



HAL
open science

Carburants à base d'algues oléagineuses Principes, filières, verrous

Eric Marechal

► **To cite this version:**

Eric Marechal. Carburants à base d'algues oléagineuses Principes, filières, verrous . Techniques de l'Ingénieur, 2021, pp.IN186 v2. 10.51257/a-v2-in186 . hal-03143875

HAL Id: hal-03143875

<https://hal.science/hal-03143875>

Submitted on 25 Feb 2021

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.

Carburants à base d'algues oléagineuses

Principes, filières, verrous

Biofuels from oleaginous algae

Principles, industry sectors, challenges

par **Eric MARECHAL**

Directeur de recherche CNRS, directeur du Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, IRIG, CEA Grenoble, Grenoble, France

Résumé (~500 - 800 signes) : Résumé du texte - Résumé du texte

Certains organismes photosynthétiques sont capables de capturer le CO₂ atmosphérique et de produire une biomasse riche en huile. Cette huile est considérée de ce fait comme une ressource renouvelable, qui pourrait devenir une alternative aux hydrocarbures fossiles. Cet article fournit une définition détaillée de ce qu'on entend par microalgue, huile, biocarburant, et donne un état de l'art des technologies de culture, de récolte, d'extraction d'huile et de conversion en biodiesel, du laboratoire à l'échelle pilote, soulignant les verrous biotechnologiques et technologiques à lever dans l'avenir.

Abstract (~500 – 800 signs) : Text abstract - Text abstract

Some photosynthetic organisms can capture atmospheric CO₂ and produce a biomass, with high levels of oil. This oil is therefore considered as a renewable resource, which could become an alternative to fossil hydrocarbons. This article provides a detailed definition of what is meant by microalgae, oil and biofuel, and gives a brief state of the art of technologies for cultivation, harvesting, oil extraction and conversion into biodiesel, from the laboratory to the pilot scale, highlighting the biotechnological and technological challenges which should be addressed in the future.

Mots-clés / Keywords :

	français	anglais
Technologies impliquées <i>(1 à 2 termes)</i>	<i>Biotechnologies, Procédés d'extraction</i>	<i>Biotechnologies, extraction processes</i>
Domaines d'application <i>(1 à 2 termes)</i>	<i>biodiésel, biokérosène</i>	<i>biodiesel, jetfuel</i>
Type d'article <i>(choisir 1 terme)</i>	<i>Etat de l'art</i>	<i>State of the art</i>
Description du contenu <i>(2 à 3 termes)</i>	<i>Culture des microalgues, extraction d'huile, biocarburant</i>	<i>Microalgae cultivation, oil extraction, biofuel</i>

Table des matières

1	Contexte	3
2	Les microalgues oléagineuses	5
2.1	Microalgues : des microorganismes unicellulaires réalisant la photosynthèse oxygénique	5
2.2	Diversité biologique des microalgues	7
2.3	Métabolisme carboné : de la capture du CO ₂ à la production de sucres et d'huiles	8
2.4	Teneur et qualité en huile des microalgues oléagineuses	10
3	Questions biologiques et biotechnologiques	13
3.1	Manipulation au laboratoire	13
3.2	Huiles : une source pour le biodiésel et le biokérosène	17
3.3	Conciliation entre biomasse et teneur en huile	19
3.4	Verrous biologiques	19
4	Procédés de culture et de récolte des microalgues	19
4.1	Culture en bassin ouvert ou en système confiné	Erreur ! Signet non défini.
5	Collecte, extraction et conversion	21
5.1	Extraire de l'huile d'un matériel hydraté	21
5.2	Conversion de l'huile en biocarburant	21
6	Une filière en construction	22
6.1	Vision linéaire de la filière	22
6.2	Vision intégrée de la filière	23
7	Conclusion	23
	Remerciements	25

1 Contexte

Les effets du changement climatique sont aujourd'hui indiscutables et ils imposent une mutation profonde et complexe visant la décarbonation des activités humaines, en particulier dans le domaine de l'énergie. Par manque d'anticipation, tous les secteurs économiques rodent encore leurs feuilles de route et une coordination aux échelles nationales et internationales se met difficilement en place, suite à l'accord de Paris de 2015. Dans ce contexte fragile et incertain, le choc de la pandémie du Covid-19 de 2020 a eu un effet accélérateur, touchant de façon critique certaines industries telles que l'aéronautique ou l'industrie automobile, mettant plus encore en évidence la nécessité de « sortir du pétrole ». Il est difficile de prédire l'impact de la crise de 2020 à moyen et long terme. Dans ce contexte, un défi pour les prochaines décennies est de réussir à proposer une alternative technologique pertinente et économiquement viable aux énergies fossiles. Le diagnostic n'est pas nouveau, a déjà été énoncé, et, parmi l'ensemble des solutions possibles, des espoirs sont nourris sur les biocarburants au sens large du terme, dérivés en particulier des algues, comme substituts au pétrole.

Les algues semblent en effet idéales pour plusieurs raisons. A la différence des plantes oléagineuses telles que le colza ou le palmier à huile, leur culture n'entre pas en concurrence avec des surfaces agricoles dédiées à l'alimentation humaine et animale. Elles sont abondantes dans les écosystèmes marins et elles ont une diversité biologique remarquable qui permet d'envisager des stratégies de criblage de la biodiversité et de sélection variétale. Les algues sont cultivables dans l'eau (même les eaux usées) et fixent le CO₂ atmosphérique par la photosynthèse, intégrant ensuite le carbone dans des molécules organiques riches en énergie. De ce fait, alors que la combustion de pétrole émet dans l'atmosphère du CO₂ piégé il y a plusieurs millions d'années, ce qui enrichit dramatiquement l'atmosphère en carbone, la combustion d'un biocarburant d'origine algale n'émet pas plus de CO₂ que ce qui a été capturé au cours de la culture par la photosynthèse. Réussir à produire en masse des microalgues, riches en molécules organiques qui puissent remplacer les hydrocarbures fossiles, nous doterait donc d'une solution virtuellement inépuisable et sans les impacts néfastes sur l'environnement liés à l'usage du pétrole.

En plus des huiles permettant de produire des biocarburants, la structure de certaines molécules produites par les algues correspond à des précurseurs ou des intermédiaires utilisés pour la production de molécules de haute valeur ajoutée ou pour la chimie de commodité. Les développements biotechnologiques dans le secteur des algo-industries s'orientent donc aussi vers la chimie verte et l'exploitation de cette ressource biologique comme une des alternatives à la pétrochimie. Enfin, certaines algues présentent des propriétés absolument remarquables, car en plus de produire des molécules organiques, elles peuvent minéraliser et piéger le CO₂ sous forme de calcaire.

Pour toutes ces raisons, le potentiel des algues est évalué dans de nombreux programmes, dits de « **CCUS** » (**Capture du Carbone, Utilisation et Stockage ; Carbon Capture, Utilization, and Storage**), en complément d'autres stratégies, sur lesquelles les instituts de recherche et les industriels concernés se positionnent. Dans ce document, l'éclairage est donné sur la production de biocarburants, mais il faut garder à l'esprit que cet objectif s'articule avec d'autres types de transformation de CO₂, également exploitables.

Les algues sont une forme possible de biomasse parmi d'autres pour produire des biocarburants. Les biocarburants peuvent eux-mêmes être de natures diverses. Les définitions assez larges de ce qu'on entend par « **biomasse** » et « **biocarburants** »

entraînent une confusion entre ce que nous pouvons faire aujourd'hui et ce que nous pourrions faire demain. En effet, la production et l'utilisation des biocarburants semblent techniquement acquises puisque des voitures circulent chaque jour avec une part d'agro-éthanol (par exemple avec le supercarburant sans plomb à 10% d'éthanol **SP95-E10**, premier carburant consommé par les Français dans les véhicules essence ou le **superéthanol E85**, contenant jusqu'à 85% d'éthanol) et que des avions volent avec une part de biocarburants. Cependant, nous parlons dans ce cas de biocarburants dérivés de la transformation des sucres, plus précisément du bioéthanol, alors que demain, nous envisageons des biocarburants dérivés des huiles, plus proches des hydrocarbures fossiles, permettant de produire ce qu'on appelle des « biodiésels » et des « biokérosènes », voire des assemblages de carburants liquides de diverses sources. Les technologies à développer ne sont donc pas la simple amélioration des technologies existantes. L'exploitation de nouvelles ressources, comme les microorganismes photosynthétiques, nécessite d'une part des connaissances biologiques que nous n'avons pas et d'autre part des ruptures technologiques pour leur maîtrise et conversion en biocarburants.

Comme de nombreux états, la France s'est engagée dans une stratégie de transition, s'imposant des feuilles de route, qu'elle révisé régulièrement. Elle s'est munie d'un dispositif législatif fixant les orientations énergétiques, d'abord en 2005 et lors du Grenelle Environnement de 2007, puis elle a adopté en 2008 un plan d'action européen, le paquet « Énergie-Climat ». Une première mise à jour des objectifs du paquet Energie-Climat pour 2030 a été présentée par la Commission Européenne en Janvier 2014 et une loi de « Transition Énergétique pour la Croissance Verte » votée en Aout 2015. Un objectif était d'atteindre une proportion de 10 % de biocarburants dans les fournitures d'essence et de diesel dès 2015, puis de progresser vers une part plus importante pour réduire notre dépendance au pétrole. Cet objectif n'a pas été atteint. Selon le tableau de bord de l'Institut Français du Pétrole et des Energies Nouvelles (IFPEN), la part de ce qu'on appelle les « **carburants alternatifs à l'essence et au gazole** » (**électricité, biocarburants, gaz de pétrole liquéfié ou GPL, gaz naturel pour véhicules ou GNV**) ne représentait en 2017 que 7,7 % des carburants consommés, soit environ 160 Mégatonnes d'équivalent pétrole par an (Mtep/an) sur un total de 2,1 Gtep/an. Les biocarburants ne représentaient qu'environ 80 Mtep avec une progression de quelques pourcents chaque année : un peu moins des deux tiers correspondent à du bioéthanol, alors qu'un tiers correspond à du biodiésel issu d'huiles transformées sous forme d'esters méthyliques d'acides gras. En Décembre 2017, l'état français et cinq groupes industriels (Air France, Airbus, Safran, SUEZ et Total) ont signé un « Engagement pour la Croissance Verte » visant la faisabilité économique et opérationnelle d'une filière de biocarburant aéronautique durable. En Janvier 2020, alors que la part des biocarburants n'est que de 0,1% dans les transports aériens, un objectif de 50% est défini par le ministère de la Transition écologique et solidaire et le secrétariat d'État en charge des Transports, visant toutefois plus modestement et raisonnablement une part de 2% de biocarburants d'ici 2025, puis 5% d'ici 2030. En 2020, de nombreux programmes incitatifs de format « Green Deal » se développent aux échelles nationales et européennes, confirmant ces objectifs ambitieux, et réservant une part de soutien public dans les différents plans de relance (en anglais : *stimulus plans*) pour le développement des biocarburants. Depuis 15 ans, les objectifs ont donc toujours été ambitieux et les progrès certes lents et pour certains décevants, mais le développement de biocarburants s'avère de plus en plus nécessaire, dans un contexte aujourd'hui plus large et intégré défini au sein de programmes de « CCUS ».

Les acteurs industriels sont aussi conscients des besoins de mutation des secteurs

traditionnels, pour les procédés d'extraction et de conversion des biocarburants ou encore de raffinage, mais aussi de la nécessité de création, de rupture et d'innovation, pour la culture et la production des microalgues. Le terme de « transition » est donc trompeur, car il s'agit de filières entières à créer sur de nouvelles bases.

