



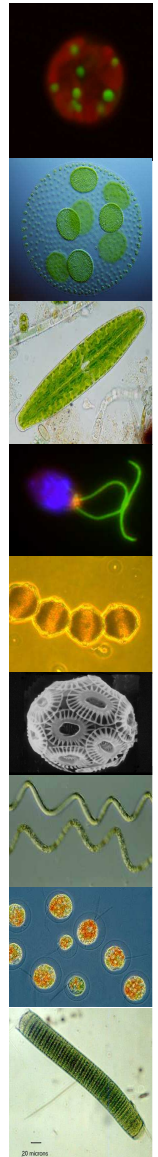
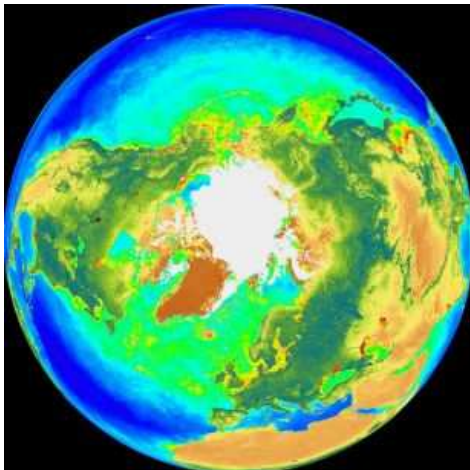
# Produire des biocarburants à partir de micro-algues : quels enjeux pour la recherche ?

Gilles Peltier

Institut de Biologie Environnementale et Biotechnologie  
CEA, CNRS, Université Aix Marseille

CEA Cadarache

[gilles.peltier@cea.fr](mailto:gilles.peltier@cea.fr)

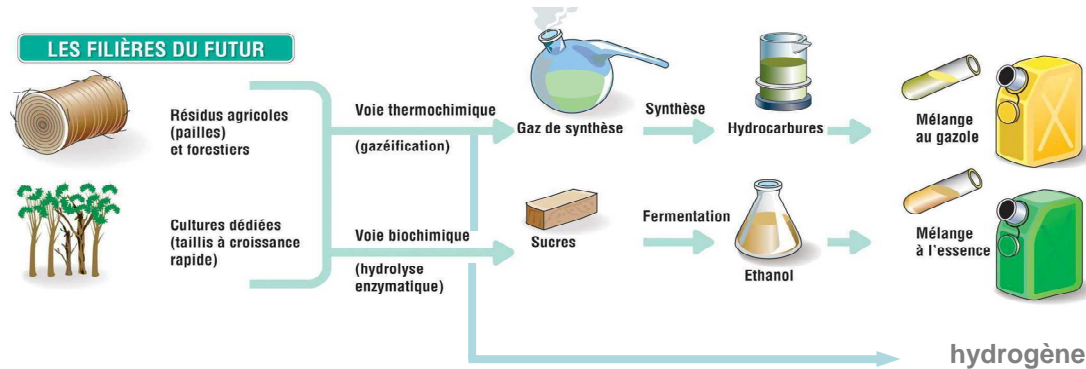


# Les biocarburants de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> générations



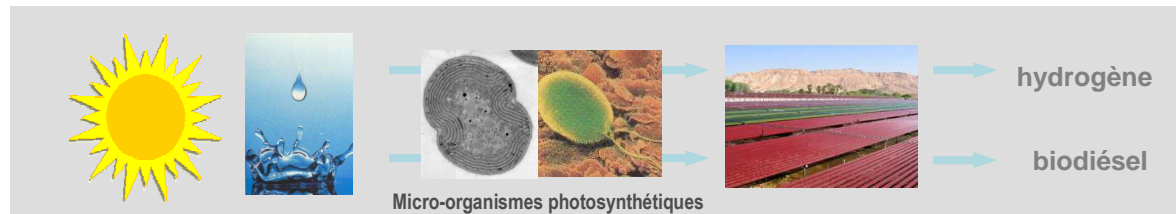
Un enjeu pour la société et pour la recherche

2G  
Biomasse  
ligno-cellulosique



*Pilotes  
Démonstrateurs*

3G  
Micro-organismes  
photosynthétiques



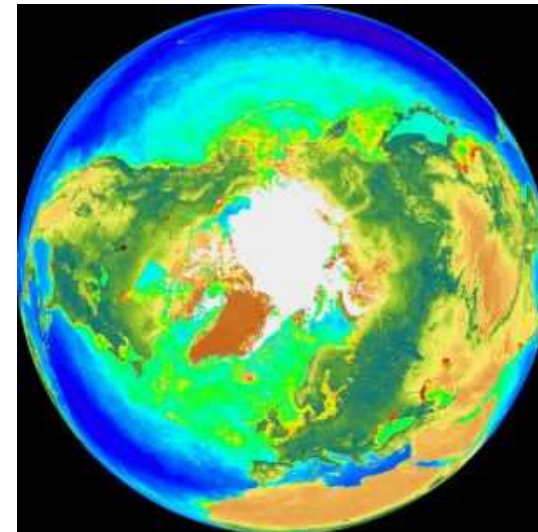
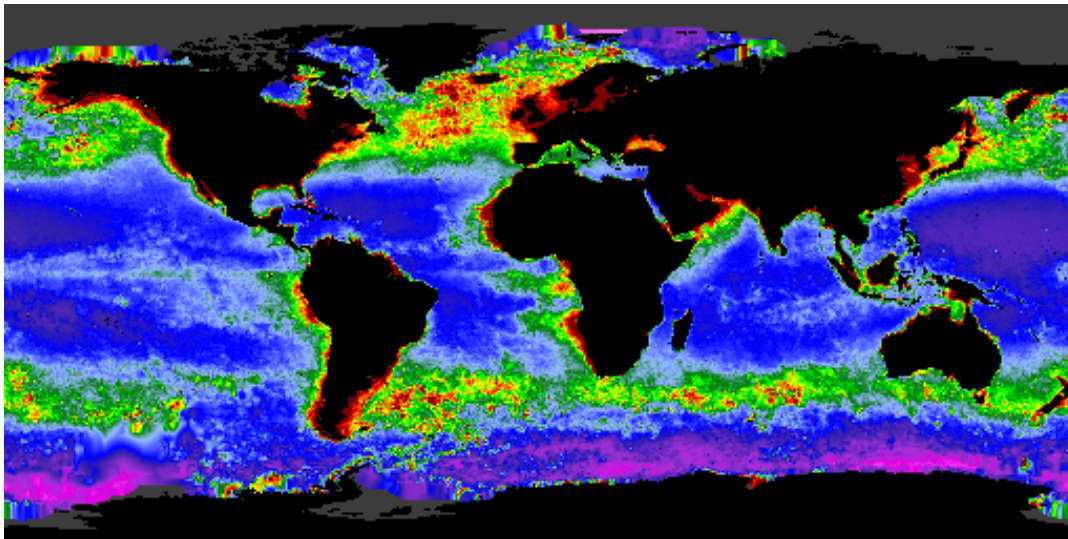
*Recherche*



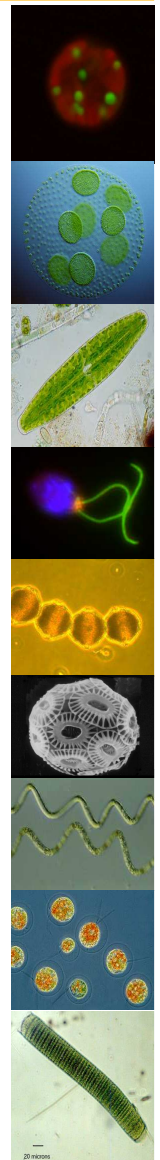
# Les micro-algues et les cyanobactéries



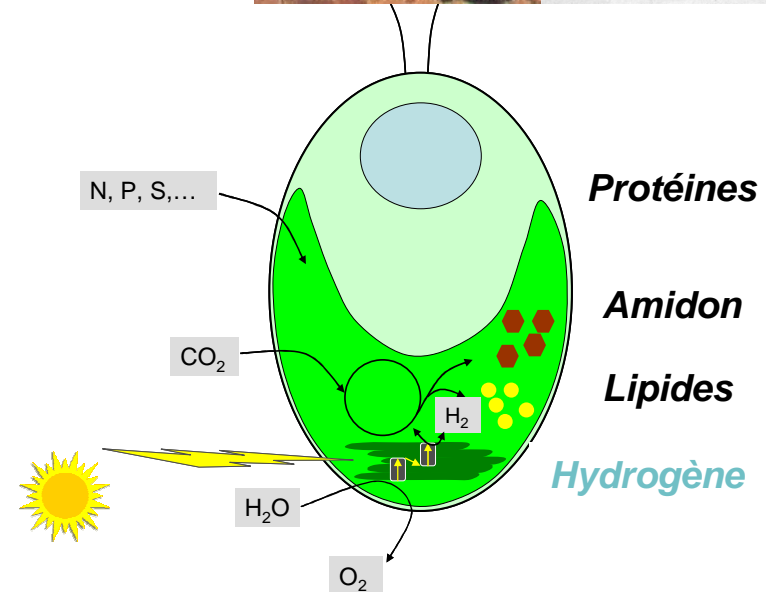
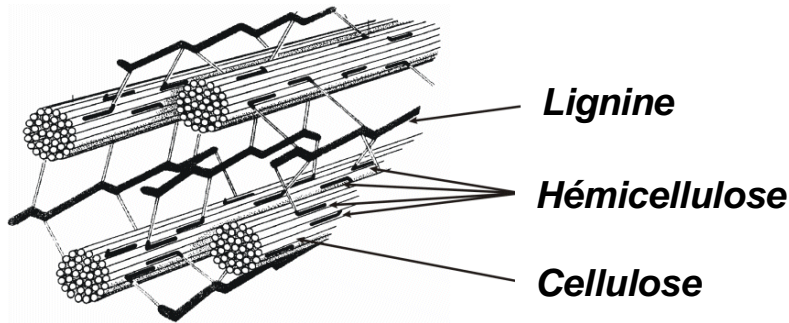
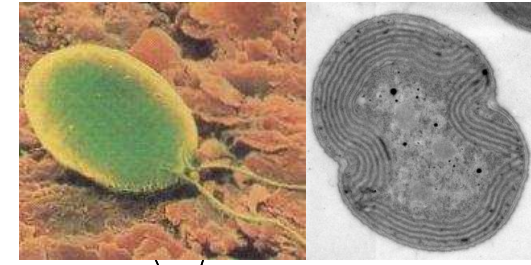
... une biodiversité à peine explorée :  
30 000 espèces décrites  
200 000 à 1 million estimées



40 à 50% de la photosynthèse terrestre  
À l'origine de la formation du pétrole



# Biomasse plantes supérieures v biomasse algale



Biomasse	Lignine (%)	Cellulose (%)	Hémicellulose (%)
Bois tendre	27-30	35-40	25-30
Bois dur	20-25	45-50	20-25
Paille de blé	15-20	33-43	20-25

Algue (% poids sec)	Protéines	Carbohydrates	Lipides	ARN / ADN
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5

## Culture en bassins ouverts

---



*Earthrise Algae Farm,  
Calipatria, California,  
USA, Culture en bassins  
ouverts sur 22 ha*

# Les différents systèmes de culture de microalgues



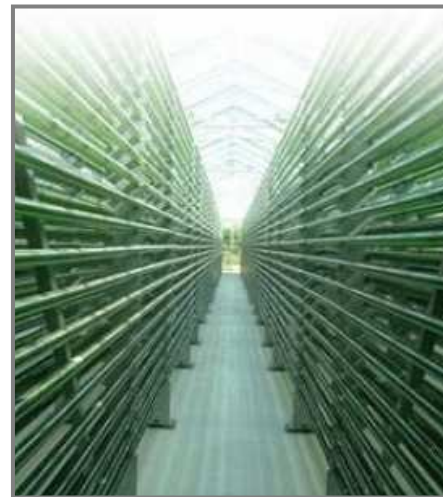
- Bassins (raceway ponds) ouverts ou fermés (sous serre)
- Photobioréacteurs tubulaires
- Sac plastiques



*Parry Nutraceuticals Ltd., Spirulina Ponds, India*



*Vue futuriste d'une ferme de microalgues cultivées en photobioréacteurs (Solix biofuels Colorado, USA)*



*Photobioréacteur plan pour la production de chlorelles (O.Pulz, Allemagne)*



*Photobioréacteur tubulaire solaire (Algatech, désert du Negev, Israël)*

# Culture de microalgues pour la production de composés HVA



Product	Species	Status
Health food and feed supplements	<i>Arthrospira</i> (3000 t) <i>Chlorella</i> (2000 t) <i>Dunaliella</i> (1200 t) <i>Aphanizomenon</i> (500 t) <i>Haematococcus</i> (300 t)	Commercial (Raceway ponds, circular ponds, lagoons, PBR)
Pigments (carotenoids, phycobiliproteins)	<i>Dunaliella</i> <i>Arthrospira</i> <i>Haematococcus</i>	Commercial (as above)
$\omega$ 3 PUFA (DHA)	<i>Schyzochitrium</i> (10 t oil) <i>Cryptocodiniun</i> (240 t oil)	Commercial (10-100 m <sup>3</sup> fermenters)
Fluorescent diagnostics Labeled compounds (stable isotopes) Restriction enzymes	<i>Arthrospira</i> <i>Anabaena</i> <i>Anacystis</i>	Commercial (small PBR)
Aquaculture feeds	Various spp. (1000 t)	Commercial (cylinders, bags, tanks)
Polysaccharides		Research
Biofertilizers		Research
Bioactive molecules (biopesticides, probiotics, pharmaceuticals, biosensors, cosmetics)		Research
Bioremediation (xenobiotics, heavy metals)		
CO <sub>2</sub> biofixation		
Energy (biodiesel, H <sub>2</sub> )		

Algae commercial applications (2006)  
< 10,000 tons

**A niche technology**

D'après M. Tredici, EABA Meeting, Florence, 2009

# Production de microalgues : avantages et inconvénients



Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Productivité surfacique élevée</li> <li>- Composition de la biomasse flexible</li> <li>- Peu de compétition avec la production alimentaire</li> <li>- Peu de compétition avec les ressources en eau</li> <li>- Recyclage de déchets urbains (N, P, S,..) ou industriels (CO<sub>2</sub>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recours aux conditions de carence pour induire l'accumulation de produits riches en énergie</li> <li>- Pas d'amélioration génétique (adaptation aux systèmes de cultures)</li> <li>- Systèmes de cultures et de récolte coûteux</li> </ul>

	Microalgues	Plantes C4 (sorgho, maïs,...)	Plantes C3
<b>Productivité maximale (T.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup>)</b>	<b>150-180</b>	<b>60</b>	<b>30</b>
<b>Productivité observée (T.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup>)</b> Photobioréacteurs Champ	<b>50-70</b>	<b>10-30</b>	<b>10-15</b>

150 T.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup> = 40 g. m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (sur 365 jours)

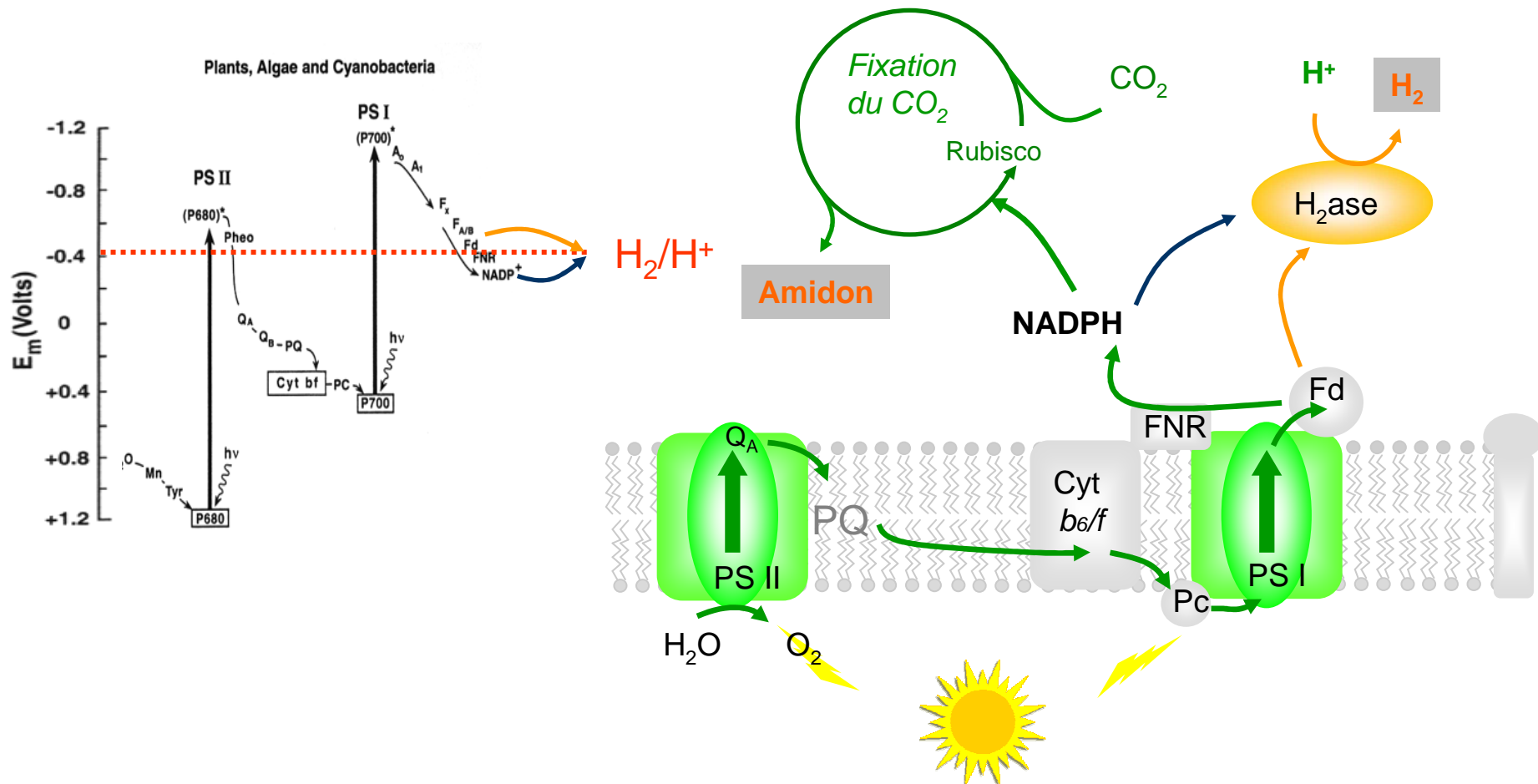
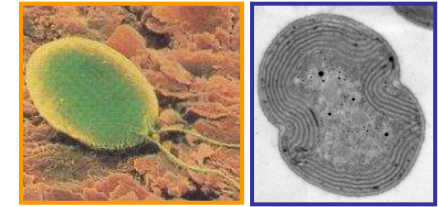
D'après « EPOBIO project » University of York – Sept 2007



