultats des simulations sur AA + AB XII

Annexe F : Résultats des expérimentations sur AA + AB XIV

1. Zone de double limitation C&P XIV
2. Conversion du carbone : PHB et X_C XV
3. Degré de plasticité du P_{in} selon la source de carbone XVI

Annexe G : Diversité initiale de la boue activée XVII

Annexe H : Dynamique de sélection sous limitation carbone – Expérimentation A2 XVIII

Annexe I : Conséquences d'un changement de taux de dilution sur la dynamique de sélection XIX

ANNEXE A : ESTIMATION DU TAUX DE MICROORGANISMES PRODUCTEURS LORS DES EXPERIMENTATIONS FED-BATCH

1. Estimation du taux de producteurs dans une boue activée

En culture fed-batch, la diversité des populations notamment liée à la présence de microorganismes non producteurs biaise les paramètres cinétiques et stœchiométriques déterminés au cours des cultures. Une méthode est proposée pour estimer le pourcentage de producteurs initialement présent dans la boue activée. Pour cela, une hypothèse est faite : les microorganismes producteurs ont stocké 85% de PHB intracellulaire. A partir de là, la concentration en microorganismes producteurs peut être calculée de la manière suivante :

$$\frac{PHB}{PHB + Xc_{producteurs}} = 0{,}85 \;\rightarrow\; Xc_{producteurs} = 0{,}17 \times PHB \;\rightarrow\; \%producteurs = \frac{Xc_{producteurs}}{Xc_{total}} \times 100$$

2. Taux de producteurs initialement présents

Dans le cas de la culture FB3, la carence en phosphore initialement imposée a conduit à une croissance microbienne nulle et a un fort stockage de PHB comme le montre la Figure 61. Au-delà, une chute significative de la vitesse spécifique de production de PHB ainsi qu'une croissance microbienne est constatée. De ce fait, en estimant que les organismes producteurs ont stocké 85% de PHB à la fin de période de carence (10 h), il est possible d'estimer la quantité de producteurs au sein de cette boue activée initialement présent.

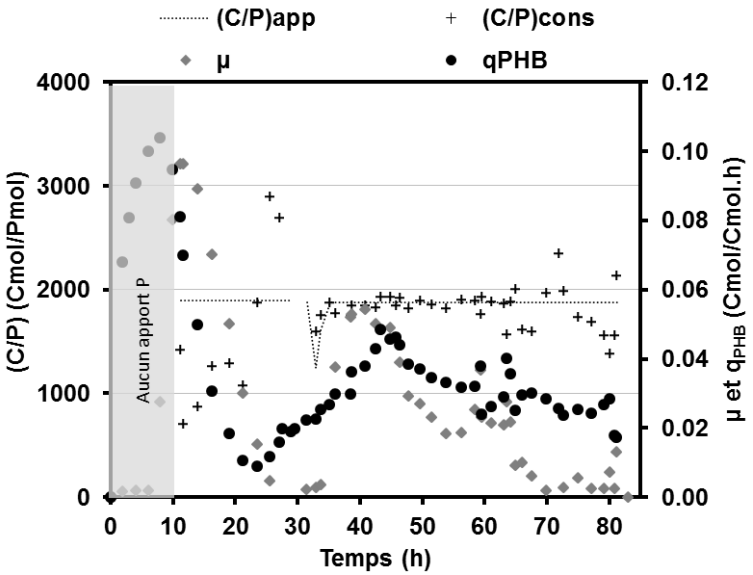

Figure 61 : Evolution des taux de croissance et des vitesses spécifiques de PHB au cours de la culture FB3

Ainsi le taux de producteurs présent initialement au sein de l'inoculum de la culture FB3 est estimé à 17%. D'après Oshiki et al. (2013), les auteurs ont estimé que le pourcentage de producteurs varie en moyenne entre 11 et 18% au sein d'une boue activée, ce qui est tout à fait en accord avec le pourcentage estimé dans la culture FB3.

Pour toutes les autres expérimentations menées en fed-batch, une croissance microbienne a eu lieu, et ce, malgré une carence en phosphore pour la culture FB4 (Figure 62).

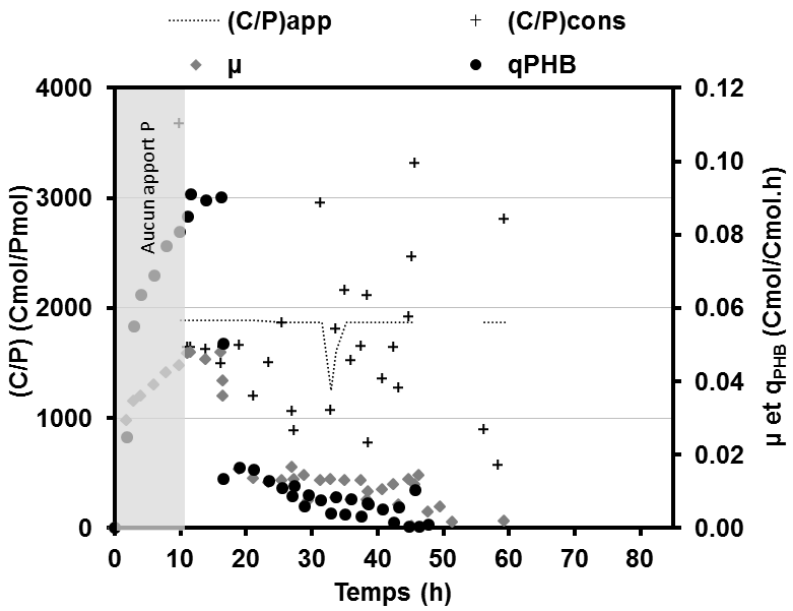

Figure 62 : Evolution des taux de croissance et des vitesses spécifiques de PHB au cours de la culture FB4

Dans ce cas, la croissance microbienne peut être celle soit des microorganismes non producteurs, des producteurs ou des deux. A partir de 16,5 h, la vitesse de production spécifique chute fortement laissant penser que les producteurs contiennent une grande quantité de PHB. Le calcul du taux de producteurs est de 15%, ce qui est dans la gamme d'estimation pour une boue activée. Au contraire, en ramenant la concentration de producteurs à la concentration initiale totale de microorganismes, un taux de producteurs initialement présent est estimé à 28%, ce qui est relativement élevé. Ainsi, la croissance microbienne ayant eu lieu provient soit des microorganismes producteurs soit à la fois des non producteurs et des producteurs.

3. Enrichissement en microorganismes producteurs

Après la première phase de la production de PHB (après environ 20 h), seule la communauté bactérienne de la culture FB3 a continué à produire du PHB jusqu'à la fin de la période d'incubation. Les populations bactériennes de cette culture semblaient faire face à une phase d'adaptation après 23 h d'incubation en augmentant la concentration et la teneur en PHB. Cela suggère qu'un enrichissement en

microorganismes producteurs de PHA s'est produit. Cette même remarque peut être faite pour les cultures FB1 et FB2, qui ont produit du PHB tout au long des expérimentations.

D'après les précédentes démonstrations, un taux de producteurs initialement présent dans la boue est estimé à 15%. Le Tableau 34 représente les temps choisis pour la détermination des taux de producteurs pour chaque culture, en vue d'estimer l'enrichissement en microorganismes producteurs au cours des cultures.

Tableau 34 : Choix des temps de cultures pour l'estimation du taux de producteurs présent

FB	Temps (h)	Figures
FB1	68	Figure 16A
FB2	57	Figure 16B
FB3	79	Figure 17A
FB4	50	Figure 17B

La Figure 63 montre les taux de producteurs estimés à différents temps de cultures pour les 4 expérimentations avec comme hypothèses un taux de producteur initial de 15% et un stockage intracellulaire de PHB de 85% dans les microorganismes producteurs.

