HAL
open science

Ingénierie écologique des communautés microbiennes de méthanisation des déchets ligno-cellulosiques

Olivier Chapleur

To cite this version:

Olivier Chapleur. Ingénierie écologique des communautés microbiennes de méthanisation des déchets ligno-cellulosiques. Sciences de l'environnement. AgroParisTech, 2012. Français. NNT : 2012AGPT0046 . pastel-00945512

HAL Id: pastel-00945512

https://pastel.hal.science/pastel-00945512

Submitted on 12 Feb 2014

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.

ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture Agriculture Alimentation Food Biologie Biology Environnement Environment Santé Health

irstea

Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Sciences de l'Environnement

présentée et soutenue publiquement par

Olivier CHAPLEUR

le 18 juin 2012

Ingénierie écologique des communautés microbiennes de méthanisation des déchets ligno-cellulosiques

Directeur de thèse : **Jean-Jacques GODON**
Co-encadrement de la thèse : **Théodore BOUCHEZ**

Jury

M. Théodore Bouchez, ICPEF, IRSTEA	Examinateur
M. Patrick Dabert, Directeur de recherche, IRSTEA	Rapporteur
M. Jean-Jacques Godon, Directeur de recherche, INRA	Examinateur
M. Laurent Mazéas, Chargé de recherche, IRSTEA	Membre invité
M. Franck Poly, Chargé de recherche, Université Claude Bernard Lyon I	Examinateur
M. Philippe Vandenkoornhuyse, Professeur, Université Rennes I	Rapporteur
Mme Laure Vieublé-Gonod, Maître de conférences, AgroParisTech	Examinateur

À la mémoire de ma maman,

À mon père,

Je souhaite remercier tous ceux qui m'ont accompagné et apporté une aide précieuse et indispensable lors de cette aventure qu'est une thèse.

Je tiens en premier lieu à exprimer toute ma gratitude à Théodore Bouchez, qui, lorsque j'ai frappé à sa porte, m'a accueilli avec bienveillance et m'a offert la possibilité de réaliser ce travail dans son équipe. Sa passion communicative pour la thématique de la gestion des déchets et l'écologie microbienne a été une grande source de motivation. Il m'a accompagné, avec Jean-Jacques Godon, mon directeur de thèse, pendant mon stage de master puis mon doctorat, et je tiens à les remercier pour avoir guidé mon travail, stimulé mes réflexions tout en m'accordant confiance et autonomie dès mes premiers pas dans le monde de l'écologie microbienne.

J'adresse mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse : Mme Laure Vieublé-Gonod et M. Frank Poly ainsi que MM. Patrick Dabert, Philippe Vandenkoornhuyse, les rapporteurs de ce travail.

Je remercie également toutes les personnes ayant participé à mon comité de thèse : chaque réunion a été l'occasion de faire un point sur l'avancée de mes travaux et de prendre du recul. Je suis très reconnaissant à Nathalie Frascaria-Lacoste, Bernard Montuelle et Pierre Renault pour leurs conseils et leurs réponses à mes questions à l'occasion de ces réunions.

Je remercie Cécile Loumagne puis Didier Pont qui m'ont accueilli dans l'unité de recherche Hydrosystèmes et Bioprocédés, ainsi que Gérard Sachon puis Michel Penel directeurs du centre d'Antony du Cemagref, puis Irstea.

J'exprime toute ma gratitude à Philippe Duchêne, directeur du département Écotechnologies à Irstea pour ses conseils avisés et sa disponibilité tout au long de ce projet de FCPR.

Je remercie chaleureusement Christian Duquennoi, chef de l'équipe SOWASTE à Antony, ainsi que Pascal Mallard puis Nathalie Touze-Foltz, animateurs du thème de recherche SOWASTE.

J'exprime également ma reconnaissance à Laurent Mazéas et Ariane Bize pour le suivi attentif et l'investissement important dans la réalisation de mes travaux. C'est un réel plaisir d'apprendre et de travailler avec eux.

J'adresse mes remerciements à Jean-Luc Guerquin-Kern et Ting-Di Wu de l'institut Curie pour notre collaboration autour du nanoSIMS.

Je remercie également l'école doctorale ABIES et en particulier Cyril Kao, Marianne Lefort, Corinne Fiers et Françoise Launay.

Je remercie aussi les membres de l'équipe SOWASTE avec qui j'ai eu la chance de passer ces quelques années : Chloé, Fan, Nelly, Ghita, Rim, Laetitia, Elizabeth, Liping, Julien, Anthony, Elie, Arnaud, Grégory, Hugues etc. En particulier, je remercie très chaleureusement Céline Madigou pour son soutien et son aide dans ce travail et son écoute face aux difficultés. Le partage de bureau nous a permis de nous rapprocher, malgré le volume important de documents que j'ai pu accumuler au fil des années !

Merci à l'ensemble des membres de l'équipe microbiologie pour l'ambiance de travail et les échanges fructueux : Chrystelle Bureau, Anne Goubet, Jean-Jacques Pernelle, Cécile Rouillon et Françoise Vincent-Hubert.

J'adresse mes remerciements au personnel de l'équipe chimie, pour leur aide précieuse dans les analyses physico-chimiques : Angeline Guenne, Nadine Derlet et Nina Pourette.

Un grand merci à toutes les belcates pour leur bonne humeur et nos collaborations piotiques : Marie-Hélène, Catherine, Emmanuelle, Adeline, Cécile, Aurélie, Marine, Violaine mais aussi Jérémie et Matthieu. Merci en particulier au docteur Fechner de me prodiguer depuis de nombreuses années des conseils si avisés, au plan personnel ou professionnel. En particulier merci d'avoir pris le temps de relire une grande partie de ce travail, et d'avoir toujours été là dans les moments importants, heureux ou difficiles!

Merci aux différents étudiants avec qui j'ai pu travailler et à qui j'espère j'ai pu donner le goût de l'écologie microbienne, et de trouver des réponses (simples) aux questions compliquées : Vincent Hébrail, Charlotte Richard, Thibaut Serain et An Shu.

Au sein de l'unité HBAN, je remercie très chaleureusement tous les membres passés et présents, pour leur aide informelle et pour leur amitié. Un grand merci à Sophie Morin, Valérie Dansin, Roger Martins, Laurence Tanton, Elizabeth Riant et Nathalie Camus pour leur disponibilité et leur bonne humeur !

Je remercie l'ensemble des autres personnels de Irstea avec qui j'ai eu la chance de pouvoir collaborer, en particulier les équipes scientifiques des autres centres régionaux, mais également les équipes du « groupement » d'Antony, les membres de la DG et en particulier de la DCRP.

Enfin, je remercie du fond du cœur tous mes amis, qui m'ont soutenu pendant cette période exigeante qu'est la thèse, mais également dans beaucoup d'autres moments de ma vie. Merci tout particulièrement à mes parents de m'avoir encouragé dans mes études et transmis leur goût pour les sciences.

– Sommaire

— *Sommaire* 2
— *Liste des abréviations* 7
— *Introduction* 9
— *Synthèse bibliographique* 13
1. Gestion des déchets et des bioprocédés : problématiques et enjeux 13
1.1. Les déchets ménagers en France 13
1.1.1. Production et traitement 13
1.1.2. Vers une optimisation nécessaire des systèmes d'élimination des déchets 15
1.1.3. Des perspectives énergétiques fortes 17
1.2. Composition des déchets non dangereux : la cellulose, une molécule clé 19
1.3. La dégradation des déchets : des bioprocédés et des microorganismes en action 20
1.3.1. Bioprocédés 20
1.3.2. Le devenir des déchets ménagers… 21
1.4. Contrôle et connaissance des bioprocédés : une gestion à l'échelle macroscopique, sous forme de boîte noire 22
1.5. Vers la connaissance des acteurs des bioprocédés : les microorganismes 23
1.5.1. Une première acquisition de connaissances partielle et biaisée 23
1.5.2. L'arrivée des techniques moléculaires 24
1.5.3. Intégration de la composante microbienne dans l'étude des bioprocédés 24
2. La biologie moléculaire au service de la description des bioprocédés 25
2.1. Comment décrire et étudier un écosystème microbien complexe ? 25
2.1.1. De la nécessité d'étudier les systèmes dans leur ensemble 25
2.1.2. Le 16S, un marqueur moléculaire universel 25
2.2. Observation des écosystèmes microbiens, des communautés aux individus 27
2.2.1. Evolution des communautés et dynamiques de population 27
2.2.2. Identifier les acteurs des écosystèmes microbiens et les classer 30
2.2.3. Observer les microorganismes directement dans leur environnement 30
2.3. Mise en évidence des informations fonctionnelles au sein d'un écosystème complexe 32
2.3.1. Les isotopes stables pour accéder à l'information fonctionnelle 32
2.3.2. Comment identifier les microorganismes fonctionnels 33
2.3.3. Mesure de l'incorporation d'isotopes au sein des microorganismes 36
3. Description des processus de méthanisation 39
3.1. Les grandes étapes de la digestion anaérobie 40
3.1.1. Hydrolyse 40
3.1.2. Acidogenèse 40
3.1.3. Acétogenèse 41
3.1.4. Méthanogenèse 41
3.1.5. Autres réactions 42
3.1.6. Cas particulier des substrats cellulosiques 42
3.2. Microbiologie de la digestion anaérobie 43
3.2.1. Hydrolyse 44
3.2.2. Acidogenèse 44
3.2.3. Acétogenèse 44
3.2.4. Méthanogenèse 44
3.2.5. Sulfato-réduction 45
3.2.6. Influence d'un ensemble de paramètres 45
3.3. Cas particulier de la cellulose et de sa dégradation d'un point de vue moléculaire 45
3.4. Conclusion 47
4. Vers la mise en œuvre d'une ingénierie écologique des communautés microbiennes des bioprocédés 48
4.1. L'ingénierie écologique, définitions et objectifs 48
4.1.1. Des premiers pas à la mise en place d'une démarche 48
4.1.2. Objectifs visés 49
4.1.3. Enjeux de recherche 49
4.2. Les passerelles entre écosystèmes macroscopiques et écosystèmes microbiens 50

4.2.1. Des règles générales pour mettre en place l'ingénierie écologique 50
4.2.2. Macro et micro : des écosystèmes différents ? 50
4.2.3. Vers une meilleure prise en compte des microorganismes 51
4.2.4. Bilan 53
4.3. La mutation de l'écologie microbienne des bioprocédés vers l'ingénierie écologique des écosystèmes microbiens des bioprocédés 54
4.3.1. Observer, reproduire, concevoir 54
4.3.2. Utiliser, manipuler ou ajuster 55

5. Quels outils pour réaliser l'ingénierie écologique des bioprocédés ? 56
5.1. Des paramètres à moduler 56
5.1.1. Notion de levier environnemental 56
5.1.2. Leviers physico-chimiques 57
5.1.3. Ajouter des substrats simples pour stimuler et orienter l'activité microbienne 59
5.1.4. S'inspirer d'autres systèmes microbiens 61
5.1.5. D'autres leviers d'action sont possibles 64
5.2. Sur quels concepts écologiques s'appuyer ? 64
5.2.1. Mesure de la stabilité, résilience et résistance 65
5.2.2. Mesure de la diversité et de la dynamique des populations 66

6. Conclusion 70

— Problématique et objectifs 71

— Matériel et méthodes 73

1. Système expérimental 73
1.1. Dispositif expérimental 73
1.2. Inoculum 73
1.3. Tampon liquide 74
1.4. Biomasses exogènes 74
1.5. Ciel gazeux 74
1.6. Substrats utilisés 74

2. Mise en place des incubations 75

3. Suivi des productions de biogaz 75
3.1. Prélèvement et analyse du biogaz 75
3.2. Analyse de la composition du biogaz par micro-chromatographie 76
3.3. Calcul des productions de biogaz 76
3.4. Mesure de la composition isotopique du biogaz 77

4. Prélèvement et conservation des échantillons liquides pendant l'incubation 77

5. Méthodes analytiques 78
5.1. pH 78
5.2. Le carbone organique et inorganique dissous 79
5.3. Les Acides Gras Volatils 79
5.4. Analyse de la composition isotopique des AGV 79
5.5. Analyses élémentaires 79

6. Méthodes de biologie moléculaire 79
6.1. Extraction d'ADN 79
6.2. ARISA 80
6.3. Principe des puces ADN Agilent Technologies 81
6.4. Ultracentrifugation 82
6.5. Pyroséquençage 83

7. Analyse des résultats d'ARISA à l'aide de Statfingerprints 83

8. Analyse des données de pyroséquençage 83

9. Vue d'ensemble des microcosmes préparés 84

9.1. Principaux paramètres physico-chimiques 84
9.2. Diversité microbienne des inocula 85
9.3. Influence de changements de température 86
9.4. Influence d'une fonctionnalisation préalable de la biomasse 90
9.5. Effet de la co-inoculation de biomasses exogènes 93

— *Influence de changements de température* *97*

1. Introduction 97

2. Données physico-chimiques 98
2.1. Productions de gaz 98
2.1.1. Production de biogaz total 99
2.1.2. Productions spécifiques de biogaz 102
2.1.3. Conclusions 105
2.2. Analyses physicochimiques de la phase liquide 105
2.2.1. Carbone organique et inorganique dissous 105
2.2.2. Acides gras volatils 107
2.3. Analyses isotopiques 108
2.3.1. Gaz 109
2.3.2. Acides gras volatils 109
2.4. Influence des prélèvements liquides 112

3. Analyses microbiologiques 113
3.1. Observation des profils ARISA de la diversité totale 113
3.1.1. Expérience IT 113
3.1.2. Expérience IM 114
3.1.3. Comparaison entre les deux expériences 115
3.1.4. Conclusion 116
3.2. Interprétation statistique des données ARISA 116
3.2.1. Construction de dendrogrammes de proximité 116
3.2.2. Calcul d'indices de diversité 118
3.3. Détermination des populations fonctionnelles 123
3.3.1. Gradients d'ultracentrifugation 123
3.3.2. Diversité de la fraction fonctionnelle de l'ADN 124
3.4. Séquençage de l'ADN 126
3.4.1. Archées 126
3.4.2. Bactéries 127
3.4.3. Bilan 130

4. Discussion 130
4.1. Performances de dégradation 130
4.1.1. Après le premier choc de température 130
4.1.2. Au retour à la température initiale 131
4.2. Voies métaboliques mises en jeu 132
4.2.1. Expérience IT 132
4.2.2. Expérience IM 132
4.2.3. Bilan 133
4.3. Structure des communautés 134
4.3.1. Température et diversité microbienne 134
4.3.2. Situations observées 135
4.3.3. Bilan 136
4.4. Changements irréversibles au passage par les conditions thermophiles 137
4.5. Diversité, écologie et fonctionnalité 139

5. Conclusion-bilan 140

— *Influence d'une fonctionnalisation préalable de la biomasse* *141*

1. Introduction 141

2. Préadaptation 143
2.1. Données physico-chimiques 143
2.1.1. Productions de gaz 143
2.1.2. Carbone organique et inorganique dissous 146
2.1.3. Acides gras volatils 146
2.2. Analyses microbiologiques 147
2.2.1. ARISA 147
2.2.2. Analyse statistique des profils ARISA 148
2.2.3. Séquençage de l'ADN 150
2.3. Bilan de la période de préadaptation 151

3. Dégradation de la cellulose 152
3.1. Données physico-chimiques 152
3.1.1. Productions de gaz 152
3.1.2. Carbone organique et inorganique dissous 153
3.1.3. Acides gras volatils 154
3.2. Analyses isotopiques 154
3.2.1. Biogaz 154
3.2.2. Acides gras volatils 155
3.3. Analyses microbiologiques 155
3.3.1. Détermination des populations fonctionnelles 155
3.3.2. Observation des profils ARISA de la diversité totale et de la diversité fonctionnelle 158
3.3.3. Interprétation statistique des données ARISA 163
3.3.4. Séquençage de l'ADN 166
3.3.5. Bilan 169

4. Discussion 169
4.1. Un modelage réussi mais surprenant 169
4.1.1. Réactions de l'inoculum initial face à différents substrats 169
4.1.2. Le modelage aboutit à des situations différentes… 170
4.1.3. … et à un cas surprenant 171
4.1.4. Efficacité et pertinence de la méthode de modelage 171
4.2. Dégradation de la cellulose : deux schémas métaboliques et écologiques se distinguent 172
4.2.1. Préadaptation avec l'acide propionique ou l'acide butyrique 173
4.2.2. Préadaptation avec le glucose ou le cellobiose 173
4.2.3. Un comportement singulier 173
4.3. Prédétermination des communautés écologiques ou évolution stochastique ? 174
4.3.1. Quelles étapes conditionnent l'évolution des processus ? 174
4.3.2. Déterminisme ou stochastisme ? 175
4.3.3. Pourquoi n'y a-t-il que deux schémas de dégradation de la cellulose ? 175

5. Bilan : la préadaptation comme levier environnemental pour modifier les communautés de microorganismes 176

— Effet de la co-inoculation de biomasses exogènes 177

1. Introduction 177

2. Données physico-chimiques 178
2.1. Productions de gaz 178
2.1.1. Co-inoculation avec le contenu ruminal 179
2.1.2. Co-inoculation avec la boue de bassin d'aération 179
2.1.3. Bilan 180
2.2. Analyses physicochimiques de la phase liquide 180
2.2.1. Carbone organique et inorganique dissous 180
2.2.2. Acides gras volatils 181
2.3. Analyses isotopiques 183
2.3.1. Gaz 183
2.3.2. Acides gras volatils 184
2.4. Influence des prélèvements liquides 186

2.4.1. Co-inoculation avec le contenu ruminal 186
2.4.2. Co-inoculation avec la boue de bassin d'aération 187
2.4.3. Bilan 187

3. Analyses microbiologiques 188
3.1. Détermination des populations fonctionnelles 188
3.2. Observation des profils ARISA de la diversité totale et de la diversité fonctionnelle 189
3.2.1. Co-inoculation avec du contenu ruminal 189
3.2.2. Co-inoculation avec la boue de bassin d'aération 191
3.2.3. Comparaison entre les différentes expériences 193
3.3. Interprétation statistique des données ARISA 193
3.3.1. Archées 193
3.3.2. Bactéries 194
3.3.3. Bilan 195
3.4. Séquençage de l'ADN 195

4. Discussion 200
4.1. Dynamiques métaboliques 200
4.2. Dynamiques écologiques 201
4.2.1. Devenir des biomasses co-inoculées 201
4.2.2. Vers une exploitation du potentiel enzymatique de biomasses exogènes 203
4.2.3. D'une perturbation à un nouvel état d'équilibre 204

5. Bilan : la co-inoculation comme levier environnemental pour l'ingénierie écologique 205
5.1. Imiter les systèmes performants 205
5.2. Modifier la diversité microbienne 206

— Discussion générale 207

1. Pertinence et limites de la démarche expérimentale 207
1.1. Conception du schéma expérimental 207
1.2. Les moyens expérimentaux 208
1.2.1. Le système d'étude 208
1.2.2. Les outils utilisés 209

2. Perturbations ou leviers environnementaux ? 211
2.1. Effets métaboliques 211
2.2. Effets écologiques 212
2.2.1. Mise en perspective globale de l'effet de certains paramètres 212
2.2.2. Diversité totale suite à l'application de leviers 214
2.2.3. Diversité fonctionnelle 215
2.3. Conclusion 216

3. Perspectives de travail 217
3.1. Autres leviers environnementaux possibles 217
3.1.1. Paramètres physico-chimiques du procédé 217
3.1.2. Elimination ou sélection de microorganismes 218
3.1.3. Faciliter le travail des microorganismes 218
3.1.4. Possibilité d'utiliser une combinaison de différents leviers 218
3.2. Vers un changement d'échelle 218

4. La mise en place de l'ingénierie écologique des communautés microbiennes des bioprocédés est-elle possible ? 219
4.1. La question de l'échelle d'observation 219
4.2. Le bioprocédé 220
4.3. L'écosystème 220
4.4. Réunir bioprocédé et écosystème 221
4.5. Conclusion 223

— Conclusion générale 225

— *Annexes* _____ *227*

Annexe 1 : Profils ARISA des expériences de changements de température, archées _____ *227*

Annexe 1 : Profils ARISA des expériences de changements de température, bactéries ___ *228*

Annexe 2 : Liste des OTUs identifiés et nom du plus proche parent pour les bactéries ____ *229*

Annexe 3 : Liste des OTUs identifiés et nom du plus proche parent pour les archées _____ *232*

Annexe 4 : Diversité des bactéries par classe et OTUs _____ *233*

Annexe 5 : Diversité des archées par genre et OTUs _____ *234*

— *Références bibliographiques* _____ *235*

– Liste des abréviations

ACP : analyse en composantes principales

ADEME : agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie

ARDRA : amplified ribosomal DNA restriction analysis

ARISA : automated ribosomal intergenic spacer analysis

CARD-FISH : catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization

CLSM : confocal laser scanning microscopy

CSD : centres de stockage de déchets

DCO : demande chimique en oxygène

DGGE : denaturing gradient gel electrophoresis

DND : déchets non dangereux

EL-FISH : element labeling-fluorescent *in situ* hybridization

FISH : fluorescent i*n situ* hybridization

FNADE : fédération nationale des activités de la dépollution et de l'environnement

HISHSIMS : halogen *in situ* hybridization secondary ion mass spectroscopy

IFEN : institut français de l'environnement

ISDND : installations de stockage des déchets non dangereux

ITS : intergenic transcribed spacer

MODECOM : méthode de caractérisation des ordures ménagères

NIMBY : not in my backyard

OTU : operational taxonomic unit

pb : paires de base

PCR : polymerase chain reaction

RFLP : restriction fragment length polymorphism

SIMS : spectrométrie de masse à ionisation secondaire

SIMSISH : secondary ion mass spectroscopy *in situ* hybridization

SIP : stable-isotope probing

SSCP : single-strand conformation polymorphism

STP : standard de températures et de pression (conditions)

TGGE : temperature gradient gel electrophoresis

T-RFLP : terminal restriction fragment length polymorphism

– Introduction

Face à des enjeux économiques, environnementaux et sociétaux croissants, la gestion des déchets doit évoluer vers de nouvelles méthodes afin de réduire les impacts d'une quantité grandissante de matière résiduelle. Cette dernière, devenue inutile pour ses détenteurs initiaux qui s'en défont, n'a pas toujours atteint le terme de son cycle de vie. En effet, la matière déchet, pendant un temps définie comme « la quantité perdue dans l'usage d'un produit », celle dont on ne veut plus et qu'il faut éliminer, prend une nouvelle signification à l'heure de la pénurie annoncée des énergies fossiles. Aujourd'hui, on prend conscience de la valeur du déchet en tant que ressource : à la fois ressource matière à travers le recyclage ou le compostage, mais également ressource énergétique, à travers l'incinération mais aussi grâce à la valorisation du biogaz issu des bioprocédés de traitement anaérobie des déchets.

A ce titre, le biogaz est reconnu comme une énergie renouvelable au titre de la directive CE (2001/77/CE) depuis septembre 2001. Il est formé dans les centres de stockage de déchets ou dans les bioréacteurs de méthanisation hors-sol au cours d'un processus appelé digestion anaérobie. La digestion anaérobie consiste en une succession de réactions de dégradation au cours desquelles la matière organique contenue dans les déchets est convertie en un gaz appelé biogaz, composé principalement de dioxyde de carbone et de méthane, qui est valorisable. Ces réactions de dégradation sont catalysées par une grande variété de microorganismes agissant simultanément et en interaction. Au sein des bioprocédés, les microorganismes forment un écosystème microbien complexe, dans lequel, à l'image des écosystèmes macroscopiques, se mettent en place des réseaux et des flux entre individus et espèces. Dans ce cadre, les paramètres opératoires appliqués aux bioprocédés définissent les conditions et les pressions environnementales qui influencent l'évolution des communautés microbiennes, induisent l'expression des fonctions et déterminent les performances des bioprocédés. Les microorganismes constituent donc un maillon incontournable de cette chaîne causale.

Cependant, du fait de limitations méthodologiques, la composante microbienne des bioprocédés a longtemps été insuffisamment comprise, ce qui a limité son exploitation. Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis d'avancer considérablement dans l'étude des communautés microbiennes complexes présentes dans l'environnement, en particulier dans les bioprocédés. De premières descriptions des écosystèmes microbiens ont été réalisées, et si la connaissance du rôle et de l'identité de chacun des microorganismes responsables de la digestion anaérobie n'est pas exhaustive, le déroulement des différentes étapes de la dégradation est mieux documenté. L'équilibre des différentes composantes de l'écosystème microbien reste toutefois plus difficile à appréhender. Les microorganismes forment des groupes fonctionnels et des chaînes trophiques, ou encore tissent des flux d'énergie et des réseaux d'interaction forts qui peuvent être très influencés par l'évolution des conditions opératoires. Les conséquences de ces modifications sur la nature des fonctions réalisées dans les bioprocédés ainsi que leur stabilité peuvent être importantes, mais sont mal comprises. Une meilleure connaissance de ces phénomènes permettrait de mieux anticiper et maîtriser les variations de fonctionnement des bioprocédés -l'instabilité amenant souvent des dysfonctionnements- et permettrait pourquoi pas d'orienter leur fonctionnement. Cependant, les techniques de biologie moléculaire seules ne fournissent pas les outils nécessaires pour faire ce travail et livrent seulement la description de la composante biotique des bioprocédés.

L'utilisation conjointe de la démarche d'ingénierie écologique et de ses techniques pourrait permettre d'aller plus loin et d'ouvrir des voies pour la manipulation *in situ* des compartiments microbiens afin d'orienter le déroulement des bioprocédés. L'ingénierie écologique est introduite par Odum dès 1962. C'est au sens strict la manipulation *in situ* de systèmes écologiques (de quelques individus à tout un écosystème) dans un contexte écosystémique explicite : prise en compte des interactions avec les autres organismes, communautés et écosystèmes, prise en compte des dimensions physiques et chimiques de la manipulation et du fonctionnement de ces systèmes écologiques. Les objectifs attendus sont divers : maintenir, favoriser ou orienter les processus naturels, et par conséquent les biens et les services qu'ils fournissent aux humains et aux autres espèces. Dans le cas des bioprocédés, une meilleure prise en compte du fonctionnement de l'écosystème microbien permettrait d'affiner la gestion et le contrôle des processus microbiens de dégradation des déchets et de production de biogaz et d'améliorer leur stabilité. L'écologie microbienne pourrait alors passer d'un cadre purement descriptif à un cadre plus prédictif et quantitatif, dans lequel les principes écologiques seraient intégrés et exploités afin de construire des systèmes qui seraient biologiquement optimisés dans un but souhaité. La mise en place de l'ingénierie écologique d'un écosystème passe par la mise en place d'outils permettant de manipuler les communautés fonctionnelles. Pour cela, il importe de caractériser l'action de différents paramètres sur la stabilité et la performance des communautés, ceci dans le but d'évaluer les possibilités d'orienter et de modifier les populations, et donc les fonctions biologiques et écologiques associées, en actionnant différents types de leviers environnementaux. L'accumulation d'outils et leur utilisation combinée permettra d'affiner la gestion des populations microbiennes. A terme, on peut envisager passer d'une gestion des bioprocédés par application de paramètres opératoires à une gestion des bioprocédés par action de leviers environnementaux qui prennent en compte explicitement les remodelages écosystémiques induits.

Un cadre théorique permet d'envisager l'ingénierie écologique des bioprocédés. Il est toutefois nécessaire d'évaluer plus précisément les possibilités offertes par cette démarche. Ce travail a notamment pour but de documenter l'action de différents paramètres environnementaux sur le fonctionnement de bioréacteurs anaérobies de dégradation de la cellulose, un constituant majeur des déchets[1]. Les conséquences écologiques et métaboliques de différentes perturbations ont été étudiées, ainsi que la capacité de l'écosystème microbien à faire face à cette perturbation (résistance) et à revenir à son état initial après la perturbation (résilience). Afin d'établir un lien entre fonction et identité des microorganismes, des techniques de marquage isotopique ont été utilisées en couplage avec la biologie moléculaire (technique stable isotope probing). De cette façon, la dynamique des groupes microbiens fonctionnels suite à l'action de leviers environnementaux a pu être caractérisée.

Ce manuscrit débute par une synthèse bibliographique dont l'objectif est d'introduire les différentes notions clés et éléments de contexte qui ont nourri la réflexion associée au choix et à la délimitation du sujet. Elle présente des données factuelles sur la gestion des bioprocédés, les outils de biologie

[1] Dans les pays développés, entre 40 et 70% des déchets contiennent des matières cellulosiques. La cellulose représente 80% du potentiel de production de biogaz à partir des déchets ménagers.

moléculaire disponibles ainsi que la démarche d'ingénierie écologique afin de mettre en perspective les éléments qui ont guidé la définition et la construction de la problématique et des objectifs expérimentaux de ce travail de doctorat. Ces derniers sont présentés à la suite de cette synthèse. Dans la suite du manuscrit, plusieurs chapitres détaillent les résultats obtenus après application de différents types de leviers environnementaux à des digesteurs de cellulose. A la fois des leviers physico-chimiques et écologiques ont été utilisés. Un chapitre est consacré à l'influence de changements brutaux de la température d'incubation, un deuxième à l'effet d'une préadaptation des flores microbiennes avec des substrats simples avant leur mise en présence de cellulose et un troisième est consacré aux conséquences d'une co-inoculation de biomasses exogènes au sein d'un digesteur de cellulose. Les développements méthodologiques réalisés pour constituer des systèmes expérimentaux adaptés à cette étude sont également présentés. A partir de ces observations, la perspective d'une ingénierie écologique des écosystèmes méthanogènes est ensuite discutée.

– Synthèse bibliographique

Le travail réalisé se situe au carrefour de différents domaines disciplinaires. Des problématiques de société (gestion durable des déchets, production d'énergie renouvelable, etc.) et des disciplines scientifiques diverses (écologie microbienne, ingénierie écologique, biologie moléculaire, etc.) y sont mêlées. Pour mettre en perspective ce travail, cette synthèse présentera tout d'abord les enjeux de la gestion et du traitement des déchets dans un contexte global, mais aussi les questions encore en suspens. Nous verrons ensuite comment les développements récents de la biologie moléculaire fournissent des outils pour aller plus loin dans l'étude et la compréhension des écosystèmes microbiens. Ceux-ci ont notamment permis d'étendre les connaissances sur la microbiologie de la digestion anaérobie et nous en ferons un bilan. Enfin, les dernières parties présenteront l'ingénierie écologique, son adaptation à l'échelle microbienne et les changements qu'elle pourra apporter dans la gestion des écosystèmes microbiens. Ces notions seront illustrées dans le cadre de la gestion des bioprocédés de dégradation des déchets ligno-cellulosiques. Des outils à utiliser ou à développer pour parvenir à un contrôle optimisé des systèmes microbiens seront également présentés.

1. Gestion des déchets et des bioprocédés : problématiques et enjeux

1.1. Les déchets ménagers en France

1.1.1. Production et traitement

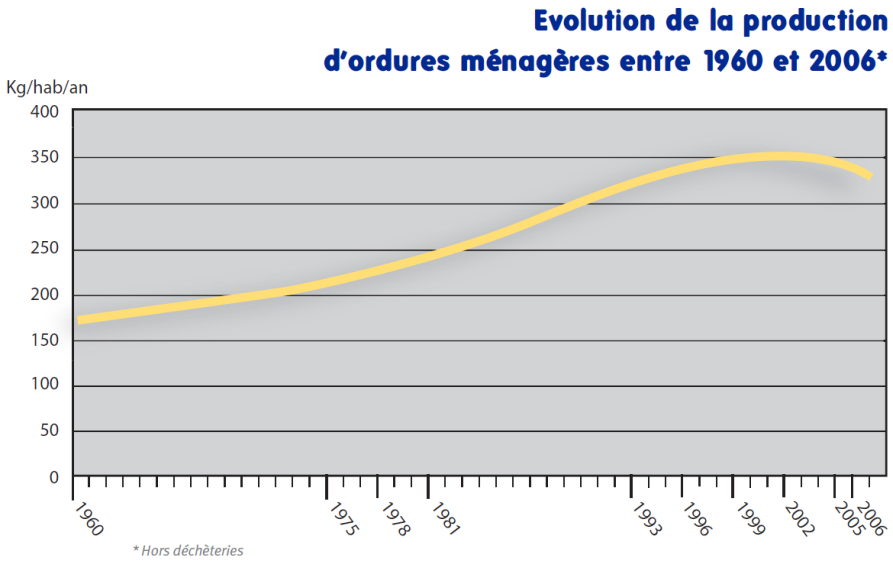


Figure 1 : Progression de la production de déchets en provenance stricte des ménages entre 1960 et 2006. (ADEME 2009, Les déchets en chiffres) (*1*)

Longtemps les hommes ont eu le sens de la rareté, de la limite de leurs ressources par rapport à l'ampleur de leurs besoins. Tout ce qui était disponible devait être utilisé, rien – ou presque – ne pouvait être jeté. Le Moyen-Âge voyant le développement des villes voit également les premières accumulations d'immondices dans les rues, qui conduiront quelques siècles plus tard François 1er à créer à Paris le premier panier à ordure ainsi qu'une taxe de ramassage en 1531. Les paniers à ordure seront rendus

obligatoires par le préfet Poubelle en 1883. Aujourd'hui, même si les rues parisiennes ont été assainies, une définition moderne des déchets issue de la Directive européenne du 5 avril 2006 nous rappelle que l'élimination de « toute substance ou tout objet […] dont son détenteur se défait ou dont il a l'intention ou l'obligation de se défaire » (Directive 2006/12/CE) est toujours au cœur des préoccupations, celles-ci n'ayant cessé de croître, en particulier au cours de la deuxième moitié du XXème siècle. En effet, l'évolution des modes de vie et des habitudes alimentaires conjuguée à la croissance démographique a eu une forte incidence sur la quantité de déchets produits quotidiennement. Bien que l'on constate une stabilisation depuis 2000, **la production des déchets des ménages a plus que doublé en France en 40 ans**. ((*1*), Figure 1). Chaque habitant produit environ un kilogramme de déchets chaque jour.

Les **déchets non dangereux** (DND) (voir encadré ci-après) représentent aujourd'hui un flux très important à gérer, d'environ **50 millions de tonnes annuelles**. Quatre filières principales d'élimination ont été développées en France pour faire face à ce flux : le tri pour recyclage, les traitements biologiques, les traitements thermiques et le stockage. Les centres de tri, au cœur du processus devant aboutir à une meilleure valorisation des déchets recyclables, ont absorbé 15,4% des DND en 2008. Les traitements biologiques, réalisés soit en présence d'oxygène pour le compostage, soit en l'absence d'oxygène pour la méthanisation, ont permis d'éliminer 11,3% des DND. Les traitements thermiques, dont le principal est l'incinération avec excès d'air, ont quant à eux traité 28,8% des DND. Enfin, et malgré le développement concomitant de ces trois techniques, le recours au stockage reste nécessaire pour faire face au flux de déchets. Ainsi, chaque année, 22,2 millions de tonnes, soit **44,5% des DND bruts sont éliminés en centres de stockage de déchets** (CSD).

En particulier, la répartition entre les différents types de traitement pour les déchets collectés par le service public (tous les DND ne sont pas collectés par le service public, certains étant recueillis par apport volontaire) présente la même tendance, avec un recours important au stockage (Figure 2).

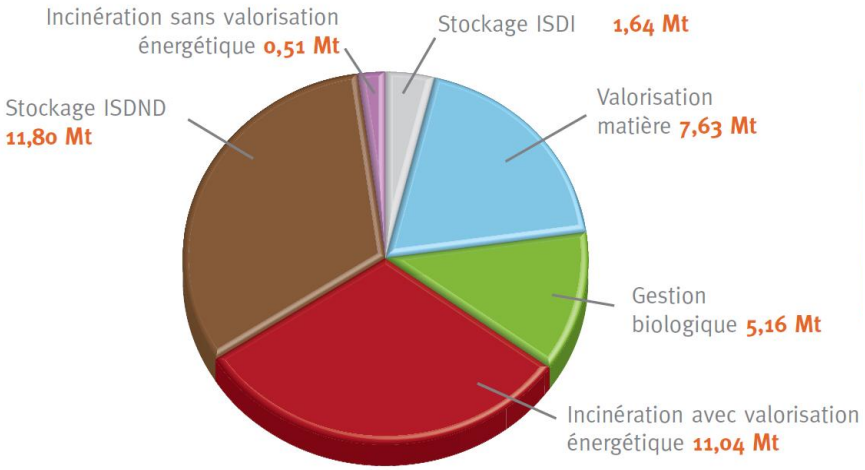


Figure 2 : Modes de traitement des 37,8 millions de tonnes de déchets collectés par le service public. (ADEME, Enquête collecte 2007) (2)

Les centres de stockage sont donc un maillon très important de la gestion globale des déchets, avec 312 sites en activité en France en 2007. La tendance est la même au niveau international où le stockage reste

le mode de gestion privilégié des déchets, notamment parce qu'il est le moins coûteux. — *Rappelons par ailleurs que des filières comme l'incinération ou la valorisation de la matière organique nécessitent, en complément, des stockages pour les résidus qu'elles produisent. Les centres de stockage des déchets représentent donc l'ultime maillon indispensable à toute méthode de traitement* — C'est pourquoi des efforts importants ont été réalisés dans leur aménagement. Les anciennes décharges, peu respectueuses de l'environnement et non contrôlées, ont été remplacées par des installations de stockage des déchets non dangereux (ISDND) soumises à de fortes contraintes réglementaires. Elles permettent une meilleure gestion des risques environnementaux associés.

Déchets Non Dangereux

Les déchets non dangereux sont constitués des ordures ménagères et des déchets provenant des entreprises industrielles, artisans, commerçants, écoles, services publics, hôpitaux, services tertiaires, qui sont collectés **dans les mêmes conditions** que les ordures ménagères (Tableau 1). Cette définition inclue les encombrants en provenance des collectes spécifiques, les déchets verts, les déchets du nettoiement, les boues de station d'épuration et divers matériaux recyclables.

Tableau 1 : La production française de déchets non dangereux.
(source ADEME – IFEN 2009) (*2*)

Déchets des collectivités	Déchets des ménages		Déchets banals des entreprises	
14Mt	31Mt		84Mt	
Déchets du nettoiement (4Mt) Déchets issus de l'assainissement collectif (9Mt) Déchets verts des collectivités (1Mt)	Encombrants et déchets verts des ménages (11Mt)	Ordures ménagères (sens strict) (20Mt)	Déchets collectés avec les ordures ménagères (5Mt)	Déchets traités en collectes privées (79Mt)

Déchets non dangereux **50 Mt**

1.1.2. Vers une optimisation nécessaire des systèmes d'élimination des déchets

Malgré un meilleur contrôle du devenir des déchets et le développement du tri sélectif, il reste difficile de faire face à une production toujours très importante. **Les exutoires actuels s'épuisent ou sont saturés**. L'ouverture de nouveaux sites conventionnels (incinérateurs ou ISDND) n'est pas aisée du fait

des impacts environnementaux et des problèmes d'acceptabilité sociétale (forte opposition des NIMBY[2]). Il faut donc essayer de résoudre le problème autrement qu'en multipliant les structures existantes. Aucune solution de remplacement n'étant pour le moment économiquement envisageable pour éliminer les déchets, on cherche plutôt à optimiser les techniques déjà utilisées.

Ceci passe notamment par l'accélération des processus de dégradation au sein des ISDND. Celles-ci peuvent être considérées comme des **réacteurs complexes** formés par les différentes couches de déchets en cours de dégradation, et animés de flux de liquides et de gaz appelés le lixiviat (liquide résiduel provenant de la percolation de l'eau à travers les déchets) et le biogaz (effluent gazeux constitué majoritairement de CO_2 et CH_4) (Figure 3). Une nouvelle approche de la conception et de la gestion de ces réacteurs est en marche depuis une vingtaine d'années dans différents pays (Etats-Unis, Angleterre, Australie, Chine…) (*3-4*). Il s'agit du concept de **« bioréacteur » ou stockage bioactif**, visant d'une part à considérer les déchets comme une ressource énergétique capable de se substituer à des énergies fossiles (la dégradation naturelle des déchets produit du biogaz considéré comme une source d'énergie renouvelable dans la Directive 2001/77/CE du 27 septembre 2001) et d'autre part à essayer de mieux maîtriser les processus microbiologiques d'évolution des déchets biodégradables dans une installation de stockage.

Figure 3 : Schéma d'une installation de stockage de déchets non dangereux.
Adapté de http://www.wm.com/WM/environmental/Bioreactor/bioreactorbrochure.pdf.

En effet, ces processus de dégradation conditionnent l'évolution des massifs de stockage de déchets dans le temps. L'efficacité de la dégradation a ainsi une influence directe sur les vitesses de tassement et de stabilisation des déchets. Elle conditionne également la vitesse d'élimination de la charge polluante. Son optimisation permettra donc de réduire les impacts environnementaux des filières de traitement par enfouissement, et aussi de faciliter la gestion des ISDND en permettant d'envisager une réduction des **durées de post-exploitation**[3]. Les systèmes (d'étanchéité ou de drainage par exemple) pourront n'être sollicités que pendant la période où leur efficacité est optimale (*5*). L'espace libéré par les déchets

2 L'acronyme NIMBY (Not In My Back Yard) s'applique à une association ou une mobilisation qui s'élève contre un projet d'infrastructure, ou contre une infrastructure existante dégradant la qualité de vie d'un quartier, sans nier l'utilité intrinsèque de celle-ci, mais en contestant son implantation et les troubles qu'elle crée ou créera dans le voisinage.

3 Une ISDND continue d'évoluer bien après qu'on ait arrêté d'y apporter des déchets. Elle doit faire l'objet d'un suivi rigoureux (contrôle de la qualité et quantité du lixiviat et biogaz produits, contrôle de l'étanchéité du système, vérification de l'absence de pollution aux abords du site, etc.). Ce suivi, réalisé par l'exploitant, permet de s'assurer que l'évolution de l'installation est correcte et n'a pas d'impact sur l'environnement. Il a pour nom post-exploitation.

dégradés (vide de fouille) pourra également être utilisé pour apporter d'autres déchets sans devoir faire appel à une autre installation.

Traditionnellement, le concept de bioréacteur implique une valorisation des biogaz produits ainsi qu'une recirculation des lixiviats au sein des ISDND afin d'obtenir une teneur en eau la plus homogène possible au sein du massif des déchets pour augmenter l'efficacité de la biodégradation[4].

Une autre voie de traitement tend également à se développer, il s'agit de la **méthanisation « hors-sol »** des déchets. Elle consiste en une dégradation biologique contrôlée des déchets dans des réacteurs hors-sol en conditions anaérobies. Elle permet d'obtenir en fin de traitement un digestat stabilisé dont la charge polluante a été minimisée, tout en produisant du biogaz, énergie renouvelable. Ce digestat, de volume moindre que les déchets de départ, peut alors être enfoui ou encore faire l'objet d'un retour au sol après compostage. La méthanisation hors-sol constitue en ce sens une filière de prétraitement des déchets, qui permet de réduire la quantité de déchets biodégradables placés en centre de stockage afin de satisfaire aux exigences imposées par la législation européenne tout en valorisant les déchets sous forme de biogaz. Cette technique s'applique à la dégradation de la plupart des déchets organiques. Elle est encore assez peu développée en France pour le traitement des DND mais l'est beaucoup plus pour le traitement des boues d'épurations, des effluents d'élevage, des résidus de l'industrie agroalimentaire… Pour pouvoir l'appliquer plus facilement aux DND, et gagner en efficacité, des optimisations sont nécessaires.

