



**HAL**  
open science

# Couplage de la fermentation sombre et de la culture de microalgues : facteurs d'inhibition sur la croissance mixotrophe et réponses métaboliques au butyrate

Julien Lacroux

## ► To cite this version:

Julien Lacroux. Couplage de la fermentation sombre et de la culture de microalgues : facteurs d'inhibition sur la croissance mixotrophe et réponses métaboliques au butyrate. Biotechnologies. Montpellier SupAgro, 2021. Français. NNT : 2021NSAM0028 . tel-04000058

**HAL Id: tel-04000058**

**<https://theses.hal.science/tel-04000058v1>**

Submitted on 22 Feb 2023

**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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Biotechnologie et Microbiologie

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau  
Portée par

Unité de recherche Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE, INRAE, UR050)

## COUPLAGE DE LA FERMENTATION SOMBRE ET DE LA CULTURE DE MICROALGUES : FACTEURS D'INHIBITION SUR LA CROISSANCE MIXOTROPHE ET REPONSES METABOLIQUES AU BUTYRATE

Présentée par Julien LACROUX

Le 22 octobre 2021

Sous la direction de Jean-Philippe STEYER

Devant le jury composé de

Carole JOUVE, Professeur des Universités, INSA Toulouse

Yonghua LI-BEISSON, Directrice de recherche, CEA Cadarache

Jack LEGRAND, Professeur émérite, GEPEA Nantes

Maeva SUBILEAU, Maître de conférence, Montpellier SupAgro

Jean-François SASSI, Ingénieur-Chercheur, Expert International, CEA Cadarache

Jean-Philippe STEYER, Directeur de recherche, INRAE Narbonne

Robert van LIS, Chargé de recherche, INRAE Narbonne

Eric TRABLY, Directeur de recherche, INRAE Narbonne

Présidente du jury

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

Co-encadrant de thèse

Co-encadrant de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER





---

## Résumé

---

La fermentation sombre combine le traitement de déchets organiques avec la production d'hydrogène. Le processus conduit à la co-production d'un effluent liquide riche en molécules organiques, telles que l'acétate et le butyrate. Ces molécules représentent des opportunités pour la bioéconomie notamment en tant que substrats de faibles coûts pour la culture de divers micro-organismes, comme celle des microalgues. En effet, l'acétate est un substrat organique simple facilement assimilable par ces espèces. En revanche, l'inhibition par les substrats et la consommation lente du butyrate restreignent l'utilisation de ces substrats à de faibles concentrations. Les objectifs de ces travaux de thèse ont donc été de déterminer les causes d'inhibition afin d'évaluer le potentiel de production de microalgues sur des effluents de FS. A cet effet, l'effet de différents paramètres abiotiques sur la croissance mixotrophe des microalgues a été étudié. L'inhibition de la croissance est principalement due aux formes non dissociées des acides. Si les inhibitions peuvent être levées par le contrôle de certains paramètres-clé comme le pH ou la concentration, la dégradation du butyrate par *Chlorella sorokiniana* reste dix fois plus faible que celle de l'acétate. Une exploration de la diversité microalgale a par la suite confirmé que seules quelques espèces pouvaient assimiler le butyrate efficacement. Parmi celles-ci, la souche purement hétérotrophe *Polytomella sp.* a présenté un taux de croissance cinq fois plus élevé que les autres espèces. La souche a donc servi d'organisme modèle pour des études métaboliques complémentaires : son métabolisme du butyrate a été élucidé grâce à des approches protéomiques. L'espèce assimile le butyrate par voie de  $\beta$ -oxydation dans le péroxysome et surexprime certaines protéines impliquées dans la résistance au stress oxydatif.

**Mots-clés :** Acétate, butyrate, fermentation sombre, inhibition, microalgues, mixotrophie

---

## Abstract

---

Dark fermentation is a biological process combining organic waste treatment with the production of hydrogen. The process also leads to the coproduction of a liquid organic rich effluent, mainly composed of acetate and butyrate. These molecules represent opportunities for the bioeconomy as cheap substrates for the cultivation of various micro-organisms such as microalgae. Acetate is indeed a simple organic substrate, easily consumable by these species. Their use is however restricted by the slow consumption of butyrate and substrates inhibition at concentrations usually lower than those found in fermentation effluents. The goals of this PhD thesis were thus to determine the causes of this inhibition in order to evaluate the production potential of microalgae on DF effluents. To meet these goals, the effect of various abiotic parameters on mixotrophic microalgae growth was assessed. Growth inhibition is mainly due to an excess of undissociated acid concentration. If inhibitions can be alleviated by controlling key factors such as pH or concentration, butyrate degradation by *Chlorella sorokiniana* remains ten times lower than that of acetate. Exploration of microalgal diversity confirmed that only few species can assimilate butyrate efficiently. Among them, the purely heterotrophic strain *Polytomella sp.* was found to be the fastest, displaying a growth rate on butyrate five times higher than other species. This strain served thus as a model organism for further metabolic studies: its butyrate metabolism was elucidated thanks to proteomics approach. The species assimilates butyrate thanks to  $\beta$ -oxidation in the peroxisome and overexpress proteins involved in the general oxidative stress response.

**Keywords:** Acetate, butyrate, dark fermentation, inhibition, microalgae, mixotrophy

*« Ne jamais se croire arrivé,  
Ne jamais cesser de faire des branches,  
Qui elles-mêmes produiront de minuscules rameaux. »*

Mona Chollet - 2004

# Remerciements

Je remercie en premier lieu les membres du jury, qui ont bien voulu consacrer une partie de leur temps à l'évaluation de ces travaux. Merci à Jack Legrand et Yonghua Li-Beisson pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit. J'espère que la lecture de ces travaux leur sera agréable et inspirante. Merci à Carole Jouve et Jean-François Sassi d'avoir accepté de participer au jury d'évaluation. Je remercie Maëva Subileau pour les mêmes raisons et d'autant plus pour m'avoir accompagné pendant ces trois années de thèse en tant que membre du comité de suivi.

Je remercie chaleureusement l'ensemble de mes encadrants scientifiques, en particulier Jean-Philippe Steyer et Robert van Lis pour avoir partagé avec moi leur vision de la science et m'avoir fait confiance pendant ces trois années. Je vous remercie pour votre disponibilité sans faille, votre écoute et les discussions enrichissantes concernant bien d'autres sujets que la seule science. Un grand merci à Eric Trably pour son implication dans l'encadrement de thèse, ses conseils sur la fermentation et ses relectures toujours constructives. Merci à Nicolas Bernet pour son temps consacré à la relecture de manuscrits malgré son emploi du temps chargé de Directeur d'unité. Finalement, bien qu'elle n'ait pas participé directement à l'encadrement, je remercie Ariane Atteia, chargée de recherche à l'UMR Marbec, pour son aide dans l'identification des isolats et dans l'analyse protéomique.

Je remercie l'ensemble du collectif du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement pour ces quatre années. Outre le niveau scientifique du Laboratoire, ce sont bien la sympathie, la bienveillance et la bonne humeur de l'ensemble du personnel qui ont donné au stagiaire que j'étais l'envie d'y effectuer une thèse. En particulier, merci à merci à Jordan Seira pour ton encadrement pendant mon stage et pour ton aide, ta disponibilité pendant ces trois ans de thèse et plus généralement ta sympathie. Merci également Anaïs pour ton aide dans toutes les analyses microbiologiques et surtout pour ta bonne humeur constante. Merci pour tous ces moments de franche rigolade !

Un très grand merci à Pierre et Margot, pour la quantité (et qualité !) de leur travail ainsi que leur implication, à toutes les étapes du stage et même par la suite. A big thanks to Mercedes for her support during the last months before the submission. Your advices helped me a lot, and your management of the lab was unvaluable during the redaction. My biggest thanks go to

Francesca : I can't thank you enough for your support during the first year and beyond, and above all for your sincere friendship.

Merci à tous les collègues et amis qui ont partagé tout ou partie de ces trois ans, à l'occasion de sorties sportives tôt le matin à courir ou de sorties beaucoup moins sportives tard le soir à jouer, danser et chanter. Merci à tous pour votre amitié.

Je remercie ma famille pour m'avoir donné l'opportunité de poursuivre mes études afin d'arriver à ce niveau et pour leur soutien constant.

Enfin, merci Romain pour ton écoute, ta patience, ta présence au quotidien et tout ce que tu m'apportes.

# Table des matières

Résumé .....	4
Abstract.....	4
Remerciements .....	6
Table des matières .....	8
Liste des figures.....	11
Liste des tableaux .....	13
Introduction.....	15
Chapitre 1.....	20
Revue de littérature.....	20
1.1. Microbiologie et voies métaboliques engagées .....	21
1.2. Paramètres opératoires affectant la fermentation sombre.....	27
2.1. Composition des effluents de fermentation sombre .....	31
2.1. Intégration de la fermentation sombre dans la bioraffinerie environnementale 35	
3.1. Qu'est-ce qu'une microalgue ?.....	40
3.2. Application et utilisations des microalgues .....	41
3.3. Modes trophiques et métabolismes du carbone .....	43
4.1. Influence des substrats carbonés.....	48
4.2. Influence des nutriments minéraux : azote et phosphore .....	51
4.3. Effet de la lumière et du CO <sub>2</sub> : interactions entre autotrophie et hétérotrophie 52	
4.4. Influence du pH .....	54
Chapitre 2.....	58
Matériel et méthodes.....	58
2.1. Souches étudiées.....	61



2.2.	Milieux de culture.....	61
2.3.	Conditions de culture.....	66
3.1.	Evaporation.....	67
3.2.	Condensation .....	71
3.3.	Agitation et homogénéisation.....	71
3.4.	Saturation de la densité optique.....	72
3.5.	Validation du protocole .....	72
4.1.	Protocole d'isolement .....	73
4.2.	Caractérisation des souches .....	76
5.1.	Analyses protéomiques fondées sur la spectrométrie de masse .....	76
5.2.	Analyses bioinformatiques .....	78
6.1.	Mesure de la biomasse.....	79
6.2.	Mesure des substrats organiques .....	80
6.1.	Mesure de l'azote et du phosphore.....	81
6.2.	Mesure des lipides totaux .....	81
6.3.	Mesure des sucres totaux .....	82
7.1.	Détermination du taux de croissance et des rendements en biomasse .....	82
7.2.	Bilan matière.....	84
Chapitre 3.....		86
Inhibition de la croissance mixotrophe par les AGV : effet du pH ou de la concentration en substrat ?.....		86
2.1.	L'inhibition de la croissance est due aux acides non dissociés .....	88
2.2.	Les pH alcalins réduisent la vitesse de consommation des substrats organiques	97
2.3.	Les concentrations en substrat organique croissantes diminuent les rendements mixotrophes.....	105

2.4. Effets combinés du pouvoir tampon, des nutriments et de la concentration en substrat	111
2.5. Potentiel de production de <i>C. sorokiniana</i>	117
Chapitre 4	125
Existe-t-il une microalgue consommant rapidement le butyrate ?	125
2.1. Insuccès de la stratégie d'isolement	126
2.2. <i>Polytomella sp.</i> : une souche hétérotrophe présentant des caractéristiques de croissance remarquables	136
2.3. Comparaison des candidats	143
Chapitre 5	155
Quel est le métabolisme du butyrate chez <i>Polytomella sp.</i> ?	155
2.1. Croissance et accumulation des composés de stockage sur les deux AGV.	156
2.2. Comparaison des protéomes globaux	157
2.3. Réponses protéomiques par catégories métaboliques	160
2.4. Voies métaboliques impliquées dans la réponse au butyrate	162
2.5. Reconstruction du réseau métabolique du butyrate	163
Chapitre 6	178
Discussions et perspectives	178
Conclusions	197
Annexe 1	199
Modélisation du protocole d'isolement	199
Annexe 2	204
Influence du lactate et de l'éthanol sur la croissance de <i>C. sorokiniana</i> et de <i>Polytomella sp.</i>	204
Références	208

## Liste des figures

Figure 1 : Principe de la fermentation sombre et de la digestion anaérobie. ....	21
Figure 2 : Voies métaboliques principales de production d'H <sub>2</sub> à partir de glucose. ....	23
Figure 3 : Identification des profils de fermentation par groupement hiérarchique.....	33
Figure 4 : Intégration de la fermentation sombre dans la bioraffinerie environnementale. ....	36
Figure 5 : Développement de la recherche microalgale. ....	42
Figure 6 : Schéma d'une microplaque 24 puits. ....	68
Figure 7 : Validation du protocole en microplaques. ....	74
Figure 8 : Exemple de détermination de $\mu$ et des biomasses finales et initiales. ....	83
Figure 9 : Inhibition de la croissance aux pH acides en présence des acides organiques. ....	89
Figure 10 : Effet des pH acides sur la croissance mixotrophe et sur la consommation de l'acétate et du butyrate par différentes souches. ....	90
Figure 11 : L'inhibition de la croissance mixotrophe de <i>C. sorokiniana</i> est due aux formes non dissociées des acides. ....	93
Figure 12 : Détermination du seuil d'inhibition de la croissance mixotrophe des souches vertes par les acides organiques. ....	95
Figure 13 : Les seuils d'inhibition permettent de déterminer le pH minimum de culture. ....	96
Figure 14 : Effets des pH alcalins sur la croissance des souches vertes. ....	99
Figure 15 : Diminution de la productivité hétérotrophe et de la consommation en substrat avec l'augmentation du pH initial. ....	100
Figure 16 : La contribution de la fixation de CO <sub>2</sub> au rendement dépend de la souche et du pH. ....	102
Figure 17 : Absence d'inhibition de la croissance mixotrophe de <i>C. sorokiniana</i> en présence de hautes concentrations en acides organiques. ....	107
Figure 18 : La consommation de substrat organique augmente tandis que le rendement mixotrophe diminue avec l'augmentation de la concentration en AGV. ....	108
Figure 19 : Elévation du pH lors de la culture sur acétate. ....	110
Figure 20 : Fluctuations du pH lors de la culture de <i>C. sorokiniana</i> . ....	112
Figure 21 : Importance du pouvoir tampon et de la concentration initiale en substrat pour la croissance et la consommation des AGV. ....	113

## Introduction

Figure 22 : Le rendement mixotrophe dépend principalement de la concentration initiale en substrat. ....	116
Figure 23 : La limitation en nutriment déclenche l'accumulation de composés de stockage. ....	120
Figure 24 : Aucun isolat ne se démarque de <i>C. sorokiniana</i> sur l'acétate ou le butyrate. ....	131
Figure 25 : Aucun isolat ne présente de tolérance particulière aux acides. ....	132
Figure 26 : <i>Polytomella sp.</i> présente le taux de croissance le plus élevé sur le butyrate. ....	139
Figure 27 : Seuils d'inhibition par les acides des souches de collection. ....	140
Figure 28 : La résistance de <i>Polytomella sp.</i> aux acides organiques se démarque des autres souches. ....	141
Figure 29 : Croissance des souches candidates sur un mélange d'AGV. ....	145
Figure 30 : Caractéristiques de croissances des souches candidates. ....	148
Figure 31 : Evolution du contenu en lipides et sucres des souches au cours de la culture. ...	151
Figure 32 : Caractéristiques de production de lipides et de sucres des souches candidates. .	152
Figure 33 : Différences physiologiques de croissance de <i>Polytomella sp.</i> sur acétate et butyrate. ....	158
Figure 34 : Comparaison des protéomes globaux de <i>Polytomella sp.</i> cultivée sur acétate ou butyrate. ....	159
Figure 35 : Aperçu de l'ensemble du protéome de <i>Polytomella sp.</i> ....	161
Figure 36 : Reconstruction métabolique de la voie d'assimilation du butyrate dans le péroxysome et interactions proposées avec les autres compartiments. ....	166
Figure 37 : Reconstruction métabolique de la voie de dégradation des acides aminés branchés dans le péroxysome et propositions d'interactions avec la mitochondrie. ....	175
Figure 38 : Inhibition et limitation de la croissance : effets combinés de la $C_T$ , du pH et de la souche étudiée. ....	179
Figure 39 : Mécanismes proposés d'inhibition par les acides non dissociés. ....	181
Figure 40 : La fidélité du protocole d'isolement n'est jamais complète. ....	202
Figure 41 : ACP des variables et des individus associées aux simulations de la figure 40. Les ACP ont été obtenues à partir des paramètres biologiques obtenus dans chaque simulation de la figure 40. (A) Uniforme 1, (B) Uniforme 2, (C) Normale 1, (D) Normale 2. ....	203
Figure 42: Croissance de <i>C. sorokiniana.</i> sur l'éthanol et le lactate. ....	205
Figure 43 : Croissance de <i>Polytomella sp.</i> sur l'éthanol et le lactate. ....	206

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Equations métaboliques des voies consommatrices d'hydrogène ou concurrentes de la production d'hydrogène. ....	26
Tableau 2 : Comparaison entre rendements théoriques et rendements expérimentaux. ....	31
Tableau 3 : Composition d'effluents de fermentation sombre.....	34
Tableau 4 : Production de lipides microbiens à partir d'AGV. ....	39
Tableau 5 : Caractéristiques de croissance de souches vertes sur acétate et butyrate.....	46
Tableau 6 : Résumé des objectifs, méthodes et souches utilisés dans les différents chapitres de résultats.....	58
Tableau 7 : Résumé des conditions expérimentales étudiées dans chaque chapitre. ....	60
Tableau 8 : Nom, description et caractéristiques principales des espèces étudiées. ....	62
Tableau 9 : Cinétiques d'évaporation au sein de différentes microplaques.....	69
Tableau 10 : Cinétiques d'évaporation au sein de différentes microplaques enveloppées de sachet plastique. ....	70
Tableau 11 : Validation du protocole en microplaques : paramètres de croissance.. ....	74
Tableau 12 : Corrélations DO <sub>750</sub> – Matière sèche de différentes souches. ....	80
Tableau 13 : Caractéristiques de croissance des souches vertes en présence d'acétate et de butyrate à différents pH.....	101
Tableau 14 : Concentrations en acides totaux ou dissociés évaluées pour la croissance de <i>C. sorokiniana</i> .....	106
Tableau 15 : Données cinétiques de <i>C. sorokiniana</i> . ....	121
Tableau 16 : Codes et lieux de prélèvement des échantillons.....	128
Tableau 17 : Caractérisation des isolats. ....	129
Tableau 18 : Liste des protéines présentant les changements les plus importants lors de la culture sur butyrate.....	167
Tableau 19 : Comparaison des seuils d'inhibition avec d'autres études.....	184
Tableau 20 : Comparaison des productivités en biomasse, lipides et sucres avec d'autres études. ....	190

# Liste des abbréviations

Ac : Acétate

AcH : Acide acétique

AGV : Acides Gras Volatils

Bu : Butyrate

Buh : Acide butyrique

DCO : Demande Chimique en Oxygène

FHL : Formate Hydrogène Lyase

FS : Fermentation Sombre

H<sub>2</sub> : Hydrogène

HBP : Bactéries Productrices D'hydrogène

LAB : Bactéries Productrices De Lactate

MFC : Microbial Fuel Cell (pile à combustible microbienne)

MEC : Microbial Electrolysis Cell (cellule d'électrolyse microbienne)

MCT : Monocarboxylate Proton

OLR : Organic Loading Rate (charge organique appliquée)

PF : Photofermentation

PFOR : Pyruvate Ferrédoxyne Oxydoréductase

PFL : Pyruvate Formate Lyase

PSNB : Bactéries Pourpres Non Sulfureuses

RH : Acide non dissocié

TSH : Temps De Séjour Hydraulique

# Introduction

Les conclusions d'une partie du sixième rapport du GIEC « *Climate Change 2021 : The Physical Science Basis* », parue cet été 2021, sont sans appel : le changement climatique est causé par les émissions anthropogéniques de gaz à effet de serre. La limitation du réchauffement climatique entre 1,5°C et 2°C, conformément aux accords de Paris de 2015, ne peut ainsi être atteinte qu'au prix d'une réduction drastique des émissions de CO<sub>2</sub> jusqu'à être nulles aux alentours de 2050<sup>1</sup>. En France, la volonté de respecter ces engagements se traduit au niveau légal par la stratégie nationale bas carbone (SNBC), instaurée par la loi 17 août 2015 relative à la transition énergétique pour la croissance verte<sup>2</sup>. La SNBC propose ainsi les orientations publiques conduisant à la décarbonation progressive mais massive de tous les secteurs économiques.

En France, le secteur du traitement des déchets représente près de 3% des émissions de gaz à effet de serre nationales, principalement en raison du stockage des déchets organiques. La SNBC prévoit une réduction de 37% de ces émissions d'ici à 2030, en partie grâce à la limitation du stockage des déchets et à leur valorisation énergétique. Dans ce cadre, la digestion anaérobie (ou méthanisation) de déchets organiques est une solution particulièrement mise en avant. Ce processus biologique permet à la fois de traiter les déchets organiques tout en produisant du biogaz (mélange de méthane et de CO<sub>2</sub>) valorisable en chaleur et électricité ou bien injectable dans le réseau de gaz après épuration. En raison de ces avantages, la SNBC prévoit ainsi de porter le volume de biogaz injecté à 14-22 TWh en 2028, contre 0,4 TWh en 2017. Cette orientation s'est traduite par une augmentation progressive au niveau national des unités de méthanisation (160 en 2013, 837 fin 2018 et plus de 1000 à ce jour) et il est fort probable que ce nombre continue d'augmenter dans les prochaines années<sup>3</sup>.

Le méthane n'est toutefois pas la molécule ayant la plus haute valeur ajoutée. En effet, un des intermédiaires produit lors de la digestion anaérobie est l'hydrogène (H<sub>2</sub>). L'H<sub>2</sub>, dont la demande annuelle mondiale est estimée à 70 millions de tonnes, est principalement utilisé dans

---

<sup>1</sup> IPCC, 2021: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2021: The Physical Science Basis*.

<sup>2</sup> <https://www.ecologie.gouv.fr/strategie-nationale-bas-carbone-snbc>

<sup>3</sup> Ademe, 2020, Déchets chiffres-clés

## Introduction

l'industrie pour le raffinage du pétrole, la production d'ammoniaque ou de méthanol. Actuellement, la production d'H<sub>2</sub> est à 95% issue de sources fossiles (gaz naturel et charbon) et est responsable de l'émission de près de 830 millions de tonnes de CO<sub>2</sub><sup>4</sup>. Cette contrainte pousse l'Europe à des investissements massifs pour la production d'H<sub>2</sub> décarboné<sup>5</sup>. En France, près de 7 milliards d'euros seront investis dans le plan hydrogène, visant notamment à pousser la part d'H<sub>2</sub> décarboné entre 20% et 40% dans le secteur industriel d'ici à 2028<sup>6</sup>. Si la principale méthode envisagée pour produire de l'H<sub>2</sub> décarboné provient de l'électrolyse de l'eau à partir d'électricité renouvelable, la fermentation sombre (FS) peut constituer une source complémentaire d'H<sub>2</sub>.

La FS correspond aux deux premières étapes de la digestion anaérobie, pendant lesquelles les bactéries anaérobies convertissent la matière organique, issue par exemple de déchets, en H<sub>2</sub>. Parmi les différentes voies de production d'H<sub>2</sub>, la FS est ainsi celle présentant l'un des plus faibles potentiels d'émission de CO<sub>2</sub> (<1 kgCO<sub>2</sub>/kgH<sub>2</sub>) en comparaison d'autres technologies tout en rendant un service de traitement de déchets. Le processus de dégradation est toutefois incomplet : près de 70% de la matière organique initiale est convertie en métabolites fermentaires tels que l'acétate et le butyrate. La soutenabilité et la rentabilité du procédé de FS passe donc par la valorisation des effluents liquides et notamment le couplage de la FS avec d'autres systèmes biologiques.

Une possible application de ces effluents est la culture de microalgues en mixotrophie pour la production de lipides microbiens. La mixotrophie associe les propriétés autotrophes des algues, c'est-à-dire la fixation de CO<sub>2</sub> en condition d'illumination, et la croissance hétérotrophe, c'est-à-dire la consommation de substrat organique dans le noir. La culture de microalgues sur de tels substrats est toutefois freinée par plusieurs verrous. Si l'acétate est un substrat promouvant la croissance par rapport à l'autotrophie, le butyrate n'est pas aussi bien assimilé par les algues et peut inhiber complètement la croissance. L'inhibition causée par le butyrate et sa consommation lente restreignent donc l'utilisation d'un tel substrat à de faibles concentrations, généralement plus faibles que celles retrouvées dans les effluents de fermentation. En conséquence, les données de croissance disponibles sont limitées et rendent

---

<sup>4</sup> IEA, 2019, The Future of Hydrogen

<sup>5</sup> [https://ec.europa.eu/growth/industry/policy/european-clean-hydrogen-alliance\\_en](https://ec.europa.eu/growth/industry/policy/european-clean-hydrogen-alliance_en)

<sup>6</sup> <https://www.economie.gouv.fr/presentation-strategie-nationale-developpement-hydrogene-decarbone-france>



## Introduction

difficile l'évaluation du potentiel de production de microalgues sur ces effluents. Enfin, l'utilisation marginale de ce substrat entraîne un manque substantiel de connaissance quant au métabolisme du butyrate et sa voie de dégradation chez les microalgues.

Les objectifs principaux de cette thèse ont donc été de :

- Déterminer les causes d'inhibition de la croissance par les AGV sur différentes espèces de microalgues
- Evaluer le potentiel de production de différentes espèces de microalgues sur un effluent de FS
- Elucider le métabolisme du butyrate par les microalgues

Cette thèse se compose de six chapitres. Le **chapitre 1** propose en premier lieu une synthèse de la littérature couvrant les bases métaboliques et microbiologiques de la fermentation sombre. Cet état de l'art nous permet par la suite d'exposer pourquoi la FS, lorsqu'elle vise la production d' $H_2$ , doit être couplée avec d'autres procédés. La deuxième moitié de cette revue se concentre sur les différents modes trophiques des algues et les paramètres influençant leurs cultures sur des acides organiques. Ce chapitre se conclue par nos objectifs et nos questions de recherche. Les matériels et méthodes employés pour répondre à ces questions sont décrits de manière exhaustive dans le **chapitre 2**.

Le **chapitre 3** apporte des éléments de réponse quant à la compréhension des causes d'inhibition de la croissance par les AGV. Pour cela, l'effet de différents paramètres abiotiques comme le pH, la concentration en AGV ou les nutriments sur la croissance de quelques espèces d'algues couramment étudiées (*Acutodesmus obliquus*, *Auxenochlorella protothecoïdes*, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlorella sorokiniana*) a été évalué. L'une des principales conclusions de ce chapitre est que l'inhibition n'est due qu'aux formes non dissociées des acides. L'autre conclusion est que les souches les plus communes peuvent toutes consommer le butyrate : son assimilation reste lente et limitée non pas par des paramètres abiotiques mais par des limites métaboliques.

Dans le **chapitre 4**, nous cherchons à savoir si cette caractéristique est commune à la majorité des espèces de microalgues ou si certaines d'entre elles sont capables de consommer rapidement le butyrate. Pour cela, la capacité à croître sur le butyrate de douze souches, isolées depuis l'environnement ou bien issues de collections, a été évaluée. A l'issue de ce criblage,

## Introduction

nous avons identifié une espèce, *Polytomella sp.*, particulièrement efficace pour consommer le butyrate.

L'étude approfondie de cette espèce fait l'objet du **chapitre 5**, dans lequel nous élucidons le métabolisme du butyrate par des approches protéomiques comparatives. Nous montrons que la présence de butyrate induit une réponse métabolique forte de *Polytomella sp.*

L'ensemble de ces résultats sont discutés plus en avant dans le **chapitre 6**. Cette discussion nous permet d'identifier certaines questions restant en suspens et de dégager quelques perspectives de recherche, d'un point de vue fondamental ou plus appliqué. Ce chapitre se termine par une conclusion générale de ces travaux de thèse.

Les travaux de cette thèse ont fait l'objet de différentes contributions, détaillées ci-dessous.

- Publications écrites

**Lacroux, J.**, Trably, E., Bernet, N., Steyer, van Lis, R. Mixotrophic growth of microalgae on volatile fatty acids is determined by their undissociated form. *Algal Research*, 47, 2020.

**Lacroux, J.**, Seira, J., Trably, E., Bernet, N., Steyer, van Lis, R. Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* on acetate and butyrate: interplay between substrate, C:N ratio and pH. *Frontiers in Microbiology*, 2021.

- Communications orales

**Lacroux, J.** pH strongly influences the growth of microalgae on volatile fatty acids from dark fermentation. IWA conference on algal technology and stabilization ponds for wastewater treatment and resource recovery. 1<sup>er</sup> et 2 juillet 2019, Valladolid, Espagne.

- Travaux de médiation scientifique

Guillaume Bagnolini & Mo', avec la participation de 13 doctorant.e.s du collège doctoral de l'Université de Montpellier. 13 thèses en BD. Septembre 2019.

*La planche de bande dessinée est présentée page suivante.*

Finale régionale du concours « Ma thèse en 180 secondes » – Edition Méditerranée Occitanie 2021. Lien vidéo : [https://www.youtube.com/watch?v=I0K2T\\_-8Pfo](https://www.youtube.com/watch?v=I0K2T_-8Pfo)

# Introduction

PEUT-ÊTRE NE VOYEZ-VOUS QUE DES DÉCHETS DANS CE TAS...

... POURTANT, SI L'ON Y REGARDE D'UN PEU PLUS PRÈS, ET SURTOUT D'UNE AUTRE MANIÈRE, ON PEUT TROUVER UNE SACRÉE QUANTITÉ DE RESSOURCES !

EN EFFET, DE CES DÉCHETS, AVEC UNE BONNE TECHNIQUE, ON PEUT TIRER...

... DE L'HYDROGÈNE !

VOUS SAVEZ, CETTE MOLÉCULE ACTUELLEMENT EN VOGUE !

ET À RAISON, CAR C'EST UNE SOURCE D'ÉNERGIE VRAIMENT PROMETTEUSE : ON PEUT L'UTILISER COMME CARBURANT POUR...

... DES VOITURES...

... DES BATEAUX...

ET MÊME POUR GÉNÉRER DE L'ÉLECTRICITÉ !

LA PRODUCTION D'HYDROGÈNE À PARTIR DES DÉCHETS ALIMENTAIRES N'A RIEN DE MAGIQUE ! ELLE RÉSULTE D'UN PROCÉDE APPELÉ LA FERMENTATION SOMBRE. NOUS METTONS LES DÉCHETS DANS UN FERMENTEUR...

... ET LAISSONS, SIMPLEMENT, CEUVRE LES BACTÉRIES ...

A TAAAABBLE!

POUET!

POUET!

POUET!

... QUI TRANSFORMENT TOUTE CETTE MATIÈRE ORGANIQUE, CE QUI GÉNÈRE DE L'HYDROGÈNE! MAIS AUSSI D'AUTRES TYPES DE RÉSIDUS.

LA FERMENTATION SOMBRE PRODUIT EN EFFET DES ACIDES GRAS VOLATILES (AGV), AINSI QUE DU PHOSPHATE (PO4) ET DE L'AMMONIUM (NH4).

HE LAISSEZ NOUS DE LA PLACE AU-DESSUS! PAS TOUJOURS LES MÊMES AU SOLEIL!

HEM! DÉLICIEUSE JOURNÉE AUJOURD'HUI!

QUAND ELLES PUISENT LEUR ÉNERGIE, COMME LES PLANTES, DE LA LUMIÈRE ET DU DIOXYDE DE CARBONE, ELLES SONT DITES « AUTOTROPHES ». CE SYSTÈME A L'AVANTAGE DE SON COÛT RÉDUIT, MAIS...

... IL NÉCESSITE UNE GRANDE SUPERFICIE EXPOSÉE À LA LUMIÈRE, ET PREND DU TEMPS, AUTRE OPTION: SE PASSER DE SOLEIL POUR SE NOURRIR D'OXYGÈNE ET DE SUCRE, COMME NOUS! ELLES SONT ALORS "HÉTÉROTROPHES".

C'EST BON, LA LUMIÈRE EST ÉTEINTE, ON PEUT TENTER À NOUVEAU DE CHOPER LE SUCRE! VOUS ÊTES PRÊTES ?

ELLES PEUVENT ÊTRE CULTIVÉES DANS DE PETITS ESPACES, CROISSENT PLUS VITE. MAIS CELA IMPLIQUE D'ACHETER DU SUCRE, UNE SACRÉE DÉPENSE À LONG TERME!

RESTE LE TROISIÈME MODE, UN ENTRE-DEUX. LA MIXOTROPHIE ALLIÉE À LA FOIS LUMIÈRE ET GLUCOSE.

JE TESTE DONC PLUSIEURS ESPÈCES D'ALGUES À DIFFÉRENTS TAUX DE CONCENTRATION D'AGV ET REGARDE SI ELLES SE SONT BIEN MULTIPLIÉES.

MAIS UNE FOIS CES DÉCHETS ASSIMILÉS, QUE FAIRE DE CES ALGUES ?

MAIS ENFIN... ÇA NE FINIRA DONC JAMAIS !?

CE QUI PERMET AUX ALGUES DU FOND DE SE DÉVELOPPER COMME CELLES EN SURFACE ET QUI ONT DU SOLEIL!

SAUF QUE DANS NOTRE CAS, À LA PLACE DU SUCRE, ON DONNE À MANGER LES FAMEUX RÉSIDUS PRODUITS PAR LES BACTÉRIES !

EH BIEN, CES ALGUES POURRAIENT POTENTIELLEMENT ALIMENTER LE FERMENTEUR ! LES ALGUES PRODUISENT EN EFFET DES SUCRES, QUI, APRÈS EXTRACTION, POURRAIENT ÊTRE CONSOMMÉS PAR LES BACTÉRIES.

LE SUCRE D'ALGUES, C'EST VRAIMENT MON PÊCHÉ MIGNON !

CE SCHÉMA EST UNE BELLE ILLUSTRATION DE L'ASPECT CYCLIQUE DU VIVANT.

DECHETS AGRO INDUSTRIELS

FERMENTATION SOMBRE BACTÉRIES

AGV NH4-PO4

MIXOTROPHIE

MICRO-ALGUES

RELATION POTENTIELLE À RÉPÉTER

TRAVAILLER SUR CES RELATIONS, C'EST SE REMETTRE DANS LE CYCLE DE LA VIE OU RIEN N'EST SUPERFLU OU INUTILE, MAIS OÙ TOUT, AU CONTRAIRE, CONSTITUE UNE RESSOURCE POUR D'AUTRES.

CE QUI MEURT AIDE À LA NAISSANCE D'AUTRES ÊTRES, QUI EUX-MÊMES VONT PRODUIRE DES SUBSTANCES NÉCESSAIRES À D'AUTRES ORGANISMES, ETC ETC...

DÈS LORS, IL N'Y A PLUS DE DÉCHET, SEULEMENT DES POTENTIELS À VALORISER ! LA MORT ET LA VIE NE SONT QUE LES DEUX PARTIES D'UN MÊME PROCESSUS !

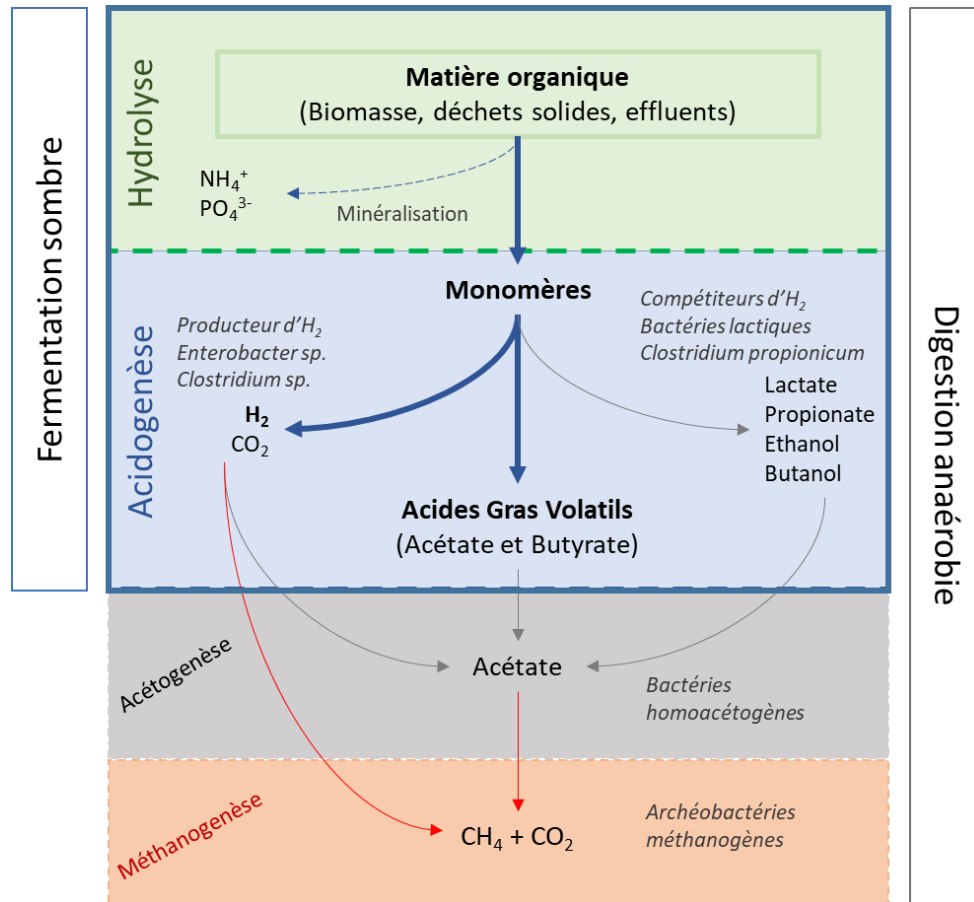


# Chapitre 1

## Revue de littérature

### 1. La fermentation sombre : conversion de déchets en énergie et molécules

La plupart des êtres vivants tirent leur énergie, sous forme d'ATP, de la glycolyse, étape durant laquelle le glucose assimilé est converti en pyruvate. En condition aérobie, le pyruvate est métabolisé dans le cycle de Krebs et les cofacteurs NADH sont ré-oxydés en  $\text{NAD}^+$  dans la chaîne respiratoire. En absence d'oxygène, la régénération de ces cofacteurs n'est pas possible par cette voie. Dans ces conditions, les micro-organismes fermentent et utilisent des molécules organiques comme accepteur final d'électrons afin de régénérer le  $\text{NAD}^+$  et les autres cofacteurs comme l'ADP ou l'AMP. La fermentation est donc un processus anaérobie conduisant à une oxydation incomplète du substrat initial : la totalité des chaînes carbonées constituant le substrat n'est pas convertie en biomasse ou en  $\text{CO}_2$ . Différentes voies de fermentation existent, généralement nommées selon le produit final de fermentation, les espèces impliquées et les conditions environnementales auxquelles elles sont confrontées. Un des moyens pour les micro-organismes d'évacuer l'excédent d'électrons est la production d'hydrogène conjointement à celle de différents acides organiques ou d'alcools. C'est ce processus que l'on nomme fermentation sombre (FS). La FS fait partie du processus complet de digestion anaérobie présentée en **Figure 1**. La matière organique est d'abord dégradée en divers monomères et nutriments lors de l'hydrolyse. Les sucres simples ainsi générés sont consommés lors de l'acidogenèse conduisant à la formation d' $\text{H}_2$ , de  $\text{CO}_2$  et d'acides gras volatils (AGV). Ces produits sont re-consommés par les bactéries homoacétogènes et méthanogènes au cours de l'acétogenèse et de la méthanogenèse pour former du méthane et du gaz carbonique. Dans les prochaines sections, nous commencerons par décrire les microorganismes impliqués dans la FS ainsi que les différentes voies métaboliques qu'ils empruntent.



**Figure 1 : Principe de la fermentation sombre et de la digestion anaérobie.** La figure présente les grandes étapes du processus de digestion anaérobie, dont la fermentation sombre fait partie. La fermentation sombre conduit à la production d' $\text{H}_2$  et d'AGV, majoritairement de l'acétate et du butyrate, suite à la dégradation de la matière organique. Des voies compétitrices de dégradation peuvent conduire à la production de différents métabolites au détriment de la production d' $\text{H}_2$ . Ces métabolites sont consommés lors de l'acétogénèse et de la méthanogénèse.

## 1.1. Microbiologie et voies métaboliques engagées

### 1.1.1. Micro-organismes producteurs d'hydrogène

L'identification des micro-organismes impliqués dans la FS a fait l'objet de plusieurs études au cours des deux dernières décennies. Trois grandes familles de bactéries productrices d'hydrogène (HBP) se distinguent en culture mixte : les anaérobies obligatoires sporulantes, les anaérobies obligatoires non sporulantes et enfin les anaérobies facultatives (Cabrol et al., 2017).

Les bactéries anaérobies obligatoires sporulantes, notamment les membres du genre *Clostridium*, sont considérées comme les principales productrices d'hydrogène pendant la fermentation sombre. Une des premières études portant sur les communautés mixtes a montré que lors de la production d'hydrogène sur glucose par une boue anaérobie non prétraitée, 64,6% des microorganismes étaient des *Clostridium* et 18,8% des *Enterobacter* (Fang et al., 2002). Depuis, tout particulièrement avec l'avènement des techniques moléculaires, ces résultats se sont confirmés et un grand nombre d'espèces se rapportant au genre *Clostridium* a pu être identifié pendant la fermentation sombre en conditions mésophiles : *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium beijerinckii* ou *C. acetobutylicum* sont des espèces fréquemment retrouvées (Cabrol et al., 2017; Lin et al., 2007; Rafrafi et al., 2013). En conditions thermophiles en revanche, les bactéries du genre *Thermoanaerobacterium* prédominent (Oliveira et al., 2020). Dans la plupart des études, l'utilisation de prétraitements thermiques favorise la sélection de ces organismes sporulants.

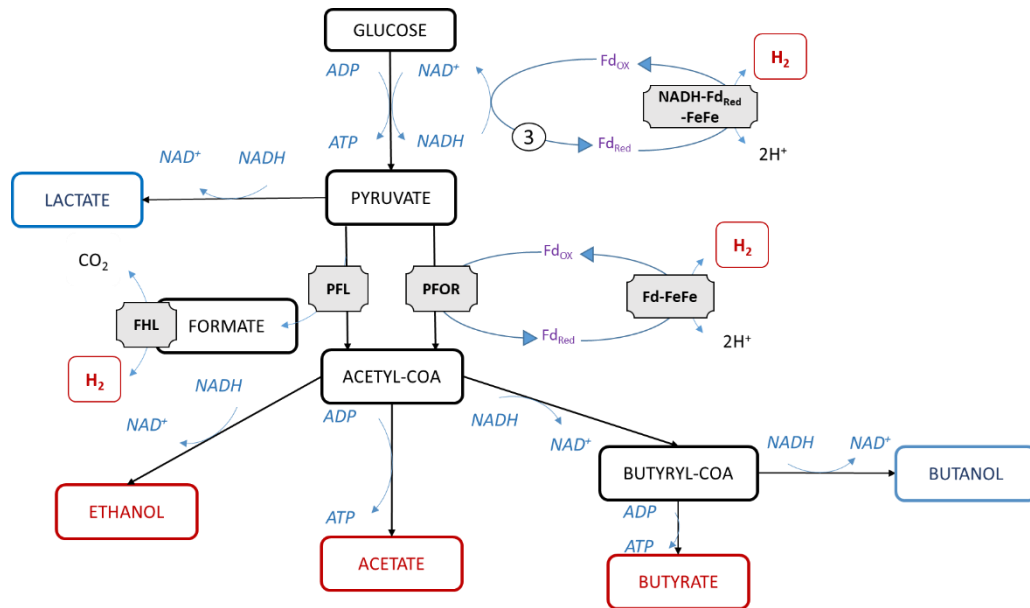
L'hydrogène peut également être produit par des bactéries anaérobies facultatives appartenant majoritairement au genre *Enterobacter* (Etchebehere et al., 2016; Fang et al., 2002). Ces organismes ont théoriquement des rendements relativement plus faibles que les *Clostridii* (Hallenbeck, 2005) mais restent toutefois attractifs puisqu'ils peuvent consommer l'oxygène résiduel dans un réacteur et créer un environnement strictement anaérobie.

Enfin, en absence de prétraitement thermique ou lorsque les conditions de culture leurs sont favorables, des bactéries anaérobies strictes non sporulantes peuvent être retrouvées dans les cultures mixtes de fermentation. Cette catégorie compte une grande diversité de genres, tels que *Ethanoligenens*, *Acetanaerobacterium*, *Prevotella*, *Selenomonas* et *Megasphaera* (Castelló et al., 2009; Etchebehere et al., 2016; Luo et al., 2008; Mariakakis et al., 2011). Ces bactéries peuvent être responsables de la majorité de la production de l'hydrogène dans certaines conditions mais ont des rendements plus faibles que les *Clostridii*.

### 1.1.2. Voies métaboliques de production d'hydrogène

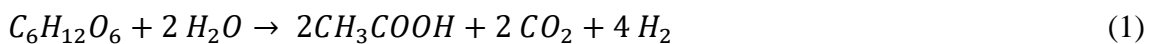
La dégradation de la matière organique conduit à la production par la glycolyse de pyruvate, l'intermédiaire clé de la fermentation (**Figure 2**). Le pyruvate est métabolisé en acétyl-CoA et en produits intermédiaires conduisant à la formation d'hydrogène. Deux voies différentes de conversion du pyruvate existent, selon l'enzyme catalysant la réaction : la voie pyruvate-

ferrédoxine oxydoréductase (PFOR) et la voie pyruvate-formate lyase (PFL). L'utilisation de l'une ou l'autre de ces voies métaboliques dépend des organismes acteurs de la fermentation. De manière générale, les anaérobies strictes et en particulier les *Clostridii* privilégient la voie PFOR tandis que la voie PFL est empruntée par les bactéries aérobies facultatives telles qu'*Enterobacter* (Hallenbeck and Benemann, 2002).

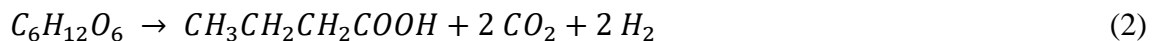


**Figure 2 : Voies métaboliques principales de production d'H<sub>2</sub> à partir de glucose.** Les métabolites finaux issus des voies conduisant à la production d'H<sub>2</sub> sont indiqués en rouge, tandis que les métabolites issus des voies compétitrices sont indiqués en bleu.

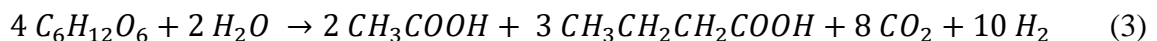
La voie pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (PFOR) conduit à la formation de ferrédoxine réduite. Les électrons de la ferrédoxine sont transférés au moyen d'une hydrogénase Fe-Fe aux protons pour produire de l'hydrogène. L'acétyl-CoA est dégradé en acétate avec production d'ATP. Cette réaction conduit à la formation de 2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>Glu</sub><sup>-1</sup>. Par ailleurs, les organismes empruntant la voie PFOR possèdent également des enzymes telles que la NADH-ferrédoxine oxydoréductase capables d'oxyder directement le NADH en NAD<sup>+</sup> avec formation de deux autres mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>Glu</sub><sup>-1</sup>. Le bilan global de cette voie métabolique est alors :



Cependant, la réaction de réduction de la ferrédoxine par le NADH n'est pas énergétiquement favorable sous conditions standards et ne se produit que sous des pressions partielles en hydrogène très réduites. L'équation (1) représente alors le rendement maximum théorique de conversion du glucose par fermentation. Afin de régénérer le NAD<sup>+</sup>, l'acétyl-CoA est donc converti en d'autres métabolites comme le butyrate, l'éthanol ou le butanol. La voie butyrate (équation (2)) est la voie la plus thermodynamiquement favorable permettant le meilleur équilibre entre production d'énergie et conservation du pouvoir oxydant, et est par conséquent favorisée (Lee et al., 2008).



Les rendements théoriques maximum sont donc de 4 et 2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>Glu</sub><sup>-1</sup> respectivement selon le profil métabolique. Théoriquement, la production d'hydrogène devrait donc être proportionnelle à la quantité d'acétate présente dans le milieu, mais la littérature peut être assez contradictoire à ce propos. (Hafez et al., 2010) établissent une corrélation entre le rendement en hydrogène et le ratio molaire Acétate : Butyrate (A : B), un ratio entre 2,0 et 2,5 conduisant à une production d'hydrogène d'environ 3 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>Glu</sub><sup>-1</sup>. (Kim et al., 2006) ont observé pour leur part qu'un ratio faible était corrélé à une meilleure production d'hydrogène. (Guo et al., 2014) indiquent de la même manière que le potentiel de production d'hydrogène (BHP) n'est pas significativement corrélé à la présence d'acétate dans le milieu mais plutôt à la concentration en butyrate. Cette absence de relation reflète la présence de voies compétitives consommatrices d'hydrogène telles que l'homoacétogénèse détaillées dans la section ci-après (Saady et al., 2013). (Hawkes et al., 2007) proposent quant à eux l'équation empirique suivante (équation (3)) pour rendre compte de la production globale d'hydrogène.

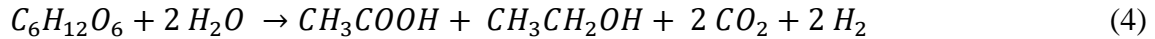


Selon cette équation, un rendement théorique de 2.5 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>Glu</sub><sup>-1</sup> peut être obtenu, pour un ratio molaire A : B de 0,66. Ce rendement a pu être observé en culture pure ou mixte par différents auteurs sur des substrats modèles (Heyndrickx et al., 1986; Lin et al., 2007; Ueno et al., 1996; Van Ginkel et al., 2001).

La voie pyruvate-formate lyase (PFL) conduit à la formation de formate, par la suite clivé en CO<sub>2</sub> et hydrogène par le complexe formate-hydrogène lyase (FHL) contenant un cofacteur Ni-Fe. L'acétyl-CoA est quant à lui converti en acétate et éthanol pour générer de l'ATP et du



NAD<sup>+</sup> respectivement. Les organismes suivant cette voie ne possèdent *a priori* pas les enzymes permettant le recyclage direct du NADH et présentent donc un rendement en hydrogène limité à 2 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>Glu</sub><sup>-1</sup> (équation (4)).



En culture mixte, le rendement en hydrogène entre 1 et 2,5 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>.mol<sub>Glu</sub><sup>-1</sup> accompagné par la production d'un mélange de différents composés, comprenant l'acétate et le butyrate mais aussi du propionate, du lactate et différents alcools comme l'éthanol ou le butanol. Les différences observées entre les rendements empiriques et théoriques trouvent plusieurs explications. D'une part, les bactéries ne tirent aucun avantage net à produire de l'hydrogène : la production d'hydrogène est dictée par le meilleur équilibre obtenu entre la génération d'ATP et de NAD<sup>+</sup> et plusieurs voies n'impliquant pas la production d'hydrogène permettent de régénérer ce cofacteur (**Figure 2**). D'autre part, certaines voies métaboliques de conversion du substrat ne produisent pas, voire consomment, de l'hydrogène (conversion du pyruvate en lactate ou du lactate en propionate respectivement). Le profil métabolique final et le rendement en hydrogène dépendent alors des communautés impliquées, du substrat de départ et des conditions environnementales dans lesquelles évoluent les micro-organismes. La description des voies compétitrices de conversion du substrat fera l'objet des sections suivantes (**Tableau 1**).

### 1.1.3. Voies de consommation de l'hydrogène et organismes associés

Les principales bactéries responsables de la diminution du rendement en hydrogène dans un fermenteur sombre sont les homoacétogènes et les méthanogènes, notamment lors de l'utilisation de boues anaérobie comme inoculum. Les premières sont des bactéries anaérobies strictes, certaines ayant la capacité à sporuler. On retrouve parmi elles des espèces du genre *Clostridium* telles que *Clostridium aceticum*, *Clostridium ljundhalii* ou *Acetobacterium sp.* (Saady, 2013). Elles tirent leur nom de leur capacité à convertir totalement le glucose en acétate via la voie de Wood-Ljungdahl (Diekert and Wohlfarth, 1994; Ragsdale and Pierce, 2008). Une molécule de glucose est dégradée en deux molécules d'acétate, huit molécules d'hydrogène et deux molécules de CO<sub>2</sub> via la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas. Les homoacétogènes peuvent fixer autotrophiquement le CO<sub>2</sub>, réduit ensuite par l'hydrogène générés par l'étape précédente

afin de former de l'acétate selon l'équation globale (5) (Ragsdale and Pierce, 2008). L'acétate ainsi produit est finalement converti en méthane lors de la méthanogenèse, qui constitue le processus ultime de la dégradation de la matière organique. Elle est réalisée par les méthanogènes, qui peuvent être acétoclastes mais également hydrogénotrophes : elles consomment alors l'hydrogène résiduel non utilisé par les homoacétogènes (équations (6)). A ce jour, tous les méthanogènes identifiés appartiennent au domaine des Archae. Le domaine présente une grande variabilité phylogénétique et se divise en cinq ordres : *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales* et *Methanosarcinales* (Thauer, 1998).

**Tableau 1 : Equations métaboliques des voies consommatrices d'hydrogène ou concurrentes de la production d'hydrogène.**

Bactéries	Equations	N°
Acétogènes	$4 H_2 + 2 CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2 H_2O$	5
Méthanogènes	$CH_3COOH \rightarrow CO_2 + CH_4$	6
	$4 H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2O$	
Productrice de propionate	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2 \rightarrow 2 CH_3CH_2COOH + 2 H_2O$	7
	$CH_3CH(OH)COOH + NADH + H^+ \rightarrow CH_3CH_2COOH + H_2O + NAD^+$	8
Lactiques	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CH(OH)COOH$	9
	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH(OH)COOH + CH_3CH_2OH + CO_2$	10
	$4 CH_3CH(OH)COOH + 2 CH_3COOH \rightarrow 3 CH_3CH_2CH_2COOH + 4 CO_2 + 2 H_2$	11

Les autres principales voies de diminution du rendement en hydrogène sont les voies productrices de propionate ou de lactate. Les bactéries du genre *Clostridium*, telles que *Clostridium propionicum* ou *Propionibacterium* sp. peuvent fermenter le glucose et l'hydrogène en propionate (équation 7) (Cohen et al., 1984; Vavilin et al., 1995). Le propionate peut également être produit par conversion directe du lactate, le substrat privilégié des bactéries productrices de propionate, selon l'équation (8). Cette voie présente un bilan neutre en hydrogène mais est directement compétitrice pour le substrat et détourne l'utilisation du pouvoir réducteur (Lee et al., 2008).

Plusieurs études indiquent la présence de bactéries lactiques (LAB) dans des réacteurs de fermentation sombre, notamment ceux traitant des déchets alimentaires ou des produits de l'industrie laitière (Santiago et al., 2019)(Santiago et al., 2019). Les LAB sont des organismes anaérobies généralement non sporulants regroupant les bactéries appartenant à l'ordre des Lactobacillales, comprenant par exemple *Lactobacillus* ou *Lactococcus*. Les LAB fermentent le glucose par voie homolactique (équation 9) ou hétérolactique (équation 10). Leur présence est ainsi généralement associée à une forte production de lactate ou d'un mélange lactate/éthanol.

Ces bactéries ne sont pas à proprement parler des bactéries consommatrices d'hydrogène mais entrent directement en compétition pour le substrat avec les HPB. Leur forte affinité pour certains substrats comme le lactose et leur efficacité métabolique leur permet généralement d'être plus compétitives et de dominer les écosystèmes. Par ailleurs, l'activité métabolique des LAB peut directement inhiber la croissance des autres bactéries, soit à cause de sécrétion de composés antibactériens soit par l'accumulation d'acide lactique, entraînant *in fine* une diminution importante du pH (Noike et al., 2002). Leur présence s'accompagne donc généralement d'une diminution du rendement en hydrogène (Guo et al., 2014; Santiago et al., 2019). Toutefois, leur impact négatif est à nuancer. (Etchebehere et al., 2016) en comparant 20 réacteurs opérés dans des conditions diverses, indiquent que si des *Lactobacilli* prédominent dans les réacteurs faiblement producteurs d'hydrogène, ils co-dominent également avec des *Clostridii* dans les réacteurs fortement producteurs d'hydrogène. (Sikora et al., 2013) suggèrent que les LAB pourraient avoir un effet positif sur les systèmes producteurs d'hydrogène en partageant une synergie similaire à celle présente dans les systèmes digestifs. Certaines bactéries peuvent en effet utiliser le lactate et l'acétate comme substrat pour produire du butyrate et de l'hydrogène selon l'équation (11).

### 1.2. Paramètres opératoires affectant la fermentation sombre

#### 1.2.1. Nature et composition du substrat

La très grande majorité des déchets organiques, disponibles et de faible coûts, peut être une source de substrat pour la FS. Ainsi, les boues activées, les résidus de biomasses lignocellulosique, les déchets alimentaires, les eaux usées ou encore les résidus d'algues

peuvent alimenter des fermenteurs (Ghimire et al., 2015). Parmi ces sources, les substrats conduisant aux meilleurs rendements en H<sub>2</sub> sont ceux riches en polysaccharides (Guo et al., 2014). En comparaison, la contribution des protéines et des lipides est faible.

### 1.2.2. Inoculum et prétraitement

Dans le cadre du traitement de déchets par fermentation, l'utilisation de cultures pures de *Clostridium* ou d'*Enterobacter* n'est pas envisageable. Ainsi, les fermenteurs sont généralement inoculés avec des cultures mixtes provenant de sources naturelles (sédiments, composts, sols, ...) ou d'autres procédés de digestion aérobie ou anaérobie, enrichies au préalable pour favoriser les producteurs d'hydrogène (Hawkes et al., 2007). Le prétraitement de l'inoculum est l'une des méthodes de sélection les plus efficaces et les plus utilisées. Elle se base sur la capacité des *Clostridii* à sporuler, tandis que les consommateurs d'hydrogène tels que les méthanogènes ou les LAB en sont incapables. La stratégie consiste donc à appliquer un stress important aux cellules (choc pH, thermique ou aérobie par exemple) : les bactéries pouvant sporuler le font en réponse à ce stress, tandis que les autres sont éliminées. Le prétraitement thermique (120°C, 20 min) est le plus couramment utilisé (Wong et al., 2014).

### 1.2.3. pH

Le pH est un paramètre fondamental pour le contrôle du procédé de fermentation. Le pH du milieu influe en effet non seulement sur les communautés, chaque espèce ayant une gamme optimale de fonctionnement, mais également sur les voies métaboliques suivies au sein d'une même espèce.

Les pH supérieurs à 6 favorisent des voies concurrentes de la production d'hydrogène. Si la réaction de conversion du formate en hydrogène est possible à des pH inférieurs à 6,5, elle devient non favorable au-delà. Plusieurs études montrent, par des approches thermodynamiques ou expérimentales, un changement métabolique de la production de butyrate et d'acétate vers la production d'acétate, de propionate, de lactate et d'éthanol lorsque le pH passe de 5-6 à au-delà de 6,5 (Asunis et al., 2019; Cohen et al., 1984; Lee et al., 2008; Temudo et al., 2007). Par ailleurs, l'activité des méthanogène semble favorisée pour des pH supérieurs à 6,5 (Fang and Liu, 2002).

Les pH trop acides (aux alentours de 4,5) inhibent totalement la fermentation, en raison de l'accumulation des acides non dissociés (Van Ginkel and Logan, 2005). La production des AGV pendant la fermentation entraîne une diminution du pH et lorsque celui-ci se rapproche des pKa des AGV (autour de 4,8 pour les AGV et de 3,9 pour l'acide lactique), les concentrations en acides non dissociés augmentent. Ces acides non dissociés peuvent diffuser passivement dans les cellules et engendrer plusieurs dommages cellulaires. Le maintien de l'homéostasie nécessite une quantité importante d'ATP, diminuant la croissance bactérienne voire l'inhibant totalement (Desbois and Smith, 2010). Par ailleurs, en réponse à ce stress, certaines espèces comme *Clostridium* peuvent changer de métabolisme et se tourner vers la solvantogénèse ou sporuler (Hawkes et al., 2007).

En résumé, bien que les organismes puissent se développer sur une large gamme de pH, la gamme optimale pour la production d'hydrogène se situe entre 5 et 6.

### 1.2.4. Temps de séjour hydraulique et charge organique appliquée

Le temps de séjour hydraulique (TSH) correspond à la durée pendant laquelle le substrat et les micro-organismes restent dans le fermenteur lors d'opérations en mode semi-continu ou continu. Le TSH permet notamment de sélectionner des micro-organismes en fonction des disparités dans leur taux de croissance. Dans le cadre de la FS, un TSH adéquat permet de sélectionner les organismes hydrolytiques de la matière complexe et les producteurs d'H<sub>2</sub> et d'éliminer les organismes consommateurs aux taux de croissance plus faibles tels que les homoacétogènes et les archaea ou compétiteurs tels que les LAB.

Sur des substrats simples comme le glucose ou le lactose, les faibles TSH (6-12h) sont en général plus favorables aux organismes producteurs d'H<sub>2</sub> (Silva-Illanes et al., 2017). Les plus haut TSH (14-24h) ne permettent pas le lessivage complet des méthanogènes (Chu et al., 2009) ou des bactéries lactiques (Palomo-Briones et al., 2017). En revanche, dans le cadre de substrats complexes, l'activité des bactéries hydrolytiques limite leur dégradation et ainsi la disponibilité des monomères aux autres organismes. Par conséquent, les TSH optimaux sur de tels substrats peuvent être plus longs. Par exemple, (Santiago et al., 2019) indiquent qu'un TSH de 48h permet la meilleure productivité en H<sub>2</sub> lors d'utilisation de déchets alimentaires, en permettant la sélection des *Clostridii* comparées au *Enterobacter* ou *Lactobacilles*.

Le TSH est également lié à un autre paramètre opératoire, la charge organique appliquée (OLR en anglais pour Organic Loading Rate), qui représente la concentration de matière organique dans l'alimentation par unité de temps. L'OLR optimale est également dépendante du substrat utilisé et de la configuration du réacteur employé. De manière générale, les charges organiques appliquées peuvent soit inhiber la production d' $H_2$  en raison de l'accumulation des produits de fin de fermentation soit conduire à une conversion du substrat inférieure en dépassant les capacités des micro-organismes. Par exemple, (Hafez et al., 2010) ont vu, en doublant l'OLR de leur réacteur de 103 à 206  $g_{COD}.L^{-1}$  (substrat glucose), le rendement en  $H_2$  diminuer de 2,8 à 1,1  $mol_{H_2}.mol_{Glu}^{-1}$ , la conversion du glucose de 94,8% à 40,5% tandis que la concentration en métabolites finaux comme l'éthanol, le propionate ou le butyrate a augmenté.

En conclusion, si les recherches ont permis de comprendre l'effet de ces paramètres sur la FS, leur optimisation reste très dépendante du substrat employé et de la configuration du réacteur.

## 2. La fermentation sombre : une étape intermédiaire de la bioraffinerie environnementale

Les recherches sur la FS ont permis une meilleure compréhension des phénomènes et des communautés impliqués pendant ce processus et, *in fine*, d'en optimiser les paramètres opératoires afin d'obtenir une meilleure production d'hydrogène. Les chiffres du **Tableau 2**, bien que calculés sur un nombre très limité d'études, indiquent ainsi que les rendements expérimentaux peuvent se rapprocher des rendements théoriques maximum. Toutefois, la recherche de performances se heurte nécessairement à la limite biologique des micro-organismes. Nous avons ainsi débuté cette synthèse bibliographique en décrivant le processus de fermentation : un processus anaérobie durant lequel l'oxydation du substrat initial est incomplète. Cette définition a pu être illustrée par l'ensemble des voies métaboliques que nous avons présentées ci-dessus : quelle que soit la voie empruntée par les HPB, la production d'hydrogène s'accompagne de la production de métabolites.

**Tableau 2 : Comparaison entre rendements théoriques et rendements expérimentaux.** Les rendements expérimentaux ont été calculés à partir des données des quatre premières lignes (voie PFOR) ou des quatre lignes intermédiaires (voie PFL) du **tableau 3**.

Voie métabolique	Equation	Rendement en H <sub>2</sub> maximum (gDCO.gDCO <sup>-1</sup> )	Rendement moyen observé (gDCO.gDCO <sup>-1</sup> )
PFOR (acétate)	(1)	0,33	0,18
PFOR (mixte)	(3)	0,21	
PFL	(5)	0,17	0,14

Il en découle que les rendements en hydrogène de fermentation seront éloignés de l'unité et qu'entre 60% et 80% de la charge organique initiale se retrouvera dans les effluents de fermentation (Moscoviz et al., 2018). Bien que la manipulation génétique puisse permettre de dépasser cette limite métabolique, il est peu probable qu'une conversion totale du substrat en hydrogène voit jamais le jour, une telle conversion étant synonyme d'absence de croissance des microorganismes. Dès lors, outre la recherche d'amélioration des performances du procédé de fermentation, une autre question fondamentale a intéressé les chercheurs : comment valoriser cette matière organique résiduelle (Hallenbeck and Benemann, 2002) ? Dans les sections suivantes, nous commencerons par présenter la composition moyenne des effluents de fermentation avant de nous intéresser aux différentes voies de couplage possibles.

### 2.1. Composition des effluents de fermentation sombre

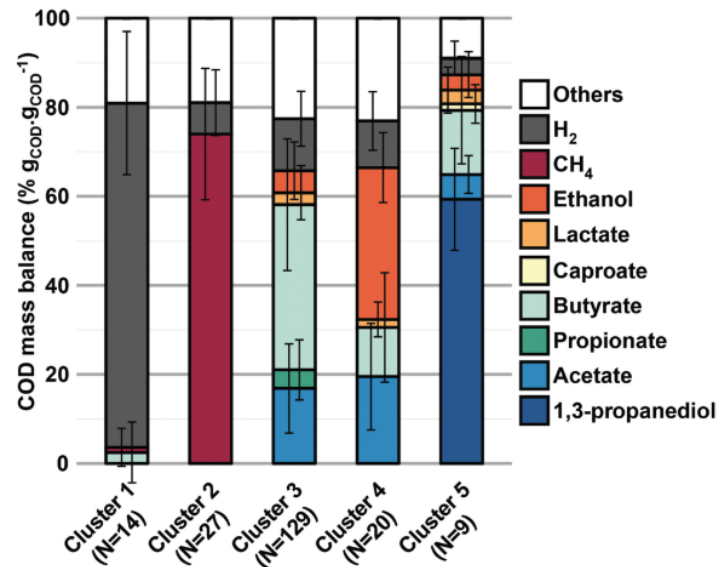
En raison de la complexité des voies de production d'hydrogène, de la diversité des communautés engagées, de leur métabolisme respectif et des conditions environnementales dans lesquelles elles évoluent, il est naturel de constater une diversité de chaque produit et de leurs proportions dans l'effluent de fermentation (Ghimire et al., 2015; Mariakakis et al., 2011). Néanmoins, sur la base des voies métaboliques présentées précédemment et des observations empiriques, il est possible de dégager trois grands profils de fermentation conduisant à des compositions distinctes en métabolites (**Tableau 3**).

Le premier groupe correspond à la voie « butyrate » (équation (3)) et conduit à la formation majoritaire d'acétate et de butyrate avec un ratio molaire A : B théorique de 0,66. On retrouve ce profil dans la plupart des études sur la fermentation sombre, probablement car les conditions de fermentation (prétraitement thermique, pH, ...) sont choisies pour le favoriser. Le deuxième groupe correspond à la voie « éthanol » (équation (4)) et conduit théoriquement à la formation d'acétate et d'éthanol dans un ratio molaire théorique 1 : 1. Ce type de fermentation est généralement rencontré lorsque des conditions spécifiques sont appliquées (traitement de l'inoculum par aération, souche pure d'*Ethanoligenens*, ...). La production d'éthanol peut également être observée par des *Clostridiales*, probablement lors de conditions de stress induisant un changement métabolique vers la solvantogénèse.

(Moscoviz et al., 2018) en étudiant et analysant systématiquement quelques 220 articles, ont pu mettre en évidence ces deux premiers groupes, et, comme le soulignent les auteurs, il apparaît que « les profils de fermentation sont relativement stables, en dépit de la grande diversité de substrats et de conditions de procédé de fermentation » (**Figure 3**). Dans cette figure proposée par les auteurs, les groupes 3 et 4, correspondant à la fermentation sombre de déchets alimentaires ou de glucose, apparaissent clairement associés aux profils « butyrate » et « éthanol » respectivement. Leurs travaux mettent également en évidence que le profil butyrate est retrouvé dans la majorité des études (129 articles). Malgré quelques variabilités, les compositions en AGV des deux profils correspondent globalement aux équations théoriques.

Le troisième groupe correspond à un système produisant du lactate. D'après l'analyse présentée ci-dessus, une fermentation lactique type ne semble jamais se dégager. Cependant, les auteurs ont écarté les fermentations « infructueuses » c'est-à-dire dégradant moins de 60% de la DCO initiale. Plusieurs études (**Tableau 3**) rapportent toutefois la présence de lactate en tant que métabolite majoritaire. Comme nous l'avons discuté en **section 1.1.3.**, ces fermentations peuvent conduire à l'échec du système et l'effluent de fermentation contient alors en majorité du lactate. Lorsque le système reste producteur, du butyrate et de l'acétate sont également retrouvés dans l'effluent. Pour ce profil de fermentation, les proportions en métabolites sont variables et dépendent fortement des conditions opératoires, notamment du HRT, de l'OLR et du pH du milieu (Asunis et al., 2019).





**Figure 3 : Identification des profils de fermentation par groupement hiérarchique.** Seuls les articles scientifiques rapportant plus de 60% de la DCO initiale sous forme de produits finaux sont pris en compte (222 articles). N correspond au nombre d'article de chaque groupement. Seuls les groupements ayant  $N > 5$  sont représentés. La figure est tirée de la figure 12 de l'article de (Moscoviz et al., 2018)

En résumé, les principaux métabolites fermentaires sont l'acétate, le butyrate, le lactate et l'éthanol, présents en différentes proportions selon le profil de fermentation. Les concentrations de ces métabolites sont évidemment fonction de la concentration en substrat organique de départ et du taux de conversion de ce substrat. (Moscoviz et al., 2018) rapportent ainsi une concentration moyenne en acétate et butyrate proche de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . Les auteurs soulignent toutefois que ces faibles concentrations sont dues aux faibles concentrations en substrats alimentant initialement le fermenteur. Dans certaines conditions, jusqu'à  $35,3 \text{ g.L}^{-1}$  d'acétate et  $21,4 \text{ g.L}^{-1}$  de butyrate ont été produits. D'autres métabolites comme le propionate, le valérate ou le succinate sont retrouvés mais sont la plupart du temps minoritaires. Certaines études rapportent la production de 1,3-propanediol, notamment lors de fermentation sur glycérol.

**Tableau 3 : Composition d'effluents de fermentation sombre.** Le tableau indique les rendements en H<sub>2</sub> (g<sub>COD.H2</sub>.g<sub>COD</sub><sup>-1</sup>) et les concentrations en métabolites (g<sub>COD</sub>.L<sup>-1</sup>) obtenues en fin de fermentation sombre pour différents substrats, inocula et prétraitements.

Substrat	[Substrat] (g <sub>COD</sub> .L <sup>-1</sup> )	Inoculum	H <sub>2</sub> (g <sub>COD</sub> . g <sub>COD</sub> <sup>-1</sup> )	Ac	Pr	Bu	Lac	EtOH	Ratio Ac : Bu	Référence
Amidon	20,0	BA (T)	0,08	1,6	0,8	7,0	0,5	-	0,23	(Arooj et al., 2008)
Lactose	12,3	BA (T)	0,09	1,0	-	2,6	0,4	-	0,39	(Palomo-Briones et al., 2018)
Glucose	7,5	BA (T)	0,17	1,0	0,0	0,9	0,1	0,2	1,11	(Fang et al., 2002)
Glucose	17,1	BA (T)	0,25	4,1	0,16	3,0	0,0	0,06	1,37	(Hafez et al., 2010)
Glucose	5,5	STEP (U)	0,08	0,8	0,2	0,2	-	1,5	4	(Song et al., 2011)
Molasse	5,0	STEP (A)	0,14	0,7	0,1	0,1	-	0,6	7	(Ren et al., 2018)
Molasse	8,0	STEP (A)	0,17	0,6	0,1	0,5	-	1,8	1,2	(Wang et al., 2013)
Molasse	7,5	STEP (U)	0,20	1,5	0,3	0,8	-	1,5	1,89	(Ren et al., 2007)
Déchets alimentaires	30,1 12,0	BA (T) BA (T)	0,00 0,07	0,2 5,8	0,4 0,5	0,5 4,1	4,6 6,3	- 1,5	0,4 1,42	(Santiago et al., 2019) (Moreno-Andrade et al., 2015)
Glucose	22,0	BA (T)	0,09	2,3	0,1	4,7	13,2	-	0,50	(Oh et al., 2004)
Petit lait de fromage	35,0	BA (T)	0,14	0,3	0,1	2,6	2,2	0,1	0,11	(Azbar et al., 2009)
Concentrations moyennes (g <sub>COD</sub> .L <sup>-1</sup> )				1,66	0,23	2,25	2,28	0,61	0,74	-
Concentrations moyennes (g <sub>C</sub> .L <sup>-1</sup> )				0,62	0,07	0,67	1,14	0,3	0,92	-

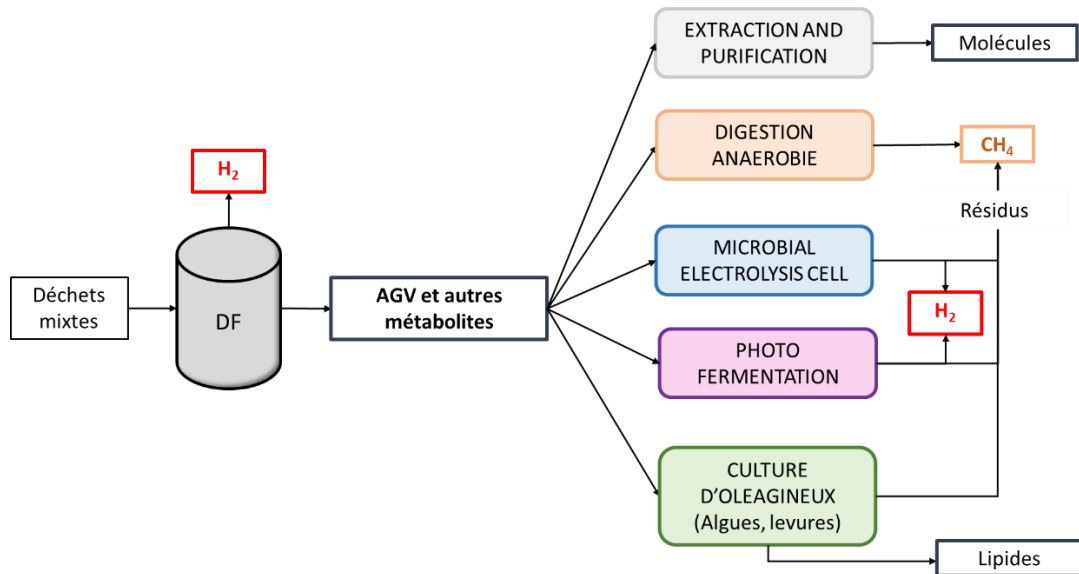
Ac : acétate ; Pr ; propionate ; Bu : butyrate ; Lac : lactate ; EtOH : éthanol. BA : Boues anaérobies ; STEP : Inoculum de stations d'épurations ; T : traitement thermique ; U : non traité ; A : traitement par aération

Les effluents de FS représentent dès lors un gisement conséquent de molécules organiques et plusieurs pistes ont été envisagées afin de valoriser cette charge organique (Ghimire et al., 2015) (**Figure 4**). D'une part, chacune de ces molécules présente des applications directes dans des domaines industriels tels que l'agro-alimentaire ou la chimie fine. Les effluents de FS peuvent ainsi être traités par divers procédés physico-chimiques afin de séparer et d'isoler chaque constituant (Aghapour Aktij et al., 2020). D'autre part, la FS peut également être couplée avec divers procédés biologiques pour la production d'énergie notamment, les effluents servant de substrat pour la croissance d'autres micro-organismes. Dans le cadre de cette thèse, nous nous limiterons à la description de ces derniers.