# Des microalgues pour la production de biocarburants ?



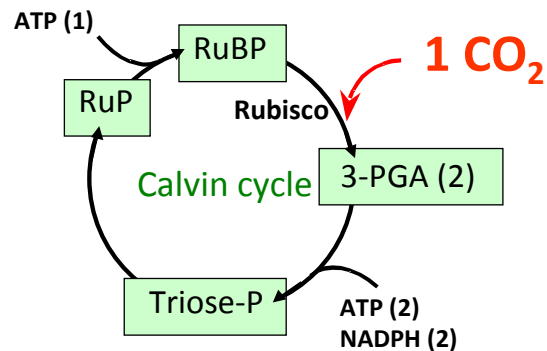
- Production d'hydrogène
- Production de lipides et de biodiesel



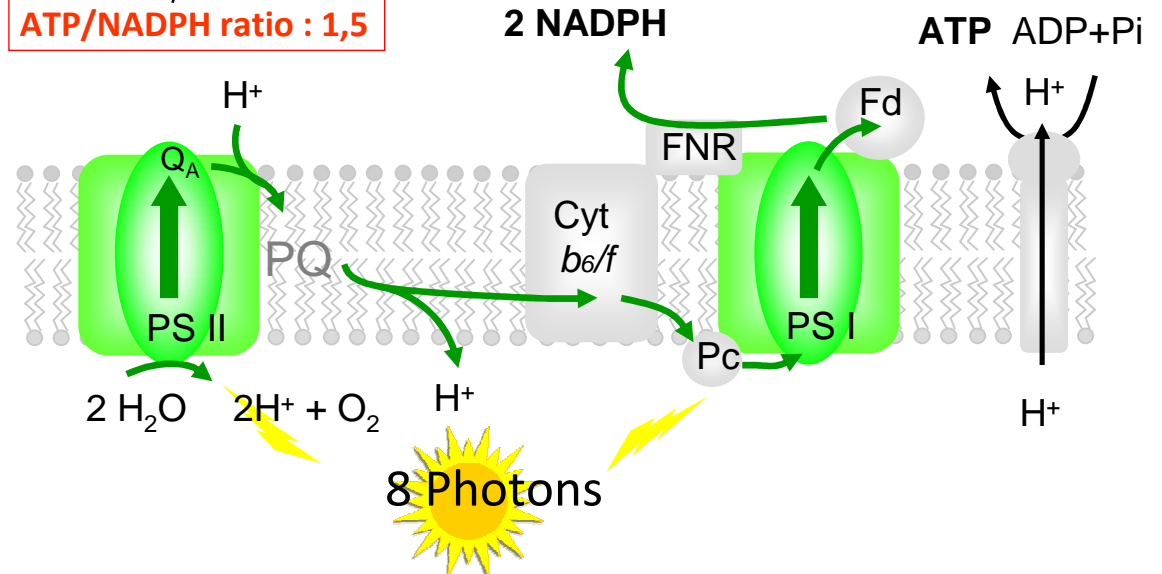
# Les limites thermodynamiques



Cycle Photosynthétique de Réduction du Carbone



3 ATP / 2 NADPH / CO<sub>2</sub>  
**ATP/NADPH ratio : 1,5**



**Photons PAR** 217 KJ. mole<sup>-1</sup> en moyenne

**1 mole fixed CO<sub>2</sub>** est équivalent à 475 KJ (1/6 mole glucose)

Conversion théorique maximale du PAR en énergie chimique (biomasse) :

$$475 \text{ KJ} / (217 \times 8 \text{ KJ}) = \mathbf{27\%}$$

PAR (Photosynthetic Active Radiation) : ~ 45% de l'énergie solaire

**Conversion photosynthétique maximale : 27% x 45% = 12 %**

# Production d'hydrogène: mécanismes et verrous biologiques

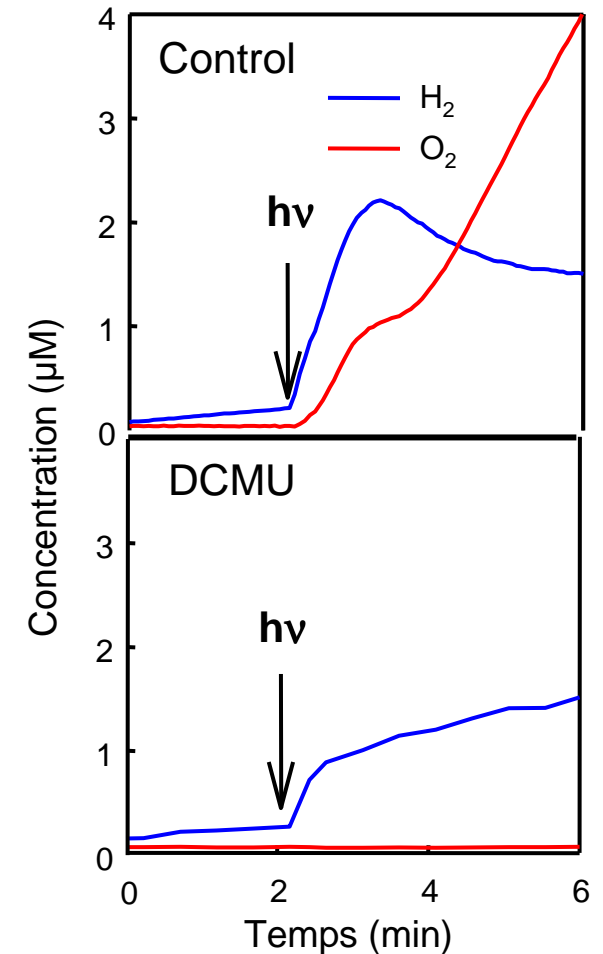
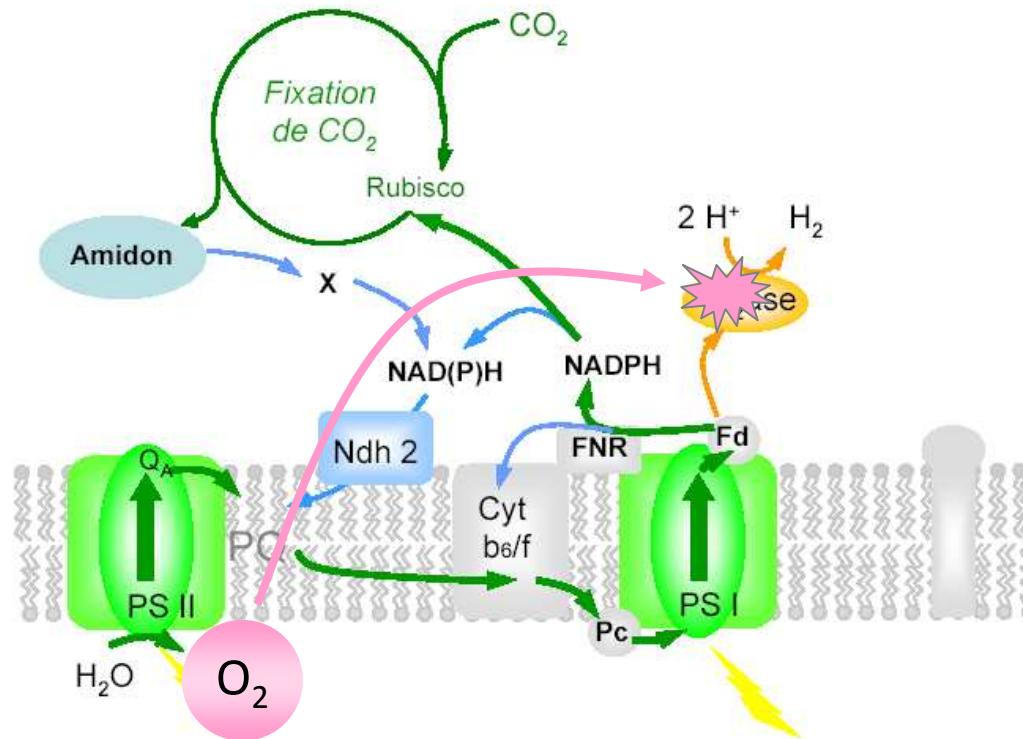
Un verrou : la sensibilité de l'hydrogénase à l'O<sub>2</sub>



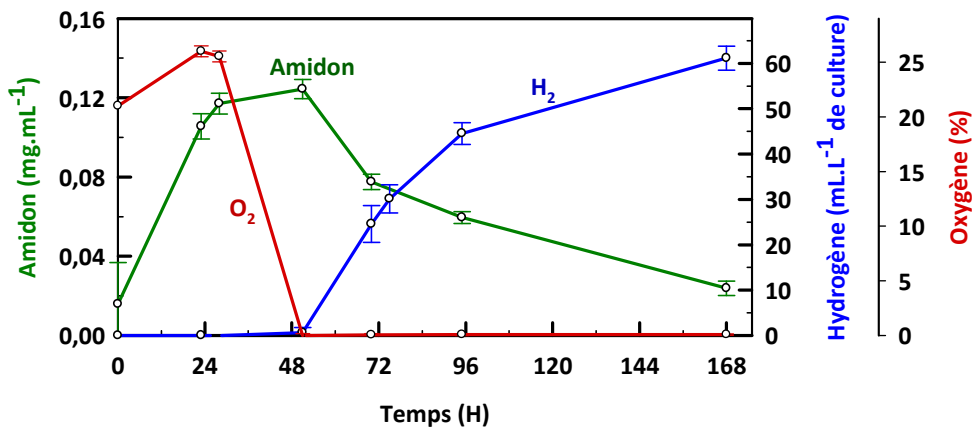
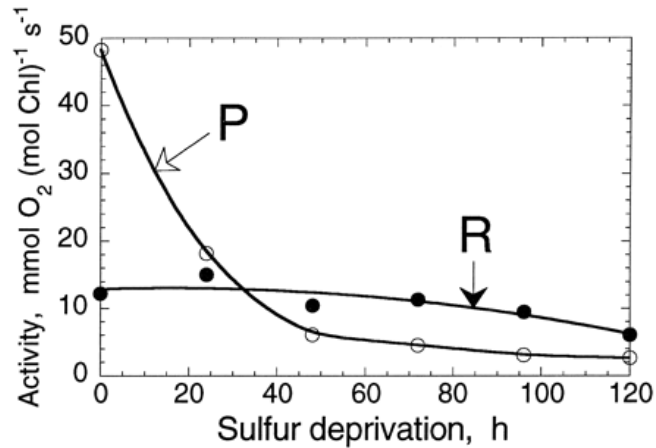
Deux stratégies de recherche :

**1. séparer dans le temps productions d'O<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>**

2. rendre l'hydrogénase insensible à l'O<sub>2</sub>



# Production d'H<sub>2</sub> en réponse à une carence en soufre (Melis *et al.*, 2000)



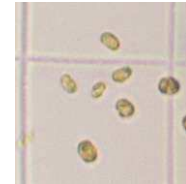
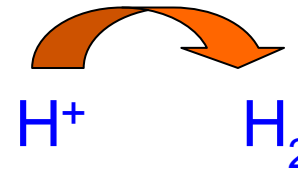
Carence en soufre

Phase 1 (0 to 40h)  
Aérobiose

Chute du PSII  
& accumulation d'amidon

Phase 2 (40 to 120h)  
Anaérobiose

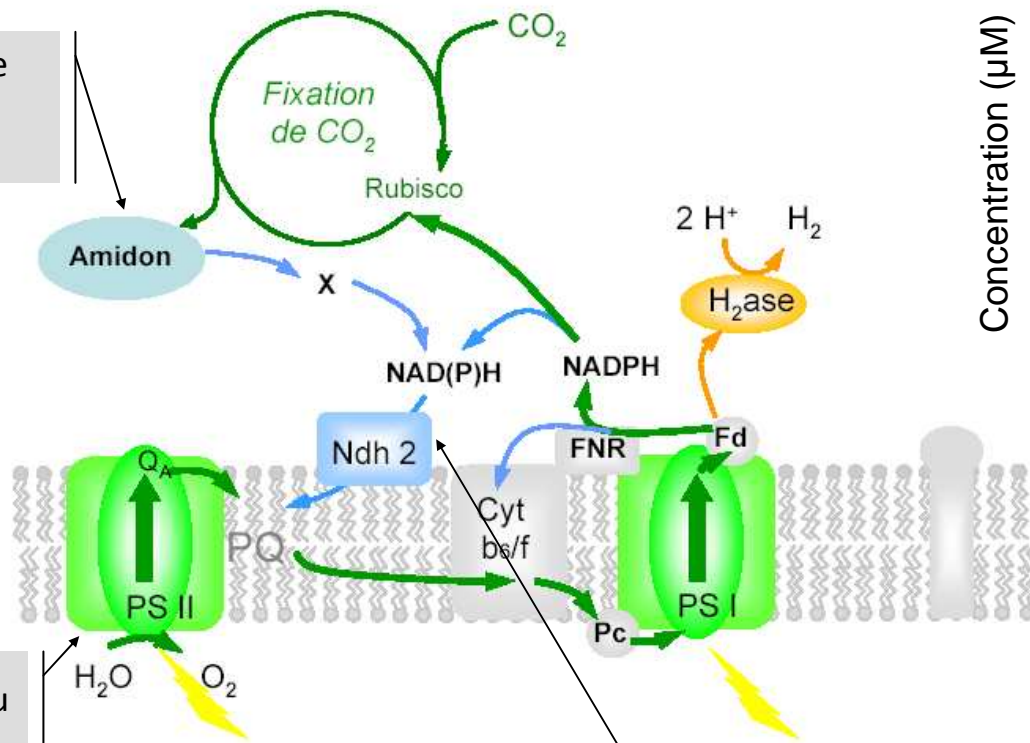
Activation hydrogénase



# S'affranchir de la carence et stimuler la voie indirecte de production d'H<sub>2</sub>

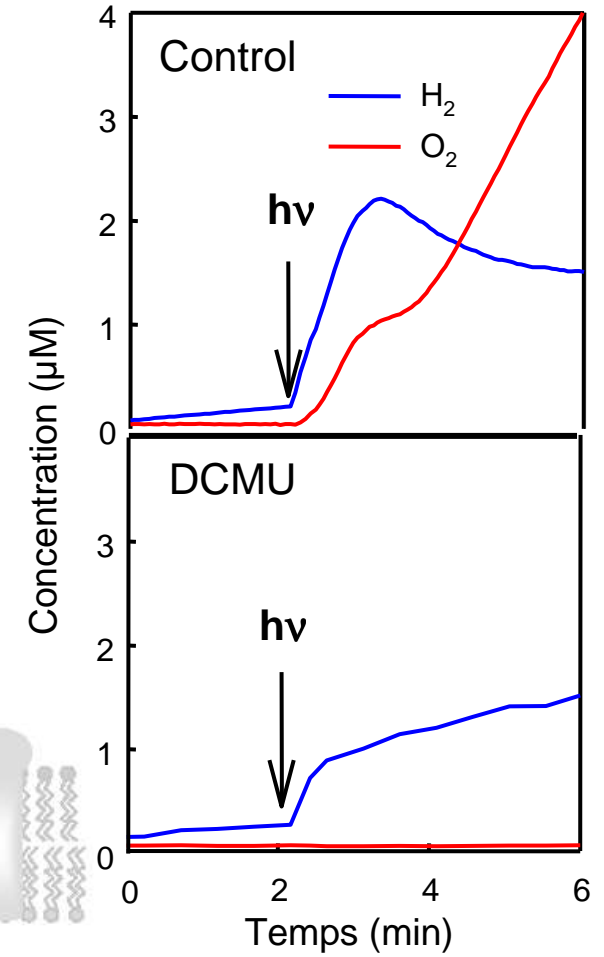


Contrôler le stockage et le déstockage de l'amidon



Contrôler l'activité du Photosystème II

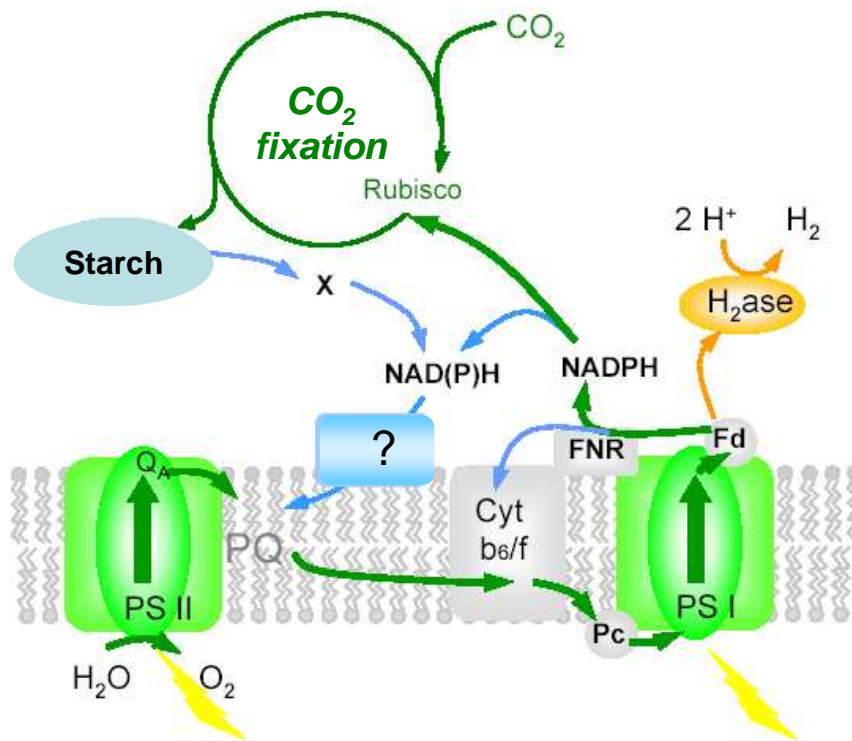
Identifier les voies métaboliques et leurs étapes limitantes



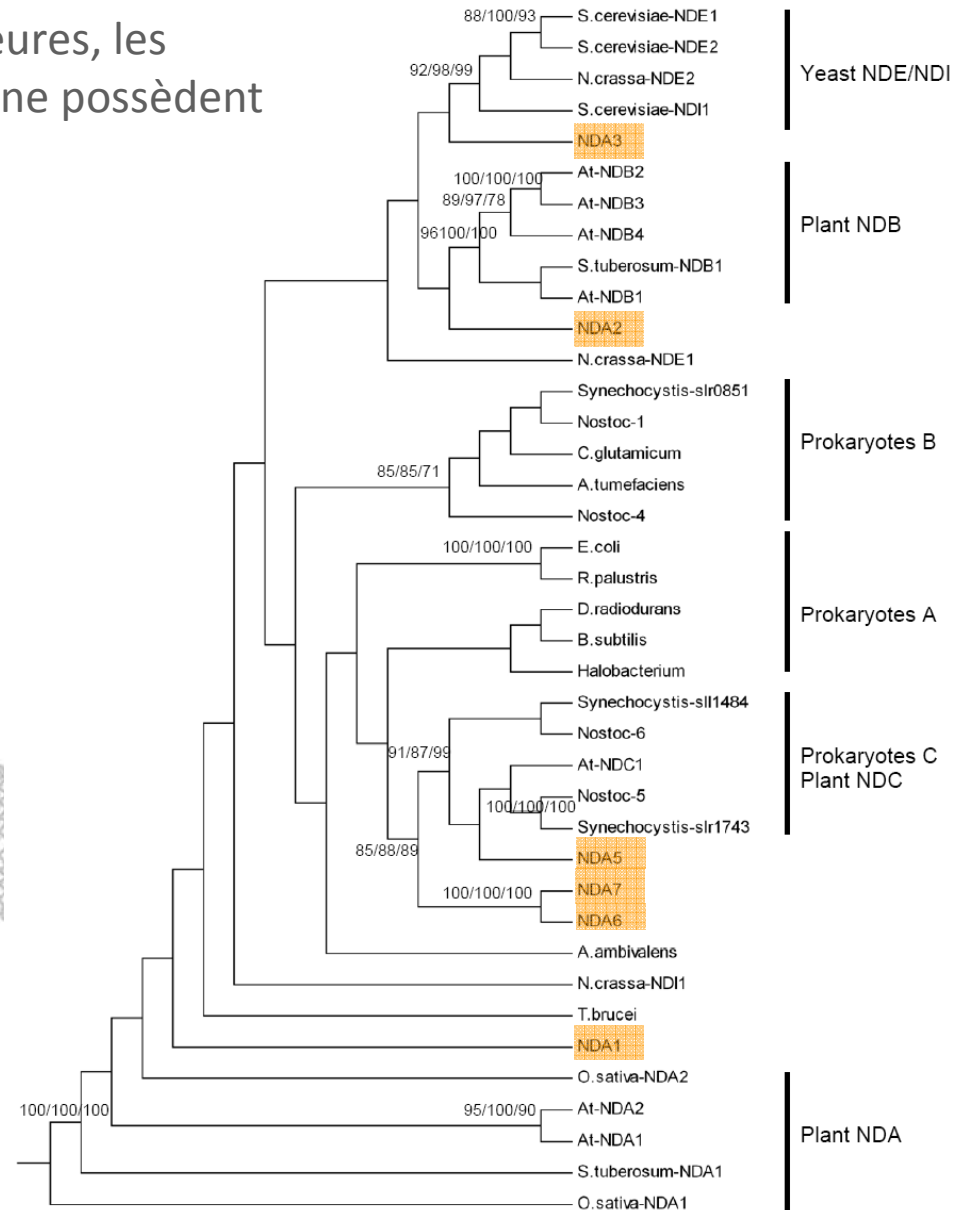
# Quelle enzyme est impliquée dans la réduction des PQs ?