Cet article propose de clarifier ce que nous entendons par biocarburant issu des algues oléagineuses, au sein des différentes formes de biocarburants. Tout au long de cet article, nous garderons à l'esprit que le potentiel des microalgues ne se cantonne pas à servir de ressource pour les énergies renouvelables. Les microalgues peuvent en effet être exploitées pour une vaste gamme d'applications, allant de la nutrition des poissons d'élevage à l'extraction de substances pour les secteurs cosmétique, nutrition humaine, biomédical ou pour la chimie verte. Les algo-technologies et les algo-industries sont à mettre en place avec le niveau d'intégration que nous connaissons pour l'agriculture et les industries qui en dépendent. Cette diversité d'applications a motivé le lancement de nombreux programmes de R&D de CCUS qui nous oblige ainsi à avoir une vision d'ensemble. La constitution de filières industrielles, intégrant énergies et autres domaines applicatifs sera donc aussi abordée.

2 Les microalgues oléagineuses

2.1 Microalgues : des microorganismes unicellulaires réalisant la photosynthèse oxygénique

Les microalgues sont des microorganismes qui se distinguent des autres par leur faculté à fixer le CO₂ de l'atmosphère par le processus photosynthétique. Les microalgues peuvent *a priori* être cultivées en apportant simplement du CO₂, quelques éléments nutritifs et une source de lumière. Cette définition recouvre une diversité biologique exceptionnelle [1] [2] [3] [4] qui doit être prise en compte, car un procédé industriel mis au point sur un type de microalgue n'est peut-être pas applicable à un autre type. Examinons tout d'abord ce qui fait l'unité de ce groupe de microorganismes.

La **photosynthèse oxygénique** est le processus biologique qui permet, grâce à la lumière du soleil, de convertir le CO₂ de l'atmosphère et l'H₂O de l'environnement en matière organique, initialement un sucre de formule générale C₆H₁₂O₆, le glucose. Le bilan de la photosynthèse est donné par l'équation suivante :



Les acteurs moléculaires de cette équation bilan (substrats, enzymes, produits) n'entrent pas en scène simultanément, ni au même lieu de la cellule.

Dans une première phase qui nécessite de la lumière, dite « **phase claire** », les **photons** sont captés par les **photosystèmes**, des complexes multiprotéiques de grandes tailles insérés à l'intérieur de membranes biologiques particulières, les **membranes photosynthétiques**. Certains constituants des antennes collectrices des photosystèmes, les **pigments**, sont capables de capturer une part importante de l'énergie portée par le spectre solaire (figure 1). Cette énergie lumineuse est convertie en **énergie chimique** (production de molécules d'ATP) et en **pouvoir réducteur** (production de molécules de NADPH, H⁺). Seule l'énergie portée par les photons captés par les pigments photosynthétiques est utilisée. Par exemple, les organismes chlorophylliens n'absorbent pas les longueurs d'onde autour du vert (ce qui donne précisément la couleur verte des organismes chlorophylliens, voir figure 1). D'autres pigments existent qui permettent d'exploiter d'autres régions du spectre lumineux.

En théorie, sur la base du fonctionnement moléculaire des photosystèmes isolés, on considère que de l'ordre de 10% de l'énergie solaire reçue devrait pouvoir être convertie en énergie chimique. Toutefois, les mécanismes biochimiques en aval de la photosynthèse sont limités et dans les faits, on estime seule une part de 1 à 5% de l'énergie solaire incidente est convertie. Améliorer ce rendement thermodynamique en « aidant » la cellule à mieux canaliser l'énergie captée est un des objectifs importants de la recherche sur la biomasse algale.

Cette première phase s'accompagne du **craquage de l'eau**, donnant ses électrons, et **libérant de l'oxygène**.

La seconde phase de la photosynthèse, dite « **phase sombre** », fait intervenir de nombreuses protéines dont la **Rubisco**, qui **capture le CO₂** atmosphérique et le « greffe » sur un substrat organique (figure 2). Par une série de réactions alimentées en ATP et en NADPH, H⁺, du **glucose**, un **sucre** de formule C₆H₁₂O₆, est synthétisé puis stocké dans la cellule sous forme de polymères.

Figure 1 - Première phase de la photosynthèse (phase claire) : capture et conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique et pouvoir réducteur. Seule l'énergie des photons captés par les pigments photosynthétiques est utilisée. Les organismes chlorophylliens n'absorbent pas les longueurs d'onde autour du vert, ce qui leur donne précisément cette couleur. D'autres pigments que la chlorophylle existent et permettent aux organismes photosynthétiques d'exploiter d'autres régions du spectre lumineux. Cette étape s'accompagne du craquage de l'eau et d'une libération d'oxygène.

Figure 2 - Seconde phase de la photosynthèse (phase sombre) : capture du CO₂ atmosphérique et production de molécules organiques. Le sucre produit (glucose) est stocké sous forme d'un polymère (amidon ou polymères de structure proche).

Bien que le point commun des microalgues soit leur faculté à réaliser la photosynthèse, le terme de microalgue ne recouvre pas une unité biologique. Par analogie, on parle de « microalgue » comme on peut parler de « céréale ». Ici **une microalgue est un organisme unicellulaire photosynthétique que l'on peut cultiver dans l'eau, dans un bassin ou dans un fermenteur**, là une céréale est une plante que l'on peut cultiver en sol, moissonner et dont on extrait des farines. Les céréales comprennent des organismes aussi distincts que le blé ou le sarrasin, qui sur le plan botanique sont très éloignés, l'un étant une monocotylédone graminée, l'autre une dicotylédone polygonacée. Si la divergence botanique au sein des céréales semble avoir peu d'impact sur les procédés de culture, de récolte et d'usage, la diversité biologique des microalgues est sans commune mesure, rassemblant sous ce vocable des organismes allant de la spiruline (une « cyanobactérie »), à la chlorelle (une « algue primaire ») et enfin *Nannochloropsis*, (un organisme de structure cellulaire d'un niveau de complexité supérieur, appelé « endosymbionte secondaire »). Nous éclairons ces différences ci-dessous (§1.2).

Toutes ces microalgues sont plus éloignées dans l'évolution qu'un humain l'est d'une méduse ou même encore d'une bactérie ! Il est donc hasardeux de les comparer de façon simpliste, et aujourd'hui, une des raisons de notre difficulté à rationaliser la R&D est liée au manque de connaissances que nous avons d'espèces qui nous semblent pourtant prometteuses pour l'industrie, telles que *Botryococcus* ou *Nannochloropsis*, connaissances qu'il est impossible d'obtenir sur des espèces

modèles étudiées depuis plusieurs décennies au laboratoire, telles que *Chlamydomonas*.

2.2 Diversité biologique des microalgues

La diversité des microalgues est issue d'une histoire évolutive qu'il a été difficile de déchiffrer, mais qu'il est possible aujourd'hui de reconstituer, par des séquences d'intégration de cellules à l'intérieur d'autres, ce qu'on appelle des **endosymbioses** [1]. Avant d'aborder brièvement cette évolution par endosymbioses successives, quelques définitions sont proposées.

Les **microalgues** sont des organismes microscopiques, unicellulaires, capables de réaliser la photosynthèse oxygénique. Les microalgues comprennent des **cellules sans noyau**, les **cyanobactéries**, et deux grands groupes de **cellules à noyau**, les **algues primaires** (les algues au sens strict du terme) et les **endosymbiontes secondaires** (algues au sens large). La **photosynthèse** nécessitant la présence de pigments captant la lumière, les microalgues sont pigmentées (voir aussi figure 1).

Les **cyanobactéries** (figure 3a) sont les microalgues les plus simples, correspondant à un embranchement des bactéries, caractérisées par la présence de membranes photosynthétiques. Elles sont toutes limitées par une double membrane, comme les bactéries dites « Gram négatives ». Ce sont des **cellules sans noyau**, le matériel génétique ou chromosome, se trouvant dans la matrice cellulaire. Les seuls compartiments intracellulaires visibles sont les **membranes photosynthétiques**. De par leur pigmentation, les cyanobactéries étaient *autrefois* appelées algues bleues ou algues bleu-vert, mais cette terminologie a été révisée du fait que seules les cellules à noyau et à chloroplaste simple sont aujourd'hui considérées comme des algues (voir ci-dessous les algues primaires). Plusieurs milliers d'espèces de cyanobactéries sont connues vivant dans les milieux marins, en eaux douces et en milieu aérien. Dans cet article, nous n'évoquerons pas les cyanobactéries, bien que plusieurs équipes de recherche explorent leur potentiel, en particulier pour sécréter des acides gras. Exemples de cyanobactéries : *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Anabaena*, *Spirulina*.

Les **algues primaires (ou algues « vraies »)** sont des organismes dont les cellules possèdent des noyaux (**cellules à noyau**) et une structure cellulaire spécialisée, le **chloroplaste primaire** (figure 3b) qui contient les **membranes photosynthétiques**. Le chloroplaste primaire ressemble à une cyanobactérie, limité comme elle par deux membranes et contenant des membranes photosynthétiques. Cette ressemblance vient du fait que le chloroplaste dérive de l'intégration d'une cyanobactérie ancestrale à l'intérieur d'une cellule à noyau. Il existe trois types d'algues primaires en fonction du pigment photosynthétique, les deux principaux types étant les **algues rouges** et les **algues vertes**. Exemple d'algue rouge : *Porphyridium*. Exemples d'algues vertes : *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Nannochloris* (à ne pas confondre avec *Nannochloropsis*), *Dunaliella*,

Les **endosymbiontes secondaires (ou algues au sens-large du terme)** sont constitués de **cellules à noyau** ayant intégré, en leur sein, une algue primaire. Il s'agit d'**organismes emboîtés** comme des *poupées russes*. L'algue primaire qui s'est intégrée suite à cette endosymbiose secondaire, s'est ensuite simplifiée au point de perdre presque tout son contenu. Au terme de ce processus, le chloroplaste est alors entouré de 4 membranes (figure 3c). Alors que notre connaissance des algues primaires est très approfondie, celle que nous avons des endosymbiontes secondaires est extrêmement lacunaire. Pourtant ce type de microalgues est actuellement considéré comme extrêmement productif et prometteur. Le plus

important groupe des endosymbiontes secondaires qui peuplent les milieux aquatiques océaniques et terrestre s'appelle le groupe des **chromalvéolés**. Il comprend par exemple les diatomées. Exemple de chromalvéolés : *Phaeodactylum*, *Thalassiosira*, *Nannochloropsis*, *Microchloropsis*.

La figure 3 montre que la machinerie photosynthétique est structurée de façon très proche au sein de toutes les microalgues, en particulier grâce à la présence de capteurs solaires (les antennes collectrices) qui transfèrent l'énergie lumineuse aux photosystèmes et à une série de protéines, en grande partie conservées au cours de l'évolution, insérées dans les membranes photosynthétiques. Cette similarité structurale tient à l'évolution des microalgues par des séries d'emboîtements, ou endosymbioses.