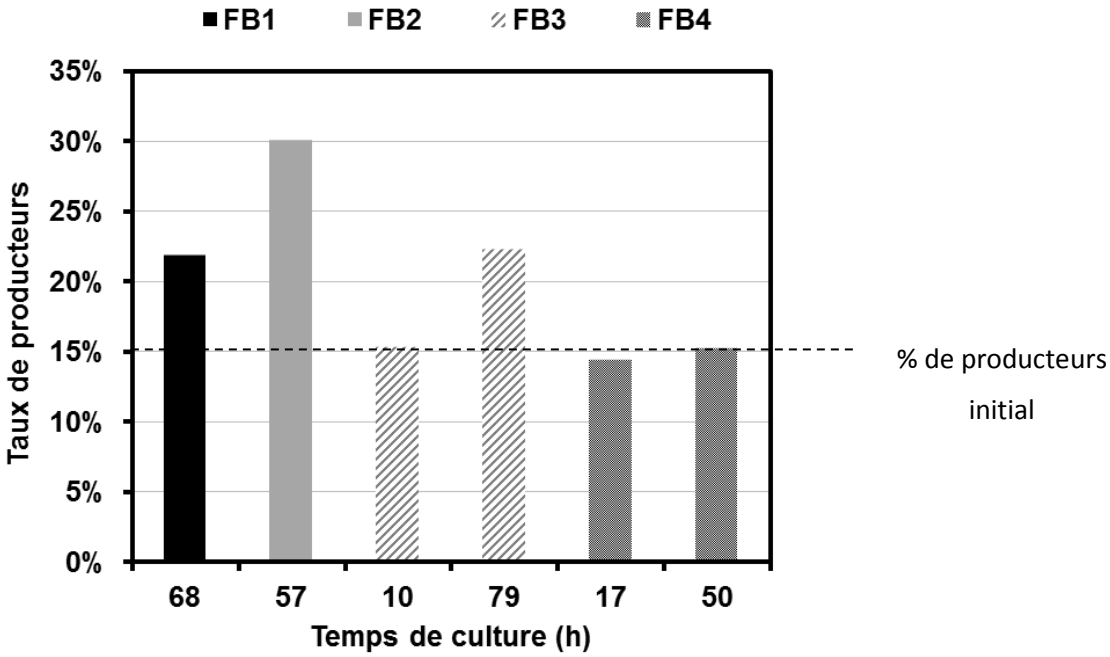

Figure 63 : Estimation du taux de producteurs selon le temps de cultures pour les expérimentations FB1, FB2, FB3 et FB4

Un enrichissement en microorganismes producteurs est mis en évidence sous les hypothèses posées pour les cultures FB1, FB2 et FB3. En ce qui concerne la culture FB4, aucun enrichissement n'est constaté au cours de la culture. La croissance ayant eu lieu dans cette expérimentation est donc à la fois celle des

producteurs et des non producteurs (facteur d'enrichissement 1). Un facteur d'enrichissement de 1,5 et 2 est observé pour les cultures FB1 et FB2 respectivement. Pour la culture FB3, comme décrit précédemment, pas d'enrichissement en producteurs n'est observé après 10 h de culture (carence en phosphore), ce qui est normal étant donné l'absence de croissance cellulaire pendant cette période. Un enrichissement d'un facteur 1,5 est constaté sur l'ensemble de la culture.

Les cultures fed-batch menées sous limitation phosphore mêlent à la fois production de PHA et croissance microbienne des organismes producteurs si la conduite en terme de degré de limitation phosphore le permet.

ANNEXE B : EVOLUTION DE LA DIVERSITE MICROBIENNE AU COURS DES EXPERIMENTATIONS FB3 ET FB4

Pour mieux connaître la diversité des populations bactériennes actives et sa dynamique sur la production de PHB opérée en réacteur fed-batch, la diversité des bactéries métaboliquement actives des expérimentations FB3 et FB4 est étudiée. Cette dernière repose sur l'analyse des transcrits pyroséquençage ARNr 16S à différents temps de la culture (et non de l'ADN 16S, comme les expérimentations en chémostat). L'abondance relative des bactéries métaboliquement active détectée est représentée sur la Figure 64. Les genres qui représentent moins de 4% des séquences totales, ont été regroupés sous l'appellation « autres ». Les conditions d'échantillonnage mises en place lors des expérimentations FB1 et FB2, n'ont pas permis d'étudier la diversité microbienne au cours des cultures.

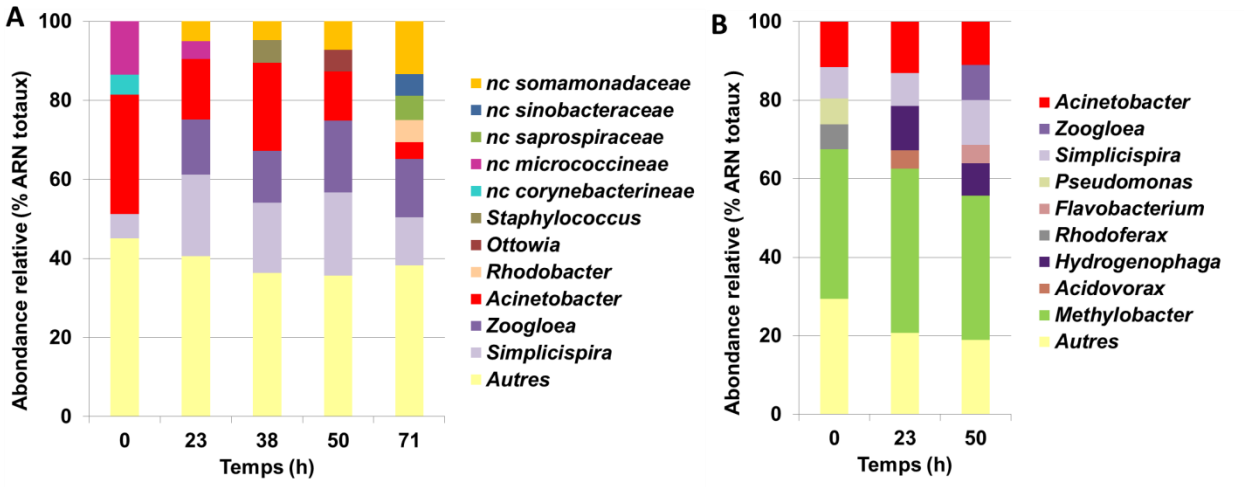

Figure 64 : Evolution des populations actives au cours du temps des cultures FB3 (A) et FB4 (B). La catégorie « autres » regroupe toutes les populations minoritaires dont les OTUs sont inférieurs à 4% des OTUs totaux.

Les populations microbiennes appartenant aux genres *Acinetobacter*, *Zoogloea* et *Simplicispira* ont été présentes activement au cours de ces deux cultures. Bien que moins de 40% des bactéries métaboliquement actives soient communes dans les deux expériences, des teneurs élevées en PHB ont été rapidement atteintes dans les deux cas (plus de 45% après 23 h de temps de culture). Ainsi, la présence et la participation des microorganismes producteurs de PHA est une évidence dans ce procédé.