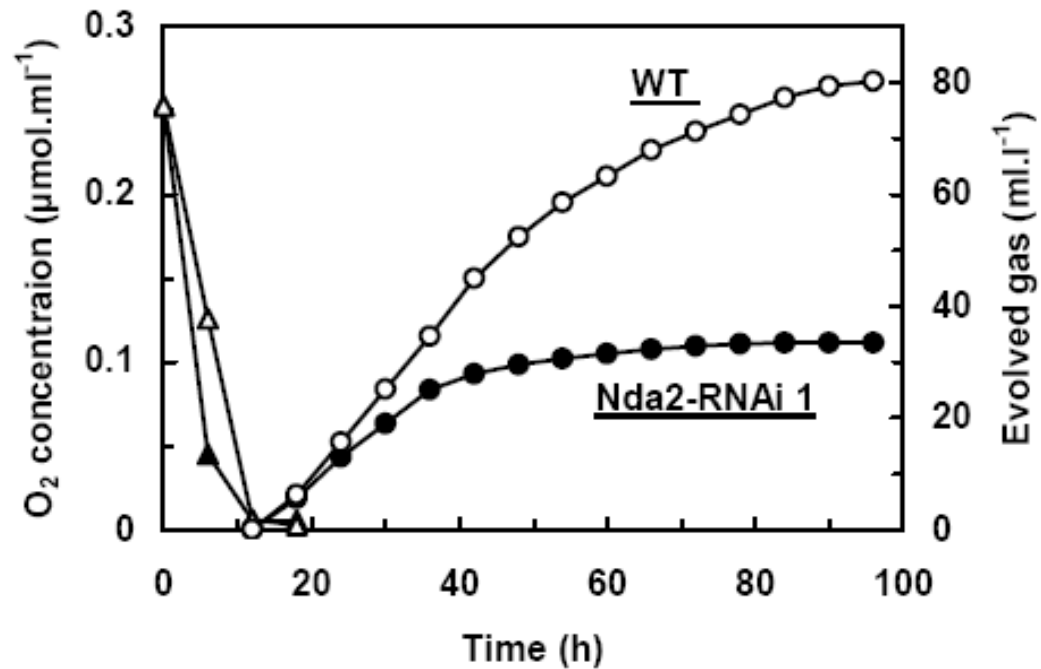
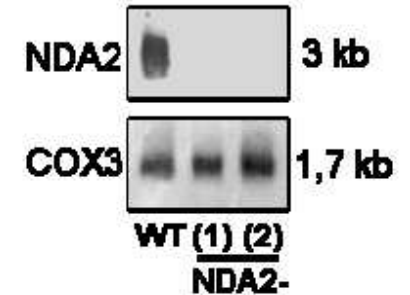
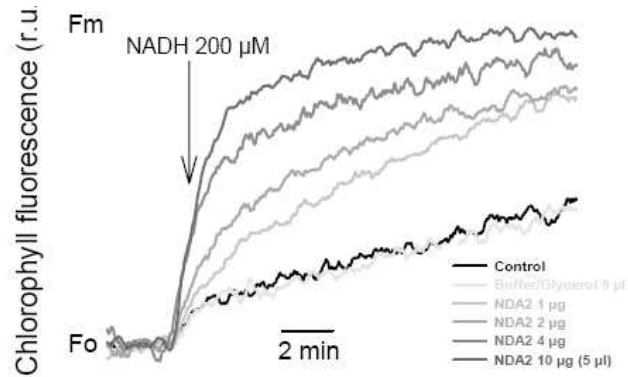
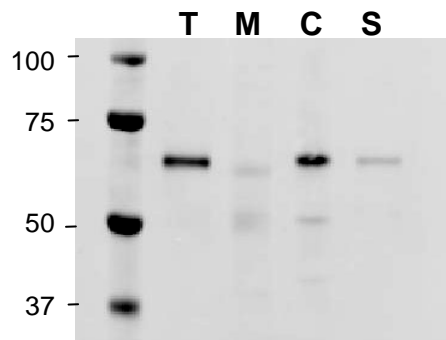
A la différence des plantes supérieures, les chloroplastes de *Chlamydomonas* ne possèdent pas de complexe NAD(P)H déshydrogénase (NDH-1) de type I



6 NDH-2 dans le génome de *Chlamydomonas*



# Nda2: une déshydrogénase chloroplastique de type II NAD(P)H



Jans et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2008)

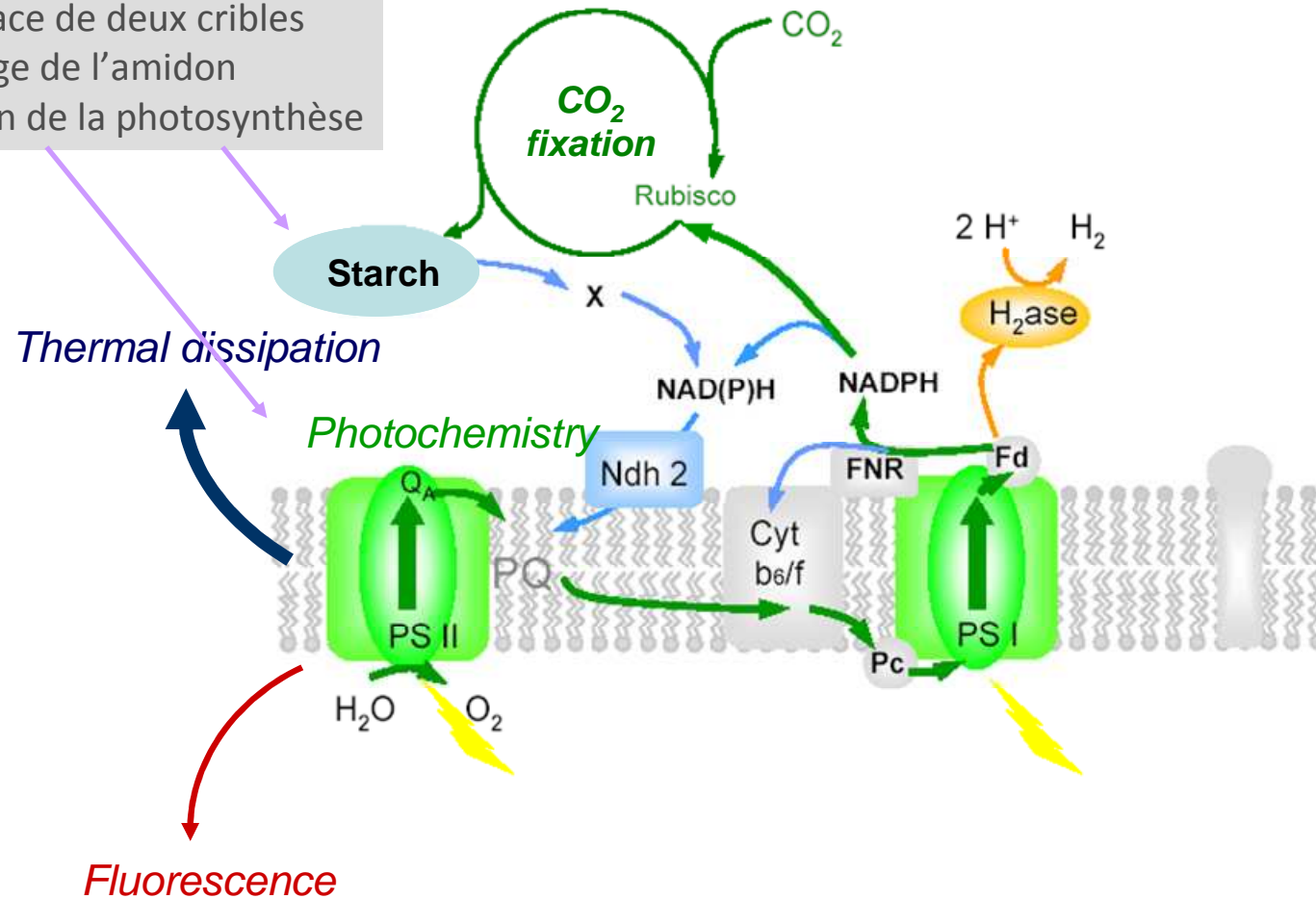
Collaboration F. Franck & C. Remacle, Liège

Desplats et al. J. Biol. Chem. (2009)

# Développement d'approches génétiques



Mise en place de deux cribles  
- Déstockage de l'amidon  
- Régulation de la photosynthèse



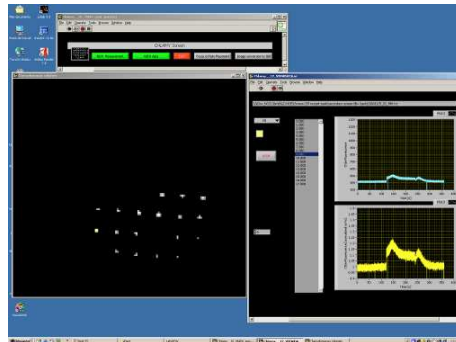


# Crible de mutants basé sur la fluorescence de la chlorophylle



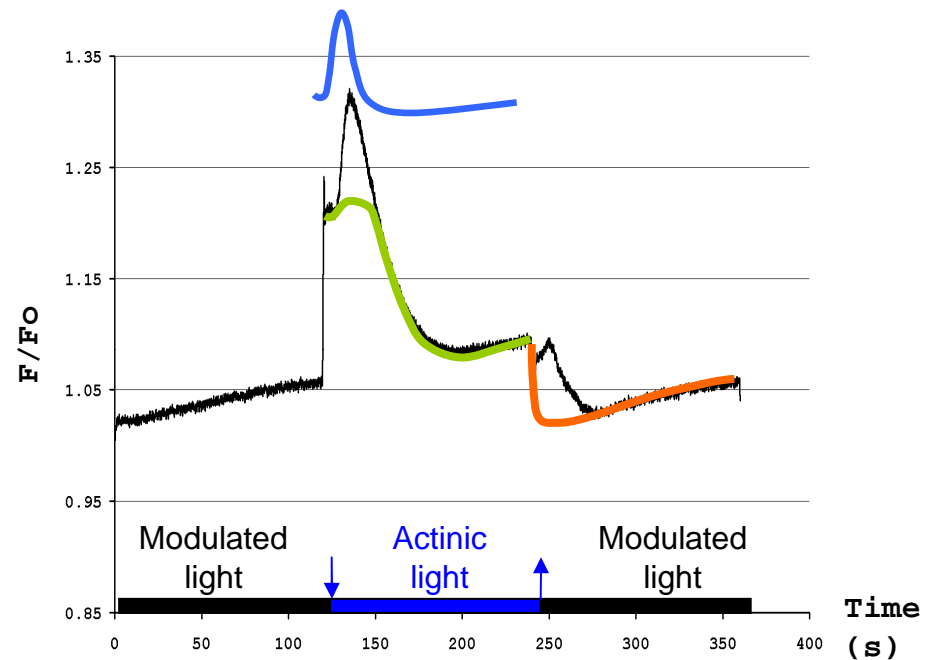
Constitution d'une banque  
de mutants d'insertion  
(15,000 mutants)

AphVIII

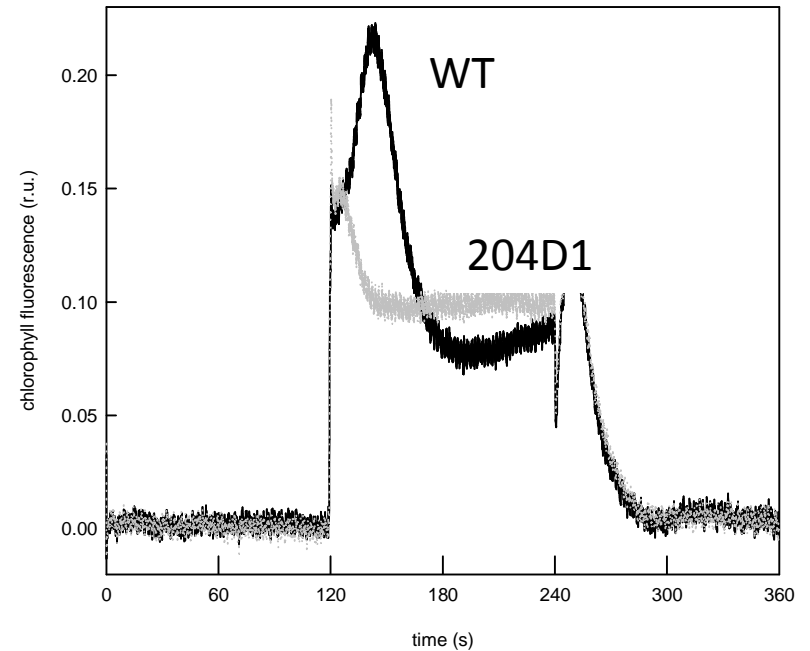
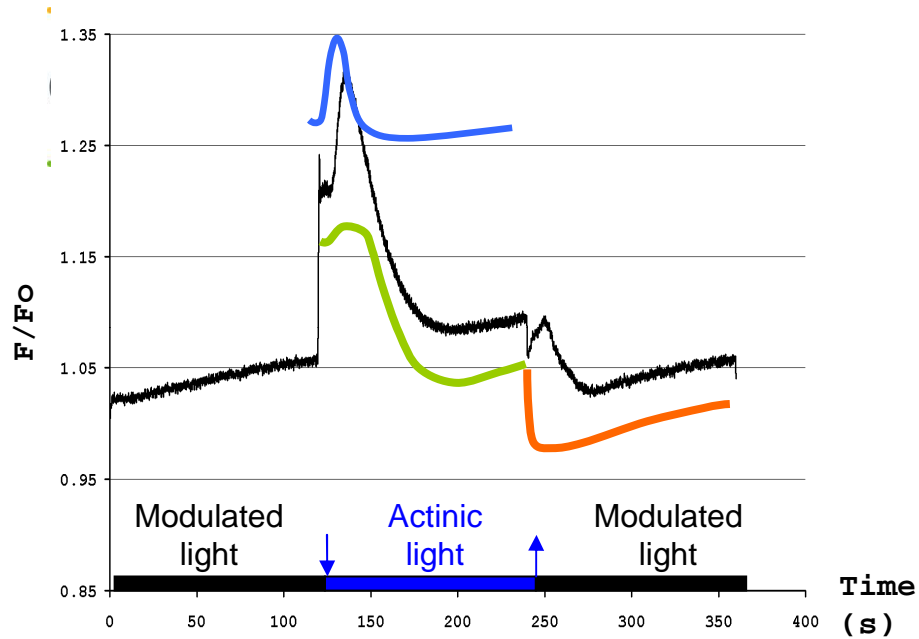


Enregistrement des transitoires de  
fluorescence de la chlorophylle sur des  
colonies isolées

Croissance photoautotrophe sur  
milieu sélectif (paromomycine)



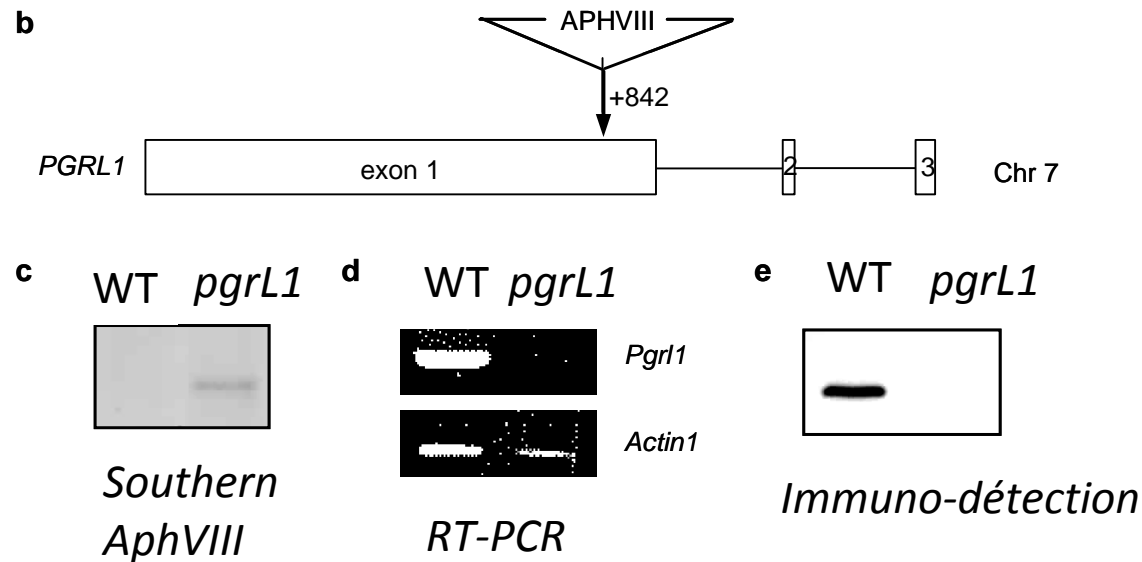
# Crible de mutants basé sur la fluorescence de la chlorophylle