Je me suis intéressé au cours de ce travail de thèse aux processus biologiques qui se déroulent dans ces deux filières en utilisant des systèmes expérimentaux modèles.

1.1.3. Des perspectives énergétiques fortes

A l'heure où l'on cherche de plus en plus à faire du déchet une ressource, les potentialités énergétiques des déchets doivent être prises en compte autant que possible, notamment la valorisation du biogaz issu de la biodégradation des déchets. La prise de conscience du fait que le biogaz recueilli en sortie des procédés de biodégradation des déchets doit être collecté et ne peut pas être rejeté dans le milieu naturel sans traitement a été rapide. En effet, outre le fait qu'il peut être responsable de nuisances olfactives importantes, le biogaz est constitué en grande partie de dioxyde de carbone et de méthane, **gaz à effet de serre**. La solution retenue pour la plupart du biogaz produit en ISDND était donc une destruction en torchère. Face à l'enjeu énergétique important de la production de méthane, d'autres solutions sont cependant préférées aujourd'hui, à l'image de celles utilisées pour valoriser le biogaz issu de la méthanisation hors-sol.

En effet, le **méthane**, constituant important du biogaz, peut être **valorisé énergétiquement** de différentes manières (production d'électricité après combustion dans un moteur thermique ou dans des turbines à gaz, production de chaleur après combustion dans une chaudière, etc.). Cependant, pour que la valorisation soit économiquement et techniquement possible, il faut obtenir des quantités régulières et suffisantes de gaz. Cela est difficile dans les ISDND conventionnelles où les productions sont assez faibles et très étalées dans le temps, et où une grande partie du gaz est brûlée en torchères (Figure 4).

4 On parle également de bioréacteur aérobie dans le cas d'aération *in situ*.

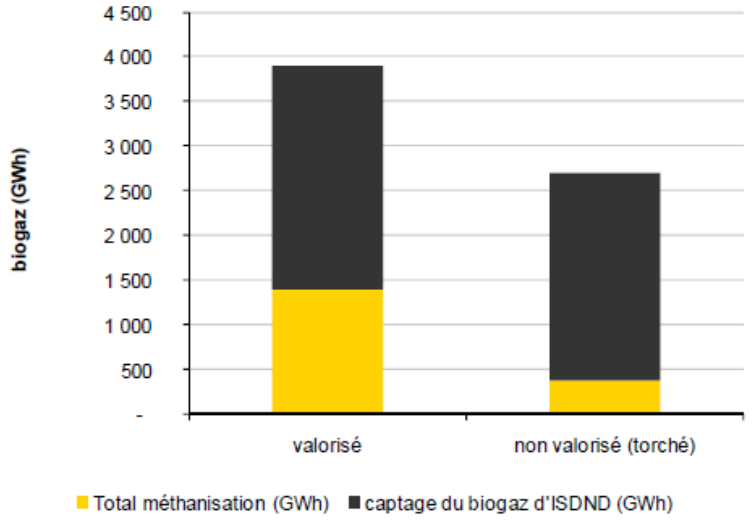


Figure 4 : Quantités de biogaz valorisées et torchées en 2008 par les unités de méthanisation et les ISDND. (Source enquête Ernst & Young 2009 et Sinoe)

Dans un contexte de promotion des énergies renouvelables sans effet de serre, il paraît donc indispensable de trouver des solutions pour permettre la valorisation du biogaz de décharge. Même si celle-ci est encore assez anecdotique dans le paysage français, l'enjeu énergétique est très important. Le biogaz constitue une **source d'énergie renouvelable** pour la production d'électricité au niveau national. Avec une production brute estimée à environ 3682 tonnes équivalent-pétrole d'ici 2020 (*6*), le biogaz devient une ressource énergétique incontournable. De nombreux secteurs y contribuent (Figure 5). Les politiques énergétiques engagées — notamment l'augmentation des prix de rachat de l'électricité produite à partir de biogaz ainsi que l'engagement des états membres de l'Europe à produire 20 % de l'énergie à partir d'énergies renouvelables d'ici 2020 dont 10% dans les transports («Paquet Energie Climat», décembre 2008) — devraient également inciter au développement de la méthanisation, dans l'ensemble des secteurs concernés.

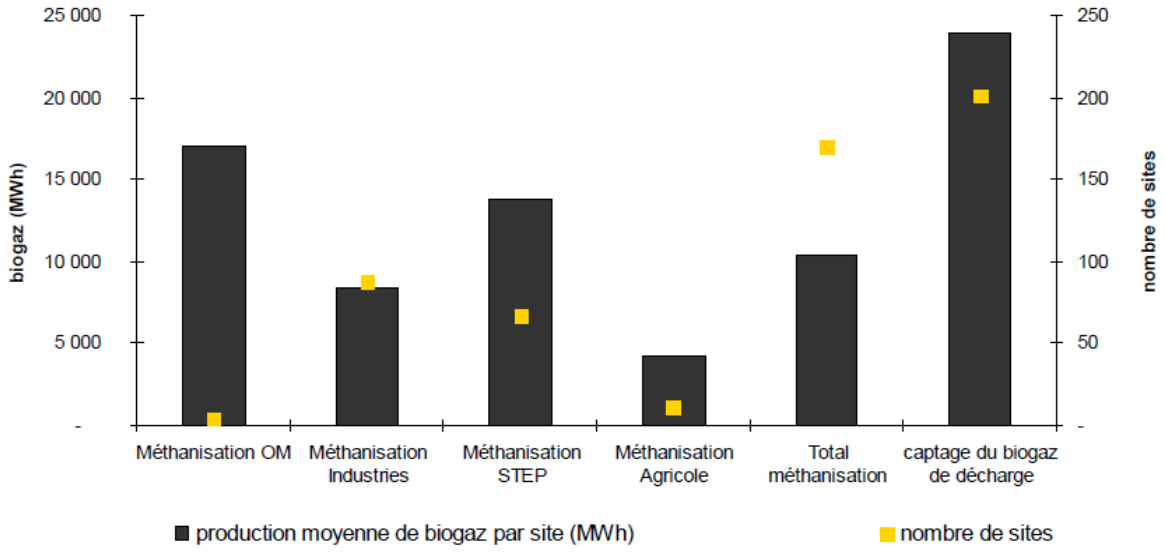


Figure 5 : Production moyenne de biogaz et nombre de site de production en France, par secteur. (Source enquête Ernst & Young 2009)

1.2. Composition des déchets non dangereux : la cellulose, une molécule clé

On trouve une très grande variété de matériaux dans les déchets ménagers, ce qui en fait un milieu à la fois hétérogène et complexe. Leur composition est variable selon le pays, le site, la période de l'année ou encore le type d'habitat. Des campagnes nationales de caractérisation sont réalisées régulièrement ; elles prennent en compte l'hétérogénéité et la variabilité de la composition des déchets ainsi que son caractère évolutif. Ainsi la procédure MODECOM™ a été développée par l'ADEME en 1993 (Ademe, 1993 (*7*)) pour obtenir une évaluation moyenne de la composition des déchets. Les résultats de la dernière enquête, publiée en 2009, font référence à l'année 2007. Les grandes catégories identifiées sont les déchets putrescibles (32,1 %), les papiers-cartons (21,5 %), le verre (12,7 %), les plastiques (11,2 %), les textiles (10,6 %, dont les textiles sanitaires), les métaux (3 %) et divers matériaux composites ou non classés (8,9 %) (Figure 6).

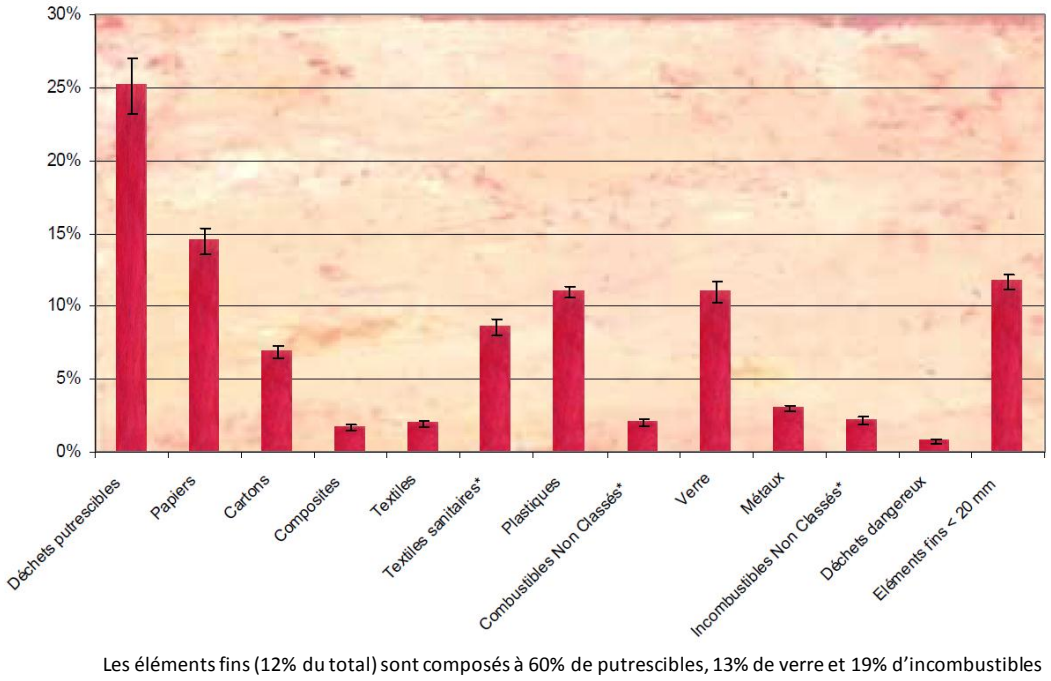


Figure 6 : Composition moyenne nationale des ordures ménagères.
(Ademe 2009 (*1*))

Retrouvés dans plusieurs de ces catégories, mais également dans les autres types de déchets traités par le service public, la cellulose et ses dérivés jouent un rôle clé dans la filière de traitement des déchets non dangereux. Du fait de la complexité de leur dégradation il est essentiel d'en comprendre les mécanismes :

- La cellulose et ses dérivés sont présents en quantités très importantes dans les déchets, sous des formes très diverses. La fraction papier-carton des ordures ménagères représente ainsi à elle seule 21,5 % des volumes d'ordures ménagères traités. S'y ajoutent les déchets putrescibles, les déchets issus de l'assainissement et du nettoiement, les déchets verts, etc. Au total, plus de **deux**

tiers (en masse) des déchets amenés en centre de stockage contiennent de la cellulose ou un de ses dérivés.

- Près de **80 %** du potentiel d'émission de biogaz d'un déchet ménager de composition moyenne est dû à la cellulose et à ses dérivés (*8*). Ces matériaux ont donc une influence très grande sur les cinétiques de méthanisation et sur la production de biogaz. Ce sont eux qui gouvernent l'avancée des processus de dégradation au sein des centres de stockage.
- Par ailleurs, c'est la dégradation de la part ligno-cellulosique des déchets qui limite cinétiquement les processus de stabilisation. Le taux de dégradation de cette fraction constitue donc un bon indicateur de l'évolution d'un massif de déchets ménagers. **Il permet d'avoir une idée précise de l'avancée des processus**.

A travers ces quelques points, il apparaît que **la cellulose et ses dérivés sont des composés incontournables** lorsqu'il est question de processus de dégradation ou de méthanisation. La compréhension des mécanismes impliqués à ce niveau est primordiale pour optimiser les bioprocédés, en particulier la dégradation des déchets en centre de stockage ou en cellule de méthanisation. Enfin, rappelons que la cellulose est l'un des principaux polysaccharides constitutifs des végétaux. C'est le biopolymère le plus abondant de la biosphère et il correspond à une fraction importante de la matière organique synthétisée chaque année par des processus photosynthétiques. L'énergie produite à partir des matières cellulosiques est donc renouvelable puisque ces composés sont produits par photosynthèse (*9*).

Pour ces différentes raisons, j'ai choisi de centrer le travail de la thèse sur la dégradation de la cellulose, de certains dérivés plus complexes (foin) et de certains sous-produits de sa dégradation (glucose, acide acétique, acide propionique, acide butyrique, cellobiose, etc.). La réflexion autour de ces substrats clés nous permettra de simplifier les dispositifs expérimentaux tout en étant bien représentatif des situations réelles.

1.3. La dégradation des déchets : des bioprocédés et des microorganismes en action

1.3.1. Bioprocédés

Si l'on se réfère à la définition la plus largement admise dans le domaine des biotechnologies, les bioprocédés recouvrent toutes les mises en œuvre de systèmes vivants, de leurs cellules ou de leurs constituants, dans le but de produire des biens ou des services. En particulier un bioprocédé peut utiliser la capacité d'organismes vivants à réaliser une transformation physique ou chimique d'un produit. Les exemples de bioprocédés sont nombreux : agroalimentaires par exemple utilisant des ferments lactiques (*Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus*) pour la fabrication de produits laitiers (yaourts, etc.) ou encore bioprocédés énergétiques comme la fabrication de bioéthanol par fermentation avec des levures du genre *Saccharomyces*, etc.

Dans ce vaste ensemble, on peut distinguer une catégorie particulière de bioprocédés dont le but serait d'éliminer, de purifier, de valoriser ou encore de réutiliser des résidus de l'activité humaine contenant de la matière organique dégradable, en maîtrisant les risques sanitaires, industriels et environnementaux associés. Les bioprocédés de traitement des eaux usées, ou le compostage des déchets verts peuvent être cités comme exemples. Nous allons voir pourquoi les processus de dégradation des DND en ISDND ou en cellules de méthanisation peuvent être considérés comme deux autres exemples de ce type de bioprocédés.

1.3.2. Le devenir des déchets ménagers…

1.3.2.1. … en centre de stockage

Au moment de leur enfouissement les DND contiennent environ **54 %** de matière organique biodégradable (*10*). Des processus biologiques de dégradation vont donc avoir lieu. Ils sont réalisés par des microorganismes qui convertissent les matières biodégradables en composés gazeux, le **biogaz**, ou dissous dans la phase liquide, le **lixiviat**.

Deux phases principales peuvent être mises en évidence. Une première étape de dégradation a lieu en présence d'oxygène. C'est la dégradation aérobie, réalisée par des microbes aérobies. Cette étape est relativement courte (généralement quelques semaines). En effet, seules les couches supérieures de déchets (jusqu'à 2 mètres de profondeur) qui viennent juste d'être entreposées ont une teneur en oxygène suffisante pour le déroulement de cette première phase. Lorsque tout l'oxygène disponible a été consommé, il y a développement d'une population de **microorganismes anaérobies** qui vont poursuivre la transformation et la dégradation des déchets. Cette dégradation est beaucoup plus longue, de l'ordre de plusieurs décennies. C'est sur cette seconde étape qu'il faut concentrer les efforts pour l'optimiser et la raccourcir.

Au cours de ces processus, la dégradation par les microorganismes entraînera la conversion et l'élimination d'une grande partie de la matière organique contenue dans les déchets sous forme de méthane valorisable.

1.3.2.2. … en méthaniseur

Le devenir des déchets en cellules de méthanisation est voisin de celui observé en centre de stockage. Il s'agit d'une transformation des déchets par des microorganismes anaérobies, mais dont la durée est beaucoup plus courte, du fait d'une échelle plus petite des installations, du contrôle plus aisé des paramètres opératoires du procédé, et d'une meilleure homogénéisation des systèmes. Après ce traitement, les déchets étant stabilisés, ils peuvent être enfouis. Ils n'évolueront alors que très peu.

Cependant, dans ces deux bioprocédés, les processus et mécanismes mis en jeu sont mal connus. Ils impliquent une **succession de microorganismes très variés** et agissant en forte interaction dans des milieux très complexes. L'identification de ces microorganismes, l'ordre de leur succession et leur fonction dans la dégradation des déchets n'étaient jusqu'à présent pas clairs, notamment en raison de limitations méthodologiques.

1.4. Contrôle et connaissance des bioprocédés : une gestion à l'échelle macroscopique, sous forme de boîte noire

Longtemps l'ingénierie des bioprocédés d'épuration a dû se contenter d'expérimenter ou d'optimiser les techniques sans avoir accès à la compréhension du compartiment microbien. Son travail consistait à ajuster les paramètres de contrôle, les flux entrants, le dimensionnement des installations, et à en observer les conséquences sur les flux sortants. Le bioprocédé était une sorte de **boîte noire** dont on étudiait la réaction face à des changements de conditions « expérimentales » ou « environnementales ». Les conséquences des modifications de ces conditions pouvaient essentiellement être observées au travers du bilan opérationnel du procédé, sans pouvoir faire le lien avec les modifications du « fonctionnement interne » de cette boîte noire, faute de pouvoir comprendre les mécanismes chimiques et biologiques internes au procédé. Le rôle précis des microorganismes et les effets des modifications de paramètres sur leur fonctionnement n'étaient en effet pas accessibles faute de moyens techniques suffisants.

Etant donné ces inconnues, les premiers développements et optimisations des bioprocédés ont eu lieu, par tâtonnement, en modifiant des paramètres et en observant les conséquences sur le travail du bioprocédé. Cependant, Horton soulignait en 1981 que les dysfonctionnements de digesteurs anaérobies étaient importants et le plus souvent dus à des erreurs de conception résultant d'une mauvaise connaissance des paramètres primordiaux pour la bonne marche d'un bioprocédé (*11*). Quelques années plus tard, en 1989, Moletta rapportait que les bioprocédés n'étaient pas encore bien maîtrisés, même si des travaux sur la digestion anaérobie réalisés depuis une quinzaine d'années avaient permis d'identifier la nature des paramètres à contrôler pour surveiller l'écosystème ainsi que les plages de valeurs à respecter pour que le processus fonctionne bien (*12*). Les paramètres pris en compte étaient alors classés en deux types : ceux qui vérifiaient que les conditions imposées de fonctionnement étaient bien réalisées (comme les débits de liquide, la température, la concentration en demande chimique en oxygène (DCO) de l'alimentation, la teneur en matières en suspension de l'effluent d'alimentation) et ceux qui permettaient de surveiller l'état d'équilibre de l'écosystème microbien (le pH, la teneur en H_2 dans les gaz, la concentration en acides gras volatiles, etc.). La solution de gestion préconisée, lorsqu'un procédé avait été choisi et des conditions de fonctionnement établies, était alors de contrôler « assez souvent les valeurs des différents paramètres pour s'assurer qu'ils restaient dans une gamme de valeurs acceptables afin de ne pas modifier les réponses cinétiques de l'écosystème microbien et maintenir un système stable » (*12*). Malgré tout, Moletta précisait que la méconnaissance des processus de digestion anaérobie avait conduit à des incidents de fonctionnement qui avaient induit une méfiance vis-à-vis du processus et même une résistance à son implantation.

Même si ces premiers tâtonnements empiriques ont permis d'établir de grandes règles sur la conduite des bioprocédés, celles-ci ne sont pas suffisantes pour rentrer plus en détail dans le contrôle des bioprocédés ou pour comprendre les conséquences diverses auxquelles peut aboutir une même modification de paramètre. Par exemple, Taconi (*13*) et Brummeler (*14*) rapportent des pH optimaux de dégradation des acides gras volatils différents et des rendements de conversion en biogaz différents. Les travaux d'optimisation n'en sont donc qu'à leur début.

Les premières tentatives de gestion des bioprocédés ouvrent la voie à l'ingénierie écologique, mais sans comprendre les conséquences exactes des paramètres opératoires sur les acteurs clés des bioprocédés : les microorganismes. Pour pouvoir proposer des solutions optimisées de valorisation et de traitement des déchets, il est nécessaire de pénétrer au cœur de la « boîte noire ». Des communautés microbiennes mal connues y jouent un **rôle essentiel**. Il faut mieux les caractériser. La compréhension de leur mode d'action permettra d'optimiser leurs compétences, et d'améliorer l'ensemble des processus de biodégradation.

1.5. Vers la connaissance des acteurs des bioprocédés : les microorganismes

1.5.1. Une première acquisition de connaissances partielle et biaisée

La découverte, à la fin du XIXème siècle, de la possibilité de cultiver en laboratoire des souches pures de microorganismes a permis à la biologie microbienne de se développer très rapidement. Malgré cela, les recherches sur les microorganismes des écosystèmes de l'environnement ont évolué plus lentement. En effet, les premières tentatives en microbiologie de l'environnement s'appuyaient sur les techniques culturales classiques, donc reposant sur l'isolement de cultures pures, qui avaient fait leurs preuves dans d'autres domaines. L'étude des écosystèmes microbiens complexes se limitait donc à la seule étude de la fraction cultivable des microorganismes. Or, nous savons désormais que seule une très faible fraction des microorganismes de l'environnement (y compris ceux impliqués dans les bioprocédés de dégradation des déchets) est cultivée (0,1 à 10%, (*15*)). Cette fraction est non seulement de faible importance, mais est également peu représentative de la diversité microbienne (*16*). En effet, certaines familles de microorganismes ne comportent qu'une faible quantité de cultivés. Cette contrainte méthodologique a longtemps freiné les avancées dans l'étude des communautés microbiennes complexes présentes dans l'environnement.

Watson-Craik et Jones (*17*) firent en 1995 un état des lieux des différents systèmes d'études et d'observation des écosystèmes microbiens complexes des installations de stockage de déchets : systèmes « batch » dans des flacons à sérum, systèmes « continus » mis en place dans des colonnes de déchets ou encore modèles plus simples avec un substrat unique. Malgré le développement de ces systèmes de laboratoire reproductibles, faciles à contrôler et performants, les auteurs signalaient qu'on ne savait que peu de chose sur le métabolisme, la nature ou même la provenance des microorganismes anaérobies responsables de la dégradation des déchets. Les résultats disponibles reposaient sur des isolements en monoculture, mais n'impliquaient pas par exemple que les microorganismes présents dans les centres de stockage fussent actifs dans la dégradation. Afin d'aller plus loin dans la compréhension et l'étude de ces systèmes, des travaux sur des observations morphologiques d'échantillons complexes avaient été réalisés, notamment pour identifier l'effet de changements de paramètres sur la répartition des différentes communautés de microorganismes. Watson-Craik et Jones faisaient alors référence à 35 types de cellules identifiées de cette façon, donc morphologiquement différentes. Ce chiffre, qui nous paraît très faible à l'échelle des connaissances actuelles sur la diversité microbienne, souligne à quel point les avancées dans la connaissance des microorganismes se sont faites

pas à pas, d'autant plus que l'identification morphologique d'un microorganisme ne préjuge en rien de sa fonction dans le système.

Cette limitation de la connaissance de notre biosphère n'est plus de mise depuis quelques années. En effet, la biologie moléculaire avec notamment l'approche ARN a fait voler en éclat les barrières méthodologiques associées aux méthodes basées sur la culture, ouvrant la voie à la description du contenu microbien de la «boîte noire».

1.5.2. L'arrivée des techniques moléculaires

L'écologie microbienne prend une nouvelle dimension à partir du début des années 90 avec l'arrivée des techniques moléculaires s'appuyant sur les séquences d'ARN ribosomaux. Ainsi, depuis une vingtaine d'années, de nouvelles techniques ont été développées, en regroupant différents outils moléculaires afin d'étudier la diversité et l'écologie des populations microbiennes sans passer par l'intermédiaire de l'isolement en boîtes de pétri. Toutes ces techniques, fondées sur l'identification génétique des microorganismes composant le milieu, reposent en grande partie sur les propriétés de la molécule d'ARN ribosomique et permettent d'analyser des échantillons complexes et naturels directement. L'ARN ribosomique est une molécule très conservée chez tous les organismes, et sa séquence fournit une carte d'identité moléculaire permettant d'identifier des microorganismes. Cette découverte a considérablement étendu notre vision de la diversité microbienne dans la quasi-totalité des écosystèmes et permet d'élargir considérablement le champ des possibilités d'étude dans un environnement complexe comme nous le verrons dans la partie 2.

Ces développements ouvrent donc la voie à une meilleure connaissance des microorganismes, acteurs clés de la dégradation. On peut identifier et caractériser génétiquement l'ensemble des groupes d'individus présents dans un échantillon. Il devient alors possible dans le cas d'un bioprocédé d'associer les processus physico-chimiques observés (variation de pH, production de gaz…) à la présence d'un groupe de microorganismes.

1.5.3. Intégration de la composante microbienne dans l'étude des bioprocédés

Après une première phase d'appropriation des outils par la communauté scientifique, des travaux de caractérisation des écosystèmes microbiens non cultivables ont pu être réalisés. Ces travaux se sont surtout placés dans une perspective « naturaliste » d'observation et de description. Ils ont conduit à un foisonnement d'informations nouvelles qui ont pu paraître contradictoires entre elles (*18-19*). — « There is an epoch in the growth of a science during which facts accumulate faster than theories can accommodate them » Sir Peter Medawar, 1982. Aujourd'hui, on commence à prendre du recul par rapport à cette phase d'acquisition de connaissances. Des **théories écologiques spécifiques aux communautés microbiennes** complexes se développent et permettent de mieux appréhender les données de l'écologie microbienne moléculaire (*20*). Ces concepts renouvellent notre compréhension de ces systèmes et permettent de réinterpréter les résultats obtenus sous un angle nouveau. On progresse de plus en plus rapidement.

Parallèlement à ce travail de description et de conceptualisation, il est désormais temps de mettre en mouvement ces connaissances dans un objectif de **recherche appliquée** (*21-22*). Les perspectives ouvertes sont très larges, mais également très ambitieuses. Voyons comment les techniques de biologie moléculaire donnent aujourd'hui accès à ces données nouvelles et à une meilleure connaissance des acteurs clés de la biodégradation : les microorganismes.

2. La biologie moléculaire au service de la description des bioprocédés

2.1. Comment décrire et étudier un écosystème microbien complexe ?

2.1.1. De la nécessité d'étudier les systèmes dans leur ensemble

Pendant longtemps les travaux sur la biosphère n'ont en général pas pris en compte les microorganismes mais uniquement les organismes de grandes tailles. Parmi eux les insectes comptaient le plus d'espèces différentes, avec un nombre total grossièrement estimé. Cependant, en se penchant d'un peu plus près sur un de ces insectes, on s'aperçoit qu'il contient des centaines de milliers d'espèces de microorganismes distinctes (*18*). De même, une poignée de sol contient des milliards de microorganismes de types tellement variés que leur nombre total n'est absolument pas connu. Les microorganismes interviennent dans des organisations complexes, au sein de chaînes trophiques, en interactions, syntrophie ou concurrence, de manière interdépendante ou compétitive, et sont indispensables au fonctionnement global des écosystèmes macroscopiques. Pour comprendre le fonctionnement de la biosphère, il est important, voire essentiel, d'entreprendre une démarche globale de connaissance de ces microorganismes. (*23*). Bien sûr, malgré les possibilités de séquençage massif, un catalogue complet de toutes les espèces serait très fastidieux et pas forcément utile, mais des études représentatives sont nécessaires. Cependant, on ne peut pas se contenter d'étudier quelques microorganismes pris au hasard, il faut tenir compte de la diversité dans laquelle ils s'insèrent, diversité qui est nécessaire pour le bon fonctionnement de l'écosystème. Ceci impose de trouver des moyens d'étudier de manière étendue les acteurs d'un écosystème microbien et impose également de considérer les phénomènes biogéochimiques qui se déroulent au sein d'un écosystème de manière globale et intégrée. Pour y parvenir des techniques spécifiques ont été développées au cours des dernières années. Elles font appel pour les procaryotes à l'ARN ribosomique 16S.

2.1.2. Le 16S, un marqueur moléculaire universel

L'accumulation de mutations au sein des génomes constitue une information cruciale dans l'histoire des espèces et un bon indicateur de l'évolution d'une espèce par rapport aux autres. En effet, plus les espèces ont évolué les unes par rapport aux autres, plus le nombre de mutations est important. On peut ainsi imaginer comparer entre elles des régions homologues du génome de différentes espèces afin de mesurer leurs différences dans le but de reconstruire leur phylogénie par parenté génétique.

Dans cette idée, Woese *et al.* se sont intéressés à la fin des années 1970 à la petite sous-unité de l'ARNr 16S (ARN ribosomaux 16S) chez les procaryotes (*24*). Cet élément constitutif du ribosome est depuis devenu la clé de voûte de l'étude des écosystèmes microbiens. L'idée brillante de Woese *et al.* a été d'utiliser l'ARNr 16S comme un outil de classification taxonomique pour les procaryotes (Figure 7).

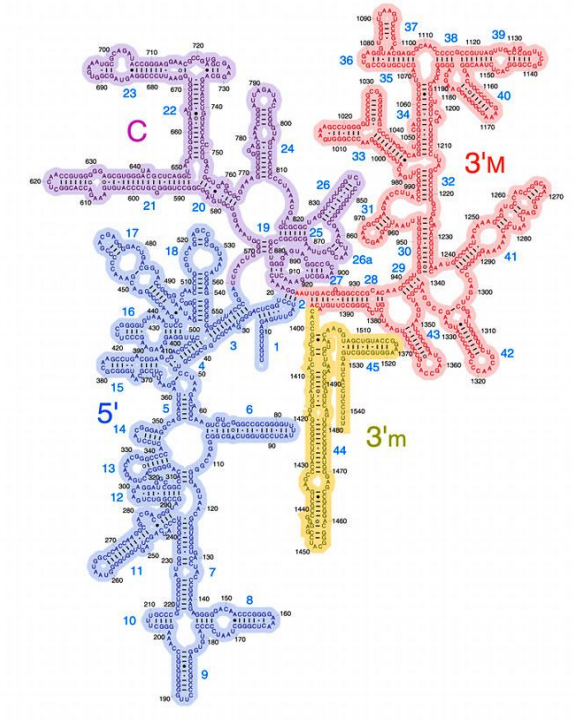


Figure 7 : Structure secondaire d'une molécule d'ARN 16S.
(d'après bioinfo.uqam.ca)

Voyons quelles sont les raisons du succès de cette méthode. Elles reposent sur les caractéristiques de la molécule d'ARNr 16S en regard de l'évolution des espèces. Voici une liste non exhaustive de ses principaux avantages :

- La molécule d'ARN ribosomique est présente de façon universelle chez les microorganismes et sa fonction est hautement conservée
- De plus elle est présente en grande abondance dans les cellules
- On peut facilement la séquencer, elle est de longueur suffisante et ses séquences sont facilement comparables
- Certaines zones de la molécule sont hautement conservées et d'autres au contraire très variables

Cette dernière caractéristique permet une identification précise des séquences et constitue une véritable **carte d'identité ou signature moléculaire** d'un groupe bactérien donné (*24*). Grâce à cet outil, Woese a démontré en 1987, sur la base de séquences d'ADN codant pour l'ARN 16S, que les êtres vivants étaient divisés en trois grands domaines (*Eubacteria*, *Archaea*, *Eukarya*, voir Figure 8) en abandonnant ainsi la dichotomie classique du monde vivant entre Procaryotes et Eucaryotes.

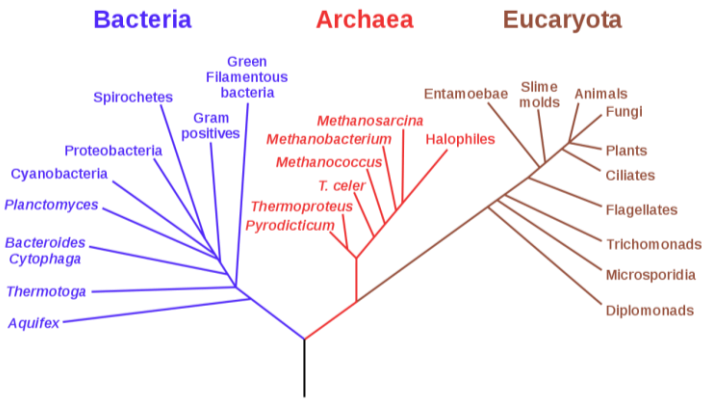


Figure 8 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse comparative des gènes ARNr.
Cet arbre montre la séparation des bactéries, des archées et des eucaryotes (d'après bioinfo.uqam.ca).

Par l'intermédiaire de l'ARNr 16S, la biologie moléculaire donne accès à de l'information sur les microorganismes sans devoir recourir à des techniques d'isolement et de culture. Ceci élargit considérablement les possibilités d'études et ouvre la voie à une meilleure compréhension et connaissance des microorganismes. On peut désormais identifier génétiquement et caractériser tous les groupes d'individus présents dans un échantillon. Il est donc possible d'associer un processus physicochimique observé et la présence de microorganismes, permettant une première étape dans la construction du lien entre identité et fonction. Voyons quelques-unes des techniques développées autour de cette approche.

2.2. Observation des écosystèmes microbiens, des communautés aux individus

Différents types de techniques ont été développés autour de l'approche 16S, permettant d'accéder à différents niveaux d'information sur les communautés microbiennes complexes. Certaines permettent une approche globale de l'écosystème, donnant des informations sur les dynamiques d'évolution et de modification de la diversité des microorganismes. D'autres permettent d'identifier précisément les microorganismes présents dans le système étudié ou encore d'aller observer directement des microorganismes d'intérêt.

2.2.1. Evolution des communautés et dynamiques de population

Les écosystèmes microbiens complexes sont constitués d'une diversité importante d'individus interdépendants interagissant entre eux. Il est important d'étudier les microorganismes de ces systèmes d'une manière globale, en particulier leur dynamique au cours du temps. Dans ce but, plusieurs techniques permettant de suivre l'évolution générale de communautés de microorganismes ont été mises au point. On les regroupe sous le nom de techniques d'empreinte génétique ou moléculaire (fingerprinting en anglais).

Ces méthodes sont généralement basées sur la migration différentielle par électrophorèse, sur gel ou en capillaire, de fragments d'ADNr préalablement amplifiés par PCR. La variabilité due aux différents membres de la communauté microbienne permet de différencier ces espèces moléculaires soit par la

taille, soit par la séquence du fragment amplifié. On obtient ainsi un profil de la communauté, ou empreinte génétique, sorte de code-barres caractérisant la diversité d'un échantillon à un moment donné. Ces codes barres pourront être comparés afin d'évaluer la dynamique de la diversité microbienne au sein d'un écosystème microbien, ou la diversité d'un échantillon par rapport à un autre.

Voici une liste d'exemples non exhaustive de techniques de fingerprinting :

- L'**ARDRA** (amplified ribosomal DNA restriction analysis) également appelée **RFLP** (restriction fragment length polymorphism) est basée sur la variabilité de la taille des fragments d'ADNr générés par une enzyme de restriction (*25-26*). Après amplification de l'ADN des gènes 16S d'un échantillon microbien complexe, une digestion enzymatique est réalisée par une ou plusieurs enzymes de restriction, choisies pour leur fréquence de coupure. Les fragments obtenus peuvent être analysés par électrophorèse sur gel ou capillaire, donnant ainsi l'empreinte de la communauté. Un inconvénient important de cette technique est qu'elle génère plusieurs fragments d'ADN par espèce, rendant le profil très complexe dès lors que le nombre d'espèces dans l'échantillon est important. Afin de rendre la méthode plus sensible et les profils plus lisibles, des développements de cette technique ont été réalisés pour développer la **T-RFLP** (terminal restriction fragment length polymorphism). Dans ce cas, la taille des fragments d'ADN est mesurée à l'aide d'un séquenceur automatique afin d'augmenter la résolution. Par ailleurs les fragments d'ADN utilisés sont issus d'une amplification par PCR utilisant des amorces munies de marqueurs fluorescents (*27-28*). Les coupures réalisées par les enzymes de restriction libèrent des fragments de taille variable, dont seuls les fragments terminaux sont détectés par le séquenceur. Le polymorphisme est alors basé uniquement sur ces fragments terminaux.

- Dans le cas de l'**ARISA** (automated ribosomal intergenic spacer analysis), la taille de l'**espace intergénique** (ITS=intergenic transcribed spacer) présent entre les gènes codant pour l'ARNr 16S et l'ARNr 23S est observée. Cette région présente une hétérogénéité très élevée en termes de taille et de composition en bases nucléotidiques. Après amplification PCR de cette zone, les amplicons sont séparés par électrophorèse. L'hétérogénéité des longueurs de l'ITS d'une espèce de microorganisme à l'autre permet ainsi de mettre en évidence de petites modifications dans la structure génétique et de ce fait de distinguer des espèces très proches phylogénétiquement (*29-30*). On peut ainsi constituer un profil moléculaire de la communauté. Cette technique permet d'avoir une bonne vue d'ensemble de la diversité et de son évolution au sein de l'écosystème. Fisher et Triplett ont rapporté que la taille des fragments d'ITS variait dans une gamme allant de 400 à 1200 paires de base (pb) dans une étude de la diversité microbienne de trois environnements d'eau douce (*31*). Ranjard *et al.* rapporte que la taille de ce fragment d'ADN varie de 150 à 1500 pb environ dans les communautés microbiennes du sol, sachant qu'il n'existe pas de corrélation entre le genre (ou l'espèce) et la taille de l'ITS correspondant (*32*).

- Les techniques de **DGGE** et **TGGE** (denaturing gradient gel electrophoresis et temperature gradient gel electrophoresis) sont basées sur l'amplification de fragments des ADN ribosomaux et leur migration dans un gel d'acrylamide contenant un gradient dénaturant. La dénaturation

peut être obtenue par une concentration croissante d'un agent chimique (urée, formamide pour la DGGE (*33*)) ou une augmentation de la température lors de l'électrophorèse (TGGE (*34*)). Ces techniques permettent de séparer sur gel les brins d'ADN en fonction de leur séquence. En effet, la composition en bases G+C et A+T modifie la position de migration d'un brin d'ADN sur le gel. Ceci s'explique par le fait que la mobilité d'un fragment d'ADN dans le gel va décroître en fonction de sa dénaturation. Or la composition en bases G+C et A+T est un facteur déterminant puisqu'elle détermine la température de séparation des brins (TGGE) et la facilité à dénaturer les brins (DGGE), les liens G-C résultant de la présence de 3 liaisons hydrogène contre 2 uniquement pour les interactions A-T. L'identification des microorganismes peut ensuite être réalisée par découpage et séquençage des bandes obtenues.

- La **SSCP** (single-strand conformation polymorphism) a été décrite par Orita *et al.* (*35*). Elle est basée sur l'amplification des ADN ribosomaux qui sont dénaturés de manière à obtenir uniquement de simples brins d'ADN. Selon leur séquence, les simples brins adopteront des conformations 3D différentes et auront une migration différentielle en électrophorèse. Il devient alors possible de différencier des fragments d'ADN de même longueur ne présentant qu'une seule mutation ponctuelle.

Ces différentes méthodes, et en particulier celles qui reposent sur de l'électrophorèse capillaire, offrent à un coût raisonnable une image d'ensemble de la communauté dans un échantillon de manière rapide (*36-38*). De fait, elles ont été beaucoup utilisées dans divers types d'environnements pour comparer les communautés de nombreux échantillons, par exemple des communautés microbiennes aquatiques (*39*) ou encore sur les communautés microbiennes du sol (*32*). Chacune possède des qualités mais aussi des contraintes spécifiques qui sont détaillées dans la revue de Spiegelman (*29*).

Par ailleurs, d'une manière générale, il faut utiliser ces techniques en gardant à l'esprit les biais engendrés par l'utilisation d'ADN extraits de communautés complexes et de l'amplification par PCR. Ainsi une extraction d'ADN non-efficace ou préférentielle peut biaiser la diversité initiale observée (*40-41*). L'efficacité des différentes étapes d'extraction et de purification de l'ADN affecte également significativement l'amplification par PCR (*42-43*). Enfin, durant la réaction de PCR, l'importance relative des différentes séquences cibles (*44-45*), la spécificité des amorces (*46*), l'efficacité de l'amplification (*47-48*) et parfois même la formation de chimères (*49*) peuvent rendre problématique la quantification de la diversité microbienne. En conséquence, même si le profil généré par les techniques d'empreinte moléculaire représente quantitativement les produits PCR obtenus, il ne peut pas être considéré comme une représentation rigoureusement quantitative de la communauté initiale.

Les techniques de fingerprinting sont malgré tout très appréciées pour leur rapidité, leur répétabilité, leur facilité de mise en œuvre et surtout leur capacité à mettre en évidence des évolutions de structure au sein de communautés environnementales. Elles sont un outil précieux dans le suivi des dynamiques de population lors de l'évolution d'un bioprocédé par exemple, ou au cours des différentes étapes de la dégradation d'un déchet. Il est important de souligner que les profils génétiques ainsi obtenus peuvent ensuite être traités avec des méthodes classiques en taxonomie, par exemple le calcul d'indices de

diversité ou de similarité (*50*) afin de quantifier la dynamique de la diversité. Cet aspect sera traité plus en détail dans la partie 5.2.2.

Au cours de ce travail de thèse, il a été choisi d'utiliser la technique d'ARISA par électrophorèse capillaire sur des puces, pour des raisons de rapidité et de simplicité, l'équipement nécessaire étant par ailleurs disponible au laboratoire.

2.2.2. Identifier les acteurs des écosystèmes microbiens et les classer

Pour aller plus en avant dans la description de l'écosystème microbien, il est nécessaire d'identifier précisément les microorganismes présents. Pour cela, afin d'étudier la population d'un échantillon complexe, on peut extraire l'ADN de l'ensemble des microorganismes présents et analyser les séquences génomiques obtenues. Différentes techniques sont disponibles (amplification PCR puis clonage/séquençage, pyroséquençage, etc.) que nous ne détaillerons pas ici.

On peut choisir de s'intéresser uniquement aux séquences d'ADNr 16S, afin d'avoir la carte d'identité moléculaire des espèces, suffisante pour identifier les microorganismes. A partir de ces données, des arbres phylogénétiques peuvent ensuite être construits afin de classer les microorganismes selon la parenté évolutive de leurs séquences de 16S.

Dans une démarche plus globale, le séquençage entier du génome des microorganismes permet d'identifier et de caractériser tous les gènes présents dans les espèces d'un échantillon complexe. On parle alors de métagénomique. L'objectif est d'étudier l'ensemble du contenu génétique issu d'un environnement complexe. Le but n'est plus uniquement d'identifier les microorganismes mais aussi d'identifier leurs différentes fonctions, les voies de régulation de certains gènes, etc. Ceci permet d'avoir un aperçu du potentiel fonctionnel d'un environnement. Le développement des nouvelles techniques de séquençage, permettant un débit de plus en plus élevé, ainsi que la diminution des coûts expérimentaux associés sont des alliés précieux dans le développement de la métagénomique. Pour faire suite au déploiement de ces techniques puissantes, il faut désormais mettre en place des outils de bioinformatique encore plus performants afin de faire face au flux de données à venir. Le risque est sinon de se laisser dépasser par ce que Marc Strous appelle une « tempête de données » (*51*) et de ne pas pouvoir exploiter pleinement ces avancées précieuses (*51-55*).

2.2.3. Observer les microorganismes directement dans leur environnement

Une fois que la diversité d'un échantillon a été caractérisée, différents outils permettent de visualiser *in situ* les populations identifiées, il s'agit des méthodes d'hybridation *in situ* (ISH). Le principe de ces méthodes est connu depuis plus d'une trentaine d'années, mais elles ne se sont réellement développées en écologie microbienne que depuis une quinzaine d'années, du fait de l'enrichissement en séquences des banques de données et du développement de logiciels de phylogénie suffisamment performants (*15, 56*). Elles constituent aujourd'hui un outil majeur en écologie microbienne pour réaliser des quantifications spatiotemporelles de microorganismes.