### 2.1. Intégration de la fermentation sombre dans la bioraffinerie environnementale

#### 2.1.1. Couplage avec la méthanisation

La FS étant une étape intermédiaire de la digestion anaérobie, associer la FS et la méthanisation apparaît comme une voie de couplage naturelle (Ting and Lee, 2007; Ueno et al., 2007). Les acides organiques générés et les substrats non dégradés lors de la fermentation sombre peuvent alimenter un réacteur de méthanisation, permettant une réduction quasi-totale de la charge organique initiale, récupérée sous forme de méthane. Plusieurs auteurs ont pu mettre en évidence la faisabilité d'un tel système couplé lors d'opérations de long terme (Cavinato et al., 2012). La mise en place d'un tel système à l'échelle industrielle est d'ailleurs pour le moment le plus plausible, puisqu'il peut s'appuyer sur les infrastructures de méthanisation déjà existantes. Ce système présente par ailleurs plusieurs avantages. D'une part, découpler les deux étapes de la digestion anaérobie permet de les optimiser individuellement, les paramètres opératoires de la fermentation et de la méthanisation étant sensiblement différents. Ceci se traduit en une augmentation du rendement global du procédé (Xia et al., 2016). D'autre part, le méthane obtenu peut être reformer pour obtenir d'avantage d' $H_2$ , ou bien l' $H_2$  obtenu par fermentation sombre peut être ajouté au méthane pour obtenir du biohythane. Ce biogaz présente des propriétés de combustion réduisant son impact environnemental comparé au méthane seul.



**Figure 4 : Intégration de la fermentation sombre dans la bioraffinerie environnementale.** La fermentation sombre permet de produire un effluent riche en molécules à haute valeur ajoutée à partir de déchets complexes. Ces effluents peuvent servir de plateforme pour plusieurs autres procédés visant la production de biogaz ( $\text{CH}_4$  ou  $\text{H}_2$ ) ou de biocarburants (lipides). La digestion anaérobie reste une étape finale de traitement des résidus organiques.

### 2.1.2. Couplage avec des systèmes producteurs d'hydrogène

La dégradation des acides organiques étant principalement limitée par des aspects thermodynamiques, un apport externe d'énergie aux micro-organismes leur permet de convertir ces composés en hydrogène. Il est alors possible d'augmenter la quantité d'hydrogène produite et ainsi se rapprocher du rendement idéal de  $1,0 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{H}_2 \cdot \text{g}_{\text{DCO}}^{-1}$  ( $12 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{Glu}}^{-1}$ ). Deux sources d'énergie distinctes ont été à ce jour envisagées, conduisant à deux systèmes biologiques différents.

Dans le premier cas, l'énergie supplémentaire est apportée par la lumière et la conversion des acides organiques est réalisée par des bactéries pourpres non sulfureuse (PNSB) dans un processus de photo-fermentation (PF). La production d'hydrogène s'y fait en conditions anaérobies en présence de lumière grâce à des nitrogénases. Ces enzymes permettent normalement la conversion de l'azote gazeux en ammonium. En absence de  $\text{N}_2$ , l'enzyme permet la réduction de protons en hydrogène (Bundhoo, 2017; Koku et al., 2002).

Dans le second cas, l'énergie supplémentaire est fournie par l'électricité. Les systèmes bio-électrochimiques se basent sur la capacité de certains micro-organismes comme *Geobacter*, *Pseudomonas* ou *Shewanella* à transférer des électrons hors de leur propre cellule (on parle d'exo-électrogènes). Ces bactéries peuvent utiliser une électrode (dans ce cas l'anode) comme accepteur d'électrons, permettant l'oxydation de substrats organiques en protons et CO<sub>2</sub>. Un courant électrique est alors généré : on parle de pile à combustible microbienne (MFC pour Microbial Fuel Cell). Dans un système MFC, les protons sont alors réduits en eau : le potentiel généré par la réaction d'oxydation d'acétate en conditions standard (25°C, 1 bar, pH 7), mesuré par rapport à l'électrode normale à hydrogène, est de -0,279V, insuffisant pour permettre la réduction des protons en hydrogène à la cathode (-0,414V). Ainsi, en appliquant un courant électrique supplémentaire (théoriquement 0,14 V), la réaction de réduction devient possible. On parle alors de cellule d'électrolyse microbienne (MEC) (Liu et al., 2005; Logan et al., 2008).

Les acides organiques produits lors de la FS pourraient ainsi alimenter des réacteurs de PF ou de MEC, permettant une conversion stœchiométrique du substrat initial en hydrogène. Ce genre de système a d'ailleurs été proposé pour la production d'énergie et le recyclage des nutriments lors de missions sur Mars (Lee et al., 2007) ! Plusieurs études rapportent une augmentation du rendement en hydrogène global en utilisant l'un des deux systèmes couplés par rapport à la FS seule (Bundhoo, 2017). (Moscoviz et al., 2018) rapportent que la production moyenne est de 0,255 g<sub>D<sub>CO-H<sub>2</sub></sub></sub>.g<sub>D<sub>CO</sub></sub><sup>-1</sup> et de 0,479 g<sub>D<sub>CO-H<sub>2</sub></sub></sub>.g<sub>D<sub>CO</sub></sub><sup>-1</sup> pour le système FS/PF et le système FS/MEC respectivement, significativement plus élevés que pour les systèmes FS seuls.

Ces systèmes présentent toutefois plusieurs limitations pratiques liées à la composition même de l'effluent. Si l'acétate, utilisé en tant que substrat modèle, est particulièrement adapté pour les deux voies de couplage, les autres acides organiques sont moins facilement dégradés (Liu et al., 2012; Uyar et al., 2009). L'acétate et le butyrate sont inhibiteurs à des concentrations trop élevées, et particulièrement aux pH de sortie des fermenteurs sombre, probablement à cause de la forme non dissociée des acides. Dans le cas de la PF, les nitrogénases sont particulièrement sensibles non seulement à l'oxygène (imposant des conditions anaérobies strictes) mais également à la présence d'azote dans des faibles concentrations de l'ordre du µM (Koku et al., 2002). Le contenu en ammonium dans les effluents de FS, issu de la dégradation des protéines et des acides aminés, implique alors l'utilisation de mutants ou de prétraitements (Adessi et al., 2012; Cheng et al., 2012), ou de substrats présentant un ratio C:N élevé.

### 2.1.3. Couplage avec la culture de micro-organismes oléagineux

Actuellement, le biodiésel est majoritairement produit à partir d'huiles végétales comestibles telles que le tournesol ou la palme. Ces procédés posent toutefois des questions éthiques majeures telles que la compétition pour une surface de terre arable limitée (dilemme « food vs fuel ») alors que la population mondiale ne cesse d'augmenter (Harvey and Pilgrim, 2011). Une alternative potentielle à la production de biodiésel végétal est d'utiliser certains micro-organismes, qualifiés d'oléagineux, dont la composition en lipides se rapproche de celles des végétaux. Arbitrairement, on considère qu'un micro-organisme est oléagineux s'il peut accumuler plus de 20% de son poids sec sous forme de lipides (Ratledge, 1994). Toutefois, le développement des lipides microbiens est freiné, entre autres, par leur coût de production élevé comparativement à celui des huiles végétales. La recherche s'est notamment concentrée sur deux types de micro-organismes : les levures (Christophe et al., 2012) et les microalgues (Chisti, 2007). Dans le cas des levures, le substrat de prédilection, le glucose, peut représenter jusqu'à 80% du coût de matières premières (Koutinas et al., 2014). Dans le cas des microalgues cultivées en autotrophie la demande en dioxyde de carbone, en nutriments minéraux (azote et phosphore) (Chisti, 2013) et plus généralement leurs contraintes physiologiques (Kenny and Flynn, 2017) limitent sévèrement leur productivité et leur potentiel commercial. Certaines microalgues peuvent être cultivées en hétérotrophie à partir de glucose, mais le même problème que pour les levures se pose alors. Les AGV issus de la FS pourraient servir de substrat de substitution pour la croissance de micro-organismes oléagineux afin de réduire en partie leur coût de production. Le **Tableau 4** rassemble quelques résultats de la littérature obtenus en cultivant des levures ou des microalgues sur des effluents de fermentation, réels ou synthétiques.

Comme pour les autres systèmes biologiques présentés ci-dessus, cette stratégie présente plusieurs verrous, notamment liés à la complexité des substrats et aux concentrations inhibitrices. L'étude de ces verrous fait l'objet de cette thèse, en particulier dans le cadre de la croissance de microalgues. Dans les sections suivantes, nous commencerons par définir les microalgues et présenterons leur métabolisme. Par la suite, nous présenterons de manière détaillées les différents verrous inhérents à ce couplage.

**Tableau 4 : Production de lipides microbiens à partir d'AGV.** Le tableau recense certaines études traitant de la production de lipides à partir de microalgues (première moitié) ou de levures (deuxième moitié).

Souche	Source d'AGV et concentration	Biomasse (g.L <sup>-1</sup> )	Lipides	Référence
<i>Auxenochlorella protothecoïdes</i>	2 g.L <sup>-1</sup> Ac : Pr : Bu = 8 : 1 : 1	0,65	0,317 g.L <sup>-1</sup>	(Fei et al., 2015a)
<i>Auxenochlorella protothecoïdes</i>	FS	2,52	0,30 g.L <sup>-1</sup>	(Patel et al., 2021a)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	10,62 g.L <sup>-1</sup> Ac, Pr, Bu, Va, Cap	1,37	0,14 g.L <sup>-1</sup>	
<i>Chlorella vulgaris</i>	FS 13,7 g <sub>DCO</sub> .L <sup>-1</sup>	4,23	Près de 15%	(Cho et al., 2015)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5 g.L <sup>-1</sup> Ac : Pr : Bu = 8 : 1 : 1	2,05	19,02%	(Moon et al., 2013)
<i>Scenedesmus sp.</i>	FS Ac, 0,73 g.L <sup>-1</sup> Bu, 0,59 g.L <sup>-1</sup> EtOH, Pr, Lac : traces	1,12	0,4 g.L <sup>-1</sup>	(Ren et al., 2018b)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Ac, 12 g.L <sup>-1</sup>	5,98	30,76%	(Fontanille et al., 2012)
	Pr, 8 g.L <sup>-1</sup>	3,38	25,73%	
	Bu, 12 g.L <sup>-1</sup>	3,39	25,07%	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Ac, 5 g.L <sup>-1</sup>	2,41	0,72 g.L <sup>-1</sup>	(Gao et al., 2017)
	Pr, 5 g.L <sup>-1</sup>	1,40	0,31 g.L <sup>-1</sup>	
	Bu, 5 g.L <sup>-1</sup>	1,43	0,23 g.L <sup>-1</sup>	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	FS	3,5	18,3%	(Llamas et al., 2020a)
<i>Cyberlindnera saturnus</i>	Ac, 3,2 g.L <sup>-1</sup> Pr, 1,3 g.L <sup>-1</sup>	2,2	29,4%	
<i>Rhodotorula toruloides</i>	IsoBu, 0,5 g.L <sup>-1</sup> Bu, 2,5 g.L <sup>-1</sup>	2,5	19,9%	
<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	IsoVa, 0,7 g.L <sup>-1</sup> Va, 1,2 g.L <sup>-1</sup>	2,4	32,6%	
<i>Lipomyces lipofer</i>	Cap, 0,6 g.L <sup>-1</sup>	2,7	10,5%	

Ac : acétate ; Pr : propionate ; Bu : butyrate ; IsoBu : isobutyrate ; IsoVa : isovalérate ; Va : valérate ; Cap : caproate. L'acronyme « FS » désigne les études portant sur l'utilisation d'effluents réels.

### 3. Les microalgues : définition et métabolismes principaux

#### 3.1. Qu'est-ce qu'une microalgue ?

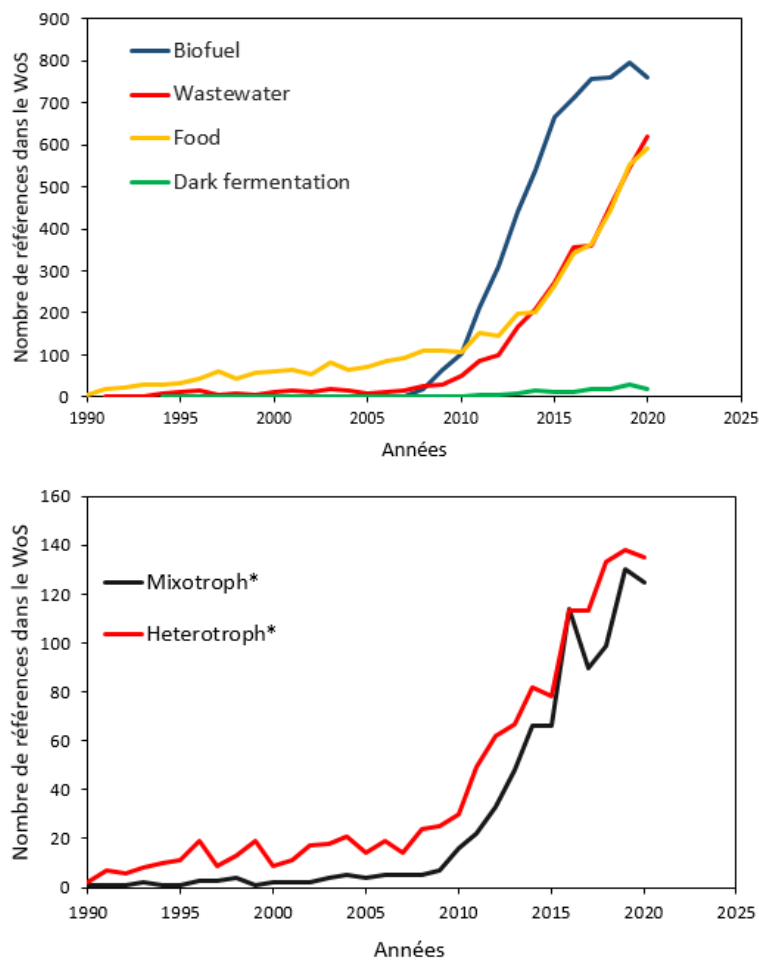
Les microalgues constituent à l'origine un groupe polyphylétique artificiel, créé pour regrouper une grande variété d'organismes unicellulaires ou coloniaux capables de réaliser la photosynthèse et la photolyse de l'eau. Dans son acception la plus large, le groupe rassemble également les cyanobactéries procaryotes (Guiry, 2012). Nous retiendrons la définition les excluant pour ne retenir que les eucaryotes. Certaines espèces ont perdu leur appareil photosynthétique mais sont néanmoins qualifiées ainsi par proximité phylogénétique avec leurs voisines (e.g. *Euglena longa*, *Polytomella caeca* ou *Cryptocodinium cohnii*). Une définition plus englobante définirait les microalgues comme des microorganismes ayant acquis, d'une façon ou d'une autre, des chloroplastes, fonctionnels ou non (Gibbs, 1993). Ainsi, la théorie de l'endosymbiose et le suivi de l'histoire évolutive des plastes, notamment photosynthétiques, permettent d'expliquer le polyphylétisme du groupe et son incroyable diversité (Keeling, 2004). Le meilleur consensus actuel répartit les microalgues au sein de quatre super-groupes eucaryotiques : *Archaeplastida*, *Chromalveolata*, *Rhizaria* et *Excavata* (Heimann and Huerlimann, 2015).

Entre 33 000 et 44 000 espèces sont actuellement recensées et certains auteurs estiment à plus de 72 000 le nombre d'espèces de microalgues (Guiry, 2012). Pour autant, un nombre très limité d'espèces est actuellement étudié et un nombre encore plus restreint fait l'objet d'une production à l'échelle industrielle. Une revue portant sur la production scientifique entre 1991 et 2011 révèle par exemple que seules une vingtaine d'espèces étaient alors étudiées, avec une prépondérance des genre *Chlorella* et *Chlamydomonas*. (Larkum et al., 2012). Les auteurs soulignent par ailleurs que 70% des études analysées ne comparent pas les genres de microalgues entre eux. Cette tendance s'est par la suite confirmée, comme le montre l'analyse de la littérature publiée entre 2007 et 2017 par (Chen et al., 2019). Ainsi, dans huit domaines de recherche sur les douze délimitant l'étude, près d'un tiers des publications porte sur le genre *Chlorella* uniquement. Un nombre conséquent de souches est pourtant disponible dans les collections publiques. La collection de culture d'algues de l'Université de Göttingen (SAG) rassemble par exemple près de 2300 espèces de microalgues.



### 3.2. Application et utilisations des microalgues

Produire des biocarburants à partir de microalgues n'est pas une idée neuve. La première motivation de la culture des microalgues remonte en effet aux années 1940-50, en période de pénurie alimentaire, où elles furent envisagées comme source alternative de protéines, lipides et sucres. Leur taux de protéines, les plus importants étant mesurés pour les espèces *Chlorella* (51 – 58 % du poids sec), font en effet des algues une source de protéines alternatives, pour les humains ou l'aquaculture (Becker, 2007). Les microalgues accumulent par ailleurs des lipides (entre 20-50% de poids sec pour la plupart des espèces) sous forme d'acides gras polyinsaturés. Cette dernière propriété rend les microalgues attractives pour la production de diésel biosourcé et a attiré l'intérêt de plusieurs programmes de recherche au cours des quarante dernières années. Entre 1978 et 1996, un programme de recherche, l'« Aquatic Species Program », est lancé aux Etats-Unis par le département de l'énergie. Ce programme de recherche fut initié à la suite du choc pétrolier des années 1970 : la hausse des prix du pétrole pousse à chercher de nouvelles sources d'énergie. En 1995, le programme se termine, en raison de coupes budgétaires, afin de favoriser des technologies plus prometteuses (le bioéthanol notamment). Une des conclusions du rapport, à l'époque, est que les productivités en biomasse et en lipides sont inférieures à celles requises pour que la technologie soit économiquement viable. Une autre conclusion est que l'application la plus probable des microalgues dans un futur proche sera l'intégration avec le traitement d'eaux usées (Sheehan John et al., 2012). La recherche dans ce domaine stagne alors pendant une dizaine d'années, jusqu'à, entre autres, la publication en 2007 d'une revue intitulée « Biodiesel from microalgae » (Chisti, 2007), et une année plus tard d'une revue intitulée « Biodiesel from microalgae beats bioethanol » du même auteur. Par ailleurs, en 2008, un nouveau pic pétrolier est atteint, parallèlement à la crise des subprimes. On assiste alors à un regain d'intérêt pour le biocarburant de microalgues, et des efforts considérables de recherche sont menés dans les années suivantes (**Figure 5**).



**Figure 5 : Développement de la recherche microalgale.** Nombre de publications référencées dans le Web of Science (WOS) au cours des trente dernières années. La recherche a été effectuée en indiquant les mots clés « microalg\* AND X », X étant l'un des mots clés indiqué en légende.

Malgré ces investissements, plusieurs verrous continuent de limiter le développement de la culture de microalgues. Les coûts de production restent globalement trop élevés pour un produit à faible valeur ajoutée comme le biodiésel, et ceux-ci doivent être considérablement réduits afin de rendre le biodiésel de microalgues économiquement attractif (Barsanti and Gualtieri, 2018). L'intégration de la culture de microalgues avec le traitement d'eaux usées permet de réduire l'utilisation d'eau fraîche, d'engrais azotés et phosphorés tout en rendant un service de dépollution mais ne conduit pas à des productivités et des densités de cellules suffisantes pour assurer la rentabilité du procédé (Pittman et al., 2011). Ceci est en partie dû au mode de culture

autotrophe, où les algues fixent le CO<sub>2</sub> pour réaliser la photosynthèse, qui dépend entre autres de la lumière. Ceci implique des productivités surfaciques, dépendantes des conditions climatiques, et des densités de biomasse faibles (Brennan and Owende, 2010). Au contraire, la culture hétérotrophe ou mixotrophe, c'est-à-dire associée à la consommation de carbone organique, permet d'obtenir des productivités en biomasse et en lipides volumiques associée à des densités de cellules plus élevées (Perez-Garcia et al., 2011). Cependant, le principal substrat étudié en hétérotrophie est le glucose : son prix élevé ne permet pas d'envisager son utilisation pour produire du biodiesel. L'utilisation d'effluents riches en matière organique, comme ceux de fermentation sombre (FS) a été alors proposée par plusieurs auteurs comme substrat de culture de faible coût (Liu et al., 2013; Patel et al., 2021b; Ren et al., 2018; Turon et al., 2015b).

### 3.3. Modes trophiques et métabolismes du carbone

Pour maintenir son activité biologique et produire de la biomasse, un organisme vivant doit utiliser une source de carbone pour servir d'architecture à sa matière, une source d'énergie pour servir les réactions propres à son métabolisme et une source d'électrons pour générer du pouvoir réducteur. On peut ainsi classer les organismes selon leurs modes trophiques, c'est-à-dire selon la nature de la source d'énergie ou de carbone utilisée par les micro-organismes. Les algues possèdent trois modes trophiques principaux. En photo-autotrophie, les algues utilisent le CO<sub>2</sub> et la lumière pour se développer par photosynthèse. Elles peuvent par ailleurs, à l'instar des organismes hétérotrophes, assimiler des substrats organiques simples comme l'acétate et le glucose pour se développer. Enfin, en présence de composés carbonés, de lumière et de CO<sub>2</sub>, les algues sont cultivées en « mixotrophie » ou « photo-hétérotrophie ».

#### 3.3.1. Autotrophie

Le métabolisme autotrophe des algues photosynthétiques repose sur la photosynthèse et l'assimilation de carbone inorganique (sous forme de CO<sub>2</sub> atmosphérique ou dissous) en présence de lumière. La photosynthèse se déroule en deux étapes : la phase claire et la phase sombre. Pendant la phase claire, l'énergie lumineuse est captée via les complexes récolteurs de lumière (les pigments) tels que la chlorophylle située dans les thylakoïdes des chloroplastes, au niveau des photosystèmes (PS). L'énergie lumineuse est utilisée dans le PSII pour réaliser la photolyse de l'eau en O<sub>2</sub>, libérant des électrons et des ions H<sup>+</sup>. Les électrons sont transférés par différents complexes (plastoquinone, cytochrome) jusqu'au PSI, où la réduction du NADP<sup>+</sup> en

NADPH a lieu. Les ions  $H^+$  créent une différence de pH dans le lumen, et leur excrétion vers le stroma permet la création d'ATP via l'ATP synthase. Pendant la phase sombre, 9 ATP sont réinvestis dans le cycle de Calvin-Benson afin de créer du glyceraldehyde-3-phosphate (G3P), à partir de 3 molécules de  $CO_2$  fixées par l'enzyme ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCo). Deux molécules de G3P sont utilisées comme précurseurs pour la fabrication du glucose.

### 3.3.2. Hétérotrophie

En présence de carbone organique et en absence de lumière, certaines espèces d'algues peuvent croître en hétérotrophie par respiration en condition aérobie. Dans la majorité des cas, la source d'électrons est aussi le composé organique qui est respiré. La plupart des microalgues peuvent assimiler des substrats carbonés simples tels que le glucose lorsque ceux-ci sont présents dans le milieu (Perez-Garcia and Bashan, 2015). Les métabolites principaux des effluents de FS peuvent servir de substrats organiques pour la croissance hétérotrophe de microalgues. Cependant, la vitesse de consommation ainsi que le rendement en biomasse dépendent de l'espèce considérée ainsi que de la nature du substrat. La consommation d'acétate a été mise en évidence pour plusieurs espèces de microalgues, notamment par des chlorophytes telles que *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus obliquus* (**Tableau 5**) mais également par d'autres genres tels que des souches d'*Euglena gracilis* (Heinrich and Cook, 1967) ou *Cryptocodinium cohnii* (Chalima et al., 2019). Les taux de croissance et les rendements en biomasse dépendent des conditions de culture mais sont la plupart du temps supérieurs à ceux obtenus en autotrophie (Perez-Garcia and Bashan, 2015). Certains auteurs affirment que l'acétate est activement importé dans la cellule via un transporteur monocarboxylate proton (MCT) comme chez les autres eukaryotes (Perez-Garcia et al., 2011), mais aucune preuve directe n'est trouvée dans la littérature. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, après transport, l'acétate est converti en acétyl-CoA via l'acétyl-CoA synthétase (ACS) ou via une réaction en deux étapes (acétate kinase suivie de la phosphate acetyl transférase). L'acétyl-CoA peut servir d'intermédiaire dans le cycle de Krebs dans les mitochondries et conduit à la formation d'ATP et de pouvoir réducteur (NADH). Cependant, ce cycle ne permet pas la formation de biomasse dans le noir par simple consommation de composés  $C_2$  comme l'acétate, les étapes de décarboxylation de l'isocytate conduisant à la formation de deux molécules de  $CO_2$  (Johnson and Alric, 2013). Le cycle du glyoxylate, situé

au niveau des glyoxysomes ou peroxysomes (organites spécialisés), permet de contourner les étapes de décarboxylation et permet la synthèse de succinate (C<sub>4</sub>) à partir de l'isocitrate, de malate (C<sub>4</sub>) et d'oxaloacétate (C<sub>4</sub>) via la glyoxylate et la malate synthase. Ces différents composés peuvent finalement être converti en phosphoénolpyruvate (PEP) et rejoindre les étapes de la néoglucogenèse, permettant par la suite la formation des composés carbonés. L'enzyme clé de ce cycle est l'isocitrate lyase : sa délétion entraîne chez *C. reinhardtii* une incapacité à croître sur l'acétate dans le noir (Plancke et al., 2014). Les acides aminés restent synthétisés à partir des intermédiaires du cycle de Krebs.

La consommation du butyrate simple par des souches pures, axéniques et en conditions contrôlées, est en revanche peu étudiée. La majorité des recherches portant sur le métabolisme du carbone chez les microalgues se concentrant sur l'acétate, les mécanismes de transport et d'assimilation du butyrate restent inconnus. Le butyrate est probablement activement transporté sous la forme anionique (BuOO<sup>-</sup>) via un transporteur monocarboxylate/proton comme l'est l'acétate. Le métabolisme suivant le transport n'est pas entièrement élucidé, mais il est probable que le butyrate soit oxydé en acetyl-CoA via une voie de  $\beta$ -oxydation dans les glyoxysomes (Baroukh et al., 2017). La plupart des espèces citées ci-dessus peuvent également assimiler le butyrate, avec néanmoins des productivités en biomasse de 5 à 10 fois inférieures à l'acétate (**Tableau 5**).

De la même manière, des informations détaillées à propos du métabolisme du lactate sont rares. Le lactate peut d'abord être converti en pyruvate via l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH), enzyme retrouvée chez *C. sorokiniana* et *C. reinhardtii* (Gruber et al., 1974; Husic and Tolbert, 1987). L'enzyme permet de produire ou d'oxyder le D-lactate depuis ou en pyruvate. Elle participe au recyclage du NADH en condition anaérobie (Burgess et al., 2016). Plusieurs auteurs indiquent que ce substrat n'est pas consommé par les espèces de *Chlorella*, que ce soit en hétérotrophie (Turon et al., 2015a) ou en mixotrophie (Liu et al., 2013a). En revanche, la consommation de lactate a été rapportée pour *Euglena gracilis* (Calvayrac et al., 1981).

Enfin, la consommation d'éthanol semble également très spécifique y compris au sein du même genre. La molécule peut diffuser passivement à travers la membrane cellulaire et est probablement oxydée en acetyl-CoA via l'enzyme alcool/aldéhyde déshydrogénase (ADH) (Atteia et al., 2003). Néanmoins, bien que *C. reinhardtii* possède cette enzyme, la souche ne peut pas consommer l'éthanol ou le butanol externe (Catalanotti et al., 2013; Jiang et al., 2017)

mais l'espèce apparentée *Polytomella sp.* peut croître en présence de 40 mM d'éthanol et le consommer (Atteia et al., 2000). L'ajout d'éthanol a pu augmenter la production de biomasse de *Scenedesmus obliquus* comparée à l'autotrophie (Matsudo et al., 2017) alors qu'un isolat de *Scenedesmus sp.* a été incapable de consommer l'éthanol pendant une culture continue (Ren et al., 2018b).

**Tableau 5 : Caractéristiques de croissance de souches vertes sur acétate et butyrate. H :** hétérotrophie ; M : mixotrophie ;  $\mu$  : taux de croissance ;  $Y_{X/S}$  : rendement en biomasse

Souche	Substrat	[Substrat] (g.L <sup>-1</sup> )	Métabolisme	$\mu$ (j <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (gx.gs <sup>-1</sup> )	Reference
<i>Acutodesmus obliquus</i>	Acétate	0,6	H	0,4	-	Combres et al, 1994
	Acétate	0,6	M	1,2	-	Combres et al, 1994
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	Acétate	0,25 - 2,5	H	2,05	0,3	Turon et al, 2015
	Butyrate	0,18 - 0,45	H	0,22	0,53	Turon et al, 2015
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Acétate	0,25 - 2,5	H	2,23	0,336	Turon et al, 2015
	Acétate	3	H	4,32	0,4	Abiusi et al, 2020
	Acétate	0,75	M	4,14	0,64	Turon et al, 2016
	Butyrate	0,18	H	0,16	0,62	Turon et al, 2015
	Butyrate	0,55	M	-	0,952	Turon et al, 2016
<i>Chlorella vulgaris</i>	Acétate	13,7	M	-	0,29	Yeh et al, 2012
	Acétate	1	M	-	0,8	Liu et al, 2012
	Butyrate	1	M	-	2,67	Liu et al, 2012

### 3.3.3. Mixotrophie

En mixotrophie, les algues associent les deux métabolismes, tirant leur énergie à la fois des composés organiques et de la lumière et utilisant le carbone organique et inorganique comme précurseurs carbonés pour synthétiser la biomasse. Ce mode de culture est à différencier de la photo-hétérotrophie, dans lequel une source de lumière est indispensable pour fournir de l'énergie aux cellules. La mixotrophie conduit généralement à des taux de croissance et des rendements supérieurs à la simple autotrophie ou l'hétérotrophie car les deux métabolismes peuvent se dérouler simultanément et non compétitivement. Le taux de croissance mixotrophe peut ainsi être exprimé comme la somme du taux de croissance hétérotrophe (assimilation du carbone organique) et du taux de croissance autotrophe (fixation du carbone inorganique) (Endo et al., 1977; Marquez et al., 1993). Dans certains cas, les taux de croissance ou rendements mixotrophes sont supérieurs à la somme de ceux observés en autotrophie ou hétérotrophie dans des conditions de culture identiques (Zhang et al., 2017). Ceci est dû à des synergies entre les deux métabolismes, permettant des économies d'atomes et d'énergie.

D'abord, l'oxygène produit par la photolyse de l'eau peut directement alimenter la phosphorylation oxydative des mitochondries. Le besoin en aération des cultures hétérotrophes peut ainsi être réduit (Abiusi et al., 2020) tout en réduisant l'accumulation d'oxygène au sein du milieu. Cette accumulation peut en effet conduire à du stress oxydatif par la formation de radicaux ou à une augmentation de la photorespiration. En mixotrophie, la présence d'acétate semble réduire la photo-inhibition notamment en interagissant avec le PSII, ce qui *in fine* réduit de même la production de radicaux oxygénés (Roach et al., 2013). (Xie et al., 2016) montrent également que la présence d'acétate permet de limiter les pertes de carbone par la photorespiration. Pendant la photorespiration, la RuBisCo capte de l'oxygène au lieu du CO<sub>2</sub> pour former du glycolate. Cette voie représente généralement une perte sèche en énergie et en carbone pour les cellules. En présence d'acétate, le glycolate peut être converti en glyoxylate et alimenter le cycle du glyoxylate dans les glyoxysomes, augmentant de fait la vitesse d'assimilation de l'acétate par rapport à l'hétérotrophie. Ces résultats coïncident avec ceux de (Cecchin et al., 2018), qui observent chez *C. sorokiniana* une surexpression du gène codant pour la glycolate oxydase, catalysant la conversion du glycolate en glyoxylate.

Inversement, le CO<sub>2</sub> issu du cycle de Krebs augmente localement la pression en CO<sub>2</sub>, qui peut être refixé par la RuBisCo. Ainsi, les enzymes induites par les faibles concentrations en

CO<sub>2</sub> telles que la carbonique anhydrase, la RuBisCo activase ou les mécanismes de concentration du carbone sont plus faiblement exprimées en mixotrophie qu'en autotrophie (Cecchin et al., 2018). Les rendements en biomasse sur le substrat peuvent donc approcher 1 g<sub>CX</sub>.g<sub>CS</sub><sup>-1</sup> (Abiusi et al., 2020) et l'émission en CO<sub>2</sub> est réduite comparée aux cultures hétérotrophes (Smith et al., 2015).

Enfin, le métabolisme visant la production de biomasse est optimisé. (Zhang et al., 2017) indiquent par exemple que pour *C. zofingiensis* cultivée sur glucose, l'activité de la RuBisCo et celle de la citrate synthase sont diminuées comparativement à la condition autotrophe et hétérotrophe, respectivement. Les auteurs suggèrent donc qu'en présence de lumière, les cellules pouvant tirer leur énergie des réactions lumineuses, une plus grande fraction de carbone organique (comparativement à l'hétérotrophie) peut être converti en biomasse. Le carbone n'était pas limitant, la fixation de CO<sub>2</sub>, et donc la régénération de la RuBisCo, peut être réduite (comparativement à l'autotrophie), ce qui conduit à une économie nette d'énergie.

### 4. Culture de microalgues sur les effluents de fermentation sombre : influence des paramètres opératoires

Comme pour tout processus biologique, la croissance des microalgues sur les substrats organiques, et plus généralement sur les effluents de FS, est influencée par plusieurs paramètres environnementaux abiotiques (concentration, lumière, pH, etc.) et biotiques (espèce considérée, présence d'autres espèces, etc.). Dans le cadre de cette thèse, nous nous limiterons à décrire les effets abiotiques principaux généraux influençant la croissance sans prendre en compte la dimension procédé (configuration du réacteur, mode de culture continu ou semi-continu).

#### 4.1. Influence des substrats carbonés

##### 4.1.1. Concentrations en substrat : inhibitions de la croissance

Dans le formalisme de Monod, le taux de croissance d'un organisme augmente avec la concentration en substrat, jusqu'à atteindre le taux de croissance maximum  $\mu_{max}$  de l'espèce considérée. En réalité, certains substrats peuvent avoir des effets délétères sur les micro-organismes lorsqu'ils sont trop concentrés. On parle alors d'inhibition de la croissance : le taux de croissance d'une espèce diminue en fonction de la concentration en substrat et de sa capacité



intrinsèque à s'accommoder des effets inhibiteurs du substrat. Lorsque l'inhibition est complète, le taux de croissance de l'organisme devient nul : aucune croissance n'est observée.

Dans le cas des microalgues, (Chen and Johns, 1994) ont été les premiers à rapporter ce genre d'inhibition chez *C. reinhardtii* en présence d'acétate. Le taux de croissance de la souche, cultivée en hétérotrophie, diminue rapidement en présence de plus de 0,5 g.L<sup>-1</sup> d'acétate. Une modélisation d'Haldane a permis aux auteurs de déterminer la constante d'inhibition,  $K_i$ , comme étant proche de 1,7 g.L<sup>-1</sup>. De la même manière, la phase de latence d'*Auxenochlorella protothecoïdes* a augmenté d'une journée en présence d'un mélange de 4 g.L<sup>-1</sup> d'AGV comparé à un mélange de 2 g.L<sup>-1</sup>. Augmenter la concentration jusqu'à 8 g.L<sup>-1</sup> a complètement inhibé la croissance de la souche (Fei et al., 2015a). La croissance hétérotrophe de *C. sorokiniana* et d'*A. protothecoïdes* a été également complètement inhibée en présence de 1,3 g.L<sup>-1</sup> d'acétate ou bien de 0,4 g.L<sup>-1</sup> butyrate (Turon et al., 2015a). Il apparaît que les AGV sont inhibiteurs de la croissance des microalgues à des concentrations relativement faibles, du moins en comparaison de la concentration en AGV possiblement récupérée en fin de fermentation (cf. **section 2.1**).

L'hypothèse la plus admise pour expliquer l'inhibition de la croissance par les AGV est l'accumulation des formes non dissociées des acides (RH) en présence de hautes concentrations. La forme RH est liposoluble et peut par conséquent traverser la membrane cellulaire. A l'intérieur de la cellule, où le pH est proche de la neutralité, la forme RH se dissocie, entraînant le relargage d'un anion et d'un proton. L'accumulation excessive d'anion à l'intérieur des cellules peut avoir un effet toxique tandis que le relargage de protons conduit à l'acidification du cytosol. Le maintien de l'homéostasie requiert de l'énergie, entraînant une demande excessive en ATP lorsque les RH sont en excès. En conséquence, les cellules manquent d'énergie pour la division cellulaire et la croissance ralentit, voire s'arrête complètement (Russell, 1992). Ces mécanismes d'inhibition par les RH ont été bien documentés pour les bactéries (Ricke, 2003) ou les levures (Casal et al., 2008), mais peu de données sont disponibles concernant leurs effets chez les microalgues.

L'éthanol, un des autres constituants des effluents de FS, peut également avoir des effets inhibiteurs sur la croissance des microalgues. Ce solvant est connu pour son effet détergent à de fortes concentrations, en raison de sa capacité à traverser la membrane lipidique des cellules. L'inhibition de la croissance microalgale par l'éthanol dépend des souches considérées. Par exemple, *Dunaliella teriolecta*, *Isochrysis galbana* ou *Monodus subterraneus* montre une

certaine tolérance à l'éthanol, leur croissance étant inhibée au-delà de 15 g.L<sup>-1</sup> d'éthanol (Okumura et al., 2001). D'un autre côté, la croissance de *C. vulgaris* est inhibée pour une concentration de 0,39 g.L<sup>-1</sup> d'éthanol (El Jay, 1996).

### 4.1.2. Comportement en mélange : assimilation diauxique des acides gras volatils

En présence d'un mélange complexe de substrats, les micro-organismes tendent à consommer les différents composés organiques de manière séquentielle : le composé le plus simple à assimiler pour le micro-organisme l'est en premier, suivi par les divers autres. Ce phénomène, découvert par Jacques Monod en 1942, est connu sous le nom de répression catabolique du carbone. L'exemple classique illustrant ce phénomène est l'assimilation du glucose et du lactose chez *Escherichia coli*. Bien que la souche sauvage puisse assimiler les deux sucres, la présence de glucose réprime l'expression de certains gènes requis pour la consommation du lactose. Il en résulte une assimilation dite diauxique : le glucose est consommé dans un premier temps, suivi par le lactose après une phase de latence nécessaire pour synthétiser de nouvelles enzymes. Cette assimilation diauxique est fortement dépendante du couple souche-substrat. Par exemple, la souche *Streptococcus thermophilus* consomme préférentiellement le lactose par rapport au glucose (Van Den Bogaard et al., 2000). Certaines souches possèdent quant à elles la faculté de consommer deux substrats simultanément. Les travaux de (Wu et al., 2021) ont permis ainsi d'isoler une souche de *Sphingomonas sanxanigenens* capables d'assimiler simultanément le glucose et le xylose.

Le phénomène de diauxie a été mise en évidence pour deux souches de microalgues, *Chlorella sorokiniana* et *Auxenochlorella protothecoïdes* croissant en hétérotrophie sur un mélange acétate : butyrate (A : B). Quels que soient les ratios A : B utilisés, l'acétate était toujours consommé avant le butyrate (Turon et al., 2015a), (Fei et al., 2015a). De la même manière, l'acétate a également eu un effet inhibiteur sur la consommation de glucose lors de la culture mixotrophe de *C. sorokiniana* sur un mélange glucose (0,6 g.L<sup>-1</sup>) et acétate (0,4 g.L<sup>-1</sup>) (Xie et al., 2020).

## 4.2. Influence des nutriments minéraux : azote et phosphore

### 4.2.1. Nutrition minérale

Les besoins en nutriments des cellules peuvent être estimés en déterminant leur composition élémentaire moyenne dans des conditions non carencées où leur taux de croissance est maximum. Un ratio classique est celui que Redfield détermina en 1934 pour le phytoplancton océanique, obtenu à partir de différents échantillons provenant des différents océans (Redfield, 1934). En analysant le contenu en C, N et P de ces échantillons ainsi que celui de l'eau de mer, il a observé pour la biomasse un ratio molaire moyen C:N:P de 106 : 16 : 1. Depuis, différents auteurs ont tenté d'actualiser ce ratio. Hillebrand et Sommer ont ainsi déterminé qu'un ratio C:N:P de 119 : 17 : 1 dans le milieu de culture permettait une croissance optimale (Hillebrand and Sommer, 1999). Ils ont déterminé qu'un ratio N:P inférieur à 13 indique une limitation en azote, tandis qu'un ratio supérieur à 22 est représentatif d'une limitation en phosphore. Plus récemment, certains auteurs, en compilant les données de quelques 100 605 mesures, ont pu réévaluer le ratio C:N:P de la matière organique en suspension dans les océans à 163 : 22 : 1 (Martiny et al., 2014). Ces différents ratios ne représentent toutefois qu'une moyenne, et, comme le soulignent les auteurs, sont sujets à plusieurs variations selon les espèces. Par ailleurs, il n'y a pas de raisons strictement biologiques pour que ce ratio soit ainsi fixé. En estimant les compositions biochimiques (ARN, acides aminés, protéines, lipides, polysaccharides) de différentes espèces d'algues, Geider et La Roche ont estimé que le ratio C:N est contraint biochimiquement entre 6 et 9 tandis que le ratio N:P peut présenter de grandes variations (de 5 à 40) en fonction du contenu en protéines, phospholipides et polyphosphates des cellules (Geider and La Roche, 2002). Les microalgues présentent en effet une certaine flexibilité métabolique quant à leur composition biochimique et s'adaptent en fonction de l'environnement dans lequel elles évoluent. Lorsque le milieu contient un excès d'N ou de P, elles peuvent en effet assimiler ces nutriments en excès par rapport à leurs besoins. Ce processus, qualifié de « consommation de luxe », amène les cellules à stocker le N et le P sous diverses formes : le rapport C:N:P de la biomasse s'en trouve ainsi modifié. Selon les espèces, l'azote peut être stocké sous forme de  $\text{NO}_3$  ou de  $\text{NH}_4$  (Lomas and Glibert, 2000). Le phosphore est, quant à lui, préférentiellement stocké sous forme de polymères linéaires d'orthophosphate, appelés polyphosphates (Eixler et al., 2006).

### 4.2.2. Carence azotée ou phosphorée : accumulation des polymères de stockage

A l'inverse, lorsque les macroéléments du milieu ne sont pas présents dans les proportions supportant le taux de croissance maximal de l'espèce considérée, la vitesse de croissance de l'espèce diminue. En particulier, lorsque l'azote ou le phosphore limitent la croissance, les cellules tendent à moins se diviser mais continuent à assimiler le carbone du milieu. Ce carbone est accumulé à l'intérieur de la cellule sous forme de composés carbonés tels que les lipides ou les polysaccharides. Par exemple, la productivité en biomasse de *C. vulgaris* cultivée en présence d'acétate a diminué de 137 à 70 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> lorsque la souche est transférée d'une condition non limitante en N et P à un régime de famine respectivement (Shen et al., 2016). En revanche, le rendement en acides gras a été parallèlement augmenté de près d'un facteur 3. Par ailleurs, la souche a été capable d'assimiler jusqu'à 362,9 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> d'acétate y compris en absence totale d'N ou de P. En cultivant *A. protothecoïdes* et *C. sorokiniana* sur un mélange d'AGV en hétérotrophie, (Patel et al., 2021a) ont trouvé qu'augmenter le C:N (m:m) de 20 à 60 entraînait une augmentation du contenu lipidique de 10% à approximativement 30% pour les deux souches. En conséquence, bien que le rendement en biomasse ait diminué de 22% et de 42% pour *A. protothecoïdes* et *C. sorokiniana* respectivement, le rendement en lipide a doublé pour les deux souches. Le changement de C:N n'a par ailleurs pas affecté la consommation d'acétate, de propionate ou de butyrate qui ont été entièrement consommés. En revanche, les AGV aux chaînes plus longues (valérate et caproate) ne l'ont pas été.

### 4.3. Effet de la lumière et du CO<sub>2</sub> : interactions entre autotrophie et hétérotrophie

Dans le cas du couplage avec la FS, l'objectif visé est la consommation la plus complète des AGV, et plus généralement des substrats organiques. La mixotrophie étant un processus combinant photosynthèse et hétérotrophie, les paramètres affectant l'un peuvent également affecter l'autre.

La présence de lumière affecte positivement la consommation des acides organiques. Comme indiqué précédemment, les rendements et taux de croissance en mixotrophie sont généralement supérieurs à ceux observés en hétérotrophie pure (Turon et al., 2015b), (Cecchin et al., 2018). (Boyle and Morgan, 2009) indiquent que la croissance mixotrophe de *C.*

*reinhardtii* est directement dépendante de l'intensité lumineuse. Les auteurs distinguent deux zones : au-dessous de  $0,8 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , la RuBisCo est inactive et le métabolisme est (photo) hétérotrophe. Au-dessus de cette valeur, l'activité de la RuBisCo augmente avec l'intensité lumineuse tandis que le cycle de Krebs est incomplet par inactivation totale de la 2-oxoglutarate décarboxylase. Quoiqu'il en soit, le rendement en biomasse augmente de manière constante avec l'intensité lumineuse. Ce phénomène est néanmoins dépendant de l'espèce considérée, puisque chez *C. sorokiniana*, les hautes intensités lumineuses contribuent à accélérer la consommation d'acétate (Xie et al., 2016). Dans le cas du butyrate, la présence de lumière semble indispensable. Par exemple, *C. sorokiniana* n'a quasiment pas consommé de butyrate dans le noir mais a pu croître sous une lumière continue de  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Turon et al., 2015b). De la même manière, la consommation du butyrate par *C. vulgaris* a été augmentée de 10% à 100% lorsque la culture passe de l'obscurité à une illumination continue avec  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Liu et al., 2013).

Outre la lumière, la concentration en carbone inorganique peut également influencer la photosynthèse et donc la mixotrophie. En condition de lumière et de  $\text{CO}_2$  saturants, (Peter B. Heifetz et al., 2000) ont montré que l'augmentation progressive d'acétate jusqu'à 29,4 mM a réduit la fixation de  $\text{CO}_2$  par *C. reinhardtii* jusqu'à 66% comparé au control autotrophe, sans affecter les taux de croissance. On peut donc supposer que la part de croissance hétérotrophe a augmenté conjointement avec l'augmentation de la concentration en substrat. De la même manière, (Liu et al., 2013) ont montré qu'en ajoutant des concentrations croissantes en butyrate (de 0,5 à  $1,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dans un milieu contenant  $2,72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de bicarbonate, la contribution du carbone organique au rendement en biomasse de *C. vulgaris* augmentait proportionnellement. Pour une intensité de lumière donnée, ces études indiquent que l'assimilation du carbone organique, quelle que soit sa nature, est favorisée par rapport à la capture du carbone inorganique. Cependant, d'autres résultats contradictoires indiquent que le carbone inorganique influence bien la mixotrophie d'une certaine manière. Par exemple, (Liu et al., 2013) ont également indiqué dans leur étude que le taux de croissance de la souche était ralenti lorsque la concentration en bicarbonate de sodium était supérieure à  $2,72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La consommation de glycérol par *Chlorella protothecoïdes* a été réduite d'un facteur 3,8 lorsque la culture était bullée avec de l'air enrichie en  $\text{CO}_2$  (5%) comparé à une condition de bullage avec air (Sforza et al., 2012). Dans le cas de *Nanochloropsis salina*, la consommation de glycérol est totalement inhibée dans la condition d'air enrichi en  $\text{CO}_2$ .

En conclusion, si la lumière a généralement une influence positive sur l'assimilation des substrats organiques, la présence de CO<sub>2</sub> a un effet plus contrasté et semblent dépendre grandement de l'espèce étudiée et du substrat organique.

### 4.4. Influence du pH

Comme pour la fermentation, le pH est un paramètre fondamental pour la culture des microalgues. Le pH joue principalement sur le pourcentage de formes ionisées ou non des diverses espèces chimiques en solution. Ces espèces, selon leurs formes chimiques, peuvent être toxiques ou non pour les cellules. Généralement, les formes non ionisées sont les plus inhibitrices, comme l'ammoniaque (NH<sub>3</sub>; pK<sub>a</sub> = 9,2) ou les RH décrits précédemment. Par ailleurs, les enzymes présentent des différences d'affinité pour l'une ou l'autre des espèces : certaines formes sont donc métabolisées plus ou moins efficacement. La prédominance d'une espèce chimique à un certain pH peut également ne pas coïncider avec la gamme de pH optimale d'activité des enzymes.

En autotrophie, la plupart des algues vertes, telles que *Chlorella* ou *Chlamydomonas*, sont capables de croître sur une gamme étendue de pH, allant de 4 à 10 mais les pH optimaux de croissance sont généralement compris entre 6,5 et 8 (Kumar et al., 2014; Mayo, 1997). La diminution de croissance aux pH alcalins est due à la non disponibilité du carbone inorganique : les microalgues vertes fixent par photosynthèse la forme CO<sub>2</sub> mais peuvent aussi assimiler le bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Grâce à des mécanismes de concentrations en carbone, elles sont capables de convertir le HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en CO<sub>2</sub> et ions hydroxyde (HO<sup>-</sup>), entraînant au passage une augmentation du pH du milieu. Cependant, aux pH > 10, où la forme carbonate (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) prédomine, ces mécanismes deviennent inefficients (Giordano et al., 2005).

Lorsque les algues sont cultivées en mixotrophie, les pH trop acides sont également inhibiteurs. Par exemple, en cultivant *Micractinium reisseri* YSW05 sur un effluent de fermentation sombre, contenant environ 30 mM d'acétate et 10 mM de butyrate (pK<sub>a</sub> = 4,8) aucune croissance n'a été observée pour un pH initial de 4,9. En fixant le pH initial de la culture à 6,8 ou à 8, la consommation d'acétate a augmenté de 83,7 à 90,5% et celle de butyrate de 31,8 à 54,5% respectivement. Toutefois, augmenter le pH au-delà de 9 a entraîné une diminution des rendements en biomasse (Hwang et al., 2014). L'inhibition de la croissance des microalgues aux pH acides en présence d'acétate est, comme décrit précédemment, probablement due à

l'accumulation d'acides non dissociés plutôt qu'à la valeur du pH en elle-même. Par exemple, il a été montré que la présence de 34,3 et 24,8 mM d'acide acétique aux pH 5 et 6 respectivement induisait un stress oxydatif, suivi de la mort cellulaire, chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Zuo et al., 2012). L'acidification du milieu de culture jusqu'à un pH de 4 avec des acides minéraux (HCl, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) en absence d'acide acétique n'a en revanche pas entraîné la mort cellulaire. D'un autre côté, la croissance de la souche était possible à pH 7 en présence de 150 mM d'acide acétique.

La consommation des AGV entraîne une augmentation rapide du pH et plusieurs auteurs montrent par ailleurs qu'un contrôle du pH est essentiel pour permettre une consommation complète des AGV par les microalgues. Par exemple, la consommation d'acétate par *C. sorokiniana* a entraîné l'augmentation du pH de culture 6,5 à 10 en moins de 2 jours (Yeh et al., 2012). En conséquence, la production de biomasse a été très faible (0,14 g.L<sup>-1</sup>) et uniquement 5% de l'acétate initial a été consommé. L'utilisation d'un système de contrôle de pH à 8,5 a permis la consommation de 90% de l'acétate et une production de biomasse plus conséquente (3,6 g.L<sup>-1</sup>). De la même manière, une augmentation du pH de 7,2 à 8,4 a été observée en moins de 2 jours lors de la culture de *C. vulgaris* en présence d'acétate (Shen et al., 2016). La meilleure productivité en biomasse (73,5 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) a été observée lorsque le pH était contrôlé à 8, tandis qu'elle a chuté 9,4 mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> en maintenant le pH à 9. La même observation a été faite pour la croissance de *C. vulgaris* sur un effluent brut de fermentation sombre : contrôler le pH à 7 a permis la consommation complète des AGV et une production quasi doublée par rapport au contrôle (pH laissé évoluer librement) (Uk et al., 2015).

## 5. Conclusion et objectifs

La fermentation sombre conduit à la coproduction d'un effluent riche en molécules organiques en proportions et natures variables selon les conditions de fermentation. La FS est toutefois un processus de dégradation incomplet : plus de 70% de la matière organique initiale sont convertis en métabolites fermentaires, majoritairement de l'acétate et du butyrate. La FS doit donc nécessairement être intégrée dans un schéma de bioraffinerie environnementale pour assurer la compétitivité et la soutenabilité du procédé. Plusieurs voies de couplages ont été proposées, parmi lesquelles la production de microalgues. Les microalgues peuvent en effet assimiler les substrats organiques simples tels que l'acétate et le butyrate en condition

hétérotrophe (absence de lumière) ou mixotrophe (présence de lumière). Plusieurs verrous limitent néanmoins ce couplage.

D'abord, l'inhibition par les substrats de la croissance des microalgues, dès  $0,1 \text{ g.C.L}^{-1}$  de butyrate notamment, limite fortement la concentration à laquelle les algues peuvent être exposées. Si plusieurs paramètres tels que la lumière, l'ajout d'acétate ou bien le ratio substrat : inoculum ont été évalués et ont permis de lever les inhibitions, les mécanismes et causes directes d'inhibition sont peu décrits chez les microalgues. Ensuite, l'acétate et le butyrate, les deux substrats majoritaires, ne sont pas assimilés identiquement par les algues. Si plusieurs paramètres abiotiques ont été expérimentés, le butyrate semble toujours plus lentement consommé que l'acétate. Enfin, l'étude de la littérature met en évidence le manque de connaissances liées au métabolisme hétérotrophe du carbone des microalgues. Si la consommation de l'acétate est bien décrite, et ce pour plusieurs espèces, la consommation d'autres substrats n'a fait l'objet que de peu d'études. L'une des raisons de ce manque de données tient certainement au fait que ces substrats ne supportent que faiblement la croissance de ces espèces : l'élucidation de leurs mécanismes de consommation n'a présenté que peu d'intérêt biotechnologique. Bien que l'incitation économique à utiliser des substrats complexes de faibles coûts, comme les effluents de FS, augmente cet attrait, il nous semble que la compréhension des mécanismes sur des substrats carbonés simples (c'est-à-dire non mélangés), à commencer par le butyrate, reste un prérequis. En ce sens, les quelques travaux se concentrant sur la physiologie des microalgues en présence de butyrate seul constituent donc des données précieuses de comparaison mais restent encore trop limitées à l'utilisation de chlorophytes robustes comme *Chlorella* ou *Scenedesmus*. Dans ce contexte, les travaux de cette thèse ont donc visé à apporter des éléments de réponse aux questions suivantes :

- Quelles sont les causes d'inhibition de la croissance des algues par les AGV ?
  - Quels paramètres abiotiques permettent de lever ces inhibitions ?
  - Existe-t-il des espèces plus tolérantes que d'autres aux AGV ?
- Quel est le potentiel de consommation du butyrate et de production de microalgues sur un effluent de FS ?
  - La faible consommation du butyrate est-elle uniquement due à l'inhibition provoquée par ce substrat ?
  - Existe-t-il des espèces plus capables que d'autres d'assimiler le butyrate ?
- Quelle est la réponse métabolique des microalgues au butyrate ?



## Chapitre 1 : Revue de littérature

Pour y répondre, nous avons choisi d'étudier la croissance de microalgues sur les deux composés majoritaires retrouvés dans les effluents de fermentation, l'acétate et le butyrate. Pour déterminer les causes d'inhibitions de la croissance, nous avons étudié l'effet de plusieurs paramètres abiotiques sur chacun des deux substrats pris séparément. Par la suite, le potentiel de production des microalgues a été évalué en mesurant les divers paramètres de croissance (taux de croissance, rendements en biomasse, en lipides et en sucres) lors de la culture sur un effluent synthétique représentatif d'un effluent réel. Afin d'apporter de la genericité aux résultats, nous avons multiplié le nombre d'espèces et de souches de microalgues étudiées. Enfin, le métabolisme du butyrate chez une espèce a été élucidé par une analyse protéomique comparative. Le détail des méthodes utilisés dans cette thèse sont décrits dans le **chapitre 2**.

# Chapitre 2

## Matériel et méthodes

### 1. Résumé des objectifs et méthodes

L'objectif de ce chapitre est de décrire exhaustivement les différentes méthodes et protocoles suivis tout au long de cette thèse. L'objectif, les méthodes particulières et les souches étudiées de chaque chapitre sont résumés dans le **Tableau 6**. Les différentes souches étudiées sont spécifiées en **section 2.1**.

**Tableau 6 : Résumé des objectifs, méthodes et souches utilisés dans les différents chapitres de résultats.**

Chapitre	Objectif	Méthodes	Souches
3	Evaluer l'effet de différents paramètres abiotiques sur la croissance de plusieurs souches.	Culture de différentes espèces dans différentes conditions. Criblage des conditions en microplaques. Analyse du potentiel de production en fioles.	<i>Acutodesmus obliquus</i> <i>Auxenochlorella protothecoïdes</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella sorokiniana</i>
4	Trouver par l'isolement ou le criblage de banque d'espèces une souche consommant rapidement le butyrate.	Isolement d'espèces Criblage de souches en microplaques. Analyse du potentiel de production en fioles.	Isolats <i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Euglena gracilis</i> <i>Ochromonas danica</i> <i>Polytomella magna</i> <i>Polytomella sp.</i>
5	Elucider la voie de métabolisation du butyrate chez <i>Polytomella sp.</i>	Culture en fioles et analyse protéomique comparative (acétate vs butyrate)	<i>Polytomella sp.</i>

Dans le **chapitre 3**, plusieurs variables abiotiques ont été étudiées : nature du substrat (autotrophie, acétate, butyrate ou mélange des deux composés), concentration en substrat, pH, tampon, ou C:N:P, tandis que des milieux fixes ont été utilisés dans les deux autres chapitres. Le **Tableau 7** présente un résumé succinct des différentes conditions évaluées, ainsi que le chapitre et la section s'y référant. La préparation du milieu de culture de base ainsi que celle de chacune des conditions variables est détaillée dans les différents paragraphes de la **section 2.2** de ce chapitre. Toutes les expériences ont été menées en mode fermé (« batch ») et en mixotrophie, c'est-à-dire en présence de lumière. La mise en place ainsi que les conditions de culture (température, lumière, etc.) sont détaillées en **section 2.3**. Afin de pouvoir cribler un grand nombre de conditions et de souches, un protocole de culture en microplaque 24 puits a été mis au point. La description détaillée de ce protocole, utilisé dans le **chapitre 3 et 4**, est donnée en **section 3**.

Dans le **chapitre 4**, plusieurs souches ont été isolées à partir d'échantillons environnementaux. Le détail du protocole d'isolement et de sélection sont décrits en **section 4.1** de ce chapitre. Le choix des lieux de prélèvement et la description de ces lieux seront détaillés directement dans le **chapitre 4**. Les méthodes de caractérisation des isolats sont décrites en **section 4.3**.

Dans le **chapitre 5**, la voie d'assimilation du butyrate par *Polytomella sp.*, et plus généralement sa réponse métabolique en présence de butyrate, a été élucidé par une approche protéomique comparative entre une culture sur acétate et butyrate. La description complète des méthodes d'analyse (extraction des protéines totales, identification et tests statistiques) est donnée en **section 5.1**. Les méthodes bio-informatiques d'établissement de base de données et de reconstruction du réseau métabolique sont décrites en **section 5.2**.

Enfin, les différentes méthodes d'analyses (biomasse, substrats, composition en sucres ou lipides) utilisées dans chaque chapitre sont décrites en **section 6** tandis que les méthodes de calculs sont décrites en **section 7**.

**Tableau 7 : Résumé des conditions expérimentales étudiées dans chaque chapitre.** Les numéros de conditions sont rappelés dans les paragraphes concernés. Auto : autotrophie ; Ac : acétate ; Bu : butyrate.

N°	Dispositif de culture	Substrat et concentration (gc.L <sup>-1</sup> )	pH	Tampon (100 mM)	C:N:P (molaire)	Chapitre - section
1	Microplaque	Auto, Ac ou Bu 0,5	Variable (5; 6; 7)	100	41,7:7,5:1	3 ; 2.1.1
2	Microplaque	Ac ou Bu Variable	Variable (5,5; 6; 6,5)	100	41,7:7,5:1	3 ; 2.1.2
3	Microplaque	Ac ou Bu Variable	6,5	100	41,7:7,5:1	3 ; 2.1.3 ; 4 ; 2.2.2
4	Microplaque	Auto, Ac ou Bu 0,5	Variable (7; 8; 9;10)	100	41,7:7,5:1	3 ; 2.2
5	Microplaque	Ac ou Bu Variable (0,5 à 5,0)	8	20	Variable	3 ; 2.3
6	Microplaque	Ac ou Bu 1,0 ou 2,0	8	Variable (0; 20 ; 100)	Variable (83:7,5:1 ; 106:16:1 ; 167:7,5:1)	3 ; 2.4
7	Fioles	Ac et Bu 1 et 2 Total : 3	8	20 ou 100	250:7,5:1 ou 106:16:1	3 ; 2.5
8	Microplaque	Ac ou Bu 0,5	7	100	41,7:7,5:1	4 ; 2.2.1
9	Fioles	Ac et Bu 0,33 et 0,66 Total : 1	7	100	106:16:1	4 ; 2.2
10	Fioles	Ac ou Bu 1	7	100	106:16:1	5

## 2. Culture des microalgues : souches étudiées, milieux employés et conditions de culture

### 2.1. Souches étudiées

Plusieurs souches ont été étudiées au cours de cette thèse. Le nom, la description et les caractéristiques particulières de chaque souche étudiée sont détaillés dans le **Tableau 8**. Les souches ont été commandées sur le site SAG<sup>7</sup>. Les souches ont été retenues en fonction de différents critères : capacités mixotrophe et/ou hétérotrophe, accumulation d'un composé d'intérêt, connaissances disponibles dans la littérature sur cet organisme.

### 2.2. Milieux de culture

#### 2.2.1. Solutions stocks

Solution d'acétate ou de butyrate (20X)

Une solution stock d'acétate et une autre solution de butyrate ont été préparées par dissolution de 54,40 g d'acétate de sodium trihydrate ou de 22,02 g de butyrate de sodium anhydre dans 1 L d'eau distillée. La solution est ensuite stérilisée par autoclave à 121°C pendant 20 min.

Solution tampon (50X)

Une solution stock de tampon a été préparée par dissolution de 238,1 g d'HEPES dans 1 L d'eau distillée. La solution est ensuite stérilisée par autoclave à 121°C pendant 20 min.

Solution d'éléments traces Hutner (1000X)

Une solution d'éléments traces Hutner (1000X) a été préparée par ajout d'acide borique (0,6 g), CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O (0,25 g), NaFeEDTA (7,5 g), Na<sub>2</sub>FeEDTA (15,0 g), MnCl<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O (2,0 g), NaMo<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O (0,25 g), ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O (1,2 g) et CoCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O (0,25 g) dans 1 L d'eau distillée. Chaque élément a été ajouté et dissout un par un.

---

<sup>7</sup> <http://sagdb.uni-goettingen.de/>

**Tableau 8 : Nom, description et caractéristiques principales des espèces étudiées.**

Nom	Genre	Description et caractéristiques
<i>Acutodesmus obliquus</i> SAG276-6	Chlorophyte	Verte, taux de croissance élevé, ubiquitaire dans les eaux usées (Wu et al., 2014)
<i>Auxenochlorella protothecoides</i> SAG 33.80	Chlorophyte	Verte, capacité hétérotrophe, accumulation de lipides (Xu et al., 2006)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	Chlorophyte	Verte, souche modèle, assimilation d'acétate efficace (Johnson and Alric, 2012)
<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG211-8k	Chlorophyte	Verte, thermo tolérante, taux de croissance élevé, ubiquitaire dans les eaux usées (Wu et al., 2014)
<i>Euglena gracilis</i> SAG1224-5/15	Euglènoïde	Verte, accumulation de paramylon, croissance hétérotrophe ou mixotrophe (Kottuparambil et al., 2019)
<i>Ochromonas danica</i> SAG933-7	Chrysophyte	Brune, capacité hétérotrophe et bactériophage (Wilken et al., 2014)
<i>Polytomella magna</i> SAG63-9	Chlorophyte	
<i>Polytomella sp.</i> Pringsheim 198.80	Chlorophyte	Blanche, absence d'appareil photosynthétique, croissance hétérotrophe (Atteia et al., 2005)

Solutions de Beijerincks (40X)

Une solution Beijerincks a été préparée par ajout de NH<sub>4</sub>Cl (16,0 g), MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O (5,3 g) et CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O (2,0 g) dans 1 L d'eau distillée. Chaque sel a été ajouté séparément sous agitation pour éviter une quelconque précipitation. La solution est ensuite stérilisée par autoclave à 121°C pendant 20 min.

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

### Solution de vitamines (10 000X)

Une solution concentrée en vitamines a été préparée en dissolvant 200 mg de vitamine B1, 2,5 mg de biotine et 10 mg de cyanocobalamine dans 10 mL d'eau distillée. La solution a été par la suite stérilisée par filtration sur un filtre de 0,2  $\mu\text{m}$ . Des aliquots d'1 mL ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

#### 2.2.2. Recette générale

Un milieu TAP modifié a été préparé en remplaçant le buffer TRIS par le buffer HEPES (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique). Les substrats acétate (Ac) et butyrate (Bu) ont été ajoutés en tant que sels de sodium à hauteur de 0,5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (correspondant à 20 mM de Na-Ac ou 10 mM de Na-Bu) pour la maintenance des cellules et les pré-cultures, où à de plus hautes concentrations si indiqué. Dans la suite du manuscrit, ces milieux sont nommés HAP ou HBP selon le substrat qu'ils contiennent, respectivement acétate ou butyrate. La solution de Beijerinck a été ajoutée à hauteur de 25  $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ , conduisant à une concentration finale en  $\text{N-NH}_4^+$  de 7,5 mM. Le phosphore a été ajouté sous forme de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pour atteindre une concentration finale de 1 mM  $\text{P-PO}_4^{3-}$ . Le ratio C:N:P correspondant était de 41,7:7,5:1. Selon le rapport empirique de Redfield 106:16:1, le carbone est le macroélément limitant de ce milieu. La concentration en tampon HEPES était de 20 mM, sauf indications contraires. La solution d'Hutner a été ajoutée à hauteur d'1  $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$  de solution. Enfin, le pH du milieu est ajusté à 7, sauf indications contraires, par ajout de NaOH 5 M. La solution a ensuite été stérilisée par autoclave ( $121^{\circ}\text{C}$ , 20 min). Après refroidissement à température ambiante, 100  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  de la solution de vitamines ont été ajoutés. Pour obtenir un milieu solide, 1,5% m/v d'agar ont été ajouté au milieu avant stérilisation.

#### 2.2.3. Milieux à pH variables (conditions 1 et 4 ; chapitre 3, sections 2.1.1 et 2.2)

Les milieux de culture avec un pH variable ont été préparés selon la recette générale sauf pour la nature du tampon, sa concentration et le pH. Le pH des solutions a été tamponné à des valeurs comprises entre 5 et 10 en utilisant une concentration de 100 mM d'un tampon approprié, c'est-à-dire du MES à pH 5 ou 6, de l'HEPES à pH 7 ou 8 et du CHES à pH 9 ou 10. Chaque milieu a été préparé en utilisant soit de l'acétate ou du butyrate individuellement à

une concentration constante de 0,5 gC.L<sup>-1</sup>. Un milieu autotrophe, pour chaque pH, a également été préparé en omettant le substrat organique dans le milieu.

### 2.2.4. Milieux à concentrations en acides non dissociés variables (conditions 2 et 3 ; chapitre 3, sections 2.1.2 et 2.1.3 ; chapitre 4, section 2.2.2)

Les milieux de culture avec une concentration variable en acides non dissociés ont été préparés selon la recette générale, sauf pour la concentration en substrat, le pH et la concentration en tampon. Dans chaque expérience, le tampon utilisé était du MES à hauteur de 100 mM. Le pH a été fixé dans un cas à 5,5 ; 6,0 ou 6,5 afin de montrer le principe d'inhibition. Dans les autres cas, pour déterminer les seuils d'inhibition, le pH a été fixé à 6,5. Des concentrations croissantes en Na-Ac ou Na-Bu ont été ajoutées afin d'obtenir la gamme de concentrations désirée en acide acétique (AcH) ou acide butyrique (BuH). La concentration en forme non dissociée ([RH], mg.L<sup>-1</sup>) a été calculée selon l'équation modifiée de Henderson-Hasselbach :

$$[RH] = \frac{C_t}{1 + 10^{pH - pKa}}$$

Où  $C_t$  est la concentration totale en acide organique (mg.L<sup>-1</sup>). Les gammes choisies ont été préalablement établies en fonction de résultats préliminaires selon les souches.

### 2.2.5. Milieux à concentrations en substrat variables (condition 5 ; chapitre 3, section 2.3)

Les milieux de culture avec différentes concentrations en substrat ont été préparés selon la recette générale avec des modifications dans la concentration en substrat, le pH et le pouvoir tampon. Les concentrations en Na-Ac ou Na-Bu individuellement ont été fixées entre 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 ; et 5,0 gC.L<sup>-1</sup>. Le pouvoir tampon (HEPES) a été fixé à 20 mM et le pH fixé à 8,0. Dans ces milieux, le C:N:P n'a pas été pris en compte et a varié de 42:7,5:1 (0,5 gC.L<sup>-1</sup>) à 416:7,5:1 (5 gC.L<sup>-1</sup>).



2.2.6. Milieux à pouvoir tampon et C:N:P variables (condition 6 ; chapitre 3, section 2.4)

Les milieux de culture avec un pouvoir tampon et un C:N:P variables ont été préparés selon la recette générale avec des modifications dans la concentration en substrat, le pouvoir tampon et le C:N:P final des milieux. Pour ces milieux, la concentration en Na-Ac ou Na-Bu individuellement a été fixée à 1,0 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup> ou 2,0 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup>. La concentration en tampon (HEPES) a été variée entre 0 mM, 20 mM et 100 mM. Le C:N:P a été varié entre 83:7,5:1, 106:16:1 ou 167:7,5:1. Afin de faire varier le C:N:P, des quantités adéquates de solutions de NH<sub>4</sub>Cl et de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ont été ajoutées.

2.2.7. Milieux d'évaluation du potentiel de *C. sorokiniana* (condition 7 ; chapitre 3, section 2.5)

Le potentiel de production de *C. sorokiniana* a été évalué en cultivant la souche sur deux milieux simulant un effluent type de fermentation sombre. Ces milieux ont été préparés selon la recette générale, avec des modifications dans la concentration en substrats, le C:N:P, le pH et le pouvoir tampon. La concentration en C a été fixée dans les deux cas à 3 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup>, avec un ratio Ac : Bu massique de 1:2, correspondant à un mélange de 2,5 g.L<sup>-1</sup> d'acétate et 3,7 g.L<sup>-1</sup> de butyrate. Dans un cas, le ratio C:N:P a été fixé à 106:16:1, pour refléter une condition idéale pour la production de biomasse. Dans cette condition, le pouvoir tampon a été fixé à 100 mM d'HEPES. Dans l'autre cas, le ratio C:N:P a été fixé arbitrairement à 250:7,5:1 afin de simuler un effluent pauvre en nutriments. Dans ce cas, le pouvoir tampon a été fixé à 20 mM. Dans les deux conditions, le pH a été fixé à 8. Afin de faire varier le C:N:P, des quantités adéquates de solutions de NH<sub>4</sub>Cl et de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ont été ajoutées.

2.2.8. Milieux de criblage de souches (condition 8 ; chapitre 4, section 2.1.2)

Les milieux de criblage de souches ont été préparés selon la recette générale excepté pour la concentration en tampon. Dans tous les cas, le pH a été fixé à 7,0 avec une concentration en HEPES de 100 mM.

### 2.2.9. Milieux de comparaison des candidats (condition 9 ; chapitre 4, section 2.2)

Les milieux de comparaisons des différents candidats ont été préparés selon la recette générale avec des modifications dans la concentration en substrat, le pouvoir tampon et le C:N:P final des milieux. La concentration en substrat a été fixée à  $1.0 \text{ g.L}^{-1}$ , avec un ratio Ac : Bu massique de 1:2, correspondant à un mélange de  $0,83 \text{ g.L}^{-1}$  d'acétate et  $1,2 \text{ g.L}^{-1}$  de butyrate. Le C:N:P a toujours été fixé à 106:16:1, par ajout de quantités adéquates de solutions de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Le pouvoir tampon a toujours été fixé à 100 mM d'HEPES, et le pH initial fixé à 7.

## 2.3. Conditions de culture

### 2.3.1. Maintenance des souches

Les souches ont été maintenues sur des boîtes de pétri contenant du milieu HAP à  $25^\circ\text{C}$  et sous lumière continue ( $100 \pm 10 \mu\text{E}$ ). *Polytomella sp.* et *Polytomella magna* ne peuvent croître sur milieu solide : elles ont été maintenues en milieu liquide par dilution régulière dans du milieu frais. L'axénie des souches a été périodiquement vérifiée par microscopie. En cas de contaminations bactériennes, les souches ont été purifiées par dilutions successives dans du milieu HAP additionné d'ampicilline ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), de spectinomycine ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ou de tétracycline ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) jusqu'à axénie.

### 2.3.2. Pré-cultures

Avant chaque expérience, les souches ont été pré-cultivées dans des fioles Erlenmeyer de 125 mL préalablement stérilisées, bouchées avec du coton. Une première pré-culture a été réalisée par suspension de quelques colonies dans 40 mL de milieu HAP (ou autre si indication contraire). A partir de cette pré-culture, une deuxième pré-culture a été réalisée pour maintenir les cellules en phase exponentielle. Ces cellules ont servi d'inoculum pour les expériences en fioles ou en microplaques. Avant inoculation, l'axénie des cultures a été vérifiée au microscope. Les cellules ont été cultivées à  $25^\circ\text{C}$  sous lumière continue ( $100 \pm 5 \mu\text{E}$ ) dans un incubateur AlgaeTron AG 230 (PSI) sous une agitation de 130 rpm. *Polytomella sp.* a été cultivée sans agitation ni lumière.

### 2.3.3. Cultures en fioles

Les cultures en fioles ont été menées dans des Erlenmeyers de 500 mL stérilisés, bouchés avec du coton, et remplis avec 200 mL de milieu de culture. Les inocula préparés comme décrits précédemment ont été centrifugés (2500 - 3000 rpm, 10 min). Le surnageant a été jeté et les cellules dispersées dans un volume approprié de PBS de manière à avoir une  $DO_{750}$  initiale dans les fioles comprises entre 0,05 et 0,1. Les fioles ont été inoculés avec 2 mL de cette suspension. Chaque culture a été menée en triplicat. Les fioles ont ensuite été incubées à 25°C, 130 rpm, sous lumière continue d'intensité  $100 \pm 5 \mu E$ . L'axénie des cultures a été périodiquement vérifiée au microscope. *Polytomella sp.* a été cultivée de la même manière mais sans agitation.

