

# 1. Partie scientifique

## 1-1 Présentation détaillée du projet (2 pages max, en français)

Faire ressortir le caractère novateur, les enjeux scientifiques et les retombées attendues.

Les microalgues ont la capacité de convertir l'énergie solaire en biomasse en utilisant l'eau et le gaz carbonique comme ressources principales. Ces organismes photosynthétiques peuvent être cultivés avec des fortes productivités surfaciques sur des terrains non valorisables par l'agriculture, constituant ainsi une ressource en biomasse renouvelable prometteuse pour la production de biocarburants de 3<sup>ème</sup> génération (bioéthanol, biodiesel ou biohydrogène) ou de composés bio-sourcés pour la chimie verte. Toutefois, la productivité des microalgues en composés d'intérêt doit être accrue pour envisager une production industrielle économiquement viable<sup>1</sup>. La plateforme **HélioBiotec** (<http://www-heliobiotec.cea.fr>) a été créée en 2008 au CEA Cadarache pour relever ce défi biotechnologique majeur. Cette plate-forme a été équipée à sa création d'outils de criblage performants (cytométrie en flux, imagerie de fluorescence,...) et d'outils analytiques puissants pour la lipidomique (HP-TLC & GC-MS robotisées, UPLC-MS-qTOF), ces outils étant utilisés pour le criblage haut-débit de souches de microalgues. Les recherches menées sur **HélioBiotec** visent à identifier et lever les verrous biologiques, notamment via des approches de génétique. Les travaux portent particulièrement sur:

- les mécanismes d'accumulation de lipides de réserve (transformables en biodiesel) et leur optimisation (ANR DIESALG en cours; projet OSEO-EIMA avec la Société **Fermentalg** en cours sur les lipides d'intérêt alimentaire)
- les mécanismes de production d'hydrogène et leur optimisation (ANR ALGO-H2, projet Européen ERA-SynBio Sun2Chem)
- les mécanismes de conversion photosynthétique de l'énergie solaire (photosynthèse) et leur optimisation; développement d'approches génétiques via la mise en place d'un banc de criblage de souches mutantes par imagerie de fluorescence (ANR Chloropath ; collaboration avec CEA Tech/DPACA)
- l'ingénierie des souches pour la production d'alcane et de lipides extracellulaires (ANRs MUSCA & BIOEPOXY en cours)
- l'amélioration des souches pour la production de caroténoïdes (collaboration avec la Société **Microphyt**)

Les approches de génétique directe ont montré leur efficacité dans l'identification de nombreux gènes clefs chez différents types d'organismes (levures, plantes,...). Dans ce type d'approche, on recherche directement le phénotype d'intérêt via le criblage haut-débit de mutants. L'identification du gène muté permet ensuite d'établir un lien entre une propriété phénotypique d'intérêt et un gène. Cette approche a été développée au laboratoire chez la microalgue modèle *Chlamydomonas reinhardtii* dont le génome a été intégralement séquencé et pour laquelle de nombreux outils génétiques sont disponibles. Ainsi, différentes techniques de criblage haut-débit ont été mises au point au laboratoire en utilisant les ressources analytiques d'**HélioBiotec** et des mutants d'intérêt isolés. On peut par exemple citer l'isolement et la caractérisation de mutants présentant des capacités de production d'H<sub>2</sub> fortement stimulées<sup>2</sup>, des mutants surproducteurs d'amidon<sup>3</sup> (Schulz *et al.* 2014 **European Patent Application** n°14305673) ou de lipides<sup>4</sup>. Toutefois, les capacités de criblage de la plate-forme sont actuellement limitées par les capacités de repiquage de souches, car cette opération nécessite une intervention manuelle coûteuse en temps et en ressources humaines.

Les techniques de repiquage haut-débit ont été utilisées pour la propagation et le criblage de banques de mutants provenant de différents types d'organismes unicellulaires, dont des bactéries et des levures. Cette technique permet d'atteindre une vitesse de propagation extrêmement élevée (jusqu'à 38400 colonies par heure). L'utilisation de cette technique a été récemment validée chez la microalgue modèle *Chlamydomonas* (<https://www.youtube.com/watch?v=AjbdJkmjZmw>). Cette technique permet également la cryoconservation des banques de mutants dans des microplaques 96 puits, permettant ainsi le stockage long terme de banques de mutants. Le robot de repiquage de colonies ROTOR de Singer permettra le repiquage robotisé de colonies, soit à partir de milieux solides (boîtes de Pétri contenant des microalgues mutantes résultant d'expérimentation de transformation des microalgues), soit à partir de puces haute-densité. Le robot a notamment la capacité de discriminer les colonies selon leur taille ou leur coloration, permettant ainsi de repérer des phénotypes de croissance d'intérêt. Il peut générer des plaques de culture de haute-densité en culture liquide ou solide. Il est ainsi

<sup>1</sup> Delrue, F., Li-Beisson, Y., Setier P.A., Sahut, C., Roubaud, A, Froment, A.K., Peltier, G. (2013) Comparison of various microalgae liquid biofuel production pathways based on energetic, economic and environmental criteria. *Bioresource Technol.* 136, 205-212

<sup>2</sup> Tolleter, D., Ghysels, B., Alric, J., Petroustos, D., Tolstygina, I., Krawietz, D., Happe, T., Auroy, P., Adriano, J.M., Beyly, A., Cuiiné, S., Plet, J., Reiter, I.M., Genty, B., Cournac, L., Hippler, M., Peltier, G. (2011) Control of hydrogen photo-production by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 23, 2619-2630