Figure 3 - Structures cellulaires contenant les membranes photosynthétiques chez les trois grands groupes de microalgues. Les *cyanobactéries* (a) sont les microalgues les plus simples, correspondant à des bactéries limitées par deux membranes biologiques et contenant dans leur matrice les membranes photosynthétiques. Les *algues primaires* ou *algues « vraies »* (b) correspondent à des cellules à noyau disposant d'un chloroplaste dit primaire, une structure qui dérive d'une cyanobactérie ancestrale. Le chloroplaste primaire est limité par deux membranes, comme la cyanobactérie, et contient les membranes photosynthétiques héritées de celle-ci. Enfin les *endosymbiontes secondaires* (c) correspondent à des cellules à noyau disposant d'un chloroplaste dit secondaire, une structure qui dérive d'une algue primaire ingérée comme une poupée russe. Ce chloroplaste est limité par trois ou quatre membranes et cette complexité cellulaire est à ce jour très mal connue.

La figure 4 schématise le scénario évolutif à l'origine de cette biodiversité.

Figure 4 - La diversité structurale des microalgues tient à leur évolution par emboîtements successifs. Une cyanobactérie a été intégrée à l'intérieur d'une cellule à noyau, au cours d'une *première endosymbiose*, donnant naissance au chloroplaste primaire qui ressemble structurellement à une cyanobactérie. Au cours du temps cette association est devenue indissociable et il ne reste que les deux membranes héritées de celles de la cyanobactérie pour entourer le chloroplaste. Les endosymbiontes secondaires dérivent d'une *deuxième endosymbiose* lorsqu'une autre cellule à noyau a ingéré une algue primaire et l'a intégrée, sous une forme simplifiée. Là encore l'association est devenue indissociable et l'organite ainsi formé est appelé un chloroplaste secondaire, limité en général par quatre membranes. Les endosymbiontes secondaires sont aujourd'hui mal connus, et un enjeu est de combler les lacunes de connaissances qui limitent leur maîtrise pour les applications biotechnologiques.

2.3 Métabolisme carboné : de la capture du CO₂ à la production de sucres et d'huiles

Toutes les microalgues réalisent la photosynthèse, dont la phase sombre assure la capture de CO₂ et la production initiale de sucre, en particulier de glucose (figure 2). Le glucose est donc à l'origine de toutes les autres molécules qui seront construites chez ces organismes, suivant un réseau de réactions chimiques, qu'on appelle le métabolisme.

Le **métabolisme carboné** est l'ensemble de toutes les réactions chimiques qui ont lieu dans un être vivant, chaque réaction étant catalysée par des **enzymes**. Les molécules qui subissent toutes ces transformations chimiques sont appelées des « **métabolites** » (voir aussi figure 5). Les sucres, les lipides, les acides aminés, les acides nucléiques, etc., et tous les intermédiaires possibles sont ainsi des métabolites.

Les « **lipides** » sont une classe de métabolites particuliers, caractérisés par leur faible solubilité dans l'eau (= hydrophobicité). Parmi ces lipides qui peuvent être de structures moléculaires très diverses, les **glycérolipides** sont issus de l'assemblage d'**acides gras** sur un squelette composé de 3 carbones, le **glycérol**. Lorsque 3 acides gras sont estérifiés sur les 3 carbones du glycérol, du **triacylglycérol** est formé, qui s'accumule sous forme de **gouttelettes d'huile**. Ce sont ces gouttelettes d'huile que l'on souhaite voir s'accumuler chez les microalgues, comme source possible pour des substituants aux hydrocarbures fossiles.

Figure 5 - Conversion du sucre, produit initial de la photosynthèse, en huile. Le point d'entrée du CO₂ se situe au niveau de la phase sombre de la photosynthèse, conduisant à la production d'un sucre, le glucose (1). Une série de réactions permet de convertir ce glucose en intermédiaires simples, à deux ou trois carbones (2), qui servent de briques de base pour fabriquer d'autres métabolites, parmi lesquels les acides gras et le glycerol-3-phosphate dont l'assemblage conduit à une classe de lipides, les glycérolipides, dont le triacylglycérol ou huile, symbolisé en rouge (3).

La figure 6 montre plus en détail les briques de base qui sont nécessaires à la synthèse des glycérolipides, parmi lesquels les huiles.

Les **glycérolipides** sont construits schématiquement par l'assemblage d'**acides gras** et de **glycérol**. Lorsque *deux* acides gras sont estérifiés, les **diacylglycérolipides** formés s'auto-assemblent dans la cellule et forment une phase cristalline fluide ou **membranes**. Lorsque *trois* acides gras sont estérifiés, le **triacylglycérol** produit est exclu des membranes subcellulaires qui l'ont généré, et il forme une phase amorphe, la **gouttelette d'huile**.

Les **acides gras** sont des longues chaînes carbonées. Lorsqu'ils contiennent plusieurs **doubles liaisons**, ils sont dits « **polyinsaturés** ». Les acides gras ayant le moins possible de doubles liaisons, sont recherchés en priorité comme substituts aux carburants fossiles, en particulier dans le secteur des biokérosènes/jetfuels. Comme on le voit sur ce schéma, toute tentative de modifier la longueur ou le degré d'insaturation des acides gras peut potentiellement impacter les glycérolipides qui composent la matrice des membranes biologiques. Les cellules peuvent réagir à ces variations de longueur et d'insaturation des acides gras en ralentissant, voire bloquant, leur croissance. **La maîtrise de la quantité et de la qualité des huiles qu'une microalgue peut produire nécessite une connaissance approfondie du métabolisme et du rôle biologique des glycérolipides.**

Figure 6 - Les glycérolipides sont à la fois les constituants des membranes biologiques et des huiles. Les briques de bases pour construire les glycérolipides sont le glycérol-3-phosphate, à l'origine du squelette glycérol, des acides gras, et des précurseurs de têtes polaires. Les acides gras représentés en bleu ont classiquement de 16 à 18 atomes de carbones, et jusqu'à > 20 carbones chez de nombreuses microalgues. Les acides gras peuvent de plus contenir des doubles

liaisons, classiquement de 1 à 5.

2.4 Teneur et qualité en huile des microalgues oléagineuses

De nombreuses espèces de microalgues contiennent des teneurs en huile élevées par rapport à leur masse de matière sèche. Le tableau 1 illustre des teneurs obtenues pour différentes espèces dans des conditions optimisées.

Tableau 1 - Exemples de teneurs en huile de quelques microalgues (données adaptées de [5] [6])

Type de microalgue	Espèce	Teneur en huile (% masse sèche)
Cyanobactéries		
	<i>Anabaena cylindrica</i>	<7
	<i>Spirulina platensis</i>	<9
	<i>Synechococcus</i> sp.	<10
Algues primaires		
Algue verte	<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
Algue verte	<i>Chlorella</i> sp.	28-32
Algue verte	<i>Dunaliella primolecta</i>	23
Algue verte	<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
Algue verte	<i>Neochloris oleabundans</i>	35-54
Algue verte	<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23
Endosymbiontes secondaires		
Chromalvéolée (dinoflagellée)	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
Chromalvéolée (diatomée)	<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
Chromalvéolée (haptophyte)	<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
Chromalvéolée (eustigmatophyte)	<i>Monallanthus salina</i>	>20
Chromalvéolée (eustigmatophyte)	<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
Chromalvéolée (diatomée)	<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
Chromalvéolée (diatomée)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
Chromalvéolée non-photosynthétique (Labyrinthulomycetes)	<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77

Les teneurs en huile sont établies par différentes techniques analytiques. Les microalgues sont tout d'abord cultivées en milieu liquide, et la biomasse est récoltée. Une fraction mise de côté permet d'évaluer la masse sèche produite après cette culture. A partir d'un culot de biomasse algale, les lipides totaux sont extraits, suivant différentes méthodes possibles, mais en général au laboratoire à l'aide de solvants organiques, puis séparés par chromatographie afin d'obtenir une fraction purifiée de triacylglycérol. La présence de triacylglycérol peut être sommairement détectée par des sondes fluorescentes telles que le rouge de Nil, mais cette coloration n'est pas quantitative. Le triacylglycérol est ensuite dosé par deux grands types de méthodes. La première consiste à méthanolyser les acides gras et à les analyser et quantifier par spectrométrie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. La seconde consiste à analyser les triacylglycérols par spectrométrie de masse en tandem et à haute résolution.

Exemple de protocole d'extraction des lipides totaux à partir d'un échantillon de microalgues (méthode de Folch)

La méthode de Folch est utilisée pour extraire des lipides à partir d'une grande

variété de matériel biologiques, dont des microalgues (exemple donnée en référence [7]). Environ 10 mg de cellules sont collectées, lyophilisées, broyées dans de l'azote liquide et transférées dans 4 mL d'éthanol bouillant pendant 5 min à 70°C afin de bloquer l'action des lipases présentes dans l'échantillon et qui pourraient dégrader les glycérolipides. Après addition de 2 mL de méthanol et 8 mL de chloroforme, l'extrait est incubé 1 h sous agitation et bullage sous argon. 3 mL de chloroforme/méthanol (2:1, volume/volume) et 17 mL de NaCl 1% sont ensuite ajoutés puis le mélange est bullé sous argon. Une centrifugation de 20 min à 100 x g permet la formation d'un bi-phase. La phase inférieure contenant les lipides est récupérée puis évaporée sous argon et les lipides peuvent être stockés à -20°C. Pendant l'ensemble de ces manipulations, les suspensions sont maintenues sous argon pour éviter leur oxydation, en particulier au niveau des doubles liaisons.

Exemple de protocole de séparation des différentes classes de glycérolipides par chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM repose sur des phénomènes d'adsorption différentielle : une phase mobile constituée de solvant progresse le long d'une phase stationnaire (silice, par exemple silica gel 60, Merck) fixée sur une plaque de verre, en générale haute de 20 cm. La migration est réalisée dans une cuve de chromatographie en verre permettant de disposer verticalement les plaques de CCM. Environ 50-200 µg de lipides sont repris dans du chloroforme puis sont déposés sur une plaque de silice [6]. Le dépôt est ensuite séché sous argon. Un mélange d'hexane/diéthyl éther/acide acétique dans les proportions 70:30:1 volume/volume permet la séparation des lipides neutres. Un faible volume de ce mélange est déposé dans la cuve de chromatographie 15 minutes avant la chromatographie, de manière à laisser les vapeurs s'équilibrer. Le volume de solvant est tel qu'il ne dépasse pas la hauteur de la ligne de dépôt sur la plaque de CCM. La plaque est ensuite disposée verticalement dans la cuve, le couvercle est fermé et chromatographie s'effectue jusqu'à ce que le front de migration du mélange de solvants approche du haut de la plaque.

Après migration, les différents lipides sont visualisés sous lumière ultra-violette, après pulvérisation d'acide 8-anilino-1-naphtalène-sulfonique 0,2% (masse/volume) dans le méthanol. Les lipides sont identifiés en comparant leurs caractéristiques de migration à celles de lipides témoins chromatographiés dans les mêmes conditions (figure 7).

Figure 7 - Séparation de triacylglycérol par migration sur couche mince. Le mélange de solvant utilisé pour cette migration est composé d'hexane/diéthyl éther/acide acétique dans les proportions 70:30:1, volume/volume. Les glycérolipides sont visualisés sous UV après pulvérisation de la CCM avec de l'acide 8-anilino-1-naphtalène-sulfonique. Cultures, extraction, chromatographie et analyses réalisées par C. Albrieux, M. Block, J. Jouhet, D. Petroutsos et F. Rébeillé au Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, Grenoble.

Exemple de protocole de qualification et de quantification d'un glycérolipide.