Une diversité plus réduite est présente dans la culture FB4, comparée à la culture FB3, avec neuf genres bactériens majeurs (avec une abondance relative de l'ARNr 16S supérieure à 4%). Parmi ces genres, une forte activité métabolique des populations du genre *Methylobacter* (40% en moyenne) a été observée. Aucune évolution significative de la diversité des populations actives n'a été observée dans le cas de la culture FB4. En revanche, la diversité des genres métaboliquement actifs présents dans la culture FB3 a

montré de fortes variations au cours de la période de culture. Au début de la culture, l'abondance relative des ARNr 16S transcrits des populations du genre *Acinetobacter* était de 30%. Par la suite, son abondance relative a chuté à environ 4%, tandis que la proportion des ARNr 16S appartenant aux populations mineures, d'abord trouvé à 4% ou moins, a augmenté à 5-18% (par exemple *Zoogloea*, *Simplicispira*). Tous ces genres sont connus pour être des producteurs de PHA (Koller et al., 2010). De plus, les populations du genre *Zoogloea*, *Acidovorax*, ont été sélectionnées au cours des expérimentations en chémostat et ont montré des forts potentiels de production de PHA, ce qui suggère qu'ils sont impliqués dans la production de PHA au cours de ces expérimentations en fed-batch.

Un enrichissement en microorganismes producteurs est mis en évidence par les résultats obtenus au cours des réacteurs fed-batch par la limitation phosphore mais n’est pas aussi fort que lors des expérimentations en chémostat. L’effet du taux de dilution montre non seulement un enrichissement spécifique mais aussi une forte sélection microbienne par le lessivage des populations non performantes.

ANNEXE C : PHOTOGRAPHIES DES SELECTIONS MICROBIENNES OBTENUES LORS DES EXPERIMENTATIONS

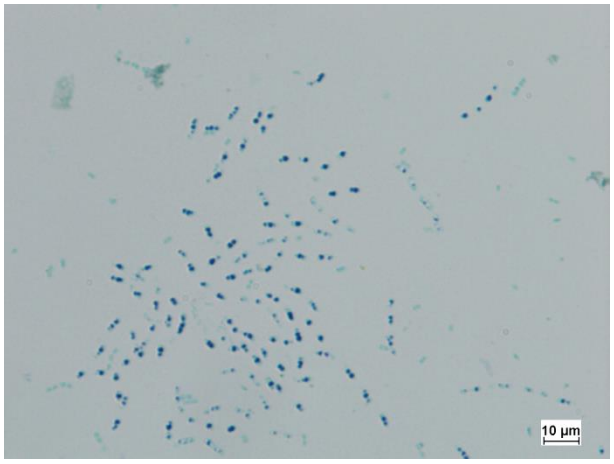

Figure 65 : Photographies d'observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif (x100) après coloration spécifique de Neisser après 5 temps de séjour pour l'expérimentation A2. Les granules phosphore apparaissent en bleu.

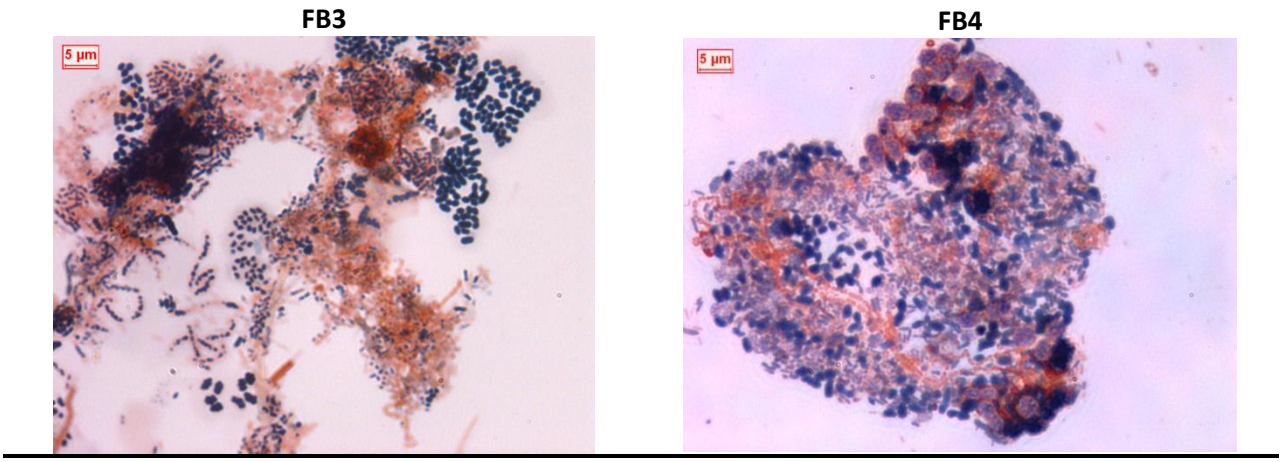

Figure 66 : Photographies d'observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif (x100) après coloration spécifique au noir de Soudan pour les expérimentations FB3 et FB4 (30 h)

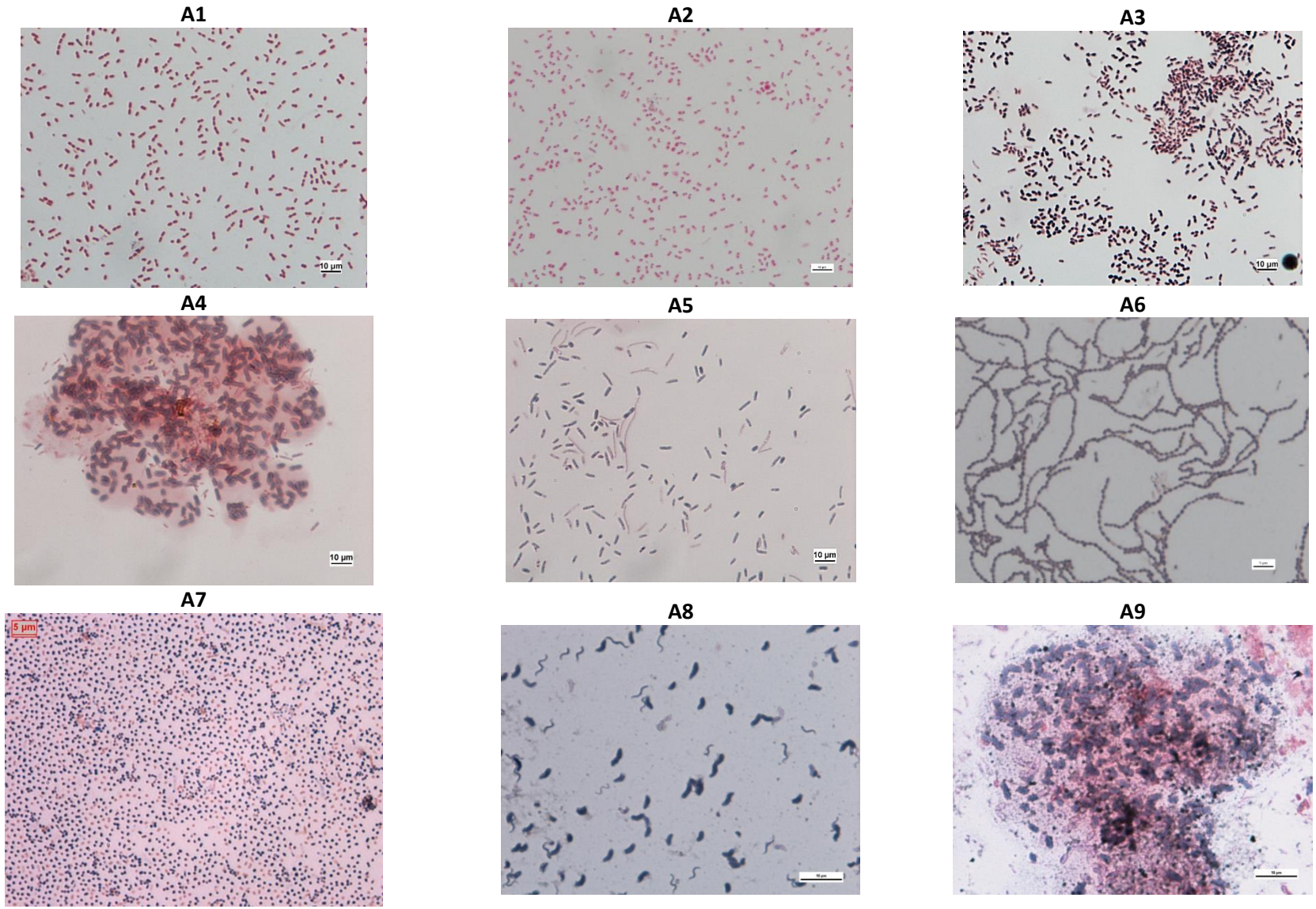

Figure 67 : Photographies d'observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif (x100) après coloration spécifique au noir de Soudant des sélections microbiennes finales pour les expérimentations menées sous AA