I	High steady state Fluorescence	2 mutants 7A2, 9H4
II	High $F_0$	3 mutants 94E4, 113A3, 220B2
III	Fluorescence induction (Kausky effect)(+/-)	3 mutants 204D1, 216A3, 125D1
IV	Dark reduction of PQ (+/-)	7 mutants 216E1, 79H5, 119B1, 220C2, 133G6, 74G3, 228F1

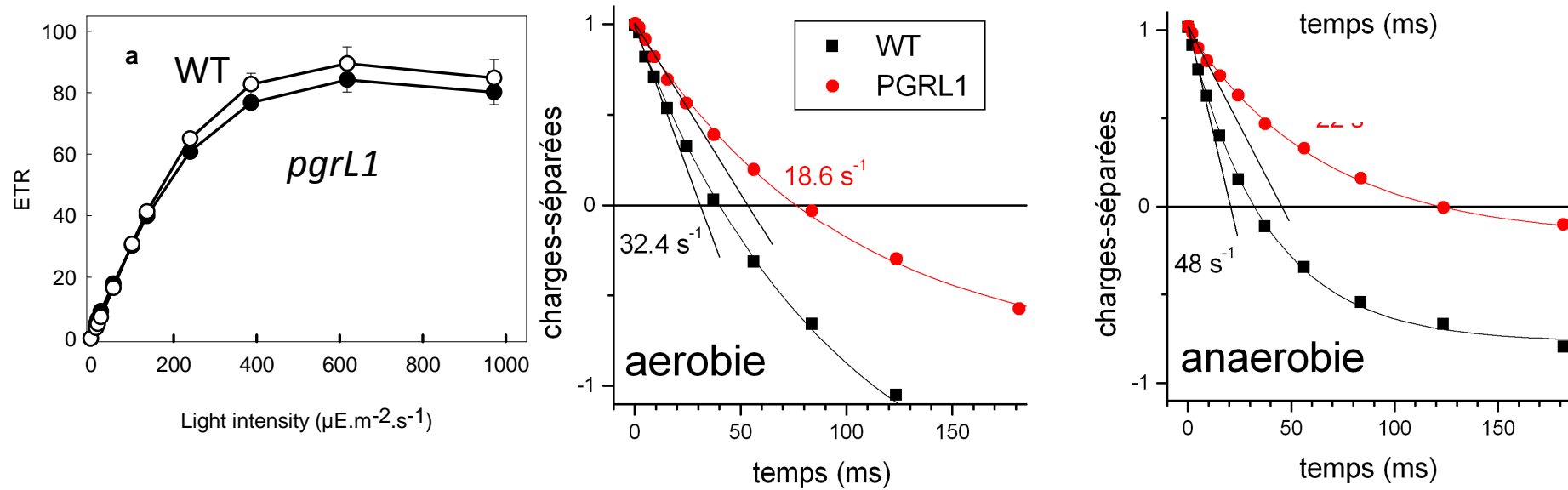
# Isolement d'un mutant affecté dans le gène *PGRL1*

DalCorso et al. (2008) *Cell* 132: 273-285



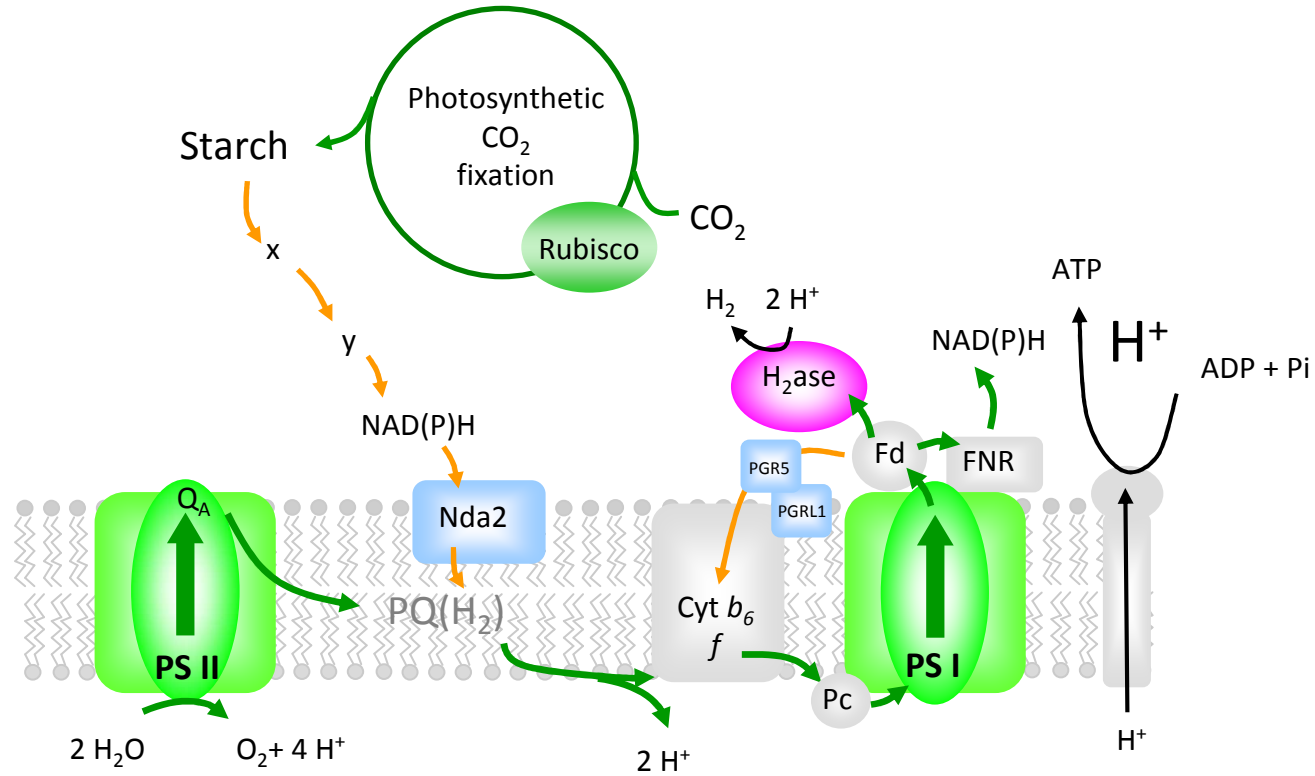
- Insertion unique de la cassette de résistance à la paromomycine
- Co-ségrégation parfaite entre phénotype et résistance à la paromomycine

# Activité réduite du transfert cyclique des électrons chez *pgrL1*

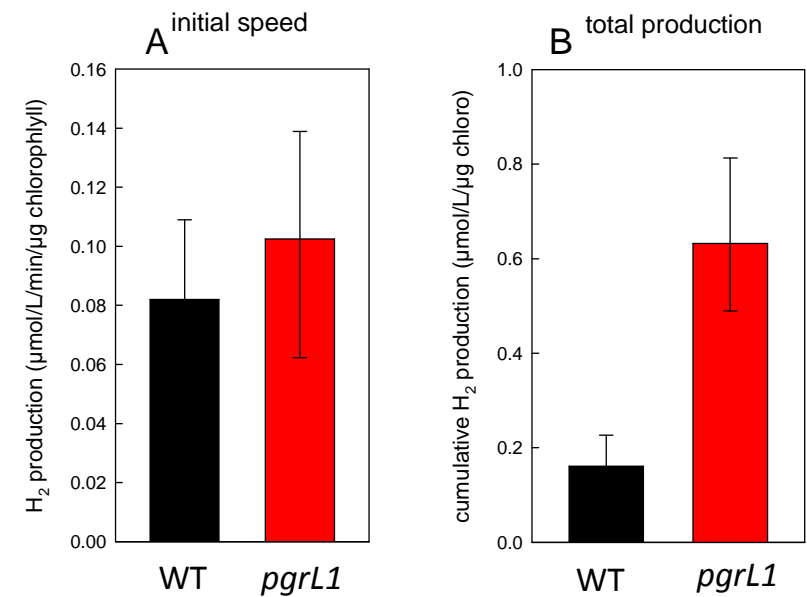
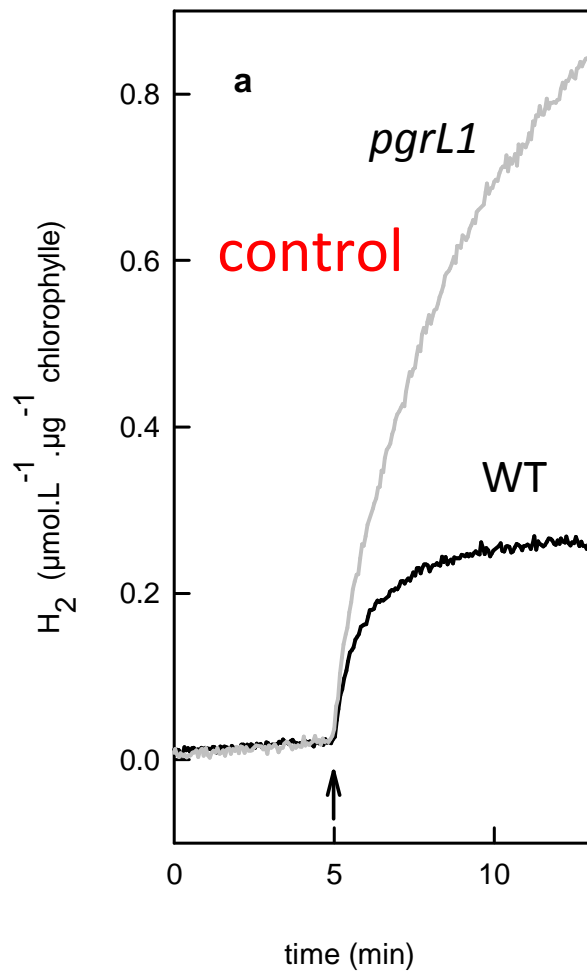


	WT	<i>pgrL1</i>
Transfert cyclique/ aérobiose (s <sup>-1</sup> )	31.4 +/- 1.85	18.8 +/- 1.33
Transfert cyclique/ anaérobiose (s <sup>-1</sup> )	46 +/- 3.61	22 +/- 2.05

# *pgrL1* est affecté dans le transfert cyclique d'électrons



# Forte stimulation de la production d' H<sub>2</sub> chez *pgrL1*

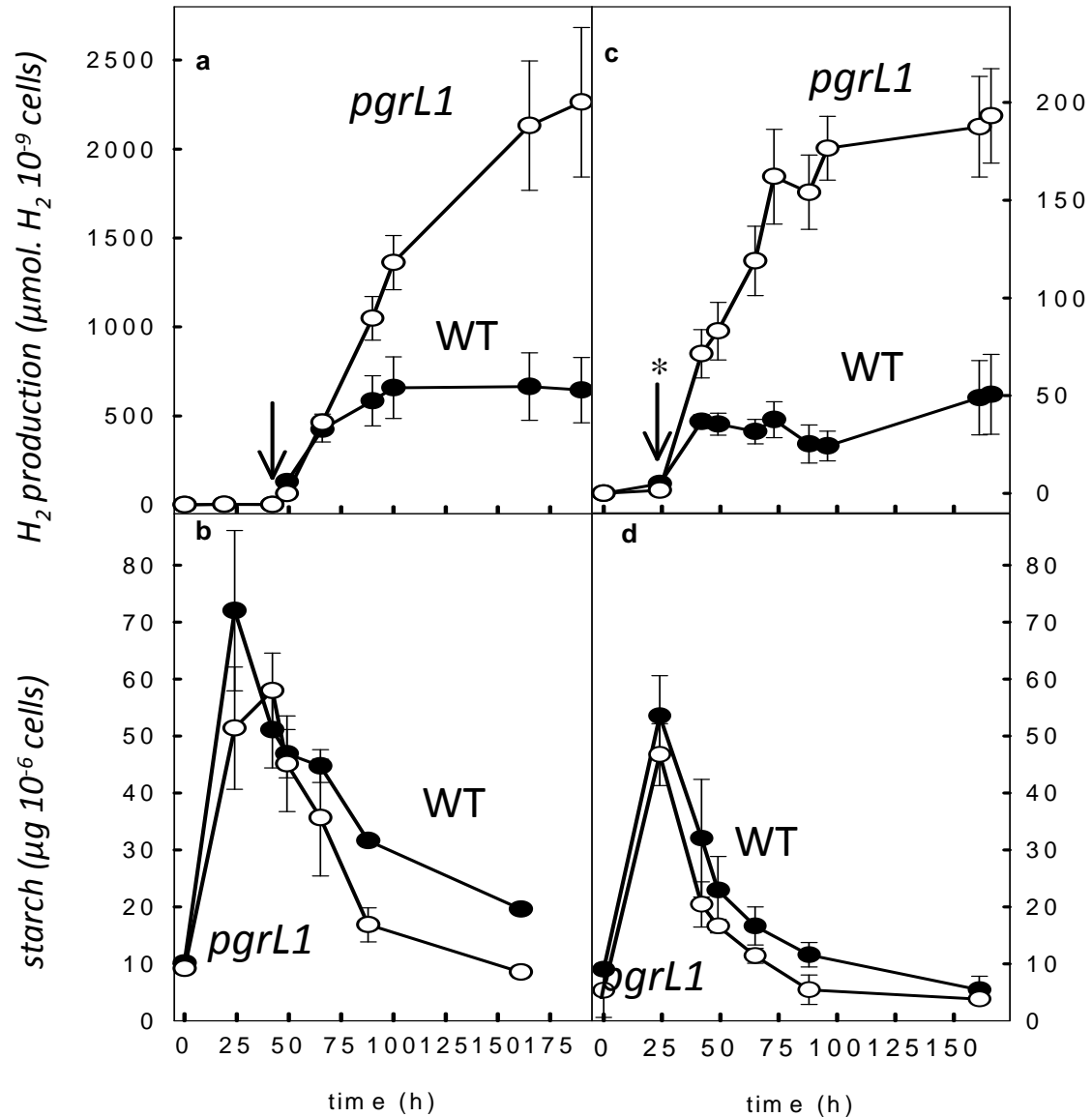


Toltey et al. (2010) à soumettre

# Stimulation de la production d'H<sub>2</sub> en carence en soufre



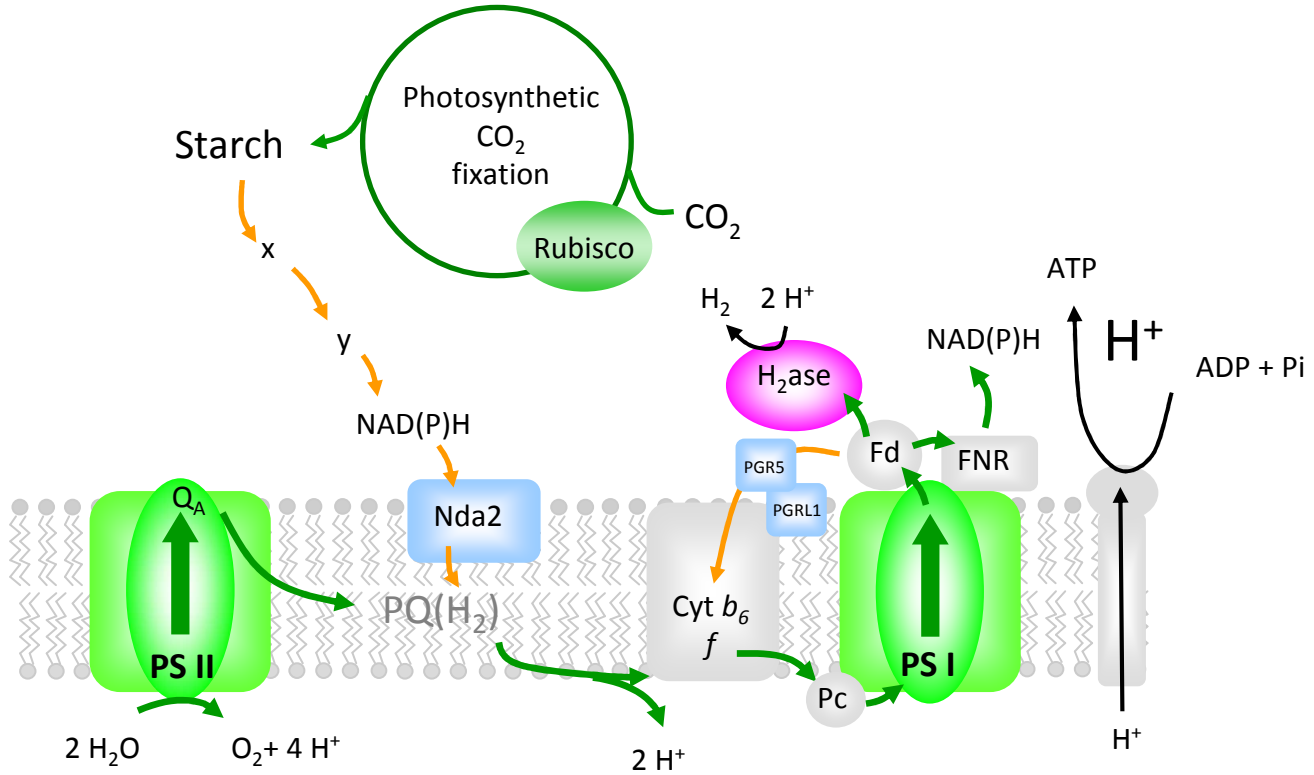
Voie directe



Voie indirecte

+ DCMU

# En anaérobiose le gradient de protons limite le flux d'électrons



Chez le WT le flux d'électrons est limité par le gradient de protons  
Chez *pgrL1* le flux d'électrons est dirigé vers l'hydrogénase

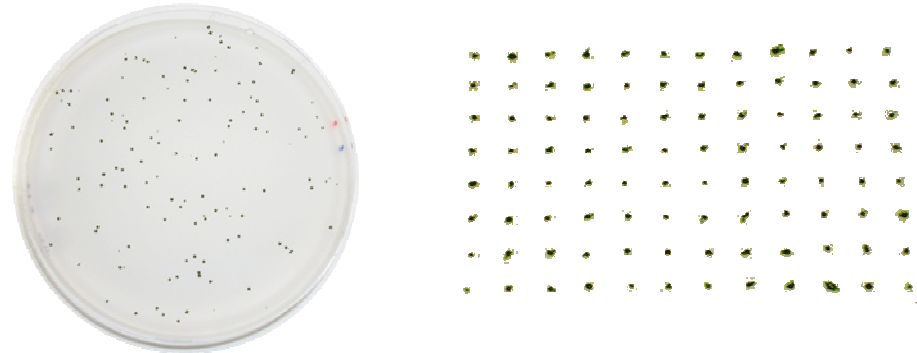


# Criblage d'une banque d'insertion

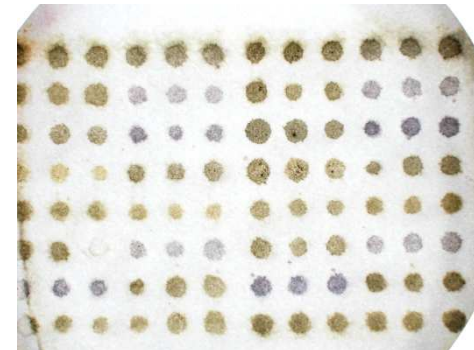
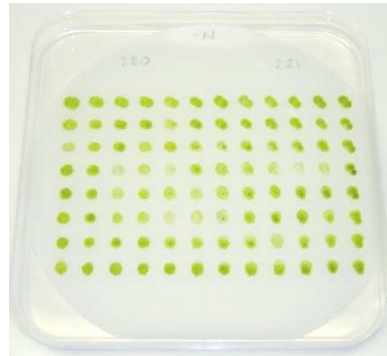
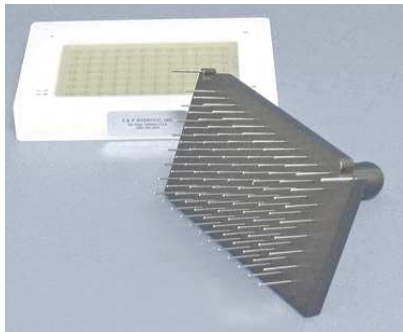
Chochois et al. (2010) *Int J Hydrogen Energy*