Ces techniques reposent sur l'hybridation d'oligonucléotides, appelés sondes, à l'intérieur d'une cellule, sur une séquence nucléotidique complémentaire, dite séquence « signature » d'un microorganisme, ou d'un groupe de microorganismes. Les techniques d'hybridation *in situ* font donc souvent appel chez les archées ou les bactéries à l'ARN ribosomique 16S. Des logiciels de phylogénie permettent de déterminer la séquence d'une sonde à partir des données de bases de séquences de l'ARNr 16S. Les sondes peuvent être plus ou moins généralistes, c'est-à-dire se fixer sur un plus ou moins grand nombre de microorganismes (espèces, ordres, phylums…) (*15*). L'accessibilité de la molécule cible à la sonde constitue l'un des facteurs déterminants de la bonne qualité d'une sonde (*57-58*). Avant de réaliser l'hybridation, l'échantillon est fixé grâce à un agent fixant. Cette fixation évite la dégradation de l'ARNr présent dans la cellule en inactivant les enzymes RNases. Dans le cas de l'hybridation *in situ* de cellules entières, la sonde peut être marquée par un radio-isotope (*59*) ou une autre substance permettant l'identification (*60*). Dans la plupart des cas, des molécules fluorescentes sont utilisées, comme la fluorescéine, la carbocyanin 3 (Cy3) ou la carbocyanin 5 (Cy5), et fixées à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide (*61*).

Intéressons nous donc plus particulièrement à l'**hybridation *in situ* en fluorescence** (technique FISH, Fluorescent *in situ* hybridization) qui repose sur l'hybridation de sondes fluorescentes sur l'ARNr 16S d'échantillons. Dans ce cas, une molécule fluorescente aura été accrochée aux sondes et va révéler l'hybridation (*59, 61-62*) (Figure 9). Après hybridation, les échantillons sont observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence ou avec un **microscope confocal à balayage laser** (Confocal laser scanning microscopy, CLSM, Figure 10) permettant de réaliser des images de plus faible profondeur de champ. Les microorganismes hybridés au sein de l'échantillon peuvent ainsi être repérés. Différentes sondes ciblant différentes séquences signatures et marquées avec différentes molécules fluorescentes peuvent être utilisées dans une même hybridation afin d'étudier plusieurs types de microorganismes au même moment (Figure 11).

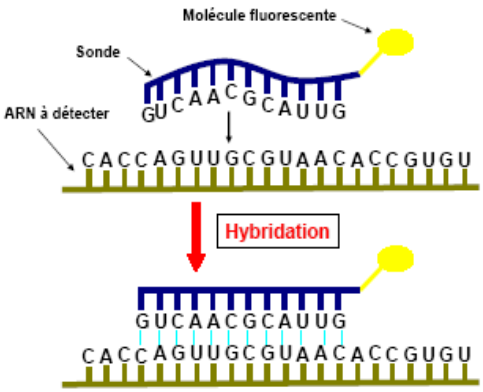


Figure 9 : Principe de l'hybridation FISH.

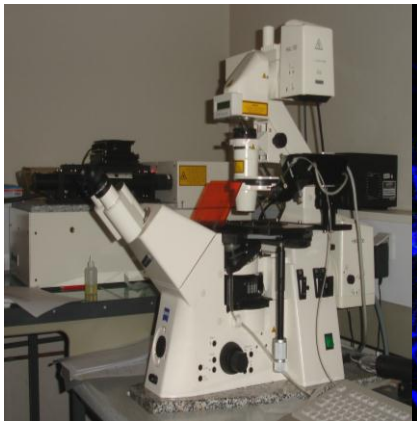


Figure 10 : Microscope confocal à balayage laser.

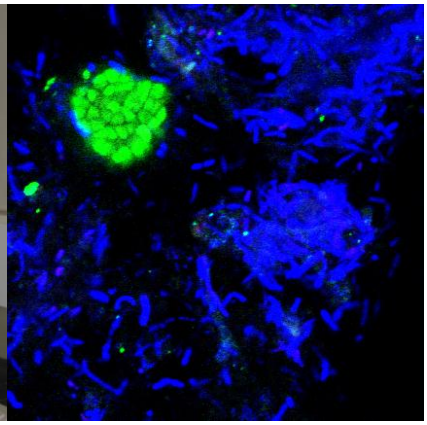


Figure 11 : Identification de différents microorganismes au sein d'un échantillon complexe par FISH.

La méthode FISH permet de réaliser une identification claire et rapide des microorganismes directement dans des échantillons environnementaux. C'est une mesure qualitative précise : certains

auteurs suggèrent qu'un seul microorganisme hybridé peut être détecté parmi un million d'autres microorganismes (*15*). Même s'il s'agit sans doute d'une estimation très optimiste, la technique FISH est l'une des plus puissantes pour localiser des microorganismes au sein d'un agrégat. Cette technique permet la visualisation des différentes populations des écosystèmes microbiens complexes, l'analyse de leur localisation spatiale, ce qui peut renseigner sur les interactions qu'ils développent, l'étude de leurs proportions, de la morphologie des microorganismes non cultivables, voire du niveau de leur activité métabolique au sein de la communauté. Le principal point faible de cette méthode est qu'elle dépend de l'élaboration de sondes et est donc limitée aux microorganismes qui sont déjà séquencés. De plus, certaines sondes peuvent reconnaître des organismes non encore identifiés. Cependant les bases de données contiennent déjà de nombreuses références. Crocetti (*63*) fait par exemple un bilan des sondes disponibles pour identifier les archées méthanogènes.

2.3. Mise en évidence des informations fonctionnelles au sein d'un écosystème complexe

Les techniques présentées dans les paragraphes précédents permettent de réaliser un inventaire moléculaire général des individus présents dans un échantillon complexe, d'avoir accès aux dynamiques de populations, ou encore de visualiser des interactions entre microorganismes. Cependant, un de leurs inconvénients principaux est que, si elles fournissent des informations étendues sur les taxa présents dans un environnement, elles ne donnent que peu d'informations sur le rôle fonctionnel de chaque groupe phylogénétique et sur l'activité des espèces. En effet, il n'y a pas nécessairement de lien entre la position phylogénétique d'un microorganisme et sa fonction dans l'écosystème (*64*). Ainsi, un des plus grands défis en écologie microbienne aujourd'hui est de décrire et comprendre le couplage entre diversité fonctionnelle et diversité structurelle ou taxonomique. Ceci nécessite la mise en place d'outils d'exploration fonctionnelle permettant d'établir un lien entre l'identité et la fonction des microorganismes non cultivables présents dans ces milieux. Dans ce sens, différentes méthodes permettant une utilisation combinée des techniques de biologie moléculaire et de marquage isotopique sont aujourd'hui proposées.

2.3.1. Les isotopes stables pour accéder à l'information fonctionnelle

La présence de microorganismes dans un échantillon ne signifie pas toujours qu'ils interviennent dans les processus biologiques étudiés. Pour relier la fonction avec le microorganisme, on peut notamment se servir de **traceurs isotopiques**. Dans ce but, les méthodologies de type « Stable-isotope probing » (SIP, marquage par isotope stable en français) ont été développées pour identifier des microorganismes impliqués dans le métabolisme d'un substrat spécifique.

Dans ces méthodes, l'échantillon environnemental à étudier est incubé avec des substrats marqués avec un isotope stable rare dans le milieu naturel. L'isotope stable contenu dans le substrat s'incorpore alors dans le matériel cellulaire des microorganismes qui l'assimilent. Ainsi les microorganismes intervenant dans le processus de dégradation, dits fonctionnels, sont « marqués ». Ce marquage pourra être utilisé

dans différentes techniques de biologie moléculaire pour identifier les groupes microbiens ayant incorporé le substrat introduit, et pour évaluer leur implication dans la métabolisation du substrat. L'utilisation de substrats marqués isotopiquement constitue ainsi une méthode de choix pour le traçage des flux de matière dans des systèmes complexes.

Par rapport au marquage radioactif, ce mode de marquage présente l'avantage de ne pas altérer significativement les propriétés physico-chimiques du composé étudié et de pouvoir être utilisé directement dans l'environnement des microorganismes. De plus, la composition isotopique particulière de la molécule étudiée permet de suivre son devenir au sein d'un système complexe et d'identifier formellement tous les produits issus de sa métabolisation.

2.3.2. Comment identifier les microorganismes fonctionnels

Afin de pouvoir identifier les microorganismes fonctionnels, il est nécessaire d'avoir accès à un marqueur moléculaire, ADN, ARN ou encore protéine, spécifique de ces microorganismes. Tout l'enjeu consiste à séparer l'information concernant les microorganismes fonctionnels de celle concernant la biomasse totale.

La méthode SIP, développée par Radajewski et ses collègues en 2000 (*65*), consiste à utiliser un substrat artificiel enrichi en ^{13}C ou ^{15}N. Les microorganismes assimilant le composé vont progressivement présenter un enrichissement de leurs constituants cellulaires (ADN, ARN et protéines en particulier) en ces isotopes stables. En s'appuyant sur le fait que les acides nucléiques enrichis en isotope stable ont une densité plus importante que les autres (*66*), on peut imaginer les séparer.

Ainsi, dès 1958, Meselson et Stahl tentent d'utiliser les propriétés physico-chimiques de certains composés tels que le Chlorure de Césium (CsCl) pour séparer par ultracentrifugation des acides nucléiques de densités différentes. En effet, lorsqu'ils sont soumis à une force centrifuge importante (plusieurs dizaines de milliers de g), ces composés en solution forment spontanément un gradient de densité. On peut utiliser ces propriétés dites « isopicniques » afin de séparer des molécules de densités différentes. Différents gradients peuvent être obtenus en fonction de la température, de la vitesse de centrifugation et du composé utilisé.

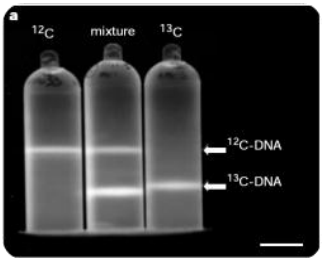


Figure 12 : Tubes contenant de l'ADN ^{12}C et ^{13}C ultracentrifugés dans une solution de CsCl. D'après (*65*).

Par exemple, des fragments d'ADN placés dans un gradient de CsCl vont se répartir en fonction de leur densité, ce qui permet de séparer les acides nucléiques lourds (marqués ^{13}C ou ^{15}N) qui vont migrer profondément, des légers (non marqués) qui sont moins denses (Figure 12). L'ADN lourd ainsi séparé

permettra d'identifier les microorganismes qui auront consommé le substrat ou qui interviennent plus en aval de la chaîne de dégradation de celui-ci. Il est donc possible de lier les métabolismes des microorganismes à leur identité taxonomique dans leur milieu environnemental.

2.3.2.1. SIP ADN

Les applications du SIP ADN en écologie microbienne ont été discutées dans plusieurs revues, sur des substrats, des biomarqueurs cibles et des environnements différents (*67-90*). La bonne séparation des ADN lourds et légers nécessite une différence de densité et donc d'enrichissement suffisante entre les molécules d'ADN. Radajewski recommande un enrichissement supérieur à 50% de ^{13}C pour permettre une bonne séparation de l'ADN marqué et non marqué (*91*). Cette valeur paraît peut-être un peu élevée par rapport à celles préconisées par d'autres auteurs, ou dans d'autres articles (*65, 92*). Cependant, cela signifie que l'ADN des microorganismes à croissance lente, donc avec un faible enrichissement en ^{13}C, ne sera pas détecté significativement même s'ils sont impliqués dans la dégradation.

Par ailleurs, il faut signaler que le pourcentage du taux de Guanine et Cytosine dans les acides nucléiques a également une influence non négligeable sur leur densité. En effet, on a la relation empirique suivante pour la densité de l'ADN dans un gradient de CsCl :

$$\rho = 0.098 * (\%GC) + 0.035 * (\%13C) + 1.660$$

2.3.2.2. SIP ARN

Sur le même principe, il est possible de réaliser une ultracentrifugation de l'ARN, (*91, 93*) qui donne accès principalement à l'identité des microorganismes (ARN ribosomique 16S), mais aussi à l'expression des différentes fonctions (ARN messagers). Cette technique, SIP-ARN, permet de relier identité et fonction biologique, et donc de connaître les membres actifs d'une population donnée responsables des processus métaboliques étudiés (*94*). Dans ce cas, il semblerait qu'un enrichissement de 20% suffise pour permettre la séparation de l'ARN lourd. Par ailleurs les microorganismes métaboliquement actifs synthétisent l'ARN plus rapidement que l'ADN. Ainsi le marquage de l'ARN se fait en quantité élevée sans qu'il y ait synthèse d'ADN ou réplication des microorganismes (*95*). La méthodologie SIP-ARN offre donc une sensibilité plus élevée que le SIP-ADN. Il faut toutefois rappeler que la manipulation de l'ARN est beaucoup plus délicate que celle de l'ADN, rendant l'utilisation du SIP-ARN moins aisée que celle du SIP-ADN. Malgré tout, dans les dernières années, le SIP-ARN a été développé et appliqué pour répondre à un certain nombre de questions fascinantes dans le domaine de la microbiologie environnementale. De nombreuses références font état de l'utilisation de cette méthode comme par exemple (*96-104*). En peu de temps, cet outil, comme le SIP-ADN, est devenu indispensable en écologie microbienne, avec encore un grand potentiel pour l'avenir.

Toutes prometteuses que soient ces techniques d'identification des membres actifs d'une communauté par leurs acides nucléiques, elles ont certaines limitations. La première est, nous l'avons dit, la nécessité d'obtenir pour les échantillons un taux d'enrichissement en isotopes des acides nucléiques suffisant pour la séparation par ultracentrifugation. La deuxième est l'assimilation possible des isotopes par des organismes non directement fonctionnels pour le substrat étudié, notamment par cross-feeding et à cause des cascades trophiques. Enfin, une autre limitation expérimentale provient de l'extraction des

acides nucléiques avant l'ultracentrifugation : il arrive que cette extraction produise des molécules partiellement dégradées en petits fragments ; or ces courts fragments n'atteignent généralement pas la région du gradient qui leur est propre sous les conditions habituelles. De plus, le %GC peut varier au sein d'un même génome suivant les régions considérées; on peut donc à cause de cette fragmentation inopportune observer des morceaux d'un même génome à des endroits différents du gradient. Malgré tout, ces techniques restent de puissants alliés pour identifier les populations fonctionnelles au sein d'écosystèmes complexes.

2.3.2.3. SIP protéines

Pour conclure, intéressons nous à une dernière méthode développée pour tenter d'identifier les microorganismes fonctionnels à l'aide des isotopes stables. Jehmlich et ses collaborateurs (*105-109*) présentent une méthode de détection de l'incorporation d'isotopes stables du substrat dans les protéines des microorganismes fonctionnels. Le principe général est le suivant : après incubation d'un échantillon complexe avec un substrat marqué, les protéines totales sont extraites, purifiées et séparées, puis la masse des peptides est mesurée par spectrométrie. Par comparaison de masse avec les peptides d'un témoin incubé avec un substrat non enrichi, les peptides et les protéines sont identifiés, et l'identité des microorganismes déduite par comparaison de séquences protéiques. D'après les auteurs, un des avantages de cette technique est de permettre d'identifier les microorganismes actifs même si leur vitesse de croissance est très lente, car il suffirait d'une très faible incorporation métabolique pour reconnaître les protéines enrichies en isotope stable. La méthode serait donc plus sensible que le SIP ADN ou ARN avec un besoin de seulement 1 à 2% d'enrichissement pour du ^{13}C par exemple, la limite théorique étant l'addition d'un isotope stable par peptide par rapport à l'abondance naturelle. Jehmlich a présenté des premiers résultats sur des souches pures de *Pseudomonas putida* cultivées en présence de benzène enrichi en ^{13}C ou d'ammonium marqué ^{15}N. L'identification des protéines enrichies nécessite d'obtenir des spectres très résolus, et l'utilisation d'algorithmes puissants qu'il faut encore améliorer. Le passage à l'échelle des communautés complexes est donc très ambitieux et nécessite encore beaucoup de travail. Cependant, les auteurs mettent en avant une très grande sensibilité de la méthode qui permettrait de mesurer la variabilité de l'incorporation des isotopes au sein de microorganismes, ce qui n'est pas possible avec l'ADN/ARN faute d'une résolution suffisante des gradients de densité. Les perspectives sont donc particulièrement intéressantes dans un environnement complexe, où les microorganismes intervenant directement dans la dégradation d'une molécule auront un enrichissement plus important en ^{13}C que celles consommant des sous-produits de dégradation ou des débris d'autres bactéries. Enfin, sous réserve de développements méthodologiques et d'algorithmes puissants, le SIP-protéine pourrait fournir directement des informations fonctionnelles, afin de pouvoir mieux comprendre les voies métaboliques du carbone et de l'azote au sein des communautés microbiennes. Cette technique semble donc prometteuse même si elle doit encore faire ses preuves sur des cas plus complexes (*110*).

2.3.3. Mesure de l'incorporation d'isotopes au sein des microorganismes

L'identification des groupes fonctionnels impliqués dans la dégradation d'un substrat donné est une première étape vers la réponse à la question **« qui fait quoi ? »**. Cependant, elle ne permet pas d'y répondre. Des étapes sont encore nécessaires pour faire le lien entre les métabolismes observés grâce aux mesures physico-chimiques et les microorganismes identifiés comme acteurs du procédé.

Repartons du constat que les groupes fonctionnels identifiés peuvent ensuite être visualisés par hybridation fluorescente *in situ* présentée au paragraphe 2.2.3. Le défi repose alors sur la visualisation de l'incorporation du substrat marqué par ces microorganismes. Plus précisément, la démonstration formelle de l'implication du microorganisme dans un processus biogéochimique particulier nécessite la mise en évidence *in situ* simultanée de : l'hybridation d'une sonde nucléique, qui révèle l'identité du microorganisme, et de l'incorporation cellulaire de l'isotope introduit, qui témoigne de sa fonction métabolique. Dans ce sens, différentes méthodes ont été développées depuis la fin des années 1990 combinant la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) et des mesures d'incorporation d'isotopes à l'échelle cellulaire.

Amann *et al.*, en 1996, ont couplé le FISH à la microautoradiographie qui consiste à incuber dans le milieu un substrat radiomarqué (*111*). Cette méthode, le **FISH-MAR**, permet de visualiser en microscopie optique, après une étape de révélation (autoradiographie), les cellules qui ont incorporé le substrat. En couplant au FISH l'identité de ces cellules peut être déduite. Une quantification grossière du signal radioactif est possible via un étalonnage interne, afin d'estimer le taux d'incorporation (*112*). Cependant, cette technique radioactive n'est pas directement compatible avec la majorité des stratégies d'identification de la communauté fonctionnelle telles que le SIP, qui est réalisé par un traceur à l'aide d'isotopes stables.

D'autres chercheurs ont couplé le FISH à la microscopie Raman qui utilise un laser incident pour mesurer l'énergie des liaisons chimiques liée aux molécules biologiques dans les cellules microbiennes individuelles (**Raman-FISH**). Elle permet au cours du temps d'observer des changements importants au niveau des spectres de résonance qui correspondent à l'incorporation d'isotopes stables, préalablement ajoutés au milieu, dans les constituants cellulaires. En couplant au FISH, on observe dans quel compartiment cellulaire le substrat est incorporé dans l'organisme identifié (*113*). Cette approche présente une résolution comparable à celle du FISH-MAR et surmonte plusieurs de ses limitations.

Plus récemment, de nouvelles méthodes, faisant appel à la technologie de spectrométrie de masse à ionisation secondaire (SIMS) ont été développées. Elles permettent une meilleure résolution spatiale ainsi qu'une mesure plus précise de l'incorporation de l'isotope au sein des microorganismes. La technique SIMS a été introduite dans les années 1960 par Castaing et Slodzian. Cette technique permet d'obtenir une cartographie en deux dimensions de la composition atomique et isotopique de la surface d'un échantillon. Le procédé consiste à bombarder en continu la surface de l'échantillon à analyser avec un faisceau d'ions énergétiques (un faisceau primaire d'ions césium (Cs^+) par exemple). Ceci aboutit à la

pulvérisation de la surface supérieure de l'échantillon et, par conséquent, à la libération d'ions secondaires. Ces ions secondaires sont triés sur la base de leur énergie dans le secteur électrostatique de l'instrument avant d'être dispersés dans un spectromètre de masse en fonction de leur rapport masse/charge. Par l'acquisition d'une série de spectres point par point à la surface de l'échantillon, une cartographie peut être produite pour une masse atomique choisie. L'information des rapports isotopiques sur une région d'intérêt peut être obtenue.

Un premier test de **couplage entre SIMS et FISH** a été effectué par Orphan en 2001 (*114*), sur un échantillon de sédiment marin, pour identifier les groupes fonctionnels intervenant dans l'oxydation anaérobie du méthane. Cependant, la résolution du SIMS à l'époque n'était pas suffisamment élevée pour permettre une mesure à l'échelle d'un microorganisme. En conséquence, les analyses SIMS n'étaient réalisées que sur des agrégats de cellules. En outre, le signal de FISH et la mesure de SIMS avaient été acquis par deux analyses séparées. Une relocalisation était alors nécessaire.

Un nouvel instrument, le NanoSIMS, présentant une résolution spatiale de 50 nm tout en maintenant une très bonne sensibilité en masse, a ensuite été développé (Figure 13). Cet instrument offre la possibilité d'effectuer l'acquisition de cinq images ioniques en parallèle. Il est ainsi possible de mesurer, en plus de la composition isotopique, l'enrichissement de la zone d'analyse en tel ou tel atome avec une précision de 0,01% (*115*).

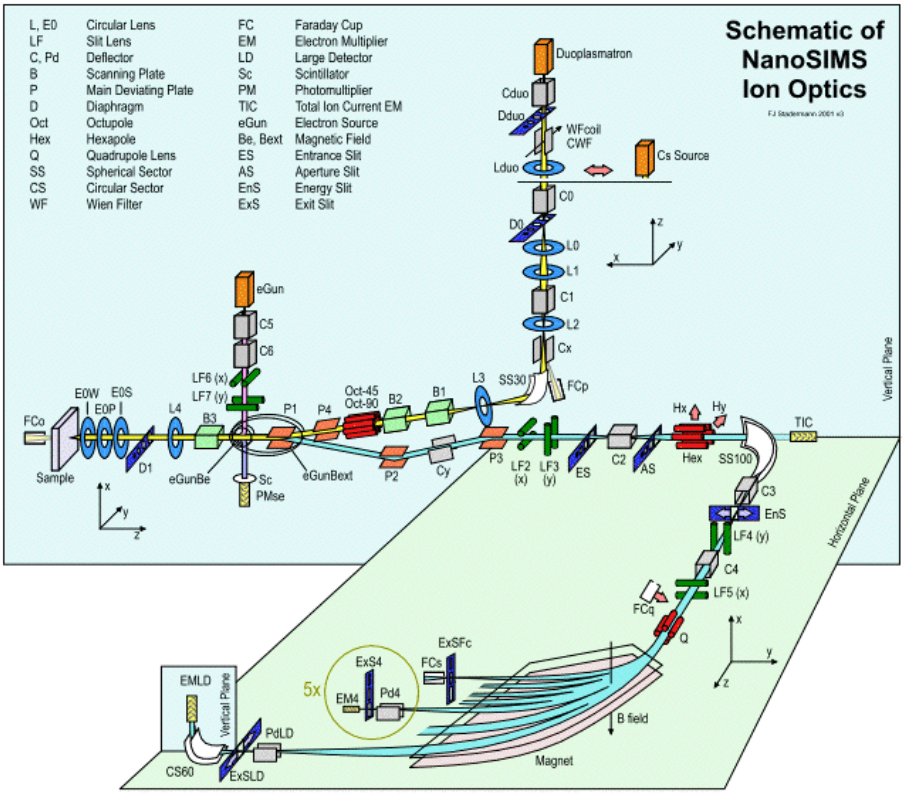


Figure 13 : Schéma du NanoSIMS.
Source : F.J. Statermann, Washington University, St Louis, Missouri, http://presolar.wustl.edu/nanosims/schematic.html

La visualisation simultanée de l'identité des microorganismes grâce à l'hybridation de sondes nucléiques spécifiques marquées à l'aide d'un atome peu présent dans la biomasse, tel que le fluor, le bromure ou l'iode, (*116*) et du taux d'incorporation d'isotopes stables a alors été rendue possible, et trois techniques voisines ont été développées dans ce sens. Elles ont pour nom secondary ion mass spectroscopy *in situ* hybridization (**SIMSISH**) (*117*), halogen *in situ* hybridization secondary ion mass spectroscopy (**HISHSIMS**) (*118-119*) et element labeling-fluorescent *in situ* hybridization (**EL-FISH**) (*120*). Ces trois méthodes reposent sur la combinaison d'une hybridation *in situ* de l'ARN ribosomique (ISH) et d'une observation de l'incorporation des isotopes à l'aide du nanoSIMS. Elles différent principalement par le mode d'hybridation.

Le SIMSISH comporte une hybridation directe d'une ou plusieurs sondes oligonucléotidiques halogénées sur l'échantillon, de la même façon que pour une hybridation FISH traditionnelle, suivie de l'observation nanoSIMS. Li *et al.* utilisent ainsi comme sonde des oligonucléotides contenant de la cytidine iodée (Li *et al.*, 2008). Grâce à cette nouvelle combinaison de méthodes, Li *et al.* étudient l'enrichissement de cellules individuelles d'*Escherichia coli* dont les substrats de culture étaient du ^{13}C-glucose et du $^{15}NH_4Cl$.

Les techniques de ELFISH et HISHSIMS font quant à elles appel à une amplification du signal d'hybridation de type CardFISH (catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization (*121*)). Dans ce cas, une sonde oligonucléotidique marquée avec l'enzyme HRP (peroxydase de raifort) est hybridée sur les cellules d'intérêt. Des tyramides contenant du fluor sont précipitées sur la peroxydase. Le signal d'hybridation est donc également détecté grâce à des atomes d'halogènes, mais à la différence du SIMSISH, l'atome est contenu dans les tyramides utilisées pour l'amplification du signal. Ainsi Musat *et al.*, ont utilisé la méthode HISHSIMS pour l'identification de trois bactéries anaérobies phototrophes habitant un lac oligotrophe. Ils ont déterminé les taux métaboliques d'assimilation de $H^{13}CO_3^-$ et $^{15}NH_4^+$ pour les trois bactéries et ont observé que les ratios métaboliques varient énormément entre les cellules individuelles d'une même espèce. La même équipe a étudié, de manière similaire, le cycle de l'azote dans le lac Cadagno (Suisse) et sa communauté microbienne (*118*). Avec le EL-FISH, Behrens *et al.* ont démontré les transferts de ^{13}C et ^{15}N entre une cyanobactérie filamenteuse *Anabaena sp.* et une bactérie épibionte du genre *Rhizobium*, attachée directement à l'hétérocyste (*120*).

L'utilisation de l'enzyme HRP dans les techniques HISHSIMS et EL-FISH permet d'augmenter l'intensité du signal d'hybridation lorsqu'il est trop faible, notamment dans les échantillons provenant d'environnements oligotrophes. Cependant, malgré la meilleure détection du signal, l'utilisation de cet enzyme implique l'apport d'une quantité importante d'éléments étrangers à l'échantillon, en particulier d'atomes de carbone et d'azote qui pourraient modifier le ratio isotopique au sein des cellules et par conséquent diminuer la précision de la quantification. Ce n'est pas le cas pour le SIMSISH pour lequel les procédures expérimentales ne modifient pas significativement les valeurs de ratio isotopique mesurées tout en permettant malgré tout d'identifier correctement les microorganismes comme l'ont montré des travaux exécutés au cours de ce travail de thèse mais non présentés dans ce manuscrit.

Une mesure précise de l'enrichissement isotopique au sein des microorganismes est particulièrement importante, puisque c'est cette valeur qui nous permettra de remonter à leur fonction. En effet, au-delà

de valider l'implication des microorganismes observés dans le processus étudié, les combinaisons nanoSIMS-ISH vont nous aider à déchiffrer et à reconstruire les chaînes métaboliques impliquées dans la dégradation du substrat étudié. Ceci sera possible en utilisant des modèles mathématiques de dégradation. Dans ces modèles, la concentration et l'enrichissement des sous-produits de dégradation du substrat de départ au cours du temps sont modélisés. Il en est de même pour la biomasse. A chaque étape de la dégradation correspond un type de microorganisme. A l'aide du modèle il est possible de prévoir son enrichissement (*122*). En comparant les prévisions du modèle aux valeurs d'enrichissement mesurées avec le nanoSIMS, on peut faire le lien entre les microorganismes observés et identifiés et les microorganismes modèles d'une fonction. De cette façon on pourra attribuer un microorganisme à chacune des fonctions identifiées dans le modèle de dégradation et enfin répondre à la question « qui fait quoi ? ».

On voit donc se dégager l'atout majeur de la combinaison nanoSIMS-ISH pour identifier les différents acteurs d'une chaîne de dégradation. Ces stratégies innovantes rendent possible l'étude du lien entre l'identité et la fonction des microorganismes. Elles s'appliquent notamment très bien à l'analyse d'échantillons complexes, tels que les échantillons environnementaux, et permettent ainsi d'explorer, par une méthode indépendante de la culture, la contribution de cellules individuelles et de communautés microbiennes dans les cycles biogéochimiques ainsi que leurs interactions et de répondre aux nombreuses questions aujourd'hui soulevées. Les enjeux de cette meilleure connaissance sont multiples. Elles permettront de mieux comprendre et appréhender les écosystèmes microbiens dans le but, par exemple de faciliter leur exploitation dans les bioprocédés, notamment ceux faisant intervenir la méthanisation, dont la connaissance n'est pas encore exhaustive.

3. Description des processus de méthanisation

En décrivant à la fin du XVIIIème siècle « l'air inflammable des marais, un air qui brûle très lentement avec une belle flamme bleue », Volta (Figure 14) mettait en avant les conséquences d'un ensemble de réactions chimiques complexes sur la matière organique dans les milieux pauvres en oxygène. La production de méthane – méthanisation – qu'il décrit provient en effet d'une transformation de la matière organique par une communauté microbienne fonctionnant en anaérobiose.

Figure 14 : Alessandro Volta.
Billet de 10 000 lires, Banca d'Italia, 1984-2001

Cette fermentation se réalise spontanément dans les écosystèmes naturels, là où la matière organique est présente dans un milieu anaérobie, comme les marais (Figure 15), les lacs, les rizières, les sédiments lacustres et marins, le sol, l'intestin de mammifères, le tractus intestinal de certains termites, etc. Maîtriser ce processus est un enjeu fort dans différents domaines industriels, dans le but de résoudre des questions environnementales d'actualité, comme l'élimination des déchets organiques, tout en produisant une énergie renouvelable : le biogaz.

Figure 15 : Gravure présentant Volta collectant du méthane dans les marais d'Angera. (Lombardie, Italie).

Afin de mieux maitriser ce processus, il est préférable de connaître les différentes étapes et les acteurs impliqués…

3.1. Les grandes étapes de la digestion anaérobie

Les résidus organiques sont composés d'une grande variété de matériaux différents. Leur dégradation passe par de nombreux intermédiaires entre la matière organique initiale et le biogaz final. Elle est classiquement divisée en quatre étapes (*cf.* Figure 16).

3.1.1.Hydrolyse

Au cours de cette étape, les macromolécules ou biopolymères (polysaccharides, lipides, protéines) sont hydrolysés en monomères hydrosolubles tels que des monosaccharides comme le glucose, des acides gras et du glycérol, des acides aminés et des bases azotées. La réaction est catalysée par des exo-enzymes. L'étape d'hydrolyse est généralement lente et est bien souvent l'étape limitante de l'ensemble du processus de dégradation, particulièrement lorsque les particules organiques contiennent de la lignine.

3.1.2. Acidogenèse

Au cours de l'étape d'acidogenèse, les molécules issues de l'étape d'hydrolyse sont fermentées principalement en acides gras volatils, ou AGV (acide acétique, propionique, butyrique, valérique, etc.), en alcools, en d'autres acides organiques (lactique, succinique…), ainsi qu'en hydrogène et en dioxyde de carbone. Cette étape est généralement 30 à 40 fois plus rapide que l'hydrolyse (*123*).

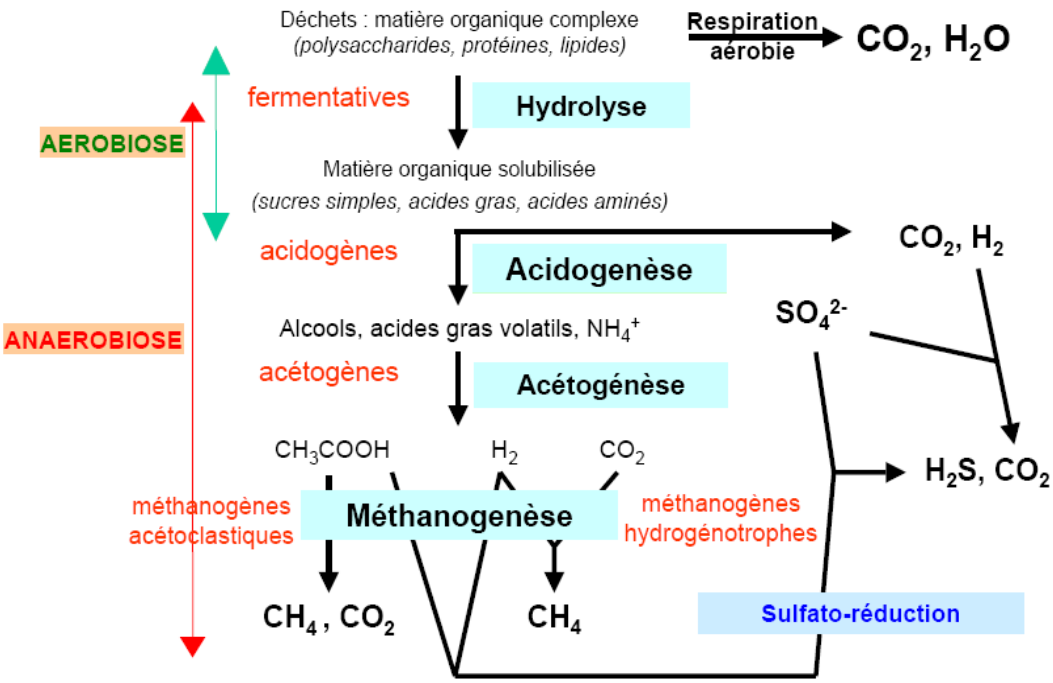


Figure 16 : Les étapes de la dégradation des déchets dans une installation de stockage de déchets. D'après (*124*)

3.1.3. Acétogenèse

Pendant l'acétogenèse, les intermédiaires métaboliques de la phase précédente sont transformés en acide acétique, dihydrogène et dioxyde de carbone, précurseurs directs du méthane. Deux voies sont possibles. La voie homoacétogène aboutit uniquement à la production d'acide acétique à partir de molécules organiques, ou à partir de dioxyde de carbone et de dihydrogène. La voie hétéroacétogène conduit à la production de dihydrogène, de dioxyde de carbone, d'acide acétique mais aussi d'autres acides gras volatils (acide propionique, acide pyruvique, acide butyrique, etc.)

Les vitesses réactionnelles d'acétogenèse sont généralement lentes et soumises à des problèmes d'inhibition par la présence de dihydrogène qui modifie l'équilibre thermodynamique de la cinétique globale. Une pression partielle de dihydrogène très basse est donc nécessaire pour rendre la production d'acide acétique thermodynamiquement possible, l'accumulation de dihydrogène conduisant à l'arrêt de l'acétogenèse.

Cette phase est une des étapes clé de la digestion anaérobie. En effet, tout dysfonctionnement à ce niveau risque de se traduire par une accumulation d'hydrogène et d'AGV associée à une importante diminution de pH, entraînant l'inhibition de l'étape suivante de méthanogenèse (*125*).

3.1.4. Méthanogenèse

Lors de cette ultime étape, les produits de l'acétogenèse sont transformés en méthane et en dioxyde de carbone. Deux types de réaction peuvent être distingués. La méthanogenèse hydrogénotrophe permet de réduire le dioxyde de carbone avec le dihydrogène en méthane. La méthanogenèse acétoclaste clive quant à elle l'acide acétique en méthane et en dioxyde de carbone. D'autres métabolites comme le

méthanol ou la méthylamine peuvent également être précurseurs du méthane. On parle alors de voie méthylotrophe.

3.1.5. Autres réactions

Par ailleurs, parallèlement à la méthanogenèse, des réactions de sulfato-réduction peuvent se produire sous l'action de bactéries sulfato-réductrices (*126*) en présence de sulfate et dans un milieu réducteur. Ces réactions permettent la transformation d'alcools ou d'acides gras en H_2S et CO_2 en utilisant le sulfate comme source d'énergie. En particulier, les bactéries sulfato-réductrices ont la capacité d'utiliser le dihydrogène et l'acide acétique, entrant ainsi en concurrence avec les réactions de méthanogenèse.

D'autres réactions peuvent également avoir lieu, faisant notamment intervenir l'azote, mais nous ne les aborderons pas dans cette synthèse.

3.1.6. Cas particulier des substrats cellulosiques

La cellulose est un homopolymère linéaire constitué de sous-unités de D-glucose liées entre elles par des liaisons glycosides β-1,4 (Figure 17). L'arrangement régulier des groupes hydroxyles, le long des chaînes de cellulose, conduit à la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires, et par conséquent à une structure fibrillaire. Cette structure existe sous forme amorphe, ou sous forme cristalline, plus résistante à la dégradation enzymatique microbienne. L'insolubilité et l'hétérogénéité structurale de la cellulose en font un substrat lentement dégradable.

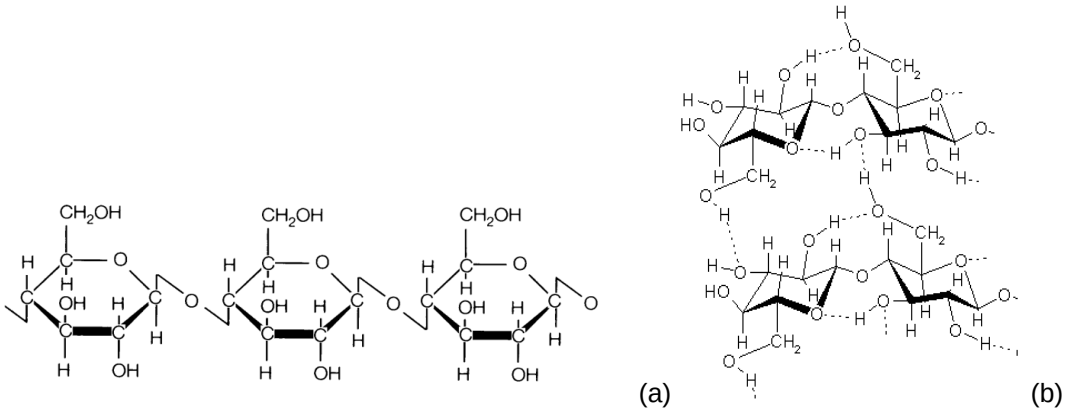


Figure 17 : Structure de la cellulose.
(a) des molécules de glucose liées par une liaison β-1,4 glycosidique. (b) liaisons hydrogène entre deux chaînes de cellulose.

Les hémicelluloses sont des constituants végétaux qui accompagnent la cellulose dans la constitution du bois. Mais, contrairement à la cellulose, les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides. En effet, elles sont constituées de divers monosaccharides incluant principalement des hexoses tels que le glucose, le mannose et le galactose mais aussi des pentoses tels que le xylose et l'arabinose (*127*). Les molécules d'hémicellulose sont plus ou moins ramifiées et présentent un degré de polymérisation plus faible que celui de la cellulose.

La ligno-cellulose est un complexe formé de polymères de lignine, de cellulose et d'hémicelluloses. Les fibres de cellulose peuvent être étroitement liées aux hémicelluloses et à la lignine par des liaisons

hydrogène ou des liaisons covalentes, ester ou éther (*128*). La lignine est une macromolécule complexe composée d'unités de type phénylpropanoïde (Figure 18). Ce polymère aromatique participe à la rigidité de la paroi cellulaire et rend les plantes plus résistantes à l'attaque des organismes pathogènes. Après les polysaccharides, la lignine est le biopolymère le plus abondant dans la nature (*128*).

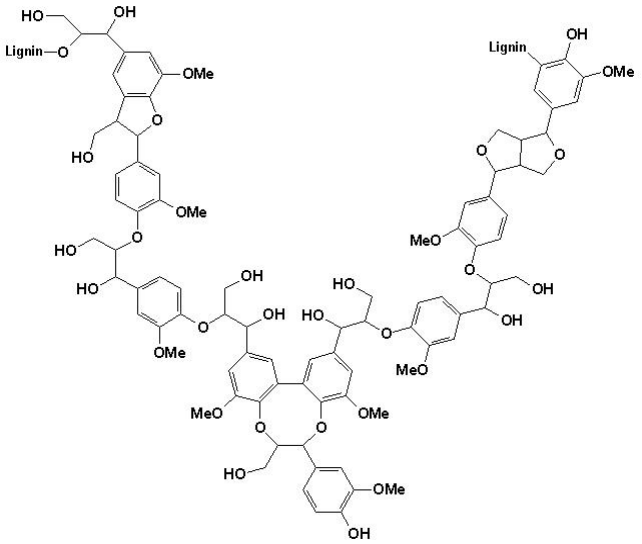


Figure 18 : Structure de la lignine.

Ces molécules peuvent être dégradées en conditions anaérobies selon les grands types de réactions décrits plus haut. Cependant, les propriétés de ces molécules les rendent difficilement dégradables, en particulier au cours de la première étape d'hydrolyse. Afin de passer outre ces difficultés, les microorganismes ont développé différentes stratégies de dégradation, que nous verrons plus loin.

3.2. Microbiologie de la digestion anaérobie

De par le nombre important de métabolites et de substrats impliqués, la digestion anaérobie est un magnifique exemple de **chaîne trophique**. En effet, une succession de microorganismes variés est impliquée au cours de la dégradation (*129-130*), les produits de biodégradation d'une réaction servant de substrat pour les réactions suivantes. Ceci suppose également des interactions importantes entre populations. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1, la connaissance de l'écologie et de la fonction des communautés microbiennes dans les bioprocédés de digestion anaérobie est indispensable pour améliorer le contrôle des processus biologiques. Les différentes méthodes de caractérisation des communautés de microorganismes évoquées dans le paragraphe 2 ont donc été appliquées à ces bioprocédés et un effort considérable a été accompli pour comprendre la structure microbienne de la communauté et tenter d'associer à chaque étape un ou plusieurs microorganismes (*131-135*). Certains microorganismes cultivables ont été isolés et sont désormais très bien caractérisés. Malgré tout, bon nombre d'entre eux ne sont pas cultivables, et laissent encore de nombreuses hypothèses ouvertes, même si les grandes lignes ont été tracées.