Les différentes classes glycérolipidiques identifiées après CCM, dont le triacylglycérol, sont récoltées par grattage de la plaque de silice et transférées dans des tubes en verre à fermeture hermétique à vis. Après addition d'une quantité connue, par exemple 5-10 µg, d'un acide gras servant de référence pour la quantification, à 15 ou 21 atomes de carbone (C15:0 ou C21:0), 3 mL de milieu de méthanolyse (H₂SO₄ (24N) 2,5% dans du méthanol) sont ajoutés. Les tubes sont fermés, puis le mélange est agité avant d'être incubé 1 h dans un bain mairé à sec à

100°C. La réaction de méthanolyse rompt la liaison ester des acides gras au glycérol et crée une liaison ester avec le méthanol. Cette réaction est arrêtée par ajout de 3 mL d'eau et 3 mL d'hexane sur le mélange refroidi. Le mélange est agité puis mis à reposer jusqu'à formation d'un bi-phase. La phase supérieure contenant les acides gras méthylés (en anglais Fatty acid methyl esters, ou FAME) est extraite et transférée dans un nouveau tube puis évaporée sous argon.

Les FAME sont repris dans 10 µL d'hexane puis injectés dans un système de chromatographie en phase gazeuse (GC). Il s'agit d'un système de séparation des molécules après les avoir rendues volatiles à haute température. Un gaz vecteur, par exemple de l'azote, permet ainsi de véhiculer les molécules volatiles de l'échantillon, ici les FAME, dans une colonne de cyanopropyl-polysilphènesiloxane, soumise à une température croissante de 130 à 180°C. Les FAME sortent de la colonne avec un temps de rétention qui dépend de leur longueur de chaîne carbonée et de leur nombre de doubles liaisons. Les FAME sont détectés par un détecteur à ionisation de flamme (FID) : les FAME pénètrent dans une flamme obtenue par combustion d'hydrogène et d'air et forment des ions, collectés par deux électrodes entre lesquelles on applique une différence de potentiel, et générant un courant électrique à la base de la détection sous forme de « pics ». Les différents acides gras sont donc identifiés en comparant les temps de rétention de leurs esters méthylés avec ceux de témoins. Sur la figure 8, chaque pic correspond donc à un FAME, et les surfaces des pics sont proportionnelles à leurs quantités. Grâce à l'addition du témoin interne C21:0 dont la quantité est connue, il est donc possible de déduire les quantités de tous les FAME de l'échantillon.

Figure 8 - Analyse du profil d'acide gras et quantification d'un glycérolipide par chromatographie phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. Chaque pic correspond à un ester méthylé d'acide gras (Fatty Acid Methyl Ester, FAME) dont le temps de rétention sur la colonne dépend du nombre de carbone et du nombre de doubles liaisons ou degré d'insaturation (par exemple le C18:1 correspond à un acide gras à 18 atomes de carbone et 1 insaturation). Sur cet exemple, le glycérolipide est constitué d'un mélange d'espèces moléculaires avec des acides gras allant de 16 à 20 carbones et de 1 à 5 insaturations. Une huile est toujours constituée d'un mélange de différentes espèces de triacylglycérol avec des acides gras variés. On parle de « profil » d'acides gras, et ce facteur définit la qualité de l'huile. La présence d'un acide gras témoin C21:0 en quantité connue permet de quantifier le glycérolipide analysé. Cultures, extraction, chromatographie et analyses réalisées par C. Albrioux, M. Block, J. Jouhet et F. Rébeillé sur la plateforme LIPANG (Lipid Analysis in Grenoble), Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, Grenoble.

Les teneurs présentées dans le tableau 1 sont issues de la littérature et ne correspondent pas à des valeurs moyennes. Il existe une très grande variabilité quantitative et qualitative. Dans chaque cas, la teneur en huile dépend de l'espèce, de la variété (on parle d'écotype), des conditions de culture, etc. On ne peut véritablement juger du potentiel d'une microalgue qu'au regard de cette teneur, certes, mais aussi de la biomasse globale qu'il est possible de produire. **Il est en effet possible d'augmenter la teneur en huile, de façon spectaculaire, en soumettant les microalgues à un stress nutritif, le plus connu étant la carence en azote** (figure 9) [5] [7] [8]. La raison de cette accumulation est l'objet de recherches très actives, partant de l'hypothèse qu'une carence nutritive bloque la croissance, mais que la présence de lumière conduit à un excès d'énergie et de NADPH, H⁺ dans la cellule (figures 1 et 2), qui sont consommés en synthétisant des

biomolécules de réserve telles que les TAG.

Figure 9 - Induction de l'accumulation de triacylglycérol dans une microalgue oléagineuse par une carence nutritive. Sur cet exemple, une cellule de la diatomée *Phaeodactylum* est visualisée dans un milieu de culture riche ou dans un milieu carencé en azote. Les cellules de cette diatomée sont fusiformes. L'ADN est visualisé à l'aide d'une sonde fluorescente, permettant de détecter le noyau au centre de la cellule (coloration bleue). Les gouttelettes d'huile s'accumulant en carence d'azote sont visualisées à l'aide d'une sonde fluorescente, le Rouge de Nil. Culture et analyses par imagerie réalisées par M. Conte au Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, Grenoble.

Toutefois, la carence en azote bloque la croissance et restreint le niveau de biomasse. Une première série de verrous se situe donc au niveau biologique, depuis la capture initiale du CO₂ par la photosynthèse, jusqu'au partitionnement des voies métaboliques conduisant aux TAG ou à d'autres métabolites. Comme indiqué plus haut, la levée de ces verrous nécessite des connaissances, en particulier dans le monde des endosymbiontes secondaires, que nous n'avons pas encore.

À retenir

- Les microalgues sont très diverses et occupent tous les écosystèmes marins et terrestres.
- La photosynthèse permet aux microalgues d'utiliser l'énergie solaire pour capturer le CO₂ et le convertir en molécules organiques.
- Parmi ces molécules, certains lipides tels que le triacylglycérol constituent des huiles valorisables pour produire des biocarburants.
- Les microalgues oléagineuses les plus riches en huiles, concentrent les efforts en recherche et développement.

3 Questions biologiques et biotechnologiques

3.1 Manipulation au laboratoire

Les microalgues peuvent être manipulées dans un laboratoire classique de microbiologie disposant de systèmes de culture éclairés. Après leur collecte dans le milieu naturel, par exemple suite à une campagne d'exploration océanographique, la première tâche est de réussir à isoler une microalgue d'intérêt de tout contaminant, phase dite d'axénisation, par des dilutions successives dans des milieux stériles, en présence d'antibiotiques, et en cherchant à démarrer une culture à partir de microalgues propres. Il existe plusieurs milieux de culture, dont une eau de mer artificielle, plus ou moins enrichis en nutriments, par exemple en phosphate, azote, ou même en matière organique comme source supplémentaire de carbone. Ces milieux sont dits « enrichis », car ils ont des teneurs en nutriments (en particulier azote et phosphate) plus élevées que dans les milieux naturels classiques, permettant des cultures de microalgues à fortes concentrations.

Préparation d'eau de mer artificielle (*enriched artificial seawater* - ESAW)

Ce protocole a été établi par le Canadian Center for the Culture of Microorganisms et

est considéré comme une référence. Quatre solutions séparées sont préparées, deux solutions de sels (solutions 1 et 2, tableaux 2 et 3), une solution de nutriments et une solution de vitamines. Les sels sont ajoutés dans l'ordre dans de l'eau distillée stérile (EDS). Quand les sels sont complètement dissous, les solutions 1 et 2 sont mélangées. Toutes les solutions sont filtrées sur fibre de verre stérile de 0,45 µm de vide de maille. Les fioles sont lavées avec de l'acide chlorhydrique (10% HCl) et rincées dans de l'EDS avant usage. Pour 1 L de solution filtrée de sels (solutions 1+2), 1 mL des solutions a, b, d, e et f et 2 mL de la solution c de nutriments sont ajoutés, ainsi que 2 mL de la solution stock de vitamines. Afin de réduire les risques de précipitation pendant la stérilisation à l'autoclave, 1,44 mL d'HCl 1N et 0,12g de bicarbonate de sodium sont ajoutés.

L'eau de mer artificielle ainsi obtenue est finalement stérilisée par autoclave

Tableau 2 - Préparation pour eau de mer artificielle - Solution 1, sels anhydres.

	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Quantité pesée (g.L ⁻¹ solution)	Concentration (mM)
NaCl	58,44	20,756	362,70
Na ₂ SO ₄	142,04	3,477	25,00
KCl	74,56	0,587	8,03
NaHCO ₃	84,00	0,170	2,07
KBr	119,01	0,085	0,73
H ₃ BO ₃	61,83	0,022	0,37
NaF	41,99	0,0027	0,07

Tableau 3 - Préparation pour eau de mer artificielle - Solution 2, sels hydratés.

	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Quantité pesée (g.L ⁻¹ solution)	Concentration (mM)
MgCl ₂ .6H ₂ O	203,33	9,395	47,18
CaCl ₂ .2H ₂ O	147,03	1,316	9,13
SrCl ₂ .6H ₂ O	266,64	0,021	0,08

Tableau 4 - Préparation pour eau de mer artificielle – Solutions stock de nutriments.

Solutions stock		Concentration stock (g.L ⁻¹)	Concentration (mM)
a	NaNO ₃	46.67	549.1
b (1)	Na ₂ glycerophosphate	6.67	21.8
c	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	15.00	105.6
d (2)	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3.64	9.81
	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O (3)	2.34	5.97
	FeCl ₃ .6H ₂ O	0.16	0.592
e	MnSO ₄ .4H ₂ O	0.54	2.42
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.073	0.254
	CoSO ₄ .7H ₂ O	0.016	0.0569
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.126	0.520
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	1.89	5.05
f	H ₃ BO ₃	3.80	61.46
g	NaSeO ₃	0.00173	0.001

(1) Le Na₂ glycerophosphate peut être remplacé par un stock équimolaire de Na₂HPO₄.

(2) Le Na₂EDTA.2H₂O est ajouté avant les métaux : Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O, FeCl₃.6H₂O.

(3) Le Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O peut être remplacé par un stock équimolaire de FeCl₃.

La solution 5 est ajustée à pH = 6 avec environ 2 g de NaCO₃.

La solution 4 peut être chauffée pour dissoudre le Fer.

Tableau 5 - Préparation pour eau de mer artificielle – Solution stock de vitamines.

	Concentration stock (g.L ⁻¹)	Concentration finale (mM)
Thiamine	0,100	2,97 x 10 ⁻¹
Vitamine B12	0,002	1,47 x 10 ⁻³
Biotine	0,001	4,09 x 10 ⁻³

La figure 10 montre les différentes échelles de culture qu'il est possible de mener en laboratoire. Un milieu est dit solide, lorsque l'eau de mer artificielle est rigidifiée par addition d'un gélifiant tel que de l'agarose. Les microalgues présentées sur la figure 10 illustrent par ailleurs, par leurs couleurs différentes, la diversité de pigments photosynthétiques qu'il est possible de rencontrer, et les contraintes que cela peut imposer en termes de spectre et d'intensité de la source lumineuse pour la culture. L'addition d'antibiotiques permet d'empêcher la croissance de contaminants, en particulier bactériens. Les champignons issus des spores présentes dans l'atmosphère constituent un contaminant classique de ce type de culture qu'il est difficile de contrôler.