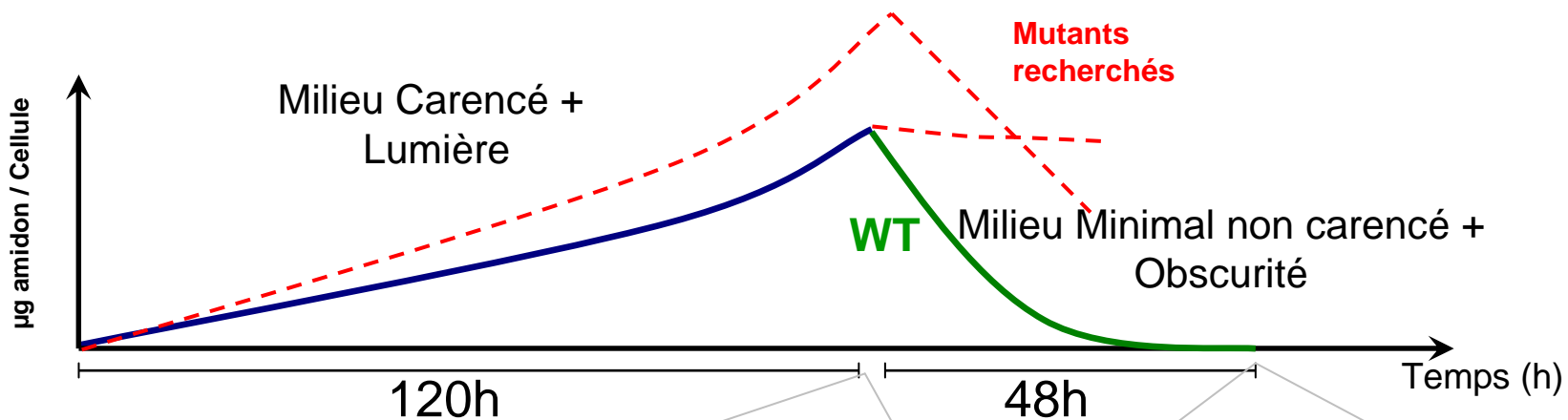
- Transformation de *C. reinhardtii* par plasmide portant la cassette AphVIII, qui confère la résistance à la paromomycine
- Sélection et repiquage de 15,000 transformants



- Transfert sur filtre et criblage



# Principe du crible



WT



# Vers un contrôle génétique de la production d'H<sub>2</sub>



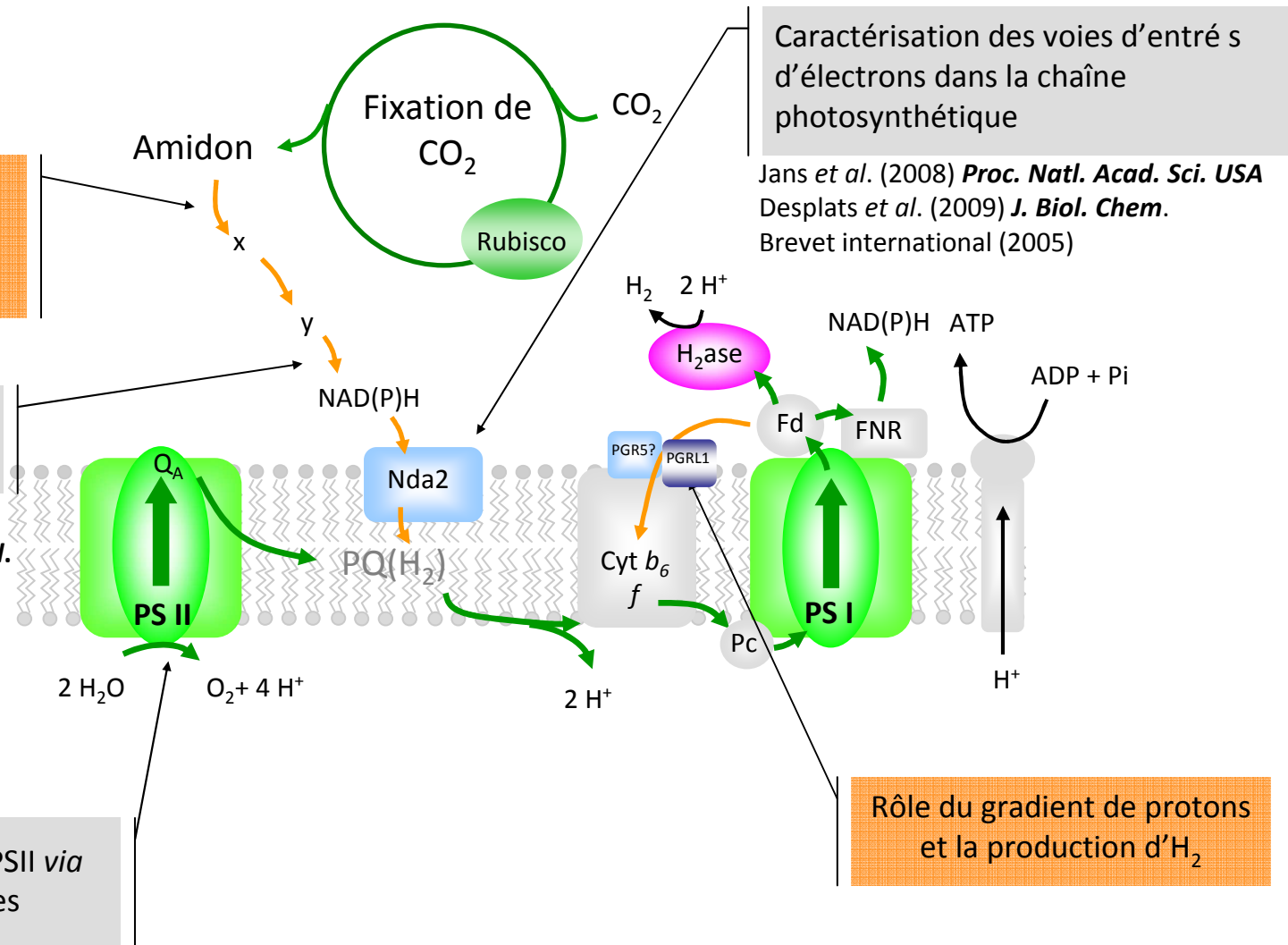
Mise en évidence d'une kinase contrôlant la dégradation de l'amidon

Rôle de l'amidon dans la production d'H<sub>2</sub>

Dauvillée et al. (2006) *Plant J.*  
Chochois et al. (2009) *Plant Physiol.*

Régulation de l'activité du PSII via des interrupteurs génétiques

Surzycki et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*



Caractérisation des voies d'entrée s d'électrons dans la chaîne photosynthétique

Jans et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
Desplats et al. (2009) *J. Biol. Chem.*  
Brevet international (2005)

Rôle du gradient de protons et la production d'H<sub>2</sub>

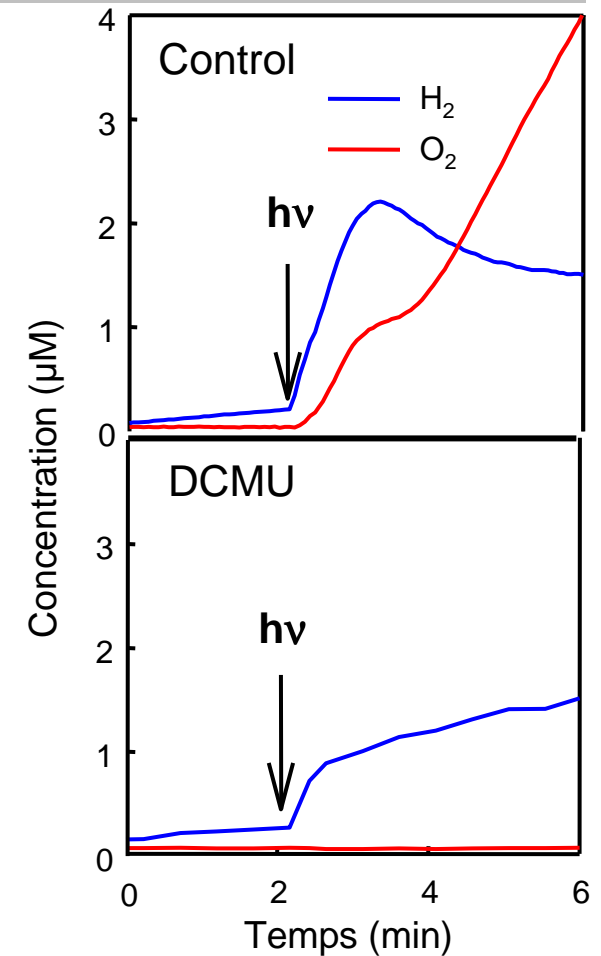
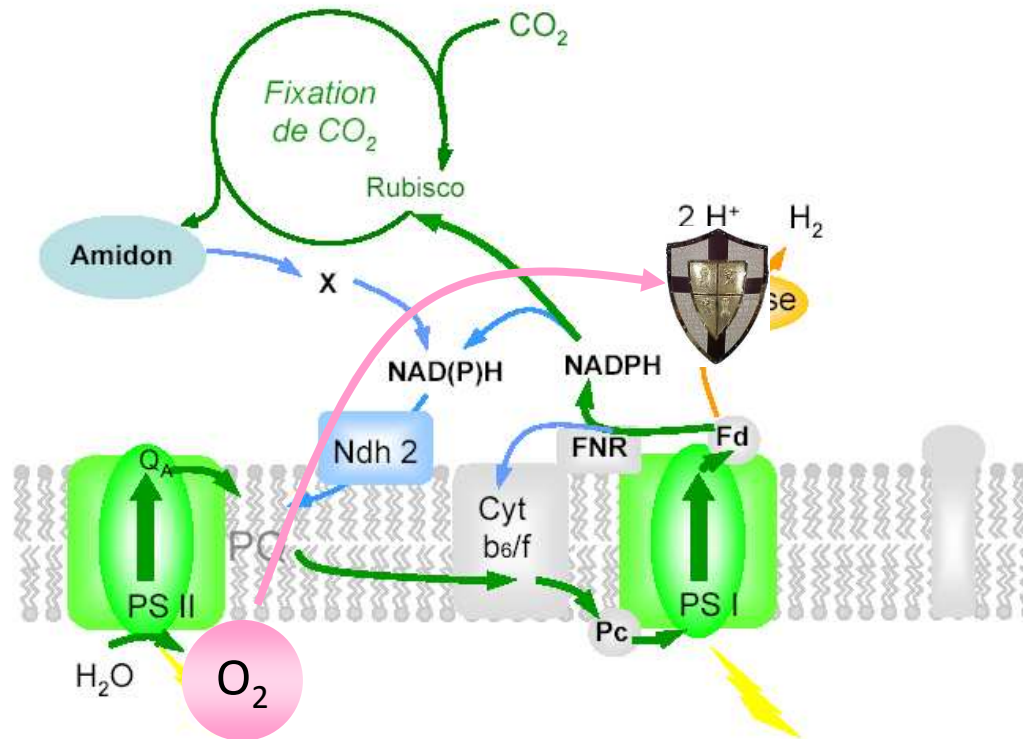
# Production d'hydrogène: mécanismes et verrous biologiques

Un verrou : la sensibilité de l'hydrogénase à l'O<sub>2</sub>

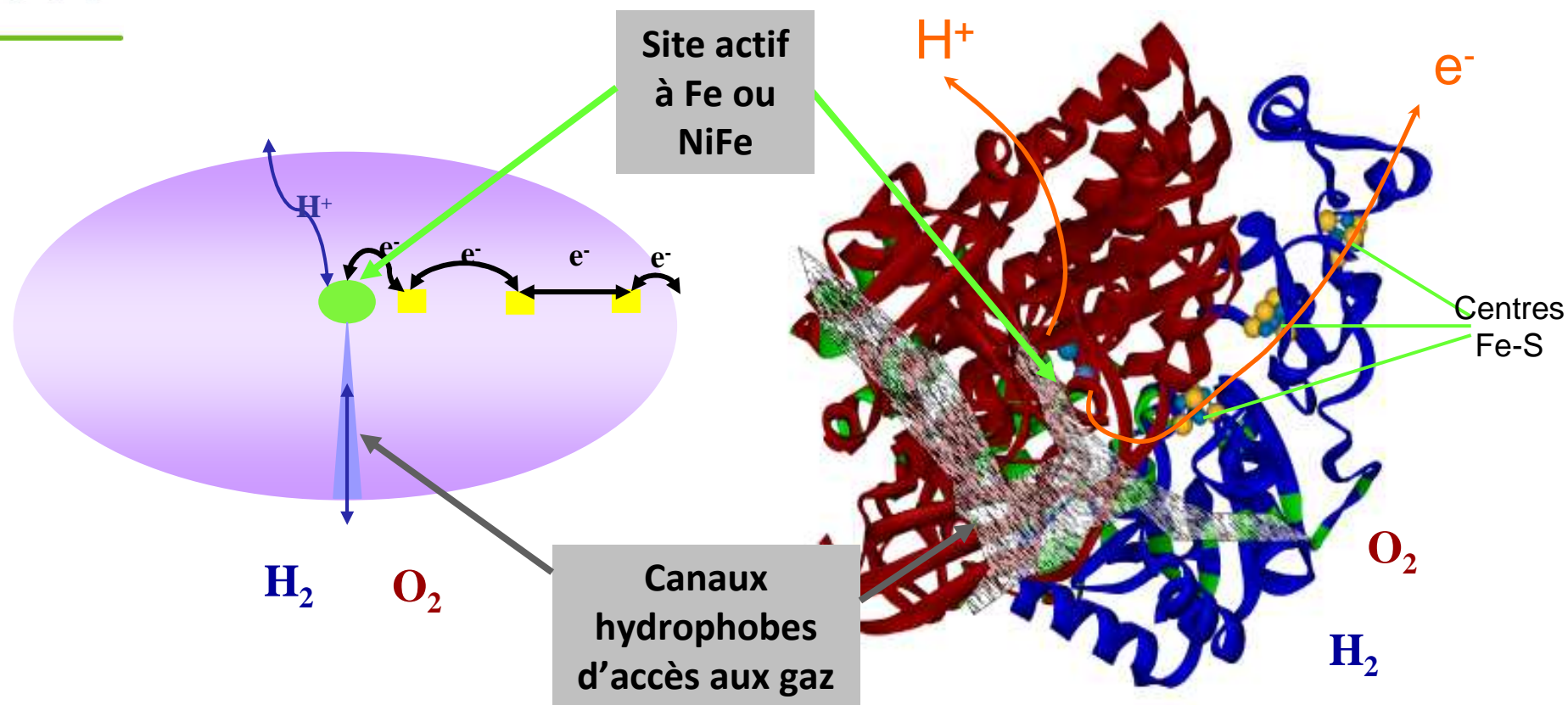


Deux stratégies de recherche :

1. séparer dans le temps productions d'O<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>
2. rendre l'hydrogénase insensible à l'O<sub>2</sub>

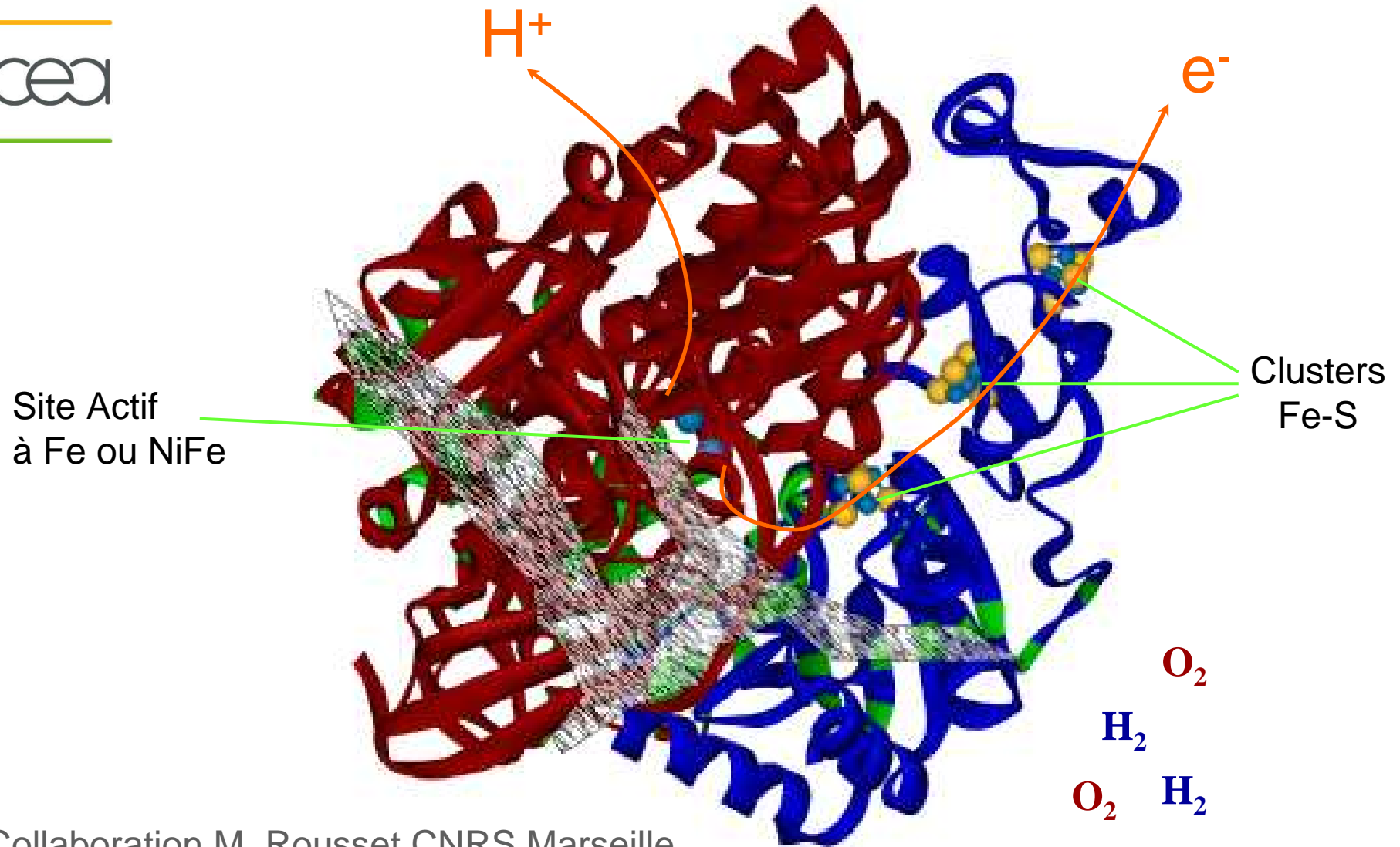


# Mécanismes de résistance à l'O<sub>2</sub> des hydrogénases à NiFe



Baffert *et al.* (2008) *Angewandte Chemie Int. Ed.*  
Leroux *et al.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
Dementin *et al.* (2009) *JACS*  
Brevet 2007