3.2.1. Hydrolyse

Des analyses phylogéniques montrent que la capacité à hydrolyser la matière organique et en particulier la cellulose est largement distribuée dans différents genres chez les bactéries, et dans les groupes fongiques des eucaryotes (*136*). Ces microorganismes sont anaérobies, stricts ou facultatifs (*137*). La biodiversité est extrêmement importante, et les vitesses de croissance relativement rapides avec des temps de doublement de quelques heures parfois. Ces microorganismes produisent des enzymes extracellulaires qui hydrolysent les biopolymères en oligomères et monomères hydrosolubles.

3.2.2. Acidogenèse

Les microorganismes acidogènes sont également appelés fermentatifs. La flore acidogène est constituée pour une partie de bactéries anaérobies facultatives (genre *Streptocoques, Bacillus, Micrococcus*, etc.) mais également de bactéries anaérobies strictes (genre *Clostridium*, etc.).

3.2.3. Acétogenèse

Deux groupes de bactéries acétogènes sont distingués (*138*) : les acétogènes productrices obligées d'hydrogène, ou bactéries syntrophes et les bactéries homo-acétogènes. Notons également que les bactéries sulfato-réductrices peuvent avoir une des fonctions précédentes.

Les bactéries syntrophes ont pour caractéristique d'effectuer des réactions dont les variations d'enthalpie libre standard sont positives. Pour pouvoir se réaliser, elles nécessitent un second microorganisme qui élimine une des molécules produites, permettant ainsi de transformer une réaction endergonique en réaction exergonique et donc de générer l'énergie nécessaire au microorganisme. Ainsi, leur croissance nécessite une très basse pression partielle en H_2 ($<10^{-4}$ atm) pour rendre la production d'acide acétique thermodynamiquement favorable (*130*). Ceci signifie que l'hydrogène produit doit être consommé immédiatement. Une syntrophie très étroite existe donc entre les bactéries acétogènes qui produisent de l'hydrogène et les autres microorganismes capables de le consommer (méthanogènes, sulfato-réducteurs). Les bactéries acétogènes productrices obligées d'hydrogène peuvent appartenir au groupe des syntrophes (genre *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas*, *Syntrophud*, *Syntrophococcus* ou *Syntrophospora* (*137*). Ces bactéries ont un temps de doublement assez long, de l'ordre de 1 à 7,5 jours (*139*).

Les bactéries homo-acétogènes peuvent produire l'acide acétique soit à partir d'un substrat carboné, soit par réduction du CO_2 par H_2. Elles proviennent de groupes bactériens variés, comportant des microorganismes Gram-positifs et Gram-négatifs, des morphologies de type bacilles et cocci, mobiles et non-mobiles, psychrophiles, mésophiles ou thermophiles (*140*).

3.2.4. Méthanogenèse

Cette réaction nécessite une anaérobiose stricte. La fonction de méthanogenèse est très conservée au niveau de la taxonomie. Cinq ordres dans le domaine *Archaea* englobent la plupart des méthanogènes. Ce sont les ordres *Methanobacteriales, Methanococcales, Methanosarcinales, Methanomicrobiales* et *Methanopyrales*. Leur temps de doublement est de l'ordre de quelques heures à quelques jours.

Les archées méthanogènes hydrogénophiles vivent en association syntrophique avec les bactéries fermentaires qui leur fournissent en continu le CO_2 et le H_2. La totalité des méthanogènes (sauf le genre *Methanosaeta*) sont capables de réaliser la méthanogenèse hydrogénophile.

La méthanogenèse acétoclaste peut quant à elle être réalisée par l'ordre *Methanosarcinales* (genre *Methanosarcina* et *Methanosaeta* exclusivement). Les réactions de méthanogenèse acétoclaste sont lentes et peu exothermiques, voire endothermiques (*141*), cependant elles génèrent environ 70% du méthane produit dans certains cas…

Enfin, seul le genre *Methanosarcina* comporte des méthylotrophes.

La distribution des archées est fortement liée aux conditions environnementales, telles que la température, le pH et la concentration des précurseurs de la méthanogenèse.

3.2.5. Sulfato-réduction

Les microorganismes sulfato-réducteurs utilisent le sulfate comme accepteur terminal d'électrons. L'H_2S produit au cours de leur métabolisme a un effet néfaste sur les organismes méthanogènes. Par ailleurs, elles entrent en compétition avec les méthanogènes pour les substrats tels qu'acide acétique, H_2 et CO_2. Les principaux microorganismes sulfato-réducteurs sont les espèces *Desulfovibrio* et *Desulfobacter*.

3.2.6. Influence d'un ensemble de paramètres

Des études de dynamique de population microbienne réalisées par des analyses d'empreintes moléculaires ont indiqué que les communautés archées et bactériennes sont sensiblement affectées au cours du processus de dégradation par différents paramètres, comme les modifications de pH, de la température ou de la concentration en AGV. L'influence de ces paramètres sera détaillée dans le paragraphe 5.1.2. Enfin, il est important de noter que les populations microbiennes sont très sensibles aux variations brusques de conditions de fonctionnement. Des variations lentes permettent de supporter des conditions inhibitrices plus élevées.

3.3. Cas particulier de la cellulose et de sa dégradation d'un point de vue moléculaire

La cellulose est un polysaccharide *a priori* peu soluble et difficilement dégradable. Les microorganismes sont cependant capables de la dégrader grâce à divers systèmes enzymatiques. Ainsi, les bactéries aérobies et des champignons produisent de nombreuses enzymes extracellulaires permettant d'hydrolyser les différentes conformations de la cellulose. Des enzymes spécifiques agissent en synergie pour une hydrolyse efficace. Certains microorganismes anaérobies ont quant à eux su développer un système leur permettant de rompre les parois cellulaires végétales qui repose sur la formation d'un complexe enzymatique extracellulaire appelé cellulosome, en complément ou à la place de la production d'enzymes extracellulaires libres. Ce complexe est constitué de 11 enzymes différentes alignées sur une protéine non-catalytique assurant une concentration locale en enzyme élevée. Ces multi-enzymes se fixent à la membrane cellulaire du microorganisme et au substrat, favorisant la proximité des cellules avec la cellulose. Les cellulosomes furent observés pour la première fois en 1985 par Bayer et Lamed

comme de larges protubérances à la surface de *Clostridium thermocellum* (bactérie thermophile anaérobie) (Figure 19). Ces observations ont été confortées en 1987 par les recherches de Mayer *et al.* qui par microscopie électronique ont montré un arrangement de ces cellulosomes en sous-unités distinctes (*142-144*).

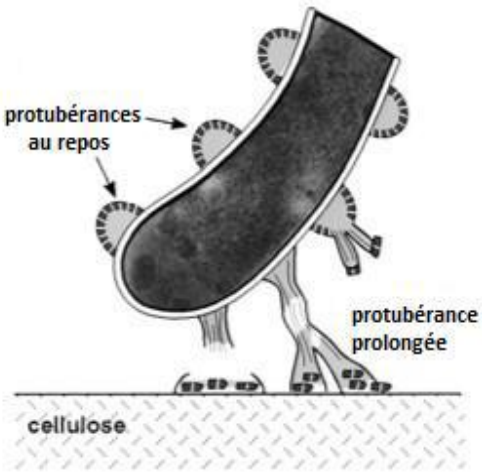


Figure 19 : Représentation schématique d'une cellule bactérienne liée à la cellulose. D'après (*145*).

Les microorganismes possédant ce système de dégradation de la cellulose sont retrouvés aussi bien dans les sols, les sédiments, les milieux aquatiques que dans le tube digestif de certains animaux comme les termites ou le rumen des ruminants comme l'illustre le Tableau 2.

Tableau 2 : Exemple de bactéries et de champignons anaérobies produisant des cellulosomes. M et T indiquent la température de croissance optimale (M : mésophile, T : thermophile) (*144*).

Microorganism	M/T*	Source
Anaerobic bacteria		
Acetivibrio cellulolyticus	M	Sewage
Bacteroides cellulosolvens	M	Sewage
Butyrivibrio fibrisolvens	M	Rumen
Clostridium acetobutylicum	M	Soil
Clostridium cellobioparum	M	Rumen
Clostridium cellulolyticum	M	Compost
Clostridium cellulovorans	M	Wood fermenter
Clostridium josui	M	Compost
Clostridium papyrosolvens	M	Paper mill
Clostridium thermocellum	T	Sewage soil
Ruminococcus albus	M	Rumen
Ruminococcus flavefaciens	M	Rumen
Anaerobic fungi ‡		
Neocallimastix patriciarum	M	Rumen
Orpinomyces joyonii	M	Rumen
Orpinomyces PC-2	M	Rumen
Piromyces equi	M	Rumen
Piromyces E2	M	Faeces

La dégradation de la cellulose, qu'elle soit catalysée par les enzymes cellulosomales ou par les enzymes libres, fait intervenir un large groupe enzymatique : celui des glycosyles hydrolases qui ont été classées en plusieurs familles sur la base de leur homologie en acides aminés.

On retrouve trois grandes catégories de cellulases :

- Les endoglucanases qui permettent de dégrader des fragments solubles et amorphes de la cellulose et de produire de nouvelles extrémités en coupant les longs fragments de cellulose.
- Les exoglucanases ou cellobiohydrolases qui permettent d'hydrolyser progressivement à partir des deux extrémités des polymères et aussi d'extraire les molécules de cellulose de la structure cristalline, et de libérer du cellobiose (*144*).
- Les β—glucosidases qui sont uniquement actives sur les cello-oligosaccharides et le cellobiose. Elles libèrent des unités monomériques de glucose, sucres simples qui sont le produit final de l'hydrolyse.

Malgré toute cette machinerie de dégradation mise en place par les microorganismes, la cellulose reste difficile à hydrolyser. Les analyses microscopiques (chimie de la matière fibreuse) et mésoscopique (physique des structures fibreuses) par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par diffraction aux rayons X montrent que les nombreuses régions cristallines (liaisons hydrogènes essentiellement inter-chaînes) rendent la cellulose moins soluble dans l'eau que les régions amorphes plus désordonnées (liaisons hydrogènes établies avec les molécules d'eau).

En outre, le fait que la cellulose ne contienne ni azote, ni phosphore la rend peu profitable d'un point de vue énergétique, ce qui explique pourquoi cette voie métabolique est peu sélectionnée et pourquoi les génomes codent pour des enzymes peu aptes à la dégrader.

3.4. Conclusion

Des acteurs très divers sont impliqués au cours de la digestion anaérobie. Ils sont en relations étroites. Une succession de réactions de dégradation a lieu, fournissant des substrats pour d'autres microorganismes ou au contraire inhibant leur fonctionnement. Un méthaniseur de déchets (ou l'installation de stockage de déchets non dangereux) figure donc un immense écosystème à l'échelle de ses acteurs, les microorganismes. Cet écosystème est d'autant plus complexe qu'il faut considérer que les microorganismes sont mis en œuvre le plus souvent dans un milieu hétérogène qui créé des niches écologiques particulières. Nous nous focaliserons donc dans ce travail de thèse sur la dégradation de la cellulose et de ses dérivés uniquement et tenterons de comprendre et d'optimiser sa dégradation en la replaçant dans un contexte écosystémique[5], à travers le prisme de l'écologie. Voyons ainsi comment la mise en place d'une ingénierie écologique des communautés microbiennes dans les bioprocédés de traitement anaérobie des déchets ligno-cellulosiques peut se réaliser.

5 C'est à dire prenant en compte l'écosystème et les interactions entre ressources vivantes dont il est le lieu

4. Vers la mise en œuvre d'une ingénierie écologique des communautés microbiennes des bioprocédés

L'ingénierie des bioprocédés pourrait être définie comme l'ensemble des fonctions qui mènent à la conception, à l'étude, à l'amélioration, à la construction, à la mise en service, à la maintenance et au suivi des bioprocédés. Ses références sont des disciplines scientifiques et techniques, parfois guidées par l'empirisme. Elle détermine des paramètres opératoires abiotiques pour modifier et contrôler au mieux les bioprocédés. La prise de conscience de l'importance des paramètres biotiques au sein des bioprocédés amène à de nouvelles réflexions et à la conceptualisation de nouveaux outils pour tenter de manipuler de manière réfléchie la composante microbienne. Pour ce faire, les interactions entre individus au sein de l'écosystème microbien doivent être mieux prises en compte et exploitées. En ce sens, l'ingénierie des bioprocédés a besoin de devenir écologique et d'enrichir ses concepts de nouvelles démarches, comme celle de l'ingénierie écologique.

4.1. L'ingénierie écologique, définitions et objectifs

4.1.1. Des premiers pas à la mise en place d'une démarche

La notion d'ingénierie écologique est introduite par Odum[6] dès 1962 (*146-148*). Elle peut être définie comme **l'application des principes de l'écologie à la gestion de l'environnement**. C'est **au sens strict** la manipulation *in situ* de systèmes écologiques (de quelques individus à tout un écosystème) dans un contexte écosystémique explicite : prise en compte des interactions avec les autres organismes, communautés et écosystèmes, prise en compte des dimensions physiques et chimiques de la manipulation et du fonctionnement de ces systèmes écologiques. La réhabilitation des sols pollués par les métaux lourds via le semis de plantes accumulatrices de ces polluants, l'épuration des eaux par les microorganismes sont ainsi des exemples d'ingénierie écologique.

Plus précisément, le but stratégique de l'ingénierie écologique est de maintenir, de favoriser ou d'orienter les processus naturels (et par conséquent les biens et les services qu'ils fournissent aux humains et aux autres espèces), avec un minimum d'intervention humaine et en minimisant les effets collatéraux. Ainsi, au delà de modifier la diversité, les manipulations induites par l'ingénierie des écosystèmes ont toutes pour but de minimiser la quantité d'énergie dépensée pour résoudre un problème particulier en comparaison à l'énergie apportée par les processus naturels (*149*). Ce but stratégique est le reflet de la définition originelle de l'ingénierie écologique par H. T Odum (*146*) : «…toutes les situations où l'énergie fournie par les humains est réduite par rapport à celle fournie par les systèmes naturels, mais cependant suffisante pour avoir des impacts forts sur les organisations et les processus qui en résultent ». En d'autres termes, l'ingénierie écologique utilise donc la tendance naturelle des écosystèmes à l'auto-organisation, à la résistance aux contraintes externes, à la résilience (c'est-à-dire la capacité de revenir à l'état antérieur après une perturbation), à s'adapter aux

6 Odum définit l'ingénierie écologique comme « those cases in which the energy supplied by man is small relative to the natural sources, but sufficient to produce large effects in the resulting patterns and processes », ou encore comme « environmental manipulation by man using small amounts of supplementary energy to control systems in which the main energy drives are still coming from natural sources »

changements, à être multifonctionnels, et à être auto-suffisants énergétiquement et matériellement (*150*). Pour cela différentes contraintes ou «leviers d'action» peuvent être appliqués à l'écosystème.

4.1.2. Objectifs visés

Les objectifs recherchés sont divers. Une approche d'ingénierie écologique peut être employée pour conserver des écosystèmes (préserver la régénération forestière par exemple), pour réhabiliter des écosystèmes dégradés en restaurant les communautés fonctionnelles ou en réintroduisant des espèces (replanter des haies ou recréer des zones humides dans les agrosystèmes), pour améliorer leur fonctionnement (en accélérant le recyclage des nutriments, la pollinisation), pour créer de nouveaux écosystèmes durables qui ont une valeur pour l'homme et pour la biosphère, ou encore pour substituer des processus naturels à des activités humaines en mettant au point des outils biologiques pour résoudre des problèmes de pollution, rétablir ou maximiser un service écosystémique[7], minimiser des consommations d'énergie non renouvelables, etc. (mise en place de toits végétaux pour la climatisation et l'épuration de l'eau, de zones humides pour le traitement des eaux usées, de forêts pour la purification de l'eau à la place de stations d'épuration). L'ingénierie écologique est donc une démarche très vaste, qui comprend de nombreux champs disciplinaires aux objectifs similaires. Elle vise à développer des modes de gestion durables des écosystèmes anthropisés, par l'utilisation explicite de processus écologiques dans un contexte écosystémique, tout en prenant en compte les contraintes économiques, sociales et politiques (*151-155*).

Le succès international actuel de l'ingénierie écologique s'explique par l'émergence de problèmes environnementaux locaux et globaux multiples, la crise de l'énergie, le mouvement culturel vers une réconciliation avec la nature et, surtout, l'évolution législative et réglementaire. Dans ce dernier domaine, on peut citer le « Clean Water Act » aux Etats-Unis (1972), la directive européenne cadre sur l'eau (2000), le marché des quotas d'émission de carbone en Europe (2003), la nouvelle politique agricole commune (2003) ou encore les projets français de mécanisme « compensatoire » sur la biodiversité (2008).

4.1.3. Enjeux de recherche

Malgré ces nombreux projets, et même si l'ingénierie écologique a été bien et suffisamment définie, son émergence en tant que discipline n'est pas encore achevée et reste une tâche difficile et un enjeu de taille (*156*). En conséquence, les **enjeux pour la recherche** sont nombreux. Il s'agit tout d'abord d'insérer dans l'ingénierie écologique pratique les avancées les plus récentes de la recherche en écologie, en hydrologie, en biologie de la conservation, en science du sol, en écologie microbienne, etc. afin d'évoluer vers une ingénierie ancrée dans la théorie plutôt que dans l'empirisme. *C'est à ce niveau que se situe mon travail.* Le second enjeu est de lier l'ingénierie écologique à l'ingénierie en général, c'est-à-dire de concevoir des systèmes techniques qui intègrent en amont les outils biologiques et écologiques (*157*). Le troisième enjeu est d'expliciter les dimensions éthiques, juridiques et économiques de l'ingénierie écologique et de proposer des pistes pour un cadrage social et politique de ce nouveau secteur

7 Une définition communément admise présente les services écosystémiques comme les bénéfices que les humains retirent des écosystèmes sans avoir à agir pour les obtenir.

d'activités. Ces différents éléments constituent les bases d'une approche formelle ayant pour but de développer une ingénierie écologique reconnue, pratique, quantitative, sous forme d'une discipline qui mêle les recherches passées et futures pour créer des bases solides (*156*). L'écologie est *a priori* la discipline scientifique la plus à même de fournir un cadre disciplinaire au développement de pratiques pour gérer les écosystèmes naturels et anthropisés de manière rationnelle et durable.

Par ces quelques éléments de contexte et de définitions, on imagine facilement comment la gestion biologique des déchets pourrait s'intégrer dans cette démarche et utiliser l'ingénierie écologique afin de faciliter et d'améliorer les processus. Voyons dans un premier temps quelles sont les passerelles disponibles entre l'ingénierie écologique des écosystèmes macroscopiques et celle des écosystèmes microbiens.

4.2. Les passerelles entre écosystèmes macroscopiques et écosystèmes microbiens

4.2.1. Des règles générales pour mettre en place l'ingénierie écologique

Après ces définitions du concept d'ingénierie écologique, on peut s'interroger sur sa mise en place, en particulier au sein des écosystèmes microbiens. Revenons tout d'abord à l'ingénierie écologique générale : Bergen énonce quelques règles de conception pour sa mise en place (*158*). La conception d'une gestion par ingénierie écologique doit tout d'abord être en accord avec les règles de l'écologie classique. En effet, dans cette démarche la nature est un partenaire, qui s'auto-organise. On ne peut pas aller à l'encontre de ce principe ; on peut certes apporter des perturbations, contraindre le système, mais pas aller à l'encontre de la réaction du système naturel sous ces contraintes. Par ailleurs la conception est spécifique à une situation et à une localisation en particulier. Les paramètres propres de la situation étudiée doivent être pris en compte, et l'ingénierie écologique adaptée à chaque cas particulier. Enfin, pour des raisons de simplicité de contrôle et de stabilisation, il est préférable de concevoir des systèmes dans lesquels les leviers d'action utilisés n'auront d'effet que sur une seule fonction.

Même si ces règles ont d'abord été énoncées pour des systèmes macroscopiques, les passerelles avec les écosystèmes microbiens semblent nombreuses et accessibles. Pour mieux les distinguer voyons tout d'abord les principales différences entre ces deux grands types d'écosystèmes.

4.2.2. Macro et micro : des écosystèmes différents ?

4.2.2.1. Multifonctionnalité

Une première différence importante entre les macro- et les microsystèmes est la notion de multifonctionnalité. Il existe en effet une très importante diversité métabolique dans le monde microbien, beaucoup plus importante que chez les macroorganismes. Ainsi, chez les microorganismes, moteurs des écosystèmes, la capacité à transformer des molécules en d'autres molécules est extrêmement importante et est influencée par de très nombreux paramètres biologiques, physico-chimiques, interactionnels, etc. (*159*). Ceci rend particulièrement complexe la prise en compte du rôle

des microorganismes dans l'écosystème, celui-ci pouvant évoluer de façon importante et parfois inattendue en fonction des changements environnementaux, en particulier lors de l'application d'un levier d'action d'ingénierie écologique (rappelons, comme nous l'avons vu au paragraphe 1.5.2, que les connaissances sur la composante microbienne et son rôle souffrent encore de très fortes lacunes).

4.2.2.2. Représentation des organismes

Un autre point différencie la gestion des écosystèmes microbiens et macroscopiques. Certes nous savons que les microorganismes sont des acteurs majeurs pour différentes fonctions dans l'écosystème, mais ils sont malgré tout peu pris en compte dans les approches systémiques. Cette pauvre représentation vient tout d'abord d'une raison évidente qui est la difficulté de dénombrer les microorganismes par rapport aux macroorganismes, comme nous l'avons vu au paragraphe 2.1.2 (*160-161*). Cette difficulté est cependant en diminution grâce aux nouvelles méthodes d'analyse de la diversité. Une seconde raison est liée à l'historique du développement de l'écologie microbienne. Les chercheurs du domaine sont en effet peu imprégnés des théories d'écologie de par leur cursus et sont plutôt orientés sur des thématiques biologiques. De plus, l'objet microbien fascine, les premiers développements ont donc largement favorisé les approches techniques au détriment de l'intégration de l'objet microbien dans des théories, d'où un déficit de conceptualisation (*20*). Enfin, un troisième point et, non des moindres, est la très difficile définition de la notion d'espèce (*162-163*) en particulier chez les microorganismes. L'absence de possibilité d'une classification plus précise (autre que par la proximité des séquences de l'ARNr 16S), qu'elle soit morphologique ou fonctionnelle, rend difficile l'identification des espèces et ainsi leur positionnement précis au sein de l'écosystème (*164-169*).

4.2.3. Vers une meilleure prise en compte des microorganismes

Comment donc améliorer la prise en compte des microorganismes dans les approches écosystémiques ? Il est nécessaire de pouvoir manipuler cette composante dans les systèmes. Comme nous l'avons vu la progression se fait pas à pas, de la compréhension du fonctionnement des systèmes à la compréhension des perturbations de fonctionnement. Ceci passe par la mise en place de diagnostics, d'études de la résilience et résistance des systèmes et finalement la mise en place d'ingénierie. Parallèlement, il faut étudier l'intégration de la composante microbienne à chacun de ces niveaux. Dans ce sens, le livre «*Ecologie microbienne du sol*» (*170*) écrit en 1970 apportait déjà les premiers éléments, notamment concernant les informations techniques de l'écologie microbienne. On pouvait toutefois lui reprocher de ne pas être écrit sur des bases et des concepts d'écologie. Des progrès ont été faits mais beaucoup sont encore possibles à ce niveau. Robert Lensi pense même que « L'écologie microbienne n'aura atteint sa maturité que quand elle aura cessé d'être microbienne » (*171*).

4.2.3.1. Introduire l'objet microbien dans les théories

Les premières théories écologiques microbiennes ont été développées par des écologues non microbiens, et la prise en compte des microorganismes dans ces modèles est trop simplifiée. Pour progresser, il est primordial de promouvoir l'objet microbien dans les théories systémiques et de l'insérer dans les champs théoriques. Il faut également se poser la question de la nature des concepts que l'objet microbien est susceptible de faire évoluer par ses caractéristiques. Les microorganismes ont un double rôle, à la fois responsables des flux mais aussi biodescripteurs de systèmes ou d'écosystèmes dans lesquels l'impact des perturbations n'est pas simple à prendre en compte. Par ailleurs, il faut revisiter la notion de communauté fonctionnelle et voir comment l'insérer dans le champ théorique (*172*). En effet, la pertinence du modèle microbien n'est pas seulement liée à la prise en compte des individus, mais aussi à celle de leur diversité métabolique, qui est primordiale. Dans ce sens, Lensi met en garde contre l'idée générale que tous les microorganismes seraient partout, impliquant que toutes les fonctionnalités microbiennes seraient partout également, car selon lui tout ne serait pas forcément partout et il serait dommageable d'en faire un postulat pour la construction des modèles.

Robert Lensi s'interroge sur les caractéristiques du modèle ou de la théorie idéaux. Ils comporteraient tout d'abord une valeur sélective des fonctions, la pertinence du modèle microbien étant en effet liée à la flexibilité des microorganismes capables d'effectuer diverses fonctions (*171, 173*). On peut citer à titre d'exemple la valeur sélective que peut conférer la capacité de respirer chez les microorganismes un autre accepteur d'électrons que le dioxygène, ce qui n'est pas envisageable chez les macroorganismes. Il faudrait également insérer des éléments concernant l'évolution, le développement et la croissance des microorganismes, ainsi que des éléments d'interaction entre le fonctionnement microbien dans l'écosystème spatialisé, et les performances de cet écosystème. Ce type d'approche est actuellement possible sur des écosystèmes modèles, avec une diversité d'individus réduite (*174-176*).

4.2.3.2. Approche par espèces ou par trait ?

Comment intégrer à des échelles plus larges ces données ? On peut envisager deux possibilités d'approche. Tout d'abord une approche globale, mais peu fonctionnelle : dans ce cas on se sert de la biomasse, de la diversité ou encore de la densité totale des microorganismes, mais cela ne permet pas de prendre en compte la capacité multifonctionnelle des microorganismes. Une autre approche est plus «fonctionnelle», c'est-à-dire privilégiant les fonctions par rapport aux individus. Le problème de ce type d'approche est qu'elle risque de n'être que partielle car on ne choisit que quelques communautés fonctionnelles pour le modèle, étant donné qu'il en existe énormément, et trop pour tout intégrer... On peut dans ce cas utiliser des rapports entre fonctions pour voir comment sont perturbées deux fonctions liées et voir la nature des liens générés entre ces fonctions. On ne s'intéresse pas uniquement à ce qui régule mais également à ce qui est régulé dans la fonction. On réfléchit au nombre de microorganismes capables d'exécuter les fonctions, lesquels les ont effectivement utilisées, quelles ont été les actions de régulation *etc.* En d'autres termes, on éclate les fonctions pour comprendre comment elles sont régulées et avoir des approches en termes de ratio, et pour voir l'influence de l'environnement. Ces deux stratégies sont complémentaires, mais l'une et l'autre sont limitées, car ne prenant pas assez en compte le côté fonctionnel dans un cas ou global dans l'autre. Il faut s'interroger

sur les stratégies envisageables pour réduire ces limitations. Il faut par exemple essayer de décrire biologiquement au maximum ces systèmes afin de constituer un arsenal conceptuel et méthodologique solide (*177-179*).

4.2.3.3. Le mythe de l'apprenti sorcier ?

Par ailleurs, il faut garder à l'esprit les conséquences non attendues et possibles des manipulations d'ingénierie écologique. Ainsi, même si elle ne s'y résume pas, cette dernière inclut fortement des manipulations biophysicochimiques des systèmes. En effet, une composante biologique peut être manipulée de manière directe, mais cela est restreint à de faibles échelles spatiales pour les microorganismes. Il est donc plus simple de manipuler une autre composante biotique pour y arriver. (*155*). Se pose alors le problème de la multifonctionnalité abordé plus haut : en effet, si on applique une perturbation pour écarter une fonction par exemple, on peut en même temps gommer d'autres fonctionnalités. Différents cas se présentent : dans certains cas, ce n'est pas forcément un problème de ne plus avoir cette fonction, cela peut même être utile : on ne cherche pas forcément à en avoir toujours plus. Dans d'autres situations, cela peut être particulièrement gênant et aller jusqu'à bloquer le système. Les conclusions sont les mêmes dans le cas inverse où l'on apporterait une fonction supplémentaire non attendue. Le problème de l'apprenti sorcier se pose donc systématiquement. Quels peuvent être les effets négatifs non prévus des manipulations, comme la stimulation de fonctions indésirables ou encore l'inhibition de fonctions désirables (*180-181*) ?

Ces différentes questions sont présentes même pour des exemples simples, par exemple l'introduction de microorganismes dans une communauté naturelle (bioaugmentation) pour restaurer ou introduire une fonction. Comment introduire et maintenir ces microorganismes dans ces systèmes ? Il y a risque de concurrence pour les mêmes niches. Des fonctions non désirées peuvent être apportées avec la communauté introduite. La contrainte sur l'écosystème sera-t-elle suffisante pour permettre à la biomasse exogène de s'implanter durablement (*181-182*) ? En effet, même si dans certains cas le maintien des microorganismes introduits n'est pas nécessaire pour que la fonction s'exerce (s'ils ont juste un effet inducteur), il est nécessaire pour ne pas devoir à chaque fois faire le travail de réintroduction.

4.2.4. Bilan

On peut conclure de cette partie que des éléments d'ingénierie écologique « générale », des théories écologiques ou encore des informations sur les microorganismes sont utilisables pour mettre en place l'ingénierie écologique des écosystèmes microbiens. Cependant, il faut assembler ces différents éléments et les compléter afin de construire un cadre théorique et des notions plus structurées qui permettront de tracer la voie aux développements futurs et aisés de l'ingénierie écologique des communautés microbiennes. Intéressons nous à présent aux apports possibles de cette discipline à la gestion des bioprocédés ou aux écosystèmes microbiens d'une manière plus générale.

4.3. La mutation de l'écologie microbienne des bioprocédés vers l'ingénierie écologique des écosystèmes microbiens des bioprocédés

4.3.1. Observer, reproduire, concevoir

Dans l'étude des bioprocédés ou des écosystèmes microbiens d'une manière plus générale, les ingénieurs et les écologues microbiens se sont longtemps concentrés sur certains groupes fonctionnels en particulier, présentant une fonction particulièrement intéressante, (les méthanogènes par exemple dans le cas de la digestion anaérobie). Ces supers microorganismes capables de réaliser la fonction cherchée dans un processus crucial étaient au centre des travaux et des préoccupations. L'approche basique consistait à essayer de favoriser et d'enrichir le bioprocédé avec ces microorganismes afin de réaliser les processus à moindre coût. Les actions contre productives étaient fréquentes du fait de la prise en compte non globale du système (*183*).

Afin de simplifier les systèmes et de mieux les contrôler, les chercheurs se sont également intéressés à la possibilité de créer des bioprocédés ne faisant appel qu'à un nombre réduit d'espèces de microorganismes. C'est le cas notamment de bioprocédés alimentaires ou à haute valeur ajoutée (production d'acides aminés, antibiotiques, vitamines par exemple). Ils ne font bien souvent intervenir qu'un seul ou deux types de microorganismes, mais sont difficiles à mettre en place du fait de la production éventuelle de sous-produits indésirables, et ont des besoins énergétiques importants pour purifier substrats et produits.

En 2008, Brenner s'interroge sur les possibilités d'ingénierie ouvertes par la biologie synthétique des microorganismes, et en particulier la création de consortia synthétiques de microorganismes (*184*). Ces systèmes semblent offrir des perspectives particulièrement intéressantes notamment pour passer outre les difficultés des bioprocédés biologiquement plus « simples » (dégradation des sous-produits toxiques, utilisation de substrats complexes, possibilité de produire plusieurs molécules d'intérêt, moins de contrainte de gestion *etc.*). De plus, les systèmes comportant plusieurs microorganismes semblent plus stables et résistent mieux aux perturbations. Ils seraient plus efficaces et adaptatifs grâce aux mécanismes de communication développés entre microorganismes. Dans une revue de 2010, Sabra fait un bilan de l'utilisation de consortia microbiens synthétiques ou non dans les bioprocédés industriels (*185*). Il fait la liste des paramètres importants à prendre en compte pour comprendre les interactions entre microorganismes et qui influencent le fonctionnement des bioprocédés : le mutualisme où les espèces se fournissent les unes les autres des avantages, la syntrophie qui en est un cas particulier où les transferts de métabolites entre microorganismes sont essentiellement utilisés pour la croissance, l'amensalisme où un microorganisme affecte un autre microorganisme sans en être affecté lui-même, ou encore le commensalisme où un seul des microorganismes bénéficie de l'autre. Les microorganismes peuvent être en compétition pour les substrats, et il existe également des phénomènes de parasitisme ou encore de prédation, etc. Malgré de nombreuses études sur le sujet, déterminer les types d'interactions microbiennes qui sont impliquées dans les consortia microbiens demeure toutefois un défi important. Par exemple, il a récemment été montré que la production du peptide plantaricin par *Lactobacillus*

plantarum NC8 n'a lieu que si la bactérie est co-cultivée avec certaines souches de bactéries Gram-positives ou encore avec ces mêmes cellules tuées à la chaleur (*186*).

L'utilisation de ces systèmes simplifiés avec seulement quelques espèces, qu'elles soient synthétiques ou non, est sans doute prometteuse, à condition toutefois de bien comprendre et maîtriser les interactions entre individus au sein des systèmes

4.3.2. Utiliser, manipuler ou ajuster

Aujourd'hui, à l'aide de la force d'appui fournie par les nouvelles sources de données à haut débit évoquées dans la partie 2.2.2, l'écologie microbienne pourrait passer d'un cadre purement descriptif à un cadre prédictif et quantitatif, dans lequel les principes écologiques seraient intégrés et exploités afin de construire des systèmes qui seraient biologiquement optimisés dans un but souhaité (*55*). Au lieu de recréer un écosystème artificiel simplifié, il serait donc légitime d'avoir l'ambition d'exploiter directement les communautés complexes, ainsi que leur capacité à s'autogérer et s'autoréguler. Les informations accumulées par l'écologie microbienne doivent être exploitées vers une ingénierie écologique des bioprocédés. Ces systèmes bénéficieront des avantages apportés par une communauté microbienne déjà constituée (stabilité et interactions) à un coût bien moindre que celui d'un système artificiel (*187*).

En particulier dans le cas de la dégradation de la cellulose des déchets en conditions anaérobies, des flores de dégradation ont pu être en partie décrites et la fonction d'un certain nombre de groupes microbiens clés caractérisée (*122*). Fort de ces premiers acquis, il faut maintenant étudier les relations entre les **performances de dégradation des déchets** et la dynamique de ces groupes microbiens. Ainsi il importe de caractériser l'action de différents paramètres sur la stabilité et la performance des communautés, ceci dans le but d'évaluer les possibilités d'orienter et de modifier les populations microbiennes, et donc les processus réactionnels associés, en actionnant différents types de **leviers environnementaux**. A terme, on peut imaginer une exploitation contrôlée des fonctions des microorganismes au service des bioprocédés de dégradation des déchets. On rejoint bien ainsi la notion d'ingénierie écologique, « manipulation *in situ* de systèmes écologiques pour une meilleure gestion des milieux », appliquée à l'échelle des communautés microbiennes et des bioprocédés. Voyons comment la mettre en place.

5. Quels outils pour réaliser l'ingénierie écologique des bioprocédés ?

5.1. Des paramètres à moduler

5.1.1. Notion de levier environnemental

5.1.1.1. Définition

Afin de modifier le système, ses fonctions, ses performances et sa population, différentes contraintes extérieures dont on sait qu'elles ont une influence sur l'équilibre et le fonctionnement de l'écosystème concerné peuvent être appliquées (*188*). Ces modifications de paramètres seront les leviers environnementaux qui nous permettront de guider l'écosystème vers un état qui nous est plus favorable. En les actionnant, on pourra induire des transformations au sein de l'écosystème microbien, de ses fonctions et de ses performances. Pour moduler ces transformations, on peut imaginer combiner différents leviers environnementaux. A terme, on peut même idéaliser l'ingénierie écologique des bioprocédés comme la gestion de bioréacteurs par une adaptation fine des paramètres de contrôle afin d'orienter les fonctions, et pouvant assurer une stabilité parfaite des procédés sur le long terme, quelles que soient les perturbations inattendues rencontrées.

Cependant les écosystèmes microbiens demeurent des organisations très complexes et il convient dans un premier temps de dresser un inventaire de leviers environnementaux simples, faciles à mettre en œuvre et utiles pour la conduite au jour le jour des bioprocédés (*158*).

5.1.1.2. Choix et sélection

Reprenons les attentes concernant les leviers environnementaux choisis. Ils doivent avant tout permettre de simplifier et de réduire la quantité de travail et d'énergie qui serait à mettre en œuvre pour réaliser la transformation souhaitée sans recourir à l'ingénierie écologique (*158*). Ils correspondent donc globalement à des modifications de paramètres simples à mettre en œuvre ou à maintenir et énergétiquement économiques par rapport à d'autres solutions. Par ailleurs, les leviers d'action ne doivent pas avoir d'effets secondaires trop contraignants ou négatifs pouvant aller à l'encontre de la démarche entreprise, en particulier dans les cas de multifonctionnalité (*189*). Il faut donc autant que possible être en mesure d'estimer et quantifier les conséquences qu'auront les leviers d'action, et si celles-ci seront réversibles ou non. Enfin, afin de valider la démarche d'ingénierie écologique des écosystèmes microbiens dans les bioprocédés, il est primordial d'identifier pour chaque grand type de modulation désiré des leviers environnementaux adaptés.

Dans le cas des bioprocédés, il faut distinguer les notions de leviers et de paramètres opératoires. En effet, même s'ils peuvent parfois prendre la même forme (un paramètre physico-chimique par exemple), leur objectif n'est pas le même. Les paramètres opératoires regroupent l'ensemble des conditions environnementales nécessaires au bon fonctionnement de la boîte noire microbienne. Les leviers environnementaux ont des objectifs plus ciblés. Ils visent à agir directement sur l'écosystème microbien contenu dans la boîte noire, pour modifier son équilibre, dans le but d'atteindre un état plus

favorable. Parfois, ils peuvent prendre la forme d'une modification pérenne ou temporaire d'un paramètre opératoire. Pour une gestion optimale des bioprocédés, il faut manipuler conjointement leviers environnementaux et paramètres opératoires. Les paragraphes suivants illustrent quelques uns des leviers d'action envisageables dans le cas de l'ingénierie écologique des bioprocédés de traitement anaérobie des déchets ligno-cellulosiques et l'influence qu'ils peuvent avoir.

5.1.2. Leviers physico-chimiques

5.1.2.1. La température

La température est un paramètre souvent contrôlable dans les méthaniseurs hors-sol. Ceux-ci peuvent mettre à profit le biogaz produit au cours du procédé afin de maintenir la température à la valeur souhaitée. Ce paramètre a donc été largement étudié. En particulier, de nombreuses études se sont intéressées à l'influence de ce paramètre sur la dégradation des déchets et la production de biogaz. Voyons dans un premier temps les conclusions de ces travaux.

Qu'il s'agisse des milieux naturels ou d'origine anthropique, la digestion anaérobie peut se dérouler dans une vaste gamme de température. Cependant, des études à différentes températures et dans des milieux variés ont permis d'identifier trois catégories de systèmes, en fonction de leur température de fonctionnement : les systèmes psychrophiles (5 à 20°C), mésophiles (20 à 45°C) et thermophiles (45 à 65°C). Bien que les grandes étapes métaboliques soient identiques pour les différentes conditions (Figure 16), la digestion à température élevée permet de raccourcir le temps de latence et d'accroître l'efficacité de la dégradation de la matière organique (*190-192*). Par conséquent, la digestion anaérobie aux températures thermophiles est généralement associée à une production totale élevée du biogaz et à une digestion plus complète (faible teneur en solides volatils dans les résidus de digestion). Par ailleurs, la digestion à des températures élevées favorise l'inhibition du développement des microbes pathogènes présents dans le déchet (*151, 192-193*). En revanche, les processus mésophiles utilisent moins d'énergie pour le chauffage (*194*) et sont généralement moins affectés par les effets inhibiteurs de l'ammoniaque libéré pendant la minéralisation des protéines (*195-196*). Enfin, si la température devient trop importante (conditions hyperthermophiles) une diminution du rendement de méthane ainsi qu'une accumulation d'AGV sont observés. L'activité des méthanogènes non hydrogénotrophes est par ailleurs réduite à la température de 65°C (*197*).

Ces études se sont souvent limitées à l'interprétation des données physico-chimiques sans prendre en compte les données de populations. Toutefois, l'impact de la température sur le développement des communautés microbiennes dans les procédés de digestion anaérobie est très important et différentes études qui le montrent ont été réalisées (*198-202*). La plupart de ces études se sont concentrées spécifiquement sur la structure de la communauté *Archaea*.

Les études de Wu *et al.*(*203*), Hernon *et al.*(*198*) et Levén *et al.*(*204*), montrent que les populations microbiennes sont différentes selon les températures considérées. L'étude d'Hernon montre par exemple le développement plus important des bactéries de la classe *Clostridia* en conditions thermophiles (Figure 20).

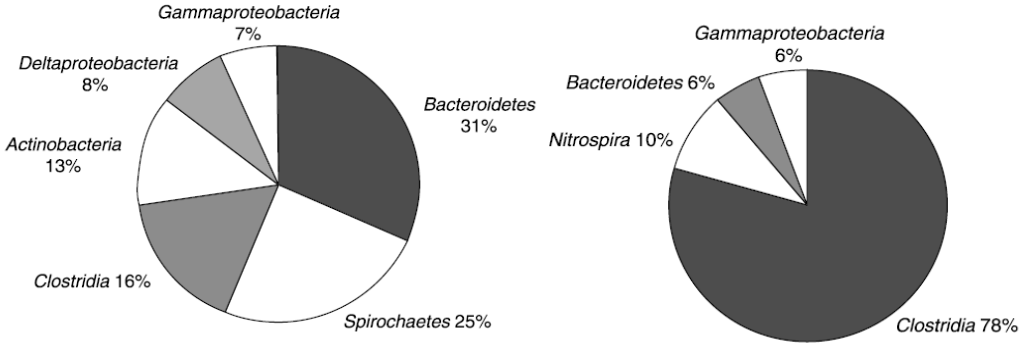


Figure 20 : Populations bactériennes identifiées au cours de la digestion anaérobie à différentes températures. D'après (*198*)

Cependant ces résultats ont été obtenus à partir de banques de clones et ne sont donc pas quantitatifs en théorie. Malgré tout, les populations microbiennes sont différentes et de ce fait la dégradation de mêmes substrats se fait par des communautés microbiennes adaptées aux différentes températures, probablement en faisant appel à des voies métaboliques spécifiques. Pour les archées, une étude de Conrad (*205*) montre qu'avec l'augmentation de la température on observe une part croissante de méthane produite via la voie hydrogénotrophe pouvant atteindre 100% à 50°C. Il semble donc que les voies de synthèse du méthane varient avec la température. De même, Li décrit en 2007 (*122*) les flores de dégradation de la cellulose à 35°C et 55°C et constate d'importantes différences.

La température est donc un paramètre particulièrement important de la digestion anaérobie et pourrait être utilisée comme un levier d'action en ingénierie écologique. Ainsi un changement de température pourrait induire des modifications importantes de la flore du bioréacteur et des voies métaboliques utilisées. La façon dont des changements successifs pourraient permettre d'aboutir à une biomasse « optimisée » vis-à-vis d'une fonction donnée reste toutefois indéterminée à ce jour.