<sup>3</sup> Chochois, V., Constans, L., Dauvillée, D., Beyly, A., Solivères, M., Ball, S., Peltier, G., Cournac, L. (2010) Screening for starch catabolism mutants of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in order to unravel key factors of hydrogen bioproduction. *Int. J. Hydrogen Energy*. 35, 10731-10740

<sup>4</sup> Cagnon, C., Mirabella, B., Nguyen, H.M., Beyly-Adriano, A., Bouvet, S., Cuiiné, S., Beisson, F., Peltier, G., Li-Beisson, Y. (2013) A genetic screen to isolate oil mutants in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Biofuels* 6, 178

possible de placer une banque de mutants (capacité maximale 6144 clones) qui seront ensuite criblés simultanément selon les critères d'intérêt choisis. Une publication récente montre que seulement deux co-auteurs ont pu identifier sans aide technique 50 gènes d'intérêt à partir d'un crible génétique utilisant ce robot<sup>5</sup>.

La stratégie développée dans notre laboratoire est basée sur des approches de génétique formelle. Des milliers de mutants sont générés de manière aléatoire et criblés sur la base de leurs propriétés phénotypiques en utilisant des techniques analytiques à haut-débit telle l'imagerie fonctionnelle basée des mesures de fluorescence de la chlorophylle<sup>6,7</sup> ou la cytométrie en flux. Les phénotypes de croissance des souches mutantes soumises à des conditions environnementales variables peuvent être directement suivis par analyse d'image ou en réponse à une coloration spécifique (coloration aux vapeurs d'iode pour l'amidon par exemple). L'isolement d'un mutant d'intérêt dépend du taux de couverture du génome. Si le génome de la microalgue contient 20000 gènes on considère généralement qu'il est nécessaire de cribler à minima 50000 à 60000 mutants pour saturer le génome (en faisant l'hypothèse d'une répartition aléatoire des mutations). Les cribles génétiques précédemment développés au laboratoire ont permis d'isoler et de caractériser des mutants d'intérêt. Toutefois, le taux de couverture du génome était très faible, car faute de moyens humains de 3000 à 15000 mutants ont été criblés. L'acquisition du robot ROTOR permettra de réaliser des recherches de mutants via des cribles génétiques saturant le génome. Il permettra également de réaliser des expérimentations jusqu'à alors non envisagées telles la recherche de mutants suppresseurs, en ayant recours à des mutations ponctuelles, dans le but d'identifier les partenaires moléculaires de gènes d'intérêt et en utilisant une souche mutante d'intérêt comme background génétique. Il permettra aussi de développer une génétique haut-débit basée sur la sélection de mutants naturels et d'identifier les gènes mutés en couplant des approches de génétique (backcross) avec les techniques de séquençage haut-débit les mutations responsables des phénotypes d'intérêt, sur le modèle de ce qui se fait chez la levure.

Jusqu'à ce jour, l'essentiel des études de génétiques effectuées sur les microalgues ont porté sur l'espèce modèle *Chlamydomonas*. Même si la culture industrielle de *Chlamydomonas* a pu être validée récemment par notre partenaire industriel **Microphyt** (<http://www.microphyt.eu>), d'autres espèces présentent un intérêt industriel plus immédiat, comme les espèces accumulatrices de lipides du genre *Chlorella* (dont le génome a été séquencé par un partenaire du projet - G. Blanc IGS Marseille), ou *Nannochloropsis* (étudiée dans le cadre du projet NannoControl financé par le CEA). L'acquisition du robot de repiquage ROTOR permettra de mettre en place des projets de criblage haut-débit de mutants (non OGM) chez ces espèces d'intérêt industriel.

On peut résumer les avantages du robot ROTOR en trois points :

1. En gagnant temps et main d'œuvre sur les opérations de repiquage l'acquisition du robot ROTOR permettra d'entreprendre des projets jusqu'à présent inenvisageables car trop consommateurs en ressources (conservation de banques de mutants, cryo-préservation...).
2. Il permettra de passer à la recherche de mutants à grande échelle en développant des stratégies génétiques qui n'ont pour l'instant été que peu développées chez les microalgues (criblage de mutants ponctuels « non OGM » sur des espèces d'intérêt industriel, QTL,...).
3. Enfin il servira de base au développement de nouveaux cribles haut-débit basés sur des systèmes d'imagerie innovants, via la transposition aux microalgues de briques technologiques développées au laboratoire (comme par exemple dans le cadre du projet IMAPLANT).

Sur le plan des retombées, l'acquisition du robot permettra de proposer une meilleure offre vis à vis de partenaires notamment industriels et d'accroître les capacités de la plateforme **HélioBiotec** à développer des contrats industriels. Le développement de modules de détection innovants, en collaboration avec les équipes techniques de l'IBEB (GRAP) ou de CEA Tech/DPACA, dans le cadre du projet de **Cité des Energies**, devrait permettre de servir de base à la création de start-up.

---

<sup>5</sup> Tulin, F., Cross, F.R. (2014) A microbial avenue to cell cycle control in the plant superkingdom. *Plant Cell* 26, 4019-4038

<sup>6</sup> Johnson X, Vandystadt G, Bujaldon S, Wollman FA, Dubois R, Roussel P, Alric J, Béal D. (2009) A new setup for *in vivo* fluorescence imaging of photosynthetic activity. *Photosynth Res.* 102, 85-93

<sup>7</sup> Houille-Vernes L, Rappaport F, Wollman FA, Alric J, Johnson X. (2011) Plastid Terminal Oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 20820-20825