# Réduction de la sensibilité à l'O<sub>2</sub> d'hydrogénases

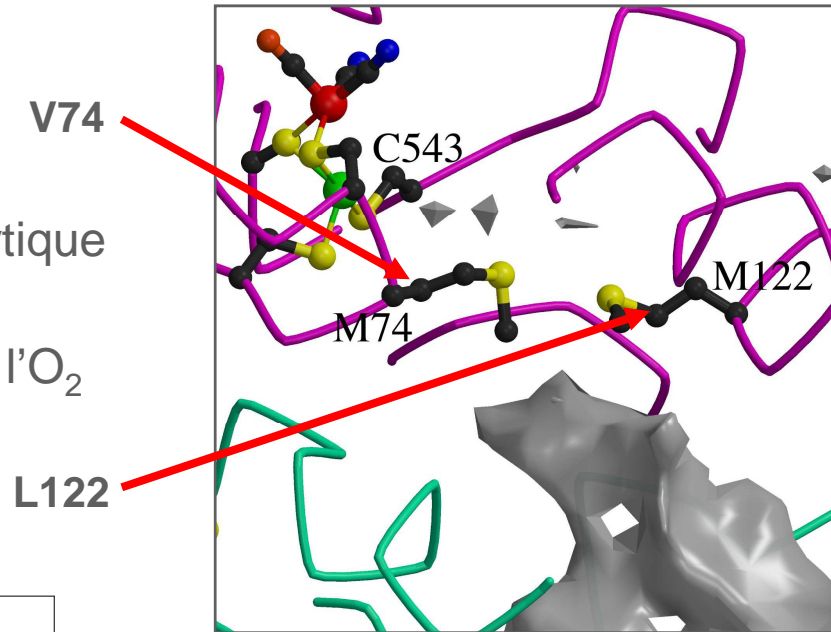


Collaboration M. Rousset CNRS Marseille  
ANR HYLIOX, DIVHYDO, EngineeringH2Cyano

# Réduction de la sensibilité à l'O<sub>2</sub> d'une hydrogénase à NiFe



Activité catalytique  
inactivée par l'O<sub>2</sub>

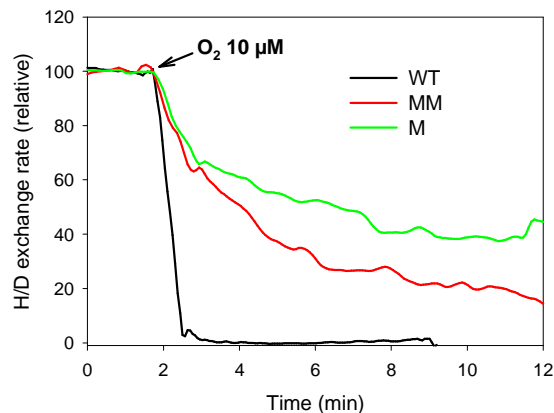


.....→ M74

Tolérante à l'O<sub>2</sub>

.....→ M122

Canal hydrophobe



Restriction du canal hydrophobe limitant  
l'accès de l'O<sub>2</sub> au site actif

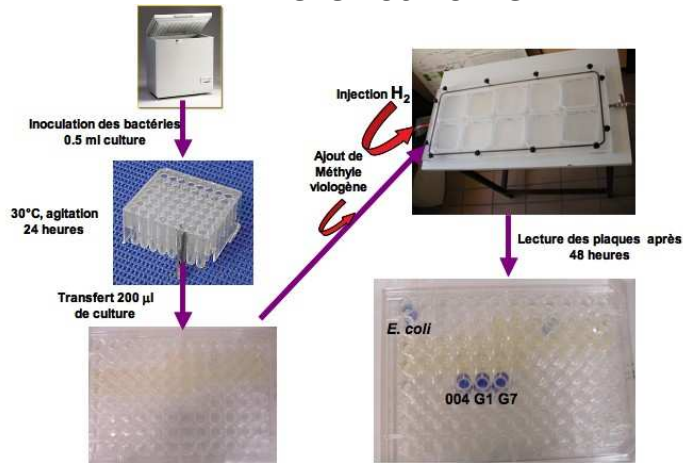
Introduction d'un résidu soufré facilitant la  
réactivation de l'enzyme

Brevet 2007  
Leroux et al. PNAS 2008  
Dementin et al. JACS 2009

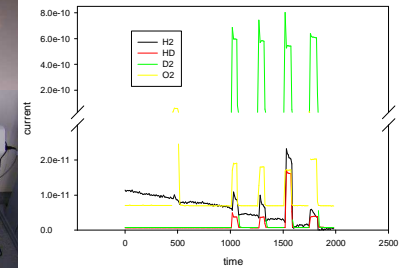
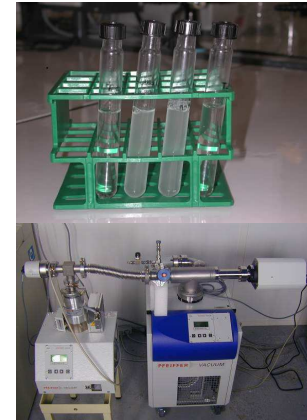
# Crible haut-débit d'H<sub>2</sub>ases issues de la biodiversité bactérienne



## Chémochromie



## Echanges H<sub>2</sub>



## Purification et séquençage



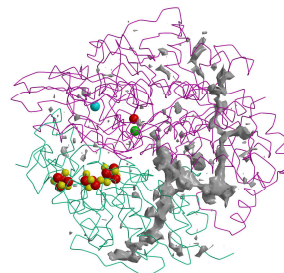
TCAGTCACGTATTCTCCTCACCATCAGGTAGATGGCGCTCTCCTGAT  
 GAATATCGTGCAGCATGCTGAGCAGGGTTTTGCTCCACGCCTGCTG  
 CTCGGGGGATTGCACAGCAAGTGCCGCATCAAACGCGTTTGCAAGC  
 ATCGCGATATGGTTACTGTCGATAACGATTTCCGCGTACTTCGGCAC  
 ACCTTCCATCTTGCGCCGCGGCTCTCCCGACTCCAGCGTGCC  
 GATCCACGCCAGGTATTCTTGCCACGGGCAACTTAACGC ...

## Spectrométrie de masse



**Caractérisation  
 cinétique de  
 l'interaction avec l'O<sub>2</sub>**

## Cristallographie

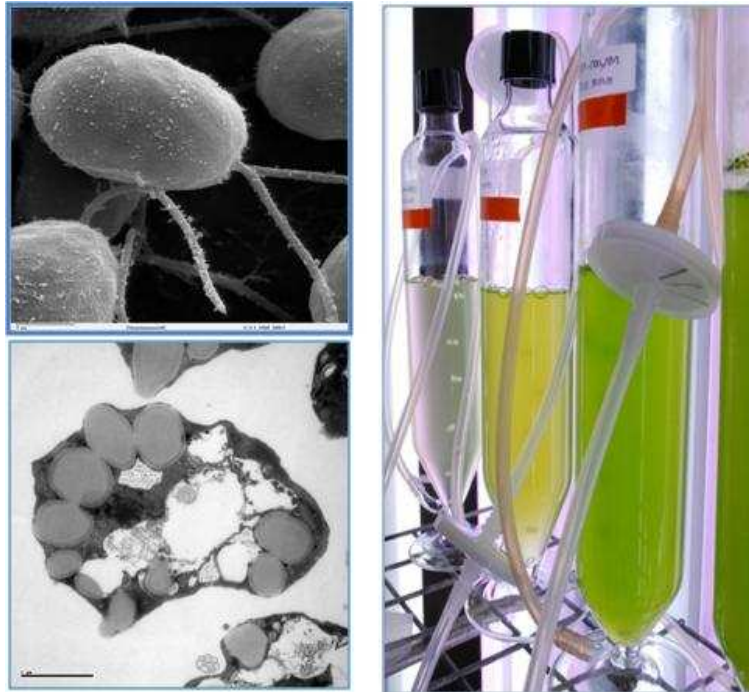


**Détermination de la  
 structure 3D**

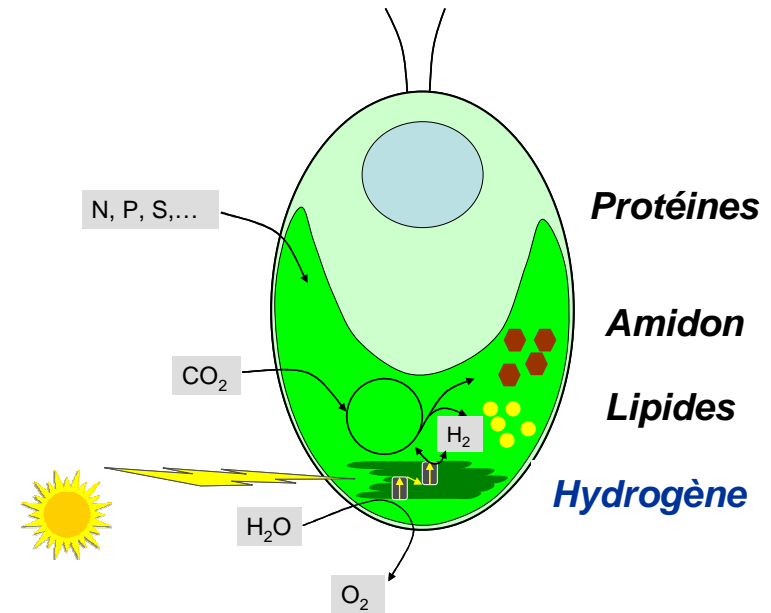


# Des microalgues pour la production de biocarburants ?

cea



*Une souche de *C. reinhardtii* accumule jusqu'à 50% de lipides*

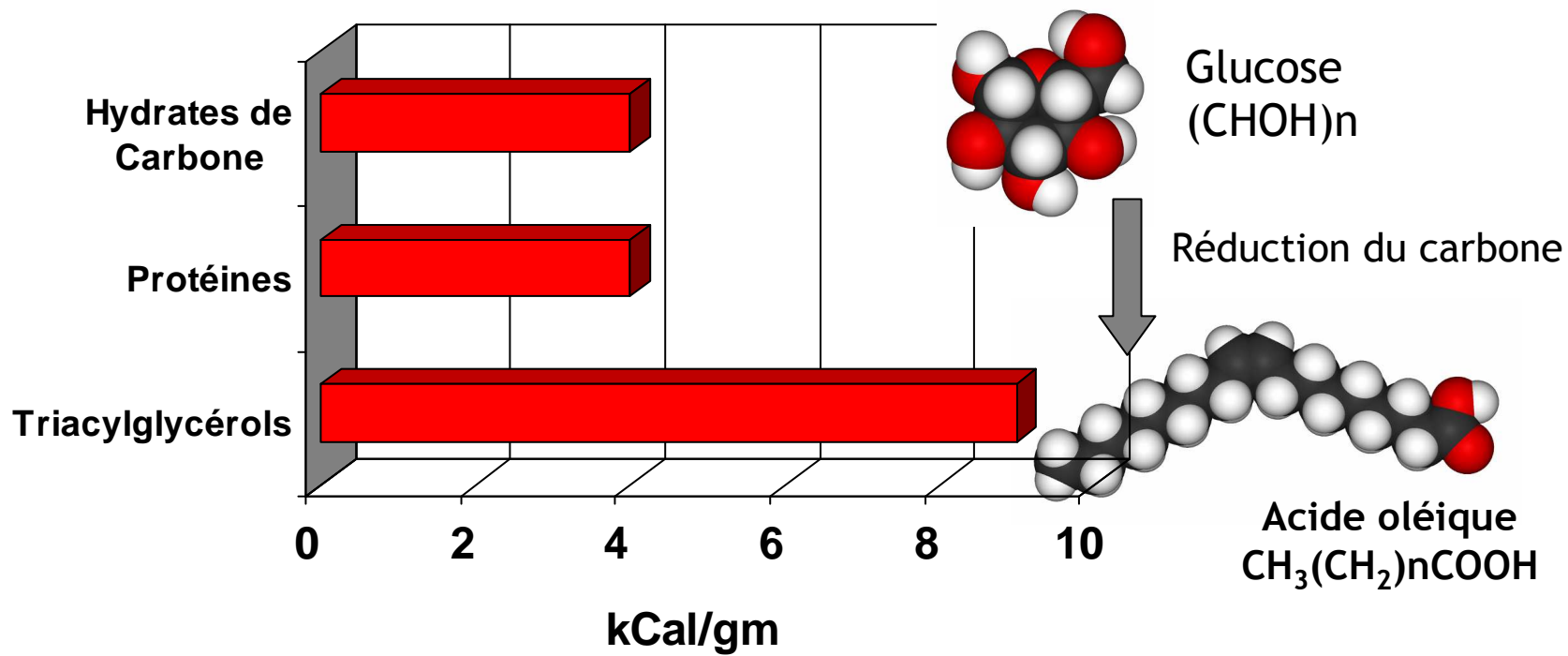


- Production d'hydrogène
- Production de lipides et de biodiesel

# Contenu énergétique des formes de Carbone organique

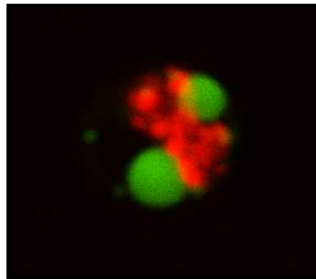


## Contenu énergétique (kCal/gm)

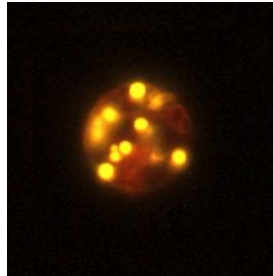


Les huiles produites par les microalgues représentent la forme la plus réduite de carbone disponible en quantité dans la nature

# Potentiel pour la production de biodiesel et verrous



*Neochloris oleoabundans*



*Chlamydomonas reinhardtii*



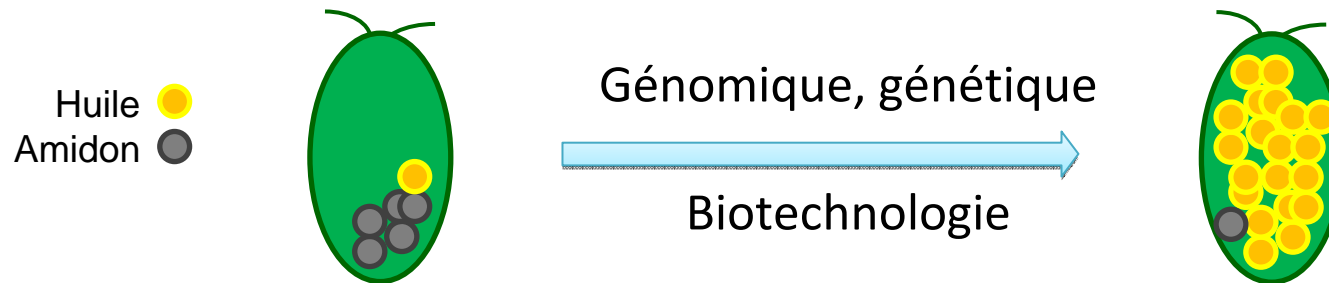
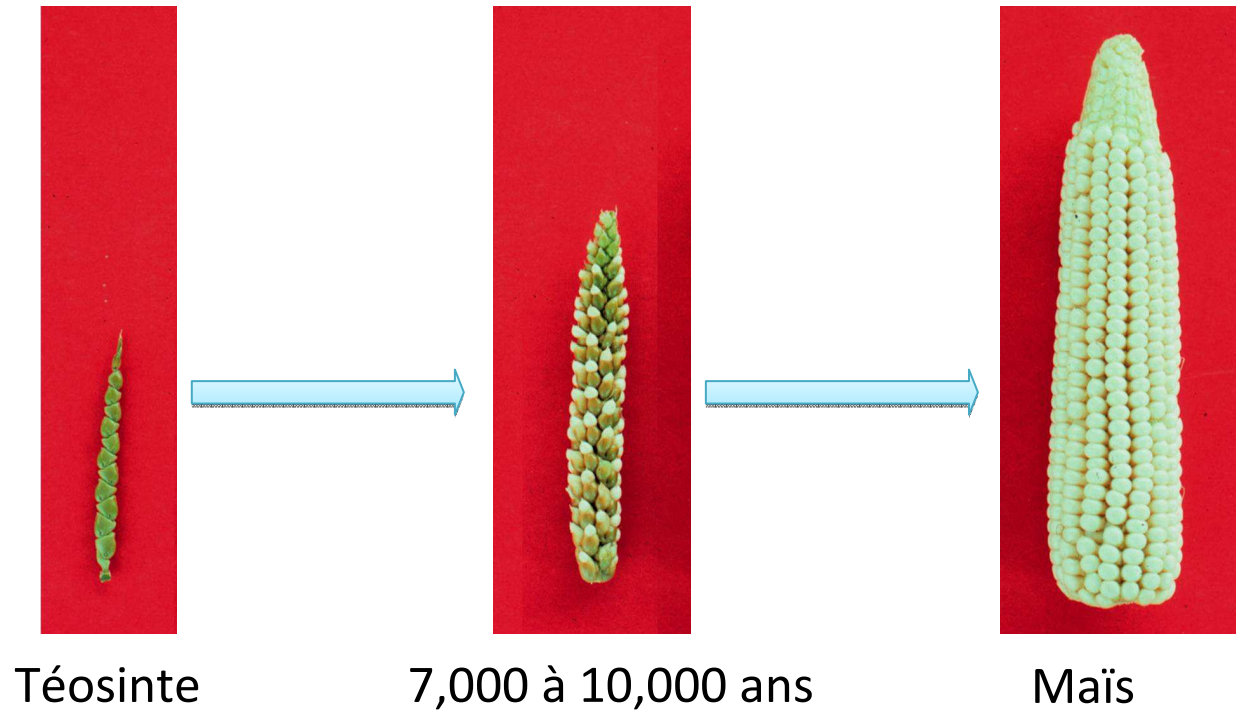
**Certaines microalgues accumulent jusqu'à 60% de leur poids sec en lipides**

	Microalgues	Plantes C4	Plantes C3
<b>Productivité maximale (T.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup>)</b> Rendement photosynthétique	<b>150-180</b> ~6 - 7.5 %	<b>60</b> ~2.5 %	<b>30</b> ~1.25 %
<b>Productivité observée (T.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup>)</b> Photobioréacteurs Champ	<b>50-70</b>	<b>10-30</b>	<b>10-15</b>
<b>Productivité en lipides potentielle (T. ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup>)</b>	<b>75-90</b>		
<b>Productivité en lipides observée (T. ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup>)</b>	<b>15-20</b>	<b>3</b>	<b>1.5</b>
<b>Coûts de production (\$ .kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>0.4 - 40</b> →	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>