La croissance sur milieu solide (figure 10a et b) permet d'obtenir des amas cellulaires issus d'une seule cellule initiale, et partageant de ce fait le même patrimoine génétique : on parle de « **colonies** ». Cette étape est importante lorsqu'on souhaite isoler et amplifier un individu remarquable, par exemple pour sa faculté à produire de grandes quantités d'huiles. La manipulation en plaques multi-puits (figure 10c) permet une croissance en milieu liquide, mais limitée du fait de la difficulté à aérer le milieu. Une bille peut aider à cette aération lorsque la plaque multi-puits est disposée sur un agitateur. Enfin la culture en milieu liquide peut être menée à des échelles allant de 100 mL à 4 L (figure 10d et e).

Les cultures liquides sont en généralensemencées avec un « inoculum » puis la croissance se déroule dans des chambres thermostatées (de 18 à 24 °C selon les espèces) éclairées en continu ou avec des alternances jours-nuits. Après une phase de croissance active, dite « **phase exponentielle** », les microalgues épuisent leur milieu, deviennent si denses que la lumière a du mal à pénétrer (figure 10, E) et ne se multiplient plus. On parle de « **phase stationnaire** » ou « **phase plateau** ». Le milieu a été appauvri en nutriments et certaines de ses propriétés physicochimiques comme le pH ont été modifiées.

La formation non désirée de **biofilms** peut se produire lorsque les cellules habituellement isolées deviennent cohésives.

La culture de routine au laboratoire, sans apport de milieu frais au long de la croissance est dite culture en batch simple.

Une culture sans renouvellement de milieu est dite **culture en batch simple**.

Lorsque du milieu est ajouté petit à petit, permettant d'apporter des nutriments, mais avec une augmentation de volume, on parle de **culture en fed-batch**.

Lorsque l'apport de nouveau milieu est mené en continu, à volume constant, soit le **débit est ajusté en fonction de constantes chimiques** (par exemple la concentration de substrats), par un **système chemostat**, soit le **débit est ajusté en fonction de la concentration en cellules**, par un système **turbidostat**.

La **montée en échelle (scale up)** ou le **passage de cultures en batch**, appropriés à des comparaisons de lignées étudiées en parallèle, à **des systèmes alimentées en continu**, ne sont pas des questions triviales, car le comportement des cultures peut varier profondément d'un système à l'autre.

Figure 10 - Différentes échelles de culture des microalgues au laboratoire. (A-B) Culture sur milieu solide, dans des boîtes de Pétri. (C-E) Culture en milieu liquide, en plaques multipuits, flacon ou colonnes. Les photos illustrent des cultures menées par L.J. Dolch, C. Meï, G. Finazzi, D. Petroutsos, C. Rak et F. Rébeillé au Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, Grenoble.

Il existe plusieurs façons de chercher à optimiser une espèce de microalgue au laboratoire. On peut chercher à **cribler la biodiversité** en tentant d'identifier la perle rare suite aux collectes océaniques. On peut tenter d'optimiser les propriétés intrinsèques d'une souche par **domestication**, en jouant sur les paramètres de cultures, en la soumettant à différents traitements ou stimuli. On peut tenter de provoquer une **évolution dirigée** par des méthodes qui ont fait leurs preuves sur des microorganismes allant des bactéries aux levures, en **sélectionnant** les individus ayant des propriétés intéressantes.

On peut enfin modifier les génomes par **ingénierie génétique**, restant en système strictement confiné, par addition ou modification de gènes. La figure 11 illustre un instrument permettant d'intégrer un ADN à l'intérieur de cellules de microalgues appelé « canon à particules ». Il existe d'autres méthodes pour faire entrer de l'ADN dans une microalgue, telles que « l'électroporation » grâce à un champ électrique très bref qui crée des pores transitoirement dans les membranes des microalgues, pores au travers il est possible de faire pénétrer de l'ADN en suspension dans le milieu. Plus récemment, la transformation de diatomées par « conjugaison » repose sur l'usage d'une bactérie qui vient "aider" à faire entrer un ADN étranger à l'intérieur de la cellule [10]. L'ADN intégré peut conduire à diminuer l'expression d'un gène de la microalgue, ou bien permettre l'expression d'un gène supplémentaire intéressant. L'insertion d'ADN dans une cellule par toutes ces méthodes est appelée « transformation ».

Figure 11 - Système permettant l'incorporation d'ADN dans des microalgues. L'ADN à introduire est conçu de façon à contenir un gène ou une séquence d'intérêt, ainsi qu'un gène de résistance à un antibiotique, par exemple la zéocyne. Cet ADN est déposé à la surface de microbilles de tungstène ou d'or qui sont pulvérisées grâce à un gaz propulseur. Les cellules ayant incorporé l'ADN peuvent être sélectionnées après culture en présence de l'antibiotique.

Les technologies d'ingénierie des génomes se sont par ailleurs considérablement améliorées grâce à la découverte de ciseaux moléculaires capables de modifier virtuellement n'importe quel gène dans n'importe quel organisme, à la condition d'avoir démontré qu'il était possible de les « transformer ». Plusieurs méthodes ont ainsi montré leur performance [RE 276]. Certaines détournent tout simplement des mécanismes intrinsèques de la microalgue, en leur fournissant un petit fragment d'ADN mimant une zone du génome de la microalgue ; l'ADN étranger comprend quelques modifications désirées, et vient se substituer à la séquence naturelle par un mécanisme d'échange appelé « recombinaison homologue » [11] [12]. Lorsque ce mécanisme n'existe pas chez une microalgue d'intérêt, ou qu'il n'est pas efficace, il existe aussi des « enzymes ciseaux » que l'on peut orienter vers la région d'ADN à modifier, soit en jouant sur la structure de l'enzyme elle-même, par exemple dans le système TALEN [13] [14], soit en la dirigeant à l'aide d'un ARN « guide », dans le système CRISPR-CAS9, illustré en figure 12 [15] [16].

Figure 12 - Exemple de ciseaux moléculaires de type CRISPR/CAS9 capables de modifier à façon l'ADN des microalgues. Il est tout d'abord essentiel d'établir que la souche de microalgue soit « transformable », c'est-à-dire qu'on puisse y insérer de l'ADN étranger. On commence par sélectionner une région du génome que l'on souhaite modifier (1). Cette région s'appelle la « cible ». On synthétise ensuite un ARN appelé « guide », capable de se coller à cette région (2). L'ARN guide permet de diriger la liaison du ciseau moléculaire, l'enzyme CAS9 (3).

Il est à noter que l'ingénierie génétique menée au laboratoire en *phase de recherche* peut permettre de mettre en évidence un **gène marqueur** remarquable pour l'accumulation d'huile par exemple, ou pour la qualité de l'huile : ce gène marqueur ainsi mis en évidence servira de critère pour **explorer à nouveau la biodiversité** afin d'identifier des souches portant naturellement le fond génétique intéressant.

3.2 Huiles : une source pour le biodiésel et le biokérosène

Sans entrer dans les détails, nous avons vu que les huiles étaient composées d'un squelette **glycérol** et de trois **acides gras**. Ceux-ci sont numérotés soit depuis l'extrémité carboxy-terminale (carbone alpha), soit depuis le **carbone oméga** (figure 13). Lorsque des doubles liaisons sont présentes et que la plus extrême se situe au niveau du troisième carbone compté à partir de l'extrémité oméga, on parle d'**acides gras oméga-3**. Lorsque la double liaison la plus extrême est au niveau du sixième carbone, on parle d'**acides gras oméga-6**. Lorsqu'il existe plusieurs doubles liaisons, on parle d'**acides gras polyinsaturés** (« poly-unsaturated fatty acids » ou PUFAs) [1] [4]. Si la présence de ces acides gras peut avoir un intérêt pour certaines applications nutraceutiques, biomédicales, cosmétiques, etc, elles posent le problème de leur **oxydation**. **Une des premières propriétés recherchées pour un biocarburant est donc une pauvreté en doubles liaisons, obtenue soit par voie biologique** en identifiant des souches produisant des TAG peu insaturés, **soit par hydrogénation**.

Figure 13 - Structure du triacylglycérol.

Le second paramètre est celui de la **longueur de la chaîne carbonée**.

Concernant les hydrocarbures fossiles et en prenant l'exemple des alcanes :

- Les chaînes très courtes tels que le méthane CH_4 , l'éthane C_2H_6 , le propane C_3H_8 et le butane C_4H_{10} sont tous des gaz, dont les points d'ébullition sont respectivement de -161, -88, -46 et -1 degrés F (soit -107, -67, -43 et -18°C).
- Les chaînes de longueur allant jusqu'à $\text{C}_{18}\text{H}_{38}$ sont liquides à température ambiante alors que les chaînes plus longues que le C19 sont solides.

De par leurs températures croissantes d'ébullitions, ces chaînes peuvent être aisément séparées par un processus de distillation, procédé à la base du raffinage du pétrole. Les chaînes de longueurs **inférieures à C8** sont très légères, facilement vaporisables, formant des liquides appelés « naphte » ou « naphtha », et utilisables pour des applications de solvatisation à séchage rapide. Les chaînes de **C8 à C12** ont un point d'ébullition inférieur à celui de l'eau. Les carburants automobiles fonctionnent à des températures au-dessus de 100°C. Ces carburants étant constitués de mélanges, le besoin de les comparer a conduit à définir un **indice d'octane** comme mesure de la résistance dans un moteur commandé par un auto-allumage, c'est-à-dire sans intervention de la bougie. Un carburant présente un indice d'octane x lorsque ce carburant se comporte comme un mélange de $x\%$ d'iso-octane (C_8H_{18} , résistant à l'auto-inflammation), et de $(100-x)\%$ de n-heptane (C_7H_{16}

qui s'auto-enflamme facilement). Suivant cette définition, l'indice d'octane d'une solution pure de C_8H_{18} est 100 et celui d'une solution pure de C_7H_{16} est de 0.

Le **kérosène** est défini dans la portion **C12-C15**, suivi des **diésels et carburants lourds**, enfin les **lubrifiants**. Ces derniers ne se vaporisent pas à température ambiante. Les chaînes de longueur **supérieure à C20**, sont solides et incluent les paraffines, les goudrons et les asphaltes. L'indice d'octane augmente dans l'ordre suivant : alcanes linéaires à chaîne longue < alcanes linéaires à chaîne courte < alcènes (oléfines) et cycloalcanes (naphtènes) < alcanes ramifiés et hydrocarbures aromatiques. **Les propriétés recherchées pour les kérosènes (ou « jetfuels ») sont leur qualité, leur point d'ébullition et faible risque d'explosion, leur faible point de congélation, leur indice d'octane élevé et l'absence de contaminants.** Le dégomme permet l'élimination de certains contaminants et des additifs importants comprennent des antioxydants. L'absence d'eau est essentielle.

Tableau 6 - Propriétés d'un kérosène (jetfuels), du type JetA-1 autorisé au niveau mondial, suivant les spécifications de British Petroleum.

	Kérosène de type JetA-1
Point d'inflammabilité	38°C
Point d'auto-inflammabilité	245°C
Point de congélation	-47°C
Température maximale de combustion à l'air	>2000°C
Densité à 15°C	800-820 kg. L ⁻¹
Energie spécifique	43 MJ.kg ⁻¹
Densité d'énergie	35 MJ.L ⁻¹

Il est souvent dit que la dernière goutte de pétrole servira à faire voler un avion. L'utilisation de biocarburants sous formes de mélanges pour les jetfuels est l'objet de recherches très actives. Les carburants pour l'aéronautique doivent respecter des contraintes très strictes, telles que le contenu énergétique qui impacte directement le rayon d'action des avions, la tenue au froid, la stabilité thermique et la stabilité au stockage, les propriétés lubrifiantes, l'explosivité. Par ailleurs, les biocarburants devront respecter d'autres contraintes, telles qu'une combustion avec de faibles niveaux d'émissions de particules et produits contaminants ainsi que d'oxydes d'azote et un bilan global de gaz à effet de serre bénéfique. Dans ce contexte, la filière bioéthanol est écartée en raison de son contenu énergétique plus faible et de ses caractéristiques d'explosivité ainsi que la filière du biodiesel en raison de son comportement à froid, du risque d'instabilité et d'un contenu énergétique lui aussi légèrement plus faible [BE 8 545].