5.1.2.2. Le pH et les acides gras volatils

Le pH optimum de fonctionnement d'un digesteur anaérobie est aux alentours de la neutralité. Le pouvoir tampon du milieu joue un rôle important pour maintenir la stabilité du système. Ainsi, l'étape d'hydrolyse peut être fortement inhibée lorsque le pH chute suite à une accumulation des AGV (si le pH du milieu est trop faible, le différentiel avec le pH intra-cellulaire est trop important et les acides intracellulaires s'accumulent). Veeken *et al.* ont d'ailleurs montré que le pH est le facteur majeur qui contrôle le taux d'hydrolyse du procédé de fermentation anaérobie, et non la concentration en AGV elle-même (*206*). De même pour la méthanogenèse, le pH optimum se situe entre 6,8 et 7,4 (*131*). Les archées méthanogènes peuvent être inhibées par une chute de pH. Cependant, une étude récente rapporte un résultat surprenant : la méthanogenèse à partir de l'acide acétique en condition acide (pH=4,5) aurait un rendement de méthane de 30% supérieur à celui obtenu en conditions neutres dans un réacteur mésophile (*13*).

Au-delà de son influence sur le pH, la concentration en AGV peut également influencer les différentes étapes de la digestion anaérobie. Cependant, à ce jour, aucune tendance nette ne s'est dégagée sur le rôle

et les concentrations d'inhibition des différents AGV, et celles-ci font encore débat. Divers travaux ont été réalisés et produisent des résultats différents, probablement en raison de la spécificité des systèmes d'étude. Ces aspects ne seront pas développés dans cette synthèse, le lecteur pourra trouver différents exemples dans les références suivantes (*197, 206-210*).

5.1.3. Ajouter des substrats simples pour stimuler et orienter l'activité microbienne

5.1.3.1. Principe

Différentes sous-voies métaboliques de dégradation de la matière organique et en particulier de la cellulose sont possibles, c'est-à-dire que la dégradation peut passer par des intermédiaires différents. Les différents types de réactions peuvent se dérouler en même temps, ou alors certaines peuvent être privilégiées par rapport à d'autres. L'orientation vers un type de réaction plutôt qu'un autre dépend des paramètres physico-chimiques du milieu, mais également des microorganismes présents (*9, 211*).

D'un point de vue opérationnel on peut préférer que la dégradation d'un substrat passe par certaines voies métaboliques plutôt que d'autres, dans le cas par exemple où un des intermédiaires formés pourrait être valorisable, ou alors pour orienter la dégradation vers des voies ayant des cinétiques de production de méthane plus importantes et donc des rendements accrus dans des méthaniseurs. Pour cela, on peut imaginer spécialiser un bioréacteur dans la réalisation d'une fonction ou d'un groupe de fonctions en particulier. Il faudrait dans ce cas que la contrainte imposée sur l'écosystème microbien du bioprocédé induise la dégradation du substrat selon des voies métaboliques spécifiques et contrôlées. Une des solutions possibles pour y parvenir serait de spécialiser la biomasse complexe initialement contenue dans le bioréacteur en une biomasse spécifique, pour laquelle la dégradation des substrats serait toujours orientée selon les mêmes voies métaboliques.

5.1.3.2. Le « priming-effect »

Afin d'illustrer ces idées, on peut citer comme parallèles les phénomènes dits de « priming-effect », ou effets d'amorce, introduits par Bingemann en 1953 (*212*). Ils ont été particulièrement étudiés dans les sols. Dans ce cas, on parle de priming-effect lorsqu'un traitement du sol (addition d'une substance au sol) a pour conséquence une modification des performances de minéralisation de la matière organique (amélioration/modification/retard, etc.). Dans sa revue publiée en 2000 (*213*), Kuzyakov dresse un bilan des nombreux cas de priming-effect observés et émet des hypothèses pour les expliquer. Parmi les différents cas possibles, l'auteur distingue les situations où le priming-effect observé s'accompagne de modifications importantes des populations et de l'activité microbienne à l'origine de la minéralisation du sol. Même s'il apparaît évident dans ces cas que le traitement du sol a modifié les communautés microbiennes avec pour conséquence des changements dans les performances de minéralisation du sol, les mécanismes biologiques et physico-chimiques en jeu ne sont pas clairs. Les auteurs émettent par exemple l'hypothèse que l'ajout de nouveaux substrats carbonés facilement dégradables dans le sol pourrait augmenter l'activité microbienne en général et donc la minéralisation du sol, peut-être par co-métabolisme. Cependant, d'autres hypothèses « non biologiques » sont également avancées. En 2003,

Fontaine va plus loin et imagine que l'ajout de substrats simples provoquerait le développement d'une communauté spécialisée dans ces substrats simples, induisant une compétition globale pour l'énergie et les nutriments avec les microorganismes dégradant la matière plus complexe, ceux-ci devenant en conséquence plus actifs et performants (*214*).

En 2005, Hamer étudie l'influence de différents substrats sur le priming-effect dans différents types de sols (*215*). Il met en évidence des priming-effect de plus ou moins grande importance (positifs ou négatifs) avec les différents substrats, et il semble que le priming-effect soit le plus important dans les sols les moins biodégradables où le substrat « simple » apporterait une grande quantité d'énergie aux microorganismes dégradant la matière complexe. Les mêmes auteurs travaillent également sur des systèmes avec ajouts répétés de substrats (*216*). Cette répétition a pour conséquence une augmentation du priming-effect qui se traduit par une meilleure dégradation des matières organiques complexes. Pour les auteurs, le co-métabolisme ou l'augmentation de la quantité de biomasse ne suffisent cependant pas à expliquer le priming-effect. Celui-ci serait également dû à des changements de structure de la communauté microbienne qui s'adapte au substrat ajouté. Toutefois, les auteurs ne disposent pas de données moléculaires pour étayer leurs hypothèses. Dans ce sens, Blagodatskaya (*217*) passe en revue les différentes hypothèses concernant les mécanismes de priming-effect et essaie de faire le lien avec les populations microbiennes. L'auteur souligne tout d'abord que le priming-effect n'implique généralement pas un unique mais plusieurs mécanismes et donc une succession de réactions et de communautés microbiennes. Cependant, la plupart des travaux se sont intéressés aux conséquences et pas aux causes du priming-effect, et malgré le développement des techniques moléculaires, peu de travaux les mettant en jeu sont répertoriés et peu de données écologiques explicatives sont disponibles. Les auteurs suggèrent de relier les futures observations à des données de biologie moléculaire, sur la dynamique et l'activité des communautés microbiennes, afin de progresser dans la compréhension des phénomènes observés. De même, Kuzyakov publie en 2010 une nouvelle revue sur le priming-effect (*218*). Il actualise les données de sa précédente revue (*213*), fait un point sur les nouvelles techniques permettant de mesurer les priming-effect et conforte le rôle des microorganismes dans les phénomènes observés, même si ce rôle reste très méconnu. Enfin, récemment, des phénomènes de priming-effect ont également été mis en évidence dans des écosystèmes aquatiques (*219*). Les auteurs émettent l'hypothèse que le priming-effect serait un phénomène général des écosystèmes. L'importance écologique du phénomène serait donc beaucoup plus grande que celle imaginée initialement pour les sols. De nombreuses questions demeurent malgré tout en suspens.

On voit avec ce parallèle que l'apport de substrats simples à des communautés complexes dégradant de la matière complexe peut avoir des conséquences importantes à la fois en termes de structure des populations et de performances de dégradation. La complexité de la matrice « sol » et le faible nombre de travaux impliquant l'étude des microorganismes n'ont pas encore permis de déterminer toutes les clés responsables du priming-effect, mais les possibilités d'exploitations dans des systèmes voisins semblent très importantes, sous réserve d'aller plus loin dans la compréhension des phénomènes biologiques impliqués.

5.1.4. S'inspirer d'autres systèmes microbiens

L'hydrolyse est généralement considérée comme le processus le plus lent et incomplet de la digestion anaérobie et reste donc l'étape limitante dans la dégradation du matériel cellulosique (*220*). Par conséquent, une augmentation du taux d'hydrolyse devrait mener à une augmentation de l'efficacité globale du procédé anaérobie de digestion. Les innovations permettant d'augmenter le taux d'hydrolyse sont cependant actuellement contraintes par le fait que l'écologie et les mécanismes microbiens de l'hydrolyse au cours de la dégradation anaérobie de la cellulose sont peu étudiés, en particulier au sein des ISDND ou des digesteurs anaérobies.

Les systèmes biologiques animaux de dégradation de la cellulose semblent quant à eux être beaucoup plus performants, sans doute suite à un processus de sélection et d'évolution très long. Par exemple, le consortium microbien présent dans le rumen de bovin hydrolyse la cellulose à 60-65% dans une durée relativement courte (jusqu'à 48 h), et il a même été rapporté que les termites sont capables d'assimiler la cellulose de bois à un taux supérieur à 90% (*221*). Dans les systèmes microbiologiques complexes, comme dans le sol ou dans un méthaniseur, la cellulose est décomposée à une échelle de temps beaucoup plus longue allant du mois à l'année. De plus, nous l'avons vu, un petit pourcentage de la cellulose est inaccessible aux attaques enzymatiques, particulièrement si elle est partiellement couverte par de la lignine.

Des bioprocédés reproduisant ou mimant les systèmes de digestion anaérobie naturels pourraient donc se montrer particulièrement performants pour accélérer cette étape d'hydrolyse (*222-223*). Dans le but d'essayer d'exploiter les fonctions des digesteurs naturels, on peut imaginer ajouter un consortium microbien plus performant à travers des apports de biomasse exogène, ou bioaugmentation. *Intéressons nous plus en détail aux systèmes animaux de dégradation de la cellulose, en particulier aux ruminants, puis aux potentialités de bioaugmentation ou co-inoculation.*

5.1.4.1. Exemple d'un système particulièrement performant : le rumen

- Quelques éléments clés

Les humains, et d'une manière plus générale les autres animaux n'ayant qu'un seul estomac, ne peuvent pas digérer la cellulose, le plus abondant des polymères organiques. Au contraire, les ruminants fournissent un habitat, le rumen, à des microorganismes anaérobies qui peuvent le faire. La digestion dans le rumen est même considérée comme le plus important des procédés de fermentation (*224*) avec un volume total d'environ 2.10^{11} L (*225*). Le rôle clé des microorganismes dans ces systèmes peut être illustré par le fait qu'environ 90 % des acides aminés qui atteignent l'intestin grêle proviennent des microorganismes du rumen (*224*). De plus, il semble que l'écosystème ruminal soit le plus élégant et évolué des systèmes digérant la cellulose dans la nature (*225*). En effet, le tractus gastro intestinal des herbivores contient un microbiome qui procède, de façon hautement spécialisée, à l'hydrolyse et la fermentation rapides de la partie lignocellulosique de leurs aliments.

Comme les aliments ne restent dans le rumen que pour une courte durée, la vitesse de dégradation de la cellulose doit y être très rapide. Celle-ci est facilitée par la rumination, au cours de laquelle les aliments

retournent dans la bouche pour être remâchés. Ceci permet une fragmentation importante de la cellulose, et la surface accessible aux microorganismes augmente considérablement (jusqu'à 10^6 fois) grâce à la diminution de la taille des particules. La dégradation de la cellulose est ainsi plus efficace (*224*).

- Flore du rumen

L'écosystème microbien du rumen contient environ 30 espèces principales de bactéries (10^{10}-10^{11}/ml), 40 espèces principales de protozoaires (10^5-10^7/ml) et 5 espèces principales de champignons (<10^5/ml) (*226*). Enfin, seulement 4% des microorganismes ruminaux sont des archées *(227)*. Les genres principaux retrouvés sont *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobiaceae* et *Methanosarcinaceae* (*228-229*). Parmi les bactéries, les genres *Bacteroidetes* et *Firmicutes* sont souvent prédominants (*230*).

On peut classer les bactéries du rumen en cinq groupes :

- les bactéries libres
- les bactéries attachées de façon lâche à la nourriture
- les bactéries attachées de façon ferme à la nourriture
- les bactéries associées à l'épithélium du rumen
- les bactéries associées à des protozoaires ou à des champignons

Les groupes 2 et 3 représentent environ 75% des populations microbiennes totales (*226*).

Le rumen fonctionne avec une densité en microorganismes très élevée (environ 15% en masse) et se distingue par une communauté microbienne dense, active et stable qui réalise une hydrolyse et une fermentation rapides de presque tous les composants de la biomasse (*225*). Néanmoins, la fermentation de la cellulose peut être augmentée par des conditions environnementales favorables telles qu'une température constante de 39°C, un potentiel d'oxydoréduction de -0.4V ou un pH neutre (*225*).

- Hydrolyse dans le rumen

Les bactéries cellulolytiques prédominantes du rumen sont *Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus* (*226*). Les espèces dominantes présentes dans le rumen peuvent varier en fonction de l'espèce animale, du régime alimentaire, de la localisation géographique et des méthodes de quantification, mais en général *F. succinogenes* est plus présente dans le rumen que les ruminococci (*231*).

Ces bactéries ont développé une spécialisation nutritionnelle extrêmement importante pour la cellulose (*232*). Elles sont capables d'utiliser la cellulose et ses produits d'hydrolyse comme leur principale source d'énergie (*226*). Leur activité cellulolytique est également la plus efficace de tous les microorganismes mésophiles, avec un taux de dégradation de 0.1 h^{-1} (qui correspond à la vitesse de croissance spécifique des bactéries cellulolytiques du rumen sur la cellulose (*225*)). La bactérie anaérobie thermophile *Clostridium thermocellum* est la plus efficace avec un taux de dégradation de 0.16 h^{-1}. La quantité de bactéries (matière sèche) dans le rumen étant d'environ 10 $g.L^{-1}$, ceci conduit à un rendement de

dégradation de 5 g de cellulose L^{-1} h^{-1} (*224*), c'est-à-dire 288 kg de DCO.m^{-3}.j-1 à comparer aux 1 à 40 réalisés par les méthaniseurs industriels (*211*).

- Rumen et méthanogenèse

L'étape de méthanogenèse permet aux communautés microbiennes du rumen de maximiser la récupération énergétique globale de la nourriture sous forme d'ATP par le transfert de H_2. Dans le rumen, la méthanogenèse a lieu presque complètement sous forme de la réduction du CO_2 pour la voie hydrogénotrophe ($H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4$). Théoriquement, la méthanogenèse acétoclaste est également possible ($acétate \rightarrow CO_2 + CH_4$). En pratique cette réaction n'a quasiment pas lieu dans le rumen car le temps de rétention est plus cours que le temps moyen de doublement des méthanogènes acétoclastes (*225*).

Les écosystèmes animaux de dégradation anaérobie de la cellulose dans le rumen sont donc particulièrement efficaces, et un méthaniseur de déchets pouvant les reproduire serait très intéressant. Voyons quelles sont les possibilités et les difficultés de transposition d'une flore dans un écosystème artificiel.

5.1.4.2. Bioaugmentation

De nombreux travaux font état d'expériences de bioaugmentation avec des biomasses variées afin d'apporter une fonctionnalité non présente dans un écosystème microbien, ou encore pour remplacer l'écosystème présent par un autre plus performant. En particulier, le traitement des eaux usées fait souvent appel à de la bioaugmentation en conditions aérobies. Les effets de ces bioaugmentations sont selon les cas plus ou moins efficaces (*183*). Les raisons avancées en cas de non succès sont diverses, mauvaise adaptation des microorganismes inoculés, insuffisance de la quantité de substrat, compétition entre la biomasse initiale et les espèces ajoutées, prédation, etc. (*233*).

En digestion anaérobie, les tentatives de bioaugmentation sont d'une manière générale moins nombreuses. Des auteurs ont évalué l'intérêt d'une bioaugmentation pour un retour à un état stable plus rapide suite à une perturbation du digesteur (*234-235*). D'autres encore s'intéressent à l'introduction d'une biomasse exogène pour améliorer la dégradation d'un substrat récalcitrant, ou encore améliorer les rendements de production de méthane (*236*). Ainsi, Angelidaki *et al.* travaillent sur la dégradation anaérobie du fumier et en particulier sur celle des fibres récalcitrantes. Différents traitements mécaniques, chimiques ou enzymatiques ont été testés dans ce sens, mais les auteurs concluent que les meilleurs résultats sont obtenus après bioaugmentation par une souche pure dégradant l'hémicellulose, la bactérie B4, qui augmente le potentiel de production de méthane de 30% par rapport aux témoins. En 2006, Cirne *et al.* ont testé l'influence d'une bioaugmentation avec une souche pure de bactéries anaérobies lipolytiques issues du rumen (*Clostridium lundense* (DSM 17049)) sur la digestion de déchets riches en lipides (*237*). Ils observent une vitesse de production du méthane plus rapide que sur les témoins, même s'ils n'ont pas pu valider que la souche lipolytique s'était implantée. Duran *et al.* évaluent quant à eux en 2006 l'effet d'un produit commercial de bioaugmentation contenant des bactéries des genres *Bacillus, Pseudomonas*, and *Actinomycetes* sur la digestion anaérobie de

solides, et en particulier la consommation des AGV et l'émission d'odeurs (*238*). Ils observent une production de méthane accrue, une moindre accumulation d'AGV et une réduction des quantités de molécules odorantes produites dans le réacteur bioaugmenté. L'origine de ces résultats n'est pas claire. Les auteurs émettent l'hypothèse que la bioaugmentation aurait pu améliorer les étapes d'hydrolyse ou de fermentation, ou encore modifier les voies métaboliques empruntées au cours de la dégradation.

Les possibilités de bioaugmentation sont donc nombreuses, et même si leurs effets ne sont pas encore toujours très bien compris, les potentialités de modification de la biomasse, d'introduction d'une fonctionnalité nouvelle ou d'amélioration de la dégradation ou encore de la production de biogaz semblent prometteuses. Les nouveaux outils de la biologie moléculaire (*cf.* paragraphe 2) donneront un éclairage nouveau pour mieux interpréter les conséquences de ces manipulations afin d'en faire des leviers environnementaux pour l'ingénierie écologique.

5.1.5. D'autres leviers d'action sont possibles

Bien entendu, les exemples donnés dans les paragraphes précédents ne constituent pas une liste exhaustive des leviers d'action possibles, mais sont quelques exemples de paramètres facilement modulables et dont on peut imaginer qu'ils auront un effet visible sur les systèmes.

On peut essayer de construire d'autres leviers en modifiant les paramètres physico-chimiques des milieux, comme la concentration en certains sels ou éléments rares. Des modifications de la biomasse complexe sont également possibles pour éliminer certaines de ses composantes, par aération par exemple ou d'une manière plus complexe en faisant appel à des virus qui détruiraient spécifiquement certains types de microorganismes (*9, 211*). On peut également travailler sur la conception des méthaniseurs pour faciliter le développement de certaines populations, par exemple en procurant des supports pour des microorganismes se développant en biofilm, ou en ajustant le brassage au sein des réacteurs pour mieux convenir aux populations à favoriser. On peut aussi jouer sur la nature et la composition du substrat introduit en entrée de méthaniseur. Ainsi «codigérer» plusieurs substrats en même temps pourrait se révéler bénéfique pour les différentes populations de microorganismes produisant des intermédiaires utiles aux unes et aux autres mutuellement.

La palette des leviers possibles est donc très grande, et **il est impossible de la définir *a priori*** avec les connaissances actuelles. Des connaissances approfondies de la diversité microbienne des bioprocédés, de leur métabolisme et de leur physiologie, en prenant en compte l'écosystème d'une manière globale sont encore à acquérir. L'ingénierie des bioprocédés va se construire progressivement, pas à pas, afin d'arriver à des modulations de plus en plus fines des processus avec des leviers environnementaux adaptés. Le défi est de déterminer quels types de perturbations permettront de satisfaire la mise en place d'un système répondant à nos besoins (*239*).

5.2. Sur quels concepts écologiques s'appuyer ?

Nous l'avons vu au début de la partie précédente, afin de pouvoir mener à bien l'ingénierie écologique des bioprocédés, un cadre théorique est nécessaire. Différentes théories écologiques ont été développées afin de faciliter les mesures de la diversité des espèces, des évolutions de répartition au sein

de la communauté ou encore les effets de différents paramètres et d'interactions sur les populations. Cependant, ce cadre théorique a été développé autour de macrosystèmes, mais il n'existe que peu d'éléments développés spécifiquement pour les écosystèmes microbiens. Toutes les théories écologiques macroscopiques ne peuvent pas être adaptées à une échelle microscopique. Voyons sur lesquelles nous pouvons nous appuyer.

5.2.1. Mesure de la stabilité, résilience et résistance

Dans la gestion des bioprocédés, il est très important de pouvoir déterminer quand un système est stable mais plus difficile de prévoir son instabilité. De même, il est important de savoir comment un système est capable de résister à une perturbation extérieure, et comment il se comportera dans le cas où les conditions environnementales redeviendraient les mêmes après une perturbation, en d'autres termes pourrait-il retrouver son état normal (résilience). Dans un cadre plus écologique et plus global, la gestion des écosystèmes en vue de l'atteinte d'états stables et résilients constitue un objectif très largement partagé. Différentes composantes de la stabilité ont d'ailleurs été énoncées : la résilience, qui est mesurée par la vitesse de retour à l'état d'équilibre initial suite à une perturbation ; la résistance, qui traduit la capacité à rester à l'état original lors d'une perturbation ; la robustesse, qui estime le niveau de perturbation que peut tolérer un système avant de passer dans un autre état ; et enfin la persistance, qui indique si un système est capable de se maintenir au cours du temps ou non.

En particulier, de très nombreux travaux théoriques et expérimentaux ont été réalisés afin d'étudier la relation entre biodiversité et stabilité fonctionnelle et microbienne des systèmes (*21, 240*). L'évolution des conclusions sur cette relation montre à quel point la stabilité est une notion difficile à appréhender et à comprendre. Ainsi, dans les années 60, on estime que la diversité (complexité) du système engendre la stabilité. Plus il y a de flux d'énergie (interactions) entre les membres de l'écosystème, plus celui-ci est stable à la perte de l'un d'entre eux. Des travaux réalisés au début des années 70 vont plutôt dans le sens d'une corrélation inverse, la complexité du système engendrerait une moindre stabilité, le système pouvant moins facilement retourner à son état d'équilibre suite à une perturbation du fait de la plus grande complexité des interactions et donc d'un risque accru de propagation des perturbations dans le système, celles-ci pouvant se maintenir. Finalement, dans les années 90, de nouvelles approches de la notion d'écosystème, faisant un lien explicite entre la variabilité des espèces et la variabilité des propriétés des écosystèmes ramènent à l'idée initiale que la diversité engendre la stabilité. En particulier, on pense que la biodiversité tamponne l'effet des perturbations sur le déroulement du processus. Des compensations fonctionnelles dues aux réponses différentes des espèces à la perturbation donnent l'assurance d'un meilleur fonctionnement de l'écosystème, les espèces redondantes pouvant montrer une complémentarité temporelle assurant la continuité des fonctions. Cependant, malgré tous les travaux réalisés pour comprendre les phénomènes à l'origine de la relation stabilité-diversité, les écologues débattent encore aujourd'hui sur l'universalité de la corrélation positive entre ces deux notions (*241-248*).

Ces approches ont principalement été réalisées sur des systèmes macroscopiques, mais depuis quelques années, des travaux sur des communautés microbiennes ont été publiés précisant l'importance de ces notions. Kaewpipat étudie l'évolution de populations microbiennes dans un digesteur aérobie au cours

du temps. Il observe que des réplicats préparés dans les mêmes conditions présentent des dynamiques de diversité des communautés importantes, même si les performances globales des systèmes ne varient pas (*249*). De plus, pendant un temps les dynamiques sont les mêmes dans les réplicats, mais elles finissent par diverger. L'auteur suggère pour éviter les divergences de préadapter les communautés aux conditions expérimentales. On retrouve des conclusions proches dans les travaux de Fernandez (*250*) et de Zumstein (*251*). Fernandez étudie par ARDRA les dynamiques des archées et des bactéries d'un réacteur de méthanisation. Elle observe des évolutions dans les populations d'archées et d'importantes variations chez les bactéries au cours du temps, ainsi que des modifications dans les métabolismes mis en jeu. Malgré cela, les performances globales du système restent inchangées. Il semblerait donc dans ce cas qu'une extrême plasticité dans la composition des communautés microbiennes permette de maintenir un fonctionnement stable de l'écosystème. Zumstein obtient des résultats équivalents avec analyse par SSCP de réacteurs anaérobies. Elle suggère que la dynamique importante observée serait due à différents paramètres biotiques, comme des phages ou de la prédation (le système étant continu et les paramètres physicochimiques constants). De la même façon, Hoshino s'intéresse en 2006 aux communautés de dégradation aérobie des eaux usées (*252*) et montre l'importance de la succession de différentes communautés pour mettre en place un processus aux performances stables.

Pour McMahon, les concepts de perturbation et stabilité sont primordiaux pour comprendre et gérer les systèmes microbiens. Ils doivent être considérés de différentes façons (*239*). Tout d'abord il faut considérer les perturbations abiotiques qui sont inévitables. Dans ce cas si l'on souhaite maintenir la redondance fonctionnelle pour résister aux perturbations et maintenir un système stable, il faut maintenir une diversité microbienne élevée. Cependant, il faut garder à l'esprit que les perturbations peuvent être utilisées pour mieux contrôler les communautés microbiennes (*21, 253*). Cette fois, on ne cherche plus à avoir la diversité la plus grande mais à la contrôler. Ce n'est pas forcément incompatible avec le maintien d'un système stable. Ainsi McMahon a observé que les digesteurs anaérobies résistaient mieux aux surcharges organiques quand leurs communautés avaient déjà été soumises à des perturbations (*254*).

Autant que dans les systèmes macroscopiques, stabilité, résistance et résilience sont des notions essentielles pour suivre et comprendre l'évolution d'un écosystème microscopique. Cependant, du fait d'un nombre d'espèces, d'une diversité de niches, d'une redondance fonctionnelle et d'une quantité d'interactions beaucoup plus importants et moins connus, l'appréhension et la bonne maîtrise de ces notions restent très complexes. Il faut toutefois les garder à l'esprit et les intégrer autant que possible dans les concepts de gestion des bioprocédés.

5.2.2. Mesure de la diversité et de la dynamique des populations

En pratique, quand on étudie la biodiversité d'un écosystème, l'espèce est l'unité la plus accessible, de cette façon, la diversité peut être mesurée de plusieurs manières (richesse, uniformité) (*255*). Toutefois, en microbiologie, comme nous l'avons vu, la notion d'espèce fait encore l'objet de nombreux débats. Différentes mesures de la diversité sont heureusement possibles indépendamment d'une définition précise des espèces. Par exemple, la diversité génétique rend compte de l'ensemble de l'information génétique contenue dans les êtres vivants, elle est le reflet de la variabilité génétique entre espèces et au

sein d'une même espèce mais n'est pas accessible aisément et fournit une masse d'informations longue à interpréter (*256*). Les microorganismes peuvent ainsi être regroupés en phylotypes en fonction de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S, mais cela ne permet pas toujours de faire le lien avec espèce et fonction comme dans le cas des systèmes macroscopiques. Une autre façon intéressante de mesurer la diversité est de traduire les informations données par des marqueurs biologiques en indicateurs, appelés indices de diversité. Ceux-ci donnent pour un écosystème à un moment donné une estimation de la diversité (*257-258*) exprimée sous forme d'une valeur numérique, plus aisée à interpréter.

5.2.2.1. Les indices de diversité

De nombreux indices de diversité ont été développés à l'échelle macroscopique pour caractériser les populations des écosystèmes. A l'échelle microbienne, les techniques de fingerprinting, ou plus généralement les techniques utilisant un marqueur moléculaire pour estimer la proximité ou la différence entre des microorganismes semblent être les sources d'informations les plus pertinentes et simples pour estimer la diversité des populations. De fait, différentes tentatives d'appropriation en écologie microbienne des connaissances développées en écologie classique ont été réalisées.

D'un point de vue pratique, les données issues des techniques d'empreinte génétique (comme l'ARISA que nous avons utilisée dans ce travail de thèse), fournissent différents types de données : pics de fluorescence (bandes sur un gel) dans les profils (exploitation de données qualitatives type absence/présence de pics) et/ou leur abondance relative (exploitation de données quantitatives basées sur l'aire ou la hauteur des pics de fluorescence). Selon les indices de diversité utilisés, toutes ou partie de ces informations sont exploitées.

Kapley estime que les deux principaux facteurs à prendre en compte pour quantifier la diversité microbiologique sont la richesse et l'uniformité (« evenness ») (*255*). La richesse est une mesure des différentes sortes de microorganismes présents dans un endroit en particulier et l'équitabilité permet de comparer l'abondance relative des différentes espèces (si une espèce est beaucoup plus abondante que les autres, l'équitabilité est faible). L'indice de diversité idéal devrait refléter le nombre de biotypes différents, leur abondance relative et les distances taxonomiques entre eux.

Les indices les plus couramment utilisés sont les indices de Simpson et de Shannon (*259*). Ils font appel à la richesse en espèce, et pondèrent les groupes en fonction de leur abondance.

- **L'indice de Simpson** peut se calculer de la manière suivante :

$$D = \sum_{i=1}^{n} o_i^{\,2}$$

où n est la taille totale de l'échantillon (par exemple le nombre d'OTUs (operational taxonomic unit) ou avec des profils ARISA le nombre de bandes identifiées d'un échantillon) et o_i l'abondance relative du i-ème phylotype (OTU ou bande d'un profil ARISA).

L'indice de Simpson est une mesure de la probabilité de "tirer" dans l'échantillon deux individus du même phylotype (*256*). Il est également utilisé sous la forme 1-D, -logD, ou encore 1/D qui varie de 1

(pour une communauté ne contenant qu'un seul phylotype) à l'infini (pour des populations dont la diversité biologique est de plus en plus grande).

- **L'indice de Shannon** est défini de la manière suivante :

$$H = -\sum_{i=1}^{n} o_i \ln(o_i)$$

où n est la taille totale de l'échantillon et o_i représente l'abondance/intensité relative de l'i-ème OTU.

L'indice de Shannon caractérise la redondance de la communauté. Il reflète la difficulté de prédire l'identité de l'individu suivant que l'on cherche à identifier. C'est une mesure d'entropie de l'échantillon : pour une communauté dans laquelle chaque organisme est distinct des autres, l'entropie est maximisée (*256*). Ainsi plus la communauté est riche en OTUs, plus H augmente. Cet indice est influencé par les variations d'abondances des OTUs rares (*260*).

Ces deux indices sont utilisés pour estimer la diversité d'échantillons que l'on souhaite comparer entre eux. Par exemple Cardinale *et al.* (*261*) comparent les performances de plusieurs sets d'amorces universelles ciblant les bactéries pour l'ARISA par l'intermédiaire des indices de Shannon et Simpson obtenus à partir de différents types d'échantillons.

Ces indices, et d'une manière plus générale les indices de diversité biologique, apportent une information globale sur la richesse en espèces des communautés. Cependant, ils n'offrent pas la possibilité de différencier des communautés de même richesse en espèce mais dont la composition serait différente. Les indices de similarité/dissimilarité le permettent. Ils ne tiennent pas compte uniquement de la diversité de chaque échantillon, mais comparent les échantillons deux à deux. Parmi les indices utilisés, on peut citer par exemple l'indice de Sorenson et l'indice de Jaccard.

- **L'indice de Sorenson** se calcule de la manière suivante :

$$Cs = \frac{2n}{x+y}$$

où n correspond au nombre de phylotypes communs aux deux échantillons, x et y étant le nombre de phylotypes contenus dans les échantillons X et Y respectivement (*262*).

- **L'indice de Jaccard** se calcule de la manière suivante :

$$J = \frac{n}{n+x+y}$$

où n désigne le nombre de phylotypes communs aux deux échantillons comparés, et x et y le nombre de phylotypes présents dans l'un des échantillons mais absents dans l'autre. Cet indice permet d'obtenir un pourcentage de similarité entre les deux échantillons étudiés. Dans certains cas, on utilise plutôt la distance de Jaccard (1-J) qui permet d'obtenir un pourcentage de dissimilarité entre les échantillons (*263*).

Cette approche par similarité/dissimilarité est qualitative (données de présence ou absence) mais ne tient pas compte des abondances relatives entre les espèces. Hill présente d'autres indices de diversité ou modèles d'abondance que nous n'aborderons pas ici (*259*). Afin d'exploiter les indices de diversité obtenus, différentes méthodes statistiques sont possibles. Kent compare par exemple les communautés bactériennes de différents lacs (*264*) à l'aide d'ANoSIM (ANalysis of SIMilarity) qui permet de déterminer si des profils sont statistiquement différents. De même Nelson l'utilise pour déterminer l'impact du NaCl sur les populations microbiennes du sol (*265*). Nous ne présenterons pas en détail les différents tests possibles, mais ceux utilisés dans ce travail de thèse seront présentés au fil du texte du manuscrit.

Ces indices ont fait leurs preuves dans le domaine macroscopique et sont aujourd'hui de plus en plus utilisés dans les systèmes microbiens. Intéressons-nous de manière prospective aux développements des mesures de la diversité dans les systèmes macroscopiques afin d'imaginer les perspectives d'évolution de mesure de la diversité des systèmes microbiens.

5.2.2.2. De nouvelles mesures de la diversité

Marzorati (*266*) propose en 2008 un outil d'interprétation théorique des profils de fingerprinting en général, basé sur trois paramètres. Un représente la richesse, l'autre la dynamique et le dernier des traits fonctionnels. Le calcul de ces trois paramètres permet de représenter les communautés microbiennes (profils de diversité) en trois dimensions et de les regrouper.

Par ailleurs, de nouveaux indices tendent à être utilisés pour l'écologie des systèmes macroscopiques afin de réaliser les mesures de diversité les plus fonctionnelles possibles. En effet, jusqu'à présent les approches étaient plutôt taxonomiques, on a maintenant une approche par trait, pour essayer de plus se focaliser sur l'aspect fonctionnel. On essaye de mettre en relation l'identité fonctionnelle avec un classement taxonomique (*267*). Le lien diversité fonction est plus difficile à mettre en œuvre car il faut faire appel à des données sur le fonctionnement de l'écosystème (ce serait par exemple la fonction de dégradation de la cellulose dans notre cas). Les connaissances sont encore trop lacunaires concernant les écosystèmes microbiens, mais des approches corrélatives seraient idéales afin de mettre en lien l'abondance d'une espèce particulière avec une quantification d'un paramètre (dégradation de la cellulose, production de gaz ou autre donnée physicochimique). Par ailleurs, d'autres indices prennent en compte l'identité, l'abondance et les différences entre les espèces (entropie quadratique) (*268*). Les différences entre espèces peuvent être mesurées avec des différences taxonomiques (divergence de séquences par exemple), et des différences de caractéristiques fonctionnelles (de manière qualitative au niveau trophique, réalisation d'une fonction ou non, ou de façon quantitative avec par exemple l'efficacité de la dégradation de certains métabolites). Ces approches sont plutôt descriptives.

Afin de simplifier l'étude de systèmes microbiens complexes, l'idéal serait de pouvoir repasser à une échelle plus réduite par l'étude de la diversité au niveau de niches écologiques, c'est-à-dire autour de certains métabolites associés à certains microorganismes seulement. Il faut pour cela quantifier les fonctions. Enfin, on peut penser à des méthodes de «Capture-Marquage-Recapture» pour déterminer l'abondance totale d'une espèce. En effet, le biais est moins grand en réalisant plusieurs relevés

d'échantillons qu'un seul (les probabilités de trouver « tous » les microorganismes au final sont plus grandes). Ces méthodes permettent d'estimer le nombre total de représentants d'une espèce dans une communauté et de donner des informations sur l'abondance. Des logiciels comme ComDyn ont été développés à cet effet (*269*).

De nombreux concepts sont donc disponibles, il ne reste plus qu'à les adapter à l'échelle microbienne ou à obtenir une quantité d'informations suffisante sur les microorganismes pour pouvoir utiliser ces outils.

6. Conclusion

Cette synthèse introductive a permis de présenter le contexte du travail qui a été réalisé pendant cette thèse. On voit se dessiner les enjeux de l'implantation de l'ingénierie écologique au sein des bioprocédés microbiens. Des travaux sont nécessaires pour une bonne mise en place, mais de nombreux outils sont déjà disponibles. L'écologie, l'ingénierie et la microbiologie doivent être adaptés pour mieux soutenir l'interdisciplinarité (*239*) et faire converger les concepts et les approches. Ainsi, on pourra atteindre l'objectif de gestion optimisée et contrôlée des bioprocédés de dégradation anaérobie des déchets ligno-cellulosiques à travers l'ingénierie écologique des communautés microbiennes.

– Problématique et objectifs

La production croissante de déchets et les objectifs de réduction des impacts environnementaux associés poussent à l'amélioration des méthodes actuelles de gestion. Parmi celles-ci, les éléments de contexte présentés dans le chapitre précédent mettent en avant les potentialités importantes offertes par les bioprocédés de traitement anaérobie des déchets. Ces méthodes reposent sur l'exploitation des fonctions de microorganismes capables de réaliser la dégradation de macromolécules en molécules plus petites, jusqu'au méthane, composant énergétique valorisable du biogaz. Pour améliorer ces modes de traitement, il faut mieux comprendre le fonctionnement de l'écosystème microbien des bioprocédés et apprendre à stabiliser, modifier, voire orienter son comportement. Pour cela la démarche d'ingénierie écologique semble fournir des concepts et des méthodes nouveaux, très prometteurs bien que peu ou pas encore exploités dans ce type de système.

Dans cette perspective, l'objectif du travail présenté dans ce manuscrit est d'évaluer la possibilité de mettre en place une démarche d'ingénierie écologique des communautés microbiennes dans les bioprocédés de traitement anaérobie des déchets ligno-cellulosiques. En ce sens, je me suis interrogé sur **les conséquences écologiques et métaboliques de l'application de leviers environnementaux aux écosystèmes microbiens complexes de bioprocédés anaérobies**.

Pour cela, plusieurs leviers environnementaux ont été sélectionnés. Les conséquences des perturbations apportées par ces leviers sur les dynamiques métaboliques et écologiques de bioréacteurs anaérobies dégradant de la cellulose ont été évaluées. Différents indicateurs physico-chimiques ont été utilisés pour caractériser la dégradation de la cellulose (production de molécules intermédiaires, production de gaz…). Les outils de la biologie moléculaire ont permis de caractériser les dynamiques microbiennes à l'échelle des communautés (par fingerprinting) ou des individus (par séquençage). L'utilisation d'isotopes stables (cellulose marquée ^{13}C), technique de « stable isotope probing » a permis de réaliser un traçage précis des flux de matières (intermédiaires de dégradation de la cellulose enrichis en ^{13}C) et des microorganismes impliqués dans la chaîne de dégradation de la cellulose (groupes microbiens fonctionnels). Les bioréacteurs utilisés sont des modèles simplifiés, ne reproduisant pas l'ensemble des contraintes de systèmes industriels, mais idéaux dans une première approche.

Parmi les différents leviers environnementaux possibles, trois ont été retenus. Le premier était physico-chimique. Il s'agissait de la température. Le deuxième consistait en une adaptation préalable d'une biomasse complexe par incubation avec des molécules simples avant mise en présence de cellulose. Le dernier consistait en la co-inoculation de diverses biomasses exogènes avec une boue anaérobie. Ces différents leviers ont été choisis car ils étaient susceptibles d'avoir des conséquences importantes sur la digestion de la cellulose et correspondaient à trois catégories d'actions différentes. Dans le cas de la température, le levier environnemental s'apparentait à un paramètre opératoire facilement contrôlable. La préadaptation avec des molécules simples correspondait quant à elle à une simplification de la communauté microbienne complexe alors que la co-inoculation s'apparentait à une complexification de cette communauté.

Le chapitre qui suit, intitulé matériel et méthodes, décrit les systèmes expérimentaux et les méthodes analytiques utilisés. Il présente également en détail le travail expérimental réalisé pour l'étude de chaque levier environnemental. Les trois chapitres suivants présentent les résultats obtenus après l'application

de chacun des trois leviers environnementaux décrits plus haut. Ces résultats sont discutés à la fin de chacune des parties. Une discussion plus globale est présentée ensuite. Elle synthétise l'ensemble des résultats obtenus et essaye de dégager de grandes tendances afin d'évaluer les conséquences écologiques et métaboliques de l'application de leviers environnementaux aux écosystèmes microbiens complexes de bioprocédés anaérobies, et les possibilités d'en faire des outils pour l'ingénierie écologique.

– Matériel et méthodes

1. Système expérimental

Pour étudier les processus de dégradation de la cellulose, des incubations en microcosmes anaérobies ont été utilisées (Figure 21). Ces microcosmes sont constitués de bouteilles dans lesquelles on a introduit un inoculum anaérobie (culot de digestat d'ordures ménagères), du tampon liquide (lixiviat centrifugé), le substrat à dégrader (cellulose par exemple), et éventuellement une biomasse supplémentaire dans le cas de co-inoculation. Les bouteilles sont fermées par un septum en caoutchouc permettant de maintenir des conditions anaérobies. L'air initialement présent est remplacé par de l'azote. Selon les conditions de l'étude, les fioles sont incubées à 35°C ou 55°C.

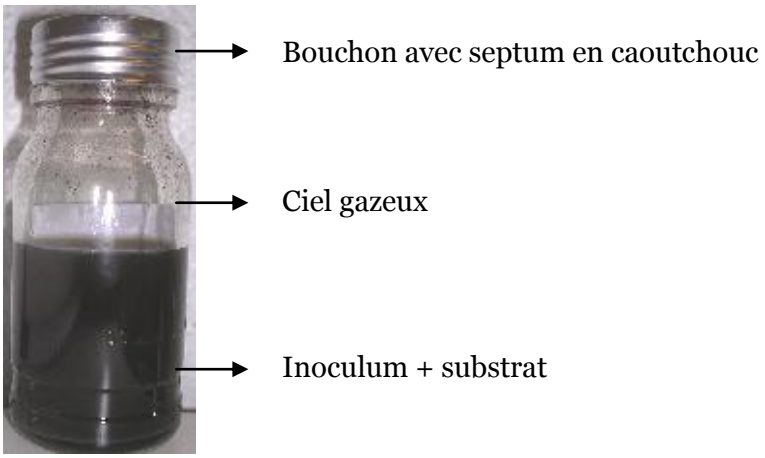


Figure 21 : Microcosme d'étude de la dégradation anaérobie utilisé dans cette thèse.

1.1. Dispositif expérimental

Les bouteilles utilisées comme bioréacteurs anaérobies sont des flacons à plasma de 150 ml utiles (La Parisienne de Verrerie), en verre borosilicaté. Les bouteilles sont fermées hermétiquement par un septum en caoutchouc d'une épaisseur de 5,5 mm et une bague à vis en aluminium de 40 mm de diamètre (La Parisienne de Verrerie). Le bouchon en caoutchouc permet de faire une centaine de prélèvements (gaz et liquide) tout en conservant une étanchéité parfaite.