Document confidentiel

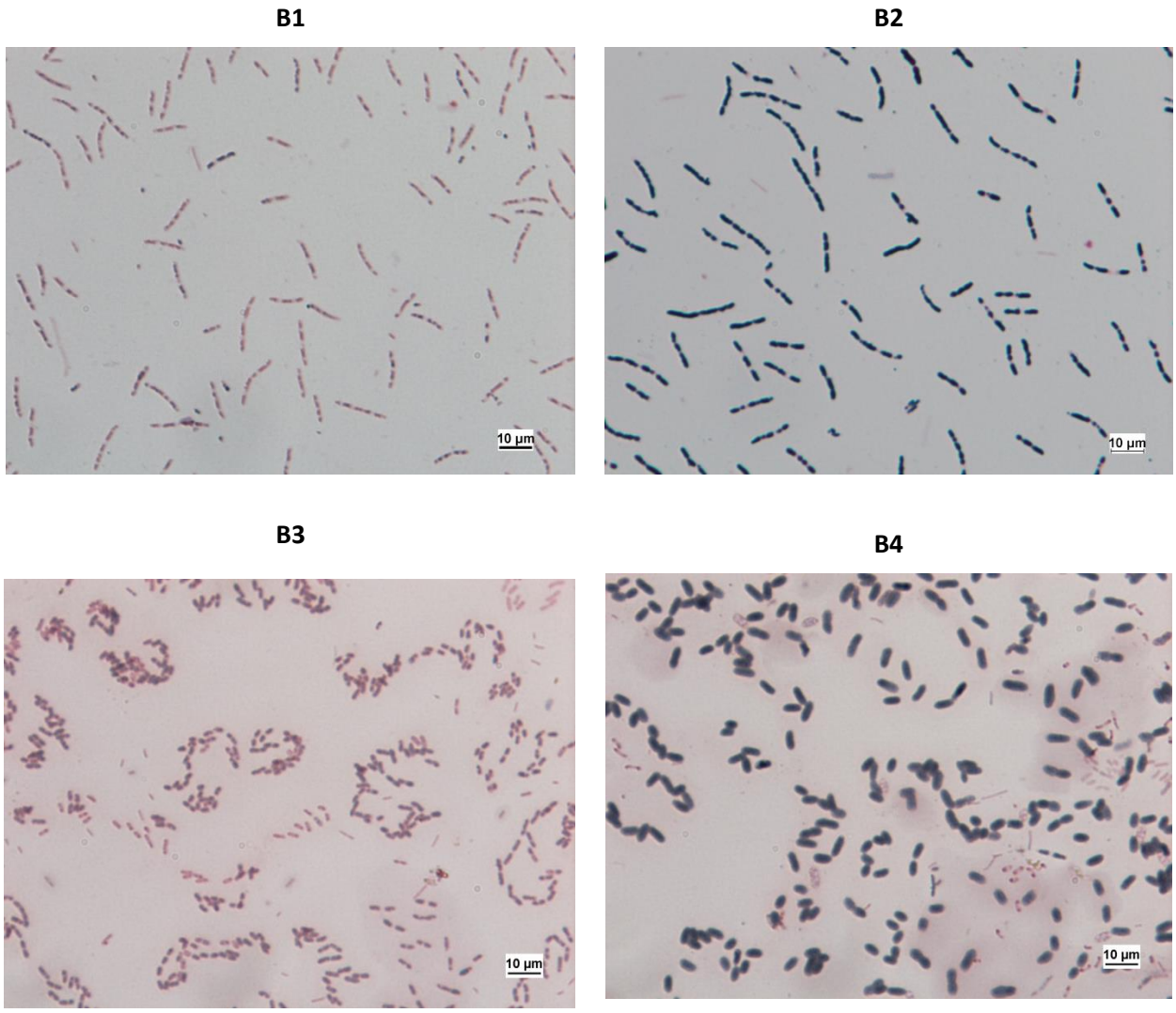

Figure 68 : Photographies d'observations microscopiques sous immersion d'huile à l'objectif (x100) après coloration spécifique au noir de Soudan des sélections microbiennes finales pour les expérimentations menées sous co-substrats AA+ AB

Lors de la coloration au noir de soudan, une contre-coloration est réalisée par la safranine, qui colore spécifiquement les composés glucidiques. C'est pourquoi l'hypothèse de production de composés extracellulaires polysaccharidiques est supposée selon les observations microscopiques.

ANNEXE D : CHOIX DU MODELE LINEAIRE POUR REPRESENTER LA LIMITATION DE LA CROISSANCE PAR LE P_{IN}

Les résultats expérimentaux obtenus avec une population sélectionnée faiblement productrice de PHA (*Acinetobacter*) sont confrontés aux deux modèles linéaires et non linéaires (Droop). Ainsi, la Figure 69 représente l'évolution des résultats expérimentaux et simulés de X_C (A), P_{in} (B) et µ (C) en fonction du temps (batch A2a). Les paramètres cinétiques choisis pour les simulations sont représentés dans le Tableau 35.

Tableau 35 : Paramètres pris en compte pour la comparaison du modèle linéaire et non linéaire

Paramètres	Valeurs	Références
P_{in_exp}	0,038 gP/gXc	
P_{in_crit}	0,004 gP/gXc	
μ_{max}	0,5 h^{-1}	Hao et Chang,1987