Concernant les huiles d'origine algales, les propriétés varient au cours de l'élongation des acides gras.

Lors de la synthèse des acides gras, un processus d'itération ajoute 2 carbones à un substrat initial, généralement à nombre pair de carbones. Le processus d'itération s'arrête lorsque l'acide gras a une longueur précise. Les acides gras produits dans le stroma des chloroplastes ont ainsi des longueurs allant de C14 à C18, avec quelques traces de C12. Un autre système enzymatique d'élongation, dans le cytoplasme de la cellule, rajoute encore des carbones allant jusqu'à des longueurs de C20 à C24 et plus. L'ensemble de ces acides gras permettent de synthétiser des triacylglycérols, certes, mais avant cette dernière étape, ils servent à construire des précurseurs mono-acyl et di-acyl qui sont localisés dans les membranes biologiques. Dans l'idéal, la production de **jetfuel** à partir d'huile microalgale requiert donc la production dans la **gamme C8-C14**. Il faut donc supposer que la cellule tolère des intermédiaires membranaires de chaînes courtes, ce qui peut perturber les propriétés

intrinsèques de ces membranes, à commencer par leur épaisseur, qui peuvent ne pas être compatibles avec les fonctions biologiques des protéines qui sont insérées dans ces membranes. Les premières tentatives de modification génétique de la diatomée *Phaeodactylum* pour provoquer l'accumulation d'acides gras de chaînes courtes (C12-C14) ont ainsi montré que dans ce cas la croissance était très altérée et qu'il n'était pas encore possible de produire une biomasse en quantité compatible avec une exploitation [9].

3.3 Conciliation entre biomasse et teneur en huile

Une cellule obèse, accumulant de l'huile de façon optimisée, n'est pas a priori une cellule saine. La multiplication est en général bloquée lorsqu'on provoque l'accumulation d'huile, à commencer par la méthode classique de carence en azote, mais aussi dans plusieurs tentatives de modifications génétiques. Des procédés en deux phases, commençant par une culture en milieu riche afin d'obtenir la biomasse désirée, suivi d'une carence en azote, font partie des approches actuellement explorées aux échelles R&D et pré-industrielles. Toutefois, la conciliation de la croissance et de l'accumulation d'huile fait partie des verrous critiques à lever [5] [6] [8] [17].

3.4 Verrous biologiques

En résumé, les verrous majeurs à lever sur la biologie des microalgues sont les suivants :

- Concilier biomasse et teneur en huile.
- Augmenter la teneur en huile.
- Optimiser la qualité des acides gras de l'huile pour l'application visée.
- Combiner accumulation d'huile et d'autres coproduits pour d'autres applications.

À retenir

- Au laboratoire, la manipulation de microalgues est réalisée en conditions stériles, suivant des méthodes classiques de microbiologie.
- La culture des microalgues nécessite une source de lumière.
- Plusieurs méthodes existent pour étudier les fonctions des gènes, par ingénierie des génomes.
- L'enjeu est de réussir à augmenter la teneur en huile des microalgues, sans que leur croissance en soit freinée.

4 Procédés de culture et de récolte des microalgues

Ce paragraphe donne une vision très sommaire des méthodes possibles de culture et de récolte des microalgues [5] [6] [17] [18]. Il existe deux grands types de systèmes, le premier sous forme de **bassins ouverts** (figure 14) ou celui en **systèmes confinés** (figure 15). Ces systèmes sont dérivés de ceux utilisés en aquaculture pour les bassins et en microbiologie pour les fermenteurs.

En systèmes de production, **l'alimentation en eau et en lumière** sont des questions critiques. L'alternance jour-nuit peut aussi être problématique, avec des chutes de contenu en huile pendant la nuit tout simplement car dans cette période les microalgues puisent dans leurs réserves. La disposition des systèmes de culture en éclairage naturel n'est donc pas nécessairement optimale. Dans ce cas, le coût de l'éclairage artificiel doit être intégré. Vice versa, la lumière intense peut provoquer un

phénomène appelé photo-inhibition, résultant de dommages de la machinerie photosynthétique. L'apport de lumière doit donc être examiné avec attention. Le taux de pénétration de la lumière varie en effet avec la longueur d'onde, les infra-rouges étant absorbés dès le premier mètre, et dépend des impuretés qui troublent l'eau, que ce soit de petites particules inertes ou les algues elles-mêmes.

Les problématiques sont différentes suivant le système utilisé pour la culture. Les bassins ouverts sont des structures éclairées naturellement, alimentées en eaux issues de sources épurées et évidemment soumis à des contaminations possibles. L'usage de cyanobactéries ou de microalgues extrémophiles telles que l'algue verte *Dunaliella* est envisagé pour ce type de système. Des surfaces de production en *raceway* de plus de 400.000 m² ont été rapportées pour la culture de cyanobactéries pour des applications alimentaires [5]. Dans les systèmes *raceway*, la biomasse est collectée au niveau des pâles, après circulation complète dans le circuit (figure 14a). Ces systèmes sont les moins coûteux mais aussi les moins productifs. Les bassins sont exposés aux aléas climatiques et subissent une évaporation importante et variable. Il n'est pas envisageable d'y cultiver des organismes modifiés génétiquement.

Figure 14 - Schémas de bassins ouverts de type 'raceway' (a) ou bassin circulaire (b).

Les **systèmes clos**, sont de plusieurs types, comme explicités plus haut, **en batch ou en alimentation continue** (figure 15). Les systèmes développés tentent des compromis pour la **gestion de l'eau, de la lumière, de diffusion des gaz**, mais aussi de coûts de fabrication et de durabilité des matériaux utilisés [6] [18]. La **contamination** est critique, gérée en partie par filtration. Des systèmes peuvent être agités par bullage d'air (*air-lift*; figure 15a, b et c) ou par des pompes (figure 15d). Des photobioréacteurs à paroi de verre ou de polymères (par exemple en polyvinylchlorure ou polycarbonate) ou de simples sacs de plastique (figure 15c) sont autant de choix techniques avec des compromis différents en termes de productibilité et de coût. En système clos, la photosynthèse conduit à la consommation de CO₂, ce qui nécessite une alimentation de ce gaz, mais aussi la production d'O₂ qui peut devenir délétère : des systèmes de dégazage sont donc prévus (figure 15d). Les systèmes tubulaires peuvent être longs de plusieurs kilomètres linéaires.

Les **rendements en biomasse** visés en **autotrophie pure** (sans autre apport de carbone que du CO₂) sont de l'ordre de **quelques grammes par Litre**. Il est important de noter qu'il est nécessaire de disposer de l'ordre d'**1,8 à 2 T de CO₂ pour produire 1 T de biomasse**. En autotrophie, les développements futurs reposeront donc sur un apport en CO₂ à faible coût, idéalement gratuit [19]. Une alternative prometteuse est d'apporter en plus une source de carbone, obtenue à faible coût parmi les coproduits des industries liées à l'agriculture, qui soit intégrée par les microalgues. Les espèces naturelles combinent photosynthèse et intégration de carbone organique, suivant un processus appelé **mixotrophie** [20] [21]. Dans ce cas les rendements visés sont dans la gamme de la **centaine de grammes par litre**.

Figure 15 - Schémas de systèmes confinés de culture de microalgues, de types colonne verticale (a), panneau plat (b), sac (c) ou tubulaire (d).

À retenir

- Deux grands types de systèmes de culture sont développés, en bassins ouverts ou en photobioréacteurs fermés.
- Il existe une très grande diversité de solutions techniques, visant à optimiser la maîtrise de la culture, la performance énergétique et le coût de production.
- Les rendements optimaux en biomasse visent des gammes allant du gramme à la centaine de grammes par litre.

5 Collecte, extraction et conversion

5.1 Extraire de l'huile d'un matériel hydraté

La **collecte de biomasse** dépend de l'**espèce de microalgue**, avec plus ou moins de facilité **en fonction de la taille des cellules et de la capacité à sédimenter** ainsi que du système choisi pour la culture. Des microalgues telles que *Phaeodactylum* sédimentent naturellement. Deux grands systèmes de collecte existent : une **récolte après une phase de culture** ou un **système de récolte en continu**. La **centrifugation** et la **filtration** sont possibles pour les études de laboratoire ou de R&D, mais coûteuses pour la phase industrielle [1]. La **déshydratation (dewatering)** est elle aussi énergivore.

L'**extraction d'huile** est l'objet d'intenses recherches. D'une part au **niveau biologique** il est par exemple possible d'optimiser des souches pour lesquelles les **gouttelettes d'huile** ont une **structure macromoléculaire** résistant moins aux méthodes d'extraction (les gouttelettes d'huile sont entourées d'un cortège protéique de différentes natures qui peut être un obstacle à rompre). La **résistance des cellules à l'éclatement**, par la présence de **parois rigides**, est aussi un paramètre sur lequel il est possible de jouer. D'autre part au **niveau procédé**, il n'est pas envisageable d'extraire à partir de biomasse sèche trop coûteuse à produire, et les recherches portent sur le **couplage entre rupture cellulaire et extraction**, le développement de **méthodes sans solvants organiques**, l'optimisation de **phases homogènes** par opposition aux **émulsions**, le développement de **méthodes d'extraction d'huile non-destructives pour les coproduits**, par exemple les protéines ou d'autres biomolécules d'intérêt, en envisageant des systèmes de raffinerie. Les huiles produites par les méthodes actuelles sont souvent riches en contaminants liposolubles, dont des lécithines nécessitant des dégomages, ou encore des composés aux propriétés anti-oxydantes.

5.2 Conversion de l'huile en biocarburant

Disposant d'huile, la transformation en biocarburant est une question de chimie qui fait aujourd'hui appel à plusieurs méthodes de **conversion** [9].

La plus commune est la **trans-estérification**, en faisant réagir l'huile avec un alcool simple tel que le méthanol ou l'éthanol (figure 16). On obtient un biodiésel qu'il est possible d'ajouter à un carburant automobile classique à hauteur de 10%. Cette réaction peut être menée par **catalyse homogène** en **conditions acides ou alcalines**, en tenant compte des réactions concurrentes non désirées de saponification, qui libèrent des acides gras libres. La trans-estérification par **catalyse hétérogène** ou dans des mélanges à des conditions de pression et températures au-dessus des points critiques (**méthodes en fluides supercritiques**) est aussi possible. L'ensemble des méthodes actuellement considérées est détaillé par [17].

Figure 16 - Conversion d'huile en biocarburant par trans-estérification.

Un **hydrotraitement de l'huile**, en deux étapes, par hydrogénation en présence d'H₂ suivie d'un hydrocraquage, libère dans ce cas des hydrocarbures incorporables en quantités plus importantes.

Les traitements par voies chimiques mais suivant des pistes biocatalytiques sont actuellement à l'étude. La conversion d'huile algale en carburant est une problématique commune à l'ensemble des huiles, dont celles issues des agro-filières à partir de plantes de cultures oléagineuses.