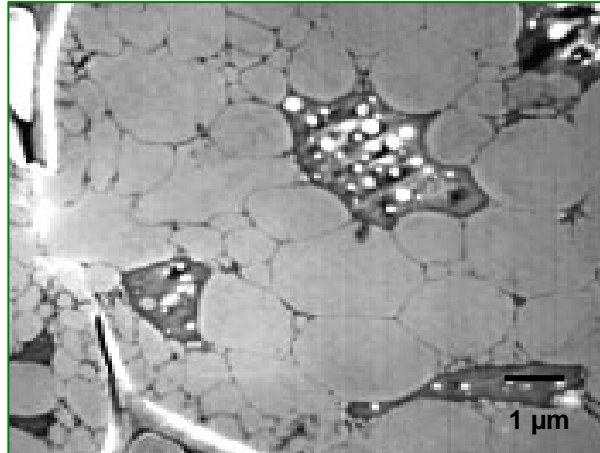
**Verrous  
Biologiques**

**Verrous  
Technologiques**

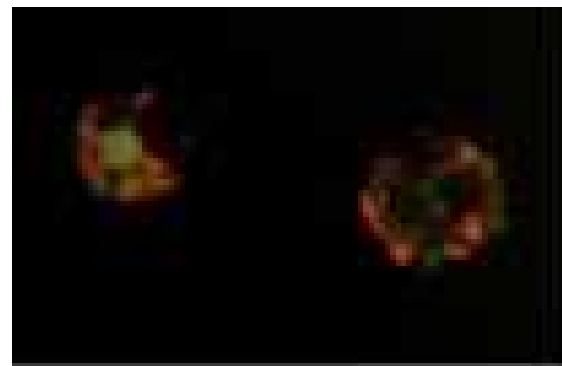
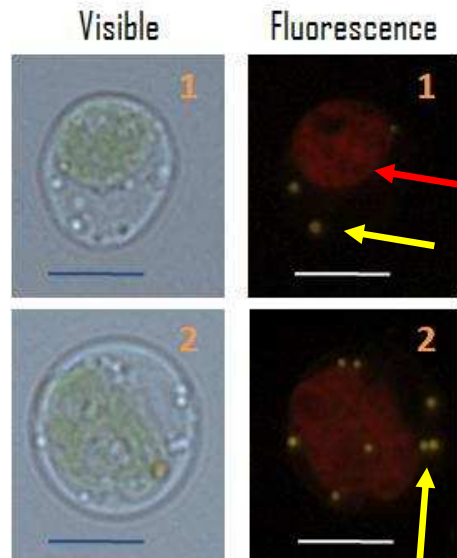
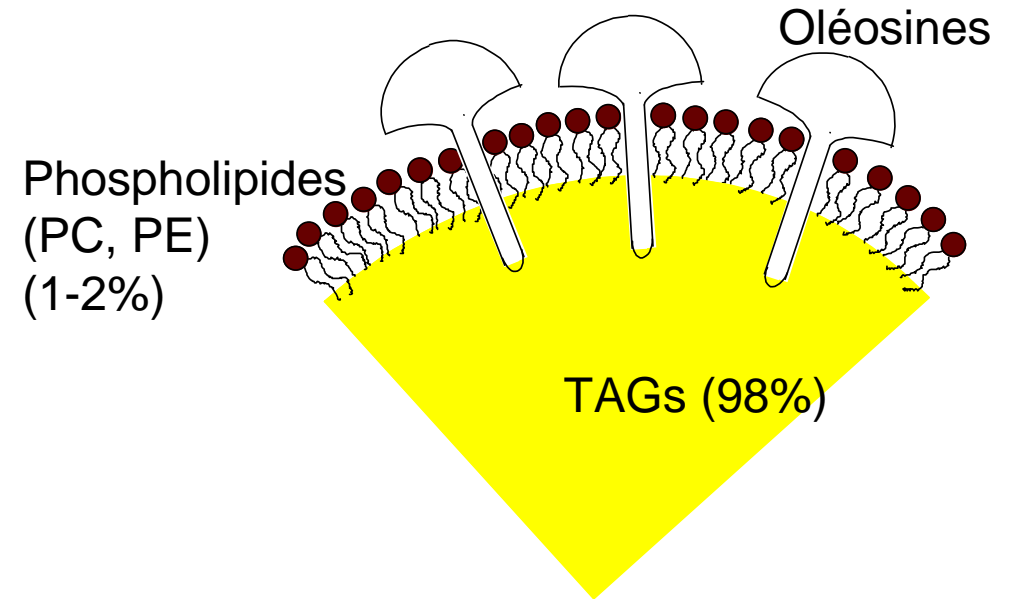
# Domestiquer les microalgues pour nos besoins en énergie



# Structure des corps lipidiques de plantes



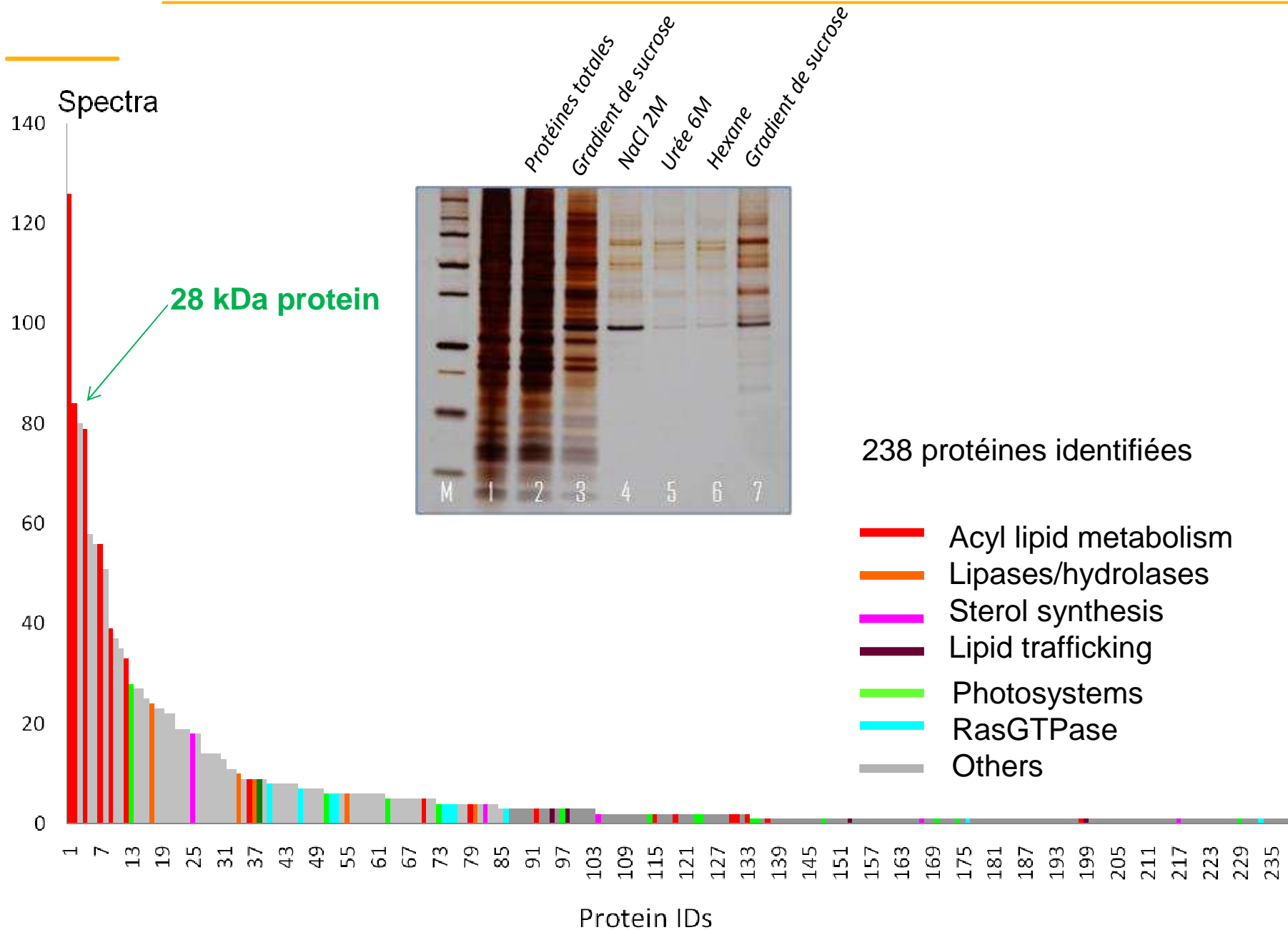
Sunflower cotyledon oil bodies under TEM  
(PhD Thesis, Fred Beisson)



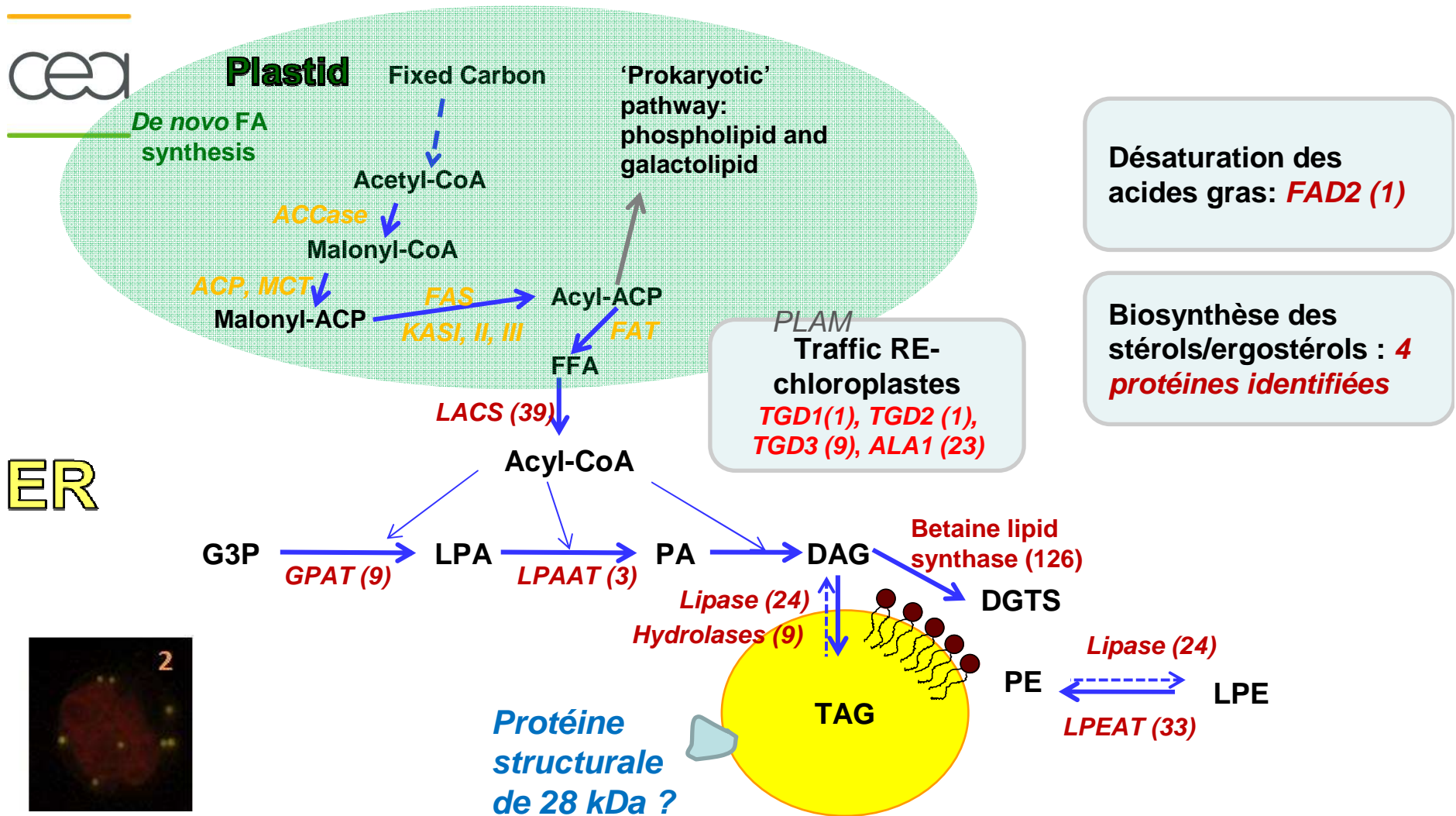
Gouttelettes lipidiques de microalgues

*Quelle structure pour les corps lipidiques de microalgues ?  
Quelles protéines ?*

# Analyse protéomique des gouttelettes lipidiques



# Voie de biosynthèse des TAGs identifiées par protéomique



# Elucider les mécanismes d'accumulation des TAG

---



**Approche gène candidat** : validation de gènes candidats identifiés par protéomique (protéine de structure candidate, voies de biosynthèse...)

Knock-down (miRNA)

Activité enzymatique

Sur-expression et/ou expression inductible (gènes régulateurs)

**Approche génétique** : criblage de mutants affectés dans le contenu en TAG

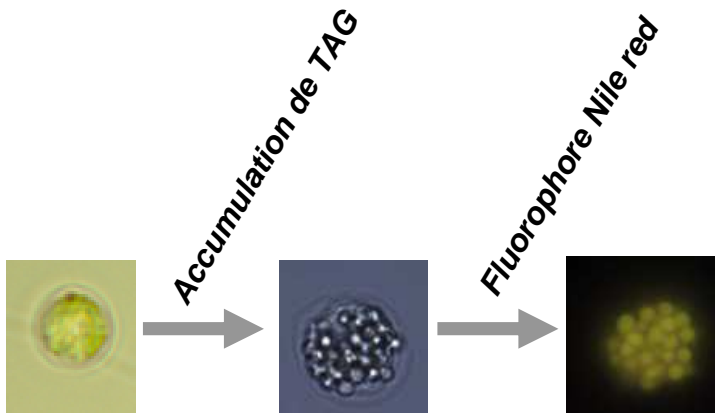
Mutants n'accumulant pas ou peu de TAG

Mutants accumulant des TAGs en l'absence de carence

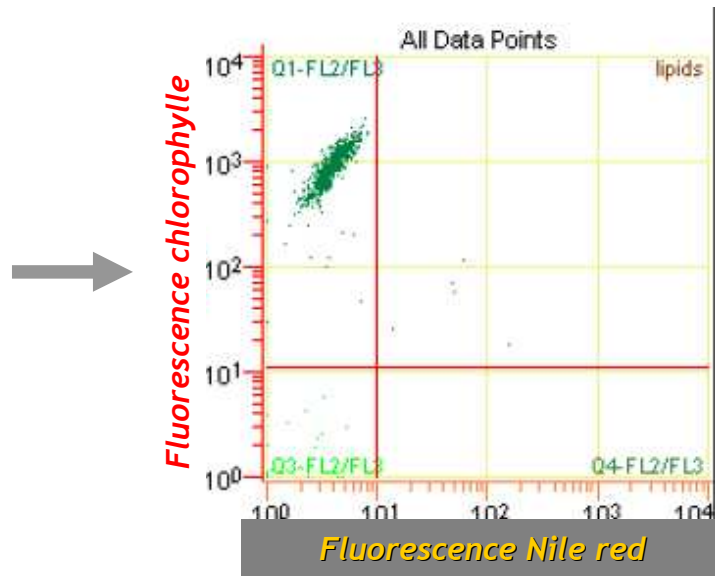
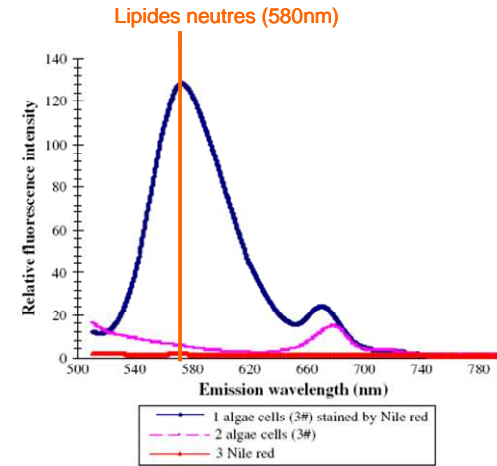
Mutants présentant des profils d'acides gras modifiés (désaturases)



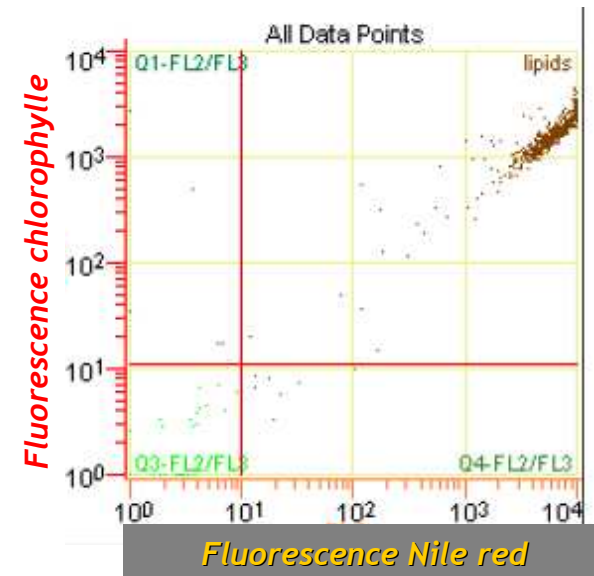
# Criblage haut-débit de souches par cytométrie en flux



Spectre d'émission (exc. 480nm) :



Souche non-accumulatrice

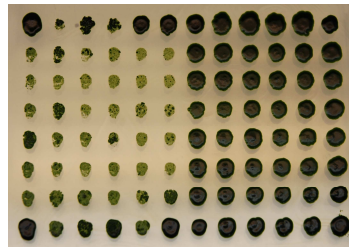


Souche accumulatrice

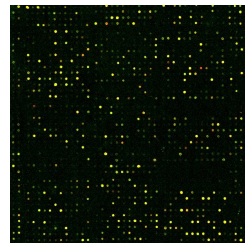
# Emergence d'une approche intégrée: Biologie des systèmes



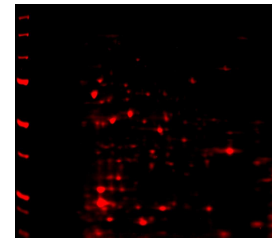
## ANR ALGOMICS



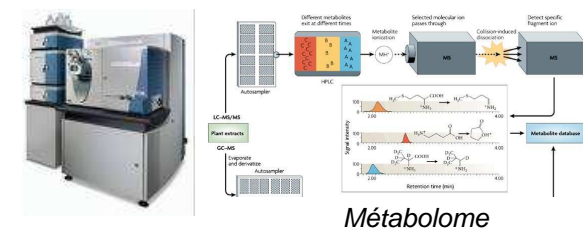
Banque de mutants de microalgues pour criblage



Transcriptome



Protéome



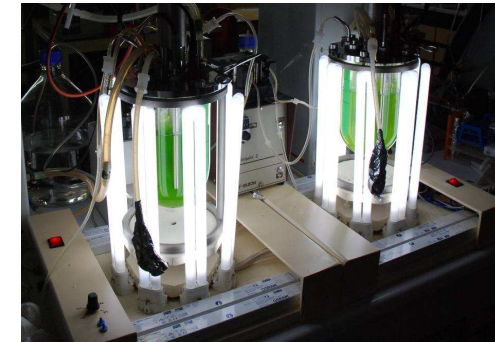
Métabolome

Obtention de mutants  
-conversion photosynthétique  
-stockage de l'énergie (lipides, hydrates de carbone)

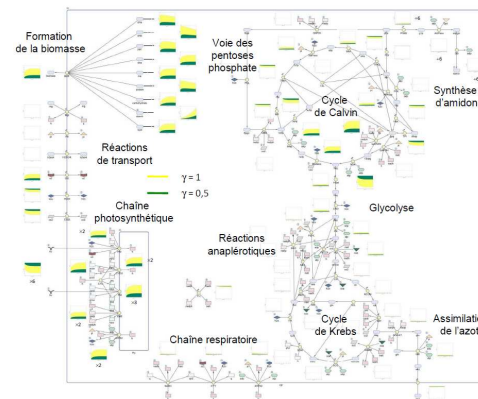
Caractérisation par des approches combinées  
-physiologie, transcriptomique, protéomique, métabolomique  
-modélisation

Identification des points de contrôle métaboliques

Stratégies d'optimisation (sur-expression, inactivation de gènes, nouvelle mutagenèse dirigée,...)