### 2.3.4. Cultures en microplaques

Les cultures en microplaques ont été menées dans des plaques 24 puits stériles, remplis avec 1 mL de milieu de culture. Les inocula préparés comme décrits précédemment ont été centrifugés (2500 - 3000 rpm, 10 min). Le surnageant a été jeté et les cellules dispersées dans un volume approprié de PBS de manière à avoir une  $DO_{750}$  initiale dans le puit d'environ 0,02. Chaque puit a été inoculé avec 10  $\mu L$  de cette suspension. Chaque culture a été menée en triplicat, au sein d'une même microplaque. Les microplaques ont ensuite été incubées à 25°C, 100 rpm, sous lumière continue d'intensité  $100 \pm 5 \mu E$ . L'axénie des cultures a été périodiquement vérifiée au microscope. La mise au point du protocole de culture en microplaques est détaillée dans la **section 3**.

## 3. Mise au point du protocole de culture en microplaques

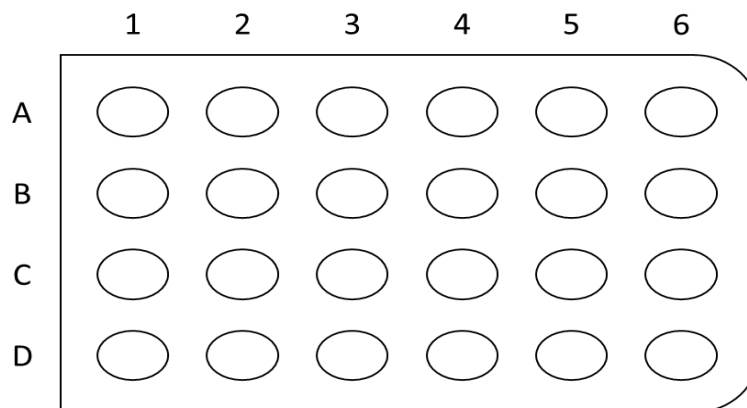
Les cultures en microplaques constituent un moyen efficace de cribler plusieurs paramètres simultanément et d'étudier leurs effets sur les dynamiques de croissance. Cependant, leur utilisation présente plusieurs inconvénients qu'il est nécessaire de prendre en compte pour s'assurer de la précision des mesures. Les paragraphes suivants décrivent les biais potentiels ainsi que les méthodes employées pour les contourner.

### 3.1. Evaporation

Premièrement, en raison du faible volume de milieu de culture (entre 1 et 1,5 mL), l'évaporation de l'eau est un problème majeur récurrent qui ne peut être considéré négligeable.

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Afin de palier à ce problème, nous avons dans un premier temps mesuré le taux d'évaporation dans chaque puits dans les conditions de croissance de notre incubateur (25°C, 100 rpm, lumière continue à 100  $\mu$ E). Les expériences ont été tout d'abord réalisées avec du milieu frais. Ce milieu étant propice à la croissance bactérienne la détermination du taux d'évaporation a été peu précise. Nous avons donc remplacé le milieu avec de l'eau distillée uniquement. Les 24 puits d'une microplaque ont été remplis avec de l'eau distillée tamponnée à 8,0. La masse correspondante (d'un puits individuel) a été mesurée par pipetage. Deux fois par jour, la masse de chaque puits a été mesurée. Ceci a été fait en pipetant le contenu d'un puits, en mesurant la masse correspondante puis en remplissant à nouveau le puits avec son contenu. Les mesures ont été faites pour trois plaques différentes. Les taux d'évaporation de chaque puits ont pu ainsi être déterminés (**Tableau 9**). Chaque puits a présenté une cinétique distincte. Nous soulignons ici que dans certains cas la linéarité a été très faible ( $R^2 < 0,9$ ) et que de grandes disparités ont été observées entre chaque puits et entre chaque plaque. Par ailleurs, l'évaporation a été élevée et non négligeable, jusqu'à 315  $\mu$ L.j<sup>-1</sup>, pour certains puits (soit plus de 30% du volume initial !). De manière générale, l'évaporation est d'autant plus importante que les puits se trouvent sur les coins de la plaque (Puits A1, A6, D1 et D6) ou en périphérie (Ligne A et D, colonne 1 et 6) (**Figure 6**).



**Figure 6 : Schéma d'une microplaque 24 puits.**

Pour contourner ce problème, un autre test a été mené. L'évaporation a cette fois-ci été contrôlée en enveloppant les plaques dans des sachets en plastique transparent. L'intensité lumineuse mesurée dans le sachet a été identique à celle mesurée sans. Les mesures de taux

d'évaporation ont de nouveau été faites suivant le même protocole (**Tableau 10**). Les mesures ont été réalisées pour six microplaques différentes, et deux répétitions ont été faites. L'utilisation du sachet plastique a présenté deux avantages. Tout d'abord, une plus grande linéarité a été observée dans chaque puits. Deuxièmement, les taux d'évaporation ont été grandement réduits d'un facteur 2 à 5. Il en résulte des taux d'évaporation bien plus homogènes entre chaque puits. Les tests statistiques ont montré que les taux d'évaporation entre chaque puits n'ont pas été significativement différents. De la même manière, chaque plaque n'a pas été différente d'une autre.

**Tableau 9 : Cinétiques d'évaporation au sein de différentes microplaques.** Les taux d'évaporation ( $\mu\text{L.j}^{-1}$ ) ont été calculés en mesurant la masse d'eau restante dans un puits chaque jour, deux fois par jour, pendant une semaine.

Puits #	Plaque A		Plaque B		Plaque C	
	$\mu\text{L.j}^{-1}$	$r^2$	$\mu\text{L.j}^{-1}$	$r^2$	$\mu\text{L.j}^{-1}$	$r^2$
A1	288,41	0,97	72,25	0,66	68,46	0,98
A2	164,65	0,95	40,82	0,97	41,51	0,95
A3	128,34	0,96	37,44	0,98	24,93	0,93
A4	99,45	0,97	39,45	0,99	26,39	0,81
A5	94,03	0,84	62,64	0,98	41,48	0,66
A6	144,58	0,39	185,00	0,96	111,89	0,19
B1	315,10	0,97	96,60	0,36	149,88	0,95
B2	162,48	0,97	45,29	0,92	61,07	0,92
B3	122,81	0,96	37,95	0,98	34,94	0,90
B4	106,07	0,92	43,99	0,99	25,30	0,99
B5	103,17	0,59	74,58	0,97	38,72	0,68
B6	162,12	0,14	234,33	0,96	105,48	0,25
C1	311,11	0,97	107,03	0,31	257,76	0,95
C2	155,86	0,97	47,34	0,91	98,67	0,96
C3	118,95	0,97	38,31	0,99	52,18	0,97
C4	105,84	0,89	40,76	1,00	35,03	0,98
C5	106,46	0,54	72,93	0,97	38,32	0,80
C6	165,78	0,06	225,12	0,96	69,96	0,60
D1	256,30	0,97	92,62	0,25	302,16	0,96
D2	127,56	0,98	45,66	0,84	110,58	0,96
D3	102,21	0,96	36,84	1,00	51,84	0,98
D4	103,09	0,84	41,49	0,99	39,78	0,98
D5	108,82	0,57	58,37	0,98	38,31	0,97
D6	158,57	0,27	161,34	0,96	52,63	0,99

**Tableau 10 : Cinétiques d'évaporation au sein de différentes microplaques enveloppées de sachet plastique.** Les taux d'évaporation ( $\mu\text{L}\cdot\text{j}^{-1}$ ) ont été en mesurant la masse d'eau restante dans un puits chaque jour, deux fois par jour, pendant une semaine. Chaque donnée représente la moyenne et l'écart type mesuré pour un même numéro de puits dans six plaques différentes, pour les deux répétitions.

Puits#	Répétition 1 $\mu\text{L}\cdot\text{j}^{-1}$		Répétition 2 $\mu\text{L}\cdot\text{j}^{-1}$	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
A1	25,17	5,62	21,11	7,49
A2	27,46	4,86	23,28	6,09
A3	28,83	6,28	24,13	5,82
A4	28,82	4,62	24,44	4,43
A5	27,91	2,95	25,15	3,76
A6	28,48	3,34	25,84	3,10
B1	27,78	6,13	20,52	9,30
B2	27,10	5,60	23,06	6,17
B3	27,19	2,56	25,45	4,50
B4	24,41	4,96	26,68	3,52
B5	24,33	6,30	27,84	3,92
B6	26,42	4,98	25,58	3,29
C1	23,40	7,64	21,18	8,97
C2	26,07	6,35	24,40	7,65
C3	23,46	5,57	26,95	4,64
C4	25,43	5,74	28,06	3,59
C5	23,94	3,46	27,59	4,10
C6	26,44	3,08	27,23	4,24
D1	25,65	3,88	22,70	8,44
D2	27,84	2,37	25,10	6,58
D3	26,96	7,83	26,41	6,08
D4	24,70	2,14	27,30	4,79
D5	26,42	5,62	28,05	3,84
D6	28,03	4,54	27,71	3,56

Puisque chaque puits et chaque plaque ne sont pas significativement différents, nous avons calculé un taux d'évaporation moyen (calculé à partir d'un taux d'évaporation moyen de chaque puits et des deux répétitions) de  $25,8 \mu\text{L}\cdot\text{j}^{-1}$ . Ce taux d'évaporation est faible et n'est pas significatif sur de faibles durée de culture (i.e.  $< 4 \text{ j}$ ), mais devient pertinent lorsque les temps de culture sont étendus. Par conséquent, de l'eau stérile a été ajoutée chaque jour dans chaque puits pour compenser la perte d'eau par évaporation. La quantité d'eau ajoutée a été calculée à partir du taux d'évaporation moyen  $25,8 \mu\text{L}\cdot\text{j}^{-1}$ .

### 3.2. Condensation

L'évaporation de l'eau est associée à de la condensation sur le couvercle de la plaque. Une condensation excessive peut empêcher la lumière de pénétrer au sein de la microplaque (ou du moins réduire l'intensité lumineuse perçue) et entraîner une surestimation de la mesure de densité optique (DO). Pour prendre en compte ce phénomène, les couvercles des plaques ont été aseptiquement nettoyés avant chaque mesure en utilisant du papier KimWipe®. A noter que nous nettoyions les couvercles également lors de la détermination du taux d'évaporation.

### 3.3. Agitation et homogénéisation

L'agitation au sein d'un puits n'est pas assurée en raison du faible volume de liquide et de la très faible surface (les forces de tension de surface deviennent prépondérantes). Ainsi, les cellules ont tendance à s'agréger au centre du puits et ne sont pas correctement dispersées. Par conséquent, l'intensité lumineuse n'est pas nécessairement homogène pour chaque cellule et le transfert de gaz n'est pas optimal. Par ailleurs, lors de la mesure de DO, les agrégats peuvent conduire à des surestimations de la valeur vraie. Pour contourner ce problème, les puits sont régulièrement homogénéisés en mélangeant le puits avec une pipette stérile. Ceci a été fait avant chaque mesure et au moins deux à quatre fois par jour. Ceci permet au moins une homogénéisation avant lecture de la DO. Cette technique ne s'attaque pas au problème de transfert de gaz. Néanmoins, en raison du mode de croissance mixotrophe, nous avons considéré que ce biais pouvait être négligé.

### 3.4. Saturation de la densité optique

La mesure de densité optique est une manière pratique d'estimer la croissance de la biomasse ainsi que la quantité de biomasse en utilisant des courbes de calibrations appropriées (cf. **section 6.1**). Cependant, la linéarité des courbes nécessite d'être déterminée au préalable. Dans le cas de la loi de Beer-Lambert, il est bien connu qu'au-delà d'une certaine concentration en soluté (ici, en biomasse), la mesure de densité optique ne devient plus valide en raison d'une saturation du signal. Ainsi, des DO trop élevées doivent être évitées, notamment en diluant les échantillons pour atteindre une valeur de DO appropriée (typiquement 0,5-0,6). De telles dilutions peuvent aisément être réalisées lors de l'utilisation de grands volumes de culture. Dans le cas des microplaques, l'échantillonnage est exclu et la DO est toujours mesurée au sein même de la microplaque. Tout au long de la croissance, la biomasse augmente et le signal peut devenir saturant sans aucune possibilité de dilution de la culture. Ceci est particulièrement vrai dans les phases avancées de croissance. Ainsi, une question légitime pourrait être : est-ce que le plateau observé en fin de croissance est dû aux cellules atteignant la phase stationnaire ou bien à une saturation du signal ? Pour répondre à cette question, la DO d'une suspension algale concentrée a été mesurée avec et sans dilution. Brièvement, *C. sorokiniana* a été cultivée dans une fiole Erlenmeyer pour produire une culture dense en phase stationnaire. La  $DO_{750}$  d'une telle culture a été mesurée à 2,05 en utilisant un spectrophotomètre à cuvette standard (cf. **section 6.1**). La culture a été diluée plusieurs fois. La  $DO_{750}$  résultante a été mesurée et dans le spectrophotomètre à cuvette et dans le lecteur de microplaque. Au-delà d'une  $DO_{750}$  de 0,5, la  $DO_{750}$  calculée pour le spectrophotomètre à cuvette, à partir de la  $DO_{750}$  brute et du facteur de dilution, a décliné rapidement, avec une perte de signal jusqu'à 51%. Ceci indique qu'il y a saturation. Dans le cas du lecteur de microplaques, la  $DO_{750}$  est restée constante pour chaque dilution testée. La perte de signal entre un échantillon dilué ou non a été au maximum de 13,8%. Une perte de signal n'est donc pas exclue pour les hautes DO. Nous montrons cependant dans le paragraphe suivant que ce biais n'empêche pas une bonne prédiction du taux de croissance et de la biomasse produite.

### 3.5. Validation du protocole

Pour valider le protocole, nous avons cultivé *C. sorokiniana* sur 0,5 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup> d'acétate (**Figure 7A**) ou de butyrate (**Figure 7B**) en fioles ou microplaques. Le taux de croissance et la biomasse



finale, obtenue par gravimétrie dans le cas des fioles ou par corrélation dans le cas des microplaques (cf. **section 6.1**), sont donnés dans le **Tableau 11**.

Aucune différence dans le taux de croissance mesuré n'a été observé entre les deux méthodes, quel que soit le substrat. Seule une petite différence de 6,2% a été observée dans la concentration en biomasse finale lors de la culture sur butyrate en fiole par rapport aux microplaques, possiblement en raison de la saturation énoncée précédemment. Nous en avons conclu que, bien que certains biais soient toujours présents, la méthode permettait une prédiction précise de la croissance microalgale. Ce protocole a été utile pour cribler plusieurs paramètres de culture mais également plusieurs souches à la fois.

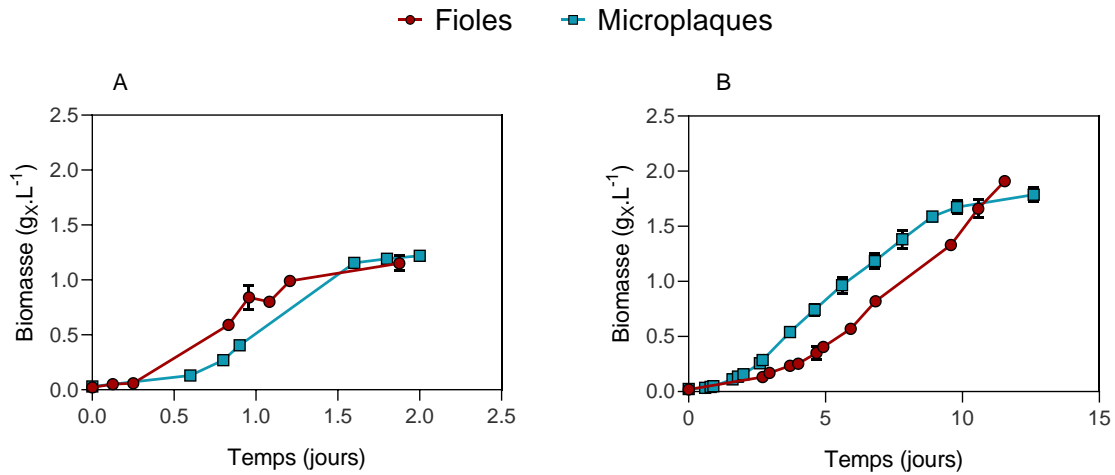
### 4. Isolement de souches

Différents échantillons environnementaux ont été prélevés afin d'isoler des souches de microalgues. La justification des lieux de prélèvements et le détail des lieux prélevés seront discutés directement dans le **chapitre 4**. Nous ne décrivons ici que le protocole d'isolement et le protocole de caractérisation des isolats.

#### 4.1. Protocole d'isolement

##### 4.1.1. Préparation des échantillons

Les échantillons liquides et solides (tourbes) ont été prélevés dans des bouteilles en plastique et conservés à 4°C, dans le noir, jusqu'au transport au laboratoire. Les échantillons liquides ont été sujet directement aux deux protocoles d'isolement décrits ci-après. Les échantillons solides ont dans un premier temps été traités. Pour extraire les microorganismes des échantillons de tourbes solides, 100 g de tourbe ont été ajoutés à 500 mL d'eau osmosée isotonique (0,85% NaCl). L'ensemble a été agité pendant 5 min, filtré sur filtre à café et chinois pour éliminer les grosses particules solides. C'est cette solution qui a été utilisée comme matériel de départ pour les stratégies d'isolement décrites ensuite. Chaque échantillon a été sujet à deux protocoles d'isolement.



**Figure 7 : Validation du protocole en microplaques : courbes de croissances.** Les graphiques présentent l'évolution de la biomasse (g<sub>X</sub>.L<sup>-1</sup>) de *C. sorokiniana* en fonction du temps (jours) lorsque la souche est cultivée sur 0,5 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup> d'acétate (A) ou de butyrate (B) en fioles (rouge) ou microplaques (bleu). Chaque point présente la moyenne et l'écart type de trois réplicats biologiques.

**Tableau 11 : Validation du protocole en microplaques : paramètres de croissance.** Le tableau consigne les valeurs de taux de croissance  $\mu$  (j<sup>-1</sup>) et de  $X_{max}$  (g<sub>X</sub>.L<sup>-1</sup>) de *C. sorokiniana* obtenus à partir des courbes de croissance de la souche sur 0,5 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup> d'acétate ou de butyrate en fiole ou en microplaque. Chaque valeur représente la moyenne et l'écart type de trois réplicats biologiques. Les lettres indiquent une différence statistique significative (p-value < 0,05). Les paramètres  $\mu$  et  $X_{max}$  et leur méthode de calcul sont définis en **section 7.1**.

	Acétate		Butyrate	
	$\mu$ (j <sup>-1</sup> )	$X_{max}$ (g <sub>X</sub> .L <sup>-1</sup> )	$\mu$ (j <sup>-1</sup> )	$X_{max}$ (g <sub>X</sub> .L <sup>-1</sup> )
Microplaque	3,6 ± 0,04	1,21 ± 0,02	0,44 ± 0,02	1,79 ± 0,06 <sup>a</sup>
Fiole	3,6 ± 0,50	1,15 ± 0,07	0,41 ± 0,02	1,91 ± 0,04 <sup>b</sup>

### 4.1.2. Stratégie directe

La première stratégie d'isolement et de sélection est dite « directe ». Une anse d'inoculation a été plongée directement dans l'échantillon environnemental, après homogénéisation, puis directement striée sur milieu HBP agar ( $0,5 \text{ gC.L}^{-1}$ ), le pH du milieu étant fixé à 8. La boîte de pétri a été placée sous lumière continue, à environ  $100 \pm 10 \mu\text{E}$  et  $25^\circ\text{C}$ . Les colonies vertes ont été striées sur une nouvelle boîte. Les colonies ont été isolées par striations successives jusqu'à l'axénie, sous un contrôle microscopique régulier. Dans certains cas, l'axénie des colonies a été obtenue par ajout d'antibiotiques (ampicilline, streptomycine, chloramphénicol, néomycine) aux concentrations de travail usuelles et dilutions successives. Après isolement, les souches ont été maintenues sur un milieu HAP à pH 7.

### 4.1.3. Cultures d'enrichissement

Les microorganismes des échantillons environnementaux ont d'abord été concentrés sur un filtre Whatman GF/F filtrant à  $0,7 \mu\text{m}$ . Ce seuil de coupure a été choisi pour collecter la majorité des microalgues en suspension. Les volumes filtrés ont été de 20 à 200 ml selon la richesse en matière en suspension. Pour un échantillon, deux filtres ont ainsi étéensemencés. Ces filtres ont servi pour inoculer des fioles contenant 50 mL de milieu HAP, à  $0,25 \text{ gC.L}^{-1}$ , à pH 7, avec ou sans  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  d'ampicilline. Les fioles ont été placées sous lumière discontinue (12h :12h ;  $100 \pm 10 \mu\text{E}$ ), à  $25^\circ\text{C}$ . Après 10 jours, des boîtes de pétri ont été inoculées à partir de ces cultures d'enrichissement. Le milieu contenu dans ces boîtes contenait un mélange de  $0,33 \text{ gC.L}^{-1}$  d'acétate et de  $0,66 \text{ gC.L}^{-1}$  de butyrate, en plus des autres constituants du milieu standard. Le pH de ce milieu a été fixé à 7. Les boîtes ont été placées sous lumière continue, à environ  $100 \pm 10 \mu\text{E}$  et  $25^\circ\text{C}$ . Les colonies vertes ont été striées sur une nouvelle boîte. Les colonies ont été isolées par striations successives jusqu'à l'axénie, sous un contrôle microscopique régulier. Dans certains cas, l'axénie des colonies a été obtenue par ajout d'antibiotiques (ampicilline, streptomycine, chloramphénicol, néomycine) aux concentrations de travail usuelles et dilutions successives. Après isolement, les souches ont été maintenues sur un milieu HAP à pH 7.

## 4.2. Caractérisation des souches

L'ADN génomique total a été isolé selon les protocoles standards. Les cellules ont été dispersées dans un tampon SDS-EB (2% SDS, 400 mM NaCl, 50 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8) et incubée à 37°C avec de la RNase A pendant 30 min. La purification de l'ADN a été effectuée une fois avec du phénol/chloroforme/isoamyl alcool (25 :24 :1 en volume) et une fois avec du chloroforme/isoamyl alcool (24 :1 en volume). Les acides nucléiques ont été précipités par ajout d'un volume d'alcool isopropylique 100% refroidi sur glace, suivi par une centrifugation. Les culots ont été rincés avec de l'éthanol à 70% puis redispersés dans du tampon TE. Les régions ARNr ont été amplifiées par PCR en utilisant la polymérase Pfu (Promega). Plusieurs amorces ont été utilisées. L'opéron de l'ARNr encodée dans le noyau couvrant la région 18S (SSU) et les 500 premières paires de bases de la région de l'ADNr 28S ont été amplifiés par les amorces EAF3 (TCGACAATCTGGTTGATCCTGCCAG) et ITS055R (CTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG) (Marin et al. 2003), le gène 18S a été amplifié en utilisant les amorces EAF3 et V9-R (CCTTCYGCAGGTTACCTAC) (Tragin et al. 2018), et la région ITS avec l'amorce V9F (TTGTACACACCGCCCGTGG) (adapté de V9\_18SNext.For (Tragin et al. 2018). Les produits de PCR ont été purifiés sur un kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) et séquencé directement sur les deux branches à Eurofins genomics<sup>8</sup>. Les opérons ARNr (18S, ITS1, 5.8S, ITS2, et 28S (partiel)) ont été alignés en utilisant Clustal Omega.

## 5. Protéomique

### 5.1. Analyses protéomiques fondées sur la spectrométrie de masse

Les protéines totales de *Polytomella sp.*, cultivée sur acétate ou butyrate (3 réplicats biologiques par condition) ont été concentrées sur le haut d'un gel SDS-PAGE (12% acrylamide) avant digestion par de la trypsine modifiée (grade séquençage, Promega), comme décrit précédemment par (Casabona et al., 2013). Les peptides ont été analysés par chromatographie nanoliquide couplée à un analyseur MS/MS (Ultimate 3000 RSLCnano et Q-Exactive HF, Thermo Fisher Scientific) en utilisant un gradient de 80 min. A cet effet, les

---

<sup>8</sup> <https://eurofinsgenomics.eu/>

peptides ont été échantillonnés sur une pré-colonne (300  $\mu\text{m}$  x 5 mm PepMap C18, Thermo Scientific) et séparés sur une colonne C18 75  $\mu\text{m}$  x 250 mm (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1,9  $\mu\text{m}$ , Dr. Maisch). L'acquisition des données de MS et de MS/MS a été faite par Xcalibur (Thermo Fisher Scientific).

Les peptides et protéines ont été identifiées par Mascot (version 2.6.0, Matrix Science) par des recherches concomitantes contre une base de données de *Polytomella sp.* interne, une base de données interne contenant les séquences des protéines parasites classiquement trouvées dans les analyses protéomiques (kératine humaines, trypsine, etc.) et les bases de données inverses correspondantes. La trypsine/P a été choisie comme enzyme et deux scissions manquées ont été autorisées. Les tolérances aux erreurs de masse des précurseurs et des fragments ont été respectivement limitées à 10 ppm et 25 mmu. Les modifications de peptides autorisées pendant la recherche ont été : Carbamidomethyl (C, fixé), Acétyl (Protéine N-terminal, variable) et Oxydation (M, variable). Le logiciel Proline (Bouyssie et al., 2020) a été utilisé pour la compilation, le groupement et le filtrage des résultats (Conservation des peptides de rang 1, peptides de longueur  $\geq$  acides aminés, score d'association peptide-spectre  $\geq$  25, taux de fausses découvertes des identifications d'association peptide-spectre  $<$  1%, comme calculé sur le score d'association peptide-spectre en employant la stratégie de base de données inversée, et un minimum de un peptide spécifique par groupe de protéine identifiée). Proline a été utilisé pour réaliser la compilation, le groupement et la première quantification MS des groupes de protéines identifiées en se basant sur les peptides spécifiques.

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel ProStaR (Wieczorek et al., 2017). Les protéines identifiées dans la base de données des parasites et les protéines détectées dans moins de trois réplicats d'une même condition ont été éliminées. Après transformation en base  $\log_2$ , les valeurs d'abondance ont été normalisées par la méthode vsn avant imputation des valeurs manquantes (en utilisant l'algorithme slsa pour les valeurs observées partiellement dans une condition et l'algorithme DetQuantile pour les valeurs totalement absentes dans une condition). Les tests statistiques ont été menés avec limma, où les protéines différentiellement exprimées ont été classées en utilisant un seuil de coupure du  $\log_2(\text{FoldChange})$  de 0,6 et un seuil de coupure de *p-value* de 0,004, permettant d'atteindre un taux de fausse identification  $<$ 1% selon la méthode de Benjamini-Hochberg.

Les valeurs d'iBAQ (« intensity-based absolute quantification ») (Schwanhäusser et al., 2011) ont été calculées à partir des intensités de MS pour chaque peptide spécifique. Pour chaque échantillon, les valeurs d'iBAQ ont été normalisées par la somme des valeurs d'iBAQ avant d'additionner les valeurs des trois réplicats pour obtenir la valeur final d'iBAQ de chaque condition.

### 5.2. Analyses bio-informatiques

L'assemblage et les annotations structurelles des séquences génomique de *Polytomella sp.* ont été décrites précédemment (van Lis et al., 2021) et utilisées pour la construction de la base de données interne. Les annotations fonctionnelles du sous jeu de protéines identifié durant l'analyse (1772 séquences) et l'attribution des catégories métaboliques ont été faites en utilisant le logiciel Mercator4 V3.0. Les fichiers de résultats ont été utilisées avec un autre fichier contenant les données de FC (Fold Change) pour projeter les données sur un fichier d'image SVG fournissant une vue d'ensemble du métabolisme (programme MapMan) (Schwacke et al., 2019). L'image SVG ainsi fournie a été éditée par le logiciel Inkscape.

Les reconstructions des voies métaboliques se sont basées sur les cartes métaboliques obtenues grâce aux codes EC et KEGG, en utilisant en priorité les enzymes montrant une différence de FC significative. Les enzymes ont été identifiées en utilisant le logiciel Mercator. Des recherches d'homologies complémentaires (BlastKOALA, KofamKOALA) ont été effectuées sur KEGG et EggNOG (Huerta-Cepas et al., 2019) pour mieux évaluer les résultats d'identification.

Pour la prédiction des localisations intracellulaires, les logiciels DeepLoc (Almagro Armenteros et al., 2017) et PredAlgo (Tardif et al., 2012) ont été utilisés. Les recherches manuelles des sites de ciblage du péroxysome PTS1 et 2 chez *C. reinhardtii* ont été effectuées selon (Gonzalez et al., 2011).

## 6. Méthodes d'analyses

### 6.1. Mesure de la biomasse

#### 6.1.1. Mesure de densité optique

Le suivi d'évolution de la biomasse a été réalisé par lecture de densité optique (DO). La plupart des microalgues présentent un pic d'absorption à 680 nm (ce qui correspond à l'absorption par la chlorophylle). Cependant, le contenu en chlorophylle peut varier avec l'âge de la culture. Pour éviter les interférences avec l'absorbance due aux pigments, il a été décidé de mesurer la densité optique à 750 nm ( $DO_{750}$ ) (Griffiths et al., 2011). La même longueur d'onde a été choisie quelle que soit l'espèce de microalgue étudiée. La  $DO_{750}$  a été mesurée de deux façons. Pour les cultures pouvant être échantillonnées, la  $DO_{750}$  a été mesurée avec un spectrophotomètre Helios Epsilon en plaçant 1 mL d'échantillon dans une cuvette et en comparant l'absorbance avec le blanc (eau distillée). L'échantillon a été au préalable dilué pour avoir une  $DO_{750}$  au maximum de 0,5. Pour les cultures en microplaques, la  $DO_{750}$  a été mesurée par un lecteur de microplaques Infinite Nanoquant M200, de la même manière comparée à l'absorbance du blanc (milieu étudié).

#### 6.1.2. Mesure de masse sèche

La masse ou matière sèche (MS) a été mesurée en filtrant un volume connu d'échantillon sur un filtre GF/C préalablement rincé, séché et pesé. Le volume d'échantillon a été choisi de telle sorte que la sensibilité de la balance permette une mesure précise tout en ne colmatant pas le filtre. Le filtre contenant la biomasse a de nouveau été rincé avec de l'eau distillée, séché à 105°C pendant la nuit et pesé de nouveau afin d'obtenir la matière sèche.

#### 6.1.3. Corrélations densité optique et matière sèche

A partir des mesures de  $DO_{750}$  et de MS, des courbes de corrélations  $DO_{750}$  – MS ont pu être tracées. Ces courbes de corrélation ont permis de convertir la  $DO_{750}$  en MS sans échantillonnage. Les coefficients de corrélation ont été déterminés pour chaque souche pour chaque substrat (acétate ou butyrate) lors d'une culture à pH 7 en présence de 0,5 g<sub>CS</sub>.L<sup>-1</sup>. Un coefficient a été déterminé pour un seul type de spectrophotomètre (microplaque ou cuvette) ou les deux selon les souches. Le coefficient pour le spectrophotomètre cuvette n'a été déterminé

que pour les souches dont le potentiel de production a été évalué. Les différents coefficients de corrélation sont donnés dans le **Tableau 12**. Pour *C. sorokiniana*, *E. gracilis*, *O. danica* et *Polytomella* sp. un coefficient de corrélation DO<sub>750</sub> – MS unique a été déterminé pour le spectrophotomètre cuvette à partir de toutes les données DO<sub>750</sub> et MS mesurées (quelle que soit la condition de culture).

**Tableau 12 : Corrélations DO<sub>750</sub> – Matière sèche de différentes souches.** Les coefficients pour le spectrophotomètre à microplaque ont été déterminés à partir d’une culture sur acétate (Ac) ou butyrate (Bu). Les coefficients pour le spectrophotomètre à cuvettes ont été déterminés à partir de toutes les données DO<sub>750</sub>-MS disponibles, quelles que soient les conditions de culture.

Souche	Spectrophotomètre microplaques				Spectrophotomètre cuvettes	
	Ac	R <sup>2</sup>	Bu	R <sup>2</sup>	Toutes données	R <sup>2</sup>
<i>A. obliquus</i>	2,025	0,965	2,562	0,991		
<i>A. protothecoïdes</i>	2,622	0,970	1,864	0,978		
<i>C. reinhardtii</i>	2,687	0,937	3,150	0,965		
<i>C. sorokiniana</i>	2,075	0,943	1,728	0,985	0,4656	0,978
<i>E. gracilis</i>					1,328	0,9708
<i>O. danica</i>					2,5845	0,8895
<i>Polytomella</i> sp.					1,108	0,9766

## 6.2. Mesure des substrats organiques

### 6.2.1. Mesure de l’acétate et du butyrate

L’acétate et le butyrate ont été mesurés par chromatographie en phase gaz. Après collecte des échantillons liquides, ceux-ci ont été centrifugés à 15 000 rpm et le surnageant a été conservé à -20°C. Les échantillons ont été décongelés avant analyse et 500 µL de surnageant ont été mélangés à 500 µL d’une solution d’étalon interne (acide éthyl-2-butyrique, 1 g.L<sup>-1</sup>).



L'appareil utilisé était un Perkin Clarus 580 équipé d'une colonne capillaire (Elite-FFAP crossbond®carbodawax® (15 m)) maintenue à 200°C. Le gaz vecteur est du N<sub>2</sub> (débit de gaz de 6 mL.min<sup>-1</sup>). Le détecteur était un détecteur à ionisation de flamme maintenu à 280°C.

### 6.1. Mesure de l'azote et du phosphore

Les ions ammonium et phosphate ont été dosés en utilisant un chromatographe DIONEX ICS-3000. Après collecte des échantillons liquides, ceux-ci ont été centrifugés à 15 000 rpm, le surnageant filtré sur des filtres nylon à 0,2 µm, puis conservé à -20°C jusqu'à analyse. La séparation des ions se fait par chromatographie ionique et la détection par conductimétrie. Le système permet de doser les anions et les cations simultanément. L'appareil est équipé d'une pré-colonne NG1-2 mm pour éviter les contaminations. Les cations ont été séparés par une colonne CS16-3mm. Les anions ont été séparés par une colonne AS15-2mm. Les éluants utilisés étaient l'HMSA (acide hydroxyméthane sulfonique) (25 – 40 mM) pompé à 0,3 mL.min<sup>-1</sup> pour les cations, et de l'hydroxyde de potassium KOH (10 – 74 mM) pompé à 0,35 mL.min<sup>-1</sup> pour les anions. La détection et quantification a été réalisée par conductimétrie.

### 6.2. Mesure des lipides totaux

Les échantillons provenant de culture fraîche ont été immédiatement centrifugés, le surnageant jeté et le culot conservé à 20°C jusqu'à analyse. Avant analyse, le culot est décongelé et dispersé dans de l'eau distillée. Après dilution ou concentration, 100 µL d'échantillons ont été placés dans un tube en verre de 10 mL pour les mesures de lipides.

Les lipides totaux ont été mesurés par la méthode de phosphovanilline (Mishra et al., 2014). Le réactif de phospho-vanilline a été préparé fraîchement avant chaque analyse en dissolvant 0,6 g de vanilline dans 10 mL d'éthanol absolu, 90 mL d'eau distillée et 400 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%). Le réactif a été stocké à l'obscurité jusqu'à utilisation. Dans les tubes de 10 mL contenant les échantillons d'algues, 2 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%) ont été ajoutés. Les tubes ont été chauffés à 100°C pendant 10 min. Après refroidissement sur glace, la réaction a été initiée par ajout de 5 mL de réactif phospho-vanilline. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 15 min et périodiquement agités par inversion. Les tubes ont ensuite été laissés dans l'obscurité pendant 45 min pour que la couleur se développe. L'absorbance de la solution a été mesurée à 530 nm en utilisant un spectrophotomètre Aqualytic® et comparée à celle de l'eau distillée. La courbe

de calibration a été obtenue en mesurant l'absorbance d'huile de colza vierge diluée dans du chloroforme. Avant réaction, le chloroforme a été évaporé sous hotte.

### 6.3. Mesure des sucres totaux

Les échantillons provenant de culture fraîche ont été immédiatement centrifugés, le surnageant jeté et le culot conservé à 20°C jusqu'à analyse. Avant analyse, le culot est décongelé, dispersé dans 1 mL d'eau distillée.

Les sucres totaux ont été mesurés par dosage colorimétrique à l'anthrone. Avant analyse, 100 mL de réactif ont été préparés par dissolution de 200 mg d'anthrone dans 100 mL d'acide sulfurique concentré (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%). Le réactif a été préparé fraîchement juste avant l'analyse. Après dilution, 1 mL de suspension algale de poids sec connu a été mis dans un tube en verre de 10 mL avant ajout de 2 mL de réactif anthrone. Les tubes ont été agités puis placés dans la glace pour 5 min pour éviter la formation de composés colorés brun (réaction de Maillard). Les tubes ont ensuite été incubés à 100°C pendant 10 min. Après refroidissement, l'absorbance à 625 nm a été mesurée (directement dans le tube) avec un spectromètre Aqualytic® et comparée à de l'eau distillée. La courbe de calibration a été obtenue en mesurant l'absorbance de solutions de glucose.

## 7. Méthodes de calcul

### 7.1. Détermination du taux de croissance et des rendements en biomasse

Les taux de croissance  $\mu$  (j<sup>-1</sup>) ont été déterminés grâce au tracé de la courbe d'équation :

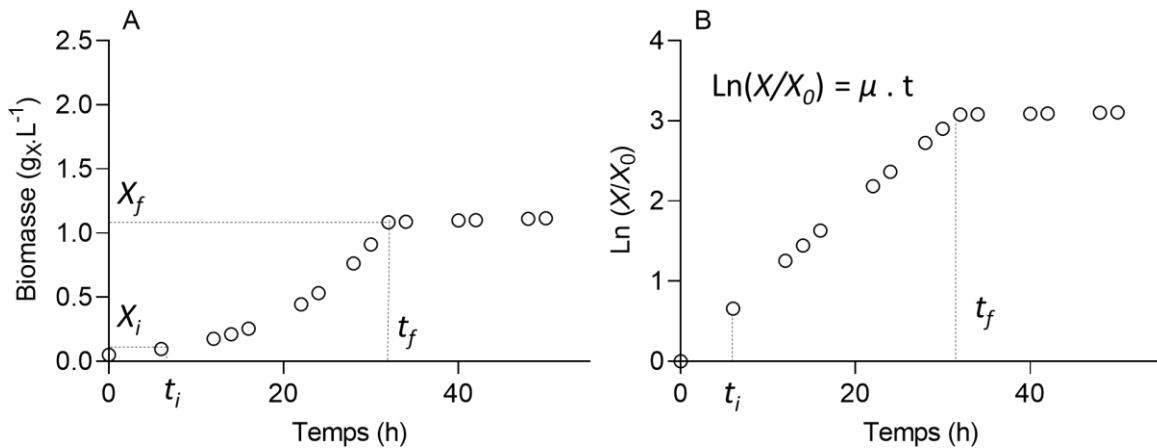
$$\ln\left(\frac{X_t}{X_0}\right) = f(t)$$

Avec  $X_t$  et  $X_0$  les concentrations en biomasse (exprimées en g<sub>MS</sub>.L<sup>-1</sup>) aux temps  $t$  et  $t_0$  (exprimés en j<sup>-1</sup>). Le temps  $t_0$  correspond au début de la culture. La phase exponentielle correspond à la partie linéaire de cette courbe, ce qui permet de déterminer le taux de croissance  $\mu$ . Les taux de croissance ont été déterminés en sélectionnant au moins quatre points conduisant au  $\mu$  le plus élevé en maintenant la linéarité (R<sup>2</sup> compris entre 0,95 et 0,99). Un exemple est donné en **Figure 8**.

Lors des expériences en fioles, permettant un suivi précis de tous les paramètres de culture, les rendements en biomasse  $Y_{X/S}$  ont été calculés selon l'équation suivante :

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_c} * 100$$

Avec  $X_f$  et  $X_i$  les concentrations en biomasse exprimées en  $g_{MS}.L^{-1}$  ou  $g_C.L^{-1}$  aux temps  $t_f$  et  $t_i$ , correspondant respectivement à la fin et au début de la phase exponentielle. Les concentrations en  $g_C.L^{-1}$  ont été déterminées grâce à la composition de la biomasse. Ce point est discuté plus en détail dans la section suivante.  $S_c$  correspond à la quantité de substrat consommé en  $g_S.L^{-1}$  ou  $g_{CS}.L^{-1}$  dans cet intervalle de temps.



**Figure 8 : Exemple de détermination de  $\mu$  et des biomasses finales et initiales.** La figure A correspond à une courbe de croissance  $X = f(t)$ , avec  $X$  la biomasse ( $g_X.L^{-1}$ ). La figure B correspond à la linéarisation de cette courbe par le tracé de la courbe  $\ln(X/X_0) = f(t)$ . La pente de la partie linéaire ( $R^2 = 0,95-0,99$ ) correspond au  $\mu$ . Les points représentés ici sont théoriques.

Dans le cas d'un mélange de substrat, le temps initial du deuxième substrat correspond au temps final de consommation du premier substrat. Le rendement a été calculé pour chaque substrat ou pour la totalité (l'unité du substrat est alors unifiée en  $g_{CS}.L^{-1}$ ).

Lors des expériences en microplaques, la quantité de substrat consommé  $S_c$  ne peut pas être déterminée pour chaque temps : pour cause de volume disponible et de volume nécessaire à la mesure, il n'est en effet possible de déterminer  $S_c$  qu'à la fin de la culture et non à la fin de la

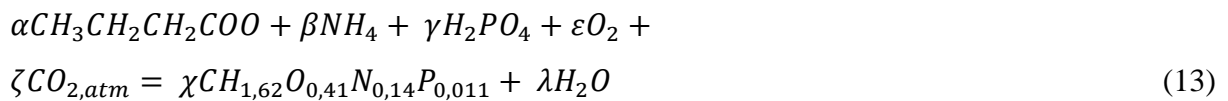
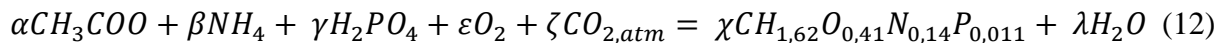
phase exponentielle. Pour les expériences en microplaques, le rendement est calculé selon l'équation :

$$Y_{X/S} = \frac{X_{max} - X_0}{S_{blanc} - S_f} * 100$$

Avec  $X_{max}$  et  $X_0$  les concentrations en biomasse exprimées en  $g_{MS}.L^{-1}$  ou  $g_C.L^{-1}$  mesurées respectivement au point final de culture et au temps initial de culture,  $S_{blanc}$  et  $S_f$  la quantité de substrat en  $g_S.L^{-1}$  ou  $g_{CS}.L^{-1}$  respectivement mesurée en fin de culture dans les puits blancs (sans inoculum) et dans le puits d'intérêt.

## 7.2. Bilan matière

La croissance mixotrophe des microalgues peut être décrite comme la somme des contributions autotrophe, c'est-à-dire la consommation de carbone inorganique, et hétérotrophe, c'est-à-dire la consommation de carbone organique. Afin d'estimer chaque contribution dans la formation de la biomasse, un bilan de matière sur le carbone a été réalisé. Pour réaliser ce bilan, nous avons considéré les équations de formations de biomasse (12) pour l'acétate et (13) pour le butyrate.



Avec  $\alpha$ ,  $\zeta$  et  $\chi$  les coefficients stœchiométriques exprimés en mol. Connaissant les quantités  $\alpha$  de substrats consommés pour former  $\chi$  biomasse, il a été possible d'estimer la quantité  $\zeta$  de  $CO_2$  fixé (ou respiré). Le bilan ne discrimine pas la façon dont l'acétate est assimilé (respiration puis fixation photosynthétique du  $CO_2$  ou incorporation directe dans la biomasse). Il est donc important de préciser que, lorsque les coefficients sont positifs, la quantité de  $CO_2$  ainsi estimée ne peut qu'être celle provenant de la fixation de carbone atmosphérique.

Les calculs ont été faits en supposant que la composition des algues vertes (*A. obliquus*, *A. protothecoïdes*, *C. reinhardtii* et *C. sorokiniana*) était proche de celle de *C. reinhardtii* déterminée par (Boyle and Morgan, 2009) de  $\text{CH}_{1,62}\text{O}_{0,41}\text{N}_{0,14}\text{P}_{0,011}$ . La composition de la biomasse algale peut toutefois fortement varier en fonction des espèces considérées. Néanmoins, des compositions de biomasse rapportées par d'autres auteurs, par exemple  $\text{CH}_{1,88}\text{O}_{0,30}\text{N}_{0,22}\text{P}_{0,013}$  pour *A. protothecoïdes* (Sforza et al., 2018) ou  $\text{CH}_{1,82}\text{O}_{0,43}\text{N}_{0,18}$  pour *C. sorokiniana* (Kumar et al., 2014) cultivées en mixotrophie se rapproche de celle utilisée pour nos estimations. Utiliser l'une ou l'autre des formules entrainerait une erreur de 1,4% ou 6,3% respectivement (en prenant en compte que la composition proposée pour *C. sorokiniana* ne tient pas compte du P). Par ailleurs, nous avons considéré que la composition de la biomasse restait constante tout le long de la culture. Si ceci reste vrai pendant la phase exponentielle, cette hypothèse peut être forte lorsque les cellules entrent en phase stationnaire où elles peuvent commencer à accumuler des composés de stockage. Cependant, cela ne changerait pas drastiquement nos estimations. Si le contenu en N ou P des cellules devait diminuer jusqu'à par exemple 0,08 et 0,008 respectivement, cela conduirait à une erreur de 4,3% dans l'estimation du contenu en carbone d'1 g de biomasse.

## Chapitre 3

# Inhibition de la croissance mixotrophe par les AGV : effet du pH ou de la concentration en substrat ?

### 1. Introduction : contexte et objectifs

L'un des verrous du couplage de la fermentation sombre avec la culture de microalgues est l'inhibition de la croissance par le butyrate, et ce même à de faibles concentrations. La croissance d'*Auxenochlorella protothecoïdes* et *Chlorella sorokinana* a été par exemple complètement inhibée dès  $0,16 \text{ g.L}^{-1}$  de butyrate en tant que substrat simple (Turon et al. 2015a). Paradoxalement, (Liu et al., 2013) ont pu cultiver *Chlorella vulgaris* sur un effluent contenant un mélange de  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$  d'acétate et  $0,8 \text{ g.L}^{-1}$  de butyrate. De la même manière, (Fei et al., 2015a) ont pu montrer que *A. protothecoïdes* pouvait être cultivée sur un mélange d'AGV acétate : propionate : butyrate (en proportion 6:1:3) jusqu'à une concentration totale de  $4 \text{ g.L}^{-1}$ . La croissance de la souche a néanmoins été totalement inhibée dès  $8 \text{ g.L}^{-1}$ . En raison de la variabilité des conditions de culture (pH, présence de lumière, concentration, mélanges de substrats ou substrats simples), les causes précises d'inhibition de la croissance restent mal connues. Par ailleurs, si la réponse aux fortes concentrations en substrats semble généralisée pour plusieurs espèces d'algues, peu d'études ont comparé la croissance de plusieurs espèces dans les mêmes conditions contrôlées.

Chez d'autres micro-organismes, les AGV sont inhibiteurs principalement en raison de la concentration en acide non dissociés, et il est probable qu'il en soit de même pour les microalgues. Par ailleurs, le pH et son contrôle semble crucial pour permettre la croissance et la consommation de l'acétate. Or, le pH et la concentration en acides non dissociés sont étroitement liés. Ainsi, plusieurs questions ont pu être soulevées : la croissance des microalgues est-elle inhibée à cause de la concentration intrinsèque en butyrate, de la valeur du pH, ou de la concentration en acides non dissociés ? La faible consommation du butyrate est-elle due à des

### Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat

conditions de culture non optimales ou bien à une limite métabolique des microalgues ? Les réponses à ces questions sont-elles généralisables à plusieurs espèces ?

En raison des inhibitions précédemment décrites, la culture des algues est limitée à des concentrations en AGV relativement faibles (de l'ordre de 2 g.L<sup>-1</sup> au maximum). Outre les inhibitions, les fortes concentrations en substrats peuvent changer le métabolisme de certains organismes. L'exemple classique illustrant ce propos est la bascule métabolique de *Saccharomyces cerevisiae* : lorsque la concentration en sucres dépasse une certaine concentration, la levure passe d'un métabolisme respiratoire à une fermentation alcoolique (effet Crabtree). Ceci conduit à une forte réduction du rendement en biomasse, y compris en condition aérobie. (Chen and Johns 1994) montrent qu'en hétérotrophie (absence de lumière), le rendement de *C. reinhardtii* diminue de 0,55 g<sub>x</sub>.g<sub>s</sub><sup>-1</sup> à 0,15 g<sub>x</sub>.g<sub>s</sub><sup>-1</sup> lorsque la concentration en acétate passe de 1 g.L<sup>-1</sup> à 2 g.L<sup>-1</sup>. Les auteurs ont néanmoins rapporté une inhibition de la croissance à cette concentration : il reste donc incertain si cette diminution de rendement est uniquement due à un changement de métabolisme ou simplement une inhibition. Par ailleurs, à notre connaissance, aucune étude n'a étudié les effets spécifiques du butyrate.

Pour apporter des éléments de réponse à l'ensemble de ces questions, nous avons considéré quatre souches de microalgues classiquement étudiées pour leur ubiquité dans les processus de traitement d'eaux usées (*Acutodesmus obliquus* et *C. sorokiniana*), leur capacité d'hétérotrophie (*A. prothotecoïdes*) ou bien leur caractère modèle (*Chlamydomonas reinhardtii*). Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet des pH acides (inférieurs à 7) ou alcalins (supérieurs à 7) et des concentrations en acides acétique ou butyrique (formes non dissociés) sur la croissance de ces souches. *C. sorokiniana* étant la souche présentant la consommation la plus rapide du butyrate, nous avons déterminé l'effet de plus hautes concentrations en substrats sur sa croissance. Enfin, nous avons caractérisé sa croissance et sa capacité d'accumulation de composés de stockage dans un effluent synthétique, composé d'un mélange d'acétate et de butyrate, dans des conditions idéales ou limitées en nutriments afin d'évaluer son potentiel de production.

## 2. Résultats et discussions

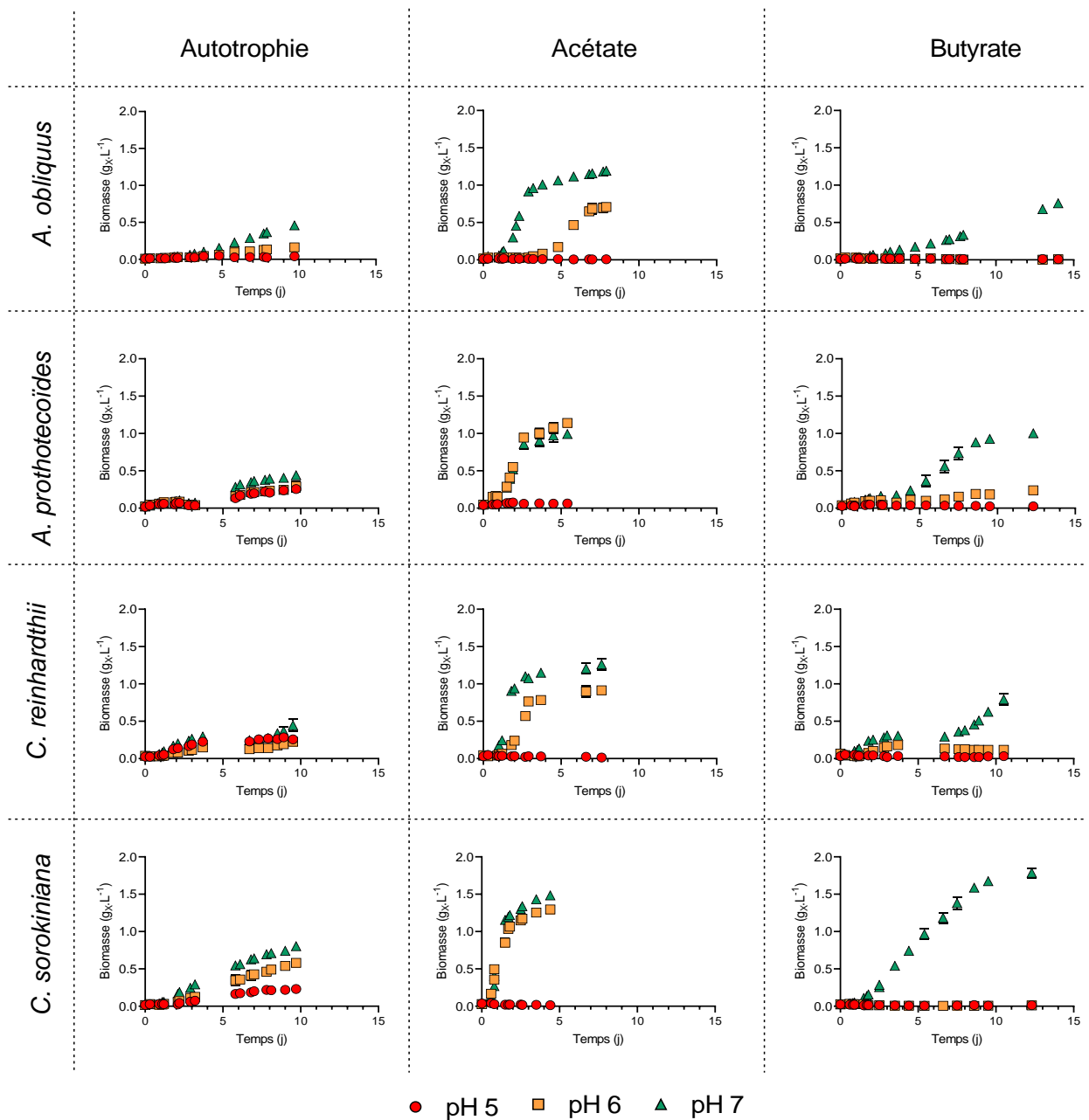
### 2.1. L'inhibition de la croissance est due aux acides non dissociés

#### 2.1.1. Les pH acides inhibent la croissance uniquement en présence d'acides organiques

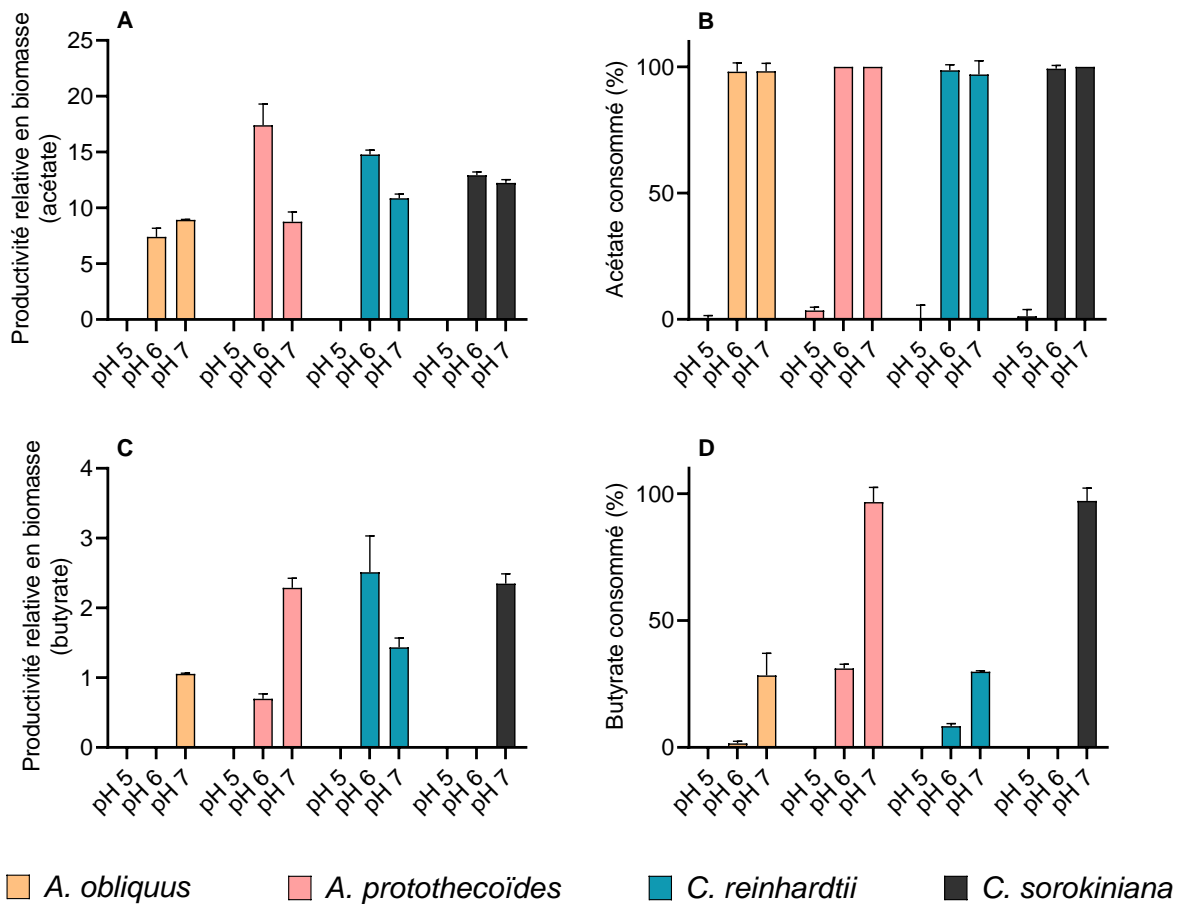
Les quatre souches vertes *Acutodesmus obliquus*, *Auxenochlorella protothecoïdes*, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlorella sorokiniana* ont été cultivées en absence de carbone organique (autotrophie) ou en présence de  $0,5 \text{ gC.L}^{-1}$  d'acétate ou de butyrate à pH 5, 6 et 7 (condition N°1 du **Tableau 7, chapitre 2**). Les courbes de croissance obtenues dans chaque condition sont montrées en **Figure 9**.

Quels que soient le pH ou la souche, la croissance autotrophe des microalgues a été faible, avec une productivité maximale allant de  $0,044$  pour *A. prothotecoïdes* à  $0,087 \text{ gX.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  pour *C. sorokiniana* à pH 7. Ces faibles productivités en biomasse sont dues à l'absence de carbone organique ou inorganique dans le milieu, la seule source de carbone provenant alors de la diffusion du  $\text{CO}_2$  atmosphérique. La productivité en biomasse de chaque souche a augmenté avec le pH du milieu en passant de 5 à 7. Or, si on ne tient pas compte des aspects cinétiques, la solubilité du  $\text{CO}_2$  en milieu aqueux augmente avec le pH. En utilisant la loi de Henry et en considérant les équilibres chimiques de l'acide carbonique ( $pK_{a1} = 6,37$  à  $20^\circ\text{C}$ ), et une teneur en  $\text{CO}_2$  à 0,04% dans l'atmosphère, on peut calculer la concentration totale en carbone inorganique dissout (CIT) à chaque pH. Entre les pH 5 et 6, la CIT n'augmente que sensiblement, passant de  $1,8.10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}$  à pH 5 à  $2,4.10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}$  à pH 6. A pH 7, la CIT augmente en revanche d'un facteur 10 ( $7.10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$ ). Le taux de croissance d'un organisme augmentant avec la concentration en substrat (formalisme de Monod), ces différences de concentrations en CIT expliqueraient en partie les différences de croissance observées à chaque pH. Quoi qu'il en soit, hormis pour la souche *A. obliquus*, une croissance, aussi faible soit elle, a été observée à pH 5 et pH 6, indiquant que ces pH ne sont *a priori* pas létaux pour ces souches.





**Figure 9 : Inhibition de la croissance aux pH acides en présence des acides organiques.** Evolution du poids sec ( $\text{g}_x \cdot \text{L}^{-1}$ ) en fonction du temps (j) pour différentes conditions en pH ou substrats d'*A. obliquus*, *A. protothecoïdes*, *C. reinhardtii* et *C. sorokiniana*. Les souches ont été cultivées en absence de carbone organique (autotrophie) ou en présence de  $0,5 \text{ g}_C \cdot \text{L}^{-1}$  d'acétate ou de butyrate, à pH 5 (ronds rouges), pH 6 (carrés oranges) ou pH 7 (triangle vert). Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques



**Figure 10 : Effet des pH acides sur la croissance mixotrophe et sur la consommation de l'acétate et du butyrate par différentes souches.** Productivités relatives en biomasse ( $g \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$ ) par rapport à l'autotrophie ( $g \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$ ) pour les différentes souches cultivées en présence de  $0,5 g \cdot L^{-1}$  d'acétate (A) ou de butyrate (C) à pH 5, 6 ou 7. Pourcentage d'acétate (B) ou de butyrate (D) consommé en fin de culture par les différentes souches cultivées à pH 5, 6 ou 7. Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.

En présence d'acétate, une phase exponentielle a pu être détectée en moins d'une demi-journée pour chaque souche à pH 6 ou pH 7. Cette phase exponentielle a duré entre 1 et 3 jours et conduit à une augmentation de la productivité relative en biomasse par rapport à l'autotrophie d'un facteur environ 8 à 17 en fonction de la souche et du pH (**Figure 10A**). A pH 6 ou 7, la consommation du substrat a été complète pour chaque souche (**Figure 10B**). Les taux de croissance et productivités en biomasse de la plupart des souches n'ont pas été significativement différents pour ces deux pH. Seule *A. obliquus* a présenté une phase de latence de 4 jours avant

### Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat

de croître à pH 6, avec un taux de croissance plus faible qu'à pH 7. *C. sorokiniana* a été la souche la plus productive ( $1,06 \text{ g}_X \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ) et présentant le meilleur rendement en biomasse ( $1,53 \text{ g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$ ). En revanche, quelle que soit la souche, aucune croissance n'a été détectée lorsque la culture a été conduite à pH 5.

En présence de butyrate, une phase de croissance n'a été clairement observable que lorsque le pH a été fixé à 7. Ces phases de croissance ont duré bien plus longtemps qu'en présence d'acétate : 10 jours ont été nécessaires pour qu'*A. protothecoïdes* ou *C. sorokiniana* consomment l'intégralité du butyrate (**Figure 10D**). Les deux autres souches n'ont consommé qu'un quart du butyrate initial dans cet intervalle de temps. Par rapport à l'autotrophie seule, les productivités relatives en biomasse n'ont augmenté que d'un facteur d'environ 2,3 pour les souches les plus efficaces (*A. protothecoïdes* et *C. sorokiniana*) et n'ont été que sensiblement différentes pour les autres (1,1 et 1,4 pour *A. obliquus* et *C. reinhardtii* respectivement) (**Figure 10C**). Encore une fois, quelle que soit la souche, aucune croissance n'a pu être observée à pH 5. *A. protothecoïdes* a pu consommer une fraction ( $31,1 \pm 1,7\%$ ) de butyrate à pH 6. Sa productivité relative en biomasse a néanmoins été de 0,70, indiquant une inhibition par le substrat. *C. reinhardtii* a d'abord été capable de croître à pH 6, consommant une fraction de butyrate ( $8,4 \pm 1,0\%$ ) et présentant une productivité relative en biomasse 2,5 fois plus importante. Cependant, après 5 jours de culture, la biomasse a chuté progressivement, indiquant également une inhibition.

L'absence complète de croissance à pH 5 quelle que soit la souche en condition mixotrophe comparé au contrôle autotrophe suggère que les acides organiques sont responsables de l'inhibition plutôt que la valeur du pH en elle-même. Cette inhibition dépend par ailleurs de la nature de l'acide, comme en témoigne l'absence de croissance observée dès le pH 6 en présence de butyrate.

#### 2.1.2. Les acides non dissociés sont responsables de l'inhibition de la croissance : mise en évidence du phénomène chez *C. sorokiniana*

Pour montrer que l'inhibition de la croissance est due à la forme non dissociée des acides tout en minimisant l'effet du pH, *C. sorokiniana* a été cultivée à 3 pH différents mais suffisamment proches l'un de l'autre (5,5 ; 6 et 6,5) en présence d'une concentration fixe en acides non dissociés (AcH pour acide acétique et BuH pour acide butyrique) (condition N°2 du

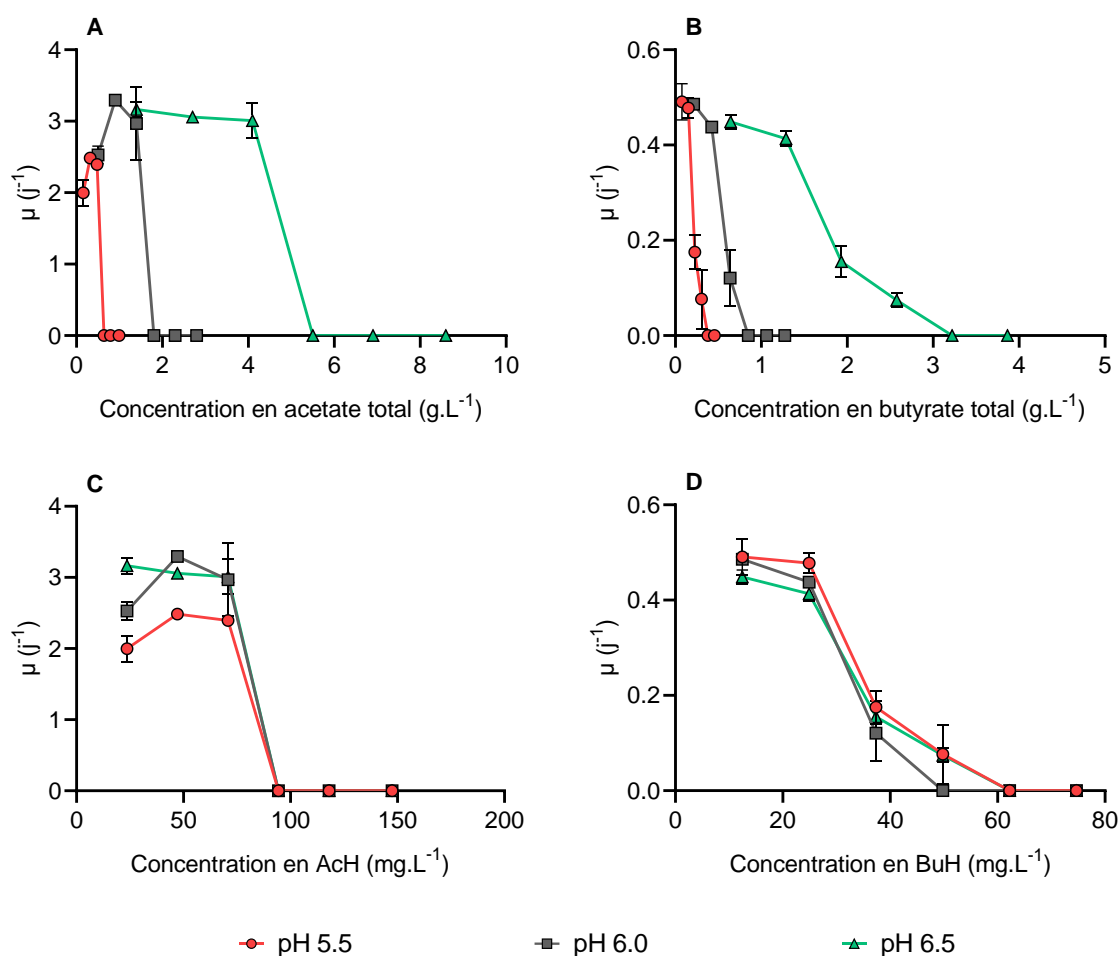
**Tableau 7, chapitre 2).** La concentration en acides non dissociés [RH] dans un effluent peut être déterminée grâce à l'équation modifiée de Henderson-Hasselbach :

$$[RH] = \frac{C_t}{1 + 10^{pH - pKa}}$$

Où  $C_t$  est la concentration totale en acide organique (somme des formes dissociées et formes non dissociées ;  $g.L^{-1}$ ). Pour chaque pH étudié, la  $C_t$  était donc croissante afin de maintenir une concentration en RH constante.

Les taux de croissance dérivés des courbes de croissance ainsi obtenues ont permis de tracer la **Figure 11**. A pH 5,5, le taux de croissance a augmenté de 2,0 à 2,4 lorsque la concentration totale en acétate a augmenté de 0,16 à 0,48  $g.L^{-1}$ , puis est devenu nul au-delà de 0,48  $g.L^{-1}$  (**Figure 11A**). Pourtant, augmenter le pH à 6,0 a permis aux cellules de croître au-delà de cette concentration, jusqu'à 1,40  $g.L^{-1}$ . Augmenter le pH jusqu'à 6,5 a permis aux microalgues de croître jusqu'à une concentration totale de 4,1  $g.L^{-1}$ . De la même manière, *C. sorokiniana* n'a pas pu croître à pH 5,5 en présence de 0,23  $g.L^{-1}$  butyrate (**Figure 11B**). Augmenter le pH à 6,5 a levé l'inhibition et permis la croissance jusqu'à 1,3  $g.L^{-1}$ . Ces différences s'expliquent par les différentes concentrations en formes non dissociées des acides. Ainsi, exprimer le taux de croissance en fonction de la concentration en AcH ou en BuH (**Figure 11C et 11D**) a permis d'identifier un seuil d'inhibition de la croissance. Quel que soit le pH initial, les microalgues peuvent croître en présence d'acétate ou de butyrate tant que les concentrations en acide non dissociées restent inférieures ou égales à 70,8  $mg.L^{-1}$  (AcH) ou 24,9  $mg.L^{-1}$  (BuH).

Les seuils ainsi déterminés permettent d'interpréter les inhibitions de croissance observées aux pH acides (**Figure 9**). La concentration en AGV a été fixée à 0,5  $g.C.L^{-1}$  dans ces expériences, soit 1,25  $g.L^{-1}$  d'acétate (total) et 0,92  $g.L^{-1}$  de butyrate (total). A pH 5, la concentration en AcH était donc de 483,5  $mg.L^{-1}$  et celle en BuH de 356,1  $mg.L^{-1}$ , des concentrations largement au-dessus des deux seuils déterminés. De même, à pH 6, la concentration en BuH était de 54,6  $mg.L^{-1}$ , expliquant l'inhibition observée. La concentration en AcH n'était quant à elle que de 74,2  $mg.L^{-1}$ , très légèrement au-dessus de la concentration maximum en AcH n'inhibant pas la croissance de *C. sorokiniana*.



**Figure 11 : L'inhibition de la croissance mixotrophe de *C. sorokiniana* est due aux formes non dissociées des acides.** Taux de croissance  $\mu$  ( $j^{-1}$ ) de *C. sorokiniana* cultivée à différents pH (5,5, ronds rouges ; 6,0, carrés noirs ; 6,5, triangles verts) en présence de concentrations (g.L<sup>-1</sup>) croissantes en acétate total (A) ou de butyrate total (B). Les graphiques (C) et (D) présentent ces mêmes taux de croissance, cette fois exprimés en fonction des concentrations (mg.L<sup>-1</sup>) en acide acétique non dissocié AcH (C) ou acide butyrique non dissocié BuH (D). Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.

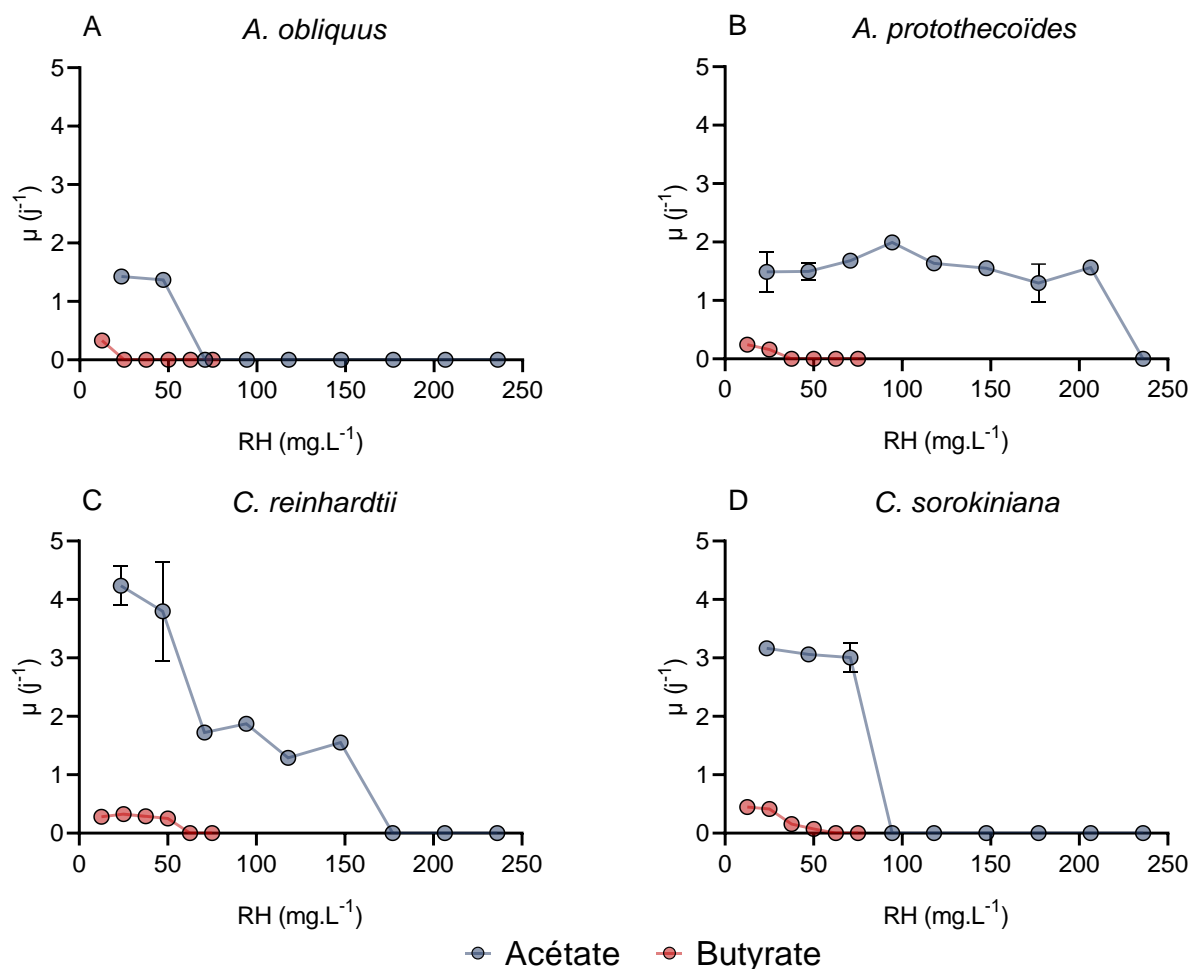
### 2.1.3. L'inhibition par les acides non dissociés est généralisable aux autres souches

Le principe d'inhibition par les acides non dissociés ayant été montré, les autres souches vertes ont été cultivées en présence de concentrations croissantes en AcH ou BuH à un pH fixe

de 6,5 (condition N°3 du **Tableau 7, chapitre 2**). Pour chaque souche, un seuil d'inhibition pour l'AcH et le BuH a ainsi pu être déterminé (**Figure 12**). Chaque souche a présenté un seuil de tolérance au BuH inférieur à celui de l'AcH, la croissance étant inhibée pour des concentrations en BuH de 2 à 8 fois plus faibles qu'en AcH. Toutefois, la résistance d'une souche à un acide n'a pas déterminé dans chaque cas sa résistance à l'autre acide. Par exemple, *A. obliquus* a été la souche la moins résistante à l'AcH (seuil à 47,2 mg.L<sup>-1</sup>) et au BuH (seuil à 12,5 mg.L<sup>-1</sup>). En revanche, si *A. protothecoïdes* a été la souche la plus tolérante à l'acide acétique (croissance jusqu'à 206 mg.L<sup>-1</sup>), elle a présenté un seuil de tolérance au butyrate inférieur à celui de *C. reinhardtii* (25,0 vs 50,0 mg.L<sup>-1</sup> respectivement). De même, la capacité d'une souche à assimiler ou croître rapidement en présence de l'un ou l'autre des substrats n'a pas permis de prédire sa capacité à tolérer ledit substrat. Par exemple, *C. sorokiniana* a présenté un taux de croissance constant autour de 3 j<sup>-1</sup> jusqu'à 70,8 mg.L<sup>-1</sup> AcH, supérieur à celui d'*A. protothecoïdes* d'environ 1,5 – 2 j<sup>-1</sup>, pourtant capable de tolérer jusqu'à 206 mg.L<sup>-1</sup> d'AcH.