Une innovation du CEA, du CNRS et de l'Université Aix Marseille ouvre peut-être une voie nouvelle pour la production d'hydrocarbures directement exploitables par collecte « en continu » à partir d'une culture. Les microalgues possèdent en effet une enzyme « retirant » l'extrémité carboxyle (-le groupement -COOH) des acides gras, libérant un hydrocarbure qu'il est possible de collecter sous forme gazeuse. Cette enzyme est dotée d'un mécanisme très original car elle est uniquement active en présence de lumière (on parle de « photoenzyme ») et a été appelée **FAP (fatty acid photodecarboxylase)** [22]. La preuve du concept a été apportée qu'il était possible d'exprimer cette enzyme dans différents microorganismes et d'en augmenter ainsi l'activité [23]. Des développements futurs sont maintenant nécessaires pour évaluer la possibilité d'exploiter ce système pour une production facilitée et économiquement viable de biocarburant.

À retenir

- La collecte de la biomasse et l'extraction de l'huile représentent des verrous technologiques majeurs.
- Des solutions techniques sont nécessaires pour optimiser l'extraction d'huile d'un matériel particulièrement hydraté.
- Plusieurs processus de conversion d'huile en biocarburant existent.
- Les recherches sont actives pour optimiser la production de molécules algosourcées plus facilement convertibles en biocarburants.

6 Une filière en construction

6.1 Vision linéaire de la filière

Le coût global de production de biomasse algale, riche en huile, facilement extractible et de qualité appropriée pour les applications en biocarburants est encore incompatible avec une viabilité économique. Des feuilles de routes ont été établies pour les efforts de recherche et de R&D [24]. La vision est dans ce cas linéaire, suivant la segmentation des efforts de R&D :

Biologie et culture → Récolte de la biomasse → Conversion en carburant et en coproduits → Modèle global de durabilité

Cette première vision propose de résoudre les questions de viabilité économique de la filière en intégrant les gains technologiques obtenus au niveau de chaque segment, un petit gain à chaque niveau permettant d'atteindre l'objectif [25]. La

planification dans le temps des efforts de R&D tient aussi compte des marchés, en débutant par les applications biomédicales ou cosmétiques, exploitant les huiles riches en acides gras polyinsaturés riches en oméga-3 par exemple, et en évoluant au cours du temps et des progrès technologiques vers des huiles pour des usages nécessitant un moindre coût à l'unité.

6.2 Vision intégrée de la filière

Les avancées n'ayant pas permis de voir une issue complètement indépendante et rentable de la filière biocarburant, une vision intégrée, en réseau, doit être aujourd'hui envisagée [26]. D'une part, cette vision doit tenir compte de l'ensemble des usages possibles des microalgues, allant de l'alimentation pour l'aquaculture à des usages en cosmétique, nutraceutique, et faisant appel à la biologie de synthèse pour la production de biomolécules utilisables en chimie (chimie dite verte). Cette intégration doit tenir compte de la progression des marchés, d'une part à volume croissant, et d'autre part en fonction des ressources concurrentes.

Un second niveau d'intégration repose sur la mise en place de solutions mixtes, hybrides, distribuées pour mener la transition énergétique dans son ensemble [24]. Les biocarburants issus des microalgues ne seront pas simplement une alternative aux ressources fossiles, suivant un mode de production unique, mais il est envisageable que plusieurs solutions technologiques et industrielles soient déployées pour des systèmes de gestion de l'eau différents, pour capturer le carbone émis par certaines industries ou les molécules organiques co-produites par d'autres. S'il est possible de faire rouler des voitures à l'électricité, l'aéronautique nécessite à ce jour des hydrocarbures. Un jeu de construction complexe devrait donc être mis en place.

Enfin, les approches actuelles tendent à inclure les stratégies algo-sourcées, dans des programmes plus larges CCUS [27] [BE 8 091].

À retenir

- Le développement de biocarburants dérivés d'algues oléagineuses s'intègre dans une filière plus générale de production de produits algosourcés pour de multiples applications.
- Cette filière fait partie des stratégies possibles des programmes visant à la capture du CO₂, son utilisation et son stockage.

7 Conclusion

Les microalgues oléagineuses sont une ressource prometteuse pour l'avenir, mais les efforts sont encore importants pour lever plusieurs verrous technologiques. Côté biologie, la recherche amont doit être soutenue afin de combler les lacunes de connaissances sur les nouveaux modèles d'organismes photosynthétiques, de cribler la biodiversité marine et d'en exploiter au mieux le potentiel, de développer et mettre en œuvre des méthodes d'ingénierie génétique pour maîtriser les microalgues comme des usines cellulaires, ceci par des approches de biologie synthétique, de concilier production de biomasse et accumulation d'huile et enfin de produire une huile de qualité appropriée [28] [29]. Les questions à résoudre sont nombreuses. Comment améliorer l'efficacité de la photosynthèse ? Comment améliorer la capture de CO₂ par les cellules ? Comment réduire le besoin en nutriments dont l'azote et le phosphate ? Comment améliorer la pénétration de la lumière dans des cultures

denses ? Comment orienter le métabolisme carboné vers les huiles ? Comment mener les cellules à sécréter de l'huile ? Comment favoriser l'auto-floculation de la biomasse pour aider à la récolte ?

Côté procédés, les systèmes de cultures sont à optimiser pour assurer la production en masse en maîtrisant les paramètres eau, lumière et gaz, ainsi que la récolte. La mise en place de fermes de production s'intègre à l'échelle des territoires dans des problématiques de gestion et de qualité des eaux usées. L'extraction de l'huile, enfin, est une des questions les plus difficiles, partant d'un matériel hydraté et intégré à l'intérieur de cellules biologiques, en tentant de limiter l'utilisation de solvants, la production d'émulsion ou la destruction des coproduits. Il est aujourd'hui évident que la production de biocarburants à partir de microalgues nécessitera encore de nombreuses années, dans un contexte plus général qui est celui de la chimie verte.

8 Glossaire

L'auteur définira les termes ou expressions les plus importants de l'article. La traduction des termes en anglais est conseillée.

Microalgue ; *microalga*

Organisme unicellulaire photosynthétique, pouvant appartenir à des branches très différentes de la biodiversité.

Photosynthèse ; *photosynthesis*

Processus biologique par lequel certains organismes convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique (« photo- »), et utilisent ensuite celle-ci pour capturer le CO₂ atmosphérique et synthétiser des molécules organiques carbonées (« -synthèse »). La photosynthèse est le point d'entrée du carbone dans la matière vivante et est à la base de tous les réseaux trophiques permettant à la vie d'exister.

Huile algale ; *algal oil*

Une huile est formée par toutes molécules hydrophobes qui se séparent d'un milieu aqueux. A l'intérieur d'une cellule algale, l'huile est formée par un lipide particulier, le triacylglycérol.

Photobioréacteur ; *photobioreactor*

Système clos et transparent, à l'intérieur duquel on cultive des microalgues en milieu liquide et sous un éclairage maîtrisé.

Transformation d'une microalgue ; *algal transformation*

La transformation est une méthode de microbiologie permettant de faire entrer une molécule d'ADN à l'intérieur d'une cellule, ici d'algue. Ce type de méthode doit être mis au point pour permettre d'optimiser une microalgue par ingénierie moléculaire.

Ingénierie génétique ; *genetic engineering*

L'ensemble des concepts et techniques mises en œuvre pour modifier le génome d'un organisme en supprimant, introduisant ou modifiant une région de son ADN

Endosymbiose ; *endosymbiosis*

Etape critique de l'évolution biologique au cours de laquelle une cellule pénètre à l'intérieur d'une autre et s'y maintient définitivement au point d'en devenir une sous-partie fonctionnelle. Schématiquement, une endosymbiose primaire a ainsi permis l'apparition d'une structure appelée chloroplaste à l'intérieur des cellules algales, qui

existait précédemment sous une forme libre et indépendante appelée cyanobactérie.

Métabolisme ; metabolism

Ensemble des réactions chimiques se produisant à l'intérieur d'une cellule. Le métabolisme carboné correspond à toutes les voies de biosynthèse et de dégradation de molécules organiques dérivées du glucose produit au moment de la photosynthèse.

Lipides ; lipids

Toutes molécules du métabolisme ayant des propriétés de « répulsion » avec l'eau. Les lipides ont donc une diversité structurale très grande, comprenant des glycérolipides, des stérols, des caroténoïdes, etc.

Acide gras ; fatty acid

Lipide de structure très simple, composée d'une chaîne de carbones avec une fonction carboxylique (acide) à une de ses extrémités. L'extrémité acide définit le carbone « alpha », l'extrémité à son opposée, le carbone « oméga ». La chaîne carbonée peut présenter des doubles liaisons. Une double liaison à 3 carbones de distance de l'extrémité oméga définit un acide gras dit « oméga-3 ».

Triacylglycérol ; *triacylglycerol*

Lipide composé d'un trialcool, le glycérol, estérifié à trois acides gras.

Autotrophie ; *autotrophy*

Faculté d'un organisme à se développer en dehors d'une source externe de « nourriture » carbonée. La photosynthèse permet à une microalgue de se développer grâce CO₂ atmosphérique Lorsque la microalgue se développe juste par ce processus, on parle de « photo-autotrophie ».

Hétérotrophie ; *heterotrophy*

Faculté d'un organisme à se développer uniquement en présence d'une source externe de « nourriture » carbonée. Les levures sont hétérotrophes.

Mixotrophie ; *mixotrophy*

Faculté d'un organisme à se développer en combinant à la fois la capture du CO₂ atmosphérique par photo-autotrophie, et la capture de carbone organique, issue d'une source externe de « nourriture » carbonée. Cette combinaison d'autotrophie et d'hétérotrophie a donné naissance au terme « mixotrophie ». Les processus moléculaires de ce mécanisme font l'objet de recherches importantes.

Remerciements

L'auteur souhaite remercier l'ensemble des collègues du Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale (unité mixte de recherche CNRS-CEA-INRAE-Université Grenoble-Alpes), impliqués dans la recherche sur les microalgues (*Chlamydomonas*, *Nannochloropsis*, *Microchloropsis*, *Phaeodactylum*), la photosynthèse, le métabolisme carboné et le métabolisme lipidique. De plus, L. Garnier et C. Biju-Duval, professeurs de l'enseignement secondaire, sont aussi remerciés pour une lecture critique de ce manuscrit. Les travaux réalisés sur la production de lipides chez les microalgues sont soutenus par le Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (programme Fermeture du Cycle du Carbone), l'Agence Nationale de la Recherche (Oceanomics ANR-11-BTBR-0008, GRAL Labex ANR-

10-LABEX-04, EUR CBS ANR-17-EURE-0003), et l'Institut Carnot 3BCAR.