1.2. Inoculum

Afin d'inoculer les microcosmes, du digestat d'ordures ménagères a été utilisé. De la boue de digesteur a été prélevée dans deux digesteurs anaérobies d'ordures ménagères fonctionnant en conditions mésophiles (Varennes-Jarcy, 77) et en conditions thermophiles (Graincourt-lès-Avrincourt, 62). Le digestat contenait de nombreux morceaux d'OM de taille importante et non digérés qu'il fallait éliminer avant utilisation tout en limitant au maximum l'exposition du digestat à l'air pour ne pas tuer les microorganismes. La viscosité de départ du digestat ne permettait ni de le filtrer ni de le tamiser directement, par conséquent, le digestat a dans un premier temps été lavé à l'eau, et le mélange obtenu a été filtré pour éliminer les imputrescibles ou les gros morceaux d'OM résiduels. Pour cela 500 mL d'eau distillée ont été ajoutés à des fractions de 400 g de digestat. Le mélange a été agité dans un bocal fermé.

Après agitation, le contenu a été aspiré sur un filtre Büchner. Les fractions liquides ont été réunies et tamisées sur trois tamis (2 mm ; 1 mm ; 0,5 mm). Le liquide obtenu a ensuite été incubé en conditions anaérobies à 35°C ou 55°C pour permettre à une éventuelle source de carbone facilement biodégradable d'être dégradée (incubation pendant plusieurs jours jusqu'à l'arrêt de la production de biogaz). A la fin de cette "pré-digestion", le liquide a été centrifugé (10000 g pendant 15 minutes) et les culots obtenus conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les caractérisations physico-chimiques des inocula sont présentées au paragraphe 9.1.

1.3. Tampon liquide

Afin de s'affranchir de l'inhibition par la disponibilité de l'eau, le système est saturé par l'ajout de lixiviat. Ce milieu a été choisi car il reproduit les conditions "réelles" de dégradation des déchets et car il présente un pouvoir tampon important, ce qui évite une acidification du milieu (et donc inhibition de la méthanogenèse) lors de la production des AGV. Le lixiviat utilisé provient d'un casier d'une installation de stockage de déchets non dangereux en phase de méthanogenèse stable (casier 412BL, Vert-le-Grand, 91). Après prélèvement, le lixiviat a été centrifugé afin d'éliminer la plus grande partie des microorganismes qu'il contenait (10000 g pendant 15 minutes à 4°C). Les surnageants ont été réunis et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les caractérisations physico-chimiques du lixiviat sont présentées au paragraphe 9.1.

1.4. Biomasses exogènes

Des expériences de co-inoculation ont été réalisées avec du contenu ruminal de vache et de la boue de bassin d'aération de station d'épuration. Le « jus de rumen » a été prélevé sur des animaux vivants et sains. Les boues ont été prélevées à la station d'épuration d'Etrechy (91) dans un bassin d'aération. Dans les deux cas, le liquide collecté a été tamisé sur trois tamis (2 mm ; 1 mm ; 0,5 mm) afin d'éliminer les grosses particules organiques. Le filtrat a été centrifugé et les culots et surnageants obtenus ont été conservés séparément à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les caractérisations physico-chimiques des biomasses exogènes sont présentées au paragraphe 9.1.

1.5. Ciel gazeux

Le gaz utilisé pour remplir le ciel gazeux des flacons à plasma est de l'azote (pureté>99,99%, Linde gas SA).

1.6. Substrats utilisés

La cellulose utilisée pour les incubations est synthétisée par *Acetobacter xylinum* (*270*) à partir de glucose marqué en ^{13}C ou non (synthétisée au CERMAV, CNRS). La cellulose enrichie contient 99% de ^{13}C. Ce type de cellulose a été choisi car il présente une structure cristalline proche de celle de la cellulose retrouvée dans le milieu naturel. Dans certains témoins de dégradation, de la cellulose industrielle (cellulose alpha, Sigma-Aldrich chimie) présentant des domaines cristallins et amorphes a été utilisée à la place de la cellulose bactérienne pour des raisons de coût. Les incubations pour lesquelles ce type de cellulose a été utilisé seront signalées au fil du texte dans le manuscrit.

Le foin utilisé est le « Foin de prairie pour rongeurs », Hanspet.

La cellulose bactérienne et le foin ont été broyés en fines particules à l'aide d'un broyeur à billes en inox (MM400, Retsch, 30 mouvements par seconde pendant 3 minutes).

Enfin, certaines incubations ont été réalisées avec de l'acide propionique (Sigma), de l'acide butyrique (Sigma), du glucose (Aldrich) ou du cellobiose (CalBiochem).

2. Mise en place des incubations

Sauf cas particuliers indiqués au fil du texte dans ce mémoire, l'ensemble des incubations a été réalisé comme décrit dans le paragraphe suivant.

La veille le milieu de culture (lixiviat centrifugé) et les culots d'inoculum sont mis à décongeler à 4°C. 6.4 g de culot sont repris dans 20 ml de milieu de culture dans un tube Falcon®. Le tube est agité et vortexé jusqu'à resuspension du culot. Le mélange est introduit dans un flacon plasma. Du lixiviat centrifugé est ajouté pour atteindre le volume final désiré (112 ml). Les flacons sont agités pour assurer une bonne homogénéisation. Un premier prélèvement liquide de 6 ml est réalisé (appelé par la suite t-1) pour pouvoir évaluer la reproductibilité des différents microcosmes mis en place au cours du temps et des expériences de cette thèse. Si nécessaire le substrat ou la biomasse supplémentaire (dans le cas d'une bioaugmentation) sont ajoutés dans le flacon. Une fois ces opérations réalisées, un bouchon en caoutchouc est placé sur le flacon, ainsi qu'une bague à vis. Le ciel gazeux dans les flacons à plasma est lavé à l'azote à l'aide d'une rampe à vide. Trois cycles vide-gaz sont effectués, et on contrôle qu'il reste moins de 0,3% d'oxygène dans le ciel gazeux en fin de cycles. Un second prélèvement liquide de 6 ml est réalisé, il est utilisé pour avoir un aperçu de l'état initial du système (appelé par la suite t0). Les flacons sont ensuite incubés à la température désirée, dans une pièce thermostatée à 35°C ou dans une étuve à 55°C. Ils contiennent alors 100 ml de liquide et 50 ml de ciel gazeux. Ils ne sont pas agités, sauf au moment des prélèvements liquides ou des analyses de gaz.

3. Suivi des productions de biogaz

3.1. Prélèvement et analyse du biogaz

Les productions de biogaz sont suivies à partir de mesures régulières de la pression dans les microcosmes et d'analyses de la composition du ciel gazeux. La température et la valeur de la pression atmosphérique peuvent avoir une forte influence sur les mesures de pression au sein des microcosmes. Pour s'en affranchir, les flacons sont sortis des incubateurs à l'avance afin que leur température s'équilibre avec la température ambiante, qui est mesurée, ainsi que la pression atmosphérique. La pression différentielle interne des bouteilles est ensuite mesurée à l'aide d'un manomètre différentiel (Digitron 2082P, gamme de mesure de 0 à 2 000 mbar, précision 4 mbar) équipé d'un tube relié à une aiguille (Ø de 0,45 mm, Terumo). Si cette pression est inférieure à 80 mbar, il n'est pas possible de réaliser une analyse de la composition du ciel gazeux, les bouteilles sont alors agitées et remises dans l'incubateur. Si elle est supérieure à 80 mbar, la composition du biogaz est mesurée à l'aide d'un

analyseur de gaz (microGC), voir paragraphe suivant. En fin d'analyse, la pression dans la bouteille est mesurée et celle-ci est dégazée jusqu'à la pression atmosphérique. Si un volume suffisant de biogaz est disponible, 7 ml de biogaz sont conservés dans un vaccutainer pour analyse de la composition isotopique des gaz (*cf.* 3.3). La pression en fin de manipulation est mesurée de nouveau, le flacon est agité et remis dans l'incubateur. Des prélèvements liquides peuvent être réalisés à ce moment.

3.2. Analyse de la composition du biogaz par micro-chromatographie

La composition du biogaz est analysée à l'aide d'un appareil de micro-chromatographie portable en phase gazeuse (Varian CP4900) dit µGC. L'analyse se déroule directement dans la bouteille grâce à un montage qui relie le µGC à une aiguille (Ø = 0,45 mm) insérée dans le microcosme à travers le septum. L'instrument permet de lancer jusqu'à 15 analyses à la suite *via* l'utilisation d'une séquence d'analyse et d'un système d'injection multivoies. Chaque analyse est réalisée 2 fois pour éliminer les gaz qui auraient pu contaminer le système d'injection. Le µGC utilisé est équipé de quatre colonnes d'élution montées en parallèle qui permettent de séparer et de quantifier les gaz suivants : O_2, N_2, CH_4, CO_2, N_2O, H_2S, H_2, NH_3. Le détecteur est un détecteur à conductivité thermique (TCD), c'est-à-dire qu'il renvoie un signal correspondant à la différence de conductivité thermique entre les composés de l'échantillon et le gaz vecteur. La sensibilité dépend de la différence de conductivité thermique entre les gaz de l'échantillon et le gaz vecteur, c'est pourquoi, l'hélium est utilisé comme gaz vecteur sur 3 colonnes d'élution et l'Argon sur la colonne permettant de visualiser le pic de NH_3. L'étalonnage du µGC est réalisé régulièrement avec trois mélanges de gaz : un mélange de 5% NH_3 et de 95% N_2 (Linde Gas SA), un mélange de 38% CO_2, 2% H_2, 0,5% H_2S, 6,5% N_2, 3% N_2O, 50% CH_4 (Air products) et un mélange de 95% N_2 et de 5% H_2 (Linde Gas SA).

3.3. Calcul des productions de biogaz

La cinétique de dégradation de la cellulose est déterminée grâce à la mesure de la pression dans les bouteilles à l'aide d'un manomètre différentiel (Digitron 2082P). Ceci permet de calculer le nombre de moles de biogaz présent dans le microcosme à partir de la loi des gaz parfaits $\mathbf{n = PV / RT}$ où

- n : nombre de moles de gaz
- R : constante universelle des gaz parfaits ($J.K^{-1}.mol^{-1}$)
- T : température (ici température ambiante) (K)
- P : pression absolue dans la bouteille (pression différentielle mesurée + pression atmosphérique) (Pa)
- V : volume du ciel gazeux (m^3)

Par différence avec le nombre de moles de gaz restant dans le ciel gazeux à la mesure précédente, on accède à la quantité de biogaz produite entre les deux mesures. Le volume de biogaz est ensuite calculé grâce au volume molaire : $\mathbf{V = V_m \times n}$ avec V_m = 24L.mol^{-1} dans les conditions STP (conditions

Standard de Température et de Pression) c'est-à-dire à une température de 298,15 K et à pression de 1013,25 Pa. L'analyse chromatographique en phase gazeuse permet de déterminer la composition du biogaz et donc de calculer la quantité et le volume des différents gaz tels que le dioxyde de carbone et le méthane produits entre deux mesures. Ces différentes mesures permettent entre autres de tracer les courbes de production cumulée de biogaz ou d'un gaz spécifique au cours du temps, et connaissant la quantité initiale de carbone présente dans le système, d'estimer l'avancement de la réaction de dégradation.

3.4. Mesure de la composition isotopique du biogaz

Les compositions isotopiques du méthane et du dioxyde de carbone sont analysées à l'aide du couplage entre un chromatographe en phase gazeuse (Trace GC Ultra, Thermo Electron Corporation, USA), un four de combustion (Finnigan GC combustion III, Thermo Electron Corporation, USA) et un spectromètre de masse isotopique (Delta plus Isotope Ratio Mass Spectrometer, Thermo Electron Corporation, USA). L'ensemble (GC-C-IRMS) est équipé d'un passeur automatique (Triplus AS, Thermo Electron Corporation, USA). Le couplage chromatographie en phase gazeuse-combustion-spectrométrie de masse isotopique (GC-C-IRMS) est représenté Figure 22. Le chromatographe en phase gazeuse (GC) est équipé d'une colonne (Rt-Q-Bond Plot 30 m X 0.32 mm X 10 µm) qui permet de séparer les gaz (CH_4 et CO_2). Ces gaz passent ensuite dans le four capillaire de combustion (constitué d'un tube de quartz rempli d'oxyde de cuivre porté à 940°C) où ils sont transformés en CO_2. La masse du CO_2 est détectée dans le spectromètre de masse isotopique ce qui permet de calculer le rapport $^{13}C/^{12}C$ de chaque composé présent dans le mélange.

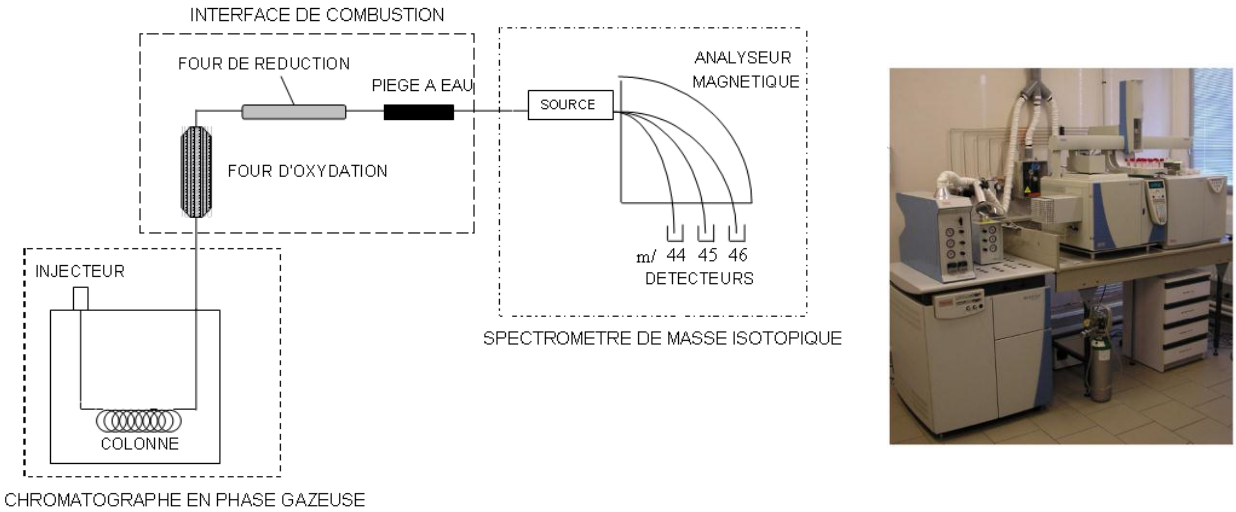


Figure 22 : Couplage chromatographie en phase gazeuse-combustion-spectrométrie de masse isotopique.

4. Prélèvement et conservation des échantillons liquides pendant l'incubation

Les prélèvements liquides sont réalisés après agitation du flacon avec une seringue et une aiguille de 0,7mm de diamètre (TERUMO stérile). Sauf mention contraire, 6 ml de liquide sont prélevés et répartis

dans 4 tubes Eppendorf (avec respectivement 1 ml, 1 ml, 2 ml et 2 ml de liquide). Un des tubes contenant 1 ml est conservé brut à -20°C. Les trois autres tubes sont centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes (4°C). Les surnageants sont collectés et conservés à -20°C. Ils seront utilisés pour différentes mesures physicochimiques. Le culot d'un tube de 2 ml est conservé à -20°C et sera utilisé pour les extractions d'ADN. Le culot d'un tube de 1 ml est conservé à -20°C et sera utilisé pour les hybridations FISH. Le culot restant a été préparé dans le but de réaliser ultérieurement des extractions d'ARN. Avant conservation à -80°C, ce culot est resuspendu dans 250 µL de PBS. 500 µL de RNAprotect (QIAGEN) sont ajoutés et le mélange est vortexé. Après 20 minutes le tube est centrifugé à 10 000 g pendant 10 min (4°C). Le surnageant est éliminé et le culot est conservé à -80°C. Les jours d'échantillonnage dépendent des essais. Le diagramme suivant (Figure 23) schématise ces différents prélèvements.

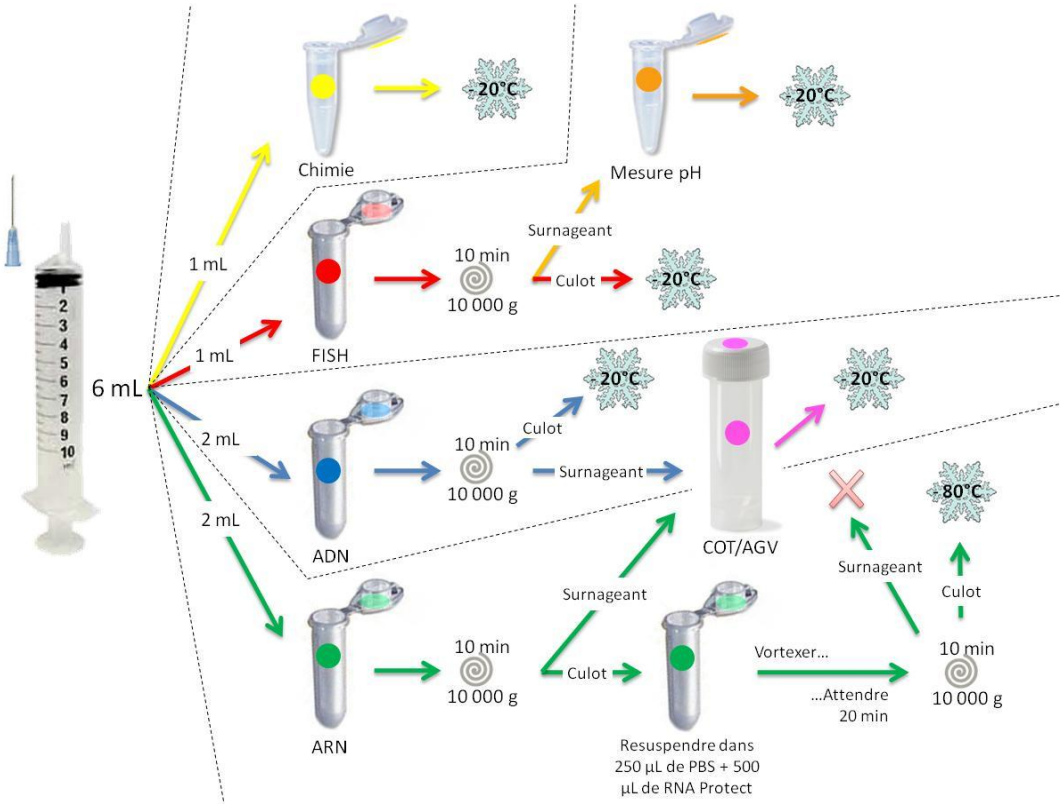


Figure 23 : Prélèvements liquides réalisés sur les incubations.

5. Méthodes analytiques

5.1. pH

La valeur de pH est mesurée dans le surnageant recueilli juste après centrifugation des prélèvements liquide. La mesure est réalisée avec un pH-mètre IQ160 de résolution 0,01. L'échantillon est agité, puis la sonde est plongée dans le lixiviat tout en étant lentement agitée jusqu'à stabilisation de la mesure.

5.2. Le carbone organique et inorganique dissous

Le carbone inorganique dissous (CID) et le carbone organique dissous (COD) sont analysés sur les surnageants des échantillons centrifugés. La norme utilisée est la norme NF EN 1484. Une acidification de l'échantillon permet de transformer le carbone inorganique en CO_2 qui est détecté par un analyseur infrarouge à double faisceau. Une oxydation est alors réalisée au persulfate de sodium à 95°C de façon à transformer le carbone organique en CO_2. L'appareil utilisé est un analyseur BIORITECH model 1010. La calibration est faite en 3 points (0, 10 & 50 $mgC.L^{-1}$ de solution de phtalate de potassium). Avant analyse les échantillons sont dilués 80 fois.

5.3. Les Acides Gras Volatils

Les concentrations en AGV (acide lactique, formique, acétique, propionique, butyrique, isobutyrique) sont déterminées par chromatographie ionique (Dionex DX-120) sur les surnageants conservés à -20°C. Le chromatographe est équipé d'une colonne échangeuse d'ions IONPAC® ICE-AS1 (9*250 mm) et la détection est réalisée par conductimétrie. Les éluents employés sont l'acide heptafluorobutyrique à 0,4 $mmol.L^{-1}$ et le TBAOH à 5 $mmol.L^{-1}$. Les calibrations sont faites entre 10 et 500 $mg.L^{-1}$ d'AGV. Les échantillons sont injectés à l'aide d'un autosampler (Dionex, AS). Avant analyse les échantillons sont dilués 20 fois.

5.4. Analyse de la composition isotopique des AGV

La composition isotopique des acides gras volatils est analysée sur le même principe que la composition isotopique du biogaz (*cf.* 3.3). Auparavant, les AGV sont extraits par la technique de Headspace, l'échantillon est chauffé à 90°C pendant 9 min puis 0,6 mL de ciel gazeux est prélevé à l'aide d'une seringue à gaz chauffée à 90°C et injecté dans le chromatographe. La colonne utilisée est une TR-WAX 30 m X 0.53 mm X 1 µm. Une seule mesure est réalisée par échantillon.

5.5. Analyses élémentaires

La quantité de carbone et d'azote contenue dans les échantillons solides est analysée sur un échantillon broyé et séché à 105°C. Environ une dizaine de milligrammes de solides sont placés dans des nacelles en étain pour l'analyse par analyseur élémentaire (Elementar, VARIO EL III, Bioritech). Chaque analyse a été faite en duplicat.

6. Méthodes de biologie moléculaire

6.1. Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN ont été réalisées avec le kit MOBIO (PowerSoil™ DNA Isolation Kit) selon le protocole fourni. Ce dernier repose sur une double lyse des cellules : chimique par plusieurs composés (dont le sodium dodecyl sulfate, un détergent fort) et mécanique grâce à un vortex énergique de 10 minutes brisant les cellules avec des billes. Par plusieurs lavages sur une membrane ne retenant que

l'ADN, on nettoie le milieu des débris de cellules, de protéines et de composés inorganiques. Après élution, on quantifie l'ADN obtenu, par le système *Quant-iT Assays* d'*Invitrogen*.

6.2. ARISA

La technique ARISA est une technique de fingerprinting qui repose sur l'amplification de la région située entre le gène codant l'ARN16S (ARN18S pour les eucaryotes) et celui codant l'ARN23S (l'ARN28S pour les eucaryotes). Cette région est de taille variable selon les microorganismes. Les réactions de PCR pour ARISA ont été réalisées avec le kit ThermoStart (Abgene). Le mix est préparé de la façon suivante pour un échantillon :

- 17.85µL H_2O ultra pure SIGMA
- 2.5 µL de buffer
- 0.5 µL primer 1 (C=10µM)
- 0.5 µL primer2 (C=10µM)
- 1 µL dNTP (C=10mM)
- 1.5 µL MgCl2 (C= 25mM)
- 0.15 µL de Taq

On ajoute ensuite 1 µL d'ADN extrait pour obtenir un volume final de 25 µL.

Au cours des expériences l'évolution des populations d'archées et de bactéries ont été suivies. Deux jeux d'amorces ont donc été utilisés pour amplifier l'ADN, il s'agit d'amorces généralistes encadrant l'espace intergénique (Tableau 3) issues de la littérature. Pour les archées nous avons utilisé les amorces 1389F (*271*) et 71R (*272*). Pour les bactéries il s'agit des amorces ITSF - ITSREub (*273*). Les températures d'hybridation des amorces ont été déterminées après optimisation avec un gradient de température.

Tableau 3 : Amorces utilisées pour la PCR ARISA.

Organismes	Nom	Séquence	Température d'hybridation
Archées	1389F	5'-CTT GCA CAC ACC GCC CGT-3'	54,5°C
	71R	5'-TCG CAG CTT RSC ACG YCC TTC- 3'	
Bactéries	ITSF	5'-GTC GTA ACA AGG TAG CCG TA-3'	55,2°C
	ITSR eub	5'-GCC AAG GCA TCC ACC-3'	

Les cycles de température pour l'amplification sont présentés dans la Figure 24 :

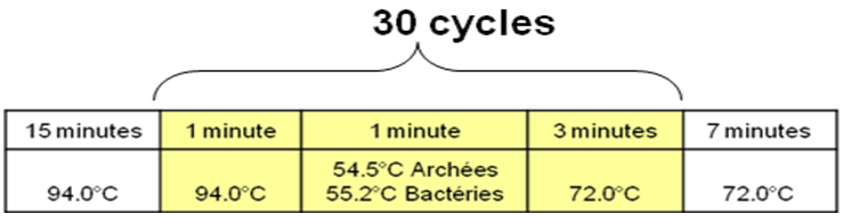


Figure 24 : Cycles de température pour amplification de l'ITS en vue de réaliser l'ARISA.

Les PCR ont été réalisées dans quatre thermocycleurs, chacun donnant des résultats équivalents (GeneAmp® PCR System 9700 de Applied Biosystem; CFX96™ Real-Time PCR detection systems de BioRad; Mastercycler® ep et Mastercycler pro d'Eppendorf).

Les produits de PCR sont ensuite analysés par électrophorèse capillaire sur des puces à ADN (Agilent, DNA Chip 1500) dans un bioanalyseur (Agilent 2100 Bioanalyzer) selon le protocole du fournisseur. Les résultats sont obtenus sous forme d'électrophorégramme (ou de pseudo-gel) où chaque pic correspond à un fragment d'ADN détecté grâce à un marqueur fluorescent. Le principe de détection est expliqué dans le paragraphe suivant.

6.3. Principe des puces ADN Agilent Technologies

Les puces à ADN utilisées offrent la possibilité de réaliser une mesure précise de la taille de fragments d'ADN, par exemple après amplification d'un échantillon complexe par PCR. Différents types de puces existent, elles sont adaptées à différentes longueurs de fragments d'ADN. Ces « lab-on-a-chip » (laboratoire sur puce) offrent l'avantage d'être très faciles et rapides à utiliser (Figure 25).

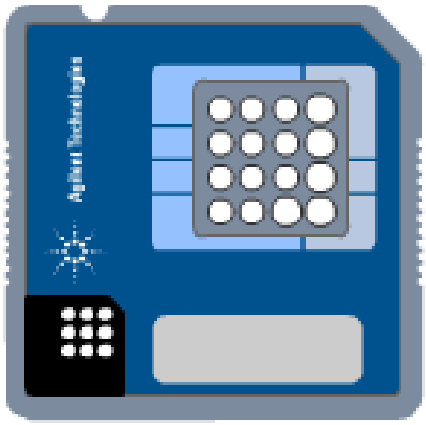


Figure 25 : Puces à ADN utilisées pour l'ARISA.

Les puces sont composées de plusieurs puits, dont 12 destinés à des échantillons, et 1 à un marqueur de poids moléculaire. Ces puits sont reliés par des micro-réseaux. Lors de la préparation d'une puce pour analyse, un gel filtré mélangé à un dye est réparti équitablement dans ces micro-réseaux.

Un tampon contenant deux marqueurs de taille est alors ajouté dans chacun des puits utilisés pour analyser les échantillons, afin de procurer un milieu stable, à un pH donné, contenant deux fragments d'ADN de taille connue.

Par ailleurs, un marqueur de poids moléculaire (ladder) est placé dans un puits pour avoir une référence et étalonner les mesures. La puce est vortexée afin d'homogénéiser le tampon et les échantillons, puis placée dans l'appareil.

Une électrode est en contact avec chaque puits. Au moment de l'analyse, cette électrode est soumise à un haut voltage, qui va permettre une séparation très rapide des brins d'ADN de l'échantillon en fonction de leur taille (passage à travers le gel, au sein des micro-réseaux plus ou moins rapide). Au moment de leur passage dans le gel, les molécules d'ADN vont se lier spécifiquement au dye. En fin de course (fin du micro-réseau), les molécules sont détectées par fluorescence. Les molécules sont excitées par un rayonnement UV, et seuls les ADNs (liés au dye) vont réémettre un rayonnement fluorescent. L'appareil mesure, en temps réel, l'intensité de la fluorescence émise en fonction du temps de rétention de l'échantillon au sein du micro-réseau. Plus les ADN sont courts, plus ils migrent rapidement et donc plus leur temps de rétention est faible. Plus l'intensité de fluorescence est importante, plus la quantité

d'ADN est importante. Ces données qualitatives (temps de rétention) et quantitatives (intensité de fluorescence) sont validées par rapport au marqueur de poids moléculaire qui est connu très précisément par le logiciel. Elles peuvent notamment être utilisées pour l'ARISA.

6.4. Ultracentrifugation

Nous avons principalement mis en œuvre cette méthodologie pour l'ADN. Des essais ont également été effectués avec de l'ARN (à partir d'ARN de souche pure de *E.Coli*), et se sont révélés concluants, mais le protocole utilisé ne sera pas décrit ici car aucun des résultats présentés dans ce manuscrit ne fait appel à cette technique. Nous allons donc nous focaliser sur l'ultracentrifugation de l'ADN.

Cette méthodologie a été appliquée pour l'ADN extrait de différentes incubations de cellulose marquée ^{13}C. En parallèle, le même protocole a été appliqué à des échantillons provenant des incubations témoins réalisées avec de la cellulose non marquée. La distribution concentration d'ADN/densité de l'ADN de chaque échantillon issu des expériences avec substrat marqué a été comparée à celle de l'échantillon témoin respectif, afin de s'assurer que la modification de la densité de l'ADN était bien due à un enrichissement spécifique en ^{13}C (en effet, la densité de l'ADN est affectée par la valeur de son enrichissement mais également par sa composition en GC (*91, 274*)).

Sauf mention contraire, les différentes procédures ont été réalisées avec du matériel fourni par la société Beckman Coulter. Les échantillons d'ADN pour l'ultracentrifugation sont préparés dans des tubes *Beckman Quick-seal* en Polyallomer de 2,2ml. Une quantité d'ADN de l'ordre de 300 à 400 ng est introduite dans le tube, ainsi qu'une solution de CsCl dans du tampon TE dont la densité est comprise entre 1,718 et 1,728, ce qui correspond à un indice de réfractométrie de 1,4010 et 1,4020. La densité moyenne et l'indice de réfraction d'une solution de CsCl (mesuré à l'aide d'un réfractomètre d'Abbe, Réfractomètre semi-automatique, ARIAS 500) sont en effet corrélés selon la formule suivante : *densité =10,8601*(indice de réfraction) -13,4974*. Le tableau suivant présente les masses et volumes de réactifs utilisés pour préparer la solution de chlorure de césium (Tableau 4).

Tableau 4 : Préparation de la solution de chlorure de Césium pour ultracentrifugation.

Nombre de tubes	Masse de CsCl (g)	Volume de tampon TE (ml)	Volume final (ml)	Densité	Indice de réfraction
2	4,4	3,3	4,5	1,718	1,4010
4	8,8	6,6	9,0	1,718	1,4010
6	13,2	9,9	13,5	1,718	1,4010
8	17,6	13,2	18,0	1,718	1,4010
10	22,0	16,5	22,5	1,718	1,4010

Une fois qu'ils sont remplis, les masses des tubes sont équilibrées très précisément deux à deux à l'aide de la solution de CsCl (différence de moins de 2 mg). Les tubes sont ensuite scellés à l'aide du "tube topper" et placés dans la centrifugeuse qui est programmée à 65 000 rpm (140 000 g) pendant 20-22h à 20°C (rotor TLA-120.2). L'accélération se fait de façon rapide tandis que la décélération se fait de façon lente afin de préserver le gradient formé par ultracentrifugation. Une fois cette dernière terminée, les tubes sont coupés à leur extrémité et le fractionnement de la solution se fait à l'aide du Beckman

Fraction Recovery System : grâce à un pousse seringue perfusant monocanal (Fisher scientific) qui remplit le tube par le haut de façon régulière avec de l'eau colorée au Bleu de Bromophénol (dont la densité est plus faible que la solution de CsCl), le tube qui a été percé avec une aiguille à son extrémité basse se vide goutte à goutte. Ainsi 24 fractions de 100µL chacune sont récupérées. Pour chaque fraction on mesure l'indice de réfraction (pour déterminer la densité) et la concentration d'ADN (kit Qubit HS, Invitrogen) afin de tracer la courbe de la concentration d'ADN en fonction de la densité. Une fois que les fractions contenant de l'ADN lourd sont repérées, l'ADN est purifié à l'aide d'un kit Microcon YM-30 (Millipore) dont la membrane en cellulose régénérée retient l'ADN qui est lavé 3 fois avec du Tris HCl 1M pH 7.2 (12 min à 14 000g). L'ADN est élué avec la même solution (15 min à 2 000g). L'ADN isolé est conservé à -20°C.

6.5. Pyroséquençage

L'essentiel des données de séquences obtenues pendant ce travail de thèse a été produit par pyroséquençage. Le pyroséquençage a été sous-traité aux laboratoires Research and Testing (Lubbock, TX). Le séquençage a été réalisé selon leurs protocoles (www.researchandtesting.com) par la méthode de tag-encoded FLX 454 amplicon pyrosequencing (bTEFAP) mise en place dans ce laboratoire. Le protocole ne sera pas détaillé ici, mais est similaire à celui décrit par Smith (*275*). Les amorces utilisées pour les bactéries sont 28F-519R (régions V1-V2-V3 de l'ARNr 16S) et pour les archées 340F-806R (régions V3-V4-V5 de l'ARNr 16S).

7. Analyse des résultats d'ARISA à l'aide de Statfingerprints

L'exploitation des résultats d'ARISA a été réalisée en partie à l'aide du logiciel « StatFingerprints » sous R (*276*). Ce package consiste en une interface graphique conviviale qui ne nécessite aucune ligne de commande. Il permet de traiter les électrophorégrammes obtenus après ARISA et de réaliser les opérations d'alignement, normalisation des profils avant de réaliser l'exploitation statistique des données. Des outils sont disponibles pour calculer des indices de biodiversité ou réaliser des analyses univariées, ou encore des analyses d'effets fixés (représentations graphiques, méthodes de classement et analyses multivariées : ACP, nMDS, ANOSIM). On peut enfin mettre en relation ces données avec les paramètres du biotope. Les résultats obtenus peuvent être sauvegardés dans différents formats et exportés. Les opérations statistiques réalisées sur les profils ARISA sont détaillées au fil du texte principal, dans les paragraphes où sont présentés des résultats d'ARISA exploités avec « StatFingerprints ».

8. Analyse des données de pyroséquençage

Les analyses de données de pyroséquençage ont été réalisées avec le logiciel libre QIIME (*277*). Dans un premier temps, les librairies ont été démultiplexées et des filtres de qualité ont été appliqués pour ôter les lectures de mauvaise qualité : celles avec une qualité moyenne de base inférieure à 25, celles contenant des homopolymères d'une longueur supérieure à 6 bases ou avec des bases ambigües, et celles de moins de 150 bases après trimming ont été éliminées. Les lectures restantes ont été alignés

avec PyNAST (*278*) contre la base de données « Silva 108 core-aligned set » adaptée pour QIIME (http://www.arb-silva.de/download/archive/qiime/). Les séquences chimériques putatives ont été identifiées avec ChimeraSlayer en utilisant la même référence Silva 108 et éliminées. Les séquences restantes ont été utilisées pour générer les OTUs avec un seuil de 0,97 (c'est-à-dire à un niveau représentatif de l'espèce) avec uclust (Robert Edgar, unpublished, 2009). Les identifications taxonomiques ont été réalisées avec RDP classifier (*279-280*) avec une valeur de coupure de bootstrap de 0,8, en utilisant une séquence représentative pour chaque OTU (la plus longue). Les OTUs ne correspondant pas au domaine phylogénétique attendu ont été éliminés (en cas de problème de spécificité des amorces de PCR utilisées pour le pyroséquençage, notamment pour les archées). Les courbes de raréfaction ont été déterminées à partir des OTUs appartenant au bon domaine phylogénétique. Le pourcentage de chaque taxon de bactéries ou d'archées a ensuite été analysé individuellement pour chaque échantillon en prenant en compte l'abondance relative des séquences concernées dans l'ensemble des séquences d'un échantillon.

Les résultats obtenus sont présentés au fil du manuscrit et regroupés globalement en annexe (fréquence de chaque OTU dans les échantillons et nom du plus proche parent). Les OTUs portent le nom de l'échantillon dans lequel ils ont été mis en évidence suivi d'un numéro d'ordre. Si un même OTU a été détecté dans deux échantillons différents, il porte le nom de l'échantillon dans lequel il a été identifié en premier (les OTUs des inocula ont été nommés en premier, puis ceux des autres échantillons, dans l'ordre des chapitres).

9. Vue d'ensemble des microcosmes préparés

Cette partie fait un bilan de l'ensemble des microcosmes qui ont été réalisés pendant la thèse et sont présentés dans ce manuscrit. Ils sont classés par « leviers d'action » utilisés, selon le même découpage que les différents chapitres de la thèse. Dans un premier temps, je reprends les caractérisations physico-chimiques des différents éléments utilisés pour constituer les bioréacteurs (biomasses, substrats, tampon liquide *etc.*) ainsi que l'analyse de la diversité des inocula avant de détailler la constitution de chacun des microcosmes.

9.1. Principaux paramètres physico-chimiques

Les principaux paramètres physicochimiques des inocula et des substrats ont été analysés et sont présentés dans les tableaux ci-dessous (Tableau 5 et Tableau 6)

Tableau 5 : Principaux paramètres physico-chimiques concernant les inocula.

	% de N particulaire	% de C particulaire	Matière sèche	Matière volatile
Digestat anaérobie mésophile (Varennes-Jarcy)	1,6%	24,6%	36,2%	14,1%
Digestat anaérobie thermophile (Graincourt-les-Avrincourt)	1,5%	22,9%	30,7%	12,2%
Boue de bassin d'aérateur de STEP (Etrechy)	5,7%	33,5%	12,3%	8,5%
Culot du contenu ruminal de vache	5,4%	42,2%	14,4%	12,1%

Dans chaque microcosme 6,4 g de digestat anaérobie, mésophile ou thermophile ont été utilisés. Dans le cas de bioaugmentation 1,3 g de biomasse exogène a été apporté en plus.

Tableau 6 : Principaux paramètres physico-chimiques concernant les substrats.

	% de N particulaire	% de C particulaire
Cellulose bactérienne	0,61	44,67
Foin	1,18	43,01

En début de chacune des phases de l'incubation, la concentration de substrat ajouté est de 100 mM de carbone. Le ratio inoculum/substrat est donc d'environ 3,15 dans les différents microcosmes. Des tests, non présentés dans ce manuscrit, ont été réalisés pour valider que la quantité d'inoculum apportée n'était pas limitante. Des microcosmes dégradant la cellulose ont été réalisés avec ¼, ½, 1, 2 et 4 fois la quantité d'inoculum utilisée. Tous présentent les mêmes cinétiques et rendements de production de biogaz, sauf les microcosmes réalisés avec ¼ pour qui la quantité d'inoculum semble limitante.

Enfin le tampon liquide (lixiviat centrifugé) présentait les caractéristiques physico-chimiques décrites dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Paramètres physico-chimiques concernant le tampon liquide.

Concentration en COD (g/L)	1490 $mg.L^{-1}$
Concentration en CID (g/L)	1710 $mg.L^{-1}$
Concentration en NH_4	970 $mg.L^{-1}$

9.2. Diversité microbienne des inocula

L'ADN des inocula a été extrait et séquencé afin d'identifier les principaux groupes de microorganismes présents au démarrage des incubations. Les graphiques suivants présentent la diversité des archées par genre (Figure 26) et par OTUs et la diversité des bactéries par classe et OTUs (Figure 27).

Le digestat mésophile contient uniquement des archées du genre *Methanosarcina* (5 OTUs principaux, dont un ultra majoritaire). 5,5% des séquences appartiennent à des OTUs contenant moins de 1% du nombre total de séquences.

Le digestat thermophile contient des archées du genre *Methanosarcina* (64%, 3 OTUs principaux), *Methanoculleus* (17%, 2 OTUs principaux), *Methanothermobacter* (14%, 1 OTU principal) et *Methanomicrobia* (1 OTU principal). 5,1% des séquences appartiennent à des OTUs contenant moins de 1% du nombre total de séquences.

Les bactéries retrouvées dans l'inoculum mésophile appartiennent aux classes *Spirochaetes* (59%, 2 OTUs principaux), *Bacteroidia* (21%, 3 OTUs principaux), *Clostridia* (9%, 2 OTUs principaux), *Synergistia* (6%, 1 OTU principal) et *Thermotogae* (1 %, 1 OTU principal). Ces microorganismes sont fréquemment

retrouvés dans les digesteurs anaérobies (*281*). Au total, 9 OTUs principaux sont présents (contenant plus de 1% du nombre total de séquences). 16,2% des séquences appartiennent à des OTUs contenant moins de 1% du nombre total de séquences.

Les bactéries retrouvées dans l'inoculum thermophile appartiennent aux classes *Thermotogae* (48%, 3 OTUs principaux), *Clostridia* (38%, 5 OTUs principaux), *Synergistia* (4%, 2 OTUs principaux). Un OTU représentant 6% des séquences n'a pas pu être identifié phylogénétiquement. Au total, 11 OTUs principaux sont présents (contenant plus de 1% du nombre total de séquences). 14,6% des séquences appartiennent à des OTUs contenant moins de 1% du nombre total de séquences.

Les populations microbiennes du contenu ruminal et de la boue de bassin d'aération sont décrites dans le chapitre traitant de l'effet de co-inoculation de biomasses exogènes.

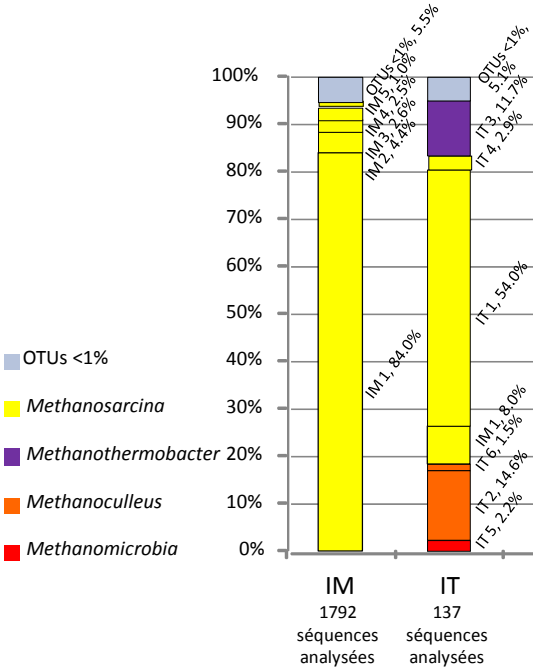


Figure 26 : OTUs archées retrouvés lors du séquençage des inocula mésophiles (IM) et thermophiles (IT).

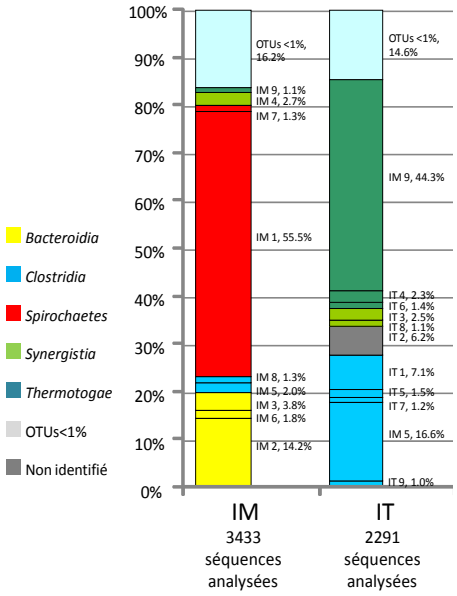


Figure 27 : OTUs bactériens retrouvés lors du séquençage des inocula mésophiles (IM) et thermophiles (IT).