#### 2.1.4. Implications sur le couplage

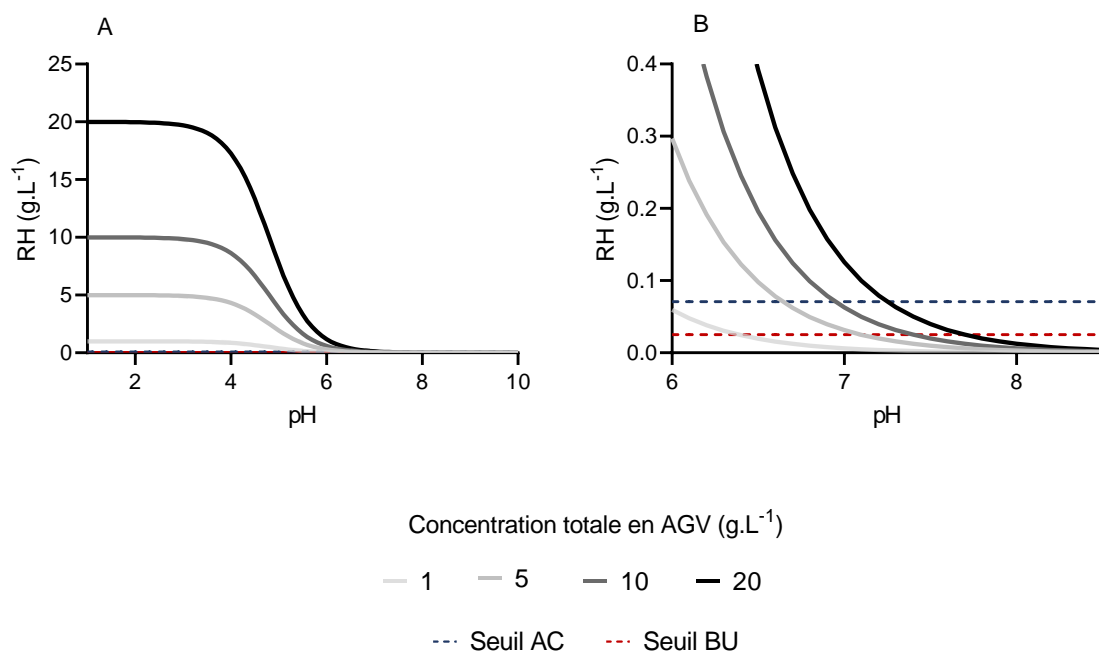
En utilisant l'équation d'Handerson-Hasselbach, il est possible de tracer l'évolution de [RH] en fonction du pH selon la  $C_i$  initiale du milieu (**Figure 14A**). Cette concentration diminue très rapidement pour devenir quasi nulle lorsque le pH s'approche de 6. Toutefois, les concentrations seuils que nous avons déterminées pour nos souches de microalgues sont également très faibles (entre 10 et 200 mg.L<sup>-1</sup> selon la souche et le substrat). En prenant pour exemple *C. sorokiniana*, la concentration en BuH excède toujours le seuil d'inhibition à pH 6 (**Figure 14B**).



**Figure 12 : Détermination du seuil d'inhibition de la croissance mixotrophe des souches vertes par les acides organiques.** Taux de croissance  $\mu$  ( $j^{-1}$ ) de *A. obliquus* (A), *A. protothecoïdes* (B), *C. reinhardtii* (C) et *C. sorokiniana* (D) cultivées en présence de concentrations ( $mg.L^{-1}$ ) croissantes en AcH (bleu) ou BuH (rouge) à pH 6,5. Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.

La connaissance des concentrations maximales en RH tolérables par les microalgues permet donc de déterminer le pH minimum de culture en fonction de la  $C_i$  initiale en AGV dans l'effluent et de la souche considérée. Les procédés de fermentation sont la plupart du temps opérés dans une gamme de pH acide, entre 5 et 6 (Van Ginkel et al., 2001) (Khanal et al., 2004). La production d'AGV par les bactéries entraîne par ailleurs une baisse de pH continue, et, sans contrôle adéquat, le pH en fin de fermentation peut s'approcher de 4 – 4,5 (Ozyurt et al., 2019). Quelles que soient les concentrations en AGV, ces pH seront inhibiteurs pour la croissance des

algues. Pour les hautes concentrations en substrats ( $> 20 \text{ g.L}^{-1}$ ), il apparaît nécessaire d'augmenter le pH près de 8. Cependant, la gamme de pH minimale permettant d'éviter l'inhibition par les acides non dissociés pour une souche ne coïncide pas nécessairement avec sa gamme de croissance optimale. L'étude de la résistance aux acides non dissociés ainsi que des pH maxima de croissance est donc une étude préliminaire nécessaire pour déterminer la concentration maximale en acides non dissociés pouvant supporter la croissance d'une souche en particulier. Au-delà, la dilution de l'effluent sera nécessaire.



**Figure 13 : Les seuils d'inhibition permettent de déterminer le pH minimum de culture.**

(A) Courbes d'évolution de la concentration en RH ( $\text{g.L}^{-1}$ ) en fonction du pH et de la concentration totale  $C_t$  en AGV. (B) Agrandissement sur la zone pH 6-8. Les seuils d'inhibition représentés sont ceux de *C. sorokiniana*. Les courbes ont été tracées en considérant un  $pK_a$  de 4,8 pour les deux AGV.



## 2.2. Les pH alcalins réduisent la vitesse de consommation des substrats organiques

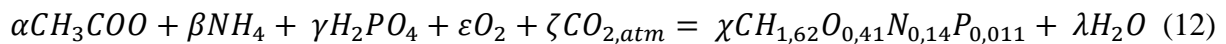
Afin d'évaluer l'influence des pH alcalins (c'est-à-dire supérieurs à 7) sur leur croissance, les quatre souches vertes précédentes, *A. obliquus*, *A. prothotecoïdes*, *C. reinhardtii* et *C. sorokiniana* ont été cultivées en absence de carbone organique (autotrophie) ou en présence de 0,5 gC.L<sup>-1</sup> d'acétate ou de butyrate à quatre pH différents (7, 8, 9 et 10) (condition N°4). Les courbes de croissance obtenues dans chaque condition sont montrées en **Figure 14**, tandis que les caractéristiques de croissance de chaque souche sont rassemblées dans le **Tableau 13**.

En autotrophie, la croissance de chaque souche a été quasi linéaire comme observé en **section 2.1**. Les pH supérieurs à 7 ont considérablement augmenté la phase de latence d'*A. prothotecoïdes*, dont la croissance n'est observable qu'après 6 jours à pH 8 et au-delà. Néanmoins, le pH n'a pas eu d'effet sur la productivité autotrophe en biomasse pour cette souche. De même, la productivité d'*A. obliquus* est constante quel que soit le pH. La productivité de *C. sorokiniana* a augmenté de 0,087 à pH 7 à 0,138 g<sub>x</sub>.L<sup>-1</sup>.j.<sup>-1</sup> à pH 8, mais est restée constante au-delà. Celle de *C. reinhardtii* a été maximale à pH 9 (0,105 g<sub>x</sub>.L<sup>-1</sup>.j.<sup>-1</sup>) puis a diminué considérablement (0,016 g<sub>x</sub>.L<sup>-1</sup>.j.<sup>-1</sup>) à pH 10. Quelle que soit la souche, une croissance, même faible, est observée à ce pH. Comme discuté en **section 2.1**, l'augmentation de la productivité autotrophe avec le pH est possiblement due à l'augmentation de la solubilité en CO<sub>2</sub>, qui est maximale à pH 8-9.

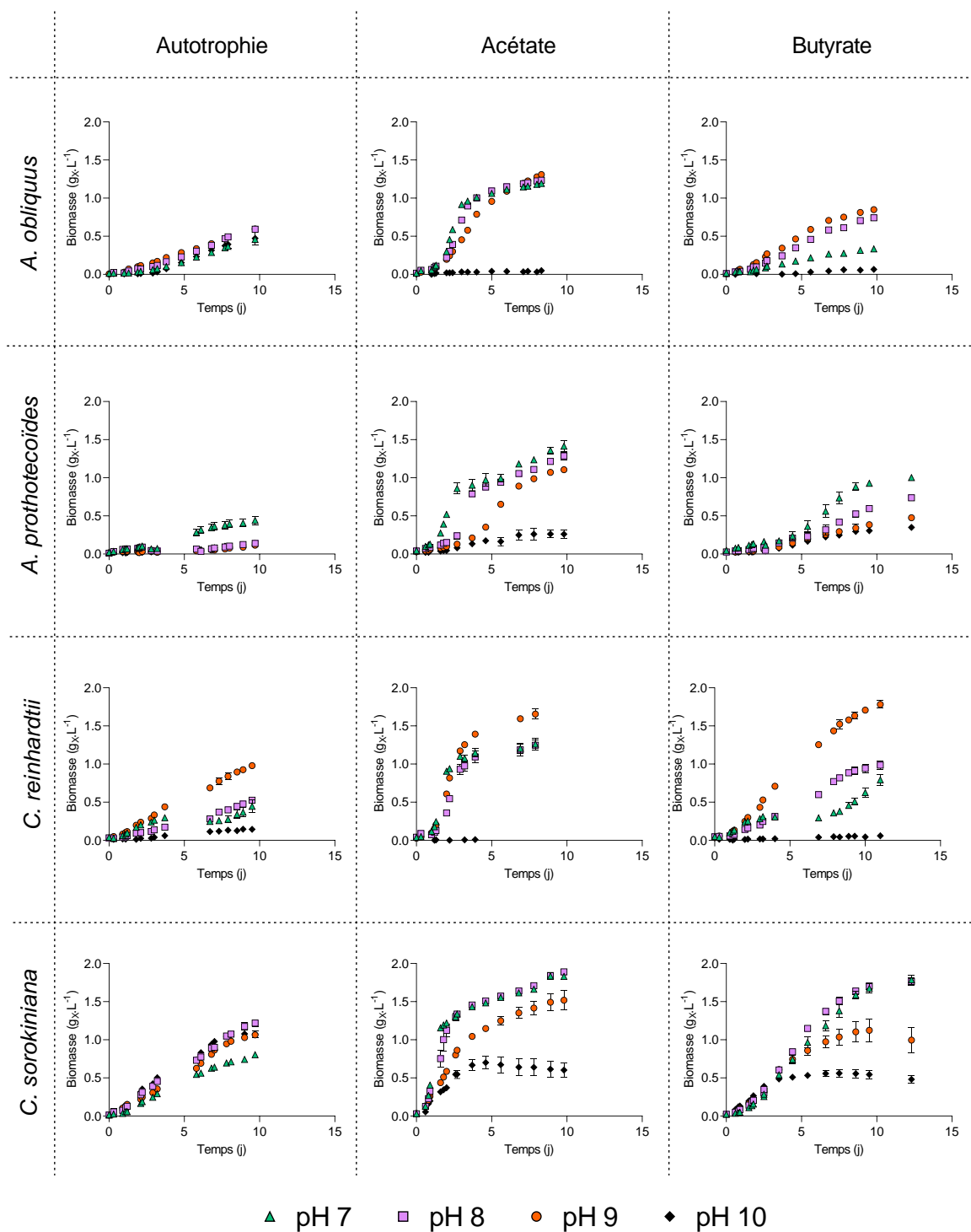
En présence d'acétate, une croissance exponentielle de 1 à 3 jours a pu être observée pour chaque souche et à presque chaque pH (**Figure 14**). La présence d'acétate a toujours augmenté la productivité relative en biomasse par rapport à l'autotrophie hormis à pH 10 (**Figure 15A**), où les croissances d'*A. obliquus* et *C. reinhardtii* sont complètement inhibées. Cependant, le facteur d'augmentation de la productivité par rapport à l'autotrophie diminue avec l'augmentation du pH de 7 à 10, quelle que soit la souche. Cette observation se traduit également par une diminution du taux de croissance sur l'acétate avec le pH, qui est maximal à pH 7 pour chaque souche (**Tableau 13**). Si la croissance a toujours été accompagnée de consommation d'acétate (**Figure 15B**), *C. sorokiniana* n'a pu consommer que 40,1 ± 5,4% d'acétate à pH 9 et 12,6 ± 2,1% à pH 10. De la même manière, *A. prothotecoïdes* n'a pu consommer que 27,1 ± 3,4% d'acétate à ce pH.

### Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat

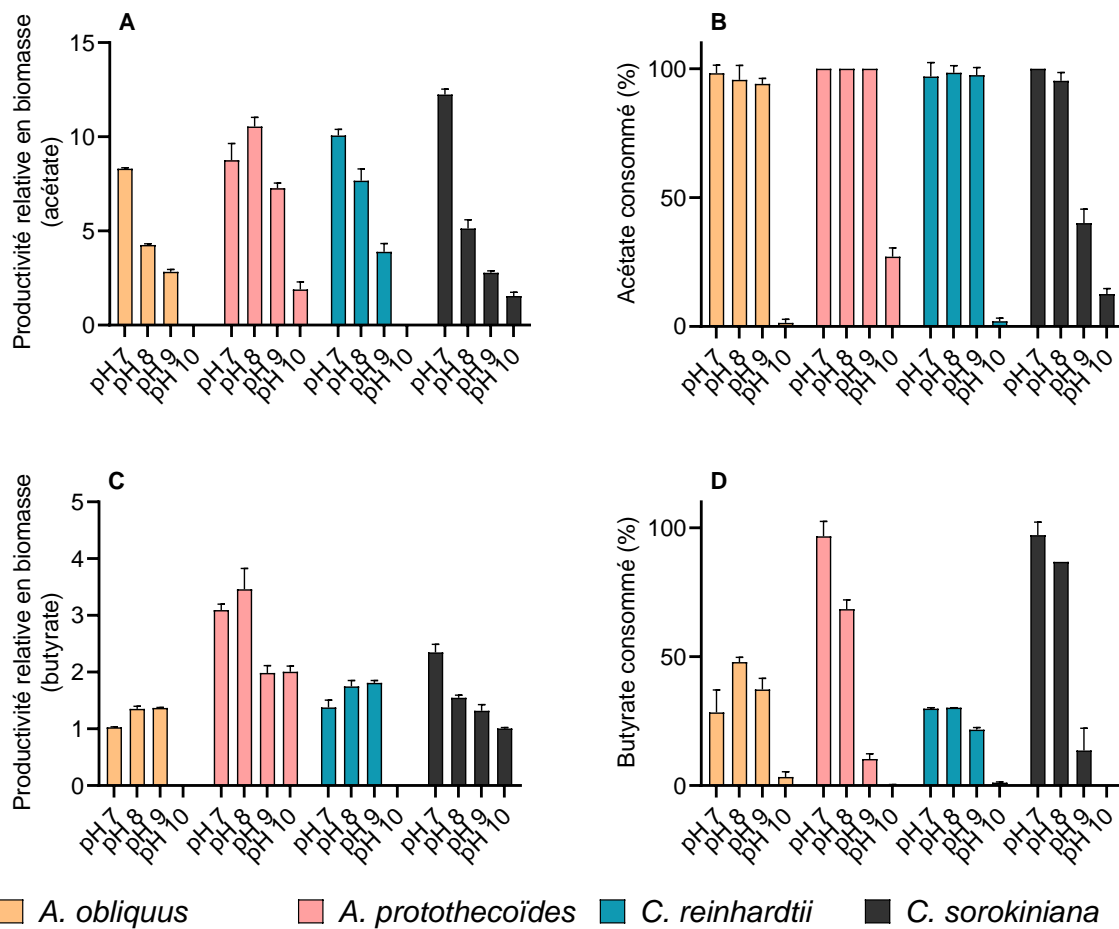
Les rendements en biomasse  $Y_{X/S}$  ( $\text{g}_{\text{CX}}.\text{g}_{\text{CS}}^{-1}$ ) sur l'acétate ont été variables en fonction de la souche et du pH considéré (**Tableau 13**). Hormis en absence de croissance, tous les rendements calculés ont été supérieurs à l'unité. Les rendements de biomasse microalgale peuvent bien s'approcher d'1,0  $\text{g}_{\text{C}}.\text{g}_{\text{C}}^{-1}$  lors de la culture mixotrophe grâce à la fixation du  $\text{CO}_2$  produit internement par la respiration. Par exemple, (Abiusi et al., 2020) ont atteint un rendement de 0,94  $\text{g}_{\text{CX}}.\text{g}_{\text{CS}}^{-1}$  lors de la culture de *C. sorokiniana* sur acétate en mixotrophie. Des rendements plus élevés indiquent qu'un surplus de  $\text{CO}_2$  atmosphérique a été fixé par les cellules (on rappelle que le  $\text{CO}_2$  n'est pas mesuré et n'est donc pas inclus dans le calcul du rendement). Afin de séparer les contributions du carbone inorganique ou organique au rendement en biomasse, un bilan de matière en carbone a été effectué (**Figure 16**). Pour réaliser ce bilan, nous avons considéré l'équation de formation de biomasse (12) pour l'acétate. D'après la formule de biomasse choisie, le carbone représente 53% de la matière sèche. On rappelle que les choix de composition de la biomasse et les implications d'un tel bilan sont détaillées dans le **chapitre 2**.



Après normalisation par rapport à la biomasse produite, on peut estimer la quantité de carbone provenant de la fixation de  $\text{CO}_2$  atmosphérique dans la biomasse. Il est difficile de dégager une tendance pour l'ensemble des souches. L'augmentation du pH n'a pas eu d'effet sur la contribution du  $\text{CO}_2$  fixé au rendement pour *A. obliquus*, a entraîné une diminution de cette contribution pour *A. protothecoïdes* et une augmentation pour les deux autres souches. Globalement, le  $\text{CO}_2$  atmosphérique a contribué pour près de 40-50% du C de la biomasse selon la souche, avec un maximum de 80-95% pour *C. sorokiniana* à pH 9-10.



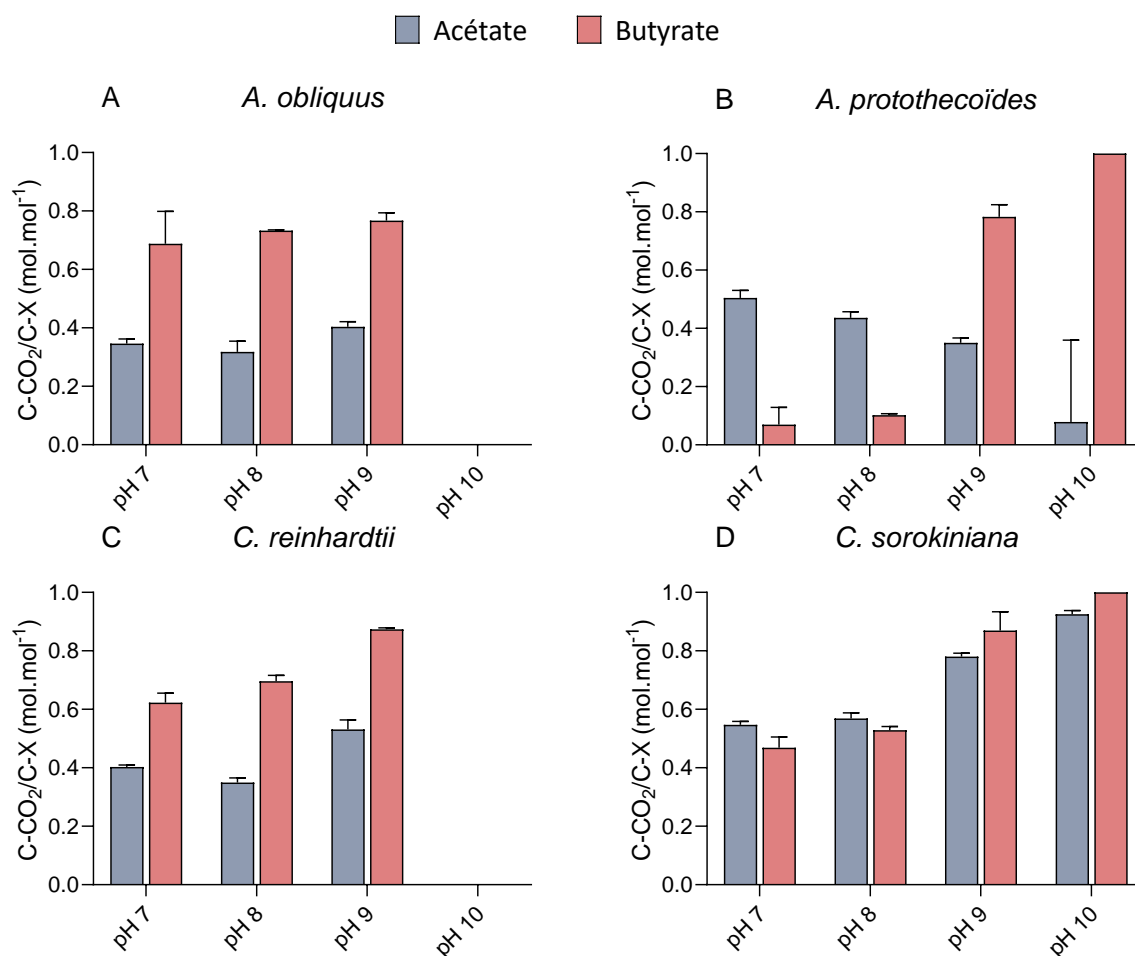
**Figure 14 :** Effets des pH alcalins sur la croissance des souches vertes. Evolution du poids sec ( $g_x.L^{-1}$ ) en fonction du temps (j) pour différentes conditions en pH ou substrats d'*A. obliquus*, *A. protothecoïdes*, *C. reinhardtii* et *C. sorokiniana*. Les souches ont été cultivées en absence de carbone organique (autotrophie) ou en présence de  $0,5 g_C.L^{-1}$  d'acétate ou de butyrate, à pH 7, pH 8, pH 9 ou pH 10. Chaque point représente la moyenne et écart type de trois répliquas biologiques.



**Figure 15 : Diminution de la productivité hétérotrophe et de la consommation en substrat avec l'augmentation du pH initial.** Productivités relative en biomasse ( $\text{g}_x \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ) par rapport à l'autotrophie ( $\text{g}_x \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ) pour les différentes souches cultivées en présence de  $0,5 \text{ g}_C \cdot \text{L}^{-1}$  d'acétate (A) ou de butyrate (C) à pH 7, 8, 9 ou 10. Pourcentage d'acétate (B) ou de butyrate (D) consommé en fin de culture par les différentes souches cultivées à pH 7, 8, 9 ou 10. Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.

**Tableau 13 : Caractéristiques de croissance des souches vertes en présence d'acétate et de butyrate à différents pH.** Le tableau présente les valeurs de taux de croissance ( $\mu$ ,  $j^{-1}$ ) et de rendements ( $Y_{XS}$ ,  $gcx \cdot gcs^{-1}$ ) d'*A. obliquus*, *A. protothecoïdes*, *C. reinhardtii* et *C. sorokiniana* cultivées en présence de  $0,5 \text{ gC}^{-1}$  d'acétate ou de butyrate à pH 7, 8, 9 ou 10. Chaque valeur représente la moyenne et l'écart type de 3 réplicats biologiques. NA : non applicable.

Souche	pH	Acétate		Butyrate	
		$\mu$ ( $j^{-1}$ )	$Y_{XS}$ ( $gcx \cdot gcs^{-1}$ )	$\mu$ ( $j^{-1}$ )	$Y_{XS}$ ( $gcx \cdot gcs^{-1}$ )
<i>A. obliquus</i>	7	$1,38 \pm 0,01$	$1,41 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,01$	$3,33 \pm 0,98$
	8	$1,20 \pm 0,01$	$1,35 \pm 0,08$	$0,27 \pm 0,02$	$3,62 \pm 0,03$
	9	$0,83 \pm 0,05$	$1,55 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,01$	$4,18 \pm 0,47$
	10	0	0	0	0
<i>A. protothecoïdes</i>	7	$1,01 \pm 0,15$	$1,86 \pm 0,07$	$0,36 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,07$
	8	$0,63 \pm 0,06$	$1,63 \pm 0,06$	$0,26 \pm 0,03$	$1,08 \pm 0,01$
	9	$0,50 \pm 0,06$	$1,42 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,05$	$4,56 \pm 0,81$
	10	$0,20 \pm 0,03$	$1,07 \pm 0,34$	$0,18 \pm 0,04$	NA
<i>C. reinhardtii</i>	7	$1,77 \pm 0,03$	$1,54 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,01$	$2,57 \pm 0,21$
	8	$1,53 \pm 0,05$	$1,42 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,01$	$3,19 \pm 0,21$
	9	$1,56 \pm 0,08$	$1,97 \pm 0,14$	$0,41 \pm 0,01$	$7,64 \pm 0,35$
	10	0	0	0	0
<i>C. sorokiniana</i>	7	$3,59 \pm 0,04$	$2,03 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,03$	$1,82 \pm 0,13$
	8	$2,98 \pm 0,26$	$2,14 \pm 0,09$	$0,54 \pm 0,01$	$2,05 \pm 0,06$
	9	$0,89 \pm 0,04$	$4,20 \pm 0,21$	$0,50 \pm 0,01$	$9,27 \pm 5,93$
	10	$0,63 \pm 0,04$	$12,57 \pm 2,4$	$0,48 \pm 0,02$	NA

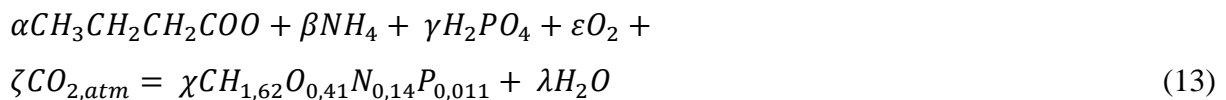


**Figure 16 : La contribution de la fixation de CO<sub>2</sub> au rendement dépend de la souche et du pH.** Chaque graphique représente le coefficient stœchiométrique de CO<sub>2</sub> atmosphérique fixé, calculé à partir des bilans de matière en fonction de  $S_0$  et normalisé par rapport à la biomasse produite pour *A.obliquus* (A), *A. protothecoides* (B), *C. reinhardtii* (C) et *C. sorokiniana* (D) obtenus pour la culture sur acétate (bleu) ou butyrate (rouge). Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.

En présence de butyrate, les effets du pH ont été contrastés en fonction des souches. Les souches ont pu croître à chaque pH, excepté à pH 10 (**Figure 16**). Encore une fois, la croissance d'*A. obliquus* et de *C. reinhardtii* a été inhibée complètement à ce pH. Pour ces deux souches, augmenter le pH de 7 à 8-9 augmente également leur productivité relative à l'autotrophie d'environ 30% (**Figure 16C**), indiquant qu'une partie de leur croissance est due à l'assimilation de butyrate. Néanmoins, leur consommation de butyrate est toujours incomplète et relativement

### Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat

constante en fonction du pH : elles ont consommé un maximum de  $47,9 \pm 1,9$  % pour *A. obliquus* et  $30,2 \pm 0,06$ % pour *C. reinhardtii* à pH 8 (**Figure 16D**). Ce résultat se reflète également dans les rendements en biomasse (**Tableau 13**) et les contributions de fixation en CO<sub>2</sub> pour ces deux souches (**Figure 16**). De la même manière que pour l'acétate, la contribution autotrophe à la formation de biomasse a été calculée selon l'équation (13) :



Pour ces souches, la contribution autotrophe à la croissance a toujours été environ deux fois plus élevées sur le butyrate que l'acétate et, pour une condition de pH donnée, supérieure ou égale à celle des autres souches. Pour *A. protothecoïdes* et *C. sorokiniana*, l'augmentation du pH a entraîné une diminution de la productivité relative par rapport à l'autotrophie. Le taux de croissance d'*A. protothecoïdes* a diminué avec le pH, tandis que celui de *C. sorokiniana* est resté constant. Pour cette souche, comme pour *A. protothecoïdes*, l'augmentation du pH au-delà de 7 a entraîné une diminution progressive de la quantité de substrat assimilé jusqu'à l'absence totale de consommation à pH 10. Les rendements de biomasse se sont donc progressivement élevés, en parallèle d'une augmentation de la contribution autotrophe (totale à pH 10).

Les pH supérieurs à 7 ont de manière générale diminué le taux de croissance mixotrophe sur l'acétate, conformément aux résultats de la littérature. Par exemple, augmenter le pH de culture de 8 à 9 a divisé par deux la quantité d'acétate consommée par la souche *Micractinium reisseri* en mixotrophie (Hwang et al., 2014). La croissance mixotrophe peut être décrite comme la somme de la croissance hétérotrophe (consommation de carbone organique) et autotrophe (fixation de carbone inorganique) (Endo et al, 1977). En partant de cette hypothèse, on peut déterminer si la diminution du taux de croissance mixotrophe sur l'acétate est due à une diminution du taux de croissance hétérotrophe, autotrophe ou une combinaison des deux. L'augmentation du pH initial ayant toujours entraîné une augmentation ou une stagnation de la productivité autotrophe pour chacune des souches, on peut supposer que la diminution du taux de croissance mixotrophe avec le pH est bien due uniquement à la diminution du taux de croissance hétérotrophe. Autrement dit, les résultats indiquent que la vitesse de consommation de l'acétate diminue avec l'augmentation du pH. Ceci concorderait avec les résultats de (Shen et al., 2016) : en condition hétérotrophe, la productivité en biomasse sur acétate de *C. vulgaris* a chuté de  $73,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  à pH 8 à  $9,4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$  à pH 9. Une hypothèse expliquant ce

### Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat

phénomène réside encore dans les formes dissociées et non dissociées des acides ainsi que leur mode de transport. Si les acides non dissociés peuvent diffuser passivement, les acides dissociés (les anions) nécessitent un transport actif. Bien que, à notre connaissance, le système de transport de l'acétate n'ait pas été décrit chez les microalgues, certains auteurs affirment que l'acétate est transporté via un symporteur monocarboxylate proton (MCT), comme chez les levures ou autres eukaryotes (Casal et al., 2008; Perez-Garcia et al., 2011). La vitesse de transport dépend alors des proportions en acides non dissociés et des anions, qui dépendent du pH. Les travaux de (Jolkver et al., 2009) sur l'espèce *Corynebacterium glutamicum* permettent d'illustrer ce propos. La souche a été capable d'assimiler de l'acétate jusqu'à pH 9, avec néanmoins une réduction de la vitesse d'assimilation d'un facteur 1,5 par rapport au pH 6. Les auteurs ont par la suite produit un mutant de l'espèce, incapable de synthétiser les protéines nécessaires au transport des monocarboxylates. En cultivant ce mutant à pH 8 ou 9, la vitesse d'assimilation d'acétate a drastiquement chuté jusqu'à être nulle. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence la contribution du transport actif en fonction du pH : celle-ci est totale aux pH 8 ou 9, c'est-à-dire quand la concentration en acides non dissociés est quasi nulle. La capacité des souches de microalgues étudiées à assimiler l'acétate aux pH alcalins indiquerait donc la présence d'un transporteur actif. Par définition, la concentration en protons diminue avec l'augmentation du pH. En supposant que l'assimilation d'une molécule d'acétate nécessite également un proton (symporteur), la concentration en proton doit devenir limitante au-delà d'un certain pH, par exemple 10. Une croissance ayant été observée dans le contrôle autotrophe, l'absence de croissance en mixotrophie ne peut être due à la valeur du pH. La très faible concentration en protons dans le milieu à pH 10 a pu conduire à une demande énergétique trop importante de la part des cellules pour contrer le gradient et l'assimilation est alors devenue impossible. L'absence totale de croissance indique que la présence d'acétate a de plus totalement inhibé le métabolisme autotrophe d'*A. obliquus* et de *C. reinhardtii*.

Les mêmes conclusions peuvent être tirées à partir des résultats obtenus sur le butyrate. La plus forte dépendance de la consommation du butyrate au pH pour *A. protothecoïdes* et *C. sorokiniana* indique qu'elles se reposent davantage sur le transport passif (diffusion) du butyrate. Cela étant, il est surprenant qu'*A. obliquus* et *C. reinhardtii* aient consommé plus de butyrate que *A. protothecoïdes* et *C. sorokiniana* à pH 9. Ces résultats suggèreraient en effet qu'*A. obliquus* et *C. reinhardtii* possèdent un transporteur présentant une certaine affinité pour le butyrate, ce qui permet un transport actif aux pH 8-9. Il semble cependant étonnant qu'une



souche montrant une certaine capacité le butyrate (comme *A. prothotecoïdes* ou *C. sorokiniana*) ne possède pas de transporteur actif tandis que des souches peu consommatrices (comme *C. reinhardtii*) en possède un.

### 2.3. Les concentrations en substrat organique croissantes diminuent les rendements mixotrophes

Les résultats présentés en **section 2.1** nous ont permis de conclure que la croissance des microalgues est inhibée par les concentrations en acides non dissociés RH. Ces concentrations sont liées à la concentration totale en acide organique et au pH du milieu, lien reflété par l'équation de Handersen-Hasselbach. Diminuer la concentration en RH en dessous du seuil d'inhibition est donc possible en diminuant la concentration totale dans le milieu, ce qui peut être facilement réalisé en le diluant. Toutefois, ceci aurait pour conséquence de diminuer la concentration en biomasse finale. Une autre possibilité est d'augmenter le pH initial du milieu, ce qui permet de travailler à des concentrations élevées en carbone. Pour évaluer cette hypothèse et évaluer l'effet de la concentration en substrat, *C. sorokiniana* a été cultivée en présence d'acétate ou de butyrate à des concentrations allant de 0,5 gcs.L<sup>-1</sup> à 5,0 gcs.L<sup>-1</sup> (condition N°5). Afin de minimiser les concentrations en formes non dissociées, le pH initial du milieu a été fixé à 8. Les concentrations en acétate ou butyrate (total) ainsi que les concentrations en acides non dissociés correspondantes sont indiquées dans le **Tableau 14**.

La croissance de *C. sorokiniana* a pu être observée quelle que soit la concentration initiale en AGV (**Figure 17**). En présence d'acétate, un taux de croissance moyen autour de  $3,93 \pm 0,13$  j<sup>-1</sup> a été observé pour les concentrations 0,5 – 3 gcs.L<sup>-1</sup> sans différence significative. Augmenter la concentration en acétate entre 4,0 et 5,0 gcs.L<sup>-1</sup> a entraîné une légère diminution du taux de croissance jusqu'à  $3,33 \pm 0,08$  j<sup>-1</sup>. Les taux de croissance de *C. sorokiniana* en présence de butyrate ont été 10 fois plus faible qu'avec l'acétate, en moyenne autour de  $0,44 \pm 0,04$  j<sup>-1</sup>, sans différence significative entre les conditions. En fixant le pH initial à 8,0, *C. sorokiniana* a donc pu croître sans inhibition majeure en présence de 12,5 g.L<sup>-1</sup> d'acétate et de 9,2 g.L<sup>-1</sup> de butyrate.

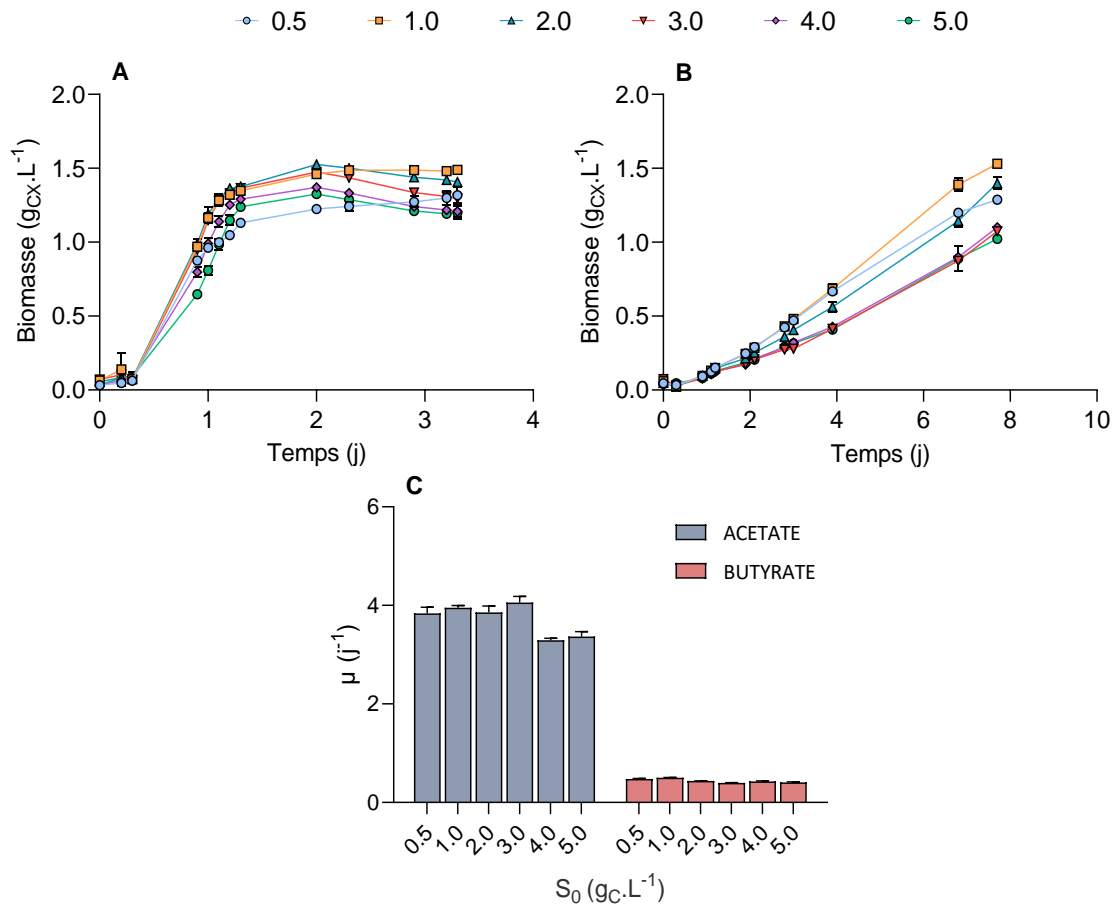
**Tableau 14 : Concentrations en acides totaux ou dissociés évaluées pour la croissance de *C. sorokiniana*.** Ces correspondances sont données pour un pH initial du milieu égal à 8.0.

[AGV] (gC.L <sup>-1</sup> )	[Acétate] (g.L <sup>-1</sup> )	[AcH] (mg.L <sup>-1</sup> )	[Butyrate] (g.L <sup>-1</sup> )	[BuH] (mg.L <sup>-1</sup> )
0,5	1,25	0,8	0,9	0,6
1	2,5	1,6	1,8	1,2
2	5	3,2	3,7	2,3
3	7,5	4,7	5,5	3,5
4	10	6,3	7,3	4,6
5	12,5	7,9	9,2	5,8

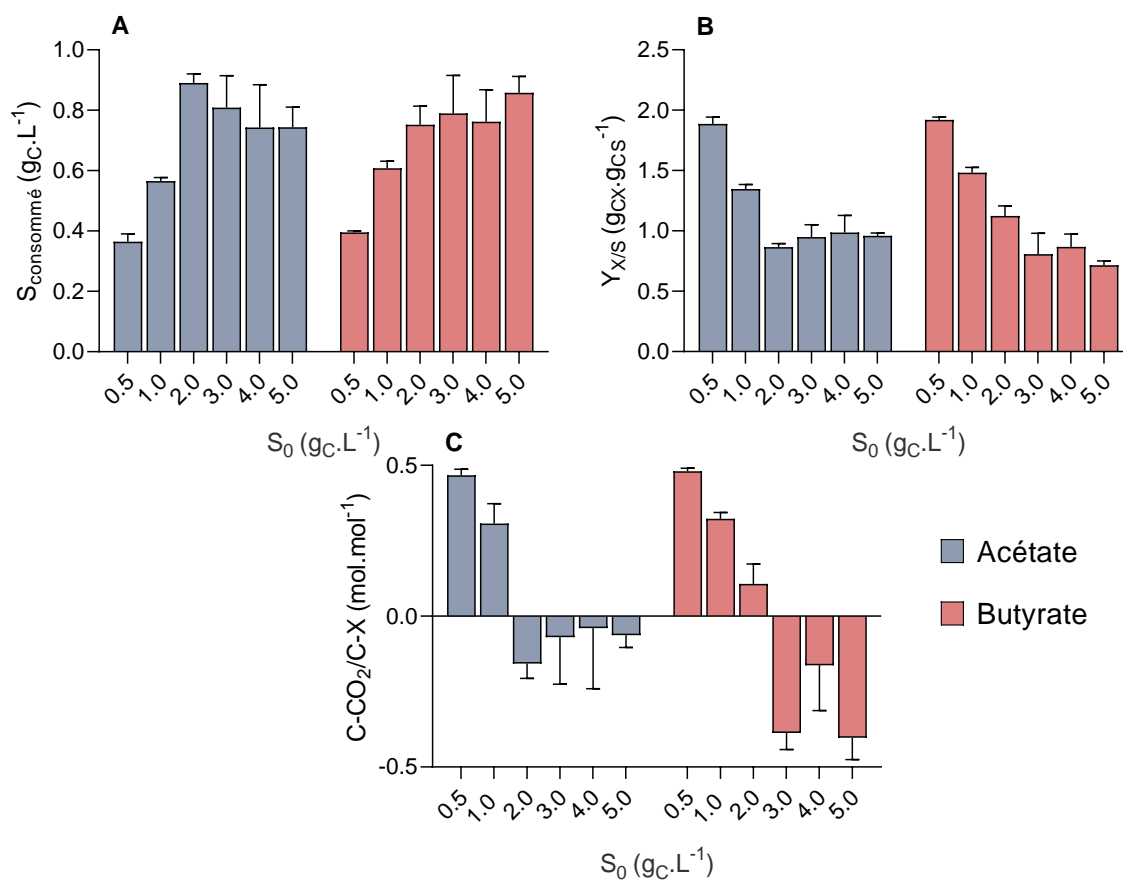
L'augmentation de la  $C_T$  au-delà de 1,0 g<sub>CS</sub>.L<sup>-1</sup> a toutefois été accompagnée d'une diminution de la biomasse finale atteinte en fin de culture. Si un maximum de 1,5 g<sub>X</sub>.L<sup>-1</sup> a été obtenu à  $S_0 = 1,0$  g<sub>CS</sub>.L<sup>-1</sup> pour les deux substrats, augmenter la  $S_0$  a conduit à une diminution de la biomasse finale de 1,4 g<sub>X</sub>.L<sup>-1</sup> à 2 g<sub>CS</sub>.L<sup>-1</sup> à 1,0 (butyrate) ou 1,2 (acétate) g<sub>X</sub>.L<sup>-1</sup> à 5 g<sub>CS</sub>.L<sup>-1</sup>. Par ailleurs, la consommation du substrat a été incomplète quelle que soit la concentration initiale  $S_0$  en substrat (**Figure 17A**), mais a augmenté avec l'augmentation de la  $S_0$ . La quantité de carbone organique assimilée en présence de 0,5 g<sub>CS</sub>.L<sup>-1</sup>  $S_0$  n'est pas la quantité maximum assimilable : seulement 0,38 g<sub>CS</sub>.L<sup>-1</sup> a été consommé dans ces conditions alors que jusqu'à 0,57-0,84 g<sub>CS</sub>.L<sup>-1</sup> a pu être consommé lorsque la  $S_0$  a été augmentée entre 1,0 et 2,0 g<sub>CS</sub>.L<sup>-1</sup>. La diminution de la biomasse finale et l'augmentation de la consommation en substrat se sont traduits par une diminution des rendements en biomasse ( $Y_{X/S}$ , g<sub>CX</sub>.g<sub>CS</sub><sup>-1</sup>) (**Figure 17B**) avec la  $S_0$ . Un rendement de 1,9 g<sub>CX</sub>.g<sub>CS</sub><sup>-1</sup> a ainsi été obtenu pour 0,5 g<sub>CS</sub>.L<sup>-1</sup> de substrat, chutant à 0,96 ou 0,72 g<sub>CX</sub>.g<sub>CS</sub><sup>-1</sup> pour 5 g<sub>CS</sub>.L<sup>-1</sup> d'acétate ou butyrate respectivement.

On rappelle que les rendements mixotrophes peuvent s'approcher de l'unité grâce au fonctionnement simultané des deux métabolismes. Comme nous avons pu le voir dans la section précédente, les rendements supérieurs reflètent une contribution plus ou moins importante de la fixation de CO<sub>2</sub> atmosphérique. Inversement, une diminution du rendement reflète une prévalence du métabolisme hétérotrophe. Afin de déterminer les contributions du métabolisme autotrophe au rendement, le même bilan de matière que précédemment a été réalisé pour chaque condition (**Figure 18**). Les coefficients positifs en C-CO<sub>2</sub> obtenus pour les  $S_0$  inférieures à 1,0 g<sub>CS</sub>.L<sup>-1</sup> montrent que la formation de biomasse n'a pu être due qu'à la fixation de CO<sub>2</sub> pour ces concentrations, peu importe la nature du substrat. Ceci pourrait signifier que les cellules ont été limitées en carbone organique : la concentration résiduelle en AGV (entre 0,1 et 0,4 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup>) en

fin de culture contredit toutefois cette hypothèse. Pour ces concentrations, du CO<sub>2</sub> atmosphérique a donc été fixé au détriment de la consommation de carbone organique. D'un autre côté, l'augmentation de la S<sub>0</sub> au-delà d'1,0 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup> a entraîné une diminution significative de la quantité de CO<sub>2</sub> atmosphérique fixée par les cellules, jusqu'à être nulle voire négative.



**Figure 17 : Absence d'inhibition de la croissance mixotrophe de *C. sorokiniana* en présence de hautes concentrations en acides organiques.** Evolution du poids sec (g<sub>X</sub>.L<sup>-1</sup>) de *C. sorokiniana* en fonction du temps (j) cultivée en présence de 0,5 (ronds bleus), 1,0 (carrés oranges), 2,0 (triangle vers le haut bleus), 3,0 (triangles vers le bas rouges), 4,0 (losanges violets) ou 5,0 (ronds verts) g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup> d'acétate (A) ou de butyrate (B) à pH 8. Le graphique C représente les taux de croissance μ (j<sup>-1</sup>) dérivés de ces courbes de croissance en fonction du substrat initial S<sub>0</sub> (g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup>) pour l'acétate (bleu) ou le butyrate (rouge). Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.



**Figure 18 : La consommation de substrat organique augmente tandis que le rendement mixotrophe diminue avec l'augmentation de la concentration en AGV. (A) Quantité d'acétate (bleu) ou de butyrate (rouge) consommée (gC.L<sup>-1</sup>) par *C. sorokiniana* en fonction de la quantité de substrat initial  $S_0$  (gC.L<sup>-1</sup>). (B) Rendement mixotrophe ( $Y_{X/S}$ , gCX.gC<sup>-1</sup>) en fonction de la  $S_0$ . (C) Coefficient stœchiométrique de CO<sub>2</sub> atmosphérique fixé, calculé à partir des bilans de matière en fonction de  $S_0$  et normalisé par rapport à la biomasse produite. Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.**

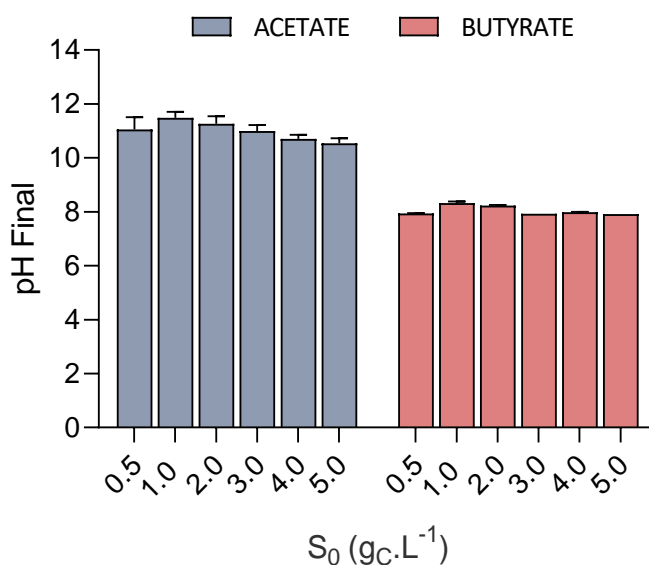
Deux conclusions peuvent être tirées de ces expériences. D'abord, la croissance de *C. sorokiniana* est bien possible à de relativement hautes concentrations en AGV, sans inhibition majeure, tant que la forme non dissociée des acides est minimisée. Ce résultat permet donc d'envisager la possibilité de cultiver *C. sorokiniana* (et d'autres souches de microalgues) sur des effluents de FS avec un minimum de dilution. En s'affranchissant de l'inhibition provoquée

### Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat

par les acides non dissociés, l'étude des effets de la concentration en acétate et butyrate a par ailleurs été rendue possible. La diminution du rendement mixotrophe avec l'augmentation de la  $C_T$  reflète quant à elle une compétition entre l'hétérotrophie et l'autotrophie : lorsque la  $C_T$  augmente, la quantité de  $\text{CO}_2$  atmosphérique fixé diminue au profit de la consommation de carbone organique.

Malheureusement, plusieurs biais remettent en question la validité de ces résultats. Il est étonnant de constater une stagnation de la concentration en biomasse finale avec l'augmentation de la  $C_T$  : augmenter la quantité de carbone total disponible aurait dû conduire à la production de davantage de biomasse, quelles que soient les interactions entre autotrophie et hétérotrophie. La croissance a donc dû être limitée par un autre facteur.

Dans ces expériences, le pouvoir tampon a été fixée à 20 mM, concentration utilisée dans le milieu HAP standard. Il apparaît que cette concentration n'a pas été suffisante pour compenser le changement de pH induit par l'assimilation de l'acétate (**Figure 19**). En revanche, le pH est resté stable aux alentours de 8 lors de la culture sur butyrate. Le butyrate contient deux fois plus de carbone par groupe monocarboxylate assimilé par rapport à l'acétate : une augmentation du pH moindre par rapport à l'acétate est donc attendue mais devrait néanmoins être visible. Les écarts d'élévation du pH entre les deux conditions pourraient également être dus aux variations entre les taux de consommation des deux substrats. En effet, le taux de croissance sur le butyrate étant 10 fois plus faible que sur l'acétate, les échanges gazeux, notamment la diffusion du  $\text{CO}_2$  atmosphérique dans le milieu, ont pu compenser en partie l'augmentation du pH. Toutefois, il est peu probable que ce phénomène explique seul les différences observées : dans les puits ne contenant pas de cellules (blancs), le pH du milieu n'a diminué que de 0,2 unité dans les puits acétate et de 0,4 unité pH dans les puits butyrate à la fin de la culture (3,4 jours pour l'acétate, 7,8 jours pour le butyrate). Quelle que soit la cause de différence d'élévation du pH entre les deux conditions, cette observation remet en cause les conclusions que nous avons tirées précédemment : nous avons en effet conclu en **section 2.2** que l'élévation du pH diminuait l'assimilation des AGV.



**Figure 19 : Elévation du pH lors de la culture sur acétate.** Le pH a été mesuré dans chaque puits en fin de culture. Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.

La phase stationnaire a également pu être atteinte après que les nutriments tels que l'azote (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou le phosphore (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) ont été entièrement consommés. En effet, une concentration fixe en ammonium de 7,5 mM (105 mgN-NH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>) et en phosphate de 1 mM (15 mgP-PO<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>) a été ajoutée au milieu. Ces concentrations correspondent à celles présentes dans le milieu HAP standard, contenant 0,5 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup>. Si on considère une formule de biomasse de CH<sub>1,62</sub>O<sub>0,41</sub>N<sub>0,14</sub>P<sub>0,011</sub> pour *C. sorokiniana* (Boyle and Morgan, 2009), ces concentrations en nutriments ne peuvent supporter la croissance qu'à hauteur de 0,64 g<sub>CX</sub>.L<sup>-1</sup>, ce qui correspond globalement aux valeurs obtenues ci-dessus.

Au vu de la variation des deux paramètres, il reste donc difficile de conclure d'après ces expériences si l'arrêt de la croissance et la consommation incomplète des substrats sont dues uniquement à l'augmentation du pH, au manque de nutriment ou à une combinaison des deux effets. Cette question fait l'objet du prochain paragraphe.

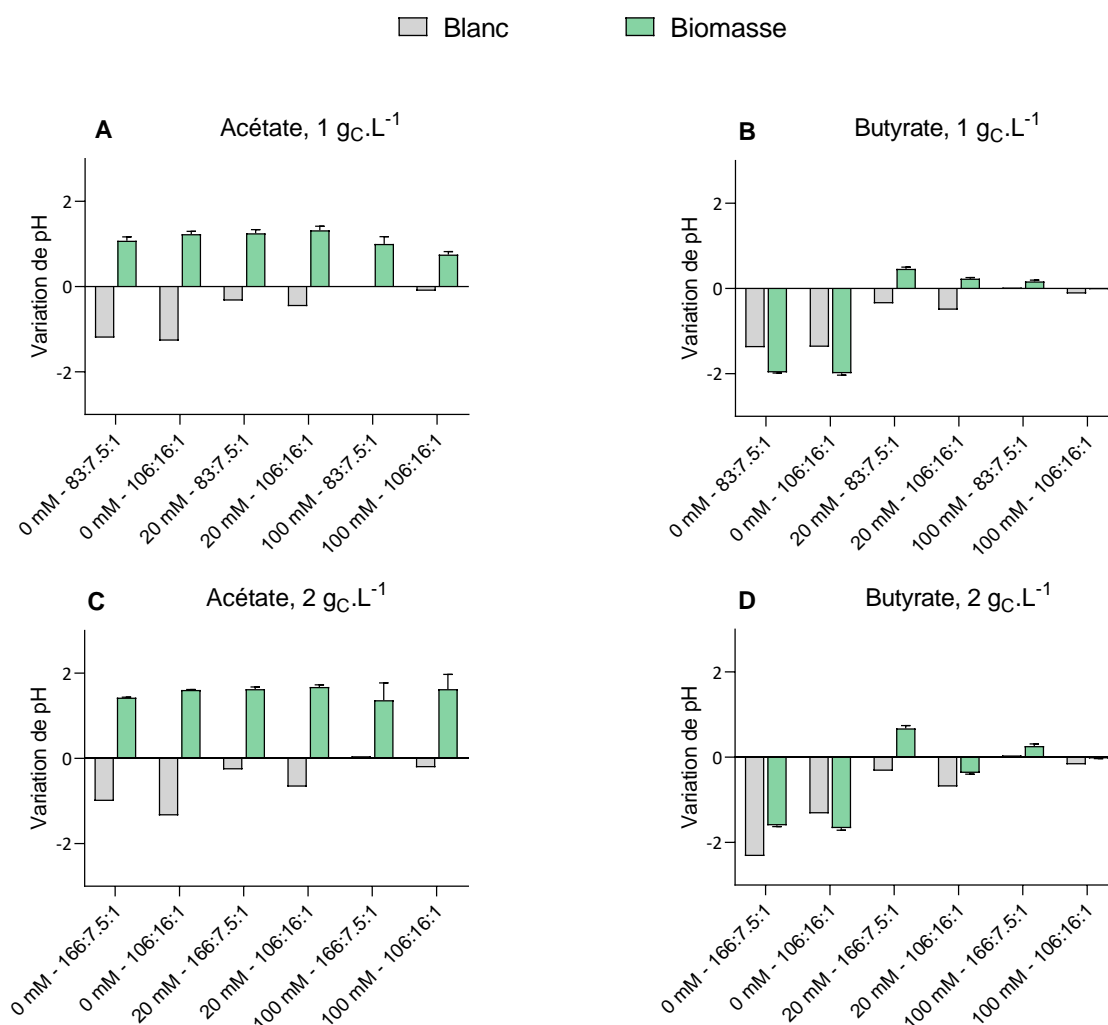
## 2.4. Effets combinés du pouvoir tampon, des nutriments et de la concentration en substrat

Afin de distinguer les effets de variations du pH pendant la culture, de limitations en nutriments ou de leur combinaison sur la croissance de *C. sorokiniana* et sa consommation du substrat, nous avons cultivé cette souche en présence de 1,0 ou 2,0 gcs.L<sup>-1</sup> d'acétate ou de butyrate. Pour chaque concentration, deux différents ratios C:N:P ont été évalués (condition N°6). D'un côté, un des deux C:N:P a été choisi pour refléter une condition dans laquelle la concentration de chaque macroélément devrait être équilibrée. Pour cette condition, nous avons choisi le ratio 106:16:1 (Ratio de Redfield) comme référence. De l'autre côté, un C:N:P différent a été choisi en tant que condition où les nutriments (N ou P) devraient limiter la croissance. Pour une concentration de 1,0 gcs.L<sup>-1</sup>, le C:N:P a été fixé à 83:7,5:1 et pour 2,0 gcs.L<sup>-1</sup>, le C:N:P a été fixé à 166:7,5:1. Pour chaque condition, trois pouvoirs tampons différents ont été évalués : 0, 20 et 100 mM d'HEPES. Le pH initial de culture a été fixé à 8. Chaque culture a été menée 7,6 jours. Dans chaque condition, le pH final et les concentrations finales en biomasse et en AGV ont été mesurées.

### 2.4.1. Le contrôle du pH maximise la croissance de *C. sorokiniana*

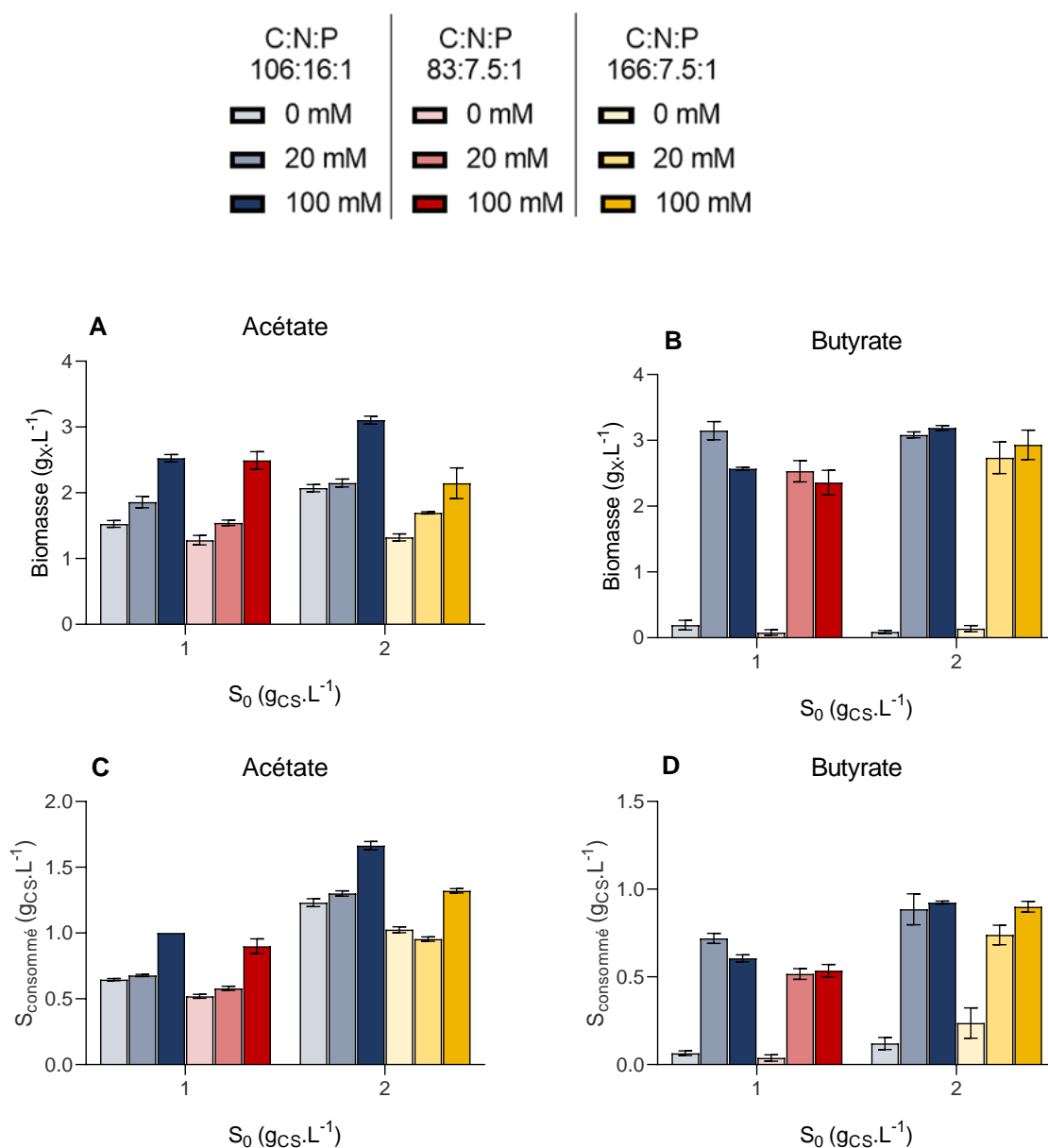
En présence d'acétate, le pH final de culture n'a pas été significativement différent entre chaque condition et a constamment augmenté jusqu'à 9,0 – 9,5 (**Figure 20A-C**). Il est toutefois probable que le pouvoir tampon a joué sur les dynamiques d'évolution du pH ou sur la valeur maximale atteinte pendant la culture. Dans les conditions faiblement tamponnées (0 et 20 mM), on peut supposer que le pH a augmenté jusqu'à 10-11, conformément aux résultats obtenus en **Figure 19**. Les cultures ayant duré cette fois-ci 7,6 jours au lieu de 3,2, le milieu s'est acidifié suite à l'arrêt de la croissance et la diffusion de CO<sub>2</sub>. Les puits blancs montrent en effet que sans inoculum, et donc sans croissance, le pH du milieu a eu tendance à diminuer.

Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat



**Figure 20 : Fluctuations du pH lors de la culture de *C. sorokiniana*.** Variations du pH par rapport au pH initial (fixé à 8) mesurés dans les puits sans inoculum (gris) ou avec inoculum (vert) à la fin de la culture (7,6 jours) de *C. sorokiniana* cultivée en présence de différentes concentrations en pouvoir tampon (0, 20 ou 100 mM) et différents C:N:P (83:7,5:1 ; 166:7,5:1 et 106:16:1) et différents substrats. Les panneaux diffèrent selon les substrats et concentrations initiales  $S_0$  utilisés. Panneau A : Acétate, 1,0 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup>. Panneau B : Butyrate, 1,0 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup>. Panneau C : Acétate, 2,0 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup>. Panneau D : Butyrate, 2,0 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup>. Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.





**Figure 21 : Importance du pouvoir tampon et de la concentration initiale en substrat pour la croissance et la consommation des AGV.** Concentration en biomasse finale ( $g_{CS} \cdot L^{-1}$ ) en fin de culture (7,6 jours) de *C. sorokiniana* cultivée en présence de différentes concentrations  $S_0$  d'acétate (A) ou de butyrate (B). Concentration en acétate (C) ou butyrate (D) consommée ( $g_{CS} \cdot L^{-1}$ ). Les différentes couleurs indiquent les ratios C:N:P (106:16:1, bleu ; 83:7,5:1, rouge et 166:7,5:1, jaune) tandis que la transparence indique le pouvoir tampon (0 mM, clair ; 20 mM, moyen ; 100mM, foncé). Chaque point représente la moyenne et écart type de trois répliques biologiques.

### Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat

Malgré l'absence de différence de pH final, la concentration en biomasse finale s'est révélée corrélée au pouvoir tampon dans le milieu : augmenter la concentration en tampon de 0-20 mM à 100 mM a toujours entraîné une augmentation de la biomasse finale, quel que soit le C:N:P (**Figure 21**). Diminuer les ratio C:N:P a bien conduit à une augmentation significative de la biomasse finale, mais plus faiblement que l'augmentation du pouvoir tampon. En prenant pour exemple la condition 1,0 gcs.L<sup>-1</sup> d'acétate sans tampon (0 mM), 1,5 et 1,3 gx.L<sup>-1</sup> de biomasse ont été respectivement obtenus pour les C:N:P 106:16:1 et 83:7,5:1. Augmenter le pouvoir tampon à 100 mM a conduit à un doublement de la biomasse finale (2,5 gx.L<sup>-1</sup>), sans différence significative, dans les deux cas. Dans le cas de la limitation la plus sévère ( $S_0 = 2$  gc.L<sup>-1</sup>; C:N:P = 166:7,5:1), le ratio C:N:P a eu une influence plus prononcée. Pour une  $S_0$  de 2,0 gcs.L<sup>-1</sup>, 1,32 gx.L<sup>-1</sup> ont été obtenus dans la condition 0 mM – 166:7,5:1, tandis que jusqu'à 2,0 gx.L<sup>-1</sup> ont été obtenus pour un C:N:P de 106:16:1. Néanmoins, augmenter le pouvoir tampon à 100 mM a de la même manière entraîné un doublement de la biomasse finale, jusqu'au même niveau que celle obtenue dans la condition 0 mM – 106:16:1.

En présence de butyrate, la présence de tampon a été obligatoire pour empêcher l'inhibition de la croissance par le butyrate. L'absence de pouvoir tampon (0 mM) a en effet conduit à une diminution du pH aux alentours de 6 ou 6,5, et ce en présence ou en absence de biomasse (**Figure 21B-D**). La consommation du butyrate étant lente, l'acidification du milieu a pu se produire plus rapidement que la croissance des cellules. En conséquence, la concentration en BuH a atteint une concentration inhibitrice, empêchant toute croissance. En effet, à ces pH finaux, la concentration en BuH est de 108,6 ou de 217,2 mg.L<sup>-1</sup> à 1,0 ou 2,0  $S_0$  respectivement, dans les deux cas supérieure aux concentrations inhibitrices déterminées en **section 2.1**. Tamponner le milieu avec 20 mM d'HEPES a été suffisant pour empêcher toute chute du pH. Les cellules n'ont donc pas été inhibées et ont pu croître. Comme observé en section précédente, le pH a très faiblement augmenté en fin de culture (maximum 0,5 unité pH avec 20 mM de tampon). Augmenter le pouvoir tampon de 20 à 100 mM n'a donc pas significativement impacté la croissance. Les différents ratios de C:N:P n'ont pas eu d'effet significatif sur la biomasse finale.

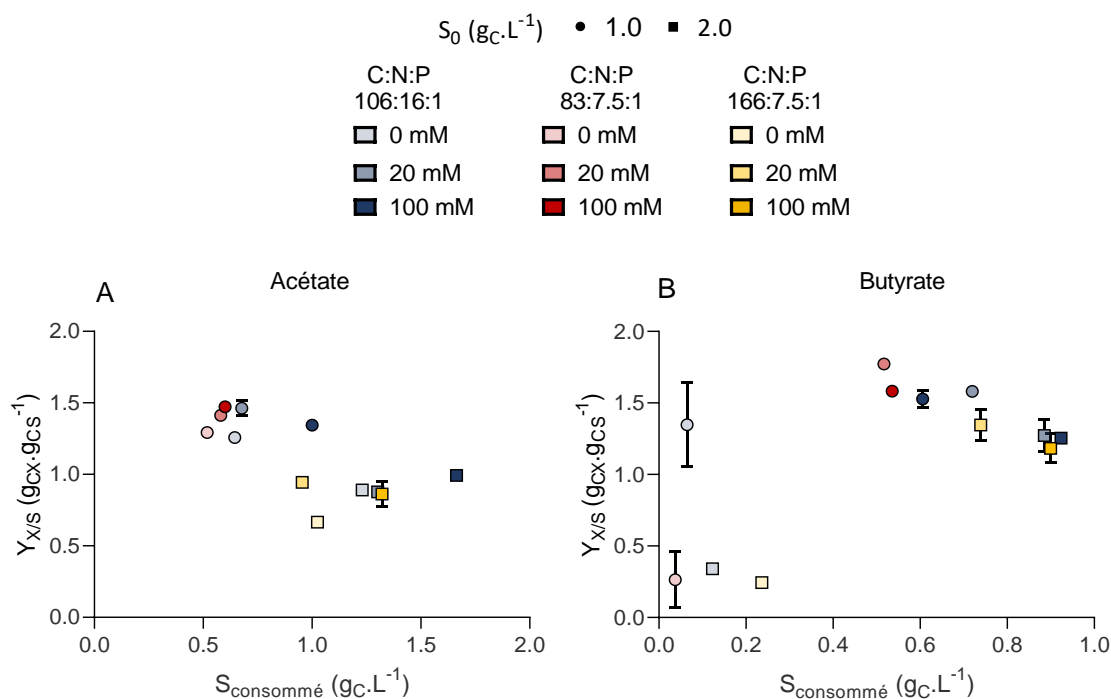
Quel que soit le substrat, l'augmentation de la biomasse finale avec le pouvoir tampon a toujours été liée à l'augmentation de la consommation en substrat : pour une  $S_0$  donnée, la consommation du substrat augmente toujours avec le pouvoir tampon, quel que soit le C:N:P (**Figure 21**).

On distingue ainsi deux effets de la concentration en tampon en fonction du substrat employé. Lors de la culture sur butyrate, le contrôle du pH est nécessaire pour empêcher une acidification du milieu due aux échanges gazeux ou d'autres processus cellulaires, plus rapides que la consommation du substrat, qui entraîne *in fine* une augmentation de la concentration en acides non dissociés. Dans le cas de l'acétate, le contrôle du pH est nécessaire pour éviter une alcalinisation trop rapide ou trop importante du milieu suite à la consommation de l'acétate, ayant pour conséquence de limiter l'assimilation du substrat comme décrit en **section 2.2**.

#### 2.4.2. La consommation des substrats et les rendements en biomasse dépendent principalement de la concentration en substrat initiale

Outre le pH, la consommation de substrat est aussi dépendante de la  $S_0$  (**Figure 21**). Par exemple, les cellules apparaissent métaboliquement capables de consommer jusqu'à près de  $1,0 \text{ gcs.L}^{-1}$  d'acétate même dans la condition la moins favorable (0 mM de tampon – 166:7,5:1) pour une  $S_0$  de  $2,0 \text{ gcs.L}^{-1}$ . Lorsque la concentration initiale est de  $1,0 \text{ gcs.L}^{-1}$ , dans les mêmes conditions de tampon et de C:N:P, les cellules ne peuvent assimiler que la moitié de cette concentration. De la même manière, augmenter la  $S_0$  de  $1,0$  à  $2,0 \text{ gcs.L}^{-1}$  a entraîné une augmentation de la quantité de butyrate consommée en fin de culture pour une même condition de tampon ou de C:N:P. Par exemple,  $0,61 \text{ gcs.L}^{-1}$  de butyrate a été consommé dans la condition 100 mM – 106:16:1 à  $S_0$   $1,0 \text{ gcs.L}^{-1}$ , quantité qui s'élève à  $0,93 \text{ gcs.L}^{-1}$  lorsque la  $S_0$  est doublée.

Les rendements en biomasse obtenus dans chaque condition ont été tracés en fonction de la quantité d'acétate (**Figure 22A**) ou de butyrate (**Figure 22B**) consommée. Les rendements ont été légèrement affectés par le pouvoir tampon et le ratio C:N:P mais ont principalement dépendu de la  $S_0$ . Les rendements en biomasse sur  $1,0 \text{ gcs.L}^{-1}$  d'acétate ont été regroupés autour de  $1,3\text{-}1,5 \text{ gcx.gcs}^{-1}$ . Augmenter la  $S_0$  à  $2,0 \text{ gcs.L}^{-1}$  a entraîné une diminution des rendements de 26-48% selon la condition. En excluant le point 0 mM – 166:7,5:1, aucune différence significative entre chaque condition n'a été observée pour  $2,0 \text{ gcs.L}^{-1}$ . Le rendement minimum ( $0,66 \text{ gcx.gcs}^{-1}$ ) a été obtenu pour la condition la plus sévère (0 mM – 166:7,5:1). La même tendance a pu être observée sur butyrate, en excluant les points à 0 mM de pouvoir tampon où aucune croissance n'a été observée : augmenter la  $S_0$  de  $1,0$  à  $2,0 \text{ gcs.L}^{-1}$  a conduit à une diminution significative du rendement de 22%.



**Figure 22 : Le rendement mixotrophe dépend principalement de la concentration initiale en substrat.** Rendements mixotrophes ( $Y_{X/S}$ ,  $g_{Cx} \cdot g_{Cs}^{-1}$ ) en fonction de la quantité d'acétate (A) ou de butyrate (B) consommée. Les différentes couleurs indiquent les ratios C:N:P (106:16:1, bleu ; 83:7,5:1, rouge et 166:7,5:1, jaune) tandis que la transparence indique le pouvoir tampon (0 mM, clair ; 20 mM, moyen ; 100mM, foncé). Les symboles indiquent la concentration en substrat initiale  $S_0$  (rond, 1  $g_C \cdot L^{-1}$  ; carré, 2  $g_C \cdot L^{-1}$ ). Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.

Ces résultats concordent avec les observations faites en **section 2.3.2**. Lors de la culture sur de faibles concentrations en substrats, ici inférieures ou égales à 1,0  $g_{Cs} \cdot L^{-1}$ , les rendements en biomasse sont toujours plus élevés, indépendamment de la quantité en nutriments ou du pouvoir tampon. Augmenter la  $S_0$  conduit toujours à une diminution du rendement de biomasse, encore une fois indépendamment du C:N:P ou du pouvoir tampon, associé à l'augmentation de la consommation de substrat organique. L'ensemble de ces résultats suggèrent une compétition entre l'assimilation du carbone organique et inorganique. En mode fermé, les cellules ne peuvent assimiler qu'une quantité fixe de carbone, déterminée par les autres conditions abiotiques (pH, luminosité, autres macro- et microéléments). En supposant que les deux

métabolismes fonctionnent indépendamment l'un de l'autre, la fraction de carbone organique ou inorganique assimilée ne doit alors dépendre que des vitesses d'assimilation (autrement dit des taux de croissance) de l'un ou l'autre substrat. Si on ne considère pas d'inhibition, ce qui est légitime en se plaçant à une concentration en RH inférieure au seuil de tolérance et à une relativement faible intensité lumineuse comme 100  $\mu\text{E}$ , chaque taux de croissance dépend directement de la concentration en substrat selon le formalisme de Monod. Aux concentrations en AGV inférieures ou égales à 1  $\text{g}_{\text{CS}}.\text{L}^{-1}$ , la concentration en substrat a pu devenir inférieure à la constante d'affinité  $K_S$  de la souche dans ces conditions lors de la consommation du substrat. Il est alors possible que la consommation de carbone organique soit devenue plus lente que la fixation de  $\text{CO}_2$  à un certain point. Puisque les cellules sont limitées dans la quantité totale de carbone qu'elles peuvent assimiler, une fraction résiduelle de carbone organique est restée non consommée. En augmentant la  $S_0$ , la quantité de substrat organique résiduelle peut rester au-dessus de la  $K_S$  critique : le taux de croissance hétérotrophe reste constant et une plus grande quantité de carbone organique peut être consommée au détriment du carbone inorganique. Cette conclusion n'est pas entièrement satisfaisante : la  $K_S$  des microalgues pour les substrats organiques étant assez faible (0.002  $\text{g}_{\text{C}}.\text{L}^{-1}$  pour l'acétate (Turon et al., 2015a)), la vitesse de consommation du carbone organique a dû rester constante quelle que soit la  $S_0$ . Il est donc plus probable que les concentrations croissantes en AGV ont diminué les vitesses de croissance autotrophe, en agissant sur la consommation du carbone inorganique. L'effet de la concentration en acétate a déjà été montré chez *C. reinhardtii*. Heifetz et al. (2000) ont ainsi montré que la fixation de  $\text{CO}_2$  est réduite en présence de concentrations croissantes en acetate. (Chapman et al., 2015) ont également suggéré que cette espèce favorisait l'assimilation de l'acétate à celle du  $\text{CO}_2$ . Etant donné que les rendements en biomasse diminuent également avec la concentration en butyrate, il semble que les cellules favorisent également l'assimilation de butyrate à celle du  $\text{CO}_2$ .