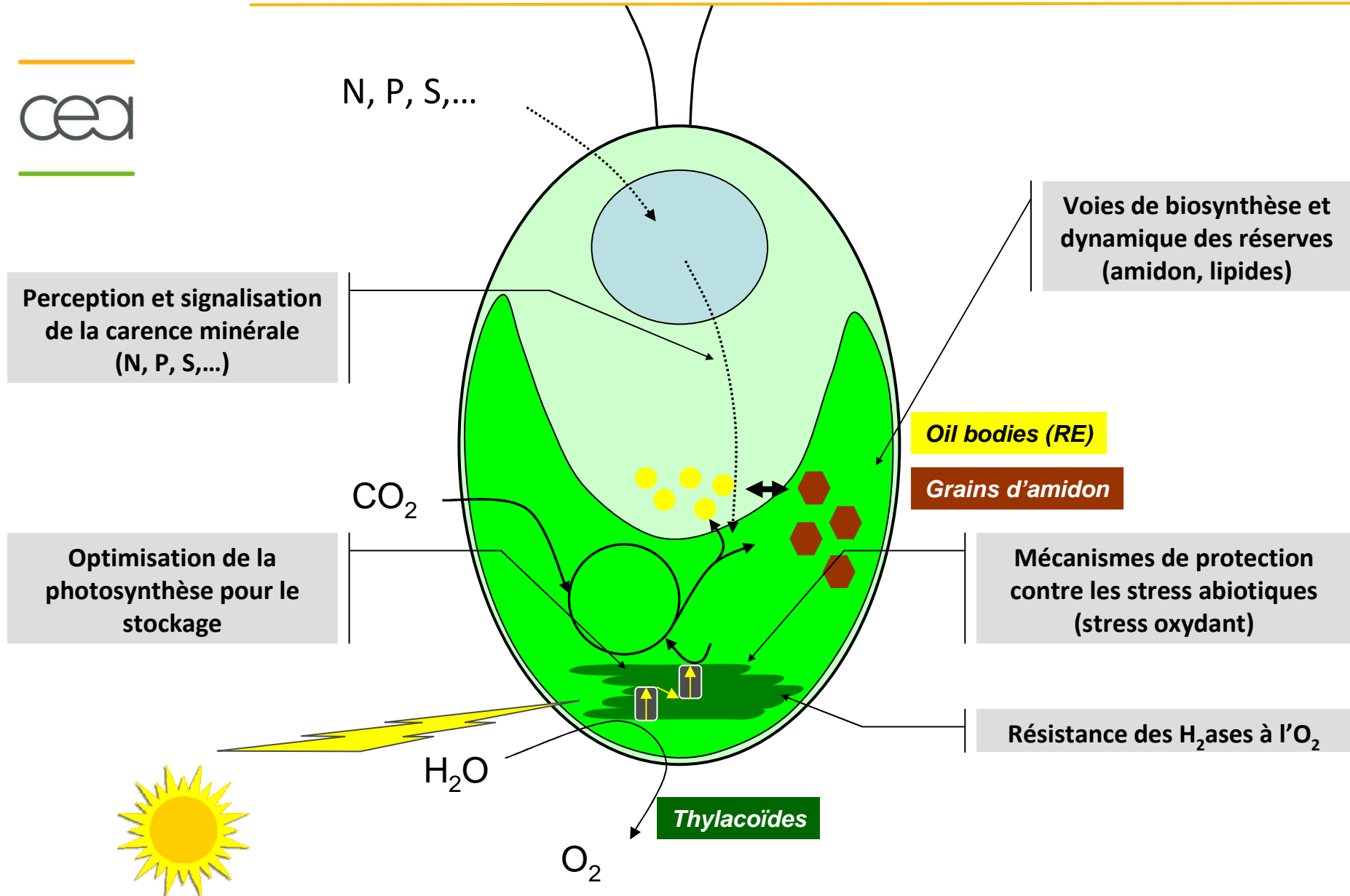


Cultures en chémostats



Modélisation de réseau métabolique

# Mécanismes et verrous biologiques



Perception et signalisation de la carence minérale (N, P, S, ...)

Voies de biosynthèse et dynamique des réserves (amidon, lipides)

Oil bodies (RE)

Grains d'amidon

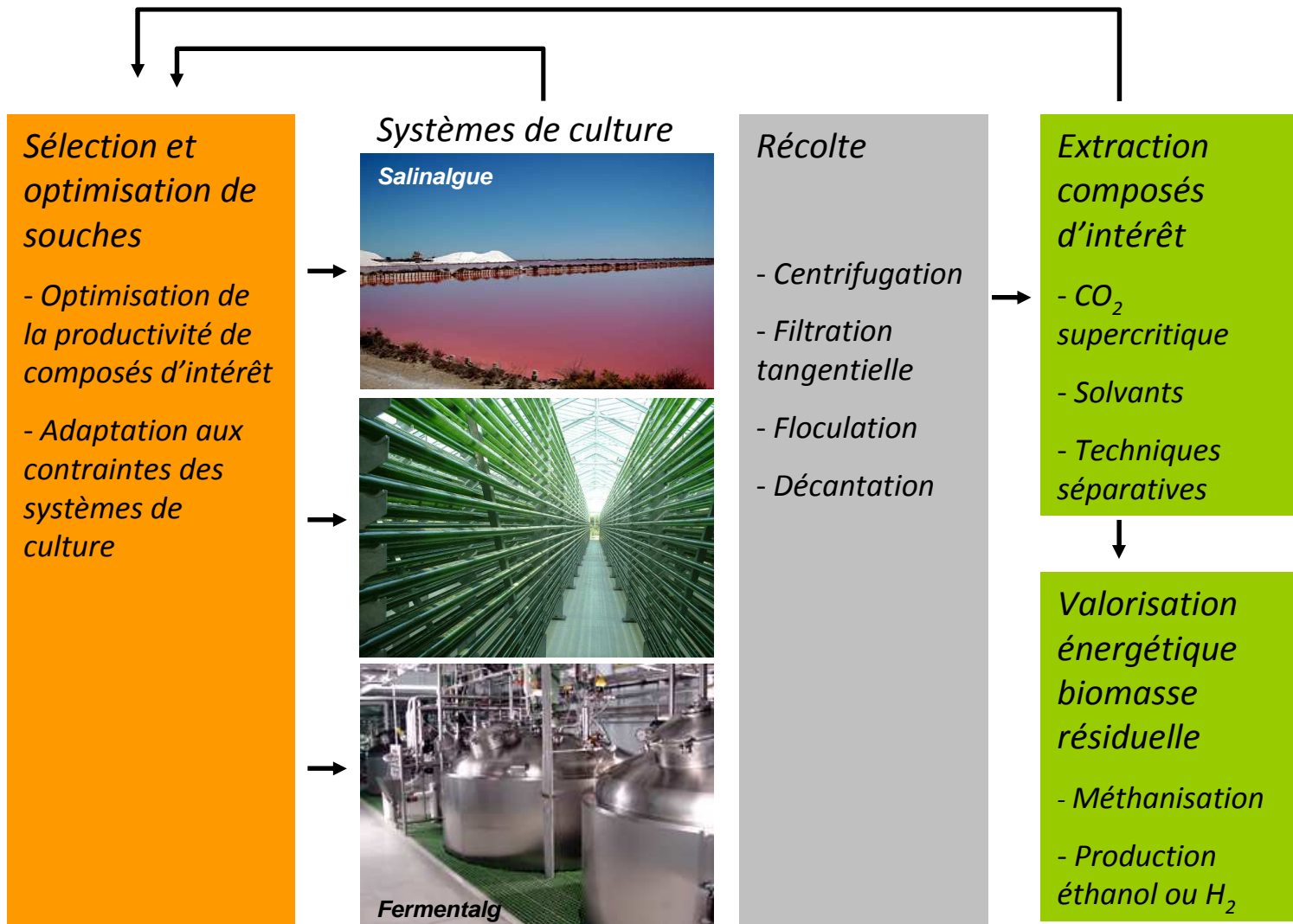
Optimisation de la photosynthèse pour le stockage

Mécanismes de protection contre les stress abiotiques (stress oxydant)

Résistance des  $H_2ases$  à l' $O_2$

Thylacoïdes

# Des verrous biologiques et technologiques

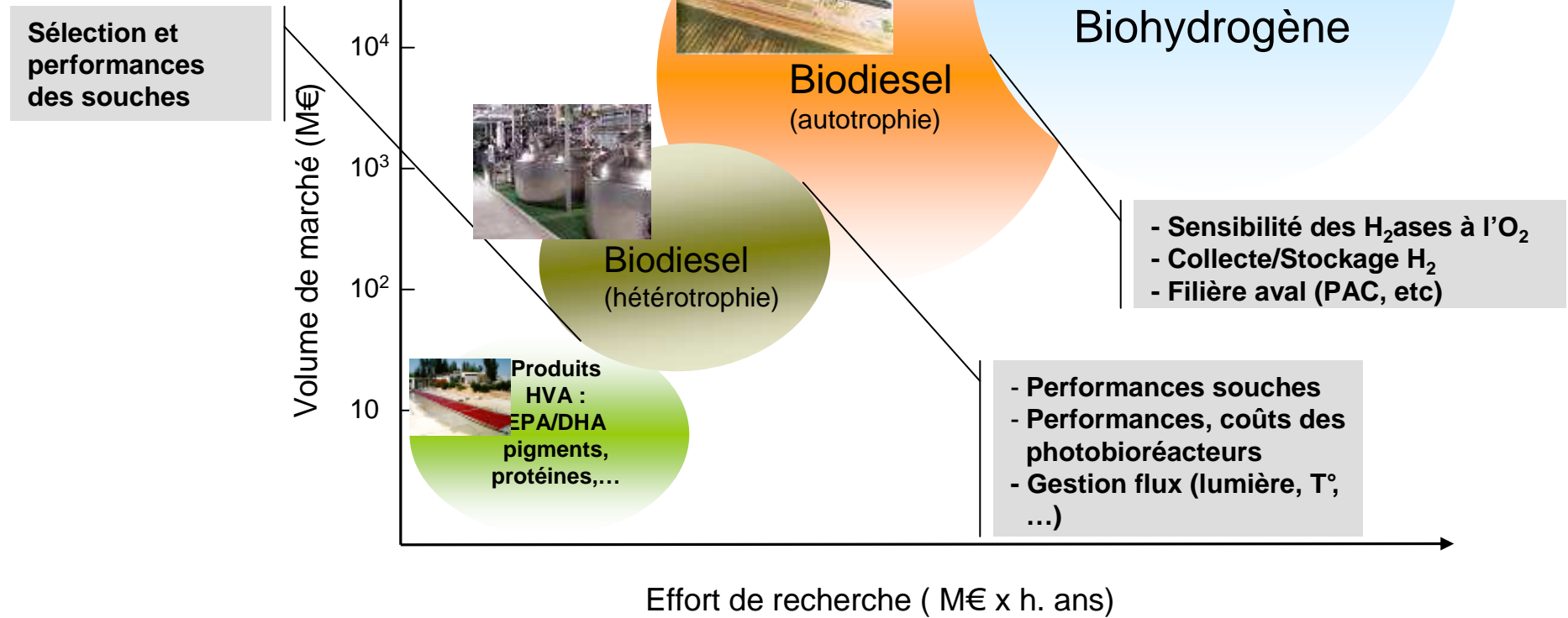


R&D

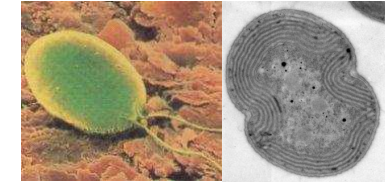
Biotechnologique

Technologique

# Des marchés existants aux biocarburants : les verrous



# Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues (LB<sup>3</sup>M)



## Chercheurs & ingénieurs

BEISSON Frédéric



BILLON Emmanuelle

CARRIER Patrick

COURNAC Laurent

CUINE Stéphan

GUEDENEY Geneviève

LI Yonghua

MIRABELLA Boris



PELTIER Gilles

PUPPO Rémy



RICHAUD Pierre

SAHUT Claire

## Techniciens

ADRIANO Jean-Marc

AUROY Pascaline

BEYLY Audrey

CARDETTINI Véronique

## Post-docs

TOLLETER Dimitri

SCHULZ-RAFFELT Miriam

## Thèses

CANO Mélissa

CHOCHOIS Vincent

NGUYEN Thi Hoa Mai

VERDIER Gaëtan

## Collaborations

Steven BALL, Université de Lille

Fabrice FRANCK, Université de Liège

Jean-David ROCHAIX, Université Genève

Marc ROUSSET CNRS, Marseille



DIVHYDO (2006-2009)

SHAMASH(2006-2009)

HYLIOX (2008-2011)

ALGOMICS (2009-2012)



FP7 SOLAR-H<sub>2</sub>

FP6 SOLAR-H

HELIOBIOTEC CPER (2007-2013)





# HélioBiotec

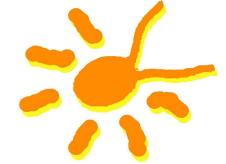


PLATE-FORME DE RECHERCHE PARTENARIALE  
BIOTECHNOLOGIES ET BIOENERGIES  
CPER 2007-2013

- parc de photo-bioréacteurs instrumentés,
- plateau technique de spectrométrie de masse (analyse des gaz et traçage isotopique),
- ensemble de techniques séparatives : GC-MS, HP-TLC, UPLC-MS-MS (lipidomique),
- méthodes biophysiques (fluorescence, changements d'absorption) pour la caractérisation de souches et le criblage haut débit,
- cytomètre en flux, lecteurs de microplaques pour le criblage haut débit,
- chambres climatiques en conditions contrôlées pour la culture de microalgues,
- plus de 500 souches cryo-conservées,
- robot de cristallisation, qPCR,...

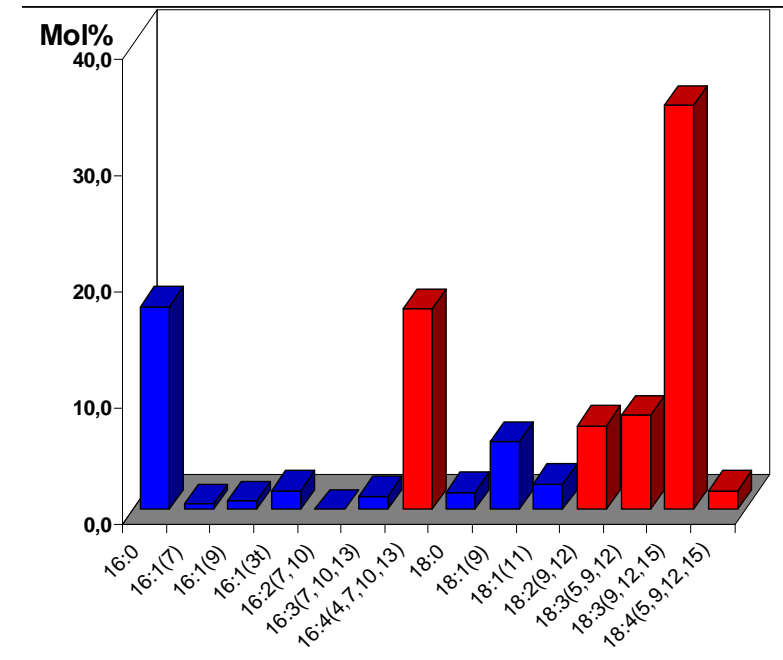
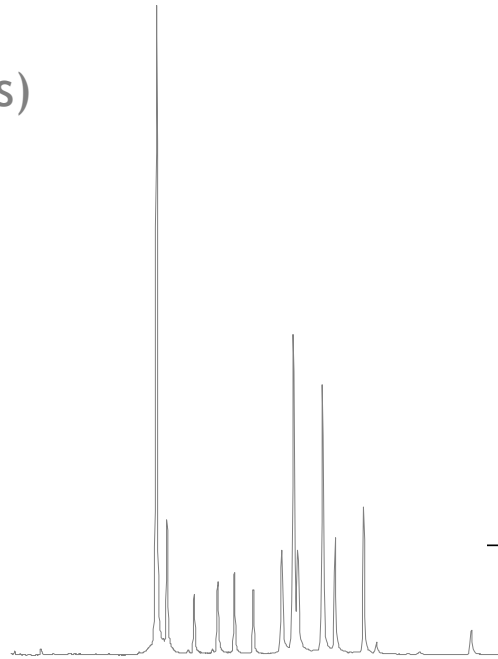
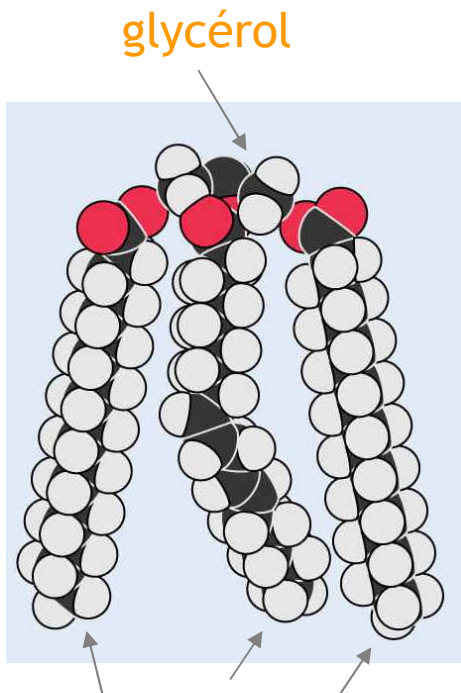




# Propriétés des huiles et composition en acides gras



Huile = triglycérides (TAGs)



*Application biodiesel :  
peu d'insaturations (résistance à l'oxydation)*