9.3. Influence de changements de température

Deux séries de bouteilles ont été réalisées : avec un inoculum thermophile (Série IT) et un inoculum mésophile (Série IM). L'objectif de ces séries de bouteilles était d'étudier l'influence des changements brutaux de température sur la dégradation de la cellulose et sur la réponse des groupes microbiens fonctionnels de dégradation de la cellulose, en termes de performance de dégradation et d'évolution de la structure et de la composition des communautés microbiennes. On s'intéressait en particulier aux capacités de résistance et de résilience (retour à l'état initial ou non) après une perturbation.

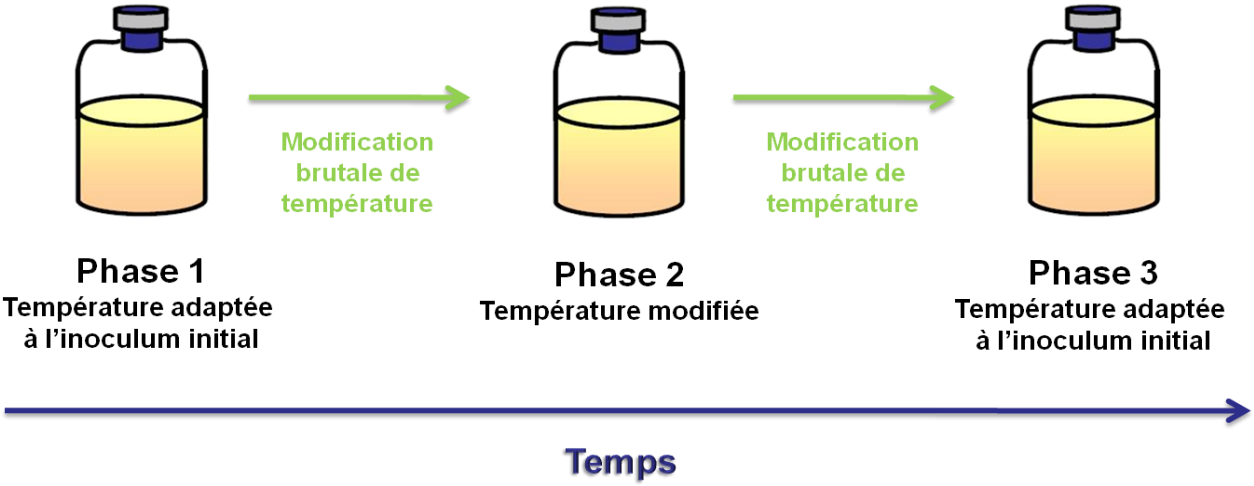


Figure 28 : Schéma des différentes phases de l'expérience de changements de température.

Une première phase consistait en la dégradation de la cellulose dans les conditions de température de l'inoculum de départ. En fin de dégradation de la cellulose et de ses sous-produits (estimée par l'arrêt de la production de biogaz), la bouteille a été ouverte, de la cellulose a été ajoutée de nouveau, le ciel gazeux lavé à l'azote et la température changée. En fin d'incubation de cette deuxième phase (à nouveau estimée par l'arrêt de la production de biogaz), les opérations décrites ont été renouvelées pour démarrer la phase 3 (Figure 28).

Afin d'accéder à l'information fonctionnelle relative à chacune des phases, 3 microcosmes ont été mis en place (numérotés 1, 2 et 3). De la cellulose marquée ^{13}C a été introduite pour chaque bouteille à une phase différente (Figure 29). Deux témoins sans changement de température (numérotés 4 et 5) ont été réalisés avec de la cellulose alpha pour comparer la production de biogaz, les paramètres physico-chimiques et les populations microbiennes dans les phases successives sans changement de température.

Figure 29 : Microcosmes préparés pour l'étude de l'influence de changements de température.

En début de chacune des phases de l'incubation, la concentration de cellulose ajoutée est de 2,7g/L soit 100 mM de carbone (cellulose bactérienne marquée ^{13}C ou non).

Le volume liquide initial était de 100ml pour toutes les bouteilles. Pour la série IT, 4 prélèvements de 6 ml ont été réalisés à chaque phase. Pour la série IM, 4 prélèvements de 6ml ont été réalisés aux phases 1 et 3, et 5 prélèvements à la phase 2.

Le tableau ci-dessous résume l'ensemble des prélèvements réalisés (Tableau 8.)

Tableau 8 : Liste des prélèvements réalisés pour les expériences de changements de température.

Microcosme	Phase de dégradation	Nom du prélèvement	Nombre de jours depuis l'introduction du substrat
IT1	Temps initiaux	IT1 -t-1	0
		IT1 -t0	0
	Phase 1	IT1 -t1	4
		IT1 -t2	8
		IT1 -t3	21
		IT1 -t4	32
	Phase 2	IT1 -t5	11
		IT1 -t6	32
		IT1 -t7	48
		IT1 -t8	68
	Phase 3	IT1 -t9	6
		IT1 -t10	15
		IT1 -t11	21
		IT1 -t12	34
IT2	Temps initiaux	IT2 -t-1	0
		IT2 -t0	0
	Phase 1	IT2 -t1	4
		IT2 -t2	8
		IT2 -t3	21
		IT2 -t4	32
	Phase 2	IT2 -t5	11
		IT2 -t6	32
		IT2 -t7	48
		IT2 -t8	68
	Phase 3	IT2 -t9	6
		IT2 -t10	15
		IT2 -t11	21
		IT2 -t12	34
IT3	Temps initiaux	IT3 -t-1	0
		IT3 -t0	0
	Phase 1	IT3 -t1	4
		IT3 -t2	8
		IT3 -t3	21
		IT3 -t4	32
	Phase 2	IT3 -t5	11
		IT3 -t6	32
		IT3 -t7	48
		IT3 -t8	68
	Phase 3	IT3 -t9	6
		IT3 -t10	15
		IT3 -t11	21
		IT3 -t12	34
IT4	Temps initiaux	IT4 -t-1	0
		IT4 -t0	0
	Phase 1	IT4 -t1	4
		IT4 -t2	8
		IT4 -t3	21
		IT4 -t4	32
	Phase 2	IT4 -t5	6
		IT4 -t6	11
		IT4 -t7	32
		IT4 -t8	48
		IT4 -t9	68
	Phase 3	IT4 -t10	6
		IT4 -t11	15
		IT4 -t12	21
		IT2 -t13	34
IT5	Temps initiaux	IT5 -t-1	0
		IT5 -t0	0
	Phase 1	IT5 -t1	4
		IT5 -t2	8
		IT5 -t3	21
		IT5 -t4	32
	Phase 2	IT5 -t5	6
		IT5 -t6	11
		IT5 -t7	32
		IT5 -t8	48
		IT5 -t9	68
	Phase 3	IT5 -t10	6
		IT5 -t11	15
		IT5 -t12	21
		IT5 -t13	34

Microcosme	Phase de dégradation	Nom du prélèvement	Nombre de jours depuis l'introduction du substrat
IM1	Temps initiaux	IM1 -t-1	0
		IM1 -t0	0
	Phase 1	IM1 -t1	9
		IM1 -t2	17
		IM1 -t3	28
		IM1 -t4	44
	Phase 2	IM1 -t5	4
		IM1 -t6	22
		IM1 -t7	34
		IM1 -t8	47
		IM1 -t9	76
	Phase 3	IM1 -t10	9
		IM1 -t11	21
		IM1 -t12	40
		IM1 -t13	65
IM2	Temps initiaux	IM2 -t-1	0
		IM2 -t0	0
	Phase 1	IM2 -t1	9
		IM2 -t2	17
		IM2 -t3	28
		IM2 -t4	44
	Phase 2	IM2 -t5	4
		IM2 -t6	22
		IM2 -t7	34
		IM2 -t8	47
		IM2 -t9	76
	Phase 3	IM2 -t10	9
		IM2 -t11	21
		IM2 -t12	40
		IM2 -t13	65
IM3	Temps initiaux	IM3 -t-1	0
		IM3 -t0	0
	Phase 1	IM3 -t1	9
		IM3 -t2	17
		IM3 -t3	28
		IM3 -t4	44
	Phase 2	IM3 -t5	4
		IM3 -t6	22
		IM3 -t7	34
		IM3 -t8	47
		IM3 -t9	76
	Phase 3	IM3 -t10	9
		IM3 -t11	21
		IM3 -t12	40
		IM3 -t13	65
IM4	Temps initiaux	IM4 -t-1	0
		IM4 -t0	0
	Phase 1	IM4 -t1	9
		IM4 -t2	17
		IM4 -t3	28
		IM4 -t4	44
	Phase 2	IM4 -t5	4
		IM4 -t6	22
		IM4 -t7	34
		IM4 -t8	47
		IM4 -t9	76
	Phase 3	IM4 -t10	9
		IM4 -t11	21
		IM4 -t12	40
		IM4 -t13	65
IM5	Temps initiaux	IM5 -t-1	0
		IM5 -t0	0
	Phase 1	IM5 -t1	9
		IM5 -t2	17
		IM5 -t3	28
		IM5 -t4	44
	Phase 2	IM5 -t5	4
		IM5 -t6	22
		IM5 -t7	34
		IM5 -t8	47
		IM5 -t9	76
	Phase 3	IM5 -t10	9
		IM5 -t11	21
		IM5 -t12	40
		IM5 -t13	65

Par ailleurs, des témoins sans ajout de substrat avaient été réalisés pour estimer la production de biogaz due à la dégradation d'éventuelles sources de carbone dégradable contenues dans l'inoculum ou le lixiviat.

9.4. Influence d'une fonctionnalisation préalable de la biomasse

Deux séries de bouteilles ont été réalisées : avec un inoculum thermophile et un inoculum mésophile. Seule la série d'expériences réalisée en conditions mésophiles est présentée dans ce manuscrit. L'objectif de ces séries était d'étudier l'influence d'une "fonctionnalisation" préalable de la biomasse par un substrat donné. L'idée est d'essayer d'orienter *in situ* le développement des communautés microbiennes vers un état donné. Pour se faire, on a incubé les inocula de référence avec des substrats simples (acide propionique, acide butyrique, glucose ou cellobiose dans notre cas) afin de favoriser la croissance des microorganismes impliqués dans la consommation de ces substrats. La biomasse fonctionnalisée a ensuite été mise en présence d'un substrat plus complexe (cellulose). La préadaptation a été réalisée en trois temps, comme décrit sur le schéma suivant (Figure 30).

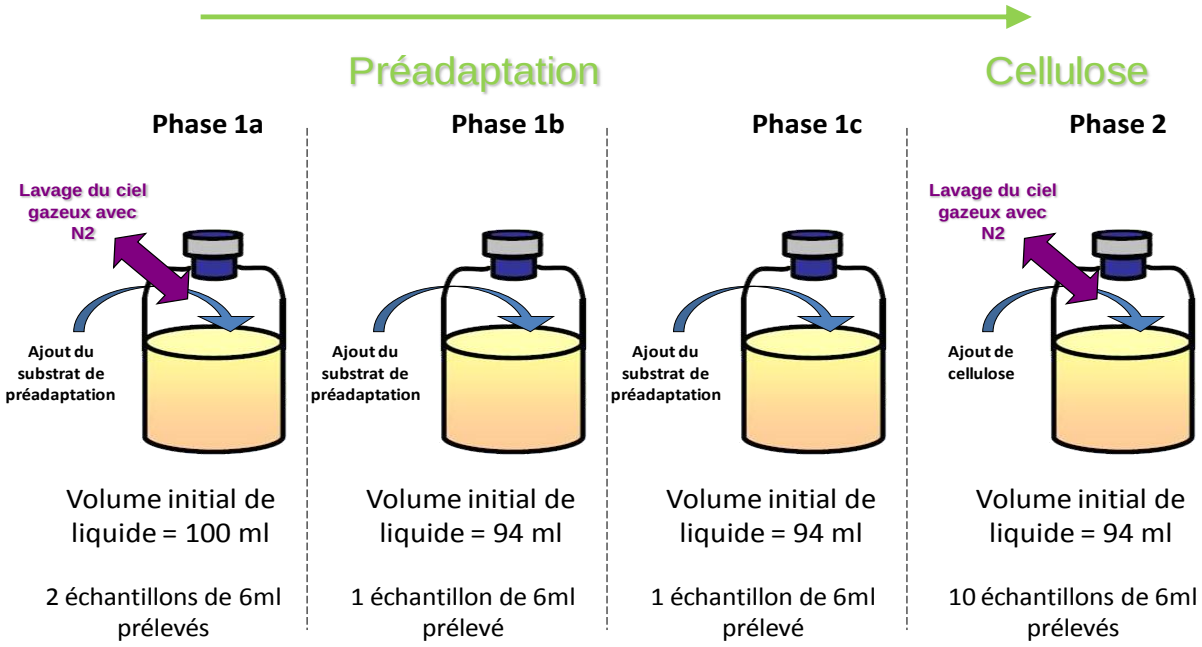


Figure 30 : Schéma des différentes phases de l'expérience de fonctionnalisation.

En début de phase 1a le substrat de préadaptation a été introduit dans le microcosme. Le ciel gazeux a été lavé avec du diazote. En fin de dégradation (arrêt de la production de biogaz), du substrat en solution dans 6ml d'eau distillée stérile a été de nouveau ajouté sans ouvrir le microcosme pour démarrer la phase 1b. Les opérations ont été réalisées de nouveau pour initier la phase 1c. En fin de phase 1c, les microcosmes ont été ouverts, et de la cellulose a été ajoutée avec 6 ml d'eau distillée stérile. Le ciel gazeux des bouteilles a été lavé avec de l'azote avant incubation. Dans chaque cas, la concentration de substrat introduite est telle que la concentration de carbone en début de dégradation est de 100 mM de carbone.

Les différents microcosmes mésophiles sont appelés respectivement $IM_{Pro}1/2$, $IM_{But}1/2$, $IM_{Glu}1/2$ et $IM_{Cell}1/2$ selon que le substrat utilisé pour la préadaptation était de l'acide propionique, de l'acide butyrique, du glucose ou du cellobiose. Pour étudier la fraction fonctionnelle des microorganismes, de la cellulose marquée (^{13}C) a été introduite dans un des deux microcosmes après chaque type de préadaptation (le microcosme 1) (Figure 31).

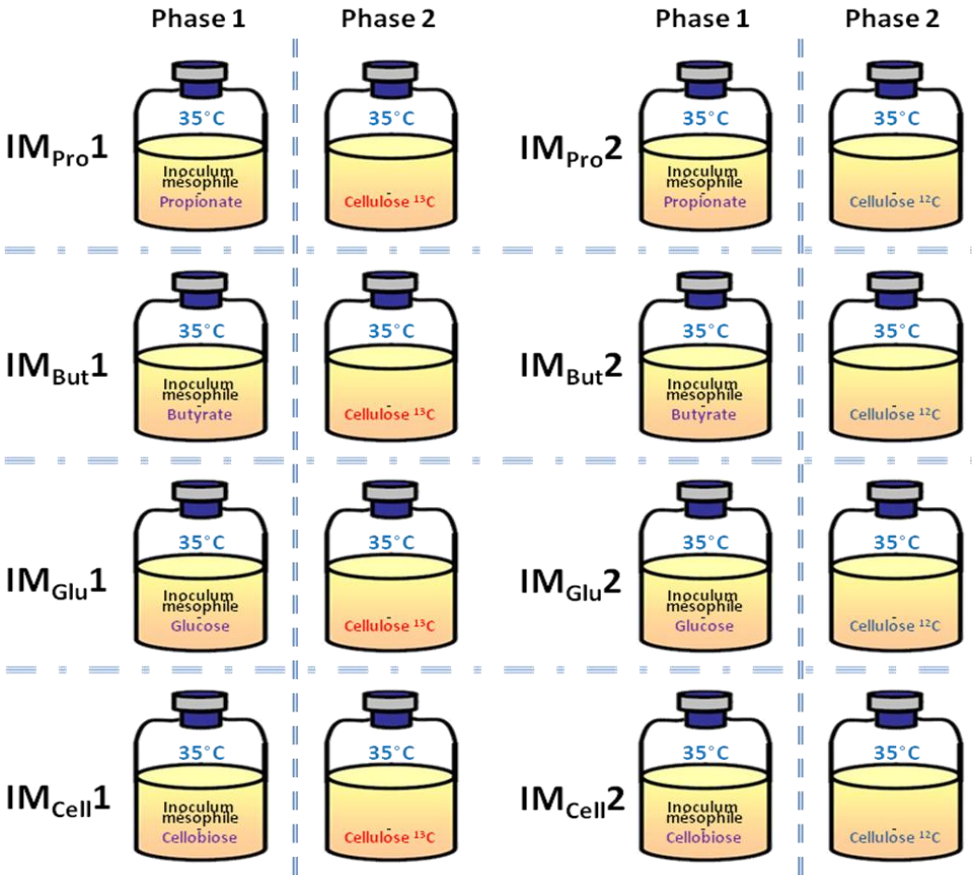


Figure 31 : Microcosmes préparés pour l'étude de la fonctionnalisation en conditions mésophiles.

Afin de distinguer la phase de préadaptation et la phase de dégradation de la cellulose dans la nomenclature des prélèvements, le nom du substrat en cours d'incubation est accolé au nom de l'incubation (par exemple $IM_{Pro}1$-Cellulose).

Deux prélèvements de 6ml ont été réalisés durant la phase 1a, 1 prélèvement a été réalisé pendant la phase 1b et la phase 1c, et enfin 10 prélèvements ont été réalisés durant la phase 2 (Figure 30).

Le tableau ci-dessous résume l'ensemble des prélèvements réalisés pour l'expérience mésophile (Tableau 9).

Tableau 9 : Liste des prélèvements réalisés pour les expériences de fonctionnalisation mésophile.

Microcosme		Nom du prélèvement	Nombre de jours depuis l'introduction du substrat
$IM_{Pro}1$	Temps initiaux	$IM_{Pro}1$ -t-1	0
		$IM_{Pro}1$ -t0	0
	Phase 1a	$IM_{Pro}1$-Propionate -t1	23
		$IM_{Pro}1$-Propionate -t2	72
	Phase 1b	$IM_{Pro}1$-Propionate -t3	107
	Phase 1c	$IM_{Pro}1$-Propionate -t4	160
	Phase 2	$IM_{Pro}1$-Cellulose -t1	1
		$IM_{Pro}1$-Cellulose -t2	6
		$IM_{Pro}1$-Cellulose -t3	8
		$IM_{Pro}1$-Cellulose -t4	10
		$IM_{Pro}1$-Cellulose -t5	13
		$IM_{Pro}1$-Cellulose -t6	17
		$IM_{Pro}1$-Cellulose -t7	22
		$IM_{Pro}1$-Cellulose -t8	29
		$IM_{Pro}1$-Cellulose -t9	38
		$IM_{Pro}1$-Cellulose -t10	55
$IM_{But}1$	Temps initiaux	$IM_{But}1$ -t-1	0
		$IM_{But}1$ -t0	0
	Phase 1a	$IM_{But}1$-Butyrate -t1	23
		$IM_{But}1$-Butyrate -t2	72
	Phase 1b	$IM_{But}1$-Butyrate -t3	107
	Phase 1c	$IM_{But}1$-Butyrate -t4	160
	Phase 2	$IM_{But}1$-Cellulose -t1	1
		$IM_{But}1$-Cellulose -t2	6
		$IM_{But}1$-Cellulose -t3	8
		$IM_{But}1$-Cellulose -t4	10
		$IM_{But}1$-Cellulose -t5	13
		$IM_{But}1$-Cellulose -t6	17
		$IM_{But}1$-Cellulose -t7	22
		$IM_{But}1$-Cellulose -t8	29
		$IM_{But}1$-Cellulose -t9	38
		$IM_{But}1$-Cellulose -t10	55
$IM_{Glu}1$	Temps initiaux	$IM_{Glu}1$ -t-1	0
		$IM_{Glu}1$ -t0	0
	Phase 1a	$IM_{Glu}1$-Glucose -t1	23
		$IM_{Glu}1$-Glucose -t2	72
	Phase 1b	$IM_{Glu}1$-Glucose -t3	107
	Phase 1c	$IM_{Glu}1$-Glucose -t4	160
	Phase 2	$IM_{Glu}1$-Cellulose -t1	1
		$IM_{Glu}1$-Cellulose -t2	6
		$IM_{Glu}1$-Cellulose -t3	8
		$IM_{Glu}1$-Cellulose -t4	10
		$IM_{Glu}1$-Cellulose -t5	13
		$IM_{Glu}1$-Cellulose -t6	17
		$IM_{Glu}1$-Cellulose -t7	22
		$IM_{Glu}1$-Cellulose -t8	29
		$IM_{Glu}1$-Cellulose -t9	38
		$IM_{Glu}1$-Cellulose -t10	55
$IM_{Cell}1$	Temps initiaux	$IM_{Cell}1$ -t-1	0
		$IM_{Cell}1$ -t0	0
	Phase 1a	$IM_{Cell}1$-Cellulobiose -t1	23
		$IM_{Cell}1$-Cellulobiose -t2	72
	Phase 1b	$IM_{Cell}1$-Cellulobiose -t3	107
	Phase 1c	$IM_{Cell}1$-Cellulobiose -t4	160
	Phase 2	$IM_{Cell}1$-Cellulose -t1	1
		$IM_{Cell}1$-Cellulose -t2	6
		$IM_{Cell}1$-Cellulose -t3	8
		$IM_{Cell}1$-Cellulose -t4	10
		$IM_{Cell}1$-Cellulose -t5	13
		$IM_{Cell}1$-Cellulose -t6	17
		$IM_{Cell}1$-Cellulose -t7	22
		$IM_{Cell}1$-Cellulose -t8	29
		$IM_{Cell}1$-Cellulose -t9	38
		$IM_{Cell}1$-Cellulose -t10	55

Microcosme		Nom du prélèvement	Nombre de jours depuis l'introduction du substrat
$IM_{Pro}2$	Temps initiaux	$IM_{Pro}2$ -t-1	0
		$IM_{Pro}2$ -t0	0
	Phase 1a	$IM_{Pro}2$-Propionate -t1	23
		$IM_{Pro}2$-Propionate -t2	72
	Phase 1b	$IM_{Pro}2$-Propionate -t3	107
	Phase 1c	$IM_{Pro}2$-Propionate -t4	160
	Phase 2	$IM_{Pro}2$-Cellulose -t1	1
		$IM_{Pro}2$-Cellulose -t2	6
		$IM_{Pro}2$-Cellulose -t3	8
		$IM_{Pro}2$-Cellulose -t4	10
		$IM_{Pro}2$-Cellulose -t5	13
		$IM_{Pro}2$-Cellulose -t6	17
		$IM_{Pro}2$-Cellulose -t7	22
		$IM_{Pro}2$-Cellulose -t8	29
		$IM_{Pro}2$-Cellulose -t9	38
		$IM_{Pro}2$-Cellulose -t10	55
$IM_{But}2$	Temps initiaux	$IM_{But}2$ -t-1	0
		$IM_{But}2$ -t0	0
	Phase 1a	$IM_{But}2$-Butyrate -t1	23
		$IM_{But}2$-Butyrate -t2	72
	Phase 1b	$IM_{But}2$-Butyrate -t3	107
	Phase 1c	$IM_{But}2$-Butyrate -t4	160
	Phase 2	$IM_{But}2$-Cellulose -t1	1
		$IM_{But}2$-Cellulose -t2	6
		$IM_{But}2$-Cellulose -t3	8
		$IM_{But}2$-Cellulose -t4	10
		$IM_{But}2$-Cellulose -t5	13
		$IM_{But}2$-Cellulose -t6	17
		$IM_{But}2$-Cellulose -t7	22
		$IM_{But}2$-Cellulose -t8	29
		$IM_{But}2$-Cellulose -t9	38
		$IM_{But}2$-Cellulose -t10	55
$IM_{Glu}2$	Temps initiaux	$IM_{Glu}2$ -t-1	0
		$IM_{Glu}2$ -t0	0
	Phase 1a	$IM_{Glu}2$-Glucose -t1	23
		$IM_{Glu}2$-Glucose -t2	72
	Phase 1b	$IM_{Glu}2$-Glucose -t3	107
	Phase 1c	$IM_{Glu}2$-Glucose -t4	160
	Phase 2	$IM_{Glu}2$-Cellulose -t1	1
		$IM_{Glu}2$-Cellulose -t2	6
		$IM_{Glu}2$-Cellulose -t3	8
		$IM_{Glu}2$-Cellulose -t4	10
		$IM_{Glu}2$-Cellulose -t5	13
		$IM_{Glu}2$-Cellulose -t6	17
		$IM_{Glu}2$-Cellulose -t7	22
		$IM_{Glu}2$-Cellulose -t8	29
		$IM_{Glu}2$-Cellulose -t9	38
		$IM_{Glu}2$-Cellulose -t10	55
$IM_{Cell}2$	Temps initiaux	$IM_{Cell}2$ -t-1	0
		$IM_{Cell}2$ -t0	0
	Phase 1a	$IM_{Cell}2$-Cellulobiose -t1	23
		$IM_{Cell}2$-Cellulobiose -t2	72
	Phase 1b	$IM_{Cell}2$-Cellulobiose -t3	107
	Phase 1c	$IM_{Cell}2$-Cellulobiose -t4	160
	Phase 2	$IM_{Cell}2$-Cellulose -t1	1
		$IM_{Cell}2$-Cellulose -t2	6
		$IM_{Cell}2$-Cellulose -t3	8
		$IM_{Cell}2$-Cellulose -t4	10
		$IM_{Cell}2$-Cellulose -t5	13
		$IM_{Cell}2$-Cellulose -t6	17
		$IM_{Cell}2$-Cellulose -t7	22
		$IM_{Cell}2$-Cellulose -t8	29
		$IM_{Cell}2$-Cellulose -t9	38
		$IM_{Cell}2$-Cellulose -t10	55

9.5. Effet de la co-inoculation de biomasses exogènes

L'objectif de cette étude était de mesurer l'effet de l'introduction d'une biomasse exogène sur le démarrage des fonctions microbiennes et les potentialités de dégradation de la cellulose, en termes de performance de dégradation et d'évolution de la structure et de la composition des communautés microbiennes. Pour cela des incubations en microcosmes anaérobies ont été mises en place. On a introduit dans ces microcosmes un inoculum contenant une flore caractéristique de la dégradation des déchets non dangereux (inoculum de digesteur d'OM mésophile et lixiviat), ainsi que la biomasse exogène (ici boue activée de station d'épuration ou contenu ruminal de vache). La quantité de biomasse exogène apportée dans chaque incubation est 20% en masse de la quantité d'inoculum de boues d'OM utilisée dans les autres microcosmes, soit 1.3g de culot de biomasse exogène et/ou 20ml de liquide exogène (équivalent à 18% en masse volatile).

Pour les deux biomasses exogènes, 7 microcosmes ont été mis en place. Deux d'entre eux contenaient de la cellulose bactérienne enrichie en carbone 13. Un troisième microcosme contenait de la cellulose bactérienne à un enrichissement naturel. Dans deux microcosmes on a introduit du foin, et dans deux contrôles aucun substrat n'a été introduit. Dans chaque cas, la concentration de substrat introduite est telle que la concentration de carbone en début de dégradation est de 100 mM de carbone. Ces informations sont résumées sur les schémas suivants (Figure 32).

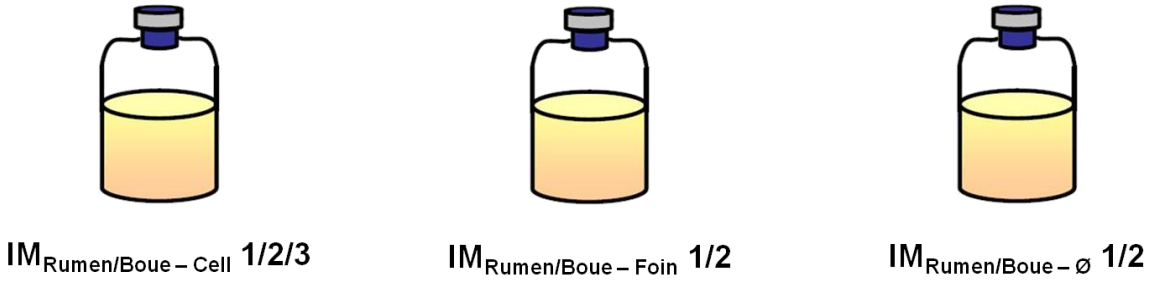


Figure 32 : Microcosmes préparés pour les expériences de co-inoculation de biomasses exogènes.

Une dizaine de prélèvements de 6 ml a été réalisée dans chaque microcosme au cours de la dégradation des substrats. Les tableaux ci-dessous résument l'ensemble des prélèvements réalisés pour l'expérience de co-inoculation avec le contenu ruminal (Tableau 10 et Tableau 11).

Tableau 10 : Liste des prélèvements réalisés pour l'expérience de co-inoculation avec le contenu ruminal.

Microcosme	Nom du prélèvement	Nombre de jours depuis l'introduction du substrat
$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$	$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$ -t-1	0
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$ -t0	0
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$ -t1	2
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$ -t2	7
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$ -t3	11
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$ -t4	14
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$ -t5	16
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$ -t6	18
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$ -t7	23
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$ -t8	31
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$ -t9	44
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}1$ -t10	66
$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$	$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$ -t-1	0
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$ -t0	0
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$ -t1	2
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$ -t2	7
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$ -t3	11
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$ -t4	14
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$ -t5	16
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$ -t6	18
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$ -t7	23
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$ -t8	31
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$ -t9	44
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}2$ -t10	66
$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$	$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$ -t-1	0
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$ -t0	0
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$ -t1	2
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$ -t2	7
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$ -t3	11
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$ -t4	14
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$ -t5	16
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$ -t6	18
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$ -t7	23
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$ -t8	31
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$ -t9	44
	$IM_{Rumen\text{-}Cell}3$ -t10	66

Microcosme	Nom du prélèvement	Nombre de jours depuis l'introduction du substrat
$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$	$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$ -t-1	0
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$ -t0	0
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$ -t1	2
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$ -t2	4
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$ -t3	7
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$ -t4	11
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$ -t5	14
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$ -t6	16
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$ -t7	23
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$ -t8	31
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$ -t9	44
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}1$ -t10	66
$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$	$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$ -t-1	0
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$ -t0	0
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$ -t1	2
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$ -t2	4
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$ -t3	7
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$ -t4	11
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$ -t5	14
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$ -t6	16
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$ -t7	23
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$ -t8	31
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$ -t9	44
	$IM_{Rumen\text{-}Foin}2$ -t10	66
$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}1$	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}1$ -t-1	0
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}1$ -t0	0
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}1$ -t1	2
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}1$ -t2	7
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}1$ -t3	11
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}1$ -t4	16
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}1$ -t5	23
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}1$ -t6	31
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}1$ -t7	44
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}1$ -t8	66
$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}2$	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}2$ -t-1	0
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}2$ -t0	0
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}2$ -t1	2
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}2$ -t2	7
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}2$ -t3	11
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}2$ -t4	16
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}2$ -t5	23
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}2$ -t6	31
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}2$ -t7	44
	$IM_{Rumen\text{-}\emptyset}2$ -t8	66

Tableau 11 : Liste des prélèvements réalisés pour l'expérience de co-inoculation avec la boue de bassin d'aération.

Microcosme	Nom du prélèvement	Nombre de jours depuis l'introduction du substrat
$IM_{Boue\text{-}Cell}1$	$IM_{Boue\text{-}Cell}1$ -t-1	0
	$IM_{Boue\text{-}Cell}1$ -t0	0
	$IM_{Boue\text{-}Cell}1$ -t1	2
	$IM_{Boue\text{-}Cell}1$ -t2	7
	$IM_{Boue\text{-}Cell}1$ -t3	11
	$IM_{Boue\text{-}Cell}1$ -t4	14
	$IM_{Boue\text{-}Cell}1$ -t5	16
	$IM_{Boue\text{-}Cell}1$ -t6	18
	$IM_{Boue\text{-}Cell}1$ -t7	23
	$IM_{Boue\text{-}Cell}1$ -t8	31
	$IM_{Boue\text{-}Cell}1$ -t9	44
	$IM_{Boue\text{-}Cell}1$ -t10	66
$IM_{Boue\text{-}Cell}2$	$IM_{Boue\text{-}Cell}2$ -t-1	0
	$IM_{Boue\text{-}Cell}2$ -t0	0
	$IM_{Boue\text{-}Cell}2$ -t1	2
	$IM_{Boue\text{-}Cell}2$ -t2	7
	$IM_{Boue\text{-}Cell}2$ -t3	11
	$IM_{Boue\text{-}Cell}2$ -t4	14
	$IM_{Boue\text{-}Cell}2$ -t5	16
	$IM_{Boue\text{-}Cell}2$ -t6	18
	$IM_{Boue\text{-}Cell}2$ -t7	23
	$IM_{Boue\text{-}Cell}2$ -t8	31
	$IM_{Boue\text{-}Cell}2$ -t9	44
	$IM_{Boue\text{-}Cell}2$ -t10	66
$IM_{Boue\text{-}Cell}3$	$IM_{Boue\text{-}Cell}3$ -t-1	0
	$IM_{Boue\text{-}Cell}4$ -t0	0
	$IM_{Boue\text{-}Cell}5$ -t1	2
	$IM_{Boue\text{-}Cell}6$ -t2	7
	$IM_{Boue\text{-}Cell}7$ -t3	11
	$IM_{Boue\text{-}Cell}8$ -t4	14
	$IM_{Boue\text{-}Cell}9$ -t5	16
	$IM_{Boue\text{-}Cell}10$ -t6	18
	$IM_{Boue\text{-}Cell}11$ -t7	23
	$IM_{Boue\text{-}Cell}12$ -t8	31
	$IM_{Boue\text{-}Cell}13$ -t9	44
	$IM_{Boue\text{-}Cell}14$ -t10	66

Microcosme	Nom du prélèvement	Nombre de jours depuis l'introduction du substrat
$IM_{Boue\text{-}Foin}1$	$IM_{Boue\text{-}Foin}1$ -t-1	0
	$IM_{Boue\text{-}Foin}2$ -t0	0
	$IM_{Boue\text{-}Foin}3$ -t1	2
	$IM_{Boue\text{-}Foin}4$ -t2	4
	$IM_{Boue\text{-}Foin}5$ -t3	7
	$IM_{Boue\text{-}Foin}6$ -t4	11
	$IM_{Boue\text{-}Foin}7$ -t5	14
	$IM_{Boue\text{-}Foin}8$ -t6	16
	$IM_{Boue\text{-}Foin}9$ -t7	23
	$IM_{Boue\text{-}Foin}10$ -t8	31
	$IM_{Boue\text{-}Foin}11$ -t9	44
	$IM_{Boue\text{-}Foin}12$ -t10	66
$IM_{Boue\text{-}Foin}2$	$IM_{Boue\text{-}Foin}2$ -t-1	0
	$IM_{Boue\text{-}Foin}3$ -t0	0
	$IM_{Boue\text{-}Foin}4$ -t1	2
	$IM_{Boue\text{-}Foin}5$ -t2	4
	$IM_{Boue\text{-}Foin}6$ -t3	7
	$IM_{Boue\text{-}Foin}7$ -t4	11
	$IM_{Boue\text{-}Foin}8$ -t5	14
	$IM_{Boue\text{-}Foin}9$ -t6	16
	$IM_{Boue\text{-}Foin}10$ -t7	23
	$IM_{Boue\text{-}Foin}11$ -t8	31
	$IM_{Boue\text{-}Foin}12$ -t9	44
	$IM_{Boue\text{-}Foin}13$ -t10	66
$IM_{Boue\text{-}\emptyset}1$	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}1$ -t-1	0
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}2$ -t0	0
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}3$ -t1	2
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}4$ -t2	7
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}5$ -t3	11
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}6$ -t4	16
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}7$ -t5	23
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}8$ -t6	31
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}9$ -t7	44
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}10$ -t8	66
$IM_{Boue\text{-}\emptyset}2$	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}2$ -t-1	0
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}3$ -t0	0
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}4$ -t1	2
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}5$ -t2	7
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}6$ -t3	11
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}7$ -t4	16
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}8$ -t5	23
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}9$ -t6	31
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}10$ -t7	44
	$IM_{Boue\text{-}\emptyset}11$ -t8	66

– Influence de changements de température

1. Introduction

La digestion anaérobie se réalise dans trois grands domaines de température : psychrophile, mésophile et thermophile (*282*). Même si les grandes voies de dégradation des molécules organiques sont semblables pour les trois gammes de température, les chemins métaboliques peuvent varier. En particulier, les populations de microorganismes présentes aux trois températures ne sont pas identiques, et semblent affectées par la température. Ce travail s'intéresse aux impacts de modifications rapides de la température opératoire sur la flore de digestion de la cellulose et sur les performances et caractéristiques de la dégradation associée. Les capacités de résistance et résilience de deux inocula mésophiles et thermophiles à des variations brutales de température sont évaluées. Les questions suivantes sont soulevées : la flore est elle capable de s'adapter rapidement à de nouvelles conditions de température ? Les modifications imposées par le changement de température sont-elles temporaires ou définitives ? Pour y répondre, deux expériences miroirs ont été réalisées.

Dans l'**expérience IT**, un **inoculum thermophile** complexe a été utilisé. Dans une première phase, la dégradation de la cellulose par cet inoculum a été étudiée en conditions thermophiles. Dans un second temps, la température d'incubation a été modifiée brutalement afin de réaliser une dégradation mésophile de la cellulose et d'évaluer la **résistance** du système face à la perturbation. Enfin dans une troisième phase, la température a été ramenée à sa valeur initiale (55°C) afin d'apprécier la capacité du système à revenir à son état normal (**résilience**) après la perturbation. De la cellulose a été ajoutée au début de chacune des phases d'incubation.

L'expérience miroir a été réalisée en partant d'un **inoculum mésophile** (**expérience IM**), incubé avec de la cellulose successivement à 35°C, 55°C et enfin 35°C.

La figure suivante (Figure 33) présente les modifications de température réalisées en fonction des phases d'incubation.

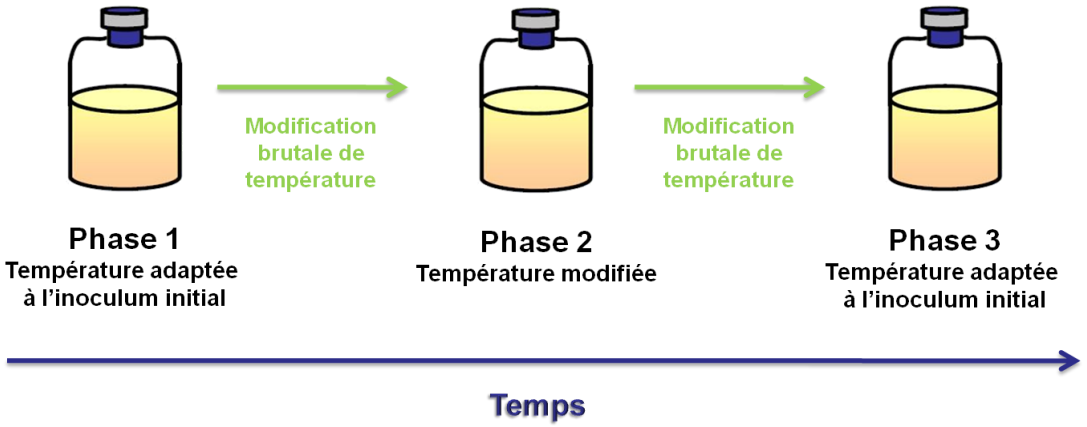


Figure 33 : Modification des températures d'incubation au cours des trois phases de l'expérience. De la cellulose a été introduite dans les microcosmes au début de chaque phase d'incubation.

Ces incubations ont été réalisées en triplicat. Le schéma ci-dessous (Figure 34) résume le déroulement des incubations pour les trois microcosmes des expériences IT et IM, appelés respectivement IT1, IT2,

IT3 et IM1, IM2, IM3. Afin d'étudier la fraction fonctionnelle des microorganismes, de la cellulose marquée (13C) a été introduite dans un des trois microcosmes au cours de chacune des phases (respectivement IT1/IM1, IT2/IM2 et IT3/IM3 pour les phases 1, 2 et 3). Pour chaque expérience, deux témoins sans changement de température ont été réalisés (IT4, IT5 et IM4, IM5). Différents prélèvements ont été réalisés au cours du temps pour analyser les paramètres physico-chimiques et microbiologiques de la dégradation. Un tableau présenté dans le chapitre précédent (paragraphe 9.2) reprend la nomenclature et la chronologie des différents prélèvements.

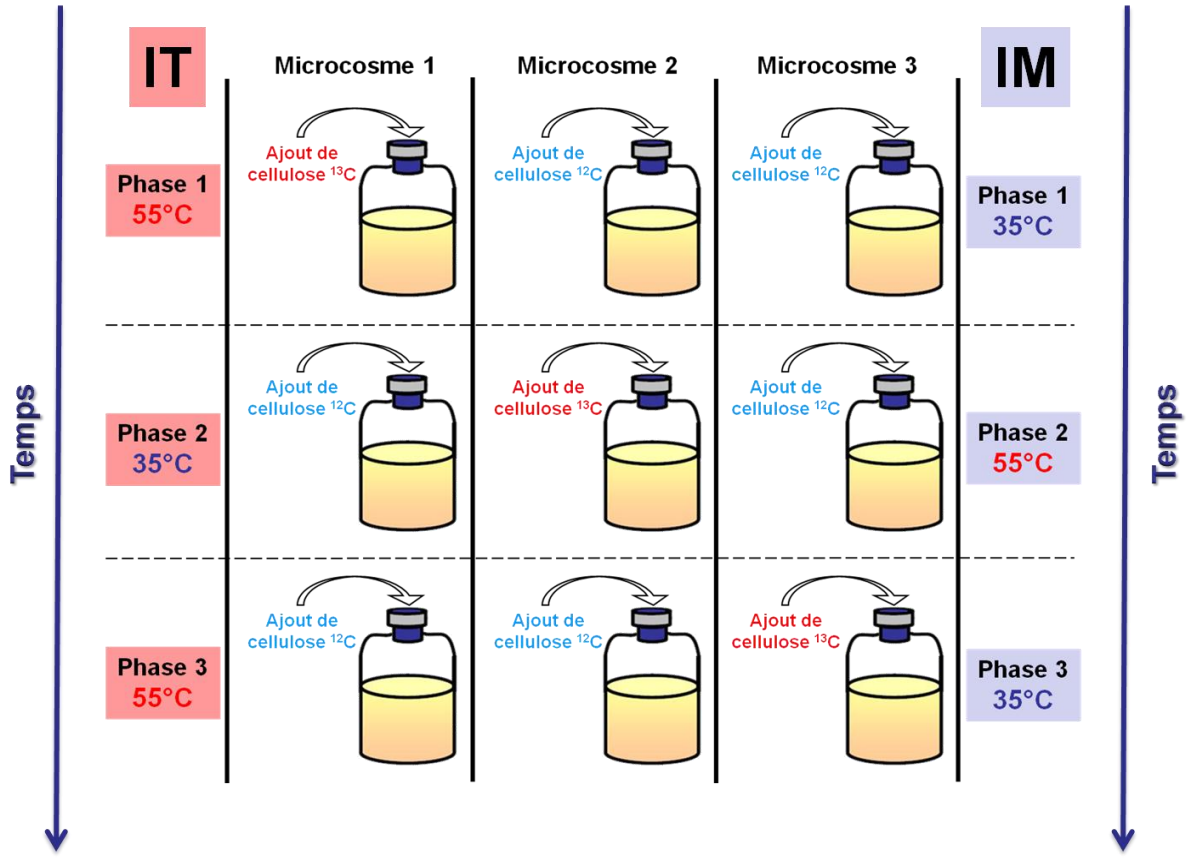


Figure 34 : Microcosmes et phases d'incubation des expériences IT et IM.