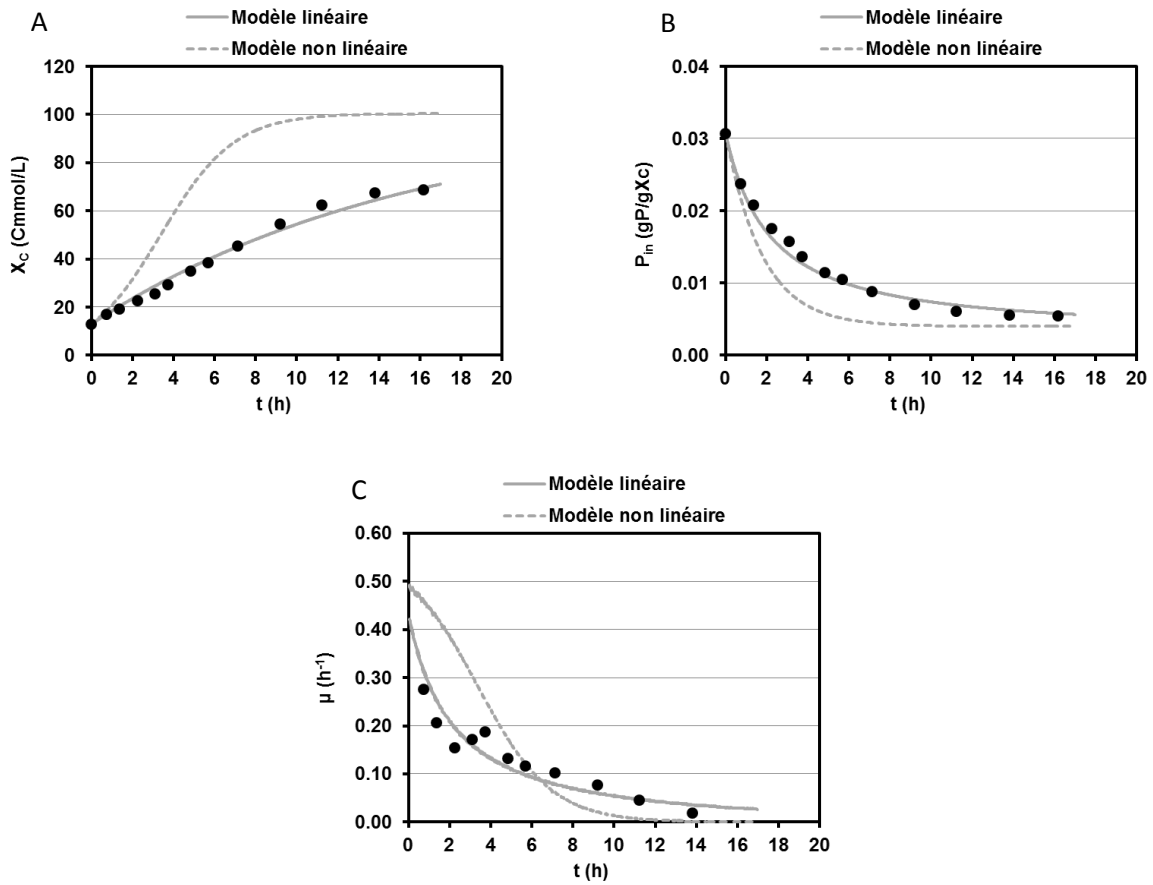

Figure 69 : Evolution des résultats expérimentaux (points) et simulés (traits) de X_C (A), P_{in} (B) et µ (C) en fonction du temps pour le batch A2a avec le modèle linéaire et non linéaire

La formulation linéaire est clairement plus en adéquation que la formulation de Droop pour représenter la limitation de la croissance par le P_{in} en condition de carence en phosphore. En calant avec le modèle non linéaire, la valeur du μ_{max} déterminée est de 0,26 h^{-1}. Sachant que cette souche est capable de se maintenir dans un chémostat à un taux de dilution de 0,31 h^{-1} (d'autant plus sous limitation phosphore), son taux de croissance maximal est donc logiquement supérieur à 0,31 h^{-1}.

Il ressort donc clairement que le modèle linéaire permet de prédire au mieux la limitation de la croissance par le taux de phosphore intracellulaire à partir des observations expérimentales de ce batch. C'est pour ces raisons que ce modèle est choisi pour représenter la limitation de la croissance par le taux de phosphore intracellulaire dans ce travail.

ANNEXE E : RESULTATS DES SIMULATIONS SUR AA + AB

« Malikia »	*« Zoogloea »*

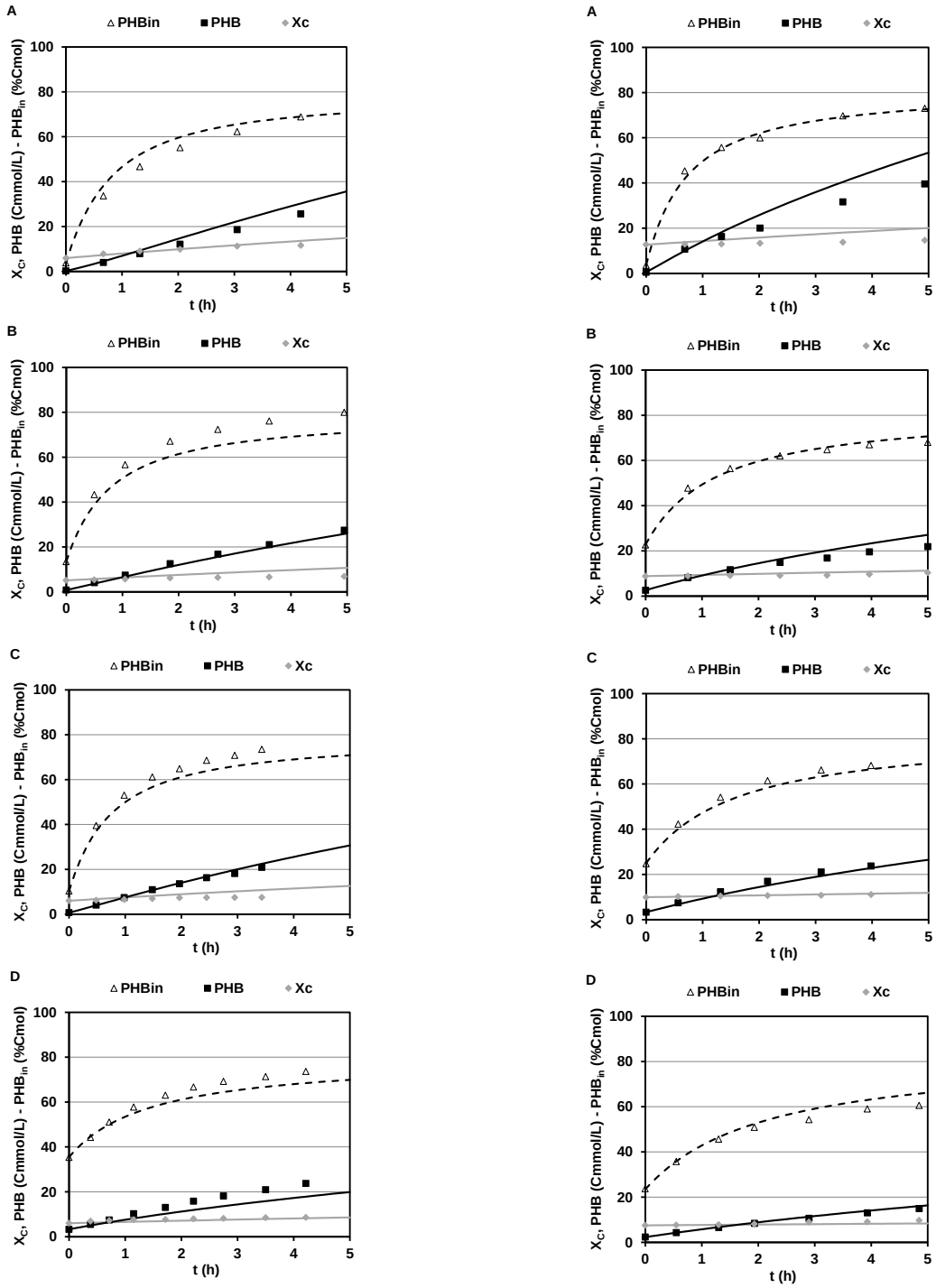

Figure 70 : Evolution des résultats expérimentaux et simulés de la concentration en X_C et PHB et de PHB_{in} au en batch : Avec la catégorie « *Malikia* » (B1b (A), B2a (B), B2b (C) et B2c (D)) ; Avec la catégorie « *Zoogloea* » (B3a (A), B3b (B), B3c (C) et B4b (D)). Symboles = expérimentation ; Trait continu = simulation.