## 2.5. Potentiel de production de *C. sorokiniana*

Afin d'évaluer le potentiel de production de biomasse, de lipides et de sucres associé au traitement des effluents de FS, *C. sorokiniana* a été cultivée sur deux milieux synthétiques mimant la composition d'un effluent type de FS (condition N°7). Au vu des données de la littérature, les profils de fermentation peuvent être assez variables en fonction des conditions opératoires. Arbitrairement, la concentration en C a été fixée dans les deux cas à 3  $\text{g}_{\text{C}}.\text{L}^{-1}$ , avec

### Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat

un ratio Ac : Bu massique de 1:2, correspondant à un mélange de 2,5 g.L<sup>-1</sup> d'acétate et de 3,7 g.L<sup>-1</sup> de butyrate. Dans un cas, le ratio C:N:P a été fixé selon le ratio Redfield (160:16:1), représentant ainsi une condition dans laquelle le carbone n'est pas limitant et le pouvoir tampon a été fixé à 100 mM. D'après les résultats obtenus précédemment, cette condition est la plus favorable à la consommation des AGV et à la production de biomasse. Dans l'autre cas, le ratio C:N:P a été fixé arbitrairement à 250:7,5:1 afin de simuler un effluent pauvre en nutriments. Par ailleurs, le pouvoir tampon a été fixé à 20 mM afin de mesurer la dynamique d'évolution du pH. Dans cette condition, la carence en nutriment devrait déclencher l'accumulation de composés de stockage au détriment de la production de biomasse. Les cultures ont été menées en erlenmeyer afin de mesurer les dynamiques d'évolution de la biomasse et de son contenu en sucres et lipides, des concentrations en substrats et nutriments et du pH dans chaque cas.

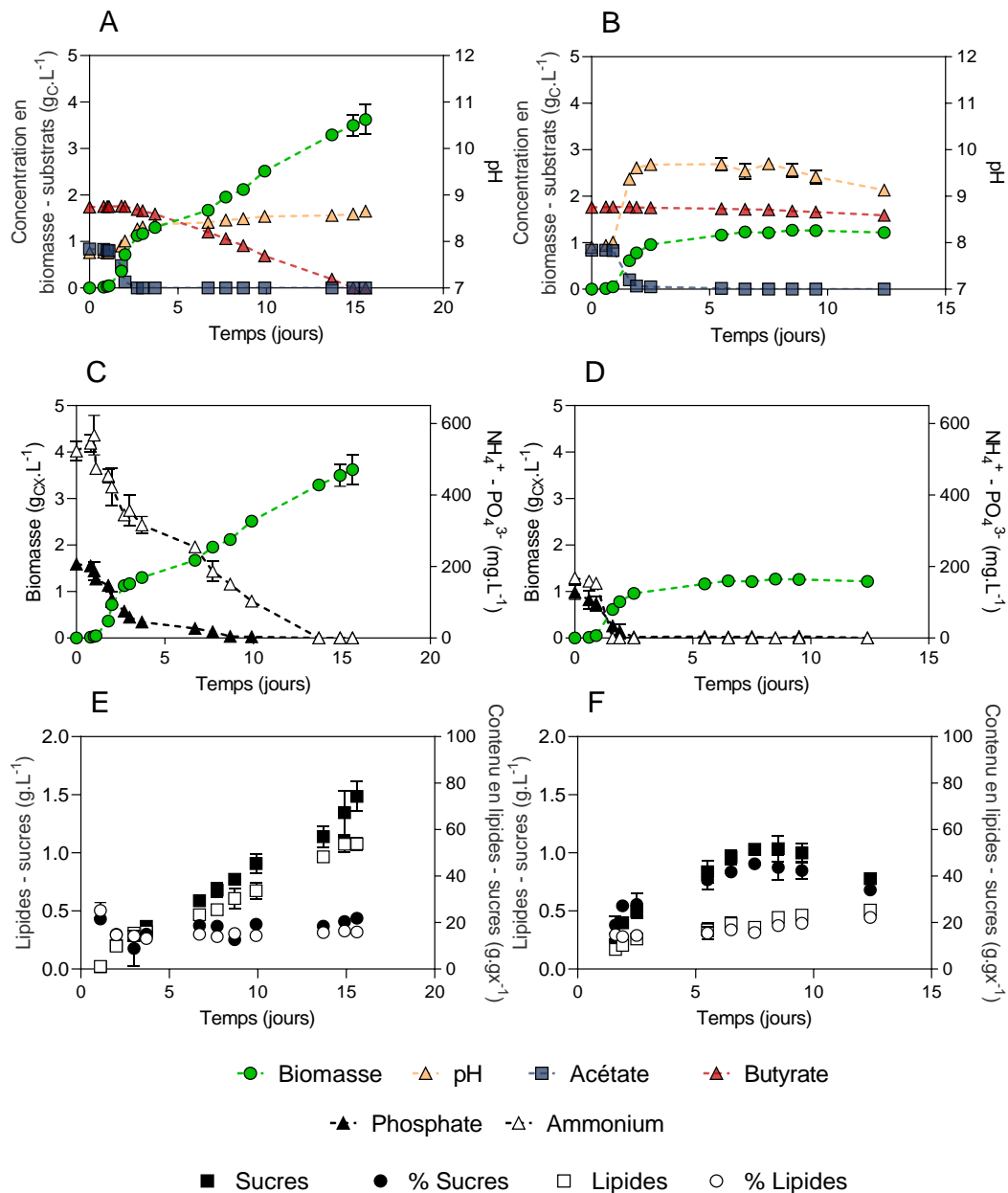
Deux phases de croissance ont pu être observées dans les deux conditions (**Figure 23A-B**). Dans un premier temps, la biomasse augmente rapidement quelle que soit la condition ( $\mu = 3,4$  ou  $3,7 \text{ j}^{-1}$ ) en consommant l'acétate (**Tableau 15**). Dans les deux conditions, l'assimilation diauxique, c'est-à-dire l'assimilation de l'acétate préférentiellement au butyrate, a été observée comme décrite par (Turon et al., 2015). Toutefois, en fixant le pH initial de la culture à 8, les hautes concentrations en AGV n'ont pas inhibé complètement la croissance des cellules. Le taux de croissance sur acétate observé dans cette expérience est dans le même ordre de grandeur que ceux présentés tout au long des paragraphes précédents. Le butyrate a donc été sans effet sur la croissance des cellules sur l'acétate. Quels que soient les ratios en nutriments ou le pouvoir tampon, l'acétate est épuisé en moins de 2 jours ( $Q_s = 0,51$  ou  $0,48 \text{ g}_{CS} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ) et conduit à un rendement en biomasse de  $1,01 \text{ g}_{CX} \cdot \text{g}_{CS}^{-1}$ . La faible concentration en pouvoir tampon (20 mM) a conduit à une augmentation du pH à 9,6 tandis que ce dernier reste stable autour de 8,3 lorsque la concentration est de 100 mM.

Dans un deuxième temps, une phase de croissance ou d'accumulation est observée en fonction du ratio en nutriment. Dans la condition non limitée (C:N:P = 106:16:1), les cellules continuent à se développer en consommant le butyrate, qui est épuisé après 10 jours, et atteignent une biomasse finale de  $3,5 \text{ g}_{CX} \cdot \text{L}^{-1}$  (**Figure 23A**). Le rendement en biomasse sur butyrate est supérieur ( $1,44 \text{ g}_{CX} \cdot \text{g}_{CS}^{-1}$ ) à celui sur acétate, conformément aux résultats précédents. Une diminution de la vitesse de consommation du substrat d'un facteur 5 a été observée ( $Q_s = 0,10 \text{ mg}_{CS} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ), associée à une réduction de la vitesse de consommation de l'ammonium d'un facteur équivalent. D'un autre côté, la vitesse de consommation du  $\text{PO}_4^{3-}$  a

### Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat

été 10 fois plus faible que pendant la phase de croissance sur acétate. L'assimilation de l'azote est liée à l'assimilation du carbone, puisque le N est incorporé sous forme d'acides aminés en utilisant différents squelettes carbonés produit lors du cycle de Krebs. En revanche, l'assimilation du P ne suit pas nécessairement la croissance de la biomasse puisque cet élément peut être stocké dans la cellule sous forme de polyphosphates. Cette consommation de luxe s'est probablement déroulée ici, puisque l'épuisement du phosphore après 10 jours n'a pas empêché les cellules de croître. Dans cette condition, le contenu en lipides et en sucres des cellules reste stable pendant toute la durée de la culture aux alentours de  $16,4 \pm 0,2\%$  et  $21,9 \pm 0,5\%$  (m/m) respectivement après épuisement du butyrate (**Figure 23E**). Aucune différence n'a été observée dans le contenu en composés de stockage entre la phase acétate et la phase butyrate. Dans la condition limitée (C:N:P = 250:7,5:1), l'effet combiné de la limitation en substrat et de l'élévation de pH a entraîné l'arrêt de la consommation du substrat ( $0,03 \text{ gcs.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) et de la croissance au profit de l'accumulation des composés de stockage, en particulier les polysaccharides. Le N et le P ont été complètement épuisés à la fin de cette phase (**Figure 23D**). Le taux de consommation de l'ammonium a été légèrement plus élevée dans la condition moins tamponnée, ce qui pourrait être dû au dégazage de l'ammoniaque avec l'augmentation du pH ( $\text{pK}_a = 9,2$ ). En comparaison avec la culture non limitée, un doublement du contenu en sucres a été observé, atteignant jusqu'à  $45,3 \pm 1,1\%$  (**Figure 23F**). Le contenu en lipides est en revanche resté stable aux alentours de 15%. Après une période étendue de limitation (environ 8 jours), le contenu en sucres a diminué tandis que le contenu en lipides a atteint  $22,3 \pm 0,8\%$ .

Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat



**Figure 23 : La limitation en nutriment déclenche l'accumulation de composés de stockage.**

Evolution de la croissance de la biomasse (g<sub>CX</sub>.L<sup>-1</sup>), du pH et de la consommation des substrats (g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup>) (A et B), de l'ammonium (mg.L<sup>-1</sup>) et du phosphate (mg.L<sup>-1</sup>) (C et D) et de la concentration totale en sucres (mg.L<sup>-1</sup>) et lipides (mg.L<sup>-1</sup>) ou du contenu de la biomasse en sucres ou lipides (%) (E et F) en fonction du temps lorsque *C. sorokiniana* a été cultivée en présence de 3 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup> acétate et butyrate (1:2) à un ratio C:N:P de 106:16:1 (A, C, E) ou 250 :7,5 :1 (B, D, F). Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.



**Tableau 15 : Données cinétiques de *C. sorokiniana*.** Les données ont été dérivées des courbes obtenues de la figure X, c'est-à-dire pour une culture sur un mélange d'acétate et de butyrate 1:2 gC.L<sup>-1</sup> avec soit 100 mM de tampon et sans limitation (100 mM – 106:16:1 C:N:P) ou bien 20 mM de tampon avec limitation en nutriment (20 – 250:7,5:1 C:N:P).  $X_{max}$  représente la biomasse maximum,  $Y$  le rendement en biomasse,  $\mu$  le taux de croissance,  $Q$  la vitesse de production de la biomasse (X) ou de la consommation des substrats (S), de l'azote (N) ou du phosphore (P) ou bien la vitesse de production des lipides ou polysaccharides. Les paramètres de croissance sont calculés pour la phase acétate ou butyrate, sauf dans le cas des lipides et polysaccharides. Les valeurs sont données en tant que moyenne  $\pm$  écart standard, n = 3. NA : Non Applicable.

	100 mM – C:N:P 106:16:1		20 mM – C:N:P 250:7,5:1	
	Acétate	Butyrate	Acétate	Butyrate
$X_{max}$ (gCX.L <sup>-1</sup> )	1,13 $\pm$ 0,10	2,37 $\pm$ 0,30	1,21 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02
$Y$ (gCX.gCS <sup>-1</sup> )	1,01 $\pm$ 0,04	1,44 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,02	NA
$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	3,4 $\pm$ 0,1	0,13 $\pm$ 0,0	3,7 $\pm$ 0,1	NA
$Q_X$ (gCX.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	0,68 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,04	0,73 $\pm$ 0,01	NA
$Q_S$ (gCS.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	0,51 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00
$Q_N$ (mgNH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	151,5 $\pm$ 34,7	35,5 $\pm$ 11,9	230,0 $\pm$ 13,9	NA
$Q_P$ (mgPO <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	98,6 $\pm$ 17,8	9,4 $\pm$ 2,8	126,9 $\pm$ 3,0	NA
$Q_{Lipides}$ (mgLip.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )		75,6 $\pm$ 4,8		36,5 $\pm$ 1,2
$Q_{Sucres}$ (mgSucres.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )		99,4 $\pm$ 8,7		150,8 $\pm$ 1
$Y_{Lipides}$ (mgLip.gCS <sup>-1</sup> )		403,7 $\pm$ 23,6		572,5 $\pm$ 51,0
$Y_{Sucres}$ (mgSucres.gCS <sup>-1</sup> )		442,6 $\pm$ 23,8		1158,6 $\pm$ 114,4

### Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat

La biomasse de *C. sorokiniana* est composée en moyenne de 40% de protéines, 30 à 38% de polysaccharides et de 18 à 22% de lipides (Lizzul et al., 2018), ce qui correspond aux valeurs obtenues ici. En accord avec l'étude bibliographique, la limitation en azote ou phosphore a entraîné l'accumulation de composés de stockage alors que la présence de N ou de P dans les proportions du ratio Redfield a promu la formation de biomasse. Il a pu être montré qu'alimenter les cellules avec de l'acétate augmentait leur contenu en lipides par rapport à l'autotrophie (Cecchin et al., 2018). La principale explication est qu'en mixotrophie, la quantité d'acétyl-CoA intracellulaire est beaucoup plus importante : l'acétate est en effet directement activé en acétyl-CoA après incorporation dans la cellule. Ce métabolite est un intermédiaire clé du métabolisme du carbone et le précurseur de la voie de synthèse des acides gras, conduisant au final à l'accumulation de lipides. La dégradation du butyrate devant mener également à l'acétyl-CoA, alimenter les cellules avec ce substrat devrait également augmenter leur contenu en lipides. Toutefois, nous avons observé que *C. sorokiniana* accumule d'abord des polysaccharides en tant que composés de stockage de courte durée, qui sont par la suite dégradés en lipides après une période prolongée de famine azotée ou phosphorée. Un tel schéma temporel d'accumulation a déjà été décrit par (Li et al., 2015) lors de la culture de *C. sorokiniana* sur glucose. En termes de productivités en lipides, augmenter la vitesse de production de biomasse, grâce à un ratio C:N:P adapté, est plus efficace qu'utiliser une stratégie de limitation en nutriments, puisque celle-ci déclenche l'accumulation de lipides uniquement après une longue période de famine. D'un autre côté, la limitation azotée a entraîné une augmentation de la productivité en polysaccharides, mais au détriment de l'assimilation des AGV. Pendant la phase de croissance, la productivité en biomasse maximale  $Q_X$  et le contenu en carbone sont inversement proportionnels (Yang et al., 2018). Une plus haute productivité en biomasse entraînera une biomasse moins concentrée en lipides et polysaccharides, ce qui est moins préférable pour des procédés d'extraction puisque de plus grands volumes doivent être traités. Ce compromis entre productivité en biomasse et contenu en lipides a été longuement discuté dans le cas des cultures en autotrophie ((Adams et al., 2013) par exemple) et le régime mixotrophe ne fait pas exception. Dans le cas d'une culture de microalgues sur des effluents de FS, l'optimisation de la productivité peut être rendue encore plus difficile. Le contenu en nutriments ne peut en effet pas être totalement contrôlé, et celui-ci dépendra principalement du type de substrats initialement alimentés dans le fermenteur.

### 3. Conclusion

Nous avons dans ce chapitre cherché à déterminer les causes d'inhibition de la croissance des microalgues par les acides organiques. Celle-ci est due aux formes non dissociées des acides et, si les mécanismes d'inhibition n'ont pas été élucidés dans cette thèse, il est probable qu'ils soient identiques à ceux observés chez d'autres micro-organismes. Des seuils d'inhibition ont été déterminés pour les deux AGV et pour chaque espèce étudiée : toutes les souches ont présenté des seuils de tolérance similaires. Bien que ces seuils ne soient valables que dans nos conditions de culture, leur connaissance a permis d'établir la gamme de pH minimale de travail permettant de s'affranchir des inhibitions. Afin de déterminer la gamme de pH maximale, nous avons par la suite étudié l'effet des pH alcalins sur la croissance. Nous avons montré que les pH avaient des effets contrastés en fonction des espèces. Généralement, les pH supérieurs à 8 ont réduit considérablement la consommation du butyrate, et dans une moindre mesure celle de l'acétate. Bien que les causes exactes expliquant ces effets n'aient pas été déterminées, il est probable qu'elles impliquent le mode de transport des AGV. De toutes ces expériences, nous avons pu déterminer que *C. sorokiniana* était la souche la plus productive sur le butyrate : elle a donc été choisie pour la suite des études.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet des hautes concentrations en substrat organique sur la croissance de *C. sorokiniana*. Nous avons montré qu'en conduisant la culture à pH 8, les hautes concentrations n'étaient pas inhibitrices. Cependant, l'augmentation de la concentration initiale dans le milieu a toujours entraîné une chute de rendement. En différenciant, par le calcul, les contributions autotrophes et hétérotrophes au rendement de biomasse, nous avons pu supposer que cette chute était due à une diminution de la fixation de CO<sub>2</sub> par les cellules. Cet effet s'est révélé indépendant d'autres conditions abiotiques telles que le contrôle du pH ou le ratio C:N:P.

Enfin, nous avons évalué le potentiel de production de *C. sorokiniana* sur un mélange synthétique d'AGV simulant une condition idéale pour la production de biomasse ou favorisant la production de composés de stockage. Comme rapporté dans la littérature, une carence en nutriment a entraîné l'accumulation de ces composés. En revanche, nous avons déterminé que *C. sorokiniana* accumulait d'abord des polysaccharides pendant les périodes de limitation courtes, qui étaient par la suite convertis en lipides pendant les périodes longues.

### Chapitre 3 : Inhibition de la croissance : influence combinée du pH et de la concentration en substrat

Si les conditions idéales de culture ont permis la consommation complète des AGV, la productivité en biomasse sur le butyrate en particulier est restée faible comparativement à celle sur l'acétate, et peu améliorée comparée à d'autres études. Il semble donc que *C. sorokiniana*, et les autres chlorophytes étudiées en général, soient limitées dans l'assimilation du butyrate. Ce point, peu discuté jusqu'à présent, fera l'objet du chapitre suivant.

## Chapitre 4

# Existe-t-il une microalgue consommant rapidement le butyrate ?

### 1. Introduction

Le chapitre précédent nous a permis d'établir les conditions abiotiques (pH, concentration en substrat, C:N:P) permettant de lever les inhibitions dues aux AGV et permettant une consommation complète du substrat. Cependant, jouer sur ces paramètres n'a globalement pas permis d'augmenter le taux de croissance de *C. sorokiniana* sur le butyrate, qui reste compris entre 0,1 et 0,3 j<sup>-1</sup>. D'autres études (Liu et al., 2013; Turon et al., 2015c) ont pu rapporter les effets de la lumière, de la température ou bien de l'ajout de bicarbonate : l'ajustement des conditions opératoires abiotiques ne permet en aucun cas d'obtenir un taux de croissance sur le butyrate équivalent à celui sur l'acétate. Les chlorophytes telles que *Chlorella* semblent donc limitées métaboliquement dans l'assimilation du butyrate. Deux questions principales ont donc sous-tendu la suite de nos travaux. Existe-t-il une ou des souches assimilant le butyrate aussi rapidement que l'acétate ? Si oui, quel est le potentiel de production de lipides d'une telle souche ? Le premier objectif de ce travail a été d'identifier au moins une espèce ou une souche consommant efficacement le butyrate. Le deuxième objectif a été d'évaluer le potentiel de production de la ou des souches cultivées sur un effluent synthétique typique. Dans le cadre de la recherche d'un micro-organisme présentant des caractéristiques particulières, deux grandes approches sont possibles.

La première approche consiste à isoler des souches issues de l'environnement selon deux stratégies distinctes. La première consiste à échantillonner des écosystèmes divers et non spécifiques et à rechercher, au sein de la biodiversité présente, les organismes possédant les caractéristiques voulues. Cette technique nécessite de pouvoir prélever, cribler et identifier un grand nombre d'échantillons pour être efficace. Dans la seconde stratégie, que nous avons privilégiée, les écosystèmes choisis sont spécifiques et possèdent des caractéristiques semblables à celles des procédés pour lesquels les organismes recherchés seront utilisés.

## Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

La deuxième approche consiste à sélectionner un organisme depuis des banques de souches, selon des critères caractéristiques de l'espèce présentant un intérêt pour le procédé d'étude. Actuellement, sélectionner une espèce ou une autre pour sa faculté à croître sur le butyrate reste difficile étant donné le peu de données disponibles dans la littérature. Afin de combler ce manque de connaissance, nous avons évalué la capacité de différentes souches de collection à croître sur ce substrat.

Plusieurs souches ont ainsi été isolées selon le protocole décrit dans le **chapitre 2** relatif aux matériel et méthodes. Chaque souche isolée ou issue des collections a été cultivée en présence d'acétate ou de butyrate : les taux de croissance et leurs seuils de tolérance aux RH ont été comparés à ceux de *C. sorokiniana*. Celles présentant les meilleurs taux de croissance ou de consommation du substrat ont été par la suite retenues comme candidates et cultivées sur un milieu synthétique contenant de l'acétate et du butyrate.

### 2. Résultats et discussion

#### 2.1. Insuccès de la stratégie d'isolement

##### 2.1.1. Choix des lieux de prélèvement

Dans un premier temps, nous avons cherché des souches potentiellement capables de consommer rapidement le butyrate à partir d'échantillons environnementaux, prélevés à partir d'écosystèmes spécifiques. Certains écosystèmes naturels rassemblent en effet des caractéristiques communes avec les conditions d'opération d'un fermenteur sombre, comme par exemple les tourbières. Une tourbière se forme lorsque les conditions topographiques et/ou climatiques occasionnent le maintien annuel d'une nappe d'eau haute qui limite les échanges gazeux au sein de la matière organique et impose ainsi une anoxie de plus en plus forte en fonction de la profondeur. La matière organique végétale est donc dégradée partiellement et s'accumule lentement pour former la tourbe. Les processus de dégradation de la matière organique au sein de ces écosystèmes sont les mêmes qu'au sein d'un fermenteur : hydrogène, méthane, acétate, butyrate et tous les autres produits intermédiaires de la fermentation sont détectables dans les tourbières (Duddleston et al., 2002).

Deux tourbières acides (pH compris entre 6 et 7 ; Canroute et Rauzes) et une tourbière alcaline (pH compris entre 7,5 et 8 ; Rey) ont été échantillonnées au moins de février 2020. Les

## Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

habitats présents pouvant être protégés, tous les prélèvements ont été précédés d'une demande d'autorisation auprès des organismes en charge de la protection des lieux. La tourbière de Canroute (code « CAN ») fait partie de l'ensemble des Tourbières du Margnès, référencé FR7300946 à l'Inventaire National du Patrimoine Naturel et fait partie du réseau Natura 2000. La tourbière des Rauzes (code « RAU ») est une autre tourbière acide faisant partie de l'ensemble Natura 2000 "Tourbières du Lévézou" dans le massif éponyme, référencé FR7300870 à l'INPN. La tourbière de Rey (code « REY ») est la seule tourbière alcaline répertoriée en région Occitanie. Elle se situe sur une zone marneuse et est référencée ZNIEFF 730003012 à l'INPN. Dans chaque tourbière, des échantillons d'eau de surface (code « ES ») et des trente premiers centimètres de tourbe (code « TO ») ont été prélevés. Par ailleurs, des sources d'eau dans la forêt près de la tourbière de Canroute ont été également prélevées (« CANSO » et « CANRU »). Outre les tourbières, deux milieux artificiels riches en matière organique ont été prélevés : nous avons échantillonné des boues de station d'épuration (STEP) de Narbonne à deux dates différentes (code « BS » 03/07/2019, prélèvement 1 et 09/08/2019, prélèvement 2) ainsi qu'un échantillon de raceway (code « RW ») du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, alimenté en eaux usées synthétiques. Le **Tableau 16** et **Tableau 17** résume ces divers prélèvements.

### 2.1.2. Le processus d'isolement a conduit majoritairement à l'isolement de *C. sorokiniana*

Des colonies ont pu être obtenues à partir de chaque échantillon environnemental et de chaque stratégie d'isolement (directe ou après enrichissement). Malheureusement, plusieurs souches ont été perdues en raison du confinement de mars à juin 2020. Au total, 8 souches ont été isolées. Ces isolats ont été identifiés par séquençage des ADN 18S et 28S ainsi que des espaceurs internes transcrits (régions ITS) (**Tableau 17**). Les résultats indiquent que les souches isolées provenant des différentes tourbières sont pour la plupart des *C. sorokiniana*. Ces souches ont été comparées avec la souche SAG 211-8k, qui est la souche que nous utilisons au laboratoire. REYTO est identique à cette souche, tandis que les trois autres présentent quelques variations ponctuelles. Seule la souche RAUES est différente, l'espèce la plus proche étant *Chlamydomonas asymetrica*. Les espèces isolées depuis les écosystèmes non naturels (boues de STEP et raceway) sont identiques et s'apparentent à l'espèce *Desmodesmus armatus*.

**Tableau 16 : Codes et lieux de prélèvement des échantillons.**

Code	Lieu de prélèvement	Description	Coordonnées
CANSO		Eau de source dans la tourbière	43°38'49.86'' N/ 2°34'56.85''E
CANES	Canroute	Eau stagnante à la surface de la tourbière	43°38'47.33'' N/ 2°34'36.02''E
CANRU		Ruisseau aux abords de la tourbière	43°38'49.86'' N/ 2°34'56.85''E
CANTO		Prélèvement des 30 premiers centimètres de la tourbe	43°38'47.33'' N/ 2°34'36.02''E
RAUES	Rauze	Eau stagnante à la surface de la tourbière	44°14'45.69'' N/ 2°56'2.53''E
RAUTO		Prélèvement des 30 premiers centimètres de la tourbe	44°14'45.69'' N/ 2°56'2.53''E
REYES	Rey	Eau stagnante à la surface de la tourbière	44°27'8.51'' N/ 2°0'27.73''E
REYTO		Prélèvement des 30 premiers centimètres de la tourbe	44°27'8.51'' N/ 2°0'27.73''E
BS1	Boues de Step, Narbonne	Boues aérobies de la station d'épuration de Narbonne – prélèvement 1	
BS2		Boues aérobies de la station d'épuration de Narbonne – prélèvement 2	
RW	Raceway, LBE, Narbonne	Raceway du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Narbonne, alimenté en eau usées synthétiques	



Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

**Tableau 17 : Caractérisation des isolats.** Les isolats ont été caractérisés par séquençage des zones 18S, 28S et ITS.

Souche	Milieu de prélèvement	Espèce la plus proche sur toute la séquence (BLASTN - 210514)	Commentaires
CANES	Tourbière de Canroute	<i>Chlorella sorokiniana</i> NIES:2173 (2486/2487(99%))	Comparée à SAG211-8k : nt1826 : G -> T (région ITS1) Souches identiques
CANSO			
CANRU		<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k FM205834.1 (2460/2461(99%))	Comparée à CANES et CANSO : nt3083 : A -> C
REYTO	Tourbière de Rey	<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k FM205834.1 (2461/2461(100%))	Souches identiques
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Souche commerciale (SAG211-8k)		
RAUES	Tourbière de Rauzes	<i>Chlamydomonas asyetrica</i> CCAP 11/41 (2524/2557(99%))	Différentes des séquences trouvées dans NCBI.
BS1	Boues de STEP  Raceway	<i>Desmodesmus armatus</i> GM4k (2591/2592(99%))	Comparées à GM4K : nt1826 : délétion T (région ITS1) Souches identiques
BS2			
RW			

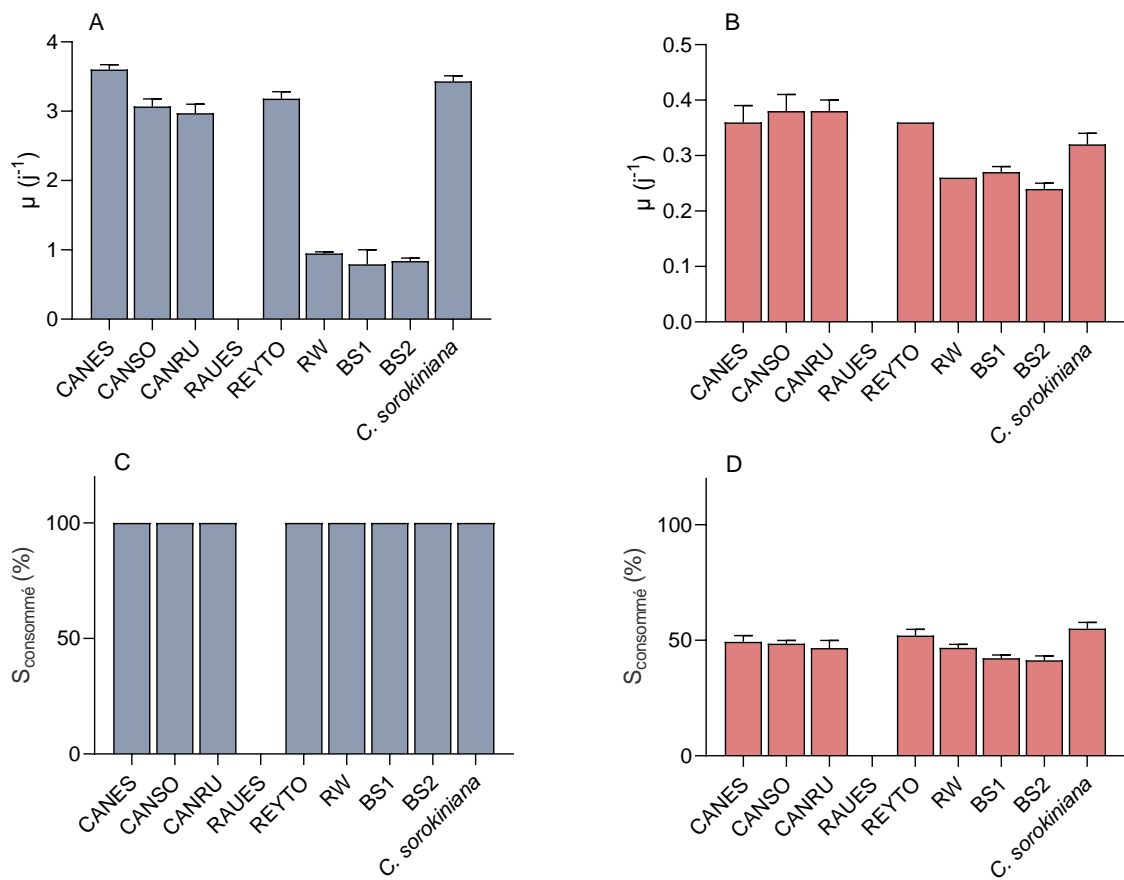
### 2.1.3. Aucune souche ne se distingue de *C. sorokiniana* sur le butyrate

Chacune des souche isolée a été cultivée en microplaques sur un milieu contenant soit 0,5 gC.L<sup>-1</sup> d'acétate ou de butyrate, à pH 7, en présence de lumière (condition N°8). Les cultures ont été menées jusqu'à atteindre la phase stationnaire ou jusqu'à un maximum de 3 jours dans le cas de l'acétate ou 7 jours dans le cas du butyrate. La croissance de ces souches a été comparée à *C. sorokiniana*.

Les taux de croissance de chaque souche sur acetate ou butyrate ont pu être déterminés (**Figure 24**). Toutes les souches hormis RAUES ont pu croître en présence d'acétate (**Figure 24A**). Les autres souches ont présenté des taux de croissance allant de  $0,84 \pm 0,04$  à  $3,60 \pm 0,07$  j<sup>-1</sup>, la phase stationnaire de croissance ayant toujours été atteinte avant 3 jours. Aucun isolat n'a présenté de taux de croissance supérieur à celui de *C. sorokiniana* : les souches isolées de *C. sorokiniana* ont présenté des taux de croissance identiques à ceux de la souche de laboratoire tandis que les souches isolées de *Desmodesmus* ont présenté des taux inférieurs. L'acétate a toujours été entièrement consommé (**Figure 24C**).

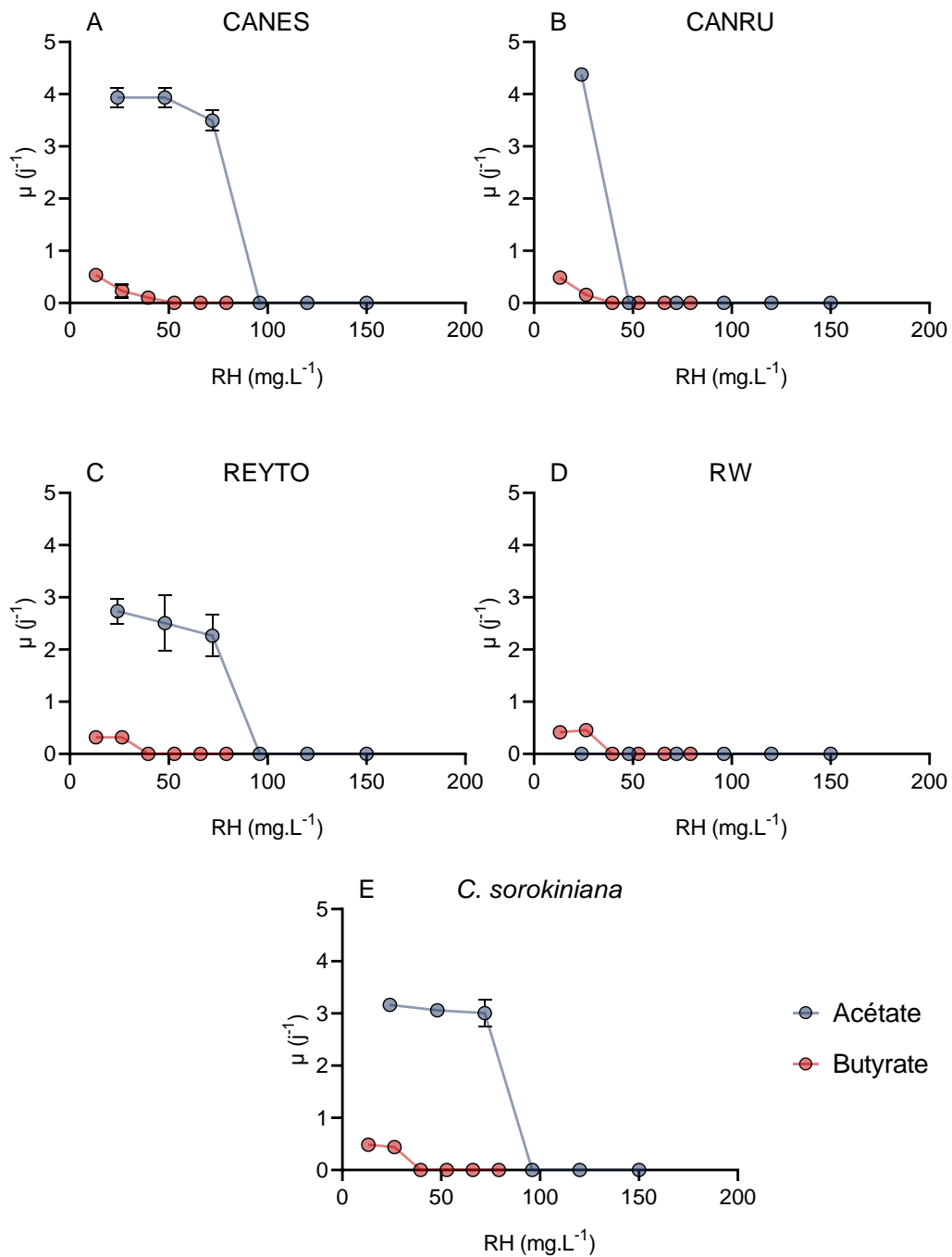
L'utilisation de butyrate en tant que substrat a toujours entraîné une réduction du taux de croissance comparativement à l'acétate (**Figure 24B**). L'isolat RAUES a également été incapable de croître sur le butyrate. La croissance des quatre souches CANES, CANSO, CANRU et REYTO a été réduite d'un facteur environ 10 : elles ont présenté les mêmes taux de croissance, identiques à ceux de la souche de laboratoire ( $0,36 \pm 0,03$  à  $0,38 \pm 0,03$  j<sup>-1</sup>). Les souches RW, BS1 et BS2 ont présenté des taux de croissance identiques ( $0,24 \pm 0,01$  à  $0,27 \pm 0,01$  j<sup>-1</sup>), inférieurs à ceux de *C. sorokiniana*. La réduction du taux de croissance a été accompagnée d'une réduction dans l'assimilation du substrat. Le taux de consommation du butyrate a toujours été incomplet, avec un maximum de 52% pour les souches de *C. sorokiniana* après 7 jours de culture (**Figure 24D**).

Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate



**Figure 24 : Aucun isolat ne se démarque de *C. sorokiniana* sur l'acétate ou le butyrate.** Taux de croissance  $\mu$  (j<sup>-1</sup>) de chaque souche cultivée en présence de 0,5 gcs.L<sup>-1</sup> d'acétate (A) ou de butyrate (B). Taux de consommation (% du substrat initial) de l'acétate (C) ou du butyrate (D) à la fin de la culture. Les souches ont été cultivées sous lumière continue, à pH 7, dans un milieu tamponné (100 mM). Les cultures ont duré jusqu'à atteindre la phase exponentielle ou bien un maximum de 3 (acétate) ou 7 jours (butyrate). Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.

Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate



**Figure 25 :** Aucun isolat ne présente de tolérance particulière aux acides. Taux de croissance  $\mu$  ( $j^{-1}$ ) de CANES (A), CANRU (B), REYTO (C), RW (D) et *C. sorokiniana* (E) cultivées en présence de concentrations ( $mg.L^{-1}$ ) croissantes en AcH (bleu) ou BuH (rouge) à pH 6,5. Chaque point représente la moyenne et écart types de trois réplicats biologiques.

## Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

### 2.1.4. Les isolats ne présentent pas de seuil de tolérance aux acides organiques particuliers

Nous avons par la suite déterminé les seuils d'inhibition de quatre isolats distincts (CANES, CANRU, REYTO et RW) selon le protocole décrit dans le **chapitre 3** (condition N°3) et les avons comparés à ceux de *C. sorokiniana* (**Figure 25**). Les différents isolats n'ont pas présenté de propriété particulière de résistance aux acides. Chaque souche a en effet présenté une tolérance à l'acide butyrique similaire à celle de la souche *C. sorokiniana* de laboratoire (environ 25 mg.L<sup>-1</sup> de BuH). Par ailleurs, les souches CANES (**Figure 25A**) et REYTO (**Figure 25C**) ont présenté une tolérance à l'acide acétique similaire à celle de *C. sorokiniana* tandis que les deux autres isolats sont inhibés dès 25 mg.L<sup>-1</sup> d'AcH.

### 2.1.5. Discussion

L'objectif de ce travail d'isolement était d'obtenir une souche photosynthétique « sauvage » présentant un taux de croissance plus élevé sur le butyrate que *C. sorokiniana*. L'objectif sous-jacent était de déterminer si une souche photosynthétique pouvait présenter une métabolisation rapide du butyrate reflétée par un taux de croissance sur ce substrat dans l'ordre de grandeur de celui obtenu sur l'acétate. Pour cela, nous avons cherché à isoler plusieurs souches depuis l'environnement.

A l'issue de la campagne d'échantillonnage et de sélection, seules des chlorophytes ont été isolées. Cela tient notamment au critère de sélection appliqué pour choisir les colonies, basé sur leur couleur verte. Toutefois, peu d'autres colonies colorées ont pu être observées sur les boîtes de pétri pendant le processus d'isolement : il est bien probable que seules des chlorophytes aient pu croître dans les conditions choisies. L'espèce majoritairement isolée est *C. sorokiniana* et est celle présentant les plus hauts taux de croissance sur le butyrate (ou même l'acétate). Parmi toutes les souches que nous avons isolées, aucune n'a présenté de taux de croissance sur le butyrate supérieur à celui que présentait la souche *C. sorokiniana* de laboratoire. Trois hypothèses, non exclusives, peuvent expliquer ces résultats.

La première hypothèse est que seules ces espèces aient été présentes dans les écosystèmes de départ. Cette hypothèse est la moins probable : bien que nous n'ayons pas mesuré la diversité initiale, des observations microscopiques ont permis de détecter la présence d'autres espèces, notamment des desmidiées et des diatomées. D'autres études témoignent également d'une plus

## Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

grande diversité : 52 genres d'algues ont par exemple pu être identifiés dans différentes tourbes par (Salazar-Torres and de Moraes Huszar, 2012) tandis que jusqu'à 533 taxons ont pu être détectés dans certains lacs tourbeux par (Borics et al., 2003). Il est donc certain que nos échantillons contenaient une multitude d'espèce qui n'ont pas pu être isolées, pour l'une ou l'autre des raisons exposées ci-après.

Les espèces que nous avons isolées sont parfois référées comme des « mauvaises herbes » de laboratoire puisqu'elles sont communément isolées depuis l'environnement, malgré des conditions de sélection différentes des nôtres (Andersen and Kawachi, 2005). La deuxième hypothèse serait donc d'attribuer à ces algues des grandes gammes de tolérance à tous les facteurs jouant dans la compétition mise en place lors de la culture d'enrichissement en laboratoire (pH, température, milieu de culture, ...). Notre milieu de sélection ne contenant par exemple pas de silice, il exclut de fait le possible isolement de diatomées (Andersen and Kawachi, 2005). Le milieu HAP, utilisé comme milieu d'enrichissement, est donc un milieu synthétique assez pauvre, relativement sélectif.

De la même manière que les isolats n'ont pas exhibé de taux de croissance particulièrement élevés sur le butyrate, leurs seuils de tolérance aux RH n'ont pas été plus élevés que ceux de la souche de laboratoire. Le pH du milieu de sélection a été fixé entre 7 et 8, dans le but de minimiser les formes non dissociées des acides. Le postulat ayant guidé cette décision était que la résistance d'une souche aux acides non dissociés n'est pas nécessairement associée à la consommation rapide du substrat (cf. **chapitre 3**) : élever le pH à 7-8 nous assurait d'observer une croissance minimale de microalgues, y compris aux faibles densités cellulaires présentes dans les échantillons, sans pour autant compromettre la possibilité d'isoler une souche avec un taux de croissance élevé sur le butyrate. Cependant, une telle stratégie ne permet pas de sélectionner de souches sur leur capacité à résister aux acides non dissociés : les souches que nous avons isolées n'ont donc pas présenté de tolérance particulière aux acides organiques. Certains auteurs affirment que l'augmentation de la tolérance aux RH chez certains organismes est associée à une plus grande activité des pompes à protons  $H^+$ -ATPase (Huang et al., 2012; Miwa et al., 1997). Les espèces les plus acidophiles parviennent à croître sur des pH proches de 1 en maintenant leur pH interne à la neutralité grâce à des pompes à protons efficaces et un plus grand pouvoir tampon interne, entre autres (Gimmler, 2001). Les souches acidophiles pourraient donc présenter une plus grande résistance aux RH. La valeur de pH que nous avons

#### Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

choisie a exclu d'emblée ces espèces, qui auraient pu présenter des caractéristiques de résistance aux acides ou de consommation du butyrate intéressantes.

La dernière hypothèse serait que les trois espèces isolées présentent intrinsèquement des caractéristiques leur permettant de croître plus rapidement sur le butyrate que les autres espèces de microalgues. Suivant cette hypothèse, le critère de sélection était bien uniquement le butyrate, et nous avons isolé les espèces les plus performantes. Une des souches isolées étant une *C. sorokiniana*, présentant très peu de différences avec la souche de laboratoire, l'hypothèse d'une simple contamination croisée ne peut être totalement exclue. Cependant, si tel était le cas, cela signifierait tout de même qu'aucune autre espèce, présente dans l'écosystème de départ, n'a pu concurrencer *C. sorokiniana* pour croître sur le butyrate. Cela sous-entendrait alors qu'aucune chlorophyte, ni aucune autre espèce d'algues, ne puisse assimiler le butyrate à des taux comparables à ceux obtenus sur l'acétate. Cette hypothèse est plausible mais néanmoins peu satisfaisante : d'après les connaissances actuelles, il n'y a *a priori* pas de raison d'un point de vue biologique interdisant l'existence d'une telle souche. Nous avons choisi d'enrichir au préalable les cultures en utilisant du milieu HAP. Ce choix a été guidé par l'hypothèse suivante : une souche consommant rapidement le butyrate devrait nécessairement consommer l'acétate à une vitesse au moins supérieure ou égale. Cette méthode n'exclut cependant pas les espèces capables de pousser rapidement sur l'acétate bien qu'elles soient incapables de croître sur le butyrate. Il est ainsi possible que *C. sorokiniana* ait pu dominer la culture mixte d'enrichissement. D'autres auteurs ont obtenu des résultats similaires aux nôtres en utilisant ce milieu. Par exemple, (Chiellini et al., 2020) ont également cherché à isoler des souches de microalgues à partir d'échantillons provenant du lac Massaciuccoli, un lac italien situé dans une zone marécageuse. Les auteurs ont employé un protocole d'isolement semblable au nôtre : enrichissement sur du milieu TAP (ce milieu est la base du milieu HAP, le tampon Tris remplaçant le tampon HEPES) et culture avec photopériode (16h : 8h, 120  $\mu$ E), puis isolement sur milieu TAP gélosé. A partir de différents échantillons environnementaux et à l'issue du processus d'isolement, les auteurs ont isolé quatre souches, présentant un haut taux de similarité avec *C. sorokiniana*. L'augmentation de la biomasse de *C. sorokiniana* pendant la phase d'enrichissement et la présence de lumière, permettant la consommation de CO<sub>2</sub> atmosphérique, ont donc pu augmenter substantiellement sa vitesse de consommation apparente du butyrate par rapport à d'autres espèces consommant pourtant plus efficacement le butyrate en culture pure.

## Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

*C. sorokiniana* a donc pu former des colonies plus rapidement, éclipsant de fait d'autres espèces potentiellement plus intéressantes.

En conclusion, il est difficile d'apporter une réponse définitive à notre question initiale. Dans les conditions de sélection que nous avons imposées, il est évident que *C. sorokiniana* domine. Ce résultat confirmerait alors ce que nous avons pu observer dans le chapitre précédent : il n'y a pas d'espèces de microalgues capables de consommer le butyrate aussi rapidement que l'acétate et, parmi les différentes espèces mixotrophes, *C. sorokiniana* est bien la souche la plus performante. Pourtant, en raison des différents biais expérimentaux évoqués plus haut (concentration en butyrate peu sélective, pH restrictif, tolérance des souches à la culture en laboratoire, éventualité d'une contamination croisée, ...), une conclusion définitive est exclue et le doute doit persister. Afin d'évaluer le protocole que nous avons établi plus formellement, nous avons exploré une approche par la modélisation du processus d'isolement, exposée en **Annexe 1**. Ce modèle montre que même dans des conditions idéales de sélection (c'est-à-dire uniquement en considérant le butyrate), le processus d'isolement n'est jamais complètement fidèle à la réalité : la meilleure algue croissant sur le butyrate n'est pas nécessairement celle isolée en condition mixte. Ainsi, seule la multiplication des milieux de prélèvement et des conditions d'isolement, au travers des technologies de "culturomics", qui automatisent la mise en place d'un très grand nombre de conditions de culture sensiblement différentes (Kambouris et al., 2018), permettrait de répondre de manière absolue à notre question.

### 2.2. *Polytomella* sp. : une souche hétérotrophe présentant des caractéristiques de croissance remarquables

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé la croissance des souches de collection suivantes : *Euglena gracilis*, *Ochromonas danica*, *Polytomella magna* et *Polytomella* sp. Ces souches ont été choisies selon le ou les critères suivants : capacité hétérotrophe ou mixotrophe démontrées ; accumulation de composés de stockage ; littérature disponible sur l'espèce. *Euglena gracilis* est un protiste croissant dans les eaux douces, capable de résister à plusieurs stress et accumulant divers composés valorisables comme le paramylon ou la vitamine E (Gissibl et al., 2019). L'espèce peut croître sous différents modes trophiques en consommant l'acétate, l'éthanol ou le lactate (Calvayrac et al., 1981; Fujita et al., 2008). *O. danica* est une chrysophyte (algue brune-dorée) pouvant croître en mixotrophie et par phagotrophie



## Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

(consommation de proies bactériennes) (Wilken et al., 2014). Cette caractéristique pourrait lui conférer un avantage particulier en cas de culture sur un effluent non stérilisé. Enfin, *Polytomella* est une algue chlorophyte incolore, proche de *C. reinhardtii*, ayant perdu ses propriétés photosynthétiques. L'espèce est purement hétérotrophe et peut consommer plusieurs acides organiques et des alcools, en plus d'accumuler une grande quantité d'amidon (de la Cruz and Gittleson, 1981).

### 2.2.1. La vitesse de croissance sur butyrate de *Polytomella sp.* se démarque des autres souches

Les souches de collection ont été cultivées en microplaques sur un milieu contenant 0,5 gC.L<sup>-1</sup> d'acétate ou de butyrate, à pH 7, en présence de lumière (condition N°8). Les cultures ont été menées jusqu'à atteindre la phase stationnaire ou jusqu'à un maximum de 3 jours dans le cas de l'acétate ou 7 jours dans le cas du butyrate. Les souches ont été comparées à *C. sorokiniana* (**Figure 26**).

*Polytomella sp.* a présenté le taux de croissance significativement le plus élevé ( $4,01 \pm 0,05$  j<sup>-1</sup>) sur l'acétate (**Figure 26A**). Le taux de croissance obtenu sur ce substrat pour *E. gracilis* et *O. danica* a été respectivement 5,0 et 6,2 fois plus faible que celui de *C. sorokiniana* ( $3,43 \pm 0,08$  j<sup>-1</sup>). Néanmoins, la consommation d'acétate a toujours été complète (**Figure 26C**). L'utilisation de butyrate en tant que substrat a toujours entraîné une réduction du taux de croissance comparativement à l'acétate (**Figure 26B**). Le taux de croissance d'*E. gracilis*, d'*O. danica* et de *Polytomella sp.* n'a toutefois été réduit que de 32%, 40% et 37% respectivement, comparativement à la réduction d'un facteur 10 pour *C. sorokiniana*. Ces souches ont consommé intégralement le butyrate au bout de 7 jours, avec une consommation complète du butyrate par *Polytomella sp.* en 2,5 jours. En comparaison, un taux de consommation maximum de 52% pour *C. sorokiniana* a été atteint après 7 jours de culture (**Figure 26D**). *Polytomella magna* a été incapable de croître sur le butyrate.

### 2.2.2. La résistance aux acides non dissociés de *Polytomella sp.* se démarque des autres souches

Nous avons par la suite déterminé les seuils d'inhibition de ces souches selon le protocole décrit dans le **chapitre 3** (condition N°3). Un seuil d'inhibition a pu être déterminé pour chaque

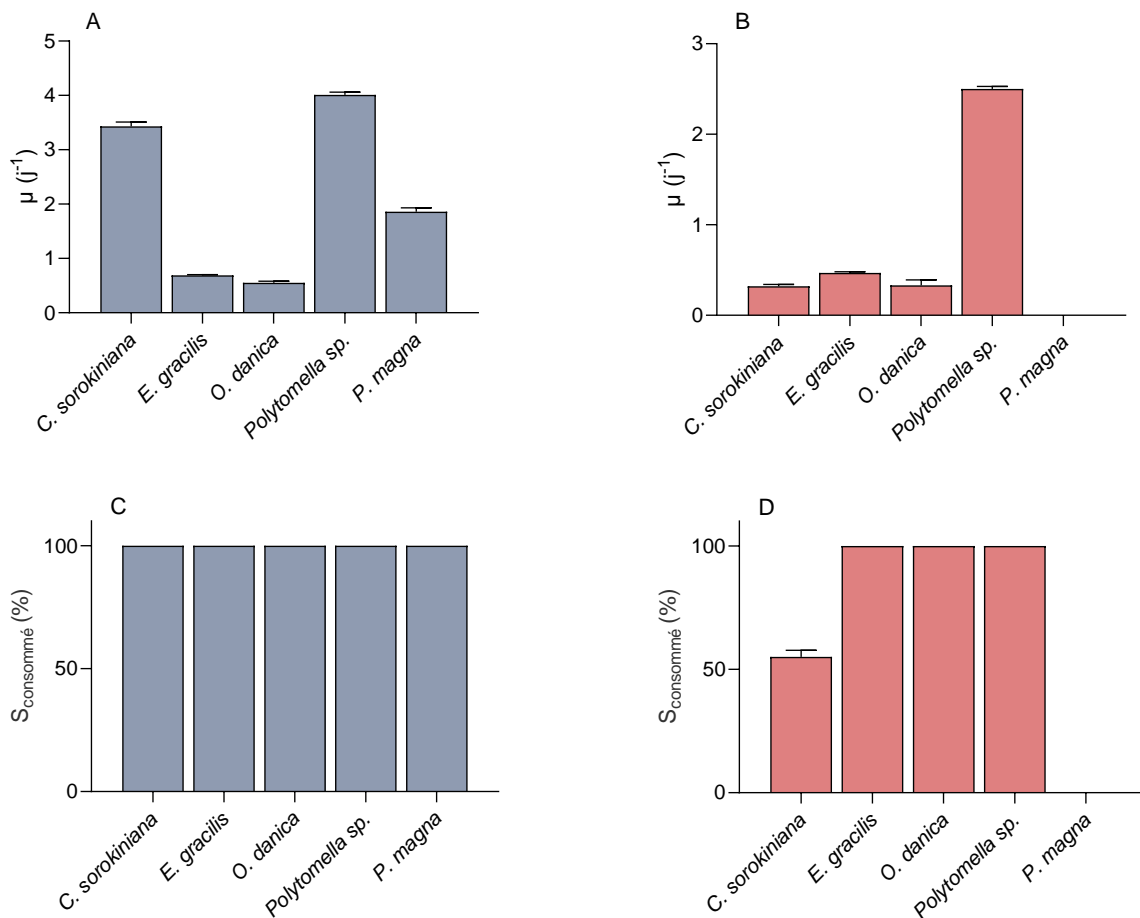
## Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

souche et pour les deux acides (**Figure 27**). On précise ici que *P. magna* n'ayant pas été capable de croître sur le butyrate, ses seuils d'inhibition n'ont pas été déterminés. L'ensemble des seuils d'inhibition obtenus pour les souches du **chapitre 3 et 4** sont compilés en **Figure 28**. *Polytomella sp.* (**Figure 27D**) a présenté des propriétés remarquables de tolérance aux acides. La souche conserve en effet un taux de croissance stable aux alentours de  $3,8 \text{ j}^{-1}$  jusqu'à  $750 \text{ mg.L}^{-1}$  d'acide acétique (soit près de  $38 \text{ g.L}^{-1}$  à pH 6,5). Elle tolère également des concentrations en acide butyrique de  $350 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $18 \text{ g.L}^{-1}$  de butyrate), soit 3 fois plus élevées que celles tolérées par *E. gracilis* (**Figure 27B**) ou *O. danica* (**Figure 27C**) et environ 10 fois plus que *C. sorokiniana* (**Figure 27A**). Les souches *O. danica* et *E. gracilis* se sont distinguées des autres espèces par une tolérance similaire aux acides acétique ou butyrique. Les autres chlorophytes, y compris *Polytomella sp.*, ont en effet toujours été inhibées par le butyrate plus rapidement que par l'acétate.

### 2.2.3. Discussion

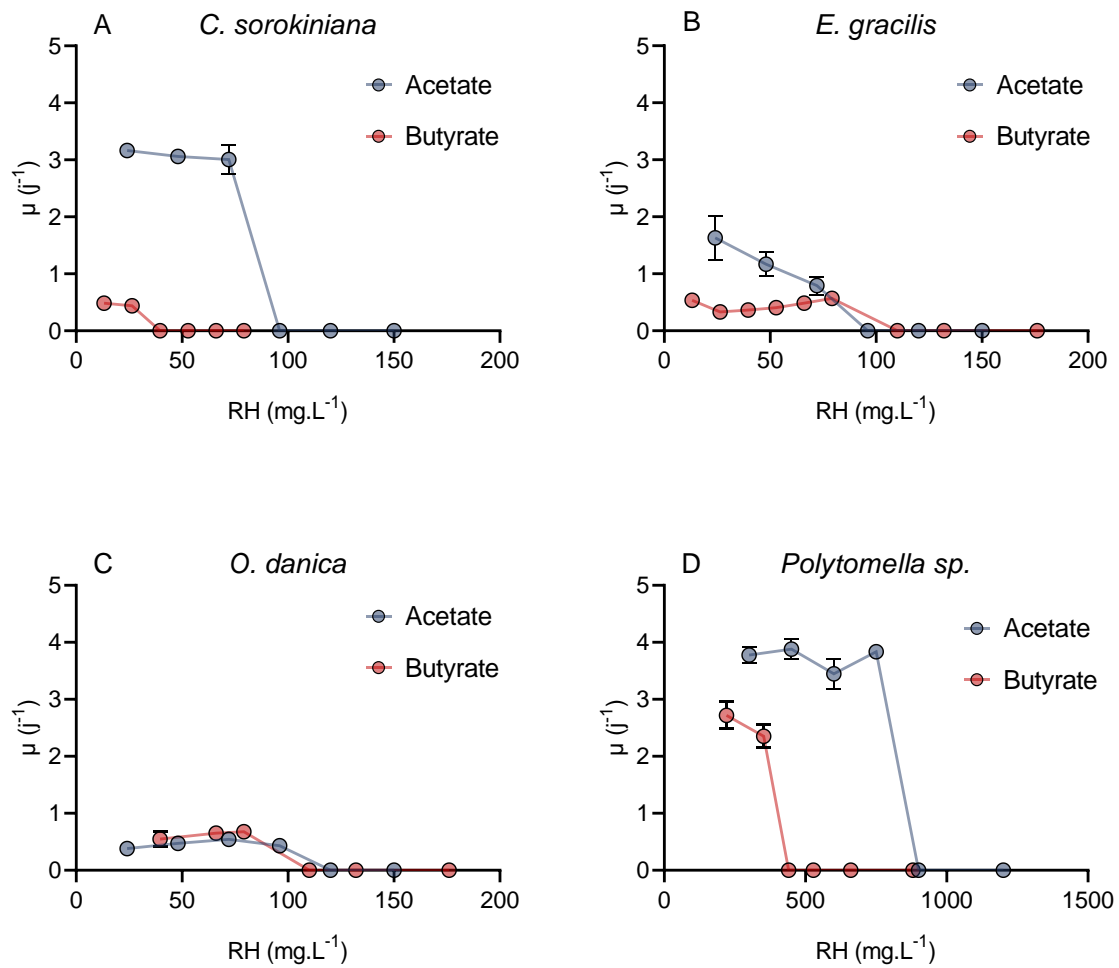
L'un des objectifs principaux de ce chapitre a été d'identifier une souche capable de consommer aussi rapidement le butyrate que l'acétate. Globalement, peu d'espèces répondent à ce critère. D'autres essais, dont les résultats n'ont pas été montrés ici, ont été menés avec les souches *Porphyridium cruentum*, *Chromochloris zofingiensis* ou *Chlamydomonas asymetrica* : aucune de ces souches n'a pu croître sur le butyrate. La quasi-totalité des souches étudiée a pu assimiler l'acétate, avec des taux de croissance compris entre 0,8 et 4,0. Si *Polytomella sp.* a le plus haut taux de croissance ( $4,0 \text{ j}^{-1}$ ), d'autres souches comme *C. sorokiniana* possèdent des taux similaires. En revanche, *Polytomella sp.* se démarque nettement de toutes les autres souches lors de la culture sur butyrate avec un  $\mu$  de  $2,5 \text{ j}^{-1}$ , nettement supérieur à la moyenne de  $0,48 \text{ j}^{-1}$  (calculée pour toutes les souches hormis *Polytomella sp.*). Il est intéressant de constater que *Polytomella magna* a été incapable de croître sur ce substrat : au sein d'un même genre, la consommation de butyrate semble donc très spécifique d'une espèce.

## Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

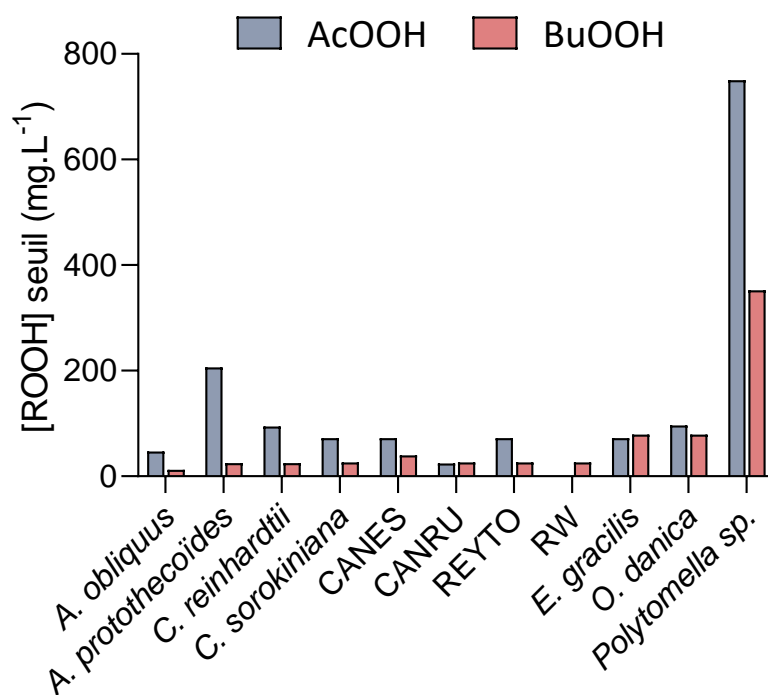


**Figure 26 : *Polytomella sp.* présente le taux de croissance le plus élevé sur le butyrate.** Taux de croissance  $\mu$  ( $j^{-1}$ ) de chaque souche cultivée en présence de  $0,5 \text{ gcs.L}^{-1}$  d'acétate (A) ou de butyrate (B). Taux de consommation (% du substrat initial) de l'acétate (C) ou du butyrate (D) à la fin de la culture. Les souches ont été cultivées sous lumière continue, à pH 7, dans un milieu tamponné (100 mM). Les cultures ont duré jusqu'à atteindre la phase exponentielle ou bien un maximum de 3 (acétate) ou 7 jours (butyrate). Chaque point représente la moyenne et écart type de trois réplicats biologiques.

Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate



**Figure 27 : Seuils d'inhibition par les acides des souches de collection.** Taux de croissance  $\mu$  (j<sup>-1</sup>) de *C. sorokiniana* (A), *E. gracilis* (B), *O. danica* (C) et *Polytomella sp.* (D) cultivées en présence de concentrations (mg.L<sup>-1</sup>) croissantes en AcH (bleu) ou BuH (rouge) à pH 6,5. Chaque point représente la moyenne de trois répliques biologiques.



**Figure 28 : La résistance de *Polytomella sp.* aux acides organiques se démarque des autres souches.** La figure rassemble les seuils de tolérance à l'acide acétique (AcH) ou butyrique (BuH) de toutes les souches étudiées dans cette thèse.

Bien qu'*E. gracilis* et *O. danica* aient pu croître sur le butyrate à une vitesse comparable à celle de l'acétate, le taux de croissance obtenu sur ce substrat pour ces deux souches est respectivement 2,9 et 3,6 fois plus faible que la moyenne de chaque souche (2,0 j<sup>-1</sup>). La consommation qualitative d'acétate ou de butyrate par les souches *E. gracilis* et *Polytomella sp.* est connue depuis plusieurs années (de la Cruz and Gittleson, 1981; Heinrich and Cook, 1967; Heizmann, 1972; Hosotani et al., 1988), mais on trouve peu de données quantitatives de croissance sur ces substrats. De plus, comme en témoignent les dates de ces références, peu de données récentes sont disponibles pour ces souches. Il reste donc difficile de comparer les résultats obtenus ici. (Ogbonna et al., 1998) rapportent pour *E. gracilis* un taux de croissance de 1,08 j<sup>-1</sup> sur glucose et de 0,6 j<sup>-1</sup> sur éthanol, comparable au 0,6 j<sup>-1</sup> déterminé pour l'acétate. Les auteurs rapportent par ailleurs que le pH optimal de croissance sur glucose d'*E. gracilis* se trouve autour de 3,5-4 : il est possible que de plus hauts taux de croissance soient obtenus pour ces pH, le criblage ayant été mené à pH 7. De la même manière, si la consommation de substrats

#### Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

organiques par *O. danica* est connue, une seule étude récente a étudié la consommation d'acétate par cette souche (Lin et al., 2019). Les mêmes auteurs ont, dans une première étude, déterminé l'effet de plusieurs paramètres opératoires sur la croissance d'*O. danica* en hétérotrophie sur du glucose (Lin et al., 2014). Globalement, le taux de croissance de la souche est compris entre 0,45 et 0,75 j<sup>-1</sup>. Sur ce substrat, les auteurs trouvent que le pH optimal de croissance est de 4. Ainsi, contrairement à nos résultats, les auteurs indiquent qu'une concentration en acétate supérieure à 1 g.L<sup>-1</sup> (0,4 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup> environ) a entraîné la mort des cellules. La détermination des seuils de tolérance permet d'expliquer ces résultats pour *E. gracilis* et *O. danica*. En raison de la toxicité de l'acide acétique, certains auteurs ont déjà pu montrer que la croissance d'*E. gracilis* était fortement inhibée pour des pH inférieurs à 5 (Bates and Hurlbert, 1970). En considérant le seuil de tolérance d'*E. gracilis* d'environ 75 mg.L<sup>-1</sup> d'acides non dissociés, le pH minimal toléré par la souche pour 0,5 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup> d'acétate ou de butyrate est de 5,5 : la gamme de pH de croissance optimale (3,5-4) est bien incompatible avec le seuil de tolérance aux acides. De la même façon, le seuil calculé pour *O. danica* (environ 110 mg.L<sup>-1</sup>) explique les résultats de (Lin et al., 2019). Leurs cultures ont été menées à pH 4-5, valeur à laquelle la concentration en AcH était de 387 mg.L<sup>-1</sup> : le pH de culture était incompatible avec le seuil de tolérance de la souche.

Une hypothèse que nous avons formulée plus haut, concernant l'isolement de différentes souches acidophiles, était que de telles souches pourraient résister davantage aux RH. Une telle hypothèse aurait pu être vérifiée avec *E. gracilis* et d'*O. danica*, ces souches pouvant croître à des pH acides (jusqu'à 3). Les résultats indiquent cependant que la propriété d'une souche à tolérer des pH acides ne permet pas de prédire sa capacité à résister aux acides non dissociés. Ce résultat a pu être de la même manière montré pour une souche acidophile, *Dunaliella acidophila* : la souche tolère parfaitement les pH très acides (proches de 1), mais est inhibée par des concentrations en AcH de 0,083 mg.L<sup>-1</sup> (Gimmler, 2001). D'après (Russell, 1992), ce sont les souches dont le pH cytosolique peut diminuer de quelques unités qui présentent les meilleures résistances aux RH. Lorsque la différence entre le pH interne et externe diminue, le gradient de concentration en RH interne et externe diminue de la même manière : une concentration en anions et protons plus faible s'accumule dans la cellule, comparativement à une cellule dont le pH interne reste constant. Outre le taux de croissance élevé de *Polytomella sp.* sur le butyrate, la souche exhibe aussi de très hautes résistances aux acides non dissociés

## Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

comparativement aux autres espèces. Il est donc possible que la résistance de *Polytomella sp.* soit due à cette propriété, qui est absente chez les autres espèces.

En raison de sa proximité phylogénétique avec d'autres espèces, notamment *C. reinhardtii*, *Polytomella sp.* a déjà servi de modèle d'étude pour tenter de comprendre différents évènements évolutifs ayant conduit l'espèce d'un mode de nutrition autotrophe à hétérotrophe (Atteia et al., 2005; Selim et al., 2020; van Lis et al., 2021). Ces études ont pu mettre en évidence des différences structurelles au niveau des mitochondries entre les deux espèces, une efficacité accrue de la chaîne respiratoire de transport d'électrons (Van Lis et al., 2005) et une plus grande concentration des intermédiaires du cycle de Krebs pendant la croissance (Selim et al., 2020), révélant globalement une capacité accrue de l'espèce à croître en hétérotrophie comparée à l'espèce photosynthétique. La physiologie unique de *Polytomella sp.* aussi bien sur l'acétate que sur le butyrate accentue l'intérêt de cette espèce pour mieux comprendre les différences entre organismes mixotrophes et hétérotrophes, et plus particulièrement dans notre cas pour comprendre les verrous métaboliques de la consommation du butyrate et d'inhibition par les RH chez les chlorophytes photosynthétiques. Outre ces aspects fondamentaux, la souche présente également des intérêts biotechnologiques, discutés ci-après.

### 2.3. Comparaison des candidats

Le deuxième objectif de ce travail était d'évaluer le potentiel de production des souches présentant une assimilation du butyrate aussi rapide que celle de l'acétate, en comparaison avec celui de *C. sorokiniana*. Pour cela les souches *E. gracilis*, *O. danica* et *Polytomella sp.* ont été cultivées sur un mélange synthétique d'AGV et comparées à *C. sorokiniana*. De plus, nous avons souhaité intégrer REYTO dans le panel de comparaison. Bien que les souches soient identiques, des différences physiologiques (accumulation de lipides ou de sucres) ne sont en effet pas exclues. La concentration en carbone a été fixée à 1,0 gC.L<sup>-1</sup>, avec un ratio A : B de 1:2. Le pH de culture était de 7, tamponné à 100 mM d'HEPES (condition N°9).

#### 2.3.1. Croissance et rendements sur le mélange d'AGV

Les courbes de croissance et de consommation des substrats sont données en **Figure 29**. Chaque souche a pu croître sur le mélange d'acétate et de butyrate.

#### Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

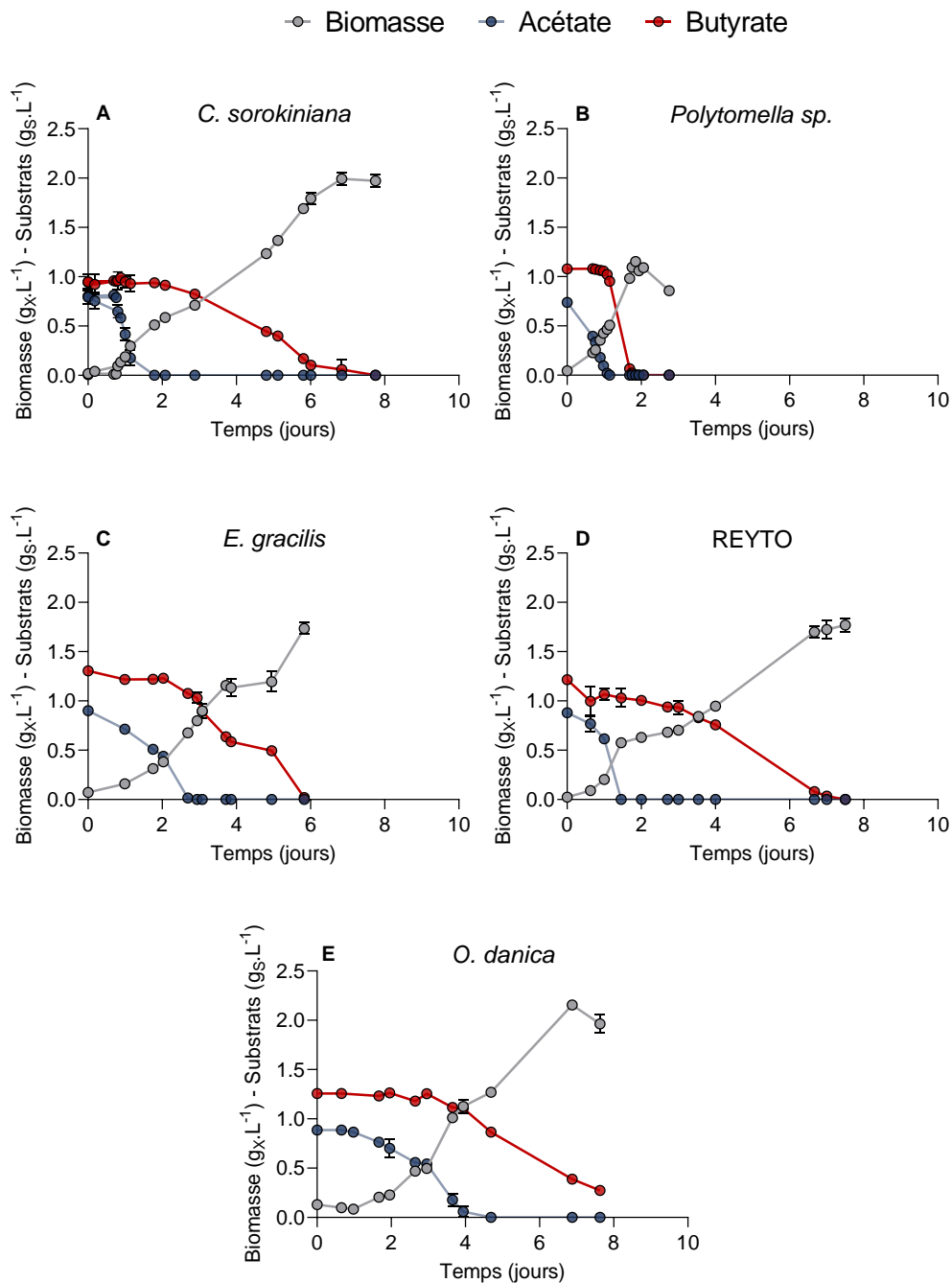
Quelle que soit la souche, l'acétate a toujours été consommé avant le butyrate et, tant que l'acétate est présent dans le milieu, la concentration en butyrate n'a pas diminué. En conséquence, chaque phase de croissance a été considérée individuellement pour le calcul des taux de croissance et des rendements (**Figure 30**). Pendant la phase de croissance sur acétate, *C. sorokiniana* a présenté le plus haut  $\mu$  ( $3,34 \pm 0,17 \text{ j}^{-1}$ ), suivie par *Polytomella sp.* et REYTO ayant un taux de croissance similaire ( $2,2 \text{ j}^{-1}$ ) (**Figure 30A**).