Dans un premier temps intéressons nous aux données physico-chimiques obtenues. Les données des témoins seront présentées de façon plus succincte après l'analyse des résultats des triplicats expérimentaux.

2. Données physico-chimiques

2.1. Productions de gaz

Des prélèvements liquides ayant été réalisés au cours des différentes phases de l'expérience, le volume contenu dans les flacons a évolué au cours du temps. Afin de se placer dans des conditions équivalentes dans chacune des phases, la quantité de cellulose ajoutée a été ajustée afin d'apporter une concentration constante de carbone organique en début de chaque phase d'incubation (2,7g /L de cellulose soit 1,2

g/L= 100 mmoles/L de carbone). Par conséquent, afin de pouvoir comparer les productions de gaz des différentes phases, celles-ci ont été exprimées en mg de carbone de gaz produit, puis normalisées par la quantité de carbone introduite au début de chaque phase (mg). Cette normalisation sera utilisée pour comparer les différents résultats obtenus.

2.1.1. Production de biogaz total

2.1.1.1. Expérience IT

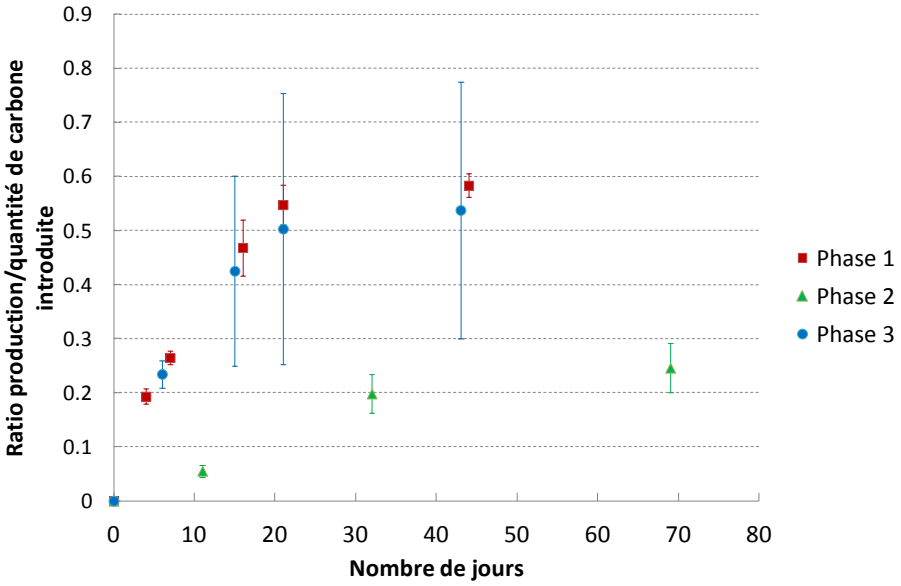


Figure 35 : Taux de conversion de la cellulose en biogaz total, expérience IT. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

La production de gaz obtenue pour l'expérience IT (**inoculum thermophile**) en première phase indique un taux de conversion de la cellulose en biogaz d'environ 60%, obtenu après 20 jours d'incubation environ. La production de gaz démarre sans latence, et l'ensemble du biogaz semble être produit en une seule fois. Les trois réplicats présentent peu de divergences, les écart-types sont assez faibles (*cf.* Figure 35).

Après modification brutale de température et ajout de cellulose (phase 2, passage aux conditions mésophiles), on observe une perte de fonctionnalité du système par rapport à la phase 1. La production de gaz est très faible pour les différents réplicats, qui montrent là encore des résultats voisins. Un plateau de production est atteint vers 30 jours, aux alentours de 20% de conversion. Il n'y a donc qu'une faible résistance fonctionnelle suite au changement de température. Une ou plusieurs des étapes du processus physicochimique de dégradation ont été modifiées ou bloquées.

Enfin, dans la troisième phase, après retour aux conditions initiales, (passage des conditions mésophiles aux conditions thermophiles), on observe un retour à la normale de la fonctionnalité des microcosmes. La production totale de gaz normalisée moyenne obtenue est en effet proche de celle mesurée au cours de la première phase (environ 55% de conversion obtenus après une vingtaine de jours avec une

cinétique équivalente). Il y a donc **résilience fonctionnelle apparente**. Cependant, on constate que les écarts-types pour les différents réplicats sont assez importants. En effet, les triplicats commencent à beaucoup diverger à partir de la troisième phase, peut-être suite à la perturbation apportée au cours de la phase 2. Seul IT2 a le même comportement en phases 1 et 3.

Enfin, notons que les témoins sans changement de température se comportent en phase 1 comme les triplicats IT1, IT2 et IT3. Après le nouvel ajout de cellulose en phase 2, aucun changement n'est observé pour le niveau de production des témoins (ratio de 60% environ), la cinétique est cependant plus rapide (plateau après une douzaine de jours). En troisième phase, la production obtenue est plus faible que celle observée pour les deux autres phases (ratio de 30% seulement), mais la cinétique de production reste très rapide (plateau atteint après 6 jours seulement). Au cours des différentes phases, le plateau est atteint de plus en plus vite, ce qui suggère que les microorganismes sont adaptés à la dégradation de la cellulose en conditions thermophiles. Le niveau plus faible de production pour les témoins en phase 3 semble indiquer que le comportement des microcosmes évolue même lorsqu'ils ne sont pas soumis à des modifications de température, mais beaucoup plus lentement toutefois.

2.1.1.2. Expérience IM

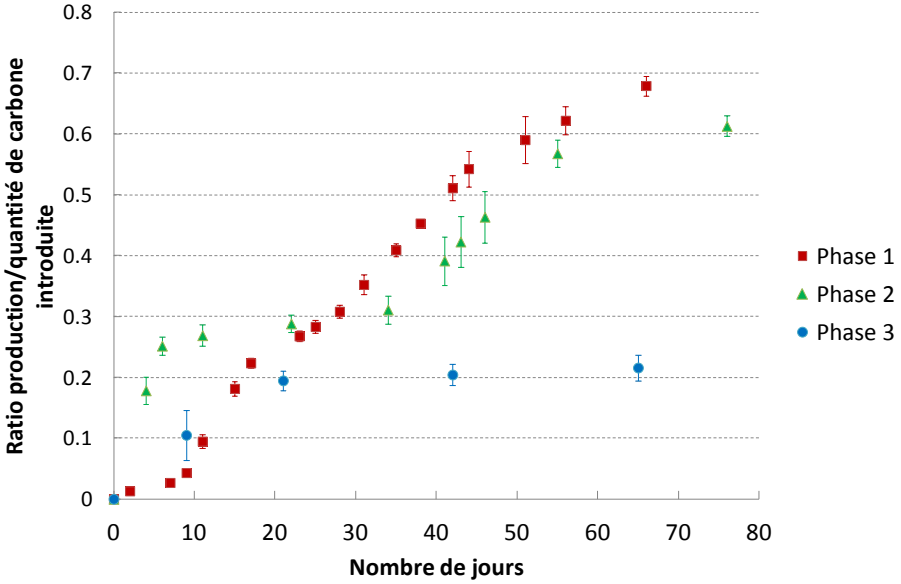


Figure 36 : Taux de conversion de la cellulose en biogaz total, expérience IM. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

Les productions de gaz obtenues pour l'expérience IM (**inoculum mésophile**) présentent des caractéristiques différentes de celles de IT. Dans cette expérience (*cf.* Figure 36), environ 70% du substrat initial est converti en gaz au cours de la première phase. Cependant la production de gaz est plus lente et progressive (plateau vers 50 jours). Elle présente une latence d'une dizaine de jours. Une inflexion de la courbe de production vers 25 jours suggère que la production de gaz est peut-être réalisée en deux temps.

Après le changement de température (passage aux conditions thermophiles), contrairement à l'expérience IT, la production démarre instantanément pour attendre environ 60% après une cinquantaine de jours. La production semble passer par deux phases également, qui sont cette fois plus nettement marquées (séparées par une trentaine de jours d'incubation, entre jour 5 et jour 35). Il y a résistance fonctionnelle apparente suite au passage en conditions thermophiles.

A l'opposé de ce qui a été observé dans l'expérience IT pour la troisième phase, le retour à la température mésophile initiale ne s'accompagne pas d'une production importante de biogaz. Le système semble bloqué, et le plateau de 20% de conversion du substrat en gaz est atteint après 20 jours d'incubation et n'évolue plus, même après plusieurs semaines supplémentaires d'incubation. La fonctionnalité semble avoir été perdue lors du passage à 55°C. Il n'y a pas de résilience fonctionnelle dans ce cas.

Enfin, les écart-types relativement faibles mesurés montrent que les différents réplicats de l'expérience IM donnent des résultats semblables, et on n'observe pas de dérive fonctionnelle entre les réplicats suite aux perturbations.

Les témoins sans changement de température se comportent en phase 1 comme les triplicats IM1, IM2 et IM3. Pour les deux autres phases le niveau de production atteint est le même qu'en phase 1, mais le plateau est atteint de plus en plus rapidement (25 jours en phase 2 et 20 jours en phase 3). Comme dans le cas des témoins de l'expérience IT, on peut imaginer que la biomasse est de plus en plus adaptée pour la dégradation de la cellulose, elle est donc plus rapide même si ses performances restent constantes.

2.1.1.3. Bilan

Note : les taux de conversion de la cellulose en biogaz peuvent paraître faibles, notamment dans les cas où les systèmes ne semblent pas affectés par les changements de température et où la cellulose se dégrade correctement. Les prélèvements liquides réalisés au cours de l'expérience sont en effet responsables du retrait d'une quantité importante de carbone qui n'est pas converti en biogaz. L'influence de ces prélèvements est discutée au paragraphe 2.4 et explique les valeurs observées, plus faibles qu'attendues.

Même si la cinétique est plus lente, le rendement apparent de conversion de la cellulose en gaz est un peu plus important dans les microcosmes inoculés avec l'inoculum mésophile que dans ceux inoculés avec l'inoculum thermophile. L'inoculum thermophile semble être directement adapté (pas de latence) alors que l'inoculum mésophile n'est fonctionnel (pour la production de gaz) qu'après plusieurs jours. La production en deux étapes est peut-être en lien avec la nécessité de cette phase d'adaptation.

Par ailleurs, ces premiers résultats montrent une **asymétrie des deux inocula** face aux perturbations induites par les changements de température. L'inoculum thermophile ne s'adapte pas au changement de température, mais conserve sa fonctionnalité disponible pour un retour aux conditions initiales. On pourra toutefois s'interroger sur les raisons de la divergence observée dans les réplicats de l'expérience IT à partir de la phase 3. Au contraire, l'inoculum mésophile s'adapte au passage en conditions thermophiles, même si cela implique une production de gaz en deux temps. Il n'est par contre pas

résilient. Ces deux expériences suggèrent donc que le passage des conditions thermophiles aux conditions mésophiles s'accompagnerait d'une perte de fonctionnalité provoquant un arrêt de la dégradation. En revanche, le passage des conditions mésophiles aux conditions thermophiles ne semble pas pénalisant, mais ne permet pas de retour en arrière.

2.1.2. Productions spécifiques de biogaz

2.1.2.1. Dioxyde de carbone

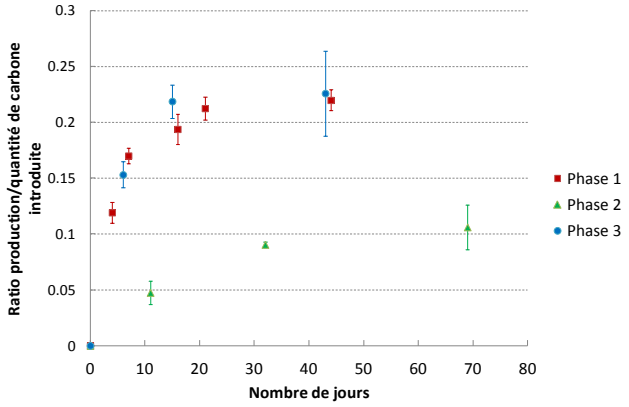


Figure 37 : Taux de conversion de la cellulose en CO_2, expérience IT. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

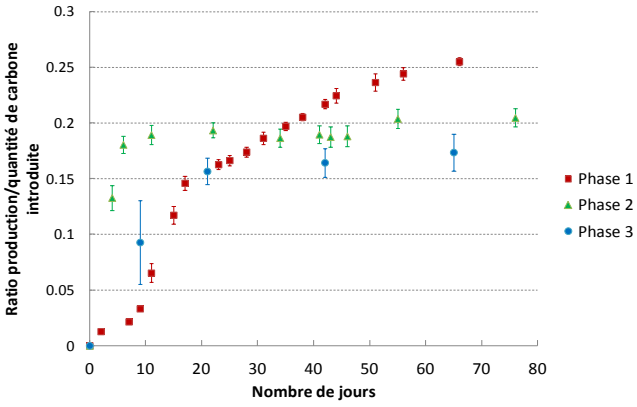


Figure 38 : Taux de conversion de la cellulose en CO_2, expérience IM. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

Pour l'expérience IT (voir Figure 37), les conclusions pour le CO_2 sont les mêmes que celles énoncées pour la production totale de biogaz, mis à part la cinétique de production qui est plus rapide pour le CO_2, celui-ci étant sans doute produit plus tôt que le CH_4. La production de la phase 3 semble très légèrement supérieure en moyenne par rapport à la phase 1, mais les écarts entre réplicats pour cette phase ne permettent pas de conclure. Pour les témoins IT4 et IT5 on observe le même niveau de production (20-25% de CO_2 produit) pour les trois phases, avec une cinétique un peu plus rapide à chaque phase.

Pour l'expérience IM (voir Figure 38), les observations sont légèrement différentes de celles réalisées pour la production totale de biogaz. Pour la phase 1, la production de CO_2 est observée avec une latence de quelques jours et atteint un plateau après une cinquantaine de jours. La cinétique de production est plus rapide que celle du gaz total au départ, mais plus lente à la fin, le CO_2 est donc plutôt produit en début de dégradation. Pour la deuxième phase, la production est observée sans latence et très rapidement. Elle est réalisée en seulement 6 jours. Au-delà, plus aucune production de CO_2 n'est observée jusqu'à la fin de cette phase. Elle est un peu plus faible en moyenne qu'à la phase 1 (environ 80%). Enfin, la production de CO_2 lors de la dernière phase atteint en moyenne environ 70% de la production observée dans la phase 1, en un laps de temps comparable. Le retour à la température

initiale n'a pas eu d'influence aussi forte sur les taux de production de CO_2 que sur la production de biogaz total.

La production des témoins sans changement de température est équivalente en phase 1 à ce qui a été observé plus haut pour IM1, IM2 et IM3. Pour les phases 2 et 3 le comportement reste le même, mais la cinétique est accélérée, comme pour le biogaz total.

2.1.2.2. Méthane

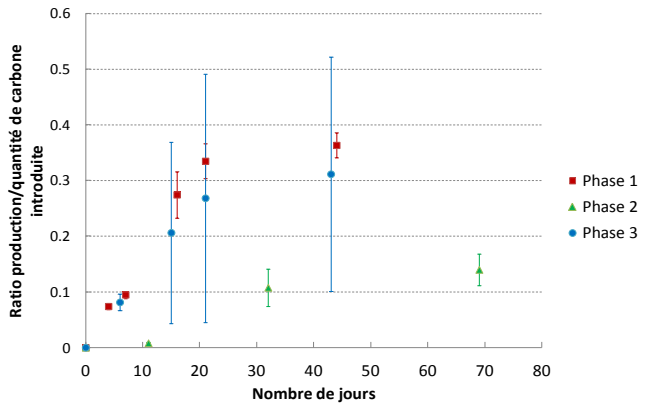


Figure 39 : Taux de conversion de la cellulose en CH_4, expérience IT.
Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

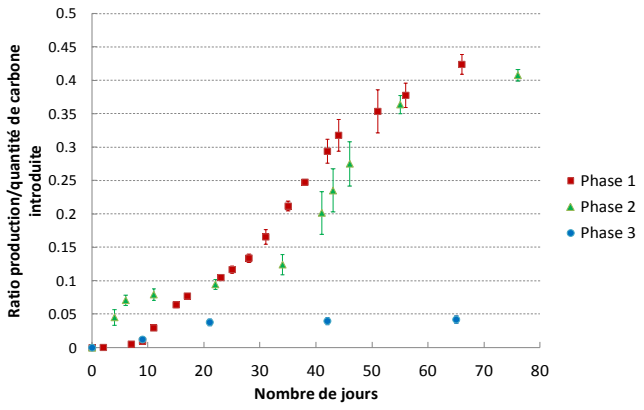


Figure 40 : Taux de conversion de la cellulose en CH_4, expérience IM.
Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

La production de méthane pour l'expérience IT (Figure 39) suit la même tendance que celle observée pour la production de biogaz total, sa cinétique étant légèrement plus lente. La production moyenne de méthane en phase 3 semble toutefois plus faible qu'à la phase 1, mais les différents réplicats montrent des valeurs différentes. Le comportement des témoins est intéressant. En phase 1, ils transforment environ 37% de la cellulose initiale en CH_4, comme les triplicats IT1, IT2 et IT3. Leur comportement est le même en phase 2 (ratio de 37% pour le CH_4), mais en phase 3 seulement 14% sont produits, alors que la production de CO_2 n'a pas diminué (*cf.* paragraphe précédent). La dérive observée est donc liée à la production de méthane, ce qui suggère un épuisement spécifique des populations méthanogènes au cours des injections successives de cellulose.

Pour l'expérience IM (Figure 40), la production de méthane en phase 1 est lente mais régulière, et atteint un plateau vers 55 jours. Tout comme sur la courbe de production de biogaz total, une légère inflexion laisse imaginer deux étapes de production, mais la tendance n'est pas nette. Pour la seconde phase cette production en deux étapes est beaucoup plus visible. Une faible quantité de méthane est produite pendant les tout premiers jours de l'incubation (20%), puis la majorité du méthane est produite entre les jours 35 et 55 (les 80% restant), après une interruption de presque 30 jours. Le niveau total de production est comparable à celui observé pour la phase 1. Enfin en phase 3, on peut observer que seulement une très faible quantité de méthane est produite pendant les premiers jours, puis que l'activité méthanogène est complètement absente jusqu'à la fin de l'incubation. La production des

témoins sans changement de température est équivalente en phase 1 à ce qui a été observé plus haut. Pour les phases 2 et 3 le comportement reste le même, mais la cinétique est accélérée, comme pour le biogaz total.

2.1.2.3. Autres gaz

Les évolutions de la concentration de N_2, O_2, N_2O, NH_3, H_2S et H_2 dans le ciel gazeux des microcosmes ont également été suivies au cours du temps. Dans les deux séries d'expériences (IT et IM), la quantité de ces gaz est quasi constante (évolution de moins de 1%).

2.1.2.4. Synthèse

Pour l'expérience IT les observations faites pour CO_2 et CH_4 sont globalement les mêmes que celles réalisées pour la production globale. On observe que le CO_2 est produit un peu plus rapidement que le CH_4, dont la production s'étale plus longtemps. On peut ajouter que pour la phase 1, le ratio final moyen de production de CH_4 / production de CO_2 est de 1,65 alors qu'il est de 1,38 pour la phase 3 (et 1,27 pour la phase 2). Cette différence entre le ratio à la phase 1 et à la phase 3 pose la question, même si les niveaux de production sont du même ordre de grandeur, de la similarité des voies métaboliques utilisées pour produire le biogaz. Ces observations devront être mises en regard des autres résultats physico-chimiques et microbiologiques pour les compléter.

Les données de production spécifique apportent également des éléments nouveaux pour l'expérience IM. On observe tout d'abord que lors de la phase 1 le CO_2 est produit avant le CH_4. Celui-ci est produit plus lentement, et progressivement tout au long de la dégradation. De même, la production de biogaz total en deux temps observée pour la phase 2 de l'expérience IM semble être bien expliquée par les productions spécifiques de biogaz. La première étape est une production majoritaire de CO_2, avec peu de CH_4 (le CO_2 provient sans doute majoritairement des étapes d'hydrolyse, et une petite quantité est produite avec le CH_4), alors que la seconde étape correspond à une production de méthane exclusivement (ceci laisse penser à la méthanogenèse hydrogénotrophe, et le temps de latence suggère que les populations d'archées ont dû s'adapter à la nouvelle température. Enfin, lors de la phase 3, même si un peu de CO_2 est produit (sans doute au cours des étapes d'hydrolyse), la production de CH_4 est totalement stoppée, la fonction production de gaz a été bloquée suite au passage des conditions thermophiles aux conditions mésophiles. On peut également se pencher sur les ratios production de CH_4 / production de CO_2 pour la série IM. Pour la phase 1, ils sont de 1,61 – 1,72 – 1,66 pour IM1 – IM2 – IM3 respectivement. Ils sont de 1,95 – 2,02 – 2,01 pour la phase 2 et enfin de 0,27 – 0,22 – 0,24 pour la troisième phase. On remarque tout d'abord que les valeurs sont proches pour les trois réplicats dans chacune des phases. Ceci est en bon accord avec les faibles écarts types calculés pour les productions de gaz. On peut donc penser que les trois réplicats ont évolué de façon proche, avec le même métabolisme. Les valeurs de la phase 2 (conditions thermophiles) sont plus élevées que pour la phase 1. Les chemins métaboliques employés sont différents. Enfin les valeurs très faibles de la phase 3 sont en accord avec la faible production de méthane.

2.1.3. Conclusions

Les principales conclusions des données sur les biogaz sont que :

- La cinétique est plus rapide pour l'inoculum thermophile, mais qu'on observe un rendement de conversion de cellulose en gaz légèrement moindre que pour l'inoculum mésophile
- Les changements de température demandent une adaptation du système et ont une influence sur les voies de production du méthane
- Une asymétrie de comportement face au changement de température est observée :
    - Résistance fonctionnelle apparente dans un cas, sans résilience (Série IM, inoculum mésophile)
    - Résilience fonctionnelle apparente mais pas de résistance (Série IT, inoculum thermophile)
- Le passage par les conditions thermophiles fait définitivement perdre certaines des fonctionnalités mésophiles
- Le passage par les conditions mésophiles induit une divergence de comportement au retour en conditions thermophiles

2.2. *Analyses physicochimiques de la phase liquide*

2.2.1. Carbone organique et inorganique dissous

2.2.1.1. Expérience IT

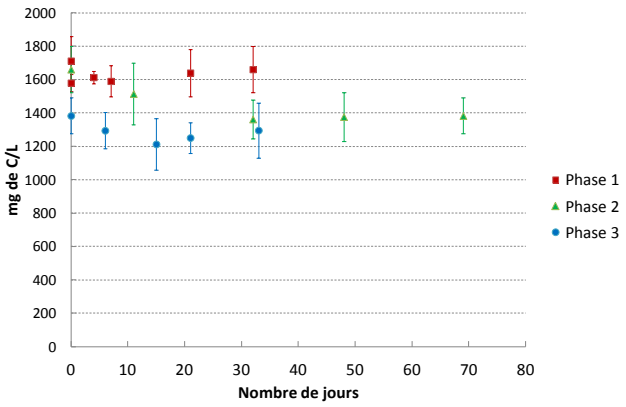


Figure 41 : Evolution de la concentration en carbone inorganique dissous, expérience IT. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

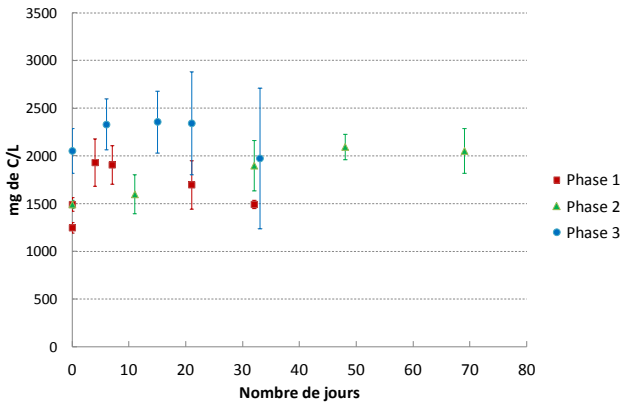


Figure 42 : Evolution de la concentration en carbone organique dissous, expérience IT. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

La quantité de carbone inorganique dissous évolue peu au cours des différentes phases de dégradation de l'expérience IT (inoculum thermophile) (Figure 41). Les valeurs mesurées pour les trois phases sont comparables. Ceci est en accord avec les valeurs de pH (non montrées) qui évoluent peu. Les

observations sont les mêmes pour les témoins. On observe toutefois une légère diminution des CID en cours de phase 2.

Les valeurs de carbone organique dissous sont quant à elles plus fluctuantes. Pour les phases avec production de gaz (phases 1 et 3), elles augmentent après quelques jours de dégradation puis diminuent par la suite. Ceci correspond logiquement à ce qui est attendu, une accumulation de sous-produits organiques dissous issus de la dégradation de la cellulose, puis leur consommation par des microorganismes pour former CO_2 et CH_4. Pour la phase 2 on observe une augmentation de la quantité de COD au cours du temps mais pas de diminution. On peut imaginer différentes hypothèses. Une d'entre elles est que seules les fonctions de production de gaz sont arrêtées, et que les étapes amont de dégradation de la cellulose se réalisent malgré le changement de température, provoquant l'accumulation de molécules organiques dissoutes selon un métabolisme similaire ou différent de celui de la phase 1. Une autre hypothèse est que la biomasse issue de la phase 1 et non active en phase 2 se dégrade et entraîne une augmentation de la quantité de carbone organique dissous.

2.2.1.2. Expérience IM

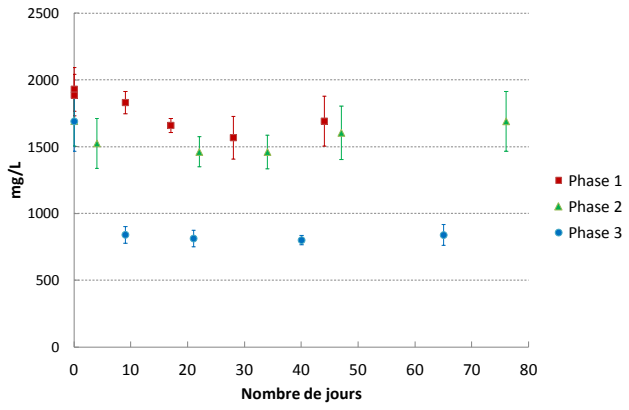


Figure 43 : Evolution de la concentration en carbone inorganique dissous, expérience IM. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

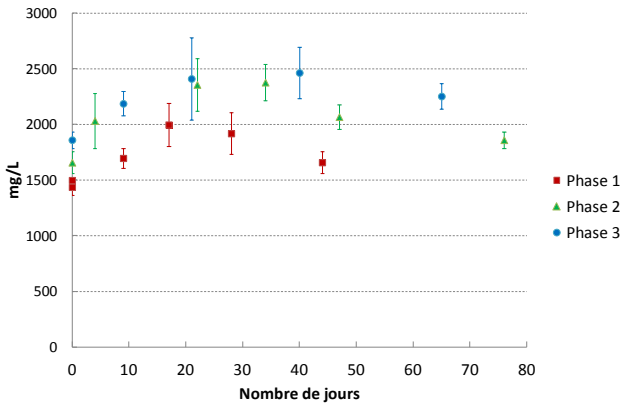


Figure 44 : Evolution de la concentration en carbone organique dissous, expérience IM. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

Dans cette expérience, on remarque également que les valeurs de CID évoluent peu au cours d'une même phase de dégradation. On peut noter que la valeur moyenne des CID au cours d'une phase diminue d'une phase à l'autre, en particulier entre la deuxième et la troisième phase.

Pour la première et la deuxième phase, les valeurs de COD augmentent puis diminuent en fin de dégradation. Comme dans l'expérience IT, ceci correspond à la formation des sous-produits de dégradation de la cellulose qui sont ensuite convertis en biogaz. Pour la troisième phase, la concentration des COD, après une légère augmentation, évolue peu. On peut émettre les mêmes hypothèses que pour la phase 2 de l'expérience IT.

2.2.2. Acides gras volatils

Les principaux AGV retrouvés au cours de l'expérience sont l'acide acétique et l'acide propionique. Ceci n'exclue pas que la dégradation passe par d'autres AGV, mais leur accumulation n'est pas suffisante pour permettre leur détection.

2.2.2.1. Expérience IT

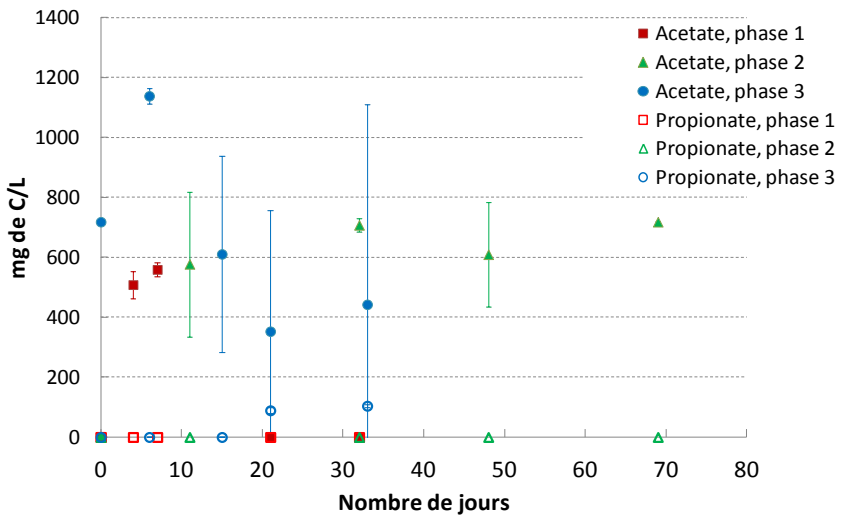


Figure 45 : Evolution de la concentration en acides gras volatils, expérience IT. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

Pour la première phase, le comportement observé est le même que pour les COD. De l'acide acétique est produit en début de dégradation puis est consommé pour être transformé en biogaz. Son épuisement correspond à l'arrêt de la production de biogaz.

Au cours de la deuxième phase, de l'acide acétique est présent en quantité importante et de façon peu variable aux différents prélèvements effectués. Il y a donc une accumulation d'acide acétique, ce qui suggère qu'**une des fonctions perdue suite au changement de température est celle de la dégradation de l'acide acétique en biogaz, mais pas la production d'acide acétique**.

Enfin pour la troisième phase, on remarque une forte concentration d'acide acétique en début d'incubation, provenant de la cellulose ajoutée qui se dégrade, mais venant sans doute également en partie de l'acide acétique résiduel accumulé lors de la phase 2 et non dégradé. Cet acide acétique est dégradé au cours du temps de façon inégale selon les microcosmes. On peut ainsi noter d'importants écart-types entre les réplicats qui correspondent aux différences de fonctionnement des uns par rapport aux autres.

2.2.2.2. Expérience IM

Au cours des phases 1 et 2, on observe une augmentation de la concentration d'acide acétique puis diminution, ce qui correspond à sa production suivie de sa dégradation. On note en phase 2 une

accumulation importante d'acide acétique pendant le premier plateau de production de biogaz. Ceci confirme l'hypothèse qu'à ce moment les archées ne sont plus capables de dégrader l'acide acétique pour produire du gaz. Elles doivent s'adapter au changement de température. La dégradation de la cellulose en phase 1 passe par la production intermédiaire d'acide propionique qui s'accumule et n'est dégradé sans doute que lorsque l'acide acétique a été consommé. Cet intermédiaire est toutefois présent de manière moins importante que l'acide acétique.

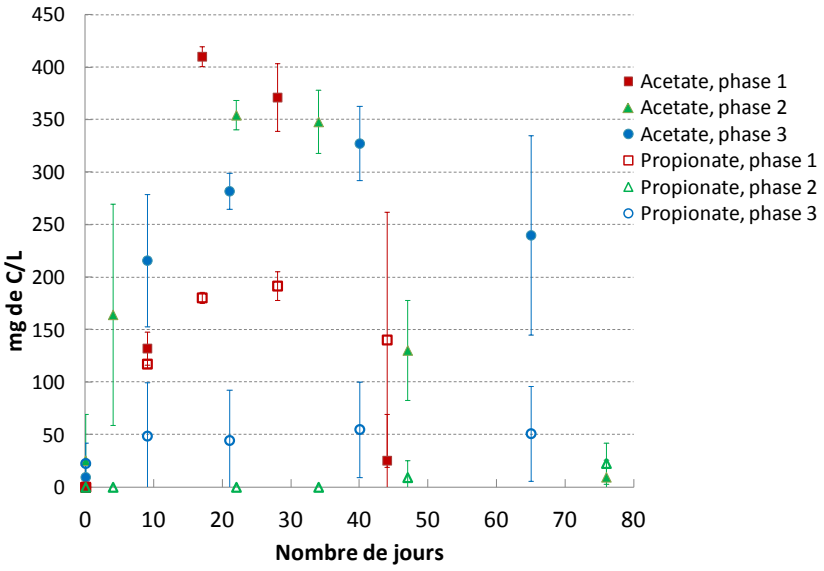


Figure 46 : Evolution de la concentration en acides gras volatils, expérience IM. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

Les niveaux de concentration en acide acétique obtenus sont moins élevés que pour l'expérience IT, ce qui s'explique sans doute par une dégradation globale de la cellulose plus lente pour l'expérience IM que pour IT (50 jours environ contre une vingtaine de jours pour la production de biogaz). La production et la dégradation étant plus étalées dans le temps, l'accumulation est moins importante.

Pour la dernière phase (sans production de gaz) on observe un niveau assez constant d'acide acétique et d'acide propionique, ce dernier étant présent en quantités faibles. Comme pour IT en phase 2, la consommation de l'acide acétique semble stoppée ou ralentie suite au changement de température. Il sera intéressant de voir si l'acide acétique et l'acide propionique accumulés proviennent de la dégradation de la cellulose ou d'un autre substrat présent dans le microcosme (biomasse).

2.3. Analyses isotopiques

Les analyses isotopiques ont été réalisées sur un seul réplicat à chaque phase. Dans la mesure où les réplicats montraient de fortes similitudes pour les autres analyses physicochimiques (expérience IT, phase 1 et 2, expérience IM, les trois phases), nous pouvons considérer que ces valeurs sont représentatives des différents réplicats (sauf pour l'expérience IT phase 3). Notons également que les valeurs mesurées correspondent à l'enrichissement du gaz ou des AGV accumulés dans le système, et ne sont pas une valeur de la production instantanée. Elles donnent tout de même une indication qualitative sur les phénomènes en jeu.

2.3.1. Gaz

Pour l'expérience IT, on peut noter, quelle que soit la phase étudiée, que le pourcentage de ^{13}C dans le méthane n'est pas de 100. Ceci signifie qu'une partie du CH_4 a été formée à partir des carbonates initialement présents dans le milieu, ou encore qu'il est formé à partir d'acide acétique non enrichi à 100% en ^{13}C, donc pas formé exclusivement à partir de la cellulose introduite. On peut ajouter que dans chaque phase le méthane étant plus enrichi que le dioxyde de carbone, il n'a pas été formé uniquement par méthanogenèse hydrogénotrophe à partir de carbonates (on peut en effet considérer qu'il n'y a pas de fractionnement isotopique entre le CO_2 gazeux et le CO_2 dissous ou sous forme de carbonates) (*283*). Plus précisément pour les phases 1 et 2, la méthanogenèse serait d'abord majoritairement hydrogénotrophe (la composition isotopique du méthane suit de près celle du dioxyde de carbone), puis une méthanogenèse majoritairement acétoclaste (fort écart entre la composition isotopique du dioxyde de carbone et du méthane). Pour la phase 3, l'écart entre la composition isotopique du dioxyde de carbone et du méthane n'augmente jamais, ce qui suggère que la méthanogenèse acétoclaste est résiliente mais que la méthanogenèse hydrogénotrophe l'est davantage.

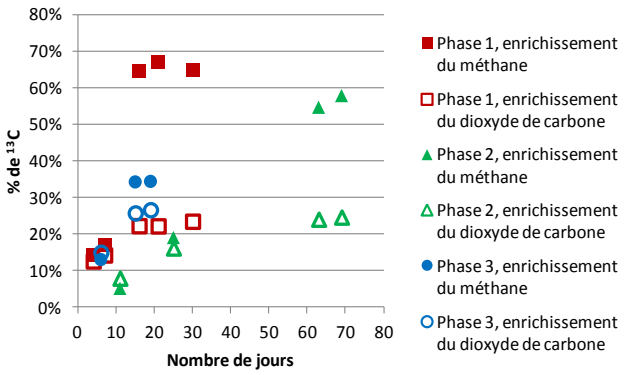


Figure 47 : Enrichissement isotopique des gaz, expérience IT.

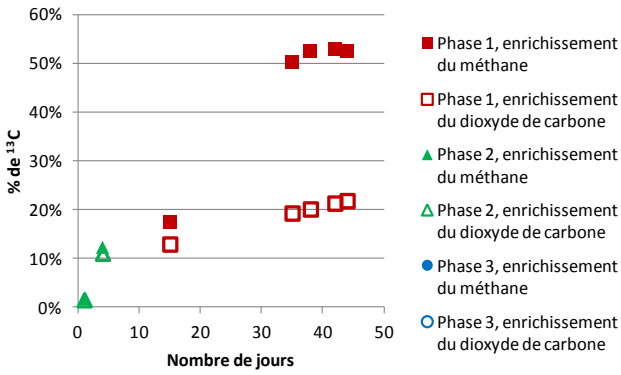


Figure 48 : Enrichissement isotopique des gaz, expérience IM.

Pour l'expérience IM, seules les valeurs d'enrichissement des gaz pour la première phase de dégradation sont disponibles, les analyses des autres échantillons n'étant pas exploitables. Le méthane produit est enrichi d'abord à 18% puis à 50% environ, alors que le dioxyde de carbone présente un enrichissement de 20%. On peut imaginer qu'une méthanogenèse d'abord majoritairement hydrogénotrophe puis acétoclaste est en jeu.

2.3.2. Acides gras volatils

Les analyses isotopiques révèlent la présence d'acide acétique, d'acide propionique et d'acide butyrique marqués dans le système. Des voies métaboliques les mettant en jeu sont donc actives, même si l'accumulation de ces AGV n'est pas toujours suffisante pour mesurer leur concentration (*cf.* 0.) L'acide butyrique est malgré tout présent en quantité bien moindre et les valeurs mesurées sont à la limite de détection de l'appareil. Nous ne présenterons donc ici que les données d'acide acétique et d'acide propionique.

2.3.2.1. Expérience IT

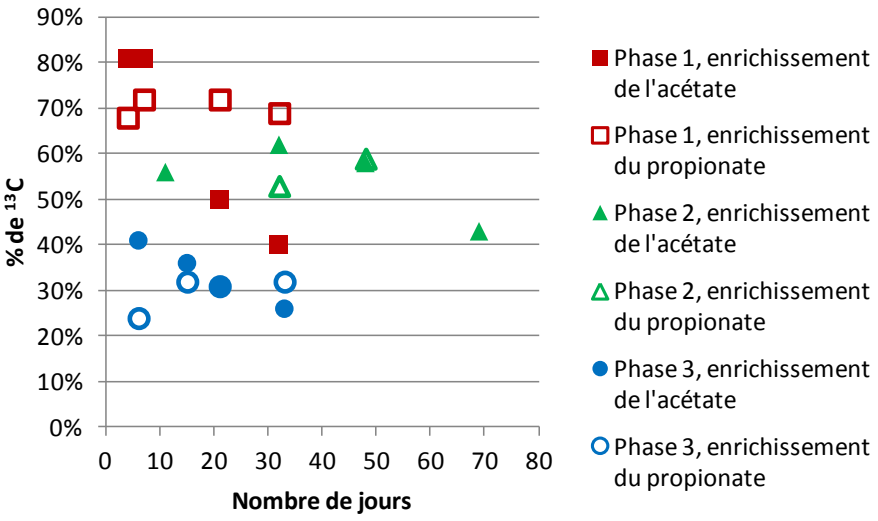


Figure 49 : Enrichissement isotopique de l'acide acétique et de l'acide propionique, expérience IT.

Les résultats montrent que l'acide acétique produit lors de la première phase de la série IT est fortement enrichi. On peut donc penser qu'il provient majoritairement de la dégradation de la cellulose. Les valeurs plus faibles pour les derniers prélèvements de IT1 sont moins significatives car la quantité d'acide acétique dans le milieu est moins importante, il est donc facilement dilué par une faible production d'acide acétique venant d'une autre source, dégradation de la biomasse par exemple.

Pour la seconde phase, l'enrichissement de l'acide acétique est d'environ 60%. Une partie non négligeable provient donc de la dégradation de la cellulose. Les premières étapes de dégradation de la cellulose n'ont pas été complètement bloquées, mais elles n'ont été que ralenties, ou remplacées par d'autres voies métaboliques. L'autre partie de l'acide acétique non enrichi peut être issue de la dégradation de biomasse morte suite au choc de température, ou encore de la réduction du CO_2 pour produire de l'acide acétique, ce qui expliquerait la diminution de CID observée en phase 2. On peut essayer de le déterminer rapidement : on observe en phase 2 de l'expérience IT2 une accumulation d'environ 600 mg de C/L d'acide acétique, soit si on prend une valeur moyenne d'enrichissement de 60%, 240 mg de C/L d'acide acétique non enrichi. Or initialement en phase 1, 1200 mg de C/L ont été introduits avec la cellulose dans IT2. Si l'on considère qu'en conditions anaérobies la biomasse fixe environ 5% du carbone métabolisé (*8*), et que tout le carbone issu de la cellulose a été métabolisé, en fin de phase 1, la phase liquide de IT2 contient 60 mg/L de biomasse nouvellement formée. La dégradation de cette biomasse ne suffit donc pas à expliquer le faible pourcentage d'enrichissement en phase 2. 185mg de C/L d'acide acétique au moins ont une autre origine, probablement l'homoacétogenèse à partir du CO_2.

Les valeurs obtenues pour la troisième phase sont plus difficilement interprétables. En effet, le système contient un mélange d'acide acétique résiduel de la phase 2 de IT3 (non enrichi) et de l'acide acétique enrichi issu de la dégradation de la cellulose nouvellement introduite dans IT3.

Les conclusions sont les mêmes avec les valeurs obtenues pour l'acide propionique pendant les trois phases. L'acide propionique est légèrement moins enrichi que l'acide acétique. On peut imaginer qu'une partie de l'acide propionique pourrait avoir pour origine une réduction de l'acide acétique. Afin de le vérifier, il faudrait savoir si les molécules d'acide acétique et d'acide propionique contiennent à la fois des carbones ^{13}C et ^{12}C ou uniquement un type de carbones. On peut également signaler que de l'acide butyrique enrichi (75-80%) a été détecté lors de la première phase, signe qu'une voie métabolique passant par cet intermédiaire est active, même si elle est minoritaire.

2.3.2.2. Expérience IM