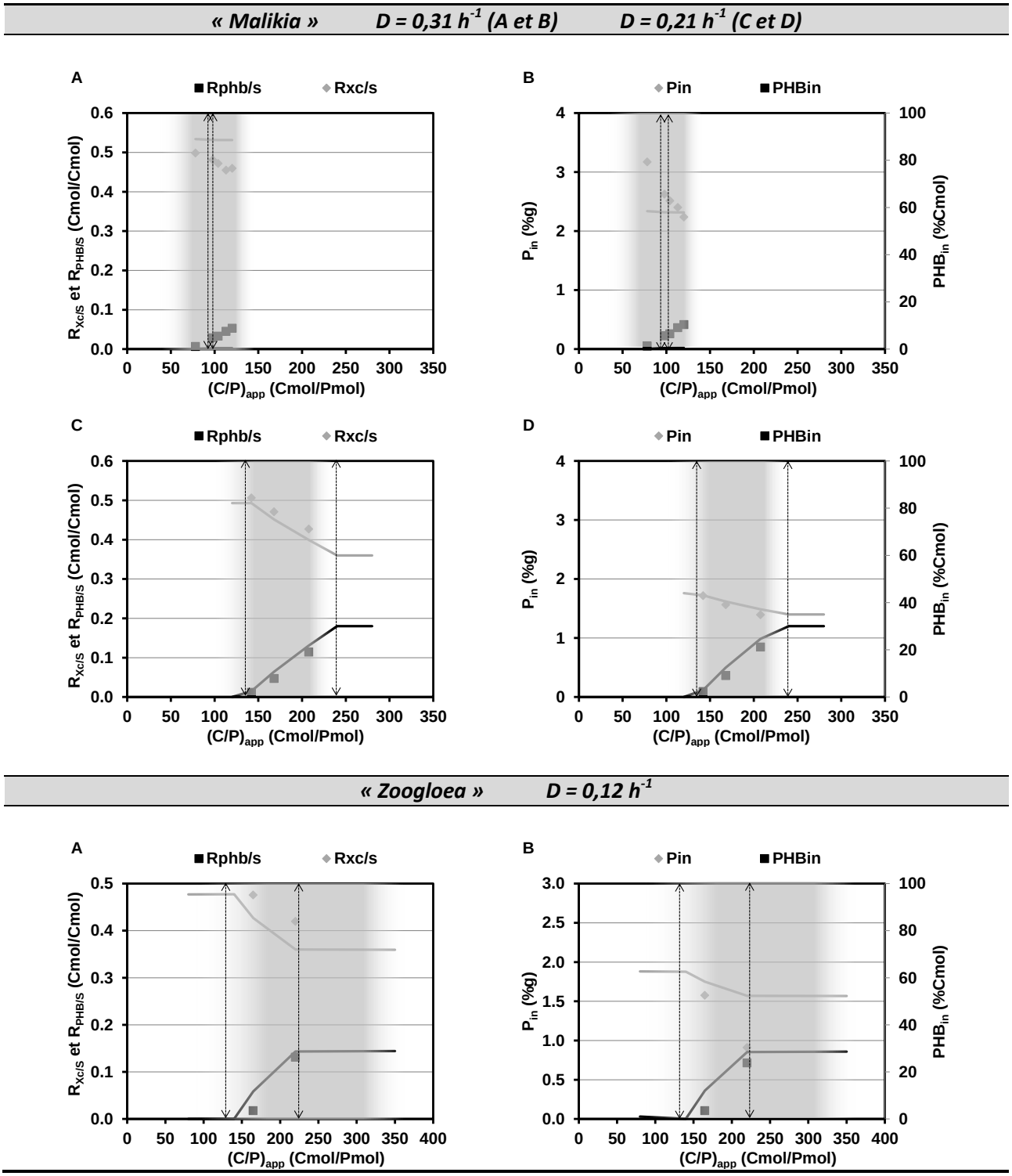

Figure 71 : Evolution des rendements observés (A et C) et des taux de phosphore et PHB intracellulaires (B et D) en fonction du degré de limitation appliqué pour chaque catégorie de populations. La zone grise représente la zone observée expérimentalement de double limitation C&P ; les traits en pointillé représentent les limites de la zone de double limitation C&P simulée avec le modèle. Symboles = expérimentation ; Trait continu = simulation.

ANNEXE F : RESULTATS DES EXPERIMENTATIONS SUR AA + AB

1. Zone de double limitation C&P

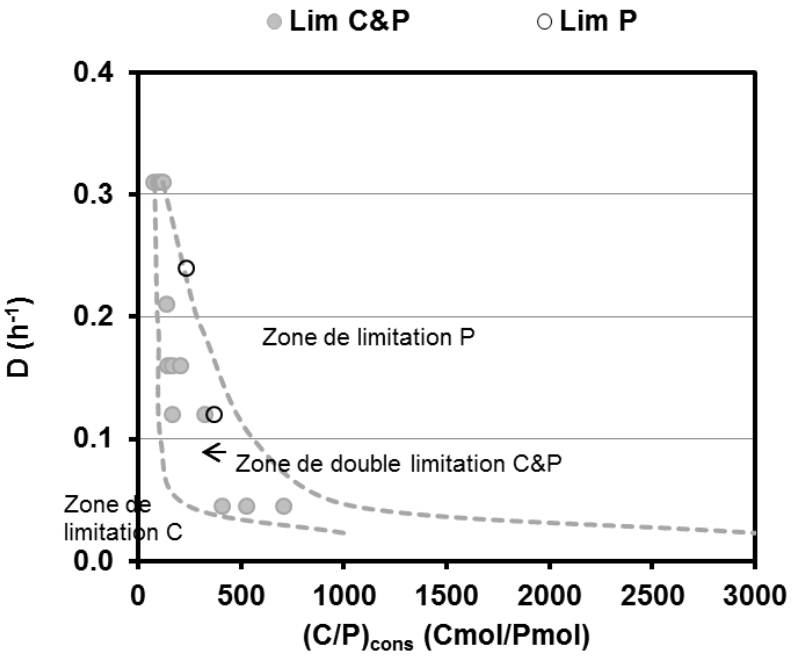

Figure 72 : Résultats des régimes stables obtenus sur le mélange AA + AB sous limitation C&P et sous limitation P uniquement. A titre de comparaison, les traits en gris représentent les frontières de la zone de DLN déterminée à partir des résultats expérimentaux sur AA

Les régimes stables sous double limitation avec AB sont majoritairement obtenus dans la zone de DLN déterminée à partir de l'AA. Cependant, à D imposé de 0,24 h^{-1}, le ratio $(C/P)_{app}$ de 237 Cmol/Pmol a conduit à une rapide accumulation de substrat carboné. A un D plus faible de 0,12 h^{-1}, le ratio $(C/P)_{app}$ de 370 Cmol/Pmol a conduit à une accumulation de substrat carboné permettant de recalculer la frontière de la zone de DLN à 358 Cmol/Pmol, inférieure à celle estimée sur AA. La zone de DNL semble donc plus étroite lorsque le butyrate est présent dans l'alimentation.

En accord avec la littérature, Zinn (2004) établit que le degré d'oxydation du substrat détermine le positionnement de la zone sur ce graphique. Il serait d'autant décaler vers la droite que le substrat serait oxydé. En effet le butyrate correspond à 1,82 gDCO/g alors que l'AA à 1,067 gDCO/g.

2. Conversion du carbone : PHB et X_C

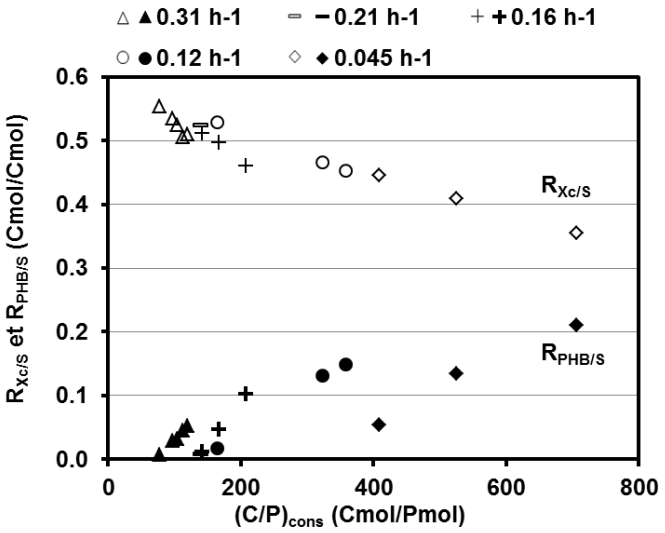

Figure 73 : Rendements observés en biomasse catalytique et PHB en fonction du degré de limitation phosphore imposé selon le carbone lorsque S = AA + AB

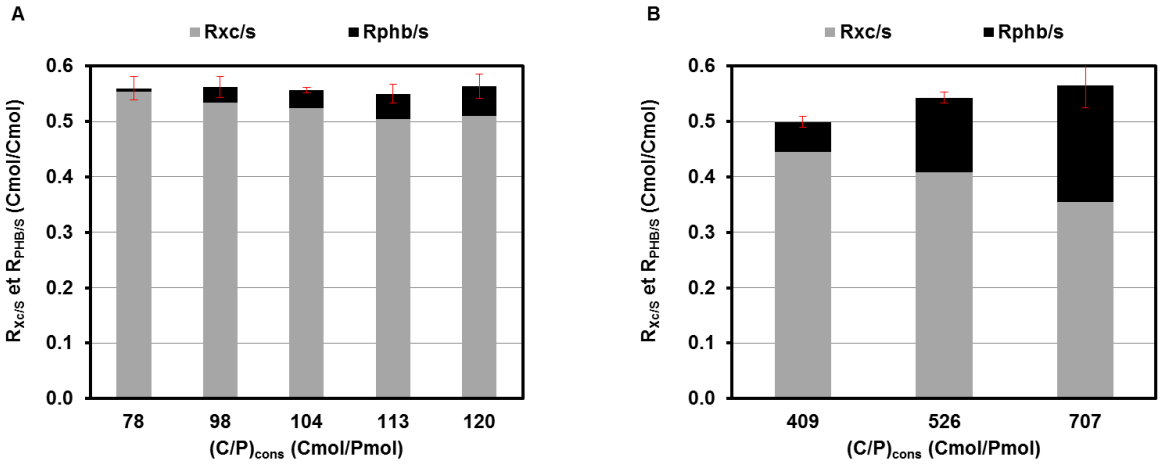

Figure 74 : Rendements observés en biomasse catalytique et PHB en fonction du degré de limitation phosphore imposé selon le carbone lorsque S = AA + AB

En comparant avec les résultats obtenus sur AA comme unique source de carbone, ces deux graphiques montrent :

- Les mêmes distributions du devenir du carbone vers le stockage de PHB au détriment de la biomasse catalytique avec l'augmentation du degré de limitation en phosphore
- De manière plus forte, l'amélioration des rendements observés (X_C+PHB) avec l'augmentation du degré de limitation en phosphore.

3. Degré de plasticité du P_{in} selon la source de carbone

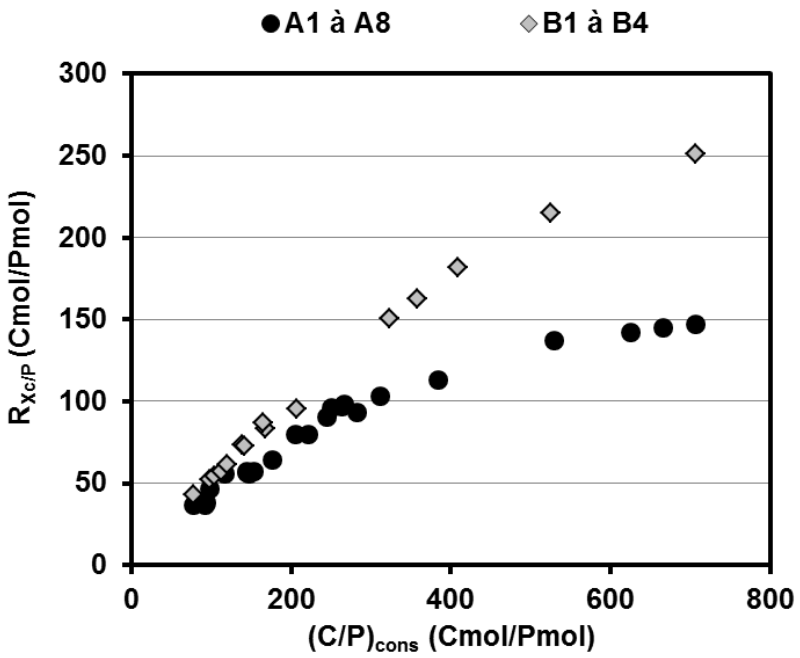

Figure 75 : Evolution des rendements $R_{Xc/P}$ selon le degré de limitation phosphore imposé pour les régimes permanents obtenus avec AA et avec AA+AB

Ce graphique montre une dilution du phosphore intracellulaire supérieure, pour un même niveau de limitation en phosphore, en présence de butyrate dans l'alimentation.

ANNEXE G : DIVERSITE INITIALE DE LA BOUE ACTIVEE

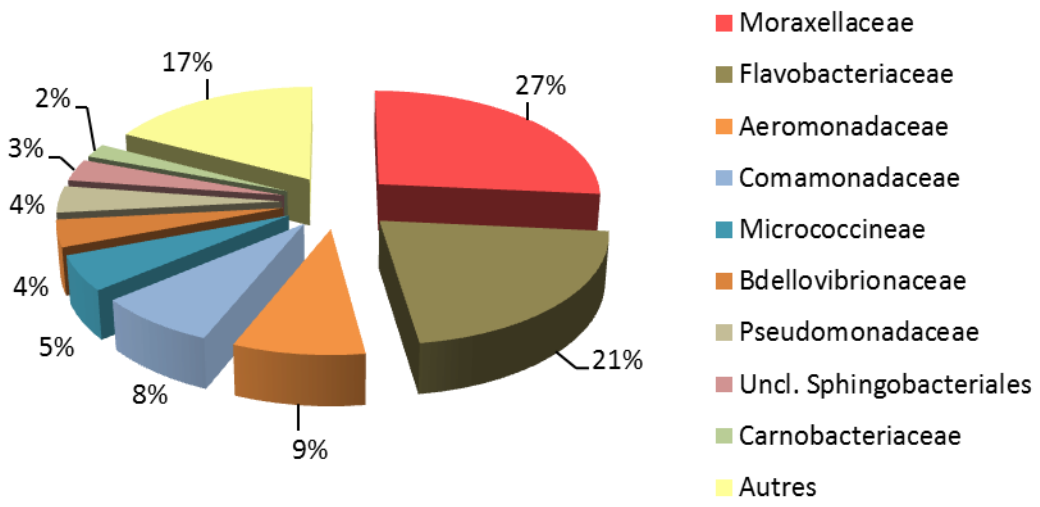

Figure 76 : Diversité initiale de la boue activée (OTUs regroupés en familles). Le groupe nommé « Autres » représente les populations minoritaires dans la communauté microbienne totale (OTUs < 2%).

ANNEXE H : DYNAMIQUE DE SELECTION SOUS LIMITATION CARBONE – EXPERIMENTATION A2

La Figure 77 représente l'évolution de la dynamique des populations au cours de l'expérience A2, menée sous acide acétique et limitation carbone uniquement à un D = 0,21 h^{-1}.

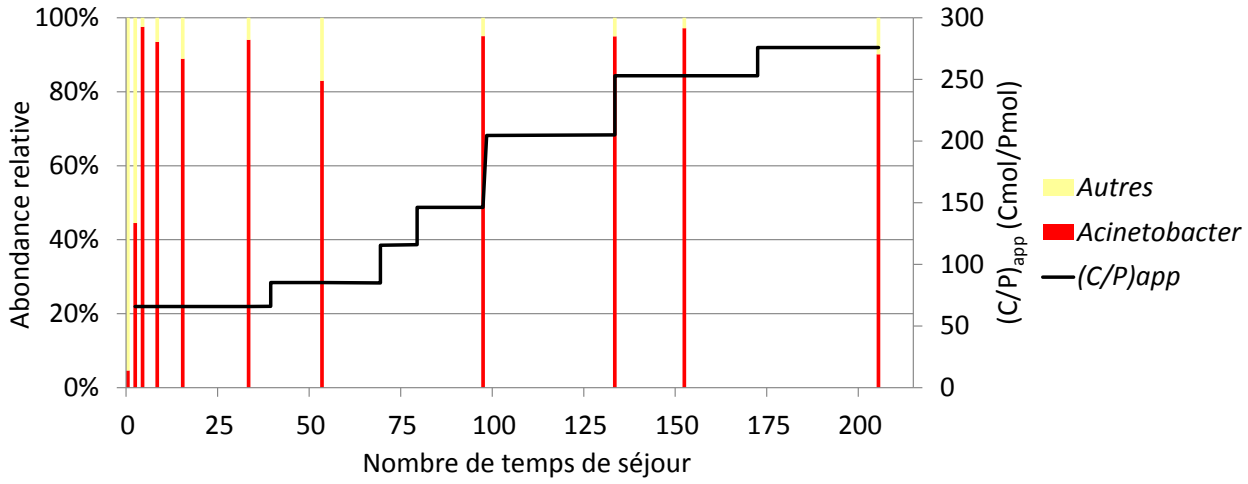

Figure 77 : Evolution de la dynamique des populations selon le nombre de temps de séjour au cours de l'expérience A2 : conditions initiales de sélection sous limitation carbone uniquement et à un D = 0,21 h^{-1}. La catégorie « autres » regroupe toutes les populations minoritaires.

Une dynamique forte de populations du genre *Acinetobacter* est observée dès le lancement de l'expérimentation, correspondant à une condition de non limitation phosphore. Ce genre de population, rapidement implantée, s'est maintenu tout au long de l'expérimentation en dépit de l'augmentation progressive du degré de la limitation en phosphore. Ce comportement appuie l'effet de la source de carbone (Acide acétique) sur la sélection de populations du genre *Acinetobacter*.

Document confidentiel

ANNEXE I : CONSEQUENCES D'UN CHANGEMENT DE TAUX DE DILUTION SUR LA DYNAMIQUE DE SELECTION

La Figure 78 représente l'évolution de la dynamique des populations au cours des expériences A3 et B2 à partir du 90ème temps de séjours, menées avec l'acide acétique uniquement et avec le mélange acide acétique/butyrique, respectivement. Un changement du taux de dilution (de 0,16 à 0,12 h^{-1}) a été effectué au 118ème temps de séjour pour les deux expérimentations.

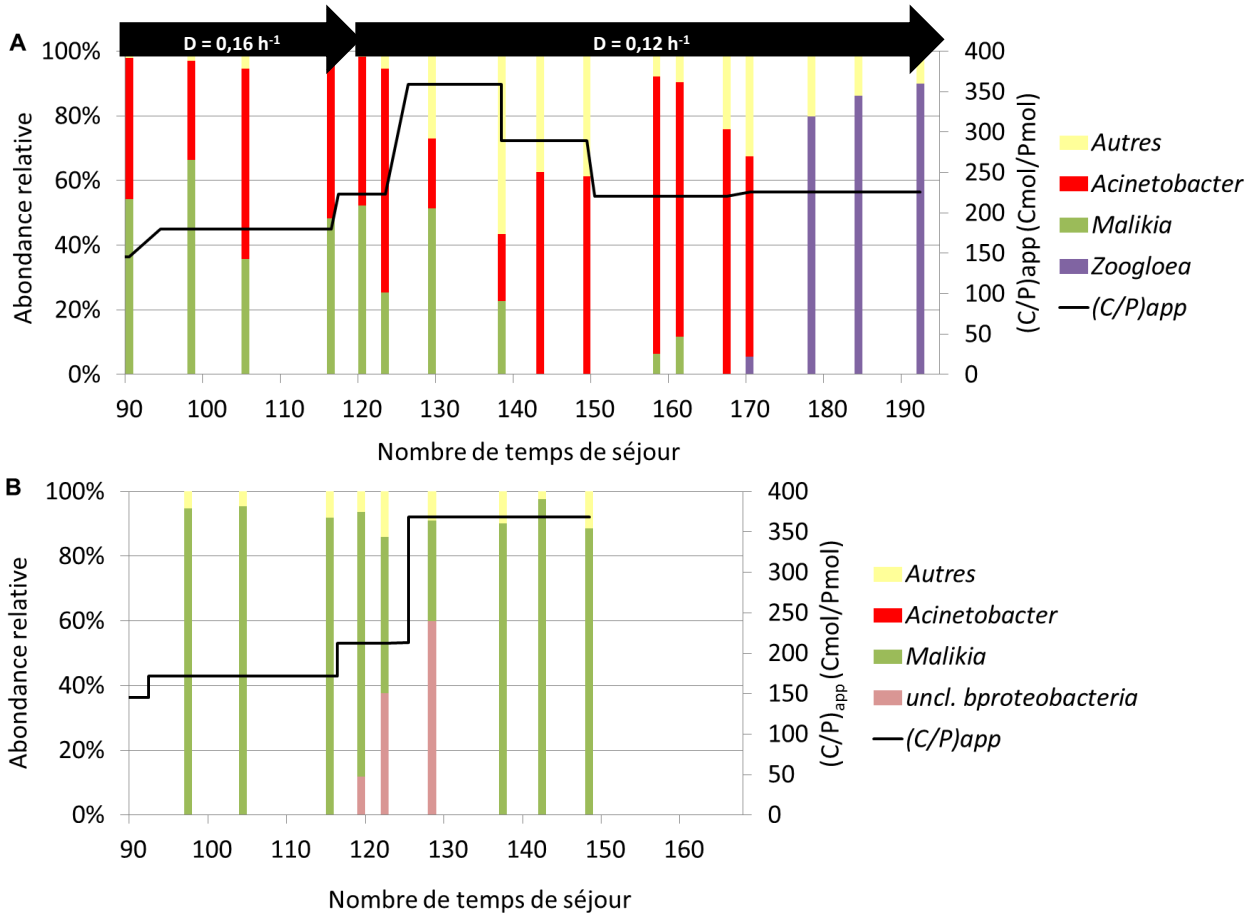

Figure 78 : Evolution de la dynamique des populations selon le nombre de temps de séjour au cours des expériences A3 (A) et B2 (B). Un changement de dilution de 0,16 à 0,12 h^{-1} a été effectué au 118ème temps de séjour. La catégorie « autres » regroupe toutes les populations minoritaires.

Sur AA, la population du genre *Malikia* a été lessivée progressivement (en 40 temps de séjour). Une dynamique des populations a été observée, avec :

- l'augmentation de la proportion des populations minoritaires représentant plus de 50% de la communauté totale une dizaine temps de séjour après la diminution du taux de dilution,
- la croissance et le maintien de la population du genre *Acinetobacter* et enfin,
- l'implantation significative de la population du genre *Zoogloea* (représentant plus de 80% de la communauté totale) au 180ème temps de séjour.

Sur le mélange AA et AB, la population du genre *Malikia* s'est maintenue après une dynamique des populations observée par la croissance d'une population (de la classe des β-proteobacteria) dès la diminution du taux de dilution, et ce, pendant 15 temps de séjour.