Après épuisement de l'acétate, le butyrate a été consommé, plus ou moins rapidement selon les souches. Le taux de croissance sur le butyrate a toujours été plus lent que sur l'acétate. *Polytomella sp.* a été la souche la plus rapide, présentant un  $\mu$  de  $1,2 \pm 0,04 \text{ j}^{-1}$ . *E. gracilis* a été la deuxième souche la plus rapide, avec un  $\mu$  de  $0,53 \pm 0,02 \text{ j}^{-1}$ . Enfin, les deux *Chlorella sorokiniana* ont présenté le même taux de croissance sur butyrate, divisé par 10 comparé à celui sur l'acétate ( $0,29 \text{ j}^{-1}$ ).

On constate que les taux de croissance de *Polytomella sp.* sont environ deux fois plus faibles dans cette expérience que ceux déterminés précédemment (respectivement  $4,0$  et  $2,5 \text{ j}^{-1}$  pour l'acétate et le butyrate). De la même manière, le taux de croissance de REYTO est plus faible sur acétate dans cette expérience que dans les caractérisations en plaques. Plusieurs hypothèses expliquent ces différences. D'abord, on pourrait supposer que la présence de butyrate inhibe la croissance sur acétate pour ces deux souches. Si tel était le cas, le même phénomène devrait être observé pour *C. sorokiniana* : un taux de croissance comparable aux autres expériences est pourtant obtenu pour cette souche. Pareillement, cette hypothèse n'expliquerait pas le taux de croissance réduit de *Polytomella sp.* sur le butyrate. L'autre hypothèse tient dans la caractérisation de la phase exponentielle, qui a été moins bien déterminée pour ces deux souches dans cette expérience (il manque quelques points de prélèvement pendant la nuit). Le taux de croissance déterminé représenterait alors un taux moyen et non un taux de croissance maximal. Cette hypothèse est la plus probable pour expliquer la différence de taux de croissance observée pour REYTO : seuls deux points ont permis de caractériser la phase exponentielle sur acétate. Pendant la phase butyrate, le taux de croissance obtenu dans cette expérience est comparable avec celui obtenu en microplaques. Cependant, une répétition de l'expérience en fiole (dont les résultats seront montrés dans le **chapitre 5**) pour *Polytomella sp.* confirme bien les taux de croissance observés ici. Pour cette espèce, la différence tient donc probablement dans le récipient de culture.



Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate



**Figure 29 : Croissance des souches candidates sur un mélange d'AGV.** Evolution du poids sec ( $g_x.L^{-1}$ ) et de la concentration en substrat ( $g_s.L^{-1}$ ) en fonction du temps (j) de *C. sorokiniana* (A), *Polytomella sp.* (B), *E. gracilis* (C), REYTO (D) et *O. danica* (E). La concentration initiale en acétate est de  $0,33 g_C.L^{-1}$  et celle en butyrate de  $0,67 g_C.L^{-1}$ . Le pH initial du milieu a été fixé à 7 et tamponné avec 100 mM d'HEPES. Chaque point représente la moyenne de trois répliques biologiques.

## Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

Dans le **chapitre 2**, nous avons en effet décrit le protocole de culture en microplaques et sa validation en comparant les taux de croissance entre microplaques et fioles pour une souche verte photosynthétique. Cependant, une telle validation n'a pas été effectuée avec *Polytomella sp.* : il est fort probable que, pour cette souche, le récipient de culture tienne un rôle plus important que pour les souches photosynthétiques, notamment en raison du transfert de gaz. Les cultures de *Polytomella sp.* sont généralement menées sans agitation (Atteia et al., 2003, 2000). Bien que nous n'ayons pas trouvé de raisons explicites contre-indiquant une agitation, aussi faible soit elle, nous avons mené nos cultures de la même manière. Le milieu de culture étant quasiment identique entre les différentes conditions (seule la concentration et la nature des substrats varient), on peut supposer que la conductance de transfert  $k_L$  est constante entre une microplaque et une fiole. Sans agitation ni bullage, le transfert de gaz dépend alors principalement de la surface d'interface gaz liquide par unité de volume de réaction (coefficient  $a$ ). Dans une fiole de 500 mL, remplie avec 200 mL de milieu, ce coefficient est théoriquement d'environ  $0,25 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ , tandis qu'il est de  $1,9 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$  dans un puits de microplaques. Sans agitation, le transfert global d'oxygène était donc meilleur dans les microplaques. Les cultures ne sont toutefois pas complètement limitées en oxygène car les cellules sont capables de nager à la surface du milieu pour s'oxygéner. Pendant la croissance, les cellules de *Polytomella sp.* forment des agrégats composés de plusieurs individus se déplaçant suivant une colonne verticale entre le fond et la surface du milieu (de la Cruz and Gittleson, 1981). Ces mouvements dépendent de la géométrie du récipient et de la profondeur de celui-ci. Dans un puit de microplaques, contenant 1 mL de milieu (sur une hauteur d'environ 0,6 cm) le fond est atteint bien plus rapidement que dans une fiole (hauteur d'environ 4 cm) : les cellules peuvent ainsi s'oxygéner plus rapidement. Ces hypothèses pourraient se vérifier en aérant davantage les cultures en fioles par agitation. Il faudrait néanmoins tenir compte de la capacité des cellules à s'accommoder de l'agitation (qui expliquerait pourquoi les cultures de *Polytomella sp.* sont menées statiquement) qui pourrait finalement diminuer plutôt qu'augmenter les taux de croissance. Malgré ces possibles limitations, *Polytomella sp.* reste la souche la plus rapide sur l'effluent synthétique : la culture est terminée en près de 2 jours contre au minimum 6 pour les autres souches.

A la fin de la consommation de l'acétate, la plupart des souches ont présenté un rendement de biomasse similaire et sans différence significative, compris entre  $1,46$  et  $1,71 \text{ gx.gcs}^{-1}$ . L'espèce *O. danica* a présenté le plus haut rendement, à  $3,40 \pm 0,33 \text{ gx.gcs}^{-1}$  (**Figure 30B**). Les

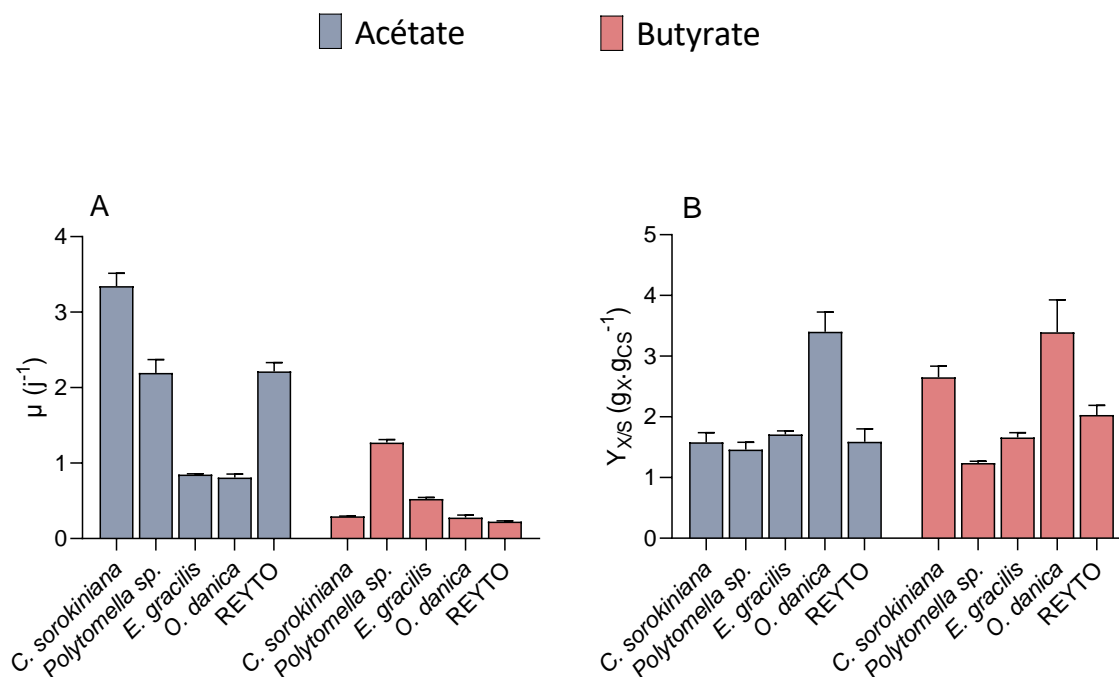
#### Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

compositions élémentaires d'*E. gracilis*, d'*O. danica* et de *Polytomella sp.* n'ont pas été référencées et n'ont pas été déterminées. En conséquence, nous n'avons exprimé les rendements qu'en grammes de biomasse et non en carbone comme dans le **chapitre 3**. A des fins de comparaisons, nous estimerons leur contenu en C à au moins 50% de la biomasse. Selon cette estimation, le rendement d'*O. danica* s'approcherait d' $1,7 \text{ g}_{\text{CX}}.\text{g}_{\text{CS}}^{-1}$ . Ceci signifierait donc que cette souche a pu assimiler du carbone inorganique par photosynthèse pendant la phase de croissance sur acétate. Encore une fois, nous n'avons trouvé que peu de données comparatives dans la littérature concernant la culture d'*O. danica* en mixotrophie : ces résultats mériteraient donc d'être confirmés.

Le rendement de chaque autre souche serait compris entre 0,7 et 0,8  $\text{g}_{\text{CX}}.\text{g}_{\text{CS}}^{-1}$ . *Polytomella sp.* est une souche incapable de réaliser la photosynthèse : son rendement correspond donc uniquement au rendement hétérotrophe. Malheureusement, nous n'avons pas trouvé de données de rendements pour *Polytomella sp.* et ne pouvons que comparer avec d'autres espèces. Cette valeur peut sembler relativement élevée : à titre de comparaison, (Turon et al., 2015a) ont obtenu un rendement de 0,42 et 0,38  $\text{g}_{\text{CX}}.\text{g}_{\text{CS}}^{-1}$  respectivement pour *C. sorokiniana* et *A. protothecoides* cultivées en hétérotrophie sur acétate. Toutefois, (Boyle and Morgan, 2009) ont bien déterminé un rendement de 0,69  $\text{g}_{\text{CX}}.\text{g}_{\text{CS}}^{-1}$  pour *C. reinhardtii* CC-400 cw15 mt+ en hétérotrophie sur du milieu TAP, ce qui correspond avec notre résultat. Le rendement hétérotrophe sur acétate semble donc très dépendant de l'espèce étudiée : en absence de données comparatives directes pour *Polytomella sp.*, nous sommes contraints d'accepter cette valeur.

Le fait que les autres souches présentent un rendement identique à *Polytomella sp.* signifierait par ailleurs qu'aucune d'entre elles n'a assimilé de carbone inorganique par photosynthèse pendant la phase de croissance sur acétate. Pour *C. sorokiniana*, on observe ainsi une chute de rendement d'environ 21% par rapport aux résultats du précédent chapitre (1,01  $\text{g}_{\text{CX}}.\text{g}_{\text{CS}}^{-1}$ ) (**Tableau 15, section 2.5**). Cette observation semble contradictoire avec les précédentes. Nous avons en effet pu conclure dans le **chapitre 3** que l'augmentation de la  $C_T$  (concentration totale en AGV) diminuait le rendement mixotrophe de *C. sorokiniana*. Les cultures ayant été menées avec 1  $\text{g}_{\text{C}}.\text{L}^{-1}$  d'AGV total (condition N°9), nous nous serions attendus à un rendement supérieur ou au moins égal à celui observé avec 3  $\text{g}_{\text{C}}.\text{L}^{-1}$  d'AGV (condition N°7). La différence de rendement observée doit donc venir du pH : fixé à 7 dans cette expérience contre 8 dans la précédente. Pourtant, nous avons précédemment déterminé un rendement de 2,0  $\text{g}_{\text{CX}}.\text{g}_{\text{CS}}^{-1}$  à pH 7 lorsque la  $C_T$  était fixée à 0,5  $\text{g}_{\text{C}}.\text{L}^{-1}$  (condition N°4)

(Tableau 13, section 2.2). L'ensemble de ces résultats suggèrent une forte régulation du métabolisme mixotrophe en fonction de conditions opératoires interdépendantes et de l'espèce considérée. Ce point sera rediscuté dans le dernier chapitre de ce manuscrit.



**Figure 30 : Caractéristiques de croissances des souches candidates.** (A) Taux de croissance  $\mu$  (j<sup>-1</sup>) de chaque souche, (B) rendements en biomasse  $Y_{X/S}$  (gx.gcs<sup>-1</sup>) de chaque souche. Les données ont été calculées pour la phase de croissance acétate (bleu) ou butyrate (rouge). Chaque point représente la moyenne de trois répliques biologiques.

A la fin de la phase butyrate, *Polytomella sp.* a présenté un rendement significativement inférieur à celui obtenu sur acétate ( $1,24 \pm 0,03$  gx.gcs<sup>-1</sup> contre  $1,46 \pm 0,12$  gx.gcs<sup>-1</sup>). Encore une fois, en considérant un taux de carbone dans la biomasse d'environ 50%, ce rendement reste inférieur à l'unité : la souche n'est pas capable d'assimiler une autre source de carbone. Le rendement d'*E. gracilis* et d'*O. danica* n'a pas significativement changé (respectivement  $1,66 \pm 0,08$  gx.gcs<sup>-1</sup> et  $3,39 \pm 0,54$  gx.gcs<sup>-1</sup>) tandis que celui de *C. sorokiniana* et REYTO a augmenté à respectivement à  $2,7 \pm 0,18$  et  $2,1 \pm 0,16$  gx.gcs<sup>-1</sup>. La présence de lumière a permis à ces souches de maintenir un rendement sur le butyrate égal ou supérieur à celui sur l'acétate.

## Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

Dans le cas d'*E. gracilis*, le maintien du rendement indique que la lumière a permis d'apporter l'énergie nécessaire à l'assimilation du butyrate, sans pour autant déclencher la fixation de carbone inorganique par photosynthèse. Ce résultat sera néanmoins nuancé dans la section suivante. Le rendement de *C. sorokiniana* est comparable à celui obtenu dans le **chapitre 3** ( $1,44 \text{ g}_{\text{CX}}.\text{g}_{\text{CS}}^{-1}$ ) (**Tableau 15, section 2.5**). Ce résultat ne remet toutefois pas nécessairement en cause nos observations précédentes : on répète que dans cette expérience (condition N°9), à la fois le pH et la  $C_T$  ont été modifiés par rapport à la condition N°7. Ainsi, un rendement de  $1,98 \text{ g}_{\text{CX}}.\text{g}_{\text{CS}}^{-1}$  a été obtenu à pH 7 et  $0,5 \text{ g}_{\text{CS}}.\text{L}^{-1}$  de butyrate (condition N°4) (**Tableau 13, section 2.2**) contre un rendement de  $1,58 \text{ g}_{\text{CX}}.\text{g}_{\text{CS}}^{-1}$  à pH 8 et  $1,0 \text{ g}_{\text{C}}.\text{L}^{-1}$  (condition N°6). Ces deux paramètres ayant des effets opposés sur le rendement (augmentation du rendement avec la diminution de la  $C_T$  et diminution du rendement avec la diminution du pH), il est possible qu'obtenir une valeur identique entre les conditions N°7 et N°9 ne soit dû qu'à une coïncidence. Le rendement de REYTO, inférieur à celui de *C. sorokiniana*, suggère que ces régulations du métabolisme mixotrophe dépendent de la souche considérée, y compris au sein de la même espèce.

### 2.3.2. Productivités en lipides et sucres

Les concentrations en lipides et en sucres produits par chacune des souches ont été mesurées au cours de la culture et rapportées à la quantité de biomasse (**Figure 31**). De la même manière que pour la biomasse, les productivités et rendements en sucres et lipides ont été déterminées selon le substrat de croissance (acétate ou butyrate) ou de manière globale, c'est-à-dire en comparant le point final de culture au point initial (**Figure 32**). Hormis REYTO, qui a présenté un comportement globalement identique à celui de *C. sorokiniana*, chaque souche a présenté des caractéristiques distinctes d'accumulation.

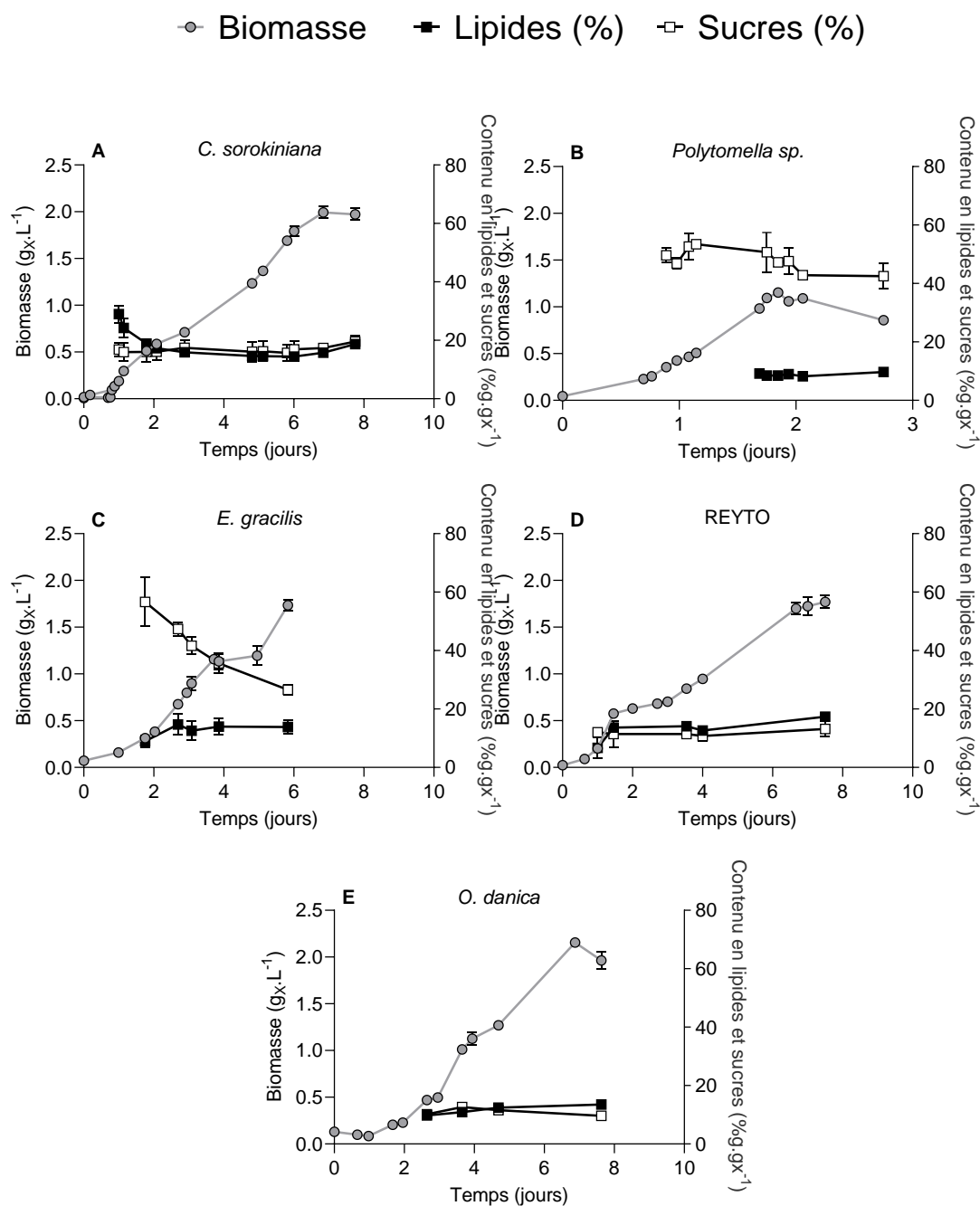
Le contenu en sucres le plus élevé a été retrouvé chez *Polytomella sp.* et *E. gracilis* ( $52,6 \pm 4,5 \%$  et  $53,5 \pm 11,2\%$  respectivement) à la fin de la phase acétate : ces deux souches présentent le rendement  $Y_{\text{Sucres}/S}$  le plus élevé sur acétate (**Figure 32B**). Ce résultat était attendu car les deux souches sont connues pour leur accumulation d'amidon pour la première (de la Cruz and Gittleston, 1981) et de paramylon pour la seconde (Gissibl et al., 2019). Les deux souches diffèrent toutefois dans leurs dynamiques d'accumulation des composés. Le contenu en sucres de *Polytomella sp.* est resté relativement constant tant que du substrat organique est présent, mais diminue progressivement jusqu'à  $35,7 \pm 3,9\%$  en fin de culture. Ceci est lié au

#### Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

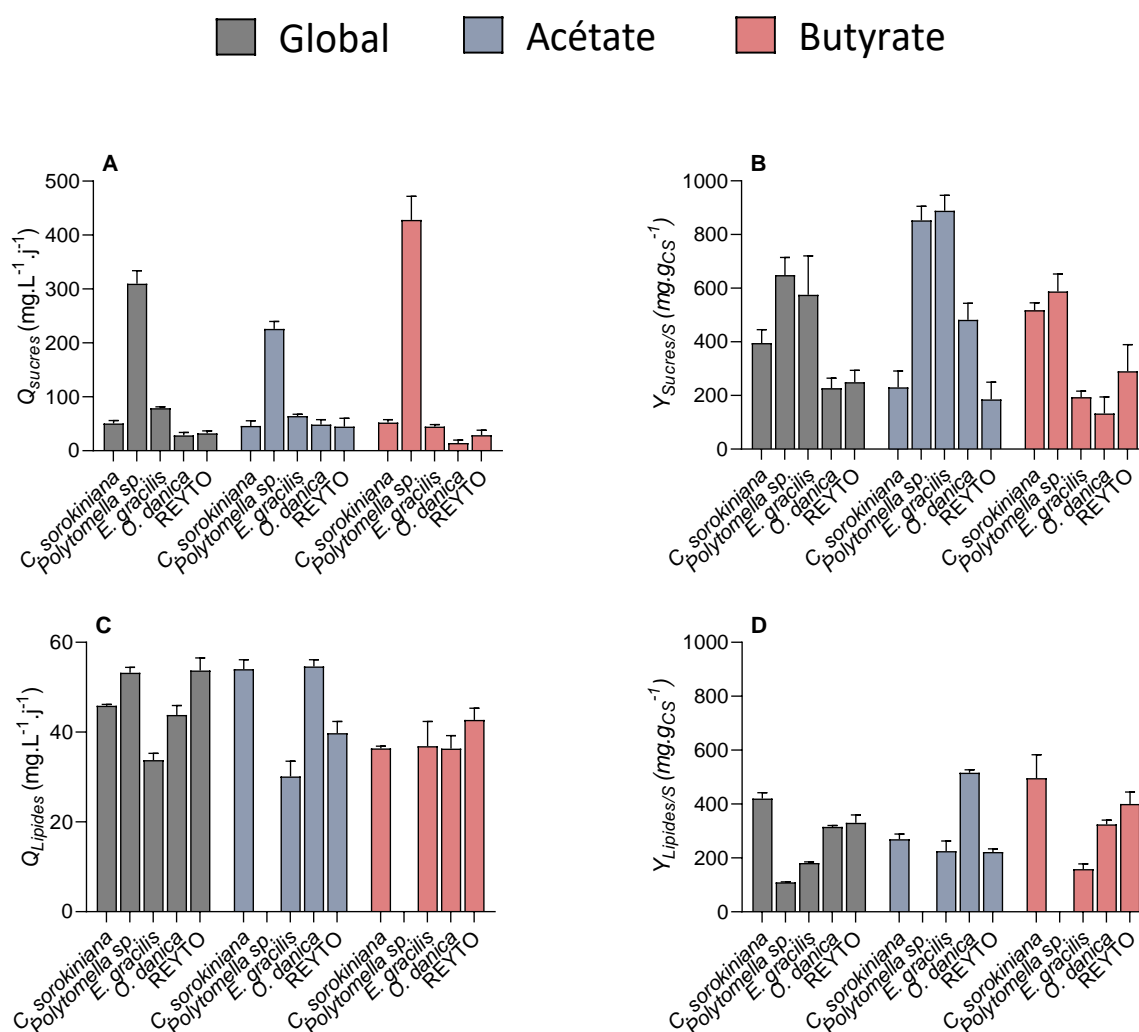
caractère purement hétérotrophe de la souche : en absence de source de carbone, *Polytomella sp.* forme des cystes immobiles et consomme ses réserves pour sa survie. La combinaison d'un taux de croissance élevé sur le butyrate et d'un rendement élevé en sucre ( $648,7 \pm 66,0 \text{ mg}_{\text{sucres}} \cdot \text{g}_{\text{CS}}^{-1}$ ) a fait de *Polytomella sp.* la souche la plus productive en sucres, quelle que soit la phase de croissance considérée (**Figure 32A**).

D'un autre côté, *E. gracilis* a puisé dans ses réserves pendant la consommation du butyrate : son contenu en sucres a diminué progressivement jusqu'à  $26,6 \pm 1,7\%$  pendant la phase de croissance. Un résultat similaire a été obtenu pour *O. danica*. Le contenu en sucres de la souche a diminué lors du passage de la phase acétate à la phase butyrate, passant de  $12,6 \pm 0,4\%$  à  $9,6 \pm 1,4\%$ . Ainsi, bien que la souche ait présenté un rendement élevé en biomasse, elle présente globalement le rendement en sucre le plus faible et son rendement en sucres a été environ 5 fois plus faible sur le butyrate que l'acétate. En conséquence, le rendement en sucre  $Y_{\text{Sucres/S}}$  d'*E. gracilis* est devenu inférieur à celui de *Polytomella sp.* en fin de culture sur butyrate ( $194,0 \pm 22,2 \text{ mg}_{\text{sucres}} \cdot \text{g}_{\text{CS}}^{-1}$ ) tandis que celui d'*O. danica* est devenu inférieur à celui de toutes les autres souches. Les souches n'accumulant pas par ailleurs d'autres composés (*i.e.* des lipides), ceci indique qu'elles doivent tirer une partie de leur énergie de la glycolyse pour maintenir un taux de croissance et un rendement de biomasse constants sur butyrate.

Le contenu en sucres des deux souches *C. sorokiniana* et REYTO est resté stable tout au long de la culture, autour de 18% et 13% respectivement, conformément aux résultats obtenus dans le **chapitre 3**. *C. sorokiniana* présente bien un rendement  $Y_{\text{Sucres/S}}$  sur le butyrate égal à celui de *Polytomella sp.* ( $518,0 \pm 27,5$  contre  $587,7 \pm 65 \text{ mg}_{\text{sucres}} \cdot \text{g}_{\text{CS}}^{-1}$  respectivement). Comme discuté précédemment, ce haut rendement provient du mode mixotrophe, qui permet à *C. sorokiniana* de consommer, en plus du substrat organique, le  $\text{CO}_2$ .



**Figure 31 : Evolution du contenu en lipides et sucres des souches au cours de la culture.** Evolution du poids sec ( $g \cdot L^{-1}$ ; ronds gris) et du contenu en lipides (carrés noirs) ou sucres (carrés blancs) ( $\% g \cdot g^{-1}$ ) en fonction du temps (j) de *C. sorokiniana* (A), *Polytomella sp.* (B), *E. gracilis* (C), REYTO (D) et *O. danica* (E). Chaque point représente la moyenne de trois répliques biologiques. L'absence de point en début de culture indique une concentration inférieure à la limite de détection.



**Figure 32 : Caractéristiques de production de lipides et de sucres des souches candidates.**

(A) Productivités en sucres  $Q_{sucres}$  (mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) (A) et (B) rendements  $Y_{sucres/S}$  (mg.gcs<sup>-1</sup>) de chaque souche. (C) Productivités en lipides  $Q_{lipides}$  (mg.L<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) et (D) rendements  $Y_{lipides/S}$  (mg.gcs<sup>-1</sup>) de chaque souche. Les données ont été calculées pour la phase de croissance acétate (bleu) ou butyrate (rouge) ou sur l'intégralité de la culture (gris). Chaque point représente la moyenne de trois répliques biologiques. L'absence de données pour *Polytomella sp.* est due à l'incapacité de différencier les contributions en fonction des phases de croissance (la quantité de lipides mesurée pendant la phase acétate étant en dessous du seuil de détection).



## Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

*Polytomella sp.* n'a malheureusement pas accumulé de lipides et a présenté globalement le contenu en lipide le plus faible ( $8,4 \pm 0,5\%$ ) (**Figure 32D**). On précise ici que la concentration en lipides de *Polytomella sp.* a été inférieure à la limite de quantification de notre méthode de dosage pendant la phase acétate : il n'a pas été possible de distinguer les contributions de l'un ou l'autre des substrats pour cette souche.

Globalement, toutes les souches ont présenté des productivités en lipides similaires, comprises entre 33,8 et 53,7 mg<sub>Lipides.gCS<sup>-1</sup></sub>. *C. sorokiniana* et REYTO restent toutefois les souches les plus intéressantes en termes de production de lipides, puisque ce sont celles ayant présenté les plus hauts contenus en lipides, sans différence significative (aux alentours de  $18,7 \pm 0,4$  et  $17,4 \pm 1,0\%$  respectivement). Ces valeurs correspondent aux valeurs de rendement déterminées dans le **chapitre 3** en condition non limitée en azote et phosphore. Ainsi, si le changement de conditions (pH et concentration) a eu un effet sur le rendement mixotrophe, notamment celui obtenu sur l'acétate, les rendements en sucres et en lipides n'ont pas été affectés.

### 3. Conclusion

L'objectif principal de ce chapitre a été d'identifier une ou plusieurs souches capables de croître aussi rapidement sur le butyrate que sur l'acétate. Pour cela, deux stratégies ont été étudiées : l'isolement de souches à partir de milieux environnementaux spécifiques et le criblage de quelques souches de collection. La première stratégie a conduit à l'isolement de plusieurs souches de microalgues, s'apparentant majoritairement à *C. sorokiniana*. Ces souches n'ont toutefois présenté aucune caractéristique de croissance améliorée par rapport à la souche de laboratoire : cette stratégie n'a donc pas permis d'identifier une espèce particulièrement capable de consommer le butyrate. La deuxième stratégie nous a permis quant à elle d'identifier trois souches consommant le butyrate aussi rapidement que l'acétate. A la suite de cette identification, nous avons évalué le potentiel de production de chaque candidate sur un effluent synthétique composé d'acétate et de butyrate.

En conclusion, il existe bel et bien des espèces de microalgues capables de croître sur le butyrate avec un taux de croissance comparable, si ce n'est égal, à celui obtenu sur l'acétate. Parmi ces souches, *Polytomella sp.* s'est particulièrement distinguée en présentant un taux de croissance sur l'acétate similaire à celui de *C. sorokiniana* et un taux de croissance sur le

Chapitre 4 : Exploration de la biodiversité : recherche d'une souche consommant rapidement le butyrate

butyrate cinq fois plus élevé que cette dernière. Ces travaux soulèvent ainsi plusieurs questions. Pourquoi *Polytomella sp.* présente-t-elle un taux de croissance sur le butyrate si élevé en comparaison des autres espèces? Quelles caractéristiques métaboliques particulières la distinguent des microalgues photosynthétiques ? Les réponses à ces questions feront l'objet du prochain chapitre

## Chapitre 5

# Quel est le métabolisme du butyrate chez *Polytomella sp.* ?

### 1. Introduction

Le **chapitre 4** nous a permis d'identifier une souche, *Polytomella sp.*, présentant des caractéristiques de croissance sur le butyrate et de tolérance aux acides non dissociés remarquables en comparaison des autres souches étudiées dans cette thèse. Ces différences physiologiques majeures ont en partie pour origine des réponses métaboliques différentes au butyrate, tant dans la voie d'assimilation que la réponse au stress acide. Malheureusement, en raison d'un manque de connaissances lié au métabolisme du butyrate, il est difficile de comparer directement *Polytomella sp.* avec une autre souche.

Le métabolisme du butyrate a été peu étudié chez les microalgues mais a en revanche fait l'objet de plusieurs travaux dans le cas des colonocytes humains, pour qui le butyrate constitue une source d'énergie primaire (Fleming et al., 1991; Roediger, 1982). Ces cellules importent le butyrate via un transporteur monocarboxylate (MCT). Le transporteur (protéine de 45 kDa) est situé dans la membrane plasmique et symporte un ion H<sup>+</sup> avec l'anion butyrate (Cuff et al., 2005). Le butyrate est ensuite importé dans la mitochondrie afin d'être oxydé en acétyl-CoA et alimenter le métabolisme central du carbone (Donohoe et al., 2011).

L'oxydation du butyrate se déroule en cinq étapes successives. D'abord, le butyrate est activé via la butyrate-CoA synthétase, puis converti en crotonyl-CoA par la butyryl-CoA déshydrogénase. La troisième étape est la conversion en hydroxybutyryl-CoA via la crotonase. L'hydroxybutyryl-CoA est par la suite transformé en acétoacétyl-CoA via l'hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase. Finalement, l'acétoacétyl-CoA est clivé en deux molécules d'acétyl-CoA par l'acétoacétyl-CoA thiolase (De Preter et al., 2012). Une voie d'assimilation plus complexe a été décrite chez la bactérie non sulfureuse *Rhodospirillum rubrum*. La première étape d'activation est menée par la butyryl-CoA : acétate-CoA transférase, tandis que différentes voies divergent au niveau du crotonyl-CoA. Une voie permet la synthèse et la dégradation de

poly(R)-3-hydroxybutyrate en acétoacétate et acétoacétyl-CoA ou bien la formation de propionyl-CoA via la (2S)-éthylmalonyl-CoA. Une voie de synthèse et de dégradation de l'isoleucine à partir du pyruvate vers le propionyl-CoA a également été observée (De Meur et al., 2020).

Chez les microalgues, les données de voie d'assimilation de l'acétate pointent un rôle central des péroxysomes comme sites de productions de l'acétyl-CoA et de transports des squelettes carbonés comme le succinate vers la mitochondrie, où ils pourront alimenter le cycle de Krebs pour la production d'énergie, d'acides aminés et de lipides (Lauersen et al., 2016). Les enzymes potentiellement impliquées dans la voie d'assimilation du butyrate, comme celles retrouvées chez les colonocytes humains, ont été pour la plupart identifiées chez *C. reinhardtii* (Li-Beisson et al., 2019) mais aucune voie métabolique interconnectée comme celle trouvée chez *R. rubrum* n'a été mise en évidence chez *C. reinhardtii*. Par ailleurs, bien que plusieurs auteurs déclarent que les AGV sont transportés via un transporteur MCT, aucune preuve expérimentale confirmant ce fait n'a pu être trouvée dans la littérature, que ce soit pour l'acétate ou le butyrate. Globalement, aucune donnée expérimentale n'a à ce jour, à notre connaissance, été fournie quant à la voie d'assimilation exacte du butyrate, sa localisation intracellulaire et les réponses métabolites associées. Quelle est la voie d'assimilation du butyrate chez *Polytomella sp.* ? Quelles sont les voies métaboliques impliquées dans la réponse au butyrate ? Ces réponses peuvent-elles donner des indications quant à la spécificité de *Polytomella sp.* en comparaison des espèces photosynthétiques ?

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé une approche protéomique à grande échelle. *Polytomella sp.* a été cultivée sur de l'acétate ou du butyrate, et les deux protéomes ont été comparés. Cette approche nous a permis d'élucider la voie d'assimilation du butyrate chez *Polytomella sp.* et d'identifier plusieurs réponses métaboliques à la présence de butyrate.

## 2. Résultats

### 2.1. Croissance et accumulation des composés de stockage sur les deux AGV

*Polytomella sp.* a été cultivé sur 1 gC.L<sup>-1</sup> d'acétate ou de butyrate (condition N°10) en fioles, sans contrôle spécifique de la lumière ni agitation (**Figure 33**). Les cellules ont pu croître sur

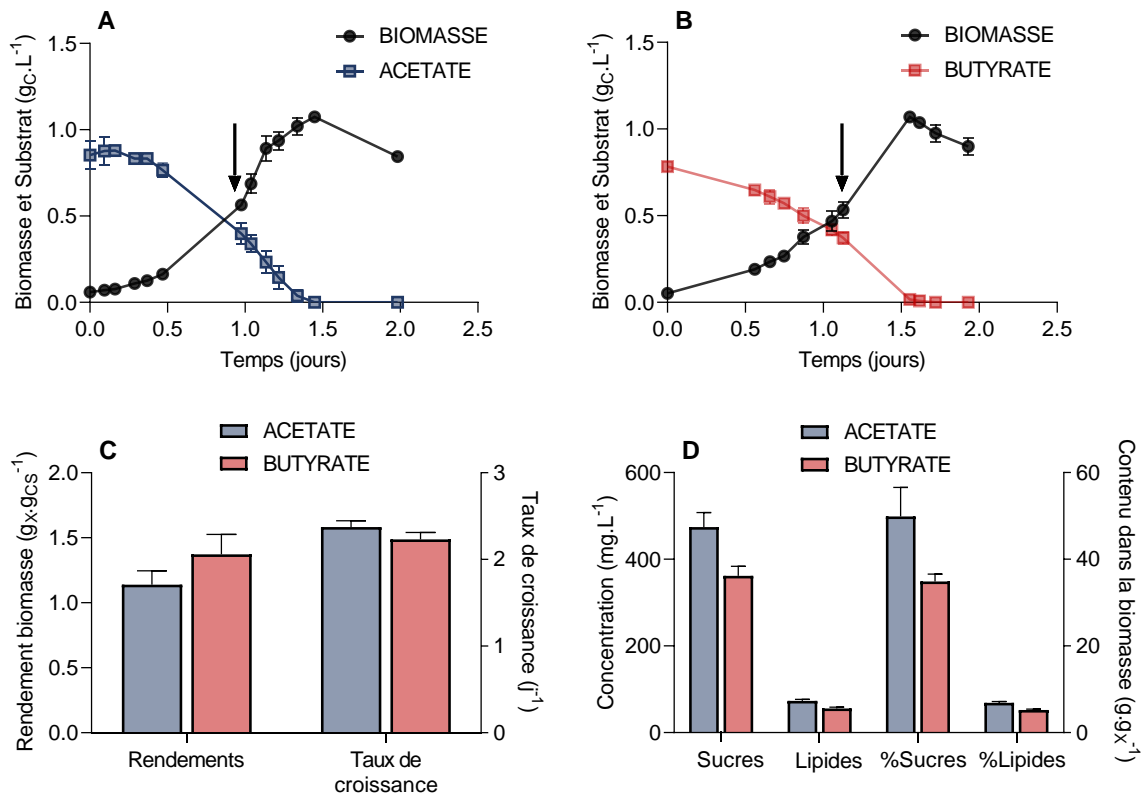
les deux substrats, et une phase exponentielle a été observée dans les deux conditions (**Figure 33A** et **33B**). Dans les deux cas, le substrat a été consommé en 1,5 jours, conduisant à une biomasse de  $1,1 \text{ g}_X \cdot \text{L}^{-1}$ . Aucune différence significative dans le rendement ( $1,27 \pm 0,03 \text{ g}_X \cdot \text{L}^{-1}$  sur acétate contre  $1,31 \pm 0,05 \text{ g}_X \cdot \text{L}^{-1}$  sur butyrate) ou le taux de croissance ( $2,37 \pm 0,07 \text{ j}^{-1}$  sur acétate et  $2,23 \pm 0,08 \text{ j}^{-1}$  sur butyrate) (**Figure 33C**) n'a été observé entre les deux substrats. Ces taux de croissance sont du même ordre que ceux observés dans le chapitre précédent, confirmant ces valeurs lorsque *Polytomella sp.* est cultivée en fiole. Après épuisement du carbone organique, la biomasse de *Polytomella sp.* a diminué rapidement et des cystes se sont formés. Comme lors de la culture en mélange, la croissance s'est accompagnée de l'accumulation de sucres : jusqu'à  $49,7 \pm 6,7\%$  en présence d'acétate et environ 15% de moins en présence de butyrate (**Figure 33D**). En revanche, les cellules ont produit très peu de lipides, avec un maximum de  $73,3 \pm 3,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  sur acétate. Une encore plus faible concentration a été mesurée lors de la culture sur butyrate ( $55,6 \pm 3,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

## 2.1. Comparaison des protéomes globaux

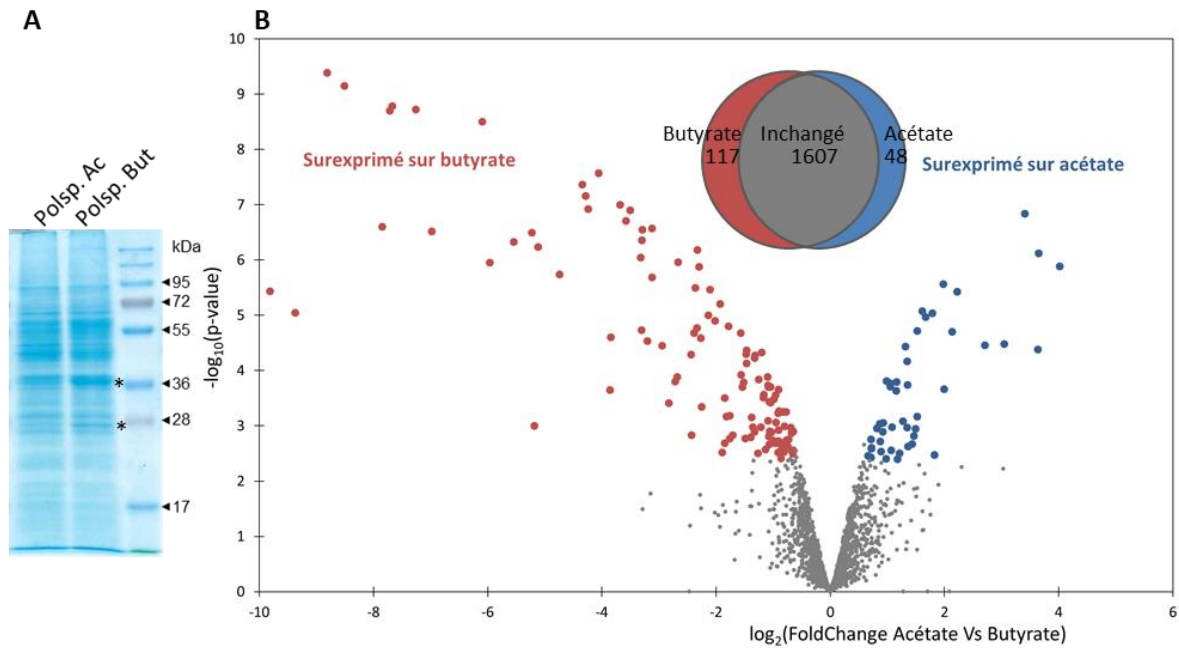
Afin d'élucider la voie d'assimilation du butyrate, la biomasse de *Polytomella sp.* a été échantillonnée pendant sa phase exponentielle de croissance sur l'acétate ou le butyrate comme indiqué par les flèches de la **Figure 33**. Les protéines cellulaires totales ont été préparées par la méthode de concentration sur un gel SDS-polyacrylamide en vue des analyses de type protéomiques. Les mêmes échantillons ont également été déposés sur un gel SDS-PAGE puis colorés avec du bleu de Coomassie G-250 après migration sur la totalité du support afin de comparer le profil global des protéines (**Figure 34A**).

La limite de détection du colorant étant de  $0,03 \mu\text{G}$  (Kang et al., 2002), et puisque  $30 \mu\text{g}$  ont été appliqués sur le gel, seules les protéines les plus abondantes sont en théorie visibles. Sur le gel, seules quelques 100 protéines ont été distinguées, parmi lesquelles seules 2 protéines de 28 kDa et 38 kDa sont clairement apparues sur-régulées sur le butyrate (**Figure 34A, astérisques**). Bien que leur identité n'ait pas été déterminée plus en avant, nous pouvons conclure que le butyrate provoque des changements métaboliques majeurs. Pour une analyse plus détaillée des bandes de protéines, un gel d'électrophorèse en 2D peut être utilisé. Nous n'avons pas choisi cette méthode car les méthodes actuelles d'analyse à large échelle, sans marquage de gel (« label-free ») sont plus puissantes et reproductibles (Burillo et al., 2017). Pour étudier en détail la réponse protéomique global au butyrate, les résultats de l'analyse à

grande échelle ont été représentées sur un graphique de type Vulcano, indiquant l'expression différentielle ( $\log_2(\text{FC})$ ) des protéines sur l'acétate contre le butyrate et leur significativité ( $p$ -value). Au total, 1772 protéines ont été retenues après analyses statistique, parmi lesquelles 117 protéines ont été significativement plus produites en présence de butyrate contre seulement 48 en présence de butyrate (**Figure 34B**). La présence du butyrate entraîne une plus grande expression de protéines comparée à celle de l'acétate.



**Figure 33 : Différences physiologiques de croissance de *Polytomella sp.* sur acétate et butyrate.** Courbes de croissance (g<sub>X</sub>.L<sup>-1</sup>) et consommation de substrat (g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup>) de *Polytomella sp.* sur acétate (A) ou butyrate (B). (C) Rendements  $Y_{XS}$  (g<sub>CX</sub>.g<sub>C</sub><sup>-1</sup>) et taux de croissance  $\mu$  (j<sup>-1</sup>) dérivés de ces courbes sur l'acétate (bleu) ou le butyrate (rouge). (D) Sucres et lipides (exprimés en concentrations brutes ; mg.L<sup>-1</sup> ou en pourcentage de la biomasse ; %g.g<sup>-1</sup>) obtenues en fin de culture sur acétate (bleu) ou butyrate (rouge) (D). Les rendements ont été calculés en estimant un contenu en carbone dans la biomasse de 50%. Les flèches indiquent à quel moment les échantillons de biomasse ont été prélevés pour les analyses protéomiques.



**Figure 34 : Comparaison des protéomes globaux de *Polytomella sp.* cultivée sur acétate ou butyrate.** (A) Séparation des protéines totales de *Polytomella sp.* (30  $\mu$ g) sur un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE, 12% acrylamide) et coloration au bleu de Coomassie. Les astérisques indiquent deux protéines nettement plus abondantes en croissance sur butyrate. (B) Graphique de type Volcano plot pour la comparaison des protéomes des cellules cultivées sur acétate ou butyrate. Le graphique représente l'expression différentielle (Fold Change Acétate/butyrate, FC) associée à sa significativité statistique ( $-\log_{10}(p_{\text{value}})$ ) pour toutes les protéines identifiées. La valeur seuil de p-value est de 0,00316. Les points rouges et verts représentent les protéines plus abondantes lors de la culture sur butyrate ou acétate respectivement (Benjamini-Hochberg FDR < 1%).

Le  $\log_2(\text{FC})$  entre l'acétate et le butyrate varie entre respectivement 4 et 10, correspondant à un FC de 16 et 0,001, les changements les plus importants ayant été déterminés lors de la croissance sur butyrate (tant en termes de FC que de nombre de protéines). Un FC de 0,001 indique une surexpression d'un facteur 1000 sur le butyrate en comparaison de l'acétate. Nous pouvons donc affirmer que le butyrate provoque bien une réponse significative chez *Polytomella sp.*, ce qui pourrait être une première indication quant à ses performances dans l'utilisation du butyrate. En revanche, malgré ce très haut FC, la différence de quantité de protéines produites (basé sur le gel de protéines) entre l'une ou l'autre condition n'est pas si

élevée. La forte réponse doit donc être limitée à quelques étapes clés, dans quelques compartiments cellulaires.

## 2.2. Réponses protéomiques par catégories métaboliques

Le programme Mercator a permis de classer les 1772 protéines en 27 catégories métaboliques. Ce programme a été originalement conçu pour les plantes, mais peut aussi être utilisé pour les microalgues. Le programme nous est également apparu adapté pour l'étude de *Polytomella sp.*, en raison de son évident lien avec les algues photosynthétiques (Fuentes-Ramírez et al., 2021; Round, 1980). La distribution des protéines totales par catégories métaboliques est présentée en **Figure 35**.

Les protéines impliquées dans la biosynthèse de protéines (transcription, traduction) représentent 12% du protéome total déterminé dans notre étude. En comparaison, ces protéines ne représentent que 2% du protéome total prédit à partir du génome de plantes (Schwacke et al., 2019). Le métabolisme hétérotrophe de *Polytomella sp.* semble donc davantage dirigé vers la synthèse de protéines. On observe que 35% des protéines totales ont été attribués aux catégories non assignées (annotées ou non). Ce résultat concorde avec les études protéomiques d'autres algues comme *C. reinhardtii* ou *Dunaliella bardawil* (Davidi et al., 2014; May et al., 2008).

Les valeurs d'iBAQ (intensity-Based Absolute Quantification) ont été calculées par catégories fonctionnelles pour le protéome de l'acétate ou du butyrate (**Figure 35A**). Ces données permettent en effet de donner une mesure quantitative de l'impact potentiel du nombre de protéines sur le métabolisme cellulaire. Nous précisons ici que la catégorie « non assignées-non annotées » représente seulement 2% des valeurs d'iBAQ, puisqu'elle ne concerne que les valeurs moyennes. Deux différences principales ressortent de ces graphiques. D'abord le nombre de protéines dans la catégorie « biosynthèse de protéines » est quantitativement plus élevée dans les cultures sur acétate que sur butyrate (11% contre 7% respectivement). Inversement, le nombre de protéines attribué à la catégorie « métabolisme des lipides » est plus élevé dans les cultures sur butyrate que sur acétate (10% contre 4% respectivement).





Ces tendances se sont confirmées en se concentrant seulement sur les protéines dont les niveaux varient significativement entre la culture sur acétate et butyrate (**Figure 35B**). Comparativement au butyrate, l'acétate a induit un plus grand nombre de protéines (indiquées entre parenthèse dans la suite du texte) impliquées dans l'homéostasie (6), la biosynthèse (13) et la translocation (2) de protéines, ainsi que le traitement de l'ARN. Tous ces processus biologiques peuvent être considérés comme nécessaires pour la maintenance cellulaire générale. D'un autre côté, comparativement à l'acétate, le butyrate a induit la production de plus de protéines impliquées dans des catégories bien spécifiques, telles que la respiration cellulaire (4), le métabolisme des polysaccharides (16), des acides aminés (10) et des lipides (24), l'homéostasie redox (9), le transport de soluté (10) et le métabolisme des coenzymes (5). En regardant les valeurs moyennes d'iBAQ pour les protéines ayant des FC significatifs, ces tendances se sont confirmées à divers degrés en fonction de la valeur de FC des protéines dans chaque catégorie. Globalement, une plus faible différence en iBAQ dans chaque groupe indique une valeur de FC plus faible, et vice versa. Les catégories ayant les plus grandes différences de valeur d'iBAQ ont été celles retrouvées dans la condition butyrate. Le métabolisme des lipides et des acides aminés a par exemple montré les plus hautes différences d'un facteur d'environ 8,3 et 5,2 respectivement en quantité de protéines. Les autres catégories comme la respiration cellulaire, le métabolisme des polysaccharides, l'homéostasie redox et le transport de soluté ont présenté de plus faibles différences, avec un facteur compris entre 1,3 et 1,7. L'organisation du cycle cellulaire n'est représentée que par une seule protéine mais avec une forte valeur de FC, se traduisant par une différence d'iBAQ d'un facteur 8,7. Pour l'acétate, hormis un facteur d'augmentation de 2,4 pour la catégorie biosynthèse de protéines, les valeurs d'iBAQ ont été assez faibles. En conclusion, ces données confirment que le butyrate induit un important changement métabolique ainsi qu'une réponse forte tant dans le nombre que la quantité de protéines.

### 2.3. Voies métaboliques impliquées dans la réponse au butyrate

Les réponses au butyrate les plus importantes de *Polytomella sp.* sont en lien avec le métabolisme des lipides, les plus hautes valeurs de FC étant obtenues pour les enzymes impliquées dans la dégradation des acides gras et les enzymes du cycle du glyoxylate. Ces enzymes sont principalement localisées dans le péroxysome : cet organelle joue un rôle clé dans

le métabolisme du butyrate, notamment dans la  $\beta$ -oxydation (Kong et al., 2017). Le butyrate étant lui-même un acide gras, l'augmentation du nombre de protéines dans cette catégorie était attendue et concorde avec ce qui a pu être décrit pour d'autres organismes (De Meur et al., 2020; De Preter et al., 2012). Les changements de niveaux d'expression des enzymes du cycle du glyoxylate coïncident avec le fait que l'oxydation du butyrate conduit à la formation de deux molécules d'acétyl-CoA, qui peuvent à leur tour alimenter directement ce cycle, situé dans le péroxysome chez *C. reinhardtii* (Lauersen et al., 2016).

Plusieurs enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydatif ont été sur-régulées. Ce résultat peut être une conséquence directe de la dégradation du butyrate, qui conduit à la formation d' $H_2O_2$  (Kato et al., 2021), mais aussi à la nature même du butyrate, plus réduite comparée à l'acétate (20 contre 8 électrons respectivement). Le métabolisme des acides aminés s'est centré principalement sur la formation et la dégradation subséquente des acides aminés branchés. Il s'est déroulé principalement dans le péroxysome, contrairement à ce qui peut être observé chez *C. sorokiniana* où il se déroule dans la mitochondrie (Liang et al., 2019). Nous soulignons ici que certaines enzymes sont en fait retrouvées dans la catégorie du métabolisme des lipides. Le métabolisme des polysaccharides, et notamment de la dégradation de l'amidon a été sur-régulée en présence de butyrate. Cela coïncide bien avec les données physiologiques décrites plus haut : les cellules cultivées en présence de butyrate présentent un contenu en sucres inférieur à celles cultivées sur acétate. Ce résultat pourrait indiquer une demande accrue en pyruvate. Enfin, les transporteurs de solutés induits par la présence de butyrate se situent principalement dans les péroxysomes et les mitochondries. Ce résultat est un indicateur de l'accroissement des échanges de métabolites entre les deux compartiments cellulaires en présence de butyrate.

#### 2.4. Reconstruction du réseau métabolique du butyrate

Une liste des protéines montrant les changements en FC les plus prononcés, rassemblées selon leur catégorie métabolique, est compilée dans le **tableau 18**. Cette liste contient les informations de la base de données ainsi que les paramètres protéomiques qui nous semblent les plus pertinents. L'identité de ces protéines a été obtenue par recherche homologue (BLAST). Leurs caractéristiques fonctionnelles et leur localisation intracellulaire (connue ou prédite) ont été utilisées pour reconstruire les voies métaboliques les plus importantes se déroulant dans *Polytomella sp.* et pour mettre en évidence les variations majeures entre les conditions de

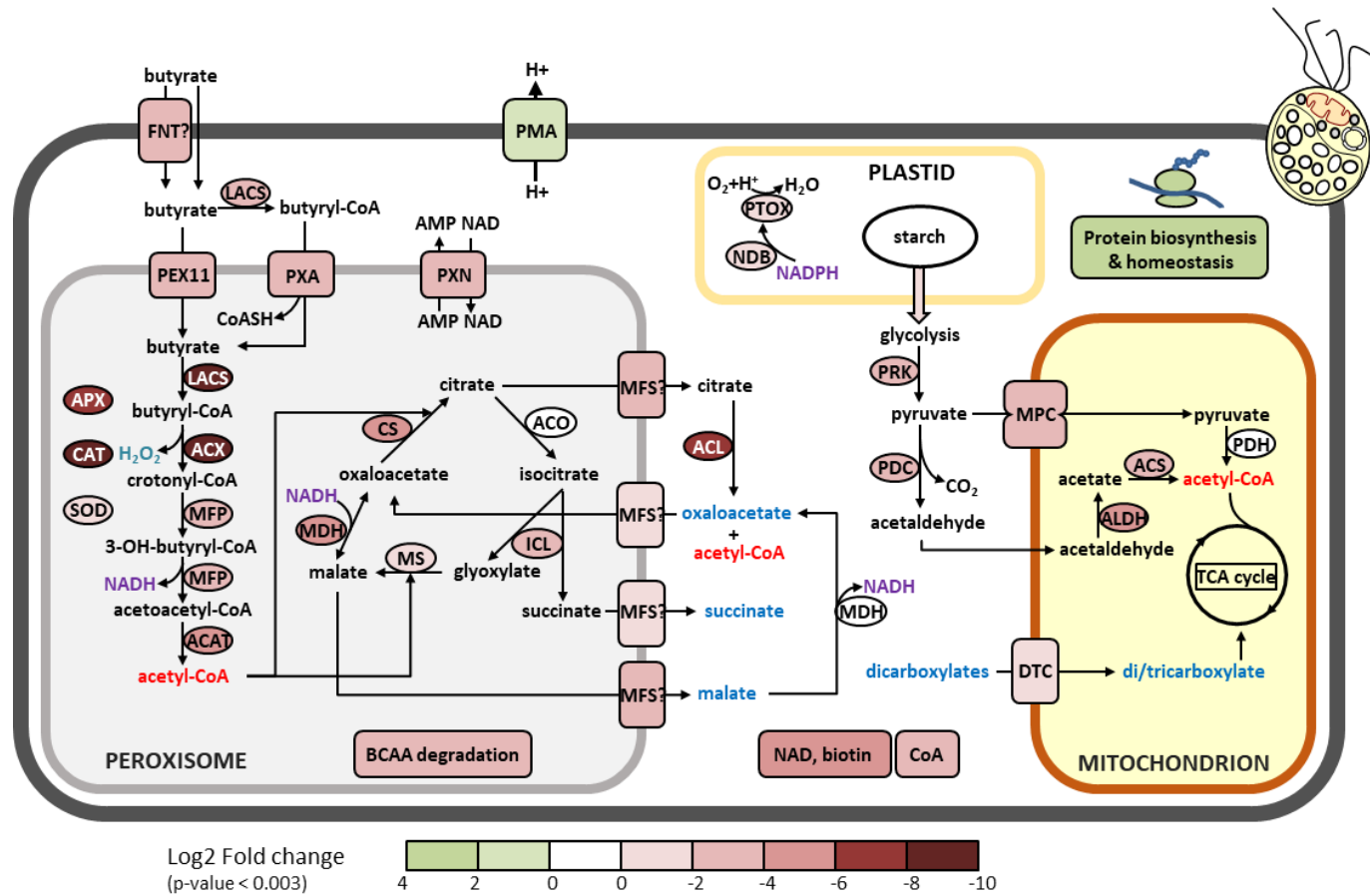
culture. Le réseau métabolique ainsi reconstruit est décrit en **Figure 36**. Ce réseau dépend non seulement de la présence des enzymes appropriées mais également de leur localisation intracellulaire. Les changements les plus importants impliqués dans l'assimilation du butyrate se situent dans le péroxysome. La localisation intracellulaire de certaines enzymes n'a en revanche pas pu être confirmée, en raison d'un manque de preuves expérimentales ou bien des résultats de prédiction ambigus ou erronés. Il n'existe à ce jour aucun logiciel de prédiction d'adressage conçu spécialement pour l'algue hétérotrophe *Polytomella sp.*

#### 2.4.1. Assimilation du butyrate dans le péroxysome

Après incorporation du butyrate par la cellule, celui-ci s'intègre dans la voie de dégradation des acides gras par  $\beta$ -oxydation dans le péroxysome. Les valeurs les plus extrêmes de FC ont en effet été obtenues pour deux enzymes impliquées dans cette voie, l'enzyme « long-chain » acyl-Coa synthétase (LACS) (FC 0,002) et acyl-CoA oxydase (ACX) (0,001) (**Figure 36**). Après importation du butyrate dans le péroxysome, celui-ci est activé en butyryl-CoA par LACS3. Une augmentation des niveaux d'expression de l'isoenzyme LACS2, possiblement localisée dans le cytoplasme, est également observées (FC de 0,16). Dans ce cas, le butyrate pourrait être importé dans le péroxysome directement sous forme de butyryl-CoA. Le butyryl-CoA est par la suite oxydé en crotonyl-CoA par l'enzyme ACX. Un des produits de la réaction par l'ACX est l' $H_2O_2$ . En fait, deux enzymes ACX différentes ont été identifiées, avec des valeurs de FC de 0,001 pour ACX2 et 0,021 pour ACX3. La localisation d'ACX2 a en fait été prédite dans les plastes, mais il est bien plus probable que cette enzyme soit localisée dans le péroxysome si l'on considère la présence importante de l'enzyme LACS dans ce compartiment. Comme nous l'avons évoqué plus haut, cela pourrait être dû à la mauvaise calibration des algorithmes de prédiction pour *Polytomella sp.* (Tardif et al., 2012). Le crotonyl-CoA est par la suite converti en 3-hydroxybutyryl-CoA puis en acétoacétyl-CoA respectivement par les activités enoyl-CoA hydratase et hydroxyacyl-CoA déshydrogénase de l'enzyme multifonctionnelle MFP (**Figure 36**). Les niveaux d'expression de cette enzyme augmentent d'un facteur 10 en présence de butyrate et semblent spécifiques à la condition butyrate puisque sa présence n'a pas été détectée dans la condition acétate. A noter que sans valeur d'iBAQ pour l'acétate, le facteur d'augmentation est une attribution plus ou moins arbitraire : le facteur d'augmentation pourrait être plus élevé, mais il n'est pas possible de savoir précisément de combien. La valeur absolue d'iBAQ déterminée sur butyrate n'est néanmoins pas très élevée,

il est donc probable que cette étape ne soit pas limitante. L'étape finale est catalysée par l'acétoacétyl-CoA thiolase (ACAT) (FC 0,004), qui convertit l'acétoacétyl-CoA en 2 molécules d'acétyl-CoA. La voie de  $\beta$ -oxydation empruntée par *Polytomella sp.* ressemble à celle décrite chez les organismes photosynthétiques, en particulier *C. reinhardtii* et *Arabidopsis*, où elle se déroule cependant à la fois dans la mitochondrie et le péroxysome (Kato et al., 2021; Kong et al., 2017; Li-Beisson et al., 2019; Pan et al., 2020). La présence de la MFP est typique de la  $\beta$ -oxydation péroxysomale des plantes, des champignons et des microalgues (Arent et al., 2010) tandis que les deux réactions se produisent via l'action de deux enzymes distinctes dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale du butyrate chez des cellules de colonocytes (De Preter et al., 2012). Il existe d'autres voies d'activation du butyrate en butyryl-CoA. Chez les mammifères et d'autres micro-organismes, la voie d'activation par la CoA peut se faire via la butyrate-CoA ligase/synthétase (EC 6.2.1.2) (De Preter et al., 2012). Pareillement, pour plusieurs bactéries, le butyryl-CoA est produit par action séquentielle de de la butyrate kinase (EC:2.7.2.7) et la phosphate butyryltransférase (EC 2.3.1.19) (Walter et al., 1993) ou bien via la butyryl-CoA:acetate CoA-transférase (EC 2.8.3.8) (Duncan et al., 2002).

Les produits finaux de l'oxydation du butyrate dans le péroxysomes sont l'acétyl-CoA, l' $H_2O_2$  et le NADH, mais incluent aussi des molécules contenant différentes longueurs de chaînes acyles, comme la biotine (Croft et al., 2006) ou l'auxine (Zolman et al., 2008).



**Figure 36 : Reconstruction métabolique de la voie d’assimilation du butyrate dans le péroxyssome et interactions proposées avec les autres compartiments.** Les éléments pris en compte sont le facteur de changement (Fold change, FC), la localisation des protéines dans les compartiments cellulaires prédits par le logiciel DeepLoc et les études précédentes. Le facteur de changement Bu/Ac (log<sub>2</sub> Fold change) est indiqué par le code couleur. Tous les di/tri acides carboxyliques pouvant être importés dans la mitochondrie sont indiqués en bleu. Les enzymes ne changeant pas ou non spécialement identifiées sont en blanc. Les codes des enzymes et d’autres informations sont fournis en **Tableau 18**.

**Tableau 18 : Liste des protéines présentant les changements les plus importants lors de la culture sur butyrate.** Les protéines sont rassemblées par catégories métaboliques. Mt : mitochondrie ; Pl : plastide ; Px : péroxysome ; Cy : Cytoplasme ; Lys : ; Nc : ; Mb : ; Er : ; Cover. : coverage ;FC : Fold change ; iBAQ Ac ou Bu: valeurs des iBAQ pour les cultures sur acétate ou butyrate respectivement. (Px) indique que la localisation a été vérifiée en se basant sur (Gonzales et al., 2011).

Catégorie métabolique	Protein ID	Code	Accésion	KEGG code	EC code	DeepLoc	Cover. (%)	FC	iBAQ Ac	iBAQ But
Photosynthesis	plastid terminal oxidase	PTOX	utr_g8363.t1	K17893	1.10.3.11	Mt	26,25	0,434	754575	1317105
Cellular respiration	pyruvate kinase	PRK	utr_g7045.t1	K00873	2.7.1.40	Pl	7,73	0,130	38836	224964
	NAD(P)H dehydrogenase	NDB3	g5286.t1	K17871	1.6.5.9	Mt	12,47	0,151	47129	216598
Carbohydrate metabolism	pyruvate decarboxylase	PDC	utr_g3758.t1	K01568	4.1.1.1	Cy	17,5	0,141	47694	228061
	aldehyde dehydrogenase (NAD+)	ALDH	utr_g438.t1	K00128	1.2.1.3	Mt	52,71	0,027	124465	1753941
	phosphofructokinase	PFKA	utr_g2860.t1	K00850	2.7.1.11	Pl	11,13	0,269	55697	140239
	alpha amylase	AMY	utr_g8059.t1	K01176	3.2.1.1	Cy	48,13	0,358	2850062	5969861
	plastidial glucanotransferase	MALQ	utr_g8936.t1	K00705	2.4.1.25	Cy	4,61	0,398	33530	61175
	UDP-sugar pyrophosphorylase	USP	utr_g1491.t1	K12447	2.7.7.64	Mt	14,2	0,415	46157	88200
Amino acid metabolism	branched-chain aminotransferase	BCAT	utr_g2499.t1	K00826	2.6.1.42	Cy	40,06	0,276	671265	1669286
	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase/enoyl-CoA hydratase isomerase family	HIBCH	g5770.t1	K05605	3.1.2.4	Px	44,83	0,070	453885	4455272
	acetyl-CoA C-acyltransferase	ACAT	VANLIS_33	K00626	2.3.1.9	Px	64,82	0,484	5147107	8127175
	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	MMSA	utr_g5322.t1	K00140	1.2.1.27	Mt	59,23	0,005	703208	10831586
Lipid metabolism	peroxisomal long-chain acyl-CoA synthetase	LACS3	g1889.t1	K00666	6.2.1.-	Cy(Px)	47,59	0,002	20968	23251928
	long-chain acyl-CoA synthetase	LACS2	utr_g2481.t1	K01897	6.2.1.3	Pl	2,77	0,157	0	31183
	acyl CoA oxidase	ACX3	utr_g4580.t1	K00232	1.3.3.6	Px	59,56	0,021	184264	6218796
	acyl CoA oxidase	ACX2	utr_g1391.t1	K00232	1.3.3.6	Pl	57,64	0,001	72833	34496189
	enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	MFP	utr_g788.t1	K10527	4.2.1.17, 1.1.1.35, 1.1.1.211	Px	70,68	0,100	0	50752
	acetyl-CoA acyltransferase/3-ketoacyl- thiolase	ACAT	utr_g2466.t1	K07513	2.3.1.16	Px	64,82	0,004	74061	12153054

Chapitre 5 : Elucidation du métabolisme du butyrate chez *Polytomella sp.*

	monofunctional hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	ACAD	utr_g5712.t1	K00249	1.3.8.7	Px	16,39	0,191	44402	170213
	3-hydroxybutyrate dehydrogenase	BDH	utr_g6778.t1	K00019	1.1.1.30	Px	78,28	0,002	398556	150126689
	citrate synthase	CS	utr_g7247.t1	K01647	2.3.3.1	Px	70,47	0,029	607037	15173928
	isocitrate lyase	ICL	utr_g3623.t1	K01637	4.1.3.1	Px	84,13	0,227	1647631	54179935
	malate synthase	MS2	utr_g1630.t1	K01638	2.3.3.9	Cy(Px)	67,71	0,399	2268881	42797266
	malate synthase	MS1	utr_g2347.t1	K01638	2.3.3.9	Cy	56,94	0,468	594743	952045
	peroxisomal NAD-dependent malate dehydrogenase	MDH1	utr_g3202.t1	K00026	1.1.1.37	Mt	63,13	0,027	534983	14569859
	ATP-dependent citrate lyase heterodimer.alpha chain	ACLY	utr_g2436.t1	K01648	2.3.3.8	Cy	61,15	0,005	47515	7501405
	ATP-dependent citrate lyase heterodimer.beta chain	ACLY	utr_g2726.t1	K01648	2.3.3.8	Cy	41,31	0,008	53911	4740660
	acetyl-CoA synthetase	ACSS	utr_g6283.t1	K01895	6.2.1.1	Cy	57,79	0,108	101643	658017
	acetyl-CoA synthetase	ACS3	utr_g5926.t1	K01895	6.2.1.1	Cy	67,52	0,078	456256	4440388
Coenzyme metabolism	pantoate:beta-alanine ligase	PANC	utr_g3036.t1	K01918	6.3.2.1	Cy	46,73	0,207	230576	818505
	7-keto-8-aminopelargonic acid synthase	KAPAS	utr_g1050.t1	K00652	2.3.1.47	Px	40,3	0,016	29348	1679217
Redox homeostasis	catalase	CAT	utr_g8710.t1	K03781	1.11.1.6	Px	64,78	0,003	7616	7578832
	ascorbate peroxidase	APX	utr_g2687.t1	K00428	1.11.1.5	Mt	68,36	0,015	164455	8543894
	typical 2-Cys peroxiredoxin (2-CysPrx)	PRX	utr_g3953.t1	K03386	1.11.1.24	Cy	30,2	0,049	11210	551561
	Fe-Mn superoxide dismutase	SOD	utr_g3322.t1	K04564	1.15.1.1	Cy	58,26	0,261	1338723	3913782
	Fe-Mn superoxide dismutase	SOD	utr_g7353.t1	K04564	1.15.1.1	Pl	16,62	0,338	185697	421492
Cell cycle organisation	peroxisomal fission factor	PEX11	utr_g5823.t1	K13352	-	Px	45,68	0,088	1271276	11022618
RNA biosynthesis	transcription elongation factor	SPT5	utr_g7362.t1	K15172	-	Nc	4,53	2,751	39960	6978
	mRNA-binding regulatory factor (RBP45/47)	RBP	utr_g1967.t1	K13201	-	Cy	10,09	2,407	133790	31039
	trimethylguanosine synthase	TGS	utr_g6581.t1	K14292	2.1.1.-	Nc	3,97	3,049	23352	0
Protein biosynthesis	Tr-type G domain-containing GTPase/elongation factor Tu assembly factor Nsa1/WDR74	TYPA	utr_g3770.t1	K06207	-	Pl	6,01	8,245	50030	1469
	GTPase assembly factor	NSA1	utr_g7089.t1	K14841	-	Nc	4,69	3,966	44966	0
	LSU proteome.component RPL38	LSG1	utr_g3801.t1	K14539	3.6.1.-	Cy	10,3	2,564	98754	30489
	pre-rRNA processing factor type Fcf2	RPL38	utr_g8236.t1	K02923	-	Cy	59,42	2,529	1529364	4717134
	pre-rRNA processing factor type Fcf2	FCF2	utr_g3144.t1	-	-	Nc	5,76	2,230	51251	0



Chapitre 5 : Elucidation du métabolisme du butyrate chez *Polytomella sp.*

Protein modification	protein kinase (MAP3K-RAF)/Dual specificity kinase splA isoform B	SPLA	utr_g6123.t1	K17535	2.7.11.1	Cy	2,21	4,663	37849	0
	mitochondrial organisation/maturation factor (CHCH domain)	CHCH	utr_g75.t1	-	-	Mt	16,96	16,13	872546	0
Protein homeostasis	plastidial small heat shock proteins	HSP20	g5306.t1	K13993	-	Mt	33,51	12,51	337931	0
	plastidial small heat shock proteins	HSP20	utr_g2186.t1	K13993	-	Mt	20,21	10,58	261427	0
	cytosolic Hsp70 chaperone system.chaperone (Hsp70)	HSP70	utr_g6948.t1	K03283	-	Cy	31,91	12,42	248468	11773
	plastidial small heat shock proteins	HSP20	utr_g2897.t1	K13993	-	Mt	26,06	6,530	214354	0
Solute transport	P3A-type proton-translocating ATPase.plasma membrane	PMA	utr_g4794.t1	K01535	7.1.2.1	Lys/Vac	1,69	3,934	19691	0
	MPC pyruvate carrier complex.component MPC1	MPC1	utr_g3777.t1	K22138	-	Mt	69,94	0,084	837218	7619610
	MPC pyruvate carrier complex.component MPC2	MPC2	utr_g6536.t1	K22139	-	Mt	63,64	0,102	537008	3960556
	ABC1 family.subfamily ABCD transporter	PXA	utr_g4304.t1	K05677	-	Mt	12,42	0,101	38981	274291
	mitochondrial carrier protein (eg 2-oxodicarboxylate), TC 2.A.29 family	MTCC	utr_g1761.t1	K15110	-	Mt	26,01	0,101	109369	822713
	peroxisomal nicotinamide adenine dinucleotide carrier	PXN	utr_g5259.t1	K13354	-	Px	12,44	0,155	25187	116093
	Formate/nitrite transporter	FNT	utr_g7576.t1	K21993	-	Mb	8,63	0,209	0	101175
	Major Facilitator Superfamily general substrate transporter	MFS	utr_g3064.t1	K02532	-	ER	19,46	0,199	367753	1401025
	peroxisomal adenine nucleotide transporter	PXN	utr_g4054.t1	K13354	-	Px	48,7	0,231	1311941	4262333
	MFS transporter (double), DHA1 family, multidrug resistance protein	MFS	utr_g3468.t1	K08157	-	Mb	5,93	0,555	977976	1348487
mitochondrial dicarboxylate/tricarboxylate transporter	DTC	g4183.t1	K15104	-	Mt	74,58	0,587	2994443	38795847	

#### 2.4.2. Cycle du glyoxylate et navettes citrate/malate

L'activité du cycle de glyoxylate approvisionne le stock des intermédiaires du cycle de Krebs. Ce cycle a été identifié dans le péroxysome chez *C. reinhardtii* cultivée sur de l'acétate (Lauersen et al., 2016). Les enzymes clefs de ce cycle, la malate synthase (MS, FC 0,4) et l'isocitrate lyase (ICL, FC 0,23), ainsi que la citrate synthase (CS, FC 0,03) et la malate déshydrogénase (MDH, FC 0,03) sont induites par le butyrate (**Figure 36**). L'aconitase (ACO) forme une partie du cycle et trois isoformes ont été détectées, cependant aucune n'a été significativement induite par le butyrate. La MS, la CS et l'ICL sont bien prédites comme étant localisées dans le péroxysome, ce qui n'est pas le cas de la MDH ou de l'ACO. Il est cependant probable que ces deux enzymes soient également péroxysomales. En effet, les résultats de BLAST avec la MDH indiquent « glyoxysomal-type MDH », tandis que pour l'ACO, 3 des 4 conservés du signal PTS2 d'adressage à la matrice péroxysomale sont présents (RV-X5-RA au lieu de RV-X5-H/QA) (Gonzalez et al., 2011). La localisation cytoplasmique de enzymes MDH et ACO ne serait cependant pas sans précédent puisque c'est ce que l'on retrouve chez les levures sans que cela n'impacte la fonction du cycle (Rottensteiner and Theodoulou, 2006). Une cause probable de l'augmentation de la MDH et de la CS en présence de butyrate tient dans la production de pouvoir réducteur sous forme de NADH par la MFP, qui peut être utilisé pour produire du malate à partir de l'oxaloacétate par la MDH puis transportés en dehors du péroxysome (Kong et al., 2018). Ceci pourrait également expliquer pourquoi les enzymes ICL et MS du cycle du glyoxylate sont moins induites que la MDH, puisque cette dernière est favorisée pour la production de malate et l'oxydation du NADH. L'oxaloacétate est également converti en citrate via la CS. Son transport hors du péroxysome est également probable si on considère la haute induction de l'enzyme ATP : citrate lyase (ACLY, FC 0,005) qui produit de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate dans le cytosol. L'oxaloacétate résultant de l'activité de l'ACLY et de la MDH du cytosol peut par ailleurs être de nouveau transporté pour alimenter les stocks du péroxysome. L'acétyl-CoA issue de l'activité ACLY peut également être utilisé pour la synthèse d'acides gras ou importés dans d'autres compartiments.