Pour en savoir plus

Carburants à base d'algues oléagineuses

Principes, filières, verrous

Biofuels from oleaginous algae

Principles, industry sectors, challenges

par **Eric MARECHAL**

Directeur de recherche CNRS, chef de l'équipe Homéostasie des Glycérolipides

Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherche en Sciences et Technologies pour le Vivant, CEA Grenoble, Grenoble, France

Sources bibliographiques

- [1] PETROUTSOS Dimitris, AMIAR Souad, ABIDA Heni, DOLCH Lina-Juana, BASTIEN Olivier, REBEILLE Fabrice, JOUHET Juliette, FALCONET Denis, BLOCK Maryse A., MCFADDEN Geoff I, BOWLER Chris, BOTTE Cyrille, MARECHAL Eric - *Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways. From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids*. Progress in Lipid Research, 54:68-85 (2014).
- [2] LEVITAN Orly, DINAMARCA Jorge, HOCHMAN Gal, FALKOWSKI Paul G. - *Diatoms: a fossil fuel of the future*. Trends in Biotechnology, 32:117-124 (2014).
- [3] BEISSON Fred, LI-BEISSON Yonghua, PELTIER Gilles, FINAZZI Giovanni, MARECHAL Eric, CHAUVAT Franck, DELRUE Florian, FROMENT Karine, BLET Vincent. – *Des microalgues pour la production des biocarburants*. Les Clefs du CEA - Les énergies bas carbone 61:49-42 (2013).
- [4] LUPETTE Josselin, MARECHAL Eric – *Le potentiel des microalgues pour la chimie verte et les bioénergies*. (L. Kalpa ed) Éditions Matériologiques, Paris, France, 321-338 (2018).
- [5] CHISTI Yusuf. – *Biodiesel from microalgae*. Biotechnology Advances, 25:294-306 (2007).
- [6] RAZZAK Shaikh A., HOSSAIN Mohammad M., LUCKY Rahima A., BASSI Amarjeet S. Bassi, DE LASSA Hugo. - *Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review*. Renewable and Sustainable Energy reviews, 27:622-653 (2013).
- [7] SIMIONATO Diana, BLOCK Maryse A, LA ROCCA Nicoletta, JOUHET Juliette, MARECHAL Eric, FINAZZI Giovanni MOROSINOTTO Tomas Morosinotto - *The response of Nannochloropsis gaditana to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus*. Eukaryotic Cell, 12:665-676 (2013)
- [8] CHISTI Yusuf. – *Biodiesel from microalgae beats bioethanol*. Trends in Biotechnology, 26: 126-131 (2008).
- [9] RADAKOVITZ Randor, EDUAFO Patrick M., POSEWITZ Mathew C. - *Genetic engineering of fatty acid chain length in Phaeodactylum tricornutum*. Metabolic Engineering 13:89-95 (2011)

- [10] MOOSBURNER Mark Andrew, GHOLAMI Pardis, McCARTHY James, TAN Maxine, BIELINSKI Vincent, ALLEN Andrew - *Multiplexed Knockouts in the Model Diatom Phaeodactylum by Episomal Delivery of a Selectable Cas9*. *Frontiers in Microbiology*, 11:5 (2020).
- [11] WEEKS Donald. - *Homologous recombination in Nannochloropsis: a powerful tool in an industrially relevant alga*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(52):20859-20860 (2011)
- [12] DOLCH Lina-Juana, RAK Camille, PERIN Giorgio, TOURCIER Guillaume, BROUGHTON Richard, LETERRIER Marine, MOROSINOTTO Tomas, TELLIER Frédérique, FAURE Jean-Denis, FALCONET Denis, JOUHET Juliette, SAYANOVA Olga, BEAUDOIN Frédéric, MARECHAL Eric. (2017) *A palmitic acid elongase affects eicosapentaenoic acid and plastidial monogalactosyldiacylglycerol levels in Nannochloropsis*. *Plant Physiology*, 173:742-759 (2017).
- [13] DABOUSSI Fayza, LEDUC Sophie, MARECHAL Alan, DUBOIS Gwendoline, GUYOT Valérie, PEREZ-MICHAUD Christophe, AMATO Alberto, FALCIATORE Angela, JULLERAT Alexandre, BEURDELEY Marine, VOYTAS Daniel, CAVAREC Laurent, DUCHATEAU Philippe. *Genome engineering empowers the diatom Phaeodactylum tricorutum for biotechnology*. *Nature Communication*. 5:3831 (2014).
- [14] HAO Xiahui, LUO Ling, JOUHET Juliette, REBEILLE Fabrice, MARECHAL Eric, HU Hanhua, PAN Yufang, TAN Xiaoming, CHEN Zhuo, YOU Lingjie, CHEN Hong, WEI Fang, GONG Yangmin. *Enhanced triacylglycerol production in the diatom Phaeodactylum tricorutum by inactivation of a Hotdog-fold thioesterase gene using TALEN-based targeted mutagenesis*. *Biotechnology Biofuels*, 11:312 (2018).
- [15] KROTH Peter , BONES Atle , DABOUSSI Fayza, FERRANTE Maria, JAUBERT Marianne, KOLOT Misha, NYMARK Marianne, RIO BARTULOS Carolina, RITTER Andrés, RUSSO Monia T, SERIF Manuel, WINGE Per, FALCIATORE Angela. *Genome editing in diatoms: achievements and goals*. *Plant Cell Reports*, 37(10):1401-1408 (2018).
- [16] ALLORENT Guillaume, GUGLIEMINO Erika, GIUSTINI Cécile, COURTOIS Florence. *Generation of Mutants of Nuclear-Encoded Plastid Proteins Using CRISPR/Cas9 in the Diatom Phaeodactylum tricorutum*. *Methods in Molecular Biology*, 1829:367-378 (2018).
- [17] ARANSIOLA E.F., OJUMU T.V., OYEKOLA O.O., MADZIMBAMUTO T.F., IKHU-OMOREGBE D.I.O. - *A review of current technology for biodiesel production: State of the art*. *Biomass and Bioenergy*, 61:276-297 (2014).
- [18] OLIVIERI Giuseppe, SALATINO Piero, MARZOCHELLA Antonia. - *Advances in photobioreactors for intensive microalgal production: configurations, operating strategies and applications*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89:178-195 (2013).
- [19] CHISTI Yusuf. – *Constraints to commercialization of algal fuels*. *Journal of Biotechnology*, 167:201-214 (2013).
- [20] WANG Jinghan, YANG Haizhen, WANG Feng. - *Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172:3307-3329 (2014).
- [21] VILLANOVA Valeria, FORTUNATO Antonio Emidio, SINGH Dipali, DAL BO Davide, CONTE Melissa, OBATA Toshihiro, JOUHET Juliette, FERNIE Alisdair, MARECHAL Eric, FALCIATORE Angela, PAGLIARDINI Julien, LE MONNIER Adeline, POOLMAN Mark, CURIEN Gilles, PETROUTSOS Dimitris, FINAZZI Giovanni. *Investigating mixotrophic metabolism in the model diatom Phaeodactylum tricorutum*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 372 (1728): 60404 (2017).
- [22] SORIGUE Damien, LEGERET Bertrand, CUINE Stéphan, BLANGY Stéphanie, MOULIN Solène, BILLON Emmanuelle, RICHAUD Pierre, BRUGIERE Sabine, COUTE Johann, NURIZZO Didier, MULLER Pavel, BRETTE Klaus, PIGNOL David, ARNOUX Pascal, LI-BEISSON Yonghua, PELTIER Gilles, BEISSON Fred Beisson. - *An algal photoenzyme converts fatty acids to hydrocarbons*. *Science*, 357(6354):903-907 (2017).

- [23] MOULIN Solène, LEGERET Bertrand, BLANGY Stéphanie, SORIGUE Damien, BURLACOT Adrien, AUROY Pascaline, LI-BEISSON Yonghua, PELTIER Gilles, BEISSON Fred. - *Continuous photoproduction of hydrocarbon drop-in fuel by microbial cell factories*. Scientific Reports, 9(1):13713 (2019).
- [24] PERSON Julie - *Algues, filières du futur*. Edition AdebioTech (2011).
- [25] WIJFFELS René H., BARBOSA Maria J. – *An outlook on microalgal biofuels*. Science, 329:796-799 (2010).
- [26] CARRE Franck. – *Production de l’Energie, Introduction*. Les Clefs du CEA - Les énergies bas carbone 61:12 (2013).
- [27] MAITLAND Geoffrey - *Carbon Capture and Storage: concluding remarks*. Faraday Discussions, 192:581-599 (2016).
- [28] GEORGIANA Ryan D., MAYFIELD Stephen P. – *Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels*. Nature, 488:329-335 (2012).
- [29] KHAN Sikandar, FU Pengcheng - *Biotechnological perspectives on algae: a viable option for next generation biofuels*, Current Opinion in Biotechnology, 62:146-152 (2020).

À lire également dans nos bases

MONTAGNE Xavier. – *Carburants liquides – Gazoles, jets fuels et autres distillats moyens*. [BE 8 545], Ressources énergétiques et stockage (2011).

DEFREL Gilles, DABOUSSI Fayza. – *Modification du génome de microalgues pour la production de molécules d’intérêt*. [RE 276], Bioprocédés (2019).

RAYNAL Ludovic, TEBIANIAN Sina - *Captage et stockage du CO₂ dans le contexte de la transition énergétique*. [BE 8 091], Ressources énergétiques et stockage (2020)

Points clés

Domaine : Techniques de production et de transformation de microalgues

Degré de diffusion de la technologie : **Émergence** | Croissance | Maturité

Technologies impliquées : Génie génétique, biologie moléculaire, biotechnologies, culture de micro-organismes, extraction d'huiles

Domaines d'application : Biocarburants, bioénergie, biomolécules, chimie verte, lubrifiants, cosmétique, nutrition humaine et animale

Principaux acteurs français :

Instituts et centres de recherche : Laboratoire de physiologie cellulaire & végétale (LPCV – CNRS, Université Grenoble Alpes, INRAE, CEA Grenoble) ; Plateforme Lipid Analysis in Grenoble (LIPANG – Région Auvergne-Rhône-Alpes, UE, CEA Grenoble), Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM – CNRS, Université Aix Marseille, CEA Cadarache) ; Plateforme Heliobiotech (CEA Cadarache) ; Cité des Energies et CEA Tech (CEA Cadarache) ; Institut de recherche interdisciplinaire de Grenoble (IRIG – CEA Grenoble) ; Laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés (LISBP Toulouse) ; Institut de biologie de l'École normale supérieure - Laboratoire de génomique des organismes photosynthétiques (IBENS Paris) ; Institut de biologie physico-chimique (IBPC ; CNRS, Sorbonne Université, Paris) ; Laboratoire de génie des procédés – environnement – agro-alimentaire (GEPEA ; CNRS, Université de Nantes, IMT Atlantique, Oniris ; Saint Nazaire) ; Plateforme AlgoSolis (Université de Nantes, CNRS).

Pôles de compétitivité : Mer Bretagne, Mer Méditerranée, Végépolys, Axelera

Institu Carnot : Bioénergies, Biomolécules et matériaux Biosourcés du Carbone Renouvelable (3BCAR)

Industriels : Abolis Metabolism Architects, Algopack, Algosource Technologies, Alpha Biotech, Cyane, Inalve, Fermentalg, Goëmar, Greensea, Innovalg, LLDC Algae, Metabolium, Microphyt, Olmix, Roquette, SunOleo, Total

Autres acteurs dans le monde : Alltech Algae, Algalimento, Algae Tec, Algatech, Algenol, Algenuity, Algomed, Archimede Ricerche, BDI Bioenergy, BP, Cellana, Cellulac, DIC, Ecoduna, Evodos, Gevo, Heliae, Jinzhou Natural Astaxanthin Inc, Jiangsu Tiankai Biotechnology, Lonza, Neoalgae, Neom, Nisshin Oillio Group, Phenometrics, Phytobloom, PetroSun, Reliance, Schott, Simris Alg, Subitec, Synoxis Algae, Synthetic Genomics, TerraVia, Dow, Unilever, Yunnan GinkoAsta Biotech

Contact : eric.marechal@cea.fr