#### 2.4.3. Transporteurs et échanges de métabolites

La présence de butyrate a fortement induit la production de 10 protéines de transports liées à la membrane, avec des valeurs de FC significatives (**Tableau 18**). Parmi ces 10 protéines,

cinq transporteurs typiquement péroxysomaux ont été identifiés. PXA1 et PXA2 montrent clairement des similarités avec les transporteurs ABC péroxysomaux des levures, et qui sont impliqués dans l'import des acides gras à longues chaînes activés depuis le cytosol jusqu'au péroxysome (Hettema et al., 1996). Le butyryl-CoA peut donc être importé depuis le cytosol, ce qui fournit une voie importante pour le CoA libre et qui contrôle l'homéostasie du CoA péroxysomal (van Roermund et al. 2020). Un troisième transporteur appartient à la famille PEX11 (FC 0,09, catégorie cycle cellulaire du **Tableau 18**). Cette protéine membranaire promeut la division des péroxysomes chez les eucaryotes et est cruciale pour la  $\beta$ -oxydation des acides gras de longueur moyenne (van Roermund et al., 2000). Deux protéines membranaires supplémentaires montrent une forte homologie de séquence avec le transporteur PXN (FC 0,155 et 0,231). Ce transporteur permet l'importation de  $\text{NAD}^+$  dans les péroxysomes en échange d'AMP (van Roermund et al., 2016). Le butyrate semble donc augmenter le besoin en cofacteurs dans le péroxysome et pourrait stimuler la biogenèse de cet organe.

Trois protéines ont été identifiées comme des transporteurs mitochondriaux, ce qui indique une certaine implication du métabolisme mitochondrial en présence de butyrate. Deux protéines sont des sous-unités du transporteur de pyruvate mitochondrial (MPC1 et 2, FC 0,08 et 0,1). Elles constituent le seul point d'entrée dans la mitochondrie du pyruvate provenant de la glycolyse ou du malate. La sur-régulation de ce transporteur est fondamentalement importante lors de l'établissement du réseau métabolique d'une cellule (Bricker et al., 2012). Un autre transporteur est homologue au transporteur mitochondrial dicarboxylate/tricarboxylate DTC (FC 0,6) de *A. thaliana* (Millar and Heazlewood, 2003). Les DTC transportent les acides dicarboxyliques (malate, oxaloacétate) ou tricarboxyliques (citrate, isocitrate) dans la matrice mitochondriale. Etant donné que les niveaux d'expression des constituants de la chaîne respiratoire mitochondriale n'augmentent pas en présence de butyrate, nous pouvons supposer que l'augmentation de l'import du pyruvate et des dicarboxylates est destinée à d'autres fonctions métaboliques, comme la synthèse d'acides aminés.

Par ailleurs, deux transporteurs généraux de substrats (MFS, FC 0,2 et 0,56) ont été identifiés. Les transporteurs MFS (Major Facilitator Superfamily, ou superfamille majeure de facilitateurs) ne peuvent transporter que de petits solutés en réponse à des gradients d'ions et peuvent se situer n'importe où dans la cellule. Leur fonction spécifique n'a pas pu être déduite et leur emplacement proposé dans la membrane péroxysomale, pour le transport de carboxylates, n'est que spéculative. Les transporteurs monocarboxylate proton MCT, qui sont

connus pour transporter l'acétate et le butyrate en dehors de la membrane plasmique, font partie de la famille des MFS (Casal and Leão, 1995), mais l'homologie entre les deux protéines MFS et les MCT est faible et ne représente que peu probablement le point d'entrée du butyrate. Cependant, un transporteur « formate-nitrite » (FNT, FC 0,21) a été induit par le butyrate. Ce transporteur partage une homologie significative avec le FNT des levures. Les transporteurs FNT sont perméables à de petits anions monovalents et ne sont pas strictement sélectifs. Selon les organismes, ils laissent passer le formate mais aussi de plus gros acides organiques tels que le lactate ou l'acétate (Lu et al., 2012). Il est ainsi possible que le FNT soit en fait responsable du transport du butyrate à travers la membrane plasmique chez *Polytomella sp.* Des analyses biochimiques et génétiques complémentaires sont nécessaires pour tester cette hypothèse, eut égard à la très faible disponibilité de données quant au transport des monocarboxylate chez les microalgues (Durante et al., 2019).

De façon intéressante, les niveaux d'expression d'une protéine de transport sont réduits en présence de butyrate. Il s'agit d'une protéine membrane  $H^+$ -ATPase de type P (PMA, FC 1,7), présentes chez les plantes, les levures et *C. reinhardtii*. Ces transporteurs membranaires participent au maintien d'un potentiel électrochimique de membrane ; par cycle catalytique, les PMAs expulsent un proton par ATP hydrolysé. Ces transporteurs expulsent des protons intracellulaires (Morth et al., 2011). Si l'on considère qu'une partie de l'acétate et du butyrate sont importés dans la cellule sous forme non dissociée, leur subséquente dissociation dans le cytosol entraîne le relargage de protons. Il semble que le butyrate nécessite une expulsion de  $H^+$  diminuée en comparaison de l'acétate, puisqu'il ne contient que la moitié de groupes carboxyliques (par gramme de carbone).

#### 2.4.4. Défenses antioxydantes

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des signaux cellulaires importants. Les conditions de stress peuvent entraîner la hausse des concentrations en ROS et causer d'importants dommages oxydatifs (Rezayian et al., 2019).

La réponse métabolique au butyrate a inclus un total de 10 protéines prédites pour jouer un rôle dans la défense au stress oxydatif. L'une d'entre elle est la 2-Cys-peroxyredoxin (PRX, FC 0,05), qui détoxifie les hydroperoxydes organiques (R-O-OH) formés à partir d' $H_2O_2$  et d'une molécule organique. Les PRXs constituent une défense au stress oxydatif et participent à la signalisation redox (Liebthal et al., 2018). Une très forte induction de la catalase péroxydomale

(CAT, FC 0,003) a été observée et est liée directement avec la production de  $H_2O_2$  par l'ACX pendant la  $\beta$ -oxydation. La CAT a une activité peroxydase qui permet le clivage de l' $H_2O_2$  sous forme d'eau et d' $O_2$ . L'ascorbate peroxydase (APX, FC 0,015) est également fortement induite par le butyrate. Cette enzyme participe aussi aux fonctions de détoxification de l' $H_2O_2$ , et est donc probablement localisée dans le peroxydosome bien qu'aucun signal d'adressage au peroxydosome n'ait été pu être identifié par les logiciels ou manuellement. D'autres protéines potentiellement impliquées dans des processus de détoxification, comme la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathione réductase (DHAR) sont également induites, bien que plus faiblement. Une autre enzyme intéressante qui a été identifiée est l'oxydase terminale chloroplastique (PTOX, FC 0,43). Chez les organismes photosynthétiques cette enzyme fonctionne dans l'homéostasie redox du chloroplaste, en réoxydant les plastoquinones réduites par l'activité du PSII en transférant les électrons en excès vers l'oxygène (Krieger-Liszkay and Feilke, 2016). Nous proposons ici que les électrons du NADPH pourraient être transférés à la PTOX via la NAD(P)H déshydrogénase (NDB3, FC 0,15) et un analogue de quinone pour compléter les défenses antioxydantes. Nous pouvons supposer que les algues vertes ne se développent pas bien sur le butyrate en raison de l'induction de la CAT et de l'APX, qui affecte négativement la photosynthèse en raison d'un niveau plus bas en  $H_2O_2$ . *Polytomella sp.* est entièrement non-photosynthétique et serait donc moins affecté. Ceci n'explique cependant pas la plus faible consommation du butyrate dans le noir complet (*i.e.* sans activité photosynthétique) des souches vertes.

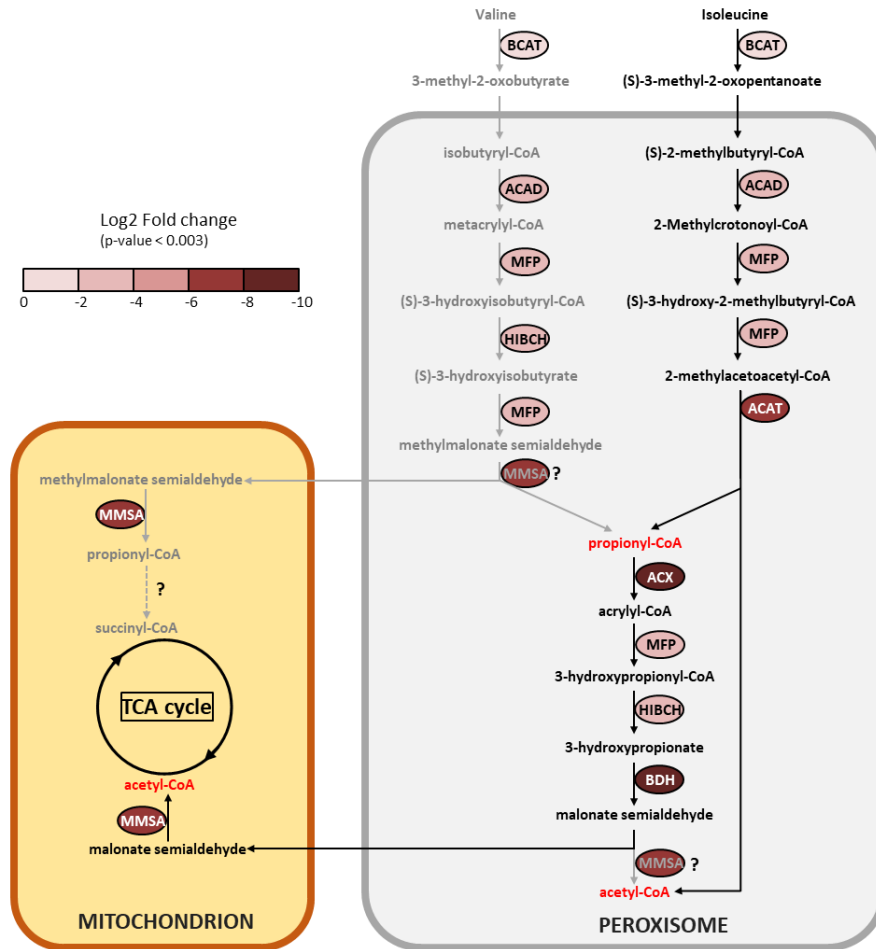
En conclusion, il est clair que le butyrate augmente le stress oxydatif des cellules et promeut de très fortes réponses antioxydantes chez *Polytomella sp.* Ces réponses pourraient être à la base de sa capacité à consommer le butyrate et à le tolérer à de fortes concentrations.

#### 2.4.5. Dégradation des acides aminés branchés

Un certain nombre de protéines induites sur le butyrate sont présentes à la fois dans les catégories métaboliques des lipides et des acides aminés (**Tableau 18**). Ces protéines rappellent les voies de dégradation des acides aminés branchés (AAB), notamment la valine et l'isoleucine en propionyl-CoA et finalement acétyl-CoA. Ces voies sont décrites pour la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* (Pan et al., 2017). La première enzyme de cette voie est l'aminotransférase des chaînes branchées (BCAT, FC 0,28), située probablement dans le cytosol. L'enzyme suivante n'a pas été clairement identifiée chez *Polytomella sp.* Les étapes

successives prennent place dans le peroxyosome et conduisent à la production de propionyl-CoA et ensuite d'acétyl-CoA dans le cas de la dégradation de la valine, ou à la production simultanée de propionyl-CoA et d'acétyl-CoA dans le cas de l'isoleucine. Deux problèmes restent à résoudre pour confirmer cette voie chez *Polytomella sp.* : i) l'enzyme centrale méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase (MMSA, FC 0,005), très fortement induite, peut être localisée dans le peroxyosome. Dans ce cas, la dégradation de la valine en acétyl-CoA peut s'effectuer. Cependant, chez *C. reinhardtii*, cette enzyme se situe dans la mitochondrie (UniProt acc. A8J3L9). Dans ce cas, le substrat pour la MMSA, le méthylmalonate semialdéhyde (MMS), devrait être transporté dans la mitochondrie. ii) la MMS est convertie en propionyl-CoA dans la mitochondrie mais ne peut pas être par la suite dégradée en succinyl-CoA et entrer dans le cycle de Krebs puisque les enzymes nécessaires ne semblent pas être présentes chez *Polytomella*, comme c'est également le cas chez *P. tricornutum* (Pan et al., 2017). La dégradation de l'isoleucine ne requiert pas la présence de MMSA dans le peroxyosome jusqu'au dernier intermédiaire avant l'acétyl-CoA, le malonate semialdéhyde, qui peut être exporté vers la mitochondrie et converti par la MMSA en acétyl-CoA. D'un autre côté, la voie de dégradation des AAB peut être fluide si la MMSA est à la fois exprimée dans le peroxyosome et la mitochondrie, ce qui est un phénomène connu (Petrova et al., 2004).

Chez la bactérie pourpre non sulfureuse *Rhodospirillum rubrum* cultivée sur butyrate, la voie de dégradation de la valine et de l'isoleucine a également été identifiée comme une voie d'assimilation car la bactérie ne possède pas de cycle du glyoxylate (De Meur et al., 2020). A noter que *R. rubrum* se développe 3 fois plus rapidement si du bicarbonate est ajouté au milieu de culture. Le bicarbonate pourrait être utilisé comme puits d'électrons et ainsi aider les défenses antioxydatives. Puisque *Polytomella sp.* possède bien un cycle du glyoxylate actif, l'utilité de cette voie de dégradation des AAB n'est pas évidente, à moins qu'une voie de synthèse de propionyl-CoA, utilisée pour la synthèse de coenzyme A, soit nécessaire.



**Figure 37 : Reconstruction métabolique de la voie de dégradation des acides aminés branchés dans le peroxyosome et propositions d'interactions avec la mitochondrie.** Cette voie dépend probablement de la localisation cellulaire de la (méthyle)malonate semialdéhyde déshydrogénase (MMSA). En fonction de la longueur de chaîne carbonée du substrat, soit le propionyl-CoA (dégradation de la valine) ou le propionyl- et l'acétyl-CoA (dégradation de l'isoleucine) sont produits. La MMSA est normalement présente dans la mitochondrie mais pas dans le peroxyosome. Dans ce cas, la voie isoleucine est probablement active puisqu'elle ne nécessite pas l'activité de la MMSA jusqu'à ce que le malonate semialdéhyde soit produit, ce dernier pouvant être exporté dans la mitochondrie pour produire l'acétyl-CoA via la MMSA. L'export de méthylmalonate semialdéhyde depuis la dégradation de la valine dans la mitochondrie devrait conduire à la production de propionyl-CoA, mais sa reconversion en succinyl-CoA n'est probablement pas possible et ne peut pas être déduite des données. Le facteur de changement Bu/Ac (log2 Fold change) est indiqué par le code couleur. Les codes des enzymes et d'autres informations sont fournies dans le **tableau 18**.

### 2.4.1. Rôle du pyruvate

Le pyruvate est au carrefour de plusieurs voies métaboliques et sa présence est primordiale quelle que soit la cellule ou le compartiment cellulaire (Shtaida et al., 2015). Plusieurs indicateurs montrent que le métabolisme du butyrate passe également par le pyruvate. D'abord, la plupart des enzymes impliquées dans la glycolyse ont été sur-régulées, comme la pyruvate kinase (PRK, FC 0,13), qui indique une augmentation de la dégradation de l'amidon et du glucose résultant en une augmentation de production de pyruvate. Cette observation coïncide avec les résultats physiologiques (**Figure 33D**). Par ailleurs, un plus haut transport du pyruvate vers la mitochondrie est suggéré par l'augmentation des niveaux de des transporteurs « mitochondrial pyruvate carrier » (MPC). De façon intéressante aucune augmentation des niveaux des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs ou de l'OXPPOS n'a été observée. Il est probable que le pyruvate importé dans la mitochondrie soit utilisé pour la production d'acides aminés comme l'alanine. Par ailleurs, la pyruvate décarboxylase (PDC, FC 0,14) a également été induite, conduisant à une augmentation de la production d'acétaldéhyde dans le cytosol. Cette molécule peut diffuser dans la mitochondrie et être convertie en acétate via la NAD<sup>+</sup> aldéhyde déshydrogénase (ALDH, FC 0,03) puis en acétyl-CoA via l'acétyl-CoA synthase (ACS, FC 0,01). Chez la levure et les plantes, la voie métabolique PDC-ALDH-ACS, aussi appelée « PDH-bypass » permet de générer de l'acétyl-CoA dans le cytosol ou la mitochondrie (Remize et al., 2000).

## 3. Conclusion

L'objectif de ce chapitre a été d'élucider les voies métaboliques chez *Polytomella sp.* et de proposer un modèle quant à sa capacité accrue à tolérer et à assimiler le butyrate. Bien qu'aucun transporteur spécifique du butyrate n'ait été identifié pour expliquer le transport du butyrate, nous proposons le FNT comme candidat pour remplir cette fonction. Les données de protéomique comparative ont montré que le butyrate est assimilé via une voie de  $\beta$ -oxydation dans le péroxysome, ce qui résulte en la production d'acétyl-CoA et en di/tricarboxylate utilisables par la cellule via le cycle du glyoxylate. Plusieurs transporteurs ont été induits pour faciliter les échanges de métabolites entre les compartiments. Le butyrate a entraîné une réponse au stress oxydatif majeure, causé par la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de NADH pendant la  $\beta$ -oxydation. Un plus grand roulement des AAB a été déterminé, conduisant à la production de



## Chapitre 5 : Elucidation du métabolisme du butyrate chez *Polytomella sp.*

propionyl-CoA et d'acétyl-CoA, qui peuvent, conjointement avec le pyruvate produit par la glycolyse, servir à la production d'acides aminés ou de cofacteurs. La présence de butyrate conduit à une réduction de l'accumulation de sucres et de lipides, mais augmente la quantité de protéines produites pour répondre à ces étapes spécifiques de conversions enzymatiques.

.

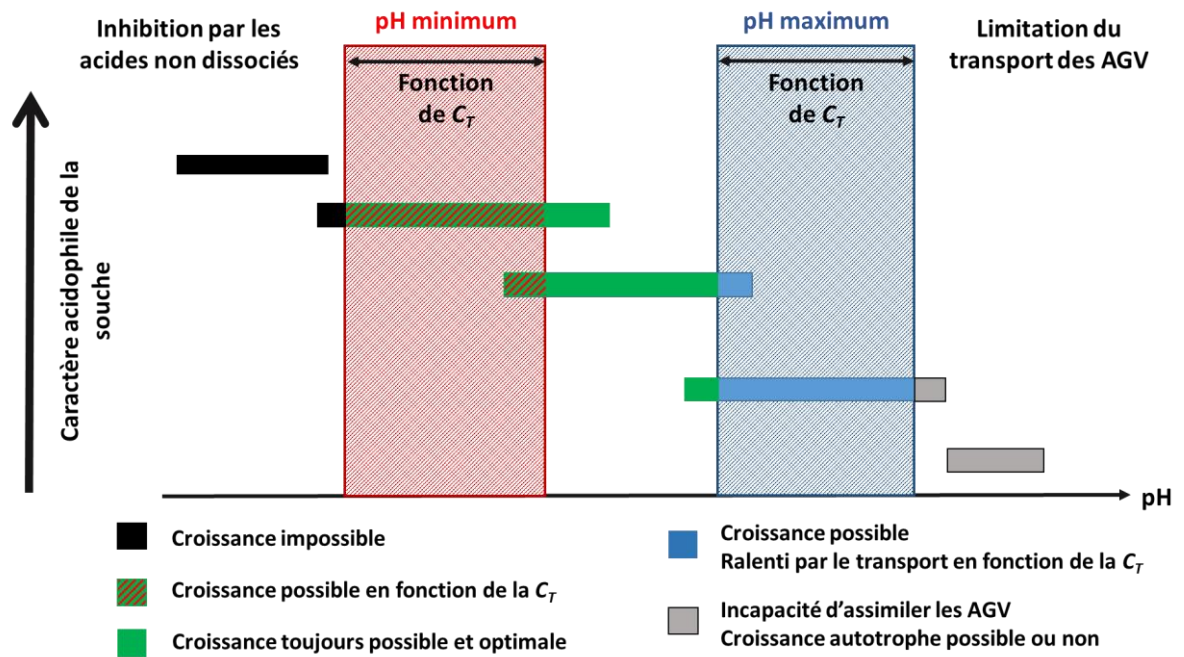
# Chapitre 6

## Discussions et perspectives

### 1. Toxicité des acides non dissociés : vers une compréhension des mécanismes inhibiteurs de la croissance

L'un des premiers objectifs de cette thèse a été de comprendre les causes d'inhibition de la croissance des microalgues lorsque celles-ci sont cultivées en présence d'AGV comme l'acétate ou le butyrate. En résumé, nous avons montré que l'inhibition de la croissance était fortement fonction du pH du milieu, de la concentration totale en acide ( $C_T$ ) mais aussi de la souche considérée (**Figure 38**). Ces conclusions ont au moins deux implications pratiques pour le développement d'un procédé couplé.

D'une part, en se basant sur les causes d'inhibition chez d'autres organismes et sur les données de littérature, nous avons pu conclure, dans le **chapitre 3**, que cette inhibition était due uniquement à une concentration en forme non dissociées des acides (RH) supérieure au seuil de tolérance des microalgues. Elever le pH de culture au-dessus d'une valeur minimum, en fonction de la  $C_T$  permet donc d'éviter l'inhibition complète de la croissance. En fonction des caractéristiques particulières des souches étudiées, comme leur caractère acidophile ou bien leur seuil de tolérance, certains pH minima seront cependant incompatibles avec la gamme de pH théoriquement nécessaire pour la croissance de l'algue. Cet argument est illustré par les mesures de concentrations seuils de *E. gracilis* et *O. danica* du **chapitre 4** : si ces souches peuvent consommer le butyrate, leur gamme de pH de croissance optimale, rapportée dans la littérature, est incompatible avec leur seuil de tolérance à cet acide. L'étude du seuil de tolérance d'une souche et de sa gamme de pH de croissance optimale nous semble donc être un préalable essentiel avant l'évaluation du potentiel de croissance d'une quelconque autre souche.



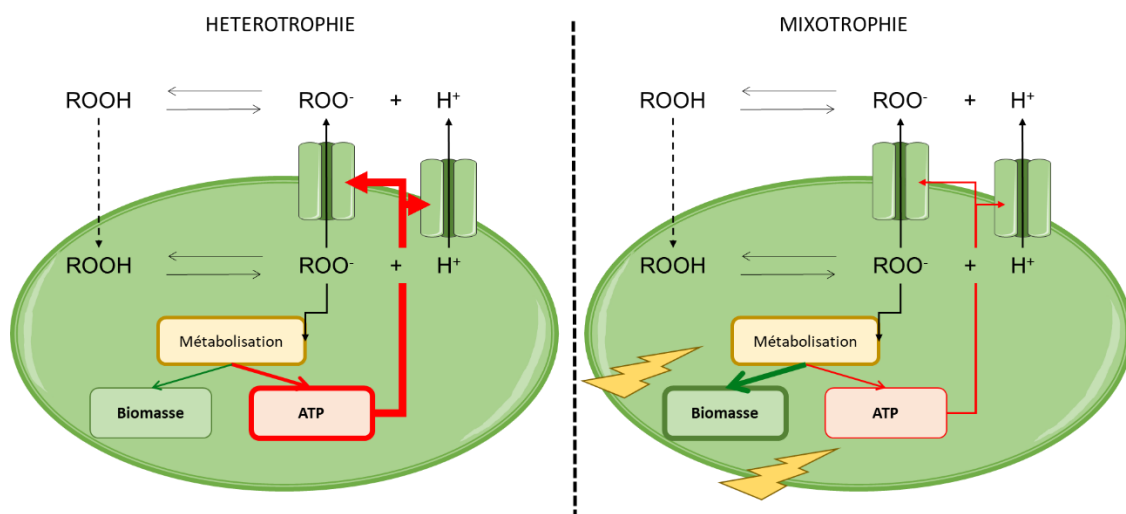
**Figure 38 : Inhibition et limitation de la croissance : effets combinés de la  $C_T$ , du pH et de la souche étudiée.**

D'autre part, les résultats du **chapitre 3**, confortés par la littérature, montrent que le pH doit être maintenu en-deçà d'une valeur maximale pour éviter une croissance limitée par le transport des AGV. La limitation de la consommation des AGV avec le pH est certainement due, au moins en partie, à leur mode de transport qui repose sur la diffusion des RH. Ainsi, pour un même pH initial, la quantité totale d'AGV consommé augmente avec la concentration totale en AGV ( $C_T$ ), jusqu'à un certain point. Néanmoins, la consommation des AGV elle-même entraînant l'alcalisation du milieu, un contrôle du pH est absolument nécessaire. Si, dans nos travaux, nous avons utilisé différents tampons, à de plus ou moins fortes concentrations, ce mode de contrôle de pH est exclu à plus grande échelle. Trois techniques de contrôle du pH nous semblent envisageables. Le pH du milieu pourrait être simplement contrôlé par ajout d'acide minéral (acide chlorhydrique) au long de la culture. En considérant les quantités nécessaires pour neutraliser le milieu, les possibles inhibitions dues à l'accumulation de chlorure et la faible valeur ajoutée du produit obtenu, il est peu probable que cette stratégie soit réalisable. La deuxième possibilité serait d'ajouter en continu ou semi-continu du milieu de fermentation, légèrement acide. En raison de l'assimilation diauxique de l'acétate et du butyrate, une telle stratégie conduira certainement à l'accumulation de butyrate dans le milieu

(dans le cas d'un système batch), conduisant *in fine* à l'inhibition du système ou à une consommation partielle de ce substrat (dans le cas d'un système continu). Enfin, dans le cas de la culture d'une algue mixotrophe, une dernière possibilité consisterait à buller le biogaz de fermentation, riche en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. Cette stratégie permettrait une valorisation complète des effluents de fermentation (gazeux et liquide), tout en permettant une purification partielle ou totale du biogaz. L'hydrogène étant le produit final désiré à l'issue de la FS, cette stratégie nécessiterait d'abord de s'assurer que l'hydrogène n'est pas consommé par les microalgues (ou d'autres organismes en culture mixte). Les mécanismes de la mixotrophie, discutés ci-après, devraient également être mieux compris. Ces différents scénarii pourraient être évalués et comparés dans le cas d'une culture sur milieu synthétique, en mode batch ou continu.

Outre les implications pratiques, plusieurs questions restent sans réponse à la suite de ces travaux, ouvrant la voie à quelques pistes de recherche. Comment les AGV inhibent la croissance des microalgues ? *A priori*, l'inhibition de la croissance suit les mêmes mécanismes que chez les bactéries ou les levures. Rappelons le principe de l'inhibition de la croissance par les acides non dissociés (**Figure 39**) : ces espèces sont lipophiles et peuvent traverser passivement les parois cellulaires. A l'intérieur de la cellule, où le pH est proche de la neutralité, les acides se re-dissocient, entraînant le relargage d'un anion et d'un proton. L'anion peut avoir différents effets néfastes sur la machinerie cellulaire, tandis que l'excès de protons diminuent le pH interne (Ricke, 2003). Pour maintenir l'homéostasie, les cellules doivent transporter activement ces composés hors du cytoplasme, par un processus consommant de l'énergie (Casal et al., 2008; Ullah et al., 2013). Lorsque la concentration en acides non dissociés dépasse un certain seuil, la demande énergétique excède les capacités des cellules : la totalité de l'énergie disponible est dédiée à la maintenance et aucune production de biomasse n'est observée. Dans le noir, cette énergie ne peut être fournie que par le cycle de Krebs. Cependant, si les cellules utilisent l'acétate pour alimenter ce cycle, la quantité de carbone assimilable par le cycle du glyoxylate, et donc disponible pour la production de biomasse, diminue. Ainsi, (Chen and Johns, 1996) ont montré une relation entre l'inhibition de la croissance avec l'augmentation de la concentration en acétate et l'augmentation de la demande énergétique de maintenance de *C. reinhardtii* associée à une baisse de rendement. En mixotrophie, la présence de lumière permet un apport supplémentaire d'énergie : une plus grande partie du carbone organique peut être dédiée à la production de biomasse. En conséquence, la présence de lumière doit très certainement augmenter la concentration maximale d'acide tolérée par les cellules. Ainsi,

(Turon et al., 2015c) ont montré que la présence de lumière permettait à *C. sorokiniana* de croître en présence de 0,3 g.C.L<sup>-1</sup> de butyrate, alors que cette concentration était inhibitrice dans le noir. La diminution du rendement hétérotrophe associée à une augmentation de la maintenance chez *C. reinhardtii* avec l'augmentation de la concentration en acétate (Chen and Johns, 1996) ainsi que l'augmentation de la tolérance aux AGV avec une source d'énergie extérieure indique effectivement qu'une partie de l'inhibition par les AGV est expliquée par une augmentation de la demande énergétique de maintenance.



**Figure 39 : Mécanismes proposés d'inhibition par les acides non dissociés.** La figure présente une proposition de mécanismes d'inhibition par les acides non dissociés en hétérotrophie ou mixotrophie. Les acides non dissociés diffusent passivement à travers la membrane cellulaire. A l'intérieur de la cellule, où le pH est proche de la neutralité, ils se dissocient en anions ROO<sup>-</sup> et ions H<sup>+</sup>. Une partie des anions est métabolisée dans le cycle du glyoxylate (glyoxysome) ou bien dans le cycle de Krebs (mitochondrie). Si les anions et les protons sont en excès, ces deux molécules doivent être exportées par des processus dépendant de l'ATP, par des transporteurs communs ou distincts, non déterminés dans la littérature. A l'extérieur de la cellule, selon le pH, une nouvelle molécule non dissociée se forme. Ceci conduit à un cycle futile de dépense énergétique : si les RH sont en excès, la cellule ne peut plus croître. En mixotrophie, la lumière apporte l'énergie nécessaire pour compenser la perte due à l'export des AGV : le seuil d'inhibition est augmenté.

Le seuil de tolérance au butyrate des souches étudiées a toujours été inférieur à celui de l'acétate, conformément aux résultats de la littérature. Pourquoi un tel effet inhibiteur ? Chez d'autres organismes comme les levures ou les bactéries, l'inhibition de la croissance par les acides non dissociés augmente également avec la longueur de chaîne du radical R (Llamas et al., 2020b; Rodrigues and Pais, 2000; Royce et al., 2013; Van Ginkel and Logan, 2005). Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette observation. Selon la loi d'Overton-Meyer, la perméabilité d'un composé à travers la membrane cellulaire augmente avec le coefficient de partition du composé entre l'eau et un solvant apolaire (Jarboe et al., 2013). Pour les acides faibles tels que l'acétate ou le butyrate, ce coefficient dépend principalement du pH (et donc de la fraction de forme protonée) et de la longueur de chaîne du radical (les chaînes longues étant plus lipophiles). La perméabilité des acides non dissociés avec la membrane cellulaire augmente donc avec la longueur de chaîne du radical : la diffusion du butyrate à travers les membranes est plus rapide que celle de l'acétate. Par ailleurs, le taux de croissance entre 2 et 10 fois plus faible sur le butyrate que sur l'acétate implique une métabolisation plus lente de ce composé. La diffusion rapide et la métabolisation plus lente entraînent probablement une accumulation globalement plus importante du butyrate à l'intérieur de la cellule pour des concentrations plus faibles : le seuil d'inhibition s'en trouve réduit. Enfin, outre les dommages internes provoqués par les acides non dissociés, ceux-ci endommagent directement les membranes cellulaires. Chez les bactéries, leur diffusion provoque des pores plus ou moins gros, entraînant des fuites de métabolites, ainsi qu'une augmentation de la polarisation de la membrane. Les chaînes longues peuvent ainsi provoquer des dégâts plus importants que les chaînes courtes (Royce et al., 2013). Bien que ces effets ne soient pas décrits chez les algues, il est possible que les mécanismes d'inhibition soient identiques.

Le **Tableau 19** présente quelques concentrations inhibitrices en acides déterminées à partir de la littérature pour certaines souches. (Turon et al., 2015) ont observé en hétérotrophie une inhibition de la croissance de *C. sorokiniana* et d'*A. protothecoïdes* dès 3,5 mg.L<sup>-1</sup> et 9,0 mg.L<sup>-1</sup> de BuH respectivement, tandis que nous avons mesuré un seuil d'inhibition à environ 25 mg.L<sup>-1</sup>. Dans les deux cas, le pH de culture était fixé à 6,5 : les différences de seuil ne peuvent pas s'expliquer par ce paramètre. Comme nous venons de le discuter, il est bien probable que les écarts observés soient dus aux deux modes trophiques utilisés. Nous avons choisi de mener toutes nos expériences sous lumière d'intensité fixe et continue pour évaluer l'inhibition par le butyrate dans les conditions les plus favorables. Il est donc important de

rappeler que les seuils de tolérance déterminés pour les souches photosynthétiques ne sont valables que dans les conditions de lumière de nos expériences. Dans un procédé réel, l'intensité lumineuse reçue par les algues sera fluctuante, notamment en raison de la turbidité plus ou moins grande des effluents, jusqu'à être nulle pendant la nuit. Le seuil de tolérance variera donc au cours du processus : la  $C_T$  ou le pH devront être respectivement diminuée ou augmenté en conséquence.

De la même manière, certains auteurs indiquent que le ratio substrat : inoculum (S:X) est un autre paramètre permettant de lever l'inhibition (Liu et al., 2013). On peut supposer que l'augmentation de la densité cellulaire initiale diminue la concentration en RH spécifique par cellule. Les concentrations maximales que nous avons calculées ne sont donc valables que pour les densités de cellules initiales appliquées dans notre étude, autour de  $0,05 \text{ g}_X \cdot \text{L}^{-1}$  : augmenter la quantité d'inoculum permet certainement d'augmenter le seuil d'inhibition. Il est difficile de trouver plus de points de comparaison, peu d'études ayant abordé le problème d'inhibition par les substrats organiques chez les microalgues. On observe néanmoins, malgré quelques variations, que les concentrations inhibitrices observées pour les chlorophytes sont dans l'ordre de grandeur des concentrations que nous avons déterminées.

En revanche, les microalgues que nous avons étudiées, les souches photosynthétiques en particulier, présentent une tolérance très faible aux RH en comparaison d'autres micro-organismes comme les levures ou les bactéries fermentaires (**Tableau 19**). Pourquoi les microalgues photosynthétiques présentent des seuils de tolérance si faibles comparativement à d'autres espèces ? L'hypothèse principale expliquant cette observation serait que les microalgues possèdent des mécanismes de protection et de tolérance au stress moins efficaces que les organismes précédemment cités. Les bactéries ou levures peuvent être en effet confrontées à un stress RH dès que les conditions aérobies ne sont plus remplies : les micro-organismes fermentent et sont exposés aux acides sécrétés par eux-mêmes ou leurs voisins. En conséquence, il serait naturel qu'ils aient évolué des stratégies de tolérance plus efficaces que celles des microalgues photosynthétiques qui ont évolué dans des milieux aérobies comparativement pauvres en acides organiques. De la même manière, *Polytomella sp.* est retrouvée dans des milieux légèrement acides, fortement fermentés (Pringhseim, 1955) et présente certainement des mécanismes de tolérance particulièrement poussés, lui permettant de croître à des concentrations en RH 10 fois plus élevées que *C. sorokiniana*, et ce bien qu'elle soit incapable d'utiliser la lumière comme source d'énergie complémentaire.

**Tableau 19 : Comparaison des seuils d'inhibition avec d'autres études.** Les concentrations en RH sont données pour les conditions dans lesquelles aucune croissance n'a été observée par les auteurs. A : algue ; B : bactérie ; L : levure ; ANPS : algue non photosynthétique ; H : mode hétérotrophe ; M : mode mixotrophe.

Espèce	Métabolisme	AcH (mg.L <sup>-1</sup> )	BuH (mg.L <sup>-1</sup> )	Réf.
<i>A. prothotecoïdes</i> (A)	H	245,2*	245,2*	(Fei et al., 2015b)
<i>A. prothotecoïdes</i> (A)	H		9,0	(Turon et al., 2015a)
<i>C. reinhardtii</i> (A)	H	43,4		(Chen and Johns, 1994)
<i>C. sorokiniana</i> (A)	H		3,5	(Turon et al., 2015a)
<i>Clostridium thermoaceticum</i> (B)	H	4060	4060	(Wang et al, 1984)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> (B)	H	4260	3168	(Costa et al, 1983)
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (L)	H	9000		(Dong et al, 2017)
<i>A. obliquus</i> (A)	M	47,2	12,5	
<i>A. protothecoïdes</i> (A)	M	206	24,9	<b>Chapitre 3</b>
<i>C. reinhardtii</i> (A)	M	94,4	24,9	
<i>C. sorokiniana</i> (A)	M	72,0	26,4	
<i>E. gracilis</i> (A)	M	72,0	79,2	<b>Chapitre 4</b>
<i>O. danica</i> (A)	M	96,0	79,2	
<i>Polytomella sp.</i> (ANPS)	H	750	352	

\*L'inhibition a été observée pour un mélange d'AGV (8 g.L<sup>-1</sup>) à pH 6,3.

Chez les bactéries fermentaires ou intestinales, on retrouve notamment une capacité accrue à expulser rapidement les protons grâce à une plus grande expression des pompes ATP-H<sup>+</sup> (Huang et al., 2012; Miwa et al., 1997) ou bien la capacité à laisser diminuer le pH interne



(Russell, 1992) comme nous l'avons évoqué dans le **chapitre 4**. Des mécanismes similaires sont présents chez les levures, dont (Mira et al., 2010) proposent une revue particulièrement détaillée. En résumé, sous le contrôle du gène *Haap1* notamment, *S. cerevisiae* surexprime différents transporteurs inclus dans l'extrusion d' $H^+$  et des anions durant les périodes de stress courtes. Pendant les périodes étendues, l'espèce adapte la morphologie de sa membrane en diminuant sa fluidité et sa porosité pour réduire la diffusion des acides. Enfin, en réponse au stress oxydatif général (espèces radicales oxygénées) provoqué par l'augmentation de l'activité cellulaire et par certains anions, l'espèce surexprime les mécanismes antioxydants.

Une perspective de ces travaux de recherche serait donc d'identifier les mécanismes de tolérance effectivement présents chez *Polytomella sp.* et absents chez *C. sorokiniana* ou *C. reinhardtii*, en se basant sur ceux présents chez d'autres eucaryotes comme *S. cerevisiae*. Ces souches pourraient être cultivées à une concentration en RH autorisant la croissance ou à une concentration limite et les différences de réponses physiologiques (pH interne, fluidité de la membrane, activité des ATPase, stress oxydatif, ...) ou protéiques pourraient être évaluées. Par la suite, une production de mutants par adaptation évolutive ou mutations aléatoires spontanées des souches photosynthétiques, capables de tolérer des concentrations en RH supérieures à celles de la souche sauvage, permettrait d'affiner les résultats obtenus par comparaison de ces mêmes réponses en présence de RH. Le protocole pourrait être établi pour l'acide acétique et/ou l'acide butyrique afin de comprendre les causes accrues d'inhibition par ce substrat. Ces résultats permettraient dans l'ensemble d'apporter quelques réponses quant aux mécanismes d'inhibitions de la croissance par les AGV et quelques pistes de réflexion quant aux différences de tolérances observées entre les microalgues photosynthétiques et les autres organismes eucaryotes.

### 2. Métabolisation du butyrate : vers l'étude de souches photosynthétiques

Le deuxième objectif de cette thèse a été de mieux comprendre les voies métaboliques liées à l'assimilation du butyrate. A cet effet, nous avons déterminé au cours des **chapitre 3** et **4** la capacité d'une quinzaine de souches à croître sur le butyrate. *Polytomella sp.* ayant été identifiée comme une spécialiste de la consommation du butyrate en comparaison de toutes les autres espèces, nous l'avons sélectionnée comme candidate pour élucider le métabolisme du butyrate. Ceci a été réalisé par des approches protéomiques comparatives au cours du **chapitre 5**. Nous

avons pu montrer que la voie d'assimilation du butyrate se faisait via la  $\beta$ -oxydation dans le péroxysome et que le butyrate entraînait une réponse antioxydante forte. Ces résultats doivent servir de base de comparaison pour étudier les verrous métaboliques à la consommation du butyrate chez les souches photosynthétiques. Est-ce que l'étape limitante est le transport du butyrate, sa  $\beta$ -oxydation ou bien tient à la gestion des effets annexes (stress  $H_2O_2$  par exemple) ?

La question du transport des AGV (acétate ou butyrate) à l'intérieur de la cellule reste en effet non résolue. Comme nous l'avons évoqué plusieurs fois, certains auteurs suggèrent que l'acétate est transporté activement dans la cellule par un transporteur monocarboxylate/protons, comme pour les autres eucaryotes (Casal et al., 2008; Perez-Garcia et al., 2011). Néanmoins, aucune preuve directe confirmant cette hypothèse n'a pu être trouvée dans la littérature. L'absence de transporteur actif impliquerait une dépendance à la diffusion pour le transport des AGV. Ceci signifie que la vitesse de consommation d'un substrat transporté passivement doit augmenter avec la concentration en acide non dissocié, jusqu'à atteindre un certain seuil. Dans le **chapitre 3**, nous avons pu montrer que l'élévation du pH limitait la consommation des AGV, sans pour autant la rendre obligatoirement nulle, chez les souches photosynthétiques telles que *C. sorokiniana* ou *C. reinhardtii*. Cet effet a été néanmoins très contrasté en fonction de la souche et du substrat : la vitesse de consommation du butyrate diminuait fortement avec le pH en comparaison de l'acétate. Ce résultat pourrait suggérer la présence d'un transporteur actif de l'acétate mais pas pour le butyrate. En évaluant l'effet du pH sur la croissance de *Polytomella sp.* en présence d'acétate ou de butyrate, nous avons déterminé que la souche était incapable de croître à des pH supérieurs à 7 (données non montrées). Ce résultat pourrait indiquer une dépendance de *Polytomella sp.* au transport passif, mais aussi simplement une incapacité de la souche à croître aux pH alcalins. La vitesse de consommation du butyrate restant très élevée y compris à pH 7, où la concentration en formes non dissociées est très faible, pousse tout de même à envisager la présence d'un transport actif. Ce résultat est par ailleurs renforcé par l'analyse protéomique du **chapitre 5**, où nous n'avons pas pu identifier de transporteur spécifique du butyrate ni de transporteur de type MCT. Néanmoins, un transporteur FNT, induit sur le butyrate, pourrait être un candidat. Pour éclaircir toutes ces questions, nous proposons plusieurs expériences. D'abord, la vérification de l'acidophilie de *Polytomella sp.* est assez simple : en cultivant *Polytomella sp.* à pH 8 avec un substrat ne nécessitant pas de transport (par exemple l'éthanol) ou bien en augmentant considérablement la concentration en AGV (afin d'avoir une concentration en acide non dissocié minimale), on pourrait facilement déterminer

si l'absence de croissance sur les AGV à ce pH est due au manque de transport ou bien à une certaine acidophilie de l'espèce. Ensuite, la nature du transporteur pourrait être confirmée via des approches génétiques, protéomiques et biochimiques. L'éthanol ne nécessitant pas de transporteur spécifique, une approche protéomique comparative entre le butyrate et ce substrat permettrait d'identifier plus facilement les protéines de transport sur-régulées en présence des acides afin d'identifier plus clairement les candidats. La présence d'un transporteur de type MCT pourrait être confirmée en utilisant des inhibiteurs de ces protéines (Halestrap, 2012), tandis que l'activité de la FNT pourrait être évaluée notamment en générant des mutants de *C. reinhardtii* par exemple. L'une des difficultés serait de généraliser les résultats obtenus à *C. sorokiniana* ou d'autres espèces, les outils moléculaires disponibles pour *C. reinhardtii* n'étant pas aussi développés pour d'autres souches.

Par la suite, il serait nécessaire de reconstruire la voie d'assimilation du butyrate chez *Chlorella sorokiniana* et ses effets sur le métabolisme global de la souche. En utilisant une approche protéomique similaire à celle proposée dans le **chapitre 5**, nous avons pu commencer à répondre à cet objectif. Bien que l'analyse des données ne soit pas terminée, les résultats préliminaires indiquent que *C. sorokiniana* assimile bien le butyrate par voie de  $\beta$ -oxydation. Néanmoins, toutes les enzymes impliquées dans ces étapes, et dans celles du cycle du glyoxylate, sont beaucoup moins sur-régulées que chez *Polytomella sp.* Par ailleurs, *C. sorokiniana* ne semble pas induire l'enzyme FNT sur le butyrate : la souche pourrait ainsi potentiellement être limitée dans le transport du butyrate, réduisant sa réponse globale à ce substrat. Néanmoins, un autre transporteur multirésistant de type ABC a été trouvé surexprimé 100 fois sur le butyrate en comparaison de l'acétate, mais son activité n'est pas encore claire. Ce transporteur est-il responsable de l'import du butyrate dans la cellule ou de son export pour gérer le stress oxydatif ? Par ailleurs, plusieurs enzymes impliquées dans la gestion du stress carboné sont également fortement impliquées (« low-CO<sub>2</sub> inducible protein »). Ces enzymes sont-elles surexprimées en raison du stress générée par la surproduction de NAD(P)H et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, perturbant la machinerie photosynthétique ? En raison de la possible complexité des interactions entre le métabolisme photosynthétique et l'assimilation du butyrate, nous suggérons dans un premier temps de cultiver *C. sorokiniana* en hétérotrophie complète sur l'acétate et le butyrate (en utilisant des concentrations et pH appropriés). Les données ainsi générées pourraient ainsi être comparées plus simplement à celles obtenues pour *Polytomella sp.*

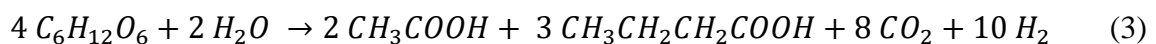
### 3. Valorisation de la biomasse algale

Le dernier objectif de cette thèse a été d'évaluer le potentiel de production de microalgues sur des effluents de fermentation. A cet effet, les paramètres de croissance et de production de produits de stockage comme les lipides et les sucres ont été mesurés. L'ensemble des résultats obtenus pendant ce travail sont consignés dans le **Tableau 20** et comparés à quelques autres études. Globalement, nous avons obtenus des rendements et des productivités en biomasse bien supérieures à ceux obtenus par d'autres auteurs. Ce résultat peut être attribué en partie au mode mixotrophe, qui permet de maximiser la biomasse (discuté plus loin), et en partie au contrôle précis de certains paramètres clés comme le pH, la concentration en substrat et le ratio C:N:P. Cependant, malgré le quasi doublement de la productivité en biomasse, la productivité en lipides que nous atteignons reste dans le même ordre de grandeur que celle atteinte par d'autres auteurs pour d'autres souches. Pourquoi une si faible productivité en lipides ?

La réponse la plus probable tient probablement dans le faible contenu en lipides (entre 10 et 20%) de *C. sorokiniana* (et des autres espèces étudiées). L'objectif principal articulant l'ensemble de la thèse a été de mieux comprendre les effets du butyrate sur l'inhibition de la croissance et sur la productivité en biomasse. Pourtant, comme nous l'avons discuté dans le **chapitre 3**, la productivité en lipides est une combinaison de la productivité en biomasse et du contenu en lipides intracellulaire. Ainsi, dans le **chapitre 3**, nous avons rapidement écarté les espèces ne présentant pas une consommation complète du butyrate (*Acutodesmus obliquus* et *Chlamydomonas reinhardtii*) ou une production de biomasse inférieure à *C. sorokiniana* (*Auxenochlorella protothecoïdes*). Ces souches, notamment *A. protothecoïdes* et *A. obliquus*, auraient pu manifester des productivités en lipides supérieures à *C. sorokiniana*. Certaines études rapportent par exemple des contenus en lipides à plus de 60 % de la biomasse pour *A. prothotecoïdes* (Rismani-Yazdi et al., 2015) et de près de 47 % pour *A. obliquus* (Ferrigo et al., 2015). De la même manière, nous n'avons dans le **chapitre 4** pas cherché de souches accumulant spécifiquement de lipides : notre objectif était bien d'identifier une espèce consommant rapidement le butyrate afin d'élucider son métabolisme. En conclusion, si la production de lipides est l'objectif final du couplage, d'autres espèces que *C. sorokiniana* ou *Polytomella sp.* devraient être étudiées en prenant comme critères de sélection la productivité en lipides et leur concentration finale, et non la consommation plus ou moins forte des substrats organiques.

Par ailleurs, la méthode de limitation par les nutriments, habituellement employée pour déclencher l'accumulation de tels composés, n'a pas porté ses fruits dans nos travaux : *C. sorokiniana* a principalement accumulé des polysaccharides en réponse à la carence nutritive. Bien sûr, ce résultat n'est valable que pour cette souche de *Chlorella* : il est possible voire certain que des résultats différents soient obtenus pour d'autres espèces. Par exemple, les espèces *Scenedesmus obliquus* ou *Neochloris oleoabundans* ont des contenus et productivités en lipides quasiment triplées lorsqu'elles passent de conditions riches à carencées en azote (Sajjadi et al., 2018). La pertinence de cette méthode sera néanmoins discutée plus en détail dans la suite de ce chapitre : la plupart de ces résultats sont valables en conditions modèles.

Enfin, en supposant que le changement d'espèces ou de conditions de culture ne permet pas d'améliorer significativement la productivité en lipides, une question se pose : comment valoriser la biomasse riche en polysaccharides ? Une possibilité serait d'alimenter le fermenteur avec la biomasse algale, complète ou après extraction de lipides, afin d'augmenter le rendement en H<sub>2</sub> (Sambusiti et al., 2015). A cet effet, *Polytomella sp.* pourrait apparaître comme une souche particulièrement intéressante. Outre sa consommation complète des substrats organiques et sa productivité en biomasse, son accumulation de composés de stockage est couplée à la croissance, contrairement à *C. sorokiniana* (et d'autres espèces) qui les accumulent après une phase de stress (cf. **chapitre 3**). Cette caractéristique permet d'envisager une culture et production continue de polysaccharides. L'accumulation d'un seul composé de stockage permet par ailleurs de considérer *Polytomella sp.* comme une plateforme de conversion des acides gras volatils et de concentration du carbone vers un composé unique, l'amidon. Ce composé, une fois extrait, pourrait servir de substrat de base pour la fermentation sombre (ou bien la production d'autres molécules). En partant de l'équation empirique de production d'H<sub>2</sub> (3) de Hawkes (Hawkes et al., 2007) et des rendements en sucres accessibles par la culture de *Polytomella sp.*, on peut évaluer grossièrement un tel scénario.



**Tableau 20 : Comparaison des productivités en biomasse, lipides et sucres avec d'autres études.** Les rendements ont été recalculés à partir de la quantité de substrat consommé. Ac : acétate ; Pr : propionate ; Bu : butyrate ; H : hétérotrophie. M : mixotrophie.

Espèce	Substrat (gcs.L <sup>-1</sup> )	Mode	$Y_{XS}$ (gx.gcs <sup>-1</sup> )	$Q_x$ (gx.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	$Y_{Lipides}$ (mgLip.gcs <sup>-1</sup> )	$Y_{Sucres}$ (mgSucres.gcs <sup>-1</sup> )	$Q_{Lipides}$ (mgLip.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	$Q_{Sucres}$ (mgsucres.L <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	Référence
<i>Scenedesmus sp.</i>	Ac : 0,152 Pr : traces Bu : 0,448	H	1,68	0,17	648,1	336,7	64,8	33,7	(Ren et al., 2018a)
A. <i>protothecoïdes</i>	AC : 0,24 Pr : 0,05 Bu : 0,16	H	0,866	0,06	413,5	-	26,7	-	(Fei et al., 2015a)
	Ac : 0,48 Pr : 0,1 Bu : 0,33		0,644	0,08	307,3	-	39,7	-	
<i>C. sorokiniana</i>	Ac : 1,1 Pr : 0,70 Bu : 0,77	H	0,41	0,13	137,1	-	45,0	-	(Patel et al., 2021a)
<i>C. sorokiniana</i>	Ac : 1 Bu : 2	M	2,33	0,47	403,7	572,5	75,6	99,4	<b>Chapitre 3</b>
	Ac : 1 Bu : 2		1,47	0,29	442,6	1158,6	36,5	150,8	
	Ac : 0,33 Bu : 0,66	M	2,34	0,33	420,7	396	45,9	50,6	
<i>Polytomella sp.</i>	Ac : 0,33 Bu : 0,66	H	1,26	0,81	109,81	648,7	53,21	309,6	<b>Chapitre 4</b>
<i>E. gracilis</i>	Ac : 0,33 Bu : 0,66	M	1,53	0,29	181,2	575,5	33,8	78,9	
<i>O. danica</i>	Ac : 0,33 Bu : 0,66	M	2,28	0,29	315	226	43,8	28,4	

D'après cette équation, la consommation de  $4 \text{ mol.L}^{-1}$  de glucose conduit à la production de  $192 \text{ gC.L}^{-1}$  d'AGV. En considérant un rendement en sucres de  $648,7 \text{ mg}_{\text{sucres.gCS}}^{-1}$  pour *Polytomella sp.*, la culture de cette souche sur un tel effluent conduirait à la production de  $0,7 \text{ mol}$  d'équivalent sucres, se traduisant en une augmentation du rendement en  $\text{H}_2$  de  $2,5 \text{ mol}_{\text{H}_2.\text{mol}_{\text{glucose}}}^{-1}$  à environ  $3 \text{ mol}_{\text{H}_2.\text{mol}_{\text{glucose}}}^{-1}$ . Ce scénario pourrait être évalué en cultivant *Polytomella sp.* et *C. sorokiniana* (ou une autre espèce accumulatrice de lipides) sur un effluent (réel ou synthétique), puis en alimentant un fermenteur avec la biomasse produite ou après extraction de lipides dans le cas de *C. sorokiniana*. Le critère d'évaluation principal serait alors le rendement énergétique ( $\text{H}_2$  ou  $\text{H}_2 + \text{lipides}$ ) obtenu dans l'un ou l'autre cas.

### 4. La mixotrophie : un mode trophique qui reste à comprendre et optimiser

Conformément à ce qui a pu être décrit dans la littérature, nous avons observé que les rendements en biomasse et les taux de croissance de *C. sorokiniana* obtenus en mixotrophie tout au long de cette thèse, sur acétate ou butyrate, sont supérieurs à ceux rapportés pour la même souche par (Turon et al., 2015) en hétérotrophie (**Tableau 5**) ou par d'autres auteurs pour d'autres souches (**Tableau 20**). De la même manière, nous avons pu conclure dans le **chapitre 4** que le mode mixotrophe permettait d'atteindre des rendements en biomasse supérieurs à ceux obtenus par une souche purement hétérotrophe. En conséquence, ce mode trophique est à privilégier pour les souches photosynthétiques puisqu'il maximise la biomasse obtenue.

Nous avons observé dans le **chapitre 3** deux tendances se dégager en fonction du pH et de la  $C_T$ . D'une part, l'augmentation du pH a conduit à la fois à une augmentation de la vitesse de production de biomasse autotrophe, probablement en raison d'une plus grande concentration en carbone inorganique dissout dans le milieu, et à une diminution de la vitesse de consommation hétérotrophe des substrats organiques. La combinaison de ces deux effets a entraîné une augmentation du rendement mixotrophe, parfois au détriment de la consommation du carbone organique en fonction du substrat et de la souche étudiée. D'un autre côté, l'augmentation de la  $C_T$  a entraîné la diminution du rendement en carbone jusqu'à s'éloigner de l'unité, et ce indépendamment des conditions de pH ou nutriments. Ceci indique que les cellules tendent davantage vers l'hétérotrophie quand la  $C_T$  augmente. Ces résultats concordent avec les observations de (Chapman et al., 2015; Heifetz et al., 2000) pour l'acétate et fournissent de nouvelles données quant à l'influence du butyrate. Ces conclusions mériteraient néanmoins

d'être confirmées et approfondies. En effet, si le bilan de matière nous a permis de tirer quelques conclusions, aucune mesure de CO<sub>2</sub> et de vitesse d'assimilation de ce substrat ne permet de les valider. Par ailleurs l'unique paramètre mesuré pendant ces travaux a été l'évolution de la biomasse. La mesure des paramètres physiologiques indicatifs de l'efficacité de la photosynthèse (contenu en pigments, évolution de la production d'oxygène, ...) fournirait des informations complémentaires quant à l'influence globale du butyrate et de sa concentration sur le métabolisme autotrophe. Ces expériences devraient être menées à des concentrations et pH non inhibiteurs, de sorte à dissocier les effets du substrat organique de ceux de l'inhibition. Les approches protéomiques, comme celles proposées par (Cecchin et al., 2018) pour l'acétate pourraient compléter les données physiologiques.

Si la concentration en substrat organique inhibe bien le métabolisme autotrophe, il serait intéressant d'évaluer si l'inverse est également vrai. Autrement dit, le carbone inorganique influence-t-il la consommation des substrats organiques, et en particulier le butyrate ? Les travaux de (Liu et al., 2013) vont dans ce sens : ils indiquent que le taux de croissance de *C. vulgaris* est ralenti lorsque la concentration en bicarbonate de sodium excède 2,72 g.L<sup>-1</sup>. Nos travaux ayant été menés à des concentrations en carbone inorganique variables en fonction du pH du milieu, une question se pose donc : est-ce que la limitation du transport des AGV avec les pH alcalins est uniquement liée à la valeur du pH ou bien également à une concentration plus importante en CO<sub>2</sub> dans le milieu ? Pour répondre à cette question, *C. sorokiniana* pourrait être cultivée en continu en présence d'acétate ou de butyrate en tant que substrat simple, additionné d'une quantité connue mais croissante de bicarbonate de sodium dans une condition de pH fixée. En maintenant un autre paramètre abiotique que le carbone comme facteur limitant (l'azote par exemple), il serait possible d'évaluer dans quelle mesure le carbone inorganique influe sur la consommation du carbone organique. Nous avons évoqué dans la section précédente la possibilité d'utiliser le biogaz riche en CO<sub>2</sub> comme moyen de réguler le pH et de fournir du carbone inorganique aux microalgues. En fonction des résultats obtenus par cette expérience, nous pourrions évaluer la pertinence de cette éventualité. Par ailleurs, comme nous l'avons évoqué un peu plus haut, la lumière ne pourra être maintenue constante pendant un procédé réel : les rendements mixotrophes obtenus dans nos travaux ne pourront en réalité jamais être atteints.

L'intérêt principal de la mixotrophie réside dans la réutilisation du CO<sub>2</sub> émis par la respiration du carbone organique, la réduction de la consommation de carbone organique pour



la production d'énergie grâce à la lumière et par l'utilisation de l'oxygène produit par la photosynthèse. Un procédé mixotrophe optimisé doit permettre d'obtenir des rendements en carbone au moins supérieur ou égaux à 1, c'est-à-dire que du carbone inorganique est consommé, sans pour autant affecter la consommation de carbone organique. Son optimisation peut toutefois être difficile : les conditions optimales d'un mode trophique ne sont pas nécessairement les mêmes pour l'autre. Une première piste serait de s'inspirer des recherches de (Abiusi et al., 2020) sur la mixotrophie de *C. sorokiniana*. Les auteurs ont pu montrer qu'en ajustant le débit d'alimentation en carbone organique (de l'acétate dans leurs cas) pour maintenir la quantité d'oxygène dissout à un niveau stable (105% dans leurs cas), il était possible d'atteindre un état que les auteurs qualifient de mixotrophie équilibrée. Cet état est caractérisé par un rendement en carbone très proche de 1, une faible émission de CO<sub>2</sub> et un besoin en aération nul grâce à la photosynthèse. Pour tenir compte des fluctuations de la lumière, leur culture a été menée en cyclo-stat : alimentation et soutirage continu le jour avec une concentration en oxygène dissout fixe, sans aération, et mode fermé la nuit avec une faible aération pour éviter l'auto-fermentation des microalgues. Un taux de dilution de 2 j<sup>-1</sup> a pu être maintenu dans la journée, avec des pertes minimales en biomasse (7%) par respiration pendant la nuit. S'il est tentant de s'inspirer directement de ce procédé pour notre cas, il est avant tout nécessaire de tenir compte du phénomène de diauxie et de la lenteur d'assimilation du butyrate par les souches photosynthétiques : un tel taux de dilution (2 j<sup>-1</sup>) impliquerait l'absence de consommation du butyrate par les algues.

### 5. Vers l'utilisation d'effluents complexes

Les travaux de cette thèse ayant eu pour objectif une compréhension de certains phénomènes (inhibitions, métabolisation du butyrate, mixotrophie...), toutes nos expériences ont été menées avec des substrats synthétiques. Nous avons concentré nos efforts sur l'étude des deux métabolites principaux, l'acétate et le butyrate utilisés en tant que substrats simples ou bien mélangés selon des proportions bien définies. Ces conditions ne reflètent évidemment pas la complexité des effluents de réels, comme décrit dans le **chapitre 1**.

La présence d'acétate et de butyrate dans un effluent témoigne généralement du succès de la fermentation vers la production d'H<sub>2</sub>. L'H<sub>2</sub> étant le produit final désiré, la conduite du procédé est telle qu'elle favorise la présence de ces deux métabolites. Toutefois, comme nous l'avons décrit dans le **chapitre 1**, en raison de la complexité de la culture mixte, de l'utilisation

de substrats eux-mêmes complexes (des déchets de compositions diverses porteurs d'une communauté bactérienne endogène spécifique), des profils de fermentation plus hétérogènes peuvent être obtenus. L'effet de ces autres métabolites fermentaires sur la croissance des algues reste donc à étudier. D'après les travaux de (Liu et al., 2013; Turon et al., 2015a), le lactate n'est *a priori* pas consommé par *C. sorokiniana* en hétérotrophie. Des essais préliminaires menés avec *C. sorokiniana* en mixotrophie et *Polytomella sp.* confirment ces résultats (**Annexe 2**). L'incapacité de *Polytomella sp.* à consommer le lactate, malgré sa prédisposition au métabolisme hétérotrophe, nous laisse penser qu'il est peu probable qu'une espèce photosynthétique puisse assimiler ce substrat. Si la présence de lumière et le mode autotrophe permet aux algues photosynthétique de continuer à se développer en absence de source de carbone organique, la prépondérance de lactate, non consommable, dans un effluent réduirait considérablement la concentration en biomasse finale dans le cas d'une culture hétérotrophe. En conséquence, la présence en grande quantité de ce métabolite est indésirable dans le couplage. Toutefois, la présence minoritaire de lactate n'inhibera pas la croissance sur l'acétate. Toujours d'après nos résultats préliminaires (**Annexe 2**), *C. sorokiniana* est tout aussi capable d'assimiler l'éthanol que *Polytomella sp.*, quoique plus lentement. Néanmoins, nous avons pu observer que la croissance de *C. sorokiniana* sur le seul substrat éthanol était impossible, probablement en raison d'une concentration trop importante. La présence de ce métabolite semble donc moins problématique mais les concentrations limites tolérables par les algues restent à déterminer.

Outre la composition en substrats organiques, la concentration en nutriments minéraux peut également être amenée à varier. En condition modèle, nous avons pu établir que le ratio Redfield 106:16:1 permettait d'optimiser la production de biomasse, tandis qu'une carence en nutriments déclenchait l'accumulation de composés de stockage. La plupart des études portant sur le C:N, y compris la nôtre, ajustent artificiellement ce ratio en ajoutant une source d'azote. En réalité, comme pour les substrats organiques, la concentration en nutriments minéraux peut également fortement varier en fonction des substrats alimentant le fermenteur. La quantité de N ou de P dans les effluents n'a pas été évaluée dans toutes les études, mais certaines d'entre elles rapportent par exemple des ratios C:N:P dans les effluents de 317:24:1 (Cho et al., 2015), 73:5.6:1 (Cho et al., 2017) et 10:0.7:1 (Qi et al., 2018). Le C:N semble relativement stable autour de 13-14 alors que la quantité de P varie grandement. En considérant le ratio C:N:P de 106:16:1 idéal pour la production de biomasse, il semble que le N ou de P soit donc toujours

limitant. Ajuster le C:N:P du milieu aux besoins de la biomasse pourrait être réalisé en mélangeant les effluents de FS avec d'autres sources de N ou de P pauvres en carbone. Il est également possible d'envisager des stratégies de production en deux étapes en utilisant des effluents de composition différentes. Par exemple, (Chiranjeevi and Venkata Mohan, 2017) ont produit des lipides de microalgues en utilisant un effluent riche en nutriment pour une première phase de croissance, suivie d'une phase d'accumulation de lipides en utilisant un effluent pauvre en nutriments. Ils observent une augmentation du taux de polysaccharides pendant la phase de croissance de 0,15 à 0,4 g.g<sup>-1</sup> biomasse. A la fin de la phase de stress, ce taux a diminué jusqu'à 0,3 g.g<sup>-1</sup> alors que les algues accumulaient des lipides jusqu'à 0,35 g.g<sup>-1</sup>. Par ailleurs, nous avons utilisé une relativement faible concentration en ammonium (allant de 105 à 550 mg.L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub>). En comparaison, la concentration en N-NH<sub>4</sub> peut atteindre des concentrations supérieures à 5000 mg.L<sup>-1</sup> N-NH<sub>4</sub> dans les effluents de digestion anaérobie, principalement en fonction des substrats d'alimentation. De telles concentrations pourraient inhiber la croissance des microalgues, en particulier si les cultures sont menées à pH alcalins, la forme NH<sub>3</sub> (pK<sub>a</sub> = 9,2) étant tout aussi toxique pour les cellules que les RH. Bien que l'espèce *C. sorokiniana* par exemple puisse tolérer des concentrations en ammoniacque jusqu'à 96,3 mg.L<sup>-1</sup> (Rossi et al., 2020), de telles concentrations excluraient dans tous les cas une stratégie de limitation azotée pour l'accumulation de lipides.

Enfin, si la composition chimique des effluents réels est bien plus complexe que dans cette étude modèle, leur composition biologique l'est tout autant. Pendant la fermentation, une communauté bactérienne mixte se développe en fonction des paramètres environnementaux appliqués, de la nature de l'inoculum et de celle du substrat. Généralement, la conduite de culture anaérobie et les prétraitements thermiques favorisent la domination de *Clostridii* ou de *Bacilli* mais d'autres espèces peuvent émerger. *A priori*, les microalgues ne seront jamais cultivées directement sur l'effluent de fermentation et une étape de centrifugation sera nécessaire pour séparer la fraction liquide, riche en matière organique, de la fraction solide. La plus grosse partie de la biomasse bactérienne sera donc retrouvée dans cette dernière. Malgré cela, il est illusoire d'imaginer un procédé complètement stérile pour le traitement d'effluents et la production de biocarburants. Ainsi, nos travaux réalisés en conditions axéniques strictes ne reflètent encore une fois pas un procédé réel : la présence de bactéries fermentaire et son effet sur la croissance des algues est à considérer. D'après les résultats de (Turon et al., 2015b), *C. sorokiniana* est compétitive en hétérotrophie pour l'acétate face aux bactéries fermentaires.

Les auteurs ont en effet remarqué que la faible densité initiale de bactéries aérobies, en sortie de fermentation, a permis la croissance des microalgues sur l'acétate. Le passage de condition anaérobie à aérobie a par la suite entraîné un changement de population microbienne : les milieux initialement dominés par les anaérobies stricts ou facultatifs comme *Clostridium sp.* et *Paenibacillus sp.* ont été progressivement colonisés par des bactéries aérobies. D'après les auteurs, ces dernières ont été responsables de la dégradation du butyrate. Si cette situation est acceptable dans un effluent principalement composé d'acétate, le cas d'un effluent où l'acétate est minoritaire serait aussi problématique que la situation énoncée plus haut pour le lactate : une très faible croissance hétérotrophe des algues serait observée. Par ailleurs, ces résultats ne sont valables qu'en mode fermé. En mode continu, il n'est pas certain que les microalgues restent compétitives pour le substrat organique une fois la communauté aérobie installée. Cette problématique de la culture hétérotrophe est bien connue et par ailleurs revue par différents auteurs (Perez-Garcia et al., 2011). Toutefois, un tel résultat peut être vu comme une opportunité : si les algues dégradent de toute manière lentement le butyrate (ou les autres substrats organiques) pourquoi ne pas laisser faire les bactéries ? Dans le cas d'une culture mixotrophe, il est possible d'obtenir un consortium robuste, reposant sur des synergies métaboliques : les bactéries respirent la matière organique tandis que les algues consomment le CO<sub>2</sub> ainsi produit (Hu et al., 2019). En supposant que les microalgues restent compétitives pour l'acétate en mixotrophie (ce qui devrait être le cas), la présence de bactéries aérobies pourrait simplement augmenter considérablement la vitesse de consommation du butyrate (et des autres métabolites fermentaires comme le lactate). Dans ce cas, une partie du rendement en biomasse algale potentiellement accessible serait sacrifié dans la biomasse bactérienne au profit d'une augmentation de la vitesse de dégradation des substrats organiques. Une partie du rendement serait conservé grâce à la photosynthèse et la fixation du CO<sub>2</sub> émis par les bactéries. Les paramètres d'obtention d'un tel consortium (pH, concentration en substrat, intensité lumineuse, aération, temps de séjour, ...) ainsi que sa robustesse (à la variabilité des effluents par exemple) restent à déterminer.

## Conclusions

La fermentation sombre, en combinant le traitement de déchets et la production d'H<sub>2</sub>, est un procédé clé pour la bioraffinerie environnementale. Son développement passe nécessairement par la valorisation de la charge organique résiduelle récupérée dans la fraction liquide des effluents. Cette thèse a eu pour ambition d'estimer le potentiel de production de microalgues à partir de tels substrats.

A partir des connaissances existantes et des données de la littérature, nous avons dans un premier temps identifié les verrous inhérents à un tel couplage : l'inhibition de la croissance par les substrats et la faible productivité en biomasse. Quelles sont les causes de l'inhibition de la croissance ? Quel est le potentiel de production de microalgues sans inhibition ? L'augmentation de la productivité en biomasse passe-t-elle par des approches biotiques (changement d'espèces) ou abiotiques (changement de paramètres environnementaux) ?

Nos travaux apportent à ces questions les éléments de réponse suivants :

- L'inhibition de la croissance microalgale est due aux formes non dissociées des acides. Ce mode d'action est généralisable à l'ensemble des espèces étudiées, mais chaque espèce présente un seuil de tolérance aux acides distinct. L'acide butyrique est davantage inhibiteur que l'acide acétique.
- Le pH est un facteur essentiel permettant de lever l'inhibition de la croissance. La gamme de pH dans laquelle les microalgues peuvent être cultivées est restreinte en raison du mode de transport des formes dissociées des acides. Le contrôle du pH est ainsi essentiel pour limiter l'alcalisation du milieu.
- Les rendements mixotrophes sont directement dépendant de la concentration en carbone organique et du pH initial du milieu. La maximisation de la productivité en biomasse passe par l'optimisation du mode mixotrophe.
- Peu d'espèces sont capables d'assimiler rapidement le butyrate. Les quelques espèces ayant cette faculté sont celles présentant une affinité pour l'hétérotrophie.
- La dégradation du butyrate est faite par voie de  $\beta$ -oxydation hautement induite dans le péroxysome chez *Polytomella sp.* La présence de butyrate implique de nombreux changements métaboliques, parmi lesquels une forte réponse antioxydante.

## Conclusion

Ces travaux ouvrent plusieurs perspectives de recherches. D'un point de vue fondamental, les modes d'actions des acides non dissociés et les réponses constitutives ou adaptatives des algues à ces molécules restent à élucider. De la même manière, certains verrous métaboliques à la consommation du butyrate par *C. sorokiniana* restent à ce jour inconnus. D'un point de vue plus appliqué, la détermination du potentiel réel de production de microalgues sur des effluents de fermentation sombre passera nécessairement par le passage de substrats modèles à réels, dont la variabilité pourra affecter considérablement les données obtenues jusqu'ici. L'obtention de ces données permettrait d'établir un modèle de production de microalgues et d'évaluer sa robustesse en fonction des performances du fermenteur.

# Annexe 1

## Modélisation du protocole d'isolement

D'un point de vue formel, la culture d'enrichissement au sein d'un protocole d'isolement/sélection « idéal » peut être conceptualisée comme un processus visant à ordonner les biomasses des algues en compétition de manière à ce que cet ordre coïncide parfaitement avec le classement "virtuel" de ces algues pour l'usage recherché. Dans notre cas, ce critère de recherche est la productivité de l'algue sur les effluents de fermentation sombre, et plus spécifiquement sur le butyrate.

En pratique, aucun accès n'est donné à ce classement virtuel puisque toutes les algues ne sont pas isolées, et on espère simplement que l'algue obtenue était bien « la meilleure » au sein de la biodiversité échantillonnée. Via la modélisation, ce classement virtuel devient une réalité manipulable et le protocole modélisé peut être évalué.

Modéliser cette culture d'enrichissement et évaluer sa qualité passe donc par 2 simulations différentes à partir d'un même groupe d'algues représentant la composition de l'échantillon. Une simulation mettra les algues en compétition dans des conditions données, et une autre simulera la croissance de ces algues une fois isolées afin d'obtenir le classement "virtuel". Ces 2 simulations font appel à des systèmes d'équations différentielles. La croissance des organismes est modélisée via un système d'équations différentielles adapté depuis (V. Turon et al., 2015a) dont la forme générale est la suivante pour  $n$  souches d'algues.

$$\left. \begin{array}{l}
 \text{Algue 1 : } \frac{dx_1}{dt} = x_1 * (Y_{A_1} * \mu_{A_1} + Y_{B_1} * \mu_{B_1} + \theta_{2_1} * x_2 + \dots + \theta_{n_1} * x_n) \\
 \dots \\
 \text{Algue n : } \frac{dx_n}{dt} = x_n * (Y_{A_n} * \mu_{A_n} + Y_{B_n} * \mu_{B_n} + \theta_{2_1} * x_1 + \dots + \theta_{n-1_n} * x_{n-1}) \\
 \text{Butyrate : } \frac{dB}{dt} = \sum_{p=1}^n - \mu_{B_p} \\
 \text{Acétate : } \frac{dA}{dt} = \sum_{p=1}^n - \mu_{A_p}
 \end{array} \right\}$$

Où pour une souche  $p$  :  $x_p$  est sa biomasse ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $Y_{Ap}$  et  $Y_{Bp}$  sont respectivement ses rendements d'assimilation pour l'acétate et le butyrate ( $0 < Y_{Ap}, Y_{Bp} < 1$ ,  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),  $\theta_{mp}$  est l'effet de la souche  $m$  sur la souche  $p$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ ).  $\mu_{Ap}$  et  $\mu_{Bp}$  sont respectivement les taux de croissance associés à l'acétate et au butyrate ( $\text{j}^{-1}$ ). Ces taux de croissances s'expriment selon le modèle de Monod pour l'acétate :

$$\mu_{Ap} = \mu_{Amax_p} * \left( \frac{A}{K_{S_p} + A} \right)$$

Où  $A$  est la concentration en acétate ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\mu_{Amax_p}$  est le taux de croissance maximal associé à l'acétate ( $\text{j}^{-1}$ ) et  $K_{S_p}$  est la constante de demi-saturation ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Le modèle de Haldane est utilisé pour le butyrate :

$$\mu_{Bp} = \mu_{Bmax_p} * \left( \frac{KD_p}{KD_p + A} \right) * \left( \frac{B}{B + \left( \frac{\mu_{Bmax_p}}{\alpha_p} \right) * \left( \left( \frac{B}{B_{opt_p}} \right) - 1 \right)^2} \right)$$

Où  $B$  est la concentration en butyrate ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et  $\mu_{Bmax_p}$  est le taux de croissance maximal associé au butyrate ( $\text{j}^{-1}$ ).  $KD_p$  est la constante de demi-saturation associée à l'inhibition par l'acétate ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), responsable du phénomène de diauxie.  $\alpha_p$  est la pente initiale ( $\text{L}\cdot\text{j}\cdot\text{g}^{-1}$ ) et  $B_{opt_p}$  est la concentration optimale en butyrate ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Une algue est donc représentée par un jeu de paramètres biologiques. A partir de cette écriture générale, de nombreuses variations sont envisageables selon les différentes hypothèses biologiques considérées. Sur ces fondements mathématiques peut se construire l'architecture générale du programme.

Un protocole, visant à isoler des algues à forte productivité sur une concentration en butyrate  $X$ , correspond à un ensemble de conditions opérantes abiotiques choisies et imposées à la simulation de la croissance en culture mixte. On lui associe aussi un arrêt de la culture à un temps  $t$  pouvant être égal ou inférieur au temps de consommation totale du butyrate ( $t_c$ ). Il sera évalué par un critère « fidélité » que nous avons calculé au sein générations aléatoires de communautés d'algues. Il évalue sa qualité pour isoler des algues ayant une forte productivité sur une concentration de butyrate  $X$ . La fidélité du protocole est définie comme la proportion des communautés (des itérations) pour lesquels l'algue dominante en biomasse à la fin de la



culture mixte est bien celle qui a la meilleure productivité une fois isolée et ramenée à ses conditions abiotiques optimales.

Ce protocole prend place dans le cadre d'"hypothèses biologiques" qui se traduisent par des écritures différentes du système d'équations différentielles telles que l'ajout d'un facteur de dépendance à la température, au pH etc., et donc de paramètres biologiques associés pour chaque algue. La nature des lois probabilistes régulant le tirage aléatoire de ces paramètres constitue une "hypothèse écologique". Les valeurs des critères ne sont pas interprétables tels quels mais seront comparées entre eux selon les hypothèses. Une « hypothèse nulle » H1 est formulée :

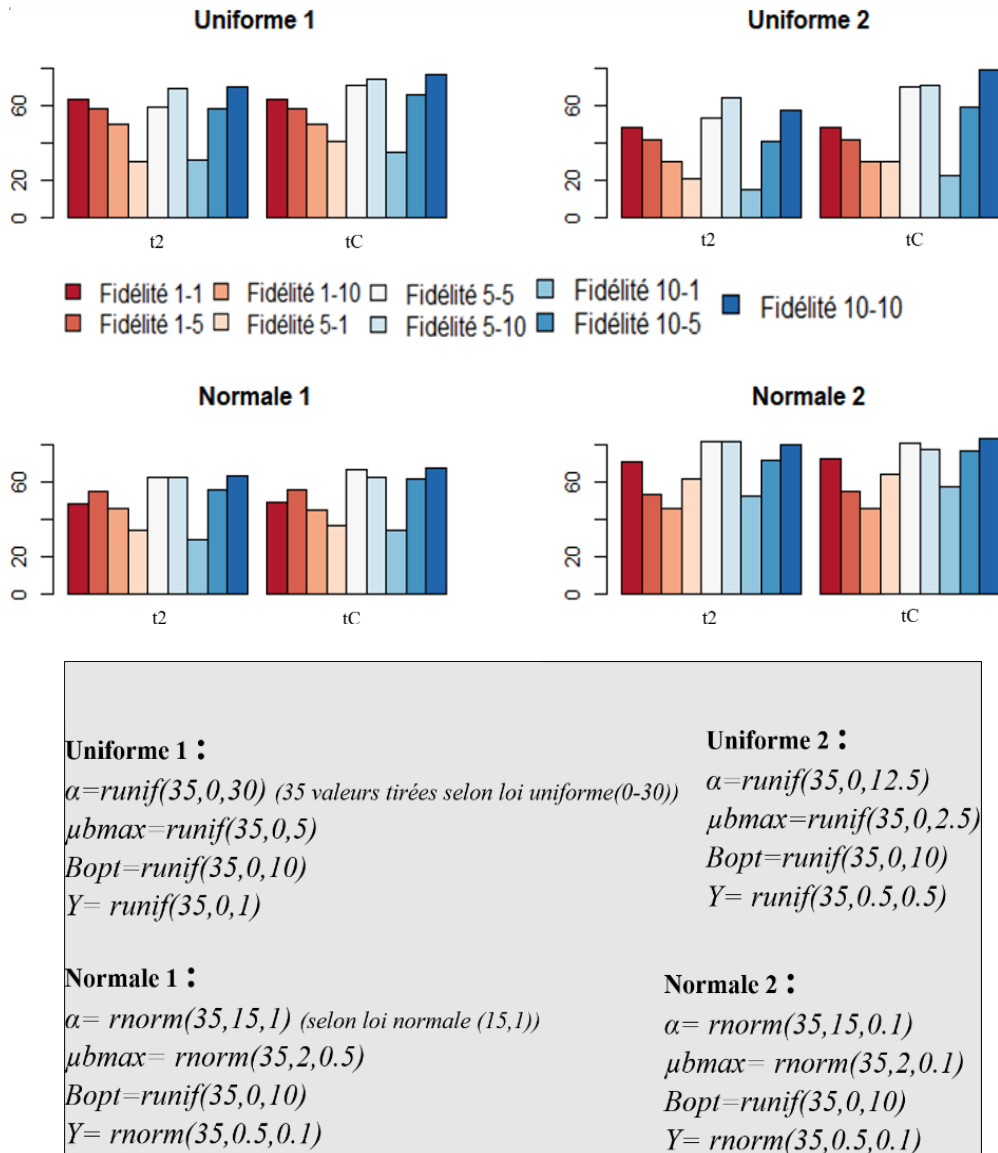
*La croissance des algues ne dépend que de la concentration en butyrate selon un modèle de Haldane.*

Pour toutes les simulations suivantes, les communautés initiales sont composées de 35 souches toutes à une concentration initiale de 0,1 g.L<sup>-1</sup>. 300 communautés (itérations) sont simulées pour obtenir les critères représentés. La modélisation est effectuée sous R Studio Version 1.2.5019 avec R-3.6.1.

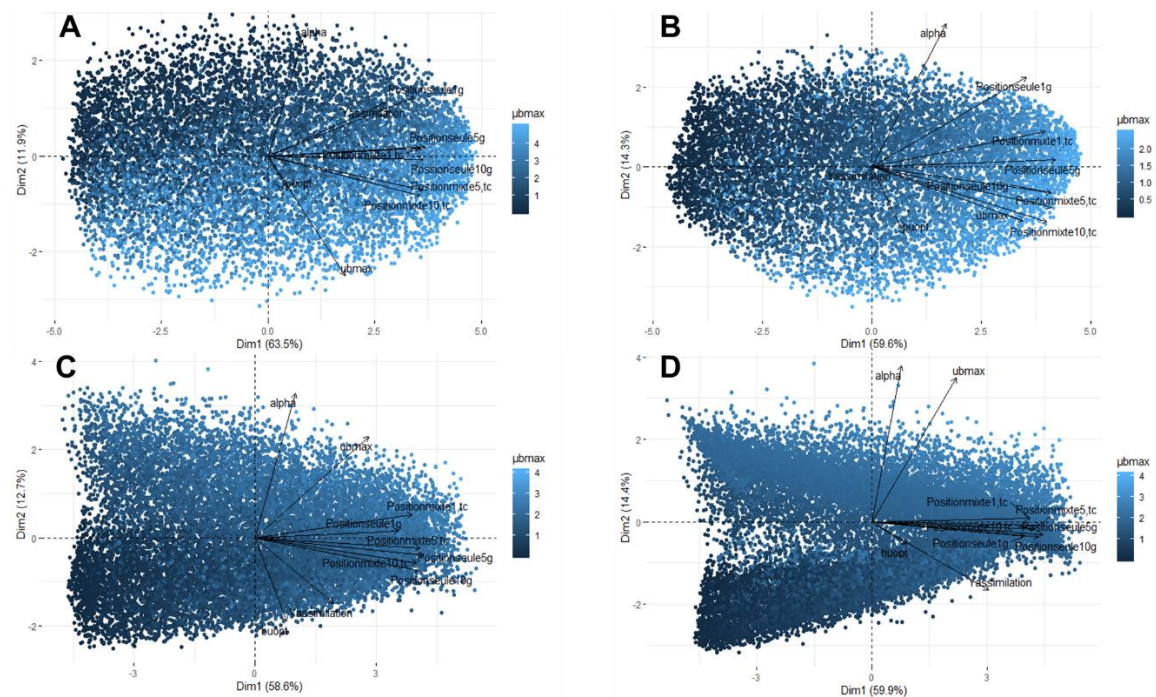
Pour toutes les simulations effectuées avec un certain nombre d'itérations ( $\pm 300$ ) dans le même cadre hypothétique, les valeurs des différents critères calculés semblent converger vers une valeur fixe. Les valeurs des critères calculés à chaque itération étant le résultat d'une expérience aléatoire, ces valeurs sont donc celles prises par des variables aléatoires aux lois probabilistes inconnues. Le théorème central limite établit que la somme d'une suite de variables aléatoires indépendantes, peu importe la loi probabiliste associée, converge vers une loi normale. Les valeurs des critères observées pour un protocole, pour un nombre de simulations suffisant, peuvent donc être interprétées comme l'espérance de cette loi normale. La convergence n'a pas pu être démontrée et aucun écart type ni intervalle de confiance pour les valeurs observées n'ont pu être calculés. La convergence reste supposée au vu des observations successives et est nécessaire pour pouvoir comparer les valeurs entre elles.

Dans le cadre H1, la fidélité du protocole n'est jamais de 100%. Elle est maximisée lorsque les paramètres biologiques de chaque algue sont tirés selon des lois normales à faible dispersion. Elle augmente généralement d'autant plus que la concentration en butyrate dans la culture après isolement est proche de celle en culture mixte. Elle monte par exemple à 80% pour un protocole

dans lequel la culture mixte se fait à la même concentration en butyrate que la culture après isolement (**Figure 40**).



**Figure 40 : La fidélité du protocole d'isolement n'est jamais complète.** La figure présente la fidélité (%) du protocole d'isolement dans le cadre de H1. Les paramètres du modèle utilisés pour déterminer la fidélité dans chaque cas sont indiqués dans l'encadré gris.



**Figure 41 : ACP des variables et des individus associées aux simulations de la figure 40.** Les ACP ont été obtenues à partir des paramètres biologiques obtenus dans chaque simulation de la **figure 40**. **(A)** Uniforme 1, **(B)** Uniforme 2, **(C)** Normale 1, **(D)** Normale 2.

La fidélité du protocole est généralement plus grande lorsque la culture mixte est arrêtée à  $t_C$  plutôt qu'à  $t_2$  ( $t_2 = t_C/3$ ) Les ACP présentées en figure 41 montrent les corrélations prenant place entre les paramètres biologiques de chaque algue ( $\mu_{Bmax_p}$ ,  $\alpha_p$ ,  $Bopt_p$ ,  $YB_p$ ) et les classements obtenus en culture mixte, ou selon leur productivité une fois isolées. La corrélation entre la valeur des paramètres et les classements, et donc l'importance des premières pour expliquer les seconds diffèrent selon les hypothèses écologiques. Certains paramètres ( $Y$ ,  $Bopt$ ,  $\mu_{Bmax}$ , etc.) pourraient donc, dans certains cadres hypothétiques, être favorisés par des protocoles appropriés.

## Annexe 2

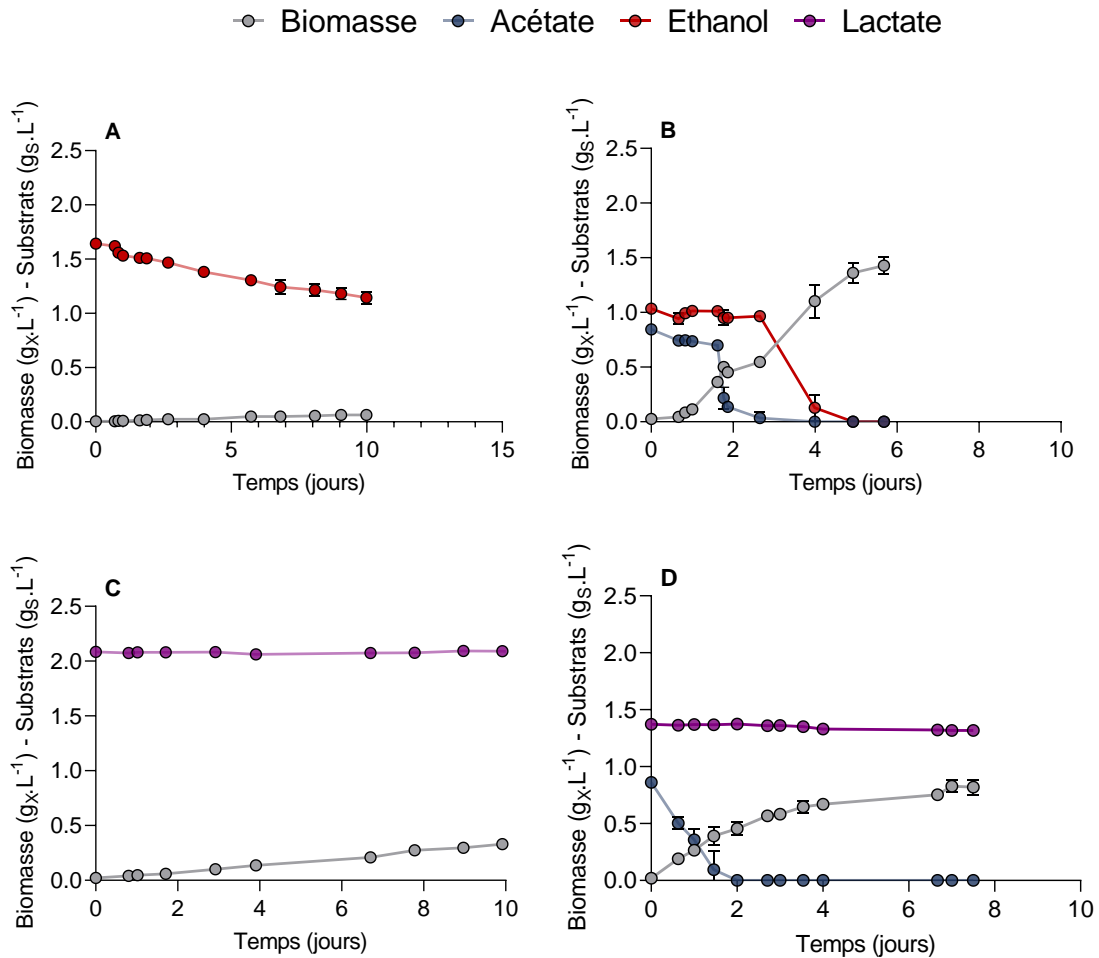
# Influence du lactate et de l'éthanol sur la croissance de *C. sorokiniana* et de *Polytomella sp.*

Si l'acétate et le butyrate sont les substrats majoritairement retrouvés dans les effluents de fermentation sombre, la présence d'éthanol et de lactate est également rapportée dans plusieurs études à des concentrations non négligeables. Il apparaît donc important d'étudier les effets de ces métabolites sur la croissance des microalgues.

Pour cela, nous avons cultivé *C. sorokiniana* et *Polytomella sp.* en fiole Erlenmeyer, dans des milieux contenant soit uniquement de l'éthanol, soit uniquement du L-lactate soit un mélange composé d'acétate et d'éthanol ou bien d'acétate et de L-lactate. Dans le mélange, nous avons utilisé les mêmes proportions que pour le mélange Ac : Bu utilisé dans tous nos travaux, c'est-à-dire 1 : 2 (en  $g_C.L^{-1}$ ). Dans tous les cas, la concentration totale en carbone a été fixée à  $1 g_C.L^{-1}$ , le pH fixé à 7 et tamponné à 100 mM et le C :N :P fixé à 106:16:1. Tous les paramètres ont été mesurés comme décrit dans le **chapitre 2**.

Les courbes de croissances ainsi obtenues sont rapportées en **figure 42** pour *C. sorokiniana* et en **figure 43** pour *Polytomella sp.*

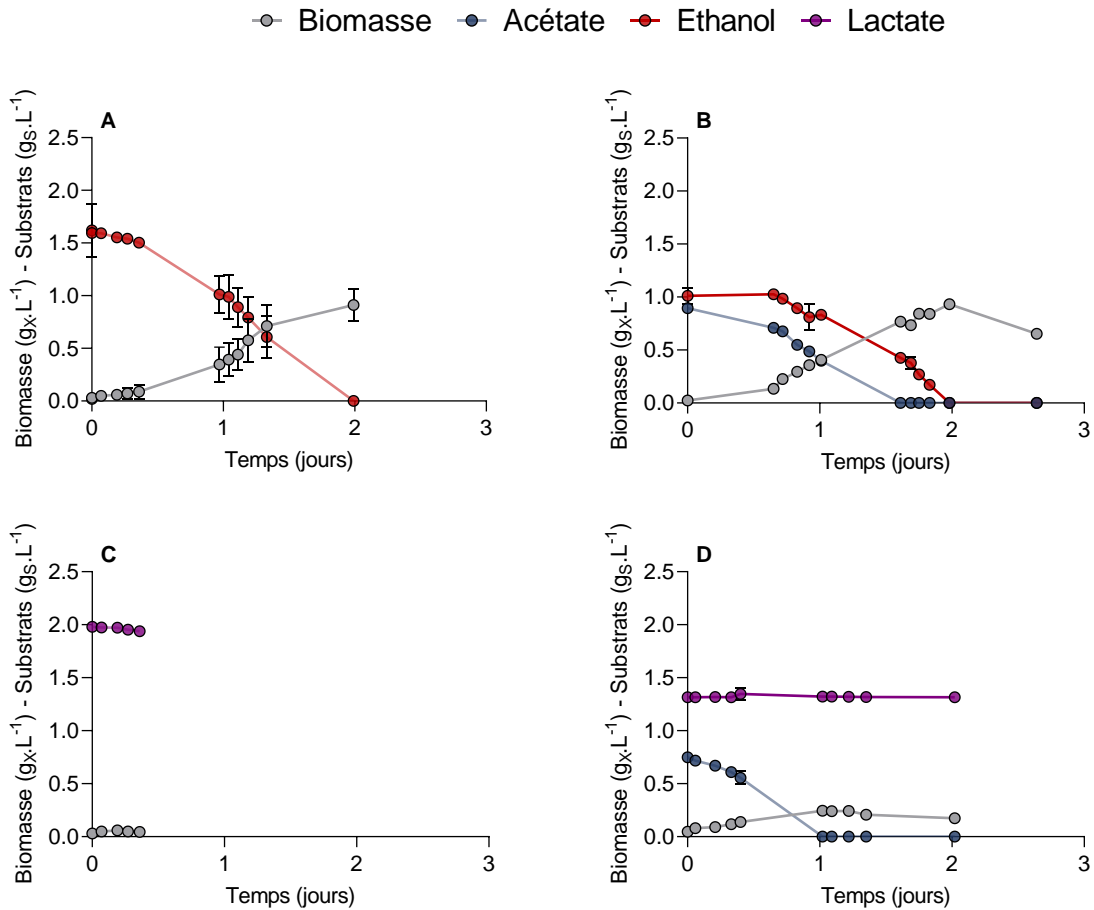
*C. sorokiniana* a été incapable de croître en présence d'éthanol en tant que substrat simple. Si la quantité d'éthanol diminue au cours du temps, il est probable que cela ne soit dû qu'à de l'évaporation, la biomasse n'augmentant pas de la même manière. La croissance autotrophe a donc été totalement inhibée par la concentration appliquée en éthanol. L'éthanol inhibe de la même manière la croissance de la souche en présence d'acétate. L'acétate présent dans le milieu a été consommé, avec un taux de croissance inférieur à celui obtenu avec de l'acétate pur ( $2,06 j^{-1}$ ). Après cette phase de consommation de l'acétate, l'éthanol est également consommé, conduisant à une augmentation de la biomasse, avec un rendement de  $0,86 g_{CX}.g_{CS}^{-1}$ . On note que la vitesse de croissance sur l'éthanol,  $0,52 j^{-1}$ , est supérieure à celle obtenue sur le butyrate.



**Figure 42: Croissance de *C. sorokiniana*. sur l'éthanol et le lactate.** Les figures représentent l'évolution de la biomasse ( $g_X.L^{-1}$ ) et de la concentration en substrat ( $g_S.L^{-1}$ ) en fonction du temps lors de la culture de *Polytomella sp.* en fioles sur  $1 g_C.L^{-1}$  d'éthanol (A), d'un mélange d'acétate et d'éthanol en proportion 1:2 (B), de lactate (C) et d'un mélange d'acétate et de lactate en proportion 1:2 (D). Chaque point représente la moyenne et l'écart type de triplicats biologiques.

La souche présente un comportement différent en présence de lactate. Ce substrat n'est jamais consommé, que cela soit en condition de substrat pur ou bien de mélange. En revanche, la concentration appliquée en lactate n'a pas inhibée la croissance autotrophe. Cela tient probablement au mécanisme d'inhibition du lactate, différent de celui de l'éthanol. Le lactate est également un acide faible pouvant se dissocier en condition acide. Son  $pK_a$  est cependant plus bas que celui de l'acétate ou du butyrate (3,86). Quelle que soit la concentration seuil tolérable par la souche, la cultiver à pH 7 conduit donc à des concentrations en acide lactique

extrêmement faibles. En condition de mélange, le lactate n'inhibe pas non plus la croissance de la souche sur acétate ( $\mu = 3,35 \text{ j}^{-1}$ ).



**Figure 43 : Croissance de *Polytomella sp.* sur l'éthanol et le lactate.** Les figures représentent l'évolution de la biomasse (g<sub>x</sub>.L<sup>-1</sup>) et de la concentration en substrat (g<sub>s</sub>.L<sup>-1</sup>) en fonction du temps lors de la culture de *Polytomella sp.* en fioles sur 1 g<sub>C</sub>.L<sup>-1</sup> d'éthanol (A), d'un mélange d'acétate et d'éthanol en proportion 1:2 (B), de lactate (C) et d'un mélange d'acétate et de lactate en proportion 1:2 (D). Chaque point représente la moyenne et l'écart type de triplicats biologiques.

*Polytomella sp.* a pu croître sur l'éthanol, que ce soit en condition de substrat pur ou de mélange. Encore une fois, la souche présente des capacités hétérotrophes remarquables. En condition de substrat simple, *Polytomella sp.* consomme l'intégralité de l'éthanol en 2 jours, avec un taux de croissance comparable à celui obtenu sur l'acétate ( $\mu = 2,4 \text{ j}^{-1}$ ). Le rendement en biomasse est identique à celui obtenu avec de l'acétate ou du butyrate pur (0,53 g<sub>CX</sub>.g<sub>CS</sub><sup>-1</sup>). En condition de mélange, l'intégralité des substrats organiques sont également consommés en

moins de 2 jours. La présence d'éthanol n'affecte pas la consommation de l'acétate ni la vitesse de croissance de la souche sur ce substrat ( $\mu = 2,48 \text{ j}^{-1}$ ). Si la consommation d'éthanol et d'acétate par *C. sorokiniana* a été diauxique, il est intéressant de constater que *Polytomella sp.* semble consommer l'acétate et l'éthanol simultanément. Néanmoins, en raison de la possible évaporation de l'éthanol au cours de la culture, ce résultat serait à confirmer.

En revanche, *Polytomella sp.* a été incapable de croître sur le lactate à l'instar de *C. sorokiniana*, que ce soit en condition de substrat pur ou bien de mélange. Le lactate n'inhibe toutefois pas la croissance sur l'acétate ( $\mu = 2,50 \text{ j}^{-1}$ ). Nous pointons ici que nous n'avons utilisé qu'un seul isomère du lactate (la forme L). Il serait intéressant de vérifier si des résultats similaires sont obtenus avec la forme D, ou, pour des raisons de coûts des isomères purs, en utilisant un mélange racémique (la forme L n'étant pas consommé, une consommation de lactate dans le cas d'un mélange racémique serait uniquement due à la consommation de la forme D).

## Références

- Abiusi, F., Wijffels, R.H., Janssen, M., 2020. Doubling of Microalgae Productivity by Oxygen Balanced Mixotrophy. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 8, 6065–6074.
- Adams, C., Godfrey, V., Wahlen, B., Seefeldt, L., Bugbee, B., 2013. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresour. Technol.* 131, 188–194.
- Adessi, A., McKinlay, J.B., Harwood, C.S., De Philippis, R., 2012. A *Rhodospseudomonas palustris* nifA\* mutant produces H<sub>2</sub> from NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-containing vegetable wastes. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15893–15900.
- Aghapour Aktij, S., Zirehpour, A., Mollahosseini, A., Taherzadeh, M.J., Tiraferri, A., Rahimpour, A., 2020. Feasibility of membrane processes for the recovery and purification of bio-based volatile fatty acids: A comprehensive review. *J. Ind. Eng. Chem.* 81, 24–40.
- Almagro Armenteros, J.J., Sønderby, C.K., Sønderby, S.K., Nielsen, H., Winther, O., 2017. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics* 33, 3387–3395.
- Andersen, R.A., Kawachi, M., 2005. Traditional Microalgae Isolation Techniques, in: *Algal Culturing Techniques*. Elsevier, pp. 83–100.
- Arooj, M.F., Han, S.K., Kim, S.H., Kim, D.H., Shin, H.S., 2008. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 3289–3294.
- Asunis, F., De Gioannis, G., Isipato, M., Muntoni, A., Poletini, A., Pomi, R., Rossi, A., Spiga, D., 2019. Control of fermentation duration and pH to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. *Bioresour. Technol.* 289, 121722.
- Atteia, A., Van Lis, R., Beale, S.I., 2005. Enzymes of the heme biosynthetic pathway in the nonphotosynthetic alga *Polytomella* sp. *Eukaryot. Cell* 4, 2087–2097.
- Atteia, A., Van Lis, R., Mendoza-Hernández, G., Henze, K., Martin, W., Riveros-Rosas, H., González-Halphen, D., 2003. Bifunctional aldehyde/alcohol dehydrogenase (ADHE) in chlorophyte algal mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 53, 175–188.



## Références

- Atteia, A., Van Lis, R., Ramírez, J., González-Halphen, D., 2000. *Polytomella* spp. growth on ethanol. Extracellular pH affects the accumulation of mitochondrial cytochrome c550. *Eur. J. Biochem.* 267, 2850–2858.
- Azbar, N., Çetinkaya Dokgöz, F.T., Keskin, T., Korkmaz, K.S., Syed, H.M., 2009. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 7441–7447.
- Baroukh, C., Turon, V., Bernard, O., 2017. Dynamic metabolic modeling of heterotrophic and mixotrophic microalgal growth on fermentative wastes. *PLoS Comput. Biol.* 13, 1–18.
- Barsanti, L., Gualtieri, P., 2018. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? *Algal Res.* 31, 107–115.
- Bates, R.C., Hurlbert, R.E., 1970. The Effect of Acetate on *Euglena gracilis* var. *bacillaris* as a Function of Environmental Conditions. *J. Protozool.* 17, 134–138.
- Becker, E.W., 2007. Micro algae as a source of protein. *Biotechnol Adv* 25, 207–210.
- Borics, G., Tóthmérész, B., Grigorszky, I., Padisák, J., Várbíró, G., Szabó, S., 2003. Algal assemblage types of bog-lakes in Hungary and their relation to water chemistry, hydrological conditions and habitat diversity. *Hydrobiologia* 502, 145–155.
- Bouyssié, D., Hesse, A.-M., Mouton-Barbosa, E., Rompais, M., Macron, C., Carapito, C., Gonzalez de Peredo, A., Couté, Y., Dupierris, V., Burel, A., Menetrey, J.-P., Kalaitzakis, A., Poisat, J., Romdhani, A., Burlet-Schiltz, O., Cianférani, S., Garin, J., Bruley, C., 2020. Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics*.
- Boyle, N.R., Morgan, J.A., 2009. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Syst. Biol.* 3, 1–14.
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.*
- Bricker, D.K., Taylor, E.B., Schell, J.C., Orsak, T., Boutron, A., Chen, Y.-C., Cox, J.E., Cardon, C.M., Van Vranken, J.G., Dephoure, N., Redin, C., Boudina, S., Gygi, S.P., Brivet, M., Thummel, C.S., Rutter, J., 2012. A Mitochondrial Pyruvate Carrier Required for Pyruvate

## Références

- Uptake in Yeast, *Drosophila*, and Humans. *Science* (80-. ). 337, 96–100.
- Bundhoo, Z.M.A., 2017. Coupling dark fermentation with biochemical or bioelectrochemical systems for enhanced bio-energy production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 26667–26686.
- Burgess, S.J., Taha, H., Yeoman, J.A., Iamshanova, O., Chan, K.X., Boehm, M., Behrends, V., Bundy, J.G., Bialek, W., Murray, J.W., Nixon, P.J., 2016. Identification of the elusive pyruvate reductase of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 57, 82–94.
- Burillo, E., Jorge, I., Martínez-López, D., Camafeita, E., Vazquez, J., Martín-Ventura, J.L., 2017. The Application of Proteomic Techniques in the Study of HDL Particle Characterization and Biomarker Discovery, in: *The HDL Handbook*. Elsevier, pp. 231–255.
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J.P., Ruiz-Filippi, G., Trably, E., 2017. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 158–181.
- Calvayrac, R., Laval-Martin, D., Briand, J., Farineau, J., 1981. Paramylon synthesis by *Euglena gracilis* photoheterotrophically grown under low O<sub>2</sub> pressure - Description of a mitochondrion complex. *Planta* 153, 6–13.
- Casabona, M.G., Vandenbrouck, Y., Attree, I., Couté, Y., 2013. Proteomic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inner membrane. *Proteomics* 13, 2419–23.
- Casal, M., Leão, C., 1995. Utilization of short-chain monocarboxylic acids by the yeast *Torulaspora delbrueckii*: Specificity of the transport systems and their regulation. *BBA - Mol. Cell Res.* 1267, 122–130.
- Casal, M., Paiva, S., Queirós, O., Soares-Silva, I., 2008. Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 974–994.
- Castelló, E., García y Santos, C., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., Etchebehere, C., 2009. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 5674–5682.

## Références

- Catalanotti, C., Yang, W., Posewitz, M.C., Grossman, A.R., 2013. Fermentation metabolism and its evolution in algae. *Front. Plant Sci.* 4, 1–17.
- Cavinato, C., Giuliano, A., Bolzonella, D., Pavan, P., Cecchi, F., 2012. Bio-hythane production from food waste by dark fermentation coupled with anaerobic digestion process: A long-term pilot scale experience. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 11549–11555.
- Cecchin, M., Benfatto, S., Griggio, F., Mori, A., Cazzaniga, S., Vitulo, N., Delledonne, M., Ballottari, M., 2018. Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. *Sci. Rep.* 8, 1–13.
- Chalima, A., Hatzidaki, A., Karnaouri, A., Topakas, E., 2019. Integration of a dark fermentation effluent in a microalgal-based biorefinery for the production of high-added value omega-3 fatty acids. *Appl. Energy* 241, 130–138.
- Chapman, S.P., Paget, C.M., Johnson, G.N., Schwartz, J.M., 2015. Flux balance analysis reveals acetate metabolism modulates cyclic electron flow and alternative glycolytic pathways in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Front. Plant Sci.* 6, 1–14.
- Chen, F., Johns, M.R., 1996. Relationship between substrate inhibition and maintenance energy of *Chlamydomonas reinhardtii* in heterotrophic culture. *J. Appl. Phycol.* 8, 15–19.
- Chen, F., Johns, M.R., 1994. Substrate inhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate in heterotrophic culture. *Process Biochem.* 29, 245–252.
- Chen, H., Li, T., Wang, Q., 2019. Ten years of algal biofuel and bioproducts: gains and pains. *Planta* 249, 195–219.
- Cheng, J., Xia, A., Liu, Y., Lin, R., Zhou, J., Cen, K., 2012. Combination of dark- and photo-fermentation to improve hydrogen production from *Arthrospira platensis* wet biomass with ammonium removal by zeolite. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 13330–13337.
- Chiellini, C., Guglielminetti, L., Sarrocco, S., Ciarli, A., 2020. Isolation of Four Microalgal Strains From the Lake Massaciuccoli: Screening of Common Pollutants Tolerance Pattern and Perspectives for Their Use in Biotechnological Applications. *Front. Plant Sci.* 11, 1–18.
- Chiranjeevi, P., Venkata Mohan, S., 2017. Diverse acidogenic effluents as feedstock for microalgae cultivation: Dual phase metabolic transition on biomass growth and lipid

## Références

- synthesis. *Bioresour. Technol.* 242, 191–196.
- Chisti, Y., 2013. Constraints to commercialization of algal fuels. *J. Biotechnol.* 167, 201–214.
- Chisti, Y., 2007. Algae production comparison. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306.
- Cho, H.U., Cho, H.U., Park, J.M., Park, J.M., Kim, Y.M., 2017. Enhanced microalgal biomass and lipid production from a consortium of indigenous microalgae and bacteria present in municipal wastewater under gradually mixotrophic culture conditions. *Bioresour. Technol.* 228, 290–297.
- Cho, H.U., Kim, Y.M., Choi, Y.N., Xu, X., Shin, D.Y., Park, J.M., 2015. Effects of pH control and concentration on microbial oil production from *Chlorella vulgaris* cultivated in the effluent of a low-cost organic waste fermentation system producing volatile fatty acids. *Bioresour. Technol.* 184, 245–250.
- Christophe, G., Kumar, V., Nouaille, R., Gaudet, G., Fontanille, P., Pandey, A., Socco, C.R., Larroche, C., 2012. Recent developments in microbial oils production: A possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 55, 29–46.
- CHU, C., EBIE, Y., INAMORI, Y., KONG, H., 2009. Effect of hydraulic retention time on the hydrogen yield and population of *Clostridium* in hydrogen fermentation of glucose. *J. Environ. Sci.* 21, 424–428.
- Cohen, A., van Gemert, J.M., Zoetemeyer, R.J., Breure, A.M., 1984. main characteristics and stoichiometric aspects of acidogenesis of soluble carbohydrate containing wastewaters.
- Croft, M.T., Warren, M.J., Smith, A.G., 2006. Algae need their vitamins. *Eukaryot. Cell* 5, 1175–1183.
- Davidi, L., Levin, Y., Ben-Dor, S., Pick, U., 2014. Proteome Analysis of Cytoplasmatic and Plastidic  $\beta$ -Carotene Lipid Droplets in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 167, 60–79.
- de la Cruz, V.F., Gittleson, S.M., 1981. The genus *Polytomella*: A review of classification, morphology, life cycle, metabolism, and motility. *Arch. fur Protistenkd.* 124, 1–28.
- De Meur, Q., Deutschbauer, A., Koch, M., Bayon-Vicente, G., Cabecas Segura, P., Wattiez, R., Leroy, B., 2020. New perspectives on butyrate assimilation in *Rhodospirillum rubrum*

## Références

- S1H under photoheterotrophic conditions. *BMC Microbiol.* 20, 1–20.
- De Preter, V., Arijs, I., Windey, K., Vanhove, W., Vermeire, S., Schuit, F., Rutgeerts, P., Verbeke, K., 2012. Impaired butyrate oxidation in ulcerative colitis is due to decreased butyrate uptake and a defect in the oxidation pathway\*. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 1127–1136.
- Desbois, A.P., Smith, V.J., 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1629–1642.
- Diekert, G., Wohlfarth, G., 1994. Metabolism of homoacetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 209–221.
- Duddleston, K.N., Kinney, M.A., Kiene, R.P., Hines, M.E., 2002. Anaerobic microbial biogeochemistry in a northern bog: Acetate as a dominant metabolic end product. *Global Biogeochem. Cycles* 16, 11-1-11–9.
- Duncan, S.H., Barcenilla, A., Stewart, C.S., Pryde, S.E., Flint, H.J., 2002. Acetate Utilization and Butyryl Coenzyme A (CoA):Acetate-CoA Transferase in Butyrate-Producing Bacteria from the Human Large Intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5186–5190.
- Durante, L., Hübner, W., Lauersen, K.J., Remacle, C., 2019. Characterization of the GPR1/FUN34/YaaH protein family in the green microalga *Chlamydomonas* suggests their role as intracellular membrane acetate channels. *Plant Direct* 3, 1–14.
- Eixler, S., Karsten, U., Selig, U., 2006. Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. *Phycologia* 45, 53–60.
- El Jay, A., 1996. Effects of organic solvents and solvent-atrazine interactions on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 84–90.
- Endo, H., Sansawa, H., Nakajima, K., 1977. Studies on *Chlorella regularis*, heterotrophic fast-growing strain II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration : *Plant cell Physiol.* 18, 199–205.
- Etchebehere, C., Castelló, E., Wenzel, J., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., Cabrol, L., Carminato, V.M., Carrillo-Reyes, J., Cisneros-Pérez, C., Fuentes, L.,

## Références

- Moreno-Andrade, I., Razo-Flores, E., Filippi, G.R., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., Zaiat, M., 2016. Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3371–3384.
- Fang, H.H.P., Liu, H., 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour. Technol.* 82, 87–93.
- Fang, H.H.P., Zhang, T., Liu, H., 2002. Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 112–118.
- Fei, Q., Fu, R., Shang, L., Brigham, C.J., Chang, H.N., 2015a. Lipid production by microalgae *Chlorella protothecoides* with volatile fatty acids (VFAs) as carbon sources in heterotrophic cultivation and its economic assessment. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 691–700.
- Fei, Q., Fu, R., Shang, L., Brigham, C.J., Chang, H.N., 2015b. Lipid production by microalgae *Chlorella protothecoides* with volatile fatty acids (VFAs) as carbon sources in heterotrophic cultivation and its economic assessment. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 691–700.
- Ferrigo, D., Galla, G., Sforza, E., Morosinotto, T., Barcaccia, G., Ceschi Berrini, C., 2015. Biochemical characterization and genetic identity of an oil-rich *Acutodesmus obliquus* isolate. *J. Appl. Phycol.* 27, 149–161.
- Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R., Larroche, C., 2012. Bioresource Technology Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* 114, 443–449.
- Fuentes-Ramírez, E.O., Vázquez-Acevedo, M., Cabrera-Orefice, A., Guerrero-Castillo, S., González-Halphen, D., 2021. The plastid proteome of the nonphotosynthetic chlorophycean alga *Polytomella parva*. *Microbiol. Res.* 243.
- Fujita, T., Aoyagi, H., Ogbonna, J.C., Tanaka, H., 2008. Effect of mixed organic substrate on  $\alpha$ -tocopherol production by *Euglena gracilis* in photoheterotrophic culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 371–378.
- Gao, R., Li, Z., Zhou, X., Cheng, S., Zheng, L., 2017. Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* culture with synthetic and food waste-derived volatile fatty acids for lipid production.

## Références

- Biotechnol. Biofuels 10, 1–16.
- Geider, R.J., La Roche, J., 2002. Redfield revisited: Variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* 37, 1–17.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., Esposito, G., 2015. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Appl. Energy*.
- Gibbs, S.P., 1993. The Evolution of Algal Chloroplasts, in: Lewin, R.A. (Ed.), *Origins of Plastids: Symbiogenesis, Prochlorophytes and the Origins of Chloroplasts*. Springer US, Boston, MA, pp. 107–121.
- Gimmler, H., 2001. 9 Acidophilic and Acidotolerant Algae.
- Giordano, M., Beardall, J., Raven, J.A., 2005. CO<sub>2</sub> Concentrating Mechanisms in Algae : Mechanisms , Environmental Modulation , and Evolution.
- Gissibl, A., Sun, A., Care, A., Nevalainen, H., Sunna, A., 2019. Bioproducts From *Euglena gracilis*: Synthesis and Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 1–16.
- Gonzalez, N.H., Felsner, G., Schramm, F.D., Klingl, A., Maier, U.-G., Bolte, K., 2011. A Single Peroxisomal Targeting Signal Mediates Matrix Protein Import in Diatoms. *PLoS One* 6, e25316.
- Griffiths, M.J., Garcin, C., van Hille, R.P., Harrison, S.T.L., 2011. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *J. Microbiol. Methods* 85, 119–123.
- Gruber, P.J., Frederick, S.E., Tolbert, N.E., 1974. Enzymes Related to Lactate Metabolism in Green Algae and Lower Land Plants. *Plant Physiol.* 53, 167–170.
- Guiry, M.D., 2012. How many species of algae are there? *J. Phycol.* 48, 1057–1063.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H., Steyer, J.P., 2014. Predictive and explicative models of fermentative hydrogen production from solid organic waste: Role of butyrate and lactate pathways. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 7476–7485.
- Hafez, H., Nakhla, G., El. Naggat, M.H., Elbeshbishy, E., Baghchehsaraee, B., 2010. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 81–92.

## Références

- Hallenbeck, P.C., 2005. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci. Technol.* 52, 21–29.
- Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R., 2002. Biological hydrogen production; Fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1185–1193.
- Harvey, M., Pilgrim, S., 2011. The new competition for land: Food, energy, and climate change. *Food Policy* 36, S40–S51.
- Hawkes, F.R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., 2007. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 172–184.
- Heifetz, Peter B., Förster, B., Osmond, C.B., Giles, L.J., Boynton, J.E., 2000. Effects of acetate on facultative autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* assessed by photosynthetic measurements and stable isotope analyses. *Plant Physiol.* 122, 1439–1445.
- Heifetz, Peter B., Förster, B., Osmond, C.B., Giles, L.J., Boynton, J.E., 2000. Effects of Acetate on Facultative Autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii*; Assessed by Photosynthetic Measurements and Stable Isotope Analyses. *Plant Physiol.* 122, 1439 LP – 1446.
- Heimann, K., Huerlimann, R., 2015. Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. *Handb. Mar. Microalgae Biotechnol. Adv.* 25–41.
- Heinrich, B., Cook, J.R., 1967. Studies on the Respiratory Physiology of *Euglena gracilis* Cultured on Acetate or. *J. Protozool.* 14, 553–565.
- Heizmann, P., 1972. INFLUENCE DE L'ECLAIREMENT SUR L'EVOLUTION DES POLYSOMES DANS DES CULTURES D'EUGLENA GRACILIS ETIOLEES. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 277, 149–160.
- Hettema, E.H., van Roermund, C.W., Distel, B., van den Berg, M., Vilela, C., Rodrigues-Pousada, C., Wanders, R.J., Tabak, H.F., 1996. The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15, 3813–22.
- Heyndrickx, M., Vansteenbeeck, A., De Vos, P., De Ley, J., 1986. Hydrogen gas production



## Références

- from continuous fermentation of glucose in a minimal medium with *Clostridium butyricum* LMG 1213t1. *Syst. Appl. Microbiol.* 8, 239–244.
- Hillebrand, H., Sommer, U., 1999. The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal. *Limnol. Oceanogr.* 44, 440–446.
- Hosotani, K., Ohkochi, T., Inui, H., Yokota, A., Nakano, Y., Kitaoka, S., 1988. Photoassimilation of Fatty Acids, Fatty Alcohols and Sugars by *Euglena gracilis* Z. *Microbiology* 134, 61–66.
- Hu, Z., Qi, Y., Zhao, L., Chen, G., 2019. Interactions Between Microalgae and Microorganisms for Wastewater Remediation and Biofuel Production. *Waste and Biomass Valorization* 10, 3907–3919.
- Huang, Z., Yu, X., Miao, H., Ren, H., Zhao, M., 2012. Enzymatic dynamics of microbial acid tolerance response (ATR) during the enhanced biohydrogen production process via anaerobic digestion. *HE* 37, 10655–10662.
- Husic, D.W., Tolbert, N.E., 1987. Inhibition of glycolate and D-lactate metabolism in a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant deficient in mitochondrial respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 1555–1559.
- Hwang, J., Kabra, A.N., Rae, J., Jeon, B., 2014. Photoheterotrophic microalgal hydrogen production using acetate- and butyrate-rich wastewater effluent 78, 887–894.
- Hwang, J.H., Kabra, A.N., Kim, J.R., Jeon, B.H., 2014. Photoheterotrophic microalgal hydrogen production using acetate- and butyrate-rich wastewater effluent. *Energy* 78, 887–894.
- Jarboe, L.R., Royce, L.A., Liu, P., 2013. Understanding biocatalyst inhibition by carboxylic acids 4, 1–8.
- Jiang, Y., Xiao, P., Shao, Q., Qin, H., Hu, Z., Lei, A., Wang, J., 2017. Metabolic responses to ethanol and butanol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–16.
- Johnson, X., Alric, J., 2013. Central Carbon Metabolism and Electron Transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic Constraints for Carbon Partitioning between Oil and Starch. *Eukaryot. Cell* 12, 776–793.

## Références

- Johnson, X., Alric, J., 2012. Interaction between starch breakdown, acetate assimilation, and photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 287, 26445–26452.
- Jolkver, E., Emer, D., Ballan, S., Kra, R., Eikmanns, B.J., Marin, K., 2009. Identification and Characterization of a Bacterial Transport System for the Uptake of Pyruvate, Propionate, and Acetate in *Corynebacterium glutamicum* □ 191, 940–948.
- Kambouris, M.E., Pavlidis, C., Skoufas, E., Arabatzis, M., Kantzanou, M., Velegraki, A., Patrinos, G.P., 2018. Culturomics: A new kid on the block of OMICS to enable personalized medicine. *Omi. A J. Integr. Biol.* 22, 108–118.
- Kang, D., Gho, Y.S., Suh, M., Kang, C., 2002. Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis [5]. *Bull. Korean Chem. Soc.* 23, 1511–1512.
- Kato, N., Nelson, G., Lauersen, K.J., 2021. Subcellular Localizations of Catalase and Exogenously Added Fatty Acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cells* 10, 1940.
- Keeling, P.J., 2004. Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *Am. J. Bot.* 91, 1481–1493.
- Kenny, P., Flynn, K.J., 2017. Physiology limits commercially viable photoautotrophic production of microalgal biofuels. *J. Appl. Phycol.* 29, 2713–2727.
- Khanal, S.K., Chen, W.H., Li, L., Sung, S., 2004. Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products. *Int. J. Hydrogen Energy* 29, 1123–1131.
- Kim, S.H., Han, S.K., Shin, H.S., 2006. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochem.* 41, 199–207.
- Koku, H., Erolu, I., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L., 2002. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1315–1329.
- Kong, F., Burlacot, A., Liang, Y., Légeret, B., Alseekh, S., Brotman, Y., Fernie, A.R., Krieger-Liszkay, A., Beisson, F., Peltier, G., Li-Beisson, Y., 2018. Interorganelle communication: Peroxisomal MALATE DEHYDROGENASE2 connects lipid catabolism to

## Références

- photosynthesis through redox coupling in chlamydomonas. *Plant Cell* 30, 1824–1847.
- Kong, F., Liang, Y., Légeret, B., Beyly-Adriano, A., Blangy, S., Haslam, R.P., Napier, J.A., Beisson, F., Peltier, G., Li-Beisson, Y., 2017. Chlamydomonas carries out fatty acid  $\beta$ -oxidation in ancestral peroxisomes using a bona fide acyl-CoA oxidase. *Plant J.* 90, 358–371.
- Kottuparambil, S., Thankamony, R.L., Agusti, S., 2019. Euglena as a potential natural source of value-added metabolites. A review. *Algal Res.* 37, 154–159.
- Koutinas, A.A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., Kookos, I.K., 2014. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel* 116, 566–577.
- Krieger-Liszky, A., Feilke, K., 2016. The Dual Role of the Plastid Terminal Oxidase PTOX: Between a Protective and a Pro-oxidant Function. *Front. Plant Sci.* 6.
- Kumar, K., Dasgupta, C.N., Das, D., 2014. Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. *Bioresour. Technol.* 167, 358–366.
- Larkum, A.W.D., Ross, I.L., Kruse, O., Hankamer, B., 2012. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends Biotechnol.* 30, 198–205.
- Lauersen, K.J., Willamme, R., Coosemans, N., Joris, M., Kruse, O., Remacle, C., 2016. Peroxisomal microbodies are at the crossroads of acetate assimilation in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res.* 16, 266–274.
- Lee, H.S., Salerno, M.B., Rittmann, B.E., 2008. Thermodynamic evaluation on H<sub>2</sub> production in glucose fermentation. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2401–2407.
- Lee, J.Z., Klaus, D.M., Maness, P.C., Spear, J.R., 2007. The effect of butyrate concentration on hydrogen production via photofermentation for use in a Martian habitat resource recovery process. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 3301–3307.
- Li-Beisson, Y., Thelen, J.J., Fedosejevs, E., Harwood, J.L., 2019. The lipid biochemistry of eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 74, 31–68.
- Li, T., Gargouri, M., Feng, J., Park, J.J., Gao, D., Miao, C., Dong, T., Gang, D.R., Chen, S.,

## Références

2015. Regulation of starch and lipid accumulation in a microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresour. Technol.* 180, 250–257.
- Liang, Y., Kong, F., Torres-Romero, I., Burlacot, A., Cuine, S., Légeret, B., Billon, E., Brotman, Y., Alseekh, S., Fernie, A.R., Beisson, F., Peltier, G., Li-Beisson, Y., 2019. Branched-Chain Amino Acid Catabolism Impacts Triacylglycerol Homeostasis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 179, 1502–1514.
- Liebthal, M., Maynard, D., Dietz, K.-J., 2018. Peroxiredoxins and Redox Signaling in Plants. *Antioxid. Redox Signal.* 28, 609–624.
- Lin, P.Y., Whang, L.M., Wu, Y.R., Ren, W.J., Hsiao, C.J., Li, S.L., Chang, J.S., 2007. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 1728–1735.
- Lin, Z., Li, C., Ju, L.K., 2019. Glycerol and Acetate Additions to Maximize Lipid Content in High-Density Cultures of Phagotrophic Alga *Ochromonas danica*. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 96, 231–238.
- Lin, Z., Raya, A., Ju, L.K., 2014. Microalga *Ochromonas danica* fermentation and lipid production from waste organics such as ketchup. *Process Biochem.* 49, 1383–1392.
- Liu, C.-H., Chang, C.-Y., Liao, Q., Zhu, X., Chang, J.-S., 2013. Photoheterotrophic growth of *Chlorella vulgaris* ESP6 on organic acids from dark hydrogen fermentation effluents. *Bioresour. Technol.* 145, 331–336.
- Liu, C.H., Chang, C.Y., Liao, Q., Zhu, X., Chang, J.S., 2013a. Photoheterotrophic growth of *Chlorella vulgaris* ESP6 on organic acids from dark hydrogen fermentation effluents. *Bioresour. Technol.* 145, 331–336.
- Liu, C.H., Chang, C.Y., Liao, Q., Zhu, X., Chang, J.S., 2013b. Photoheterotrophic growth of *Chlorella vulgaris* ESP6 on organic acids from dark hydrogen fermentation effluents. *Bioresour. Technol.* 145, 331–336.
- Liu, C.H., Chang, C.Y., Liao, Q., Zhu, X., Liao, C.F., Chang, J.S., 2013c. Biohydrogen production by a novel integration of dark fermentation and mixotrophic microalgae cultivation, in: *International Journal of Hydrogen Energy*. Elsevier Ltd, pp. 15807–15814.
- Liu, H., Grot, S., Logan, B.E., 2005. Electrochemically assisted microbial production of

## Références

- hydrogen from acetate. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4317–4320.
- Liu, W., Huang, S., Zhou, A., Zhou, G., Ren, N., Wang, A., Zhuang, G., 2012. Hydrogen generation in microbial electrolysis cell feeding with fermentation liquid of waste activated sludge. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 13859–13864.
- Lizzul, A.M., Lekuona-Amundarain, A., Purton, S., Campos, L.C., 2018. Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. *Biology (Basel)*. 7, 1–12.
- Llamas, M., Dourou, M., González-Fernández, C., Aggelis, G., Tomás-Pejó, E., 2020a. Screening of oleaginous yeasts for lipid production using volatile fatty acids as substrate. *Biomass and Bioenergy* 138, 1–10.
- Llamas, M., Tomás-Pejó, E., González-Fernández, C., 2020b. VOLATILE FATTY ACIDS FROM ORGANIC WASTES AS NOVEL LOW-COST CARBON SOURCE FOR *Yarrowia lipolytica*. *N. Biotechnol.* 56, 123–129.
- Logan, B.E., Call, D., Cheng, S., Hamelers, H.V.M., Sleutels, T.H.J.A., Jeremiasse, A.W., Rozendal, R.A., 2008. Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8630–8640.
- Lomas, M.W., Glibert, P.M., 2000. COMPARISONS OF NITRATE UPTAKE , STORAGE , AND REDUCTION IN MARINE DIATOMS AND FLAGELLATES 1 Diatoms , but not flagellates , have been shown to increase rates of nitrogen release after a shift from a low growth irradiance to a much higher experimental ir 913, 903–913.
- Lu, W., Du, J., Schwarzer, N.J., Gerbig-Smentek, E., Einsle, O., Andrade, S.L.A., 2012. The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 13254–13259.
- Luo, Y., Zhang, H., Salerno, M., Logan, B.E., Bruns, M.A., 2008. Organic loading rates affect composition of soil-derived bacterial communities during continuous, fermentative biohydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 6566–6576.
- Mariakakis, I., Bischoff, P., Krampe, J., Meyer, C., Steinmetz, H., 2011. Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 10690–10700.

## Références

- Marquez, F.J., Sasaki, K., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., 1993. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 76, 408–410.
- Martiny, A.C., Vrugt, J.A., Lomas, M.W., 2014. Concentrations and ratios of particulate organic carbon, nitrogen, and phosphorus in the global ocean 1–7.
- Matsudo, M.C., Sousa, T.F., Pérez-Mora, L.S., Bezerra, R.P., Sato, S., Carvalho, J.C.M., 2017. Ethanol as complementary carbon source in *Scenedesmus obliquus* cultivation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 92, 781–786.
- May, P., Wienkoop, S., Kempa, S., Usadel, B., Christian, N., Rupprecht, J., Weiss, J., Recuenco-Munoz, L., Ebenhöf, O., Weckwerth, W., Walther, D., 2008. Metabolomics- and Proteomics-Assisted Genome Annotation and Analysis of the Draft Metabolic Network of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 179, 157–166.
- Mayo, A.W., 1997. Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialgal *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria 69.
- Millar, A.H., Heazlewood, J.L., 2003. Genomic and Proteomic Analysis of Mitochondrial Carrier Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131, 443–453.
- Mira, N.P., Teixeira, M.C., Sá-Correia, I., 2010. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: A genome-wide view. *Omi. A J. Integr. Biol.* 14, 525–540.
- Mishra, S.K., Suh, W.I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M.S., Yang, J.W., 2014. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresour. Technol.* 155, 330–333.
- Miwa, T., Esaki, H., Umemori, J., Hino, T., 1997. Activity of H<sup>2</sup>-ATPase in Ruminant Bacteria with Special Reference to Acid Tolerance 63, 2155–2158.
- Moon, M., Kim, C.W., Park, W.K., Yoo, G., Choi, Y.E., Yang, J.W., 2013. Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res.* 2, 352–357.
- Moreno-Andrade, I., Carrillo-Reyes, J., Santiago, S.G., Bujanos-Adame, M.C., 2015. Biohydrogen from food waste in a discontinuous process: Effect of HRT and microbial community analysis. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 17246–17252.

## Références

- Morth, J.P., Pedersen, B.P., Buch-Pedersen, M.J., Andersen, J.P., Vilsen, B., Palmgren, M.G., Nissen, P., 2011. A structural overview of the plasma membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-ATPase ion pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 60–70.
- Moscoviz, R., Trably, E., Bernet, N., Carrère, H., 2018a. The environmental biorefinery: State-of-the-art on the production of hydrogen and value-added biomolecules in mixed-culture fermentation. *Green Chem.* 20, 3159–3179.
- Moscoviz, R., Trably, E., Bernet, N., Carrère, H., 2018b. The environmental biorefinery: State-of-the-art on the production of hydrogen and value-added biomolecules in mixed-culture fermentation. *Green Chem.* 20, 3159–3179.
- Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., Ohba, M., 2002. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1367–1371.
- Ogbonna, J.C., Tomiyama, S., Tanaka, H., 1998. Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of  $\alpha$ -tocopherol. *J. Appl. Phycol.* 10, 67–74.
- Oh, Y.K., Kim, S.H., Kim, M.S., Park, S., 2004. Thermophilic biohydrogen production from glucose with trickling biofilter. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 690–698.
- Okumura, Y., Koyama, J., Takaku, H., Satoh, H., 2001. Influence of organic solvents on the growth of marine microalgae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 123–128.
- Oliveira, C.A., Fuess, L.T., Soares, L.A., Damianovic, M.H.R.Z., 2020. Thermophilic biohydrogen production from sugarcane molasses under low pH: Metabolic and microbial aspects. *Int. J. Hydrogen Energy* 45, 4182–4192.
- Ozyurt, B., Soysal, F., Hitit, Z.Y., Camcioglu, S., Akay, B., Ertunc, S., 2019. An efficient dark fermentative hydrogen production by GMV control of pH. *Int. J. Hydrogen Energy* 44, 19709–19718.
- Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., Trably, E., 2017. Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. *Appl. Energy* 198, 77–87.
- Palomo-Briones, R., Trably, E., López-Lozano, N.E., Celis, L.B., Méndez-Acosta, H.O., Bernet, N., Razo-Flores, E., 2018. Hydrogen metabolic patterns driven by *Clostridium-Streptococcus* community shifts in a continuous stirred tank reactor. *Appl. Microbiol.*

## Références

- Biotechnol. 102, 2465–2475.
- Pan, R., Liu, J., Wang, S., Hu, J., 2020. Peroxisomes: versatile organelles with diverse roles in plants. *New Phytol.* 225, 1410–1427.
- Pan, Y., Yang, J., Gong, Y., Li, X., Hu, H., 2017. 3-Hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase involved in isoleucine catabolism regulates triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160409.
- Patel, A., Mahboubi, A., Horváth, I.S., Taherzadeh, M.J., Rova, U., Christakopoulos, P., Matsakas, L., 2021a. Volatile Fatty Acids (VFAs) Generated by Anaerobic Digestion Serve as Feedstock for Freshwater and Marine Oleaginous Microorganisms to Produce Biodiesel and Added-Value Compounds. *Front. Microbiol.* 12, 1–17.
- Patel, A., Sarkar, O., Rova, U., Christakopoulos, P., Matsakas, L., 2021b. Valorization of volatile fatty acids derived from low-cost organic waste for lipogenesis in oleaginous microorganisms-A review. *Bioresour. Technol.* 321, 124457.
- Perez-Garcia, O., Bashan, Y., 2015. Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics, in: *Algal Biorefineries*. Springer International Publishing, Cham, pp. 61–131.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* 45, 11–36.
- Petrova, V.Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A. V., Schmitt, M.J., 2004. Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem. J.* 380, 393–400.
- Pittman, J.K., Dean, A.P., Osundeko, O., 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour. Technol.* 102, 17–25.
- Plancke, C., Vigeolas, H., Höhner, R., Roberty, S., Emonds-Alt, B., Larosa, V., Willamme, R., Duby, F., Onga Dhali, D., Thonart, P., Hiligsmann, S., Franck, F., Eppe, G., Cardol, P., Hippler, M., Remacle, C., 2014. Lack of isocitrate lyase in *Chlamydomonas* leads to changes in carbon metabolism and in the response to oxidative stress under mixotrophic growth. *Plant J.* 77, 404–417.
- PRINGSHEIM, E.G., 1955. The Genus *Polytomella* \*. *J. Protozool.* 2, 137–145.



## Références

- Qi, W., Mei, S., Yuan, Y., Li, X., Tang, T., Zhao, Q., 2018. Enhancing fermentation wastewater treatment by co-culture of microalgae with volatile fatty acid- and alcohol-degrading bacteria. *Algal Res.* 31, 31–39.
- Rafrafi, Y., Trably, E., Latrille, E., Meynial-salles, I., 2013. Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen 8.
- Ragsdale, S.W., Pierce, E., 2008. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1784, 1873–1898.
- Ratlidge, C., 1994. Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids, in: Kamel, B.S., Kakuda, Y. (Eds.), *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids*. Springer US, Boston, MA, pp. 235–291.
- Redfield, A.C., 1934. On the Proportions of Organic Derivatives in Sea Water and Their Relation to the Composition of Plankton, in: *James Johnstone Memorial Volume*, University Press of Liverpool. pp. 176–192.
- Remize, F., Andrieu, E., Dequin, S., 2000. Engineering of the Pyruvate Dehydrogenase Bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the Cytosolic Mg<sup>2+</sup> and Mitochondrial K<sup>+</sup> Acetaldehyde Dehydrogenases Ald6p and Ald4p in Acetate Formation during Alcoholic Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3151–3159.
- Ren, H.Y., Kong, F., Ma, J., Zhao, L., Xie, G.J., Xing, D., Guo, W.Q., Liu, B.F., Ren, N.Q., 2018a. Continuous energy recovery and nutrients removal from molasses wastewater by synergistic system of dark fermentation and algal culture under various fermentation types. *Bioresour. Technol.* 252, 110–117.
- Ren, H.Y., Liu, B.F., Kong, F., Zhao, L., Ma, J., Ren, N.Q., 2018b. Favorable energy conversion efficiency of coupling dark fermentation and microalgae production from food wastes. *Energy Convers. Manag.* 166, 156–162.
- Ren, N., Xing, D., Rittmann, B.E., Zhao, L., Xie, T., Zhao, X., 2007. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environ. Microbiol.* 9, 1112–1125.
- Rezayian, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., 2019. Oxidative damage and antioxidative system in algae. *Toxicol. Reports* 6, 1309–1313.

## Références

- Ricke, S.C., 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult Sci* 82, 632–639.
- Rismani-Yazdi, H., Hampel, K.H., Lane, C.D., Kessler, B.A., White, N.M., Moats, K.M., Thomas Allnut, F.C., 2015. High-productivity lipid production using mixed trophic state cultivation of *Auxenochlorella* (*Chlorella*) *protothecoides*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 639–650.
- Roach, T., Sedoud, A., Krieger-Liszkay, A., 2013. Acetate in mixotrophic growth medium affects photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* and protects against photoinhibition. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1827, 1183–1190.
- Rodrigues, G., Pais, C., 2000. The Influence of Acetic and Other Weak Carboxylic Acids on Growth and Cellular Death of the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Food Technol. Biotechnol.* 38, 27–32.
- Rossi, S., Díez-Montero, R., Rueda, E., Castillo Cascino, F., Parati, K., García, J., Ficara, E., 2020. Free ammonia inhibition in microalgae and cyanobacteria grown in wastewaters: Photo-respirometric evaluation and modelling. *Bioresour. Technol.* 305, 123046.
- Rottensteiner, H., Theodoulou, F.L., 2006. The ins and outs of peroxisomes: Co-ordination of membrane transport and peroxisomal metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763, 1527–1540.
- Round, F., 1980. THE EVOLUTION OF PIGMENTED AND UNPIGMENTED UNICELLS -A RECONSIDERATION OF THE PROTISTA. *BioSystems* 12, 61–69.
- Royce, L.A., Liu, P., Stebbins, M.J., Hanson, B.C., Jarboe, L.R., 2013. The damaging effects of short chain fatty acids on *Escherichia coli* membranes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8317–8327.
- Russell, J.B., 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Bacteriol.*
- Saad, N.M.C., 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 13172–13191.
- Sajjadi, B., Chen, W.Y., Raman, A.A.A., Ibrahim, S., 2018. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their

## Références

- effects on fatty acid composition. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 97, 200–232.
- Salazar-Torres, G., de Moraes Huszar, V.L., 2012. Microalgae community of the Huaytire wetland, an Andean high-altitude wetland in Peru. *Acta Limnol. Bras.* 24, 285–292.
- Sambusiti, C., Bellucci, M., Zabaniotou, A., Beneduce, L., Monlau, F., 2015. Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: A comprehensive review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 44, 20–36.
- Santiago, S.G., Trably, E., Latrille, E., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., 2019. The hydraulic retention time influences the abundance of *Enterobacter*, *Clostridium* and *Lactobacillus* during the hydrogen production from food waste. *Lett. Appl. Microbiol.* 69, 138–147.
- Schwacke, R., Ponce-Soto, G.Y., Krause, K., Bolger, A.M., Arsova, B., Hallab, A., Gruden, K., Stitt, M., Bolger, M.E., Usadel, B., 2019. MapMan4: A Refined Protein Classification and Annotation Framework Applicable to Multi-Omics Data Analysis. *Mol. Plant* 12, 879–892.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., Selbach, M., 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342.
- Selim, K.A., Lapina, T., Forchhammer, K., Ermilova, E., 2020. Interaction of N-acetyl-l-glutamate kinase with the PII signal transducer in the non-photosynthetic alga *Polytomella parva*: Co-evolution towards a hetero-oligomeric enzyme. *FEBS J.* 287, 465–482.
- Sforza, E., Cipriani, R., Morosinotto, T., Bertuccio, A., Giacometti, G.M., 2012. Excess CO<sub>2</sub> supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Bioresour. Technol.* 104, 523–529.
- Sforza, E., Pastore, M., Spagni, A., Bertuccio, A., 2018. Microalgae-bacteria gas exchange in wastewater: how mixotrophy may reduce the oxygen supply for bacteria. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 28004–28014.
- Sheehan John, Terri, D., John, B., Paul, R., 2012. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species. *Eur. Phys. J. C* 72, 14.
- Shen, X.F., Liu, J.J., Chauhan, A.S., Hu, H., Ma, L.L., Lam, P.K.S., Zeng, R.J., 2016. Combining nitrogen starvation with sufficient phosphorus supply for enhanced biodiesel

## Références

- productivity of *Chlorella vulgaris* fed on acetate. *Algal Res.* 17, 261–267.
- Shtaida, N., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., 2015. The role of pyruvate hub enzymes in supplying carbon precursors for fatty acid synthesis in photosynthetic microalgae. *Photosynth. Res.* 125, 407–422.
- Sikora, A., Baszczyk, M., Jurkowski, M., Zielenkiewicz, U., 2013. Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence? *Lact. Acid Bact. - R D Food, Heal. Livest. Purp.*
- Silva-Illanes, F., Tapia-Venegas, E., Schiappacasse, M.C., Trably, E., Ruiz-Filippi, G., 2017. Impact of hydraulic retention time (HRT) and pH on dark fermentative hydrogen production from glycerol. *Energy* 141, 358–367.
- Smith, R.T., Bangert, K., Wilkinson, S.J., Gilmour, D.J., 2015. Synergistic carbon metabolism in a fast growing mixotrophic freshwater microalgal species *Micractinium inermum*. *Biomass and Bioenergy* 82, 73–86.
- Song, J., An, D., Ren, N., Zhang, Y., Chen, Y., 2011. Effects of pH and ORP on microbial ecology and kinetics for hydrogen production in continuously dark fermentation. *Bioresour. Technol.* 102, 10875–10880.
- Tardif, M., Atteia, A., Specht, M., Cogne, G., Rolland, N., Brugière, S., Hippler, M., Ferro, M., Bruley, C., Peltier, G., Vallon, O., Cournac, L., 2012. PredAlgo: A New Subcellular Localization Prediction Tool Dedicated to Green Algae. *Mol. Biol. Evol.* 29, 3625–3639.
- Temudo, M.F., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M., 2007. Influence of the pH on (Open) mixed culture fermentation of glucose: A chemostat study. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 69–79.
- Thauer, R.K., 1998. SPECIAL Biochemistry of methanogenesis : a tribute to 2377–2406.
- Ting, C.H., Lee, D.J., 2007. Production of hydrogen and methane from wastewater sludge using anaerobic fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 677–682.
- Turon, V, Baroukh, C., Trably, E., Latrille, E., Fouilland, E., Steyer, J., 2015. Bioresource Technology Use of fermentative metabolites for heterotrophic microalgae growth : Yields and kinetics. *Bioresour. Technol.* 175, 342–349.

## Références

- Turon, V., Baroukh, C., Trably, E., Latrille, E., Fouilland, E., Steyer, J.P., 2015a. Use of fermentative metabolites for heterotrophic microalgae growth: Yields and kinetics. *Bioresour. Technol.* 175, 342–349.
- Turon, V., Trably, E., Fayet, A., Fouilland, E., Steyer, J.P., 2015b. Raw dark fermentation effluent to support heterotrophic microalgae growth: Microalgae successfully outcompete bacteria for acetate. *Algal Res.* 12, 119–125.
- Turon, V., Trably, E., Fouilland, E., Steyer, J.-P., 2015c. Growth of *Chlorella sorokiniana* on a mixture of volatile fatty acids: the effects of light and temperature. *Bioresour. Technol.* 198, 852–860.
- Turon, V., Trably, E., Fouilland, E., Steyer, J.-P., 2015d. Growth of *Chlorella sorokiniana* on a mixture of volatile fatty acids: The effects of light and temperature. *Bioresour. Technol.* 198, 852–860.
- Ueno, Y., Fukui, H., Goto, M., 2007. Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1413–1419.
- Ueno, Y., Otsuka, S., Morimoto, M., 1996. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 194–197.
- Uk, H., Mo, Y., Choi, Y., Xu, X., Yun, D., Moon, J., 2015. Bioresource Technology Effects of pH control and concentration on microbial oil production from *Chlorella vulgaris* cultivated in the effluent of a low-cost organic waste fermentation system producing volatile fatty acids 184, 245–250.
- Ullah, A., Chandrasekaran, G., Brul, S., Smits, G.J., Superior, I., Superior, I., 2013. Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure 4, 1–10.
- Uyar, B., Eroglu, I., Yu, M., 2009. Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents 34, 4517–4523.
- Van Den Bogaard, P.T.C., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., De Vos, W.M., 2000. Control of lactose transport,  $\beta$ -galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *J. Bacteriol.* 182, 5982–5989.
- Van Ginkel, S., Logan, B.E., 2005. Inhibition of biohydrogen production by undissociated

## Références

- acetic and butyric acids. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9351–9356.
- Van Ginkel, S., Sung, S., Lay, J.J., 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4726–4730.
- van Lis, R., Couté, Y., Brugière, S., Tourasse, N.J., Laurent, B., Nitschke, W., Vallon, O., Atteia, A., 2021. Phylogenetic and functional diversity of aldehyde-alcohol dehydrogenases in microalgae. *Plant Mol. Biol.* 105, 497–511.
- Van Lis, R., González-Halphen, D., Atteia, A., 2005. Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1708, 23–34.
- van Roermund, C.W.T., Schroers, M.G., Wiese, J., Facchinelli, F., Kurz, S., Wilkinson, S., Charton, L., Wanders, R.J.A., Waterham, H.R., Weber, A.P.M., Link, N., 2016. The Peroxisomal NAD Carrier from *Arabidopsis* Imports NAD in Exchange with AMP. *Plant Physiol.* 171, 2127–2139.
- van Roermund, C.W.T., Tabak, H.F., van den Berg, M., Wanders, R.J.A., Hettema, E.H., 2000. Pex11p Plays a Primary Role in Medium-Chain Fatty Acid Oxidation, a Process That Affects Peroxisome Number and Size in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 150, 489–498.
- Vavilin, V.A., Rytow, S. V., Lokshina, L.Y., 1995. Modelling hydrogen partial pressure change as a result of competition between the butyric and propionic groups of acidogenic bacteria. *Bioresour. Technol.* 54, 171–177.
- Walter, K.A., Nair, R. V., Cary, J.W., Bennett, G.N., Papoutsakis, E.T., 1993. Sequence and arrangement of two genes of the butyrate-synthesis pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene* 134, 107–111.
- Wang, Y., Rischer, H., Eriksen, N.T., Wiebe, M.G., 2013. Mixotrophic continuous flow cultivation of *Chlorella protothecoides* for lipids. *Bioresour. Technol.* 144, 608–614.
- Wieczorek, S., Combes, F., Lazar, C., Gai Gianetto, Q., Gatto, L., Dorffer, A., Hesse, A.-M., Couté, Y., Ferro, M., Bruley, C., Burger, T., 2017. DAPAR & ProStaR: software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics. *Bioinformatics* 33, 135–136.

## Références

- Wilken, S., Schuurmans, J.M., Matthijs, H.C.P., 2014. Do mixotrophs grow as photoheterotrophs? Photophysiological acclimation of the chrysophyte *ochromonas danica* after feeding. *New Phytol.* 204, 882–889.
- Wong, Y.M., Wu, T.Y., Juan, J.C., 2014. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 34, 471–482.
- Wu, M., Zhao, X., Shen, Y., Shi, Z., Li, G., Ma, T., 2021. Efficient simultaneous utilization of glucose and xylose from corn straw by *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 to produce microbial exopolysaccharide. *Bioresour. Technol.* 319, 124126.
- Wu, Y.H., Hu, H.Y., Yu, Y., Zhang, T.Y., Zhu, S.F., Zhuang, L.L., Zhang, X., Lu, Y., 2014. Microalgal species for sustainable biomass/lipid production using wastewater as resource: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 33, 675–688.
- Xia, A., Cheng, J., Murphy, J.D., 2016. Innovation in biological production and upgrading of methane and hydrogen for use as gaseous transport biofuel. *Biotechnol. Adv.* 34, 451–472.
- Xie, X., Huang, A., Gu, W., Zang, Z., Pan, G., Gao, S., He, L., Zhang, B., Niu, J., Lin, A., Wang, G., 2016. Photorespiration participates in the assimilation of acetate in *Chlorella sorokiniana* under high light. *New Phytol.* 209, 987–998.
- Xie, Z., Lin, W., Liu, J., Luo, J., 2020. Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for biomass production by using pH-stat culture medium: Glucose-Acetate-Phosphorus (GAP). *Bioresour. Technol.* 313, 123506.
- Xu, H., Miao, X., Wu, Q., 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* 126, 499–507.
- Yang, L., Chen, J., Qin, S., Zeng, M., Jiang, Y., Hu, L., Xiao, P., Hao, W., Hu, Z., Lei, A., Wang, J., 2018. Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Biofuels* 11, 1–12.
- Yeh, K.L., Chen, C.Y., Chang, J.S., 2012. PH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. *Biochem. Eng. J.* 64, 1–7.
- Zhang, Z., Sun, D., Wu, T., Li, Y., Lee, Y., Liu, J., Chen, F., 2017. The synergistic energy and carbon metabolism under mixotrophic cultivation reveals the coordination between

## Références

- photosynthesis and aerobic respiration in *Chlorella zofingiensis*. *Algal Res.* 25, 109–116.
- Zolman, B.K., Martinez, N., Millius, A., Adham, A.R., Bartel, B., 2008. Identification and Characterization of *Arabidopsis* Indole-3-Butyric Acid Response Mutants Defective in Novel Peroxisomal Enzymes. *Genetics* 180, 237–251.
- Zuo, Z., Zhu, Y., Bai, Y., Wang, Y., 2012. Plant Physiology and Biochemistry Acetic acid-induced programmed cell death and release of volatile organic compounds in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol. Biochem.* 51, 175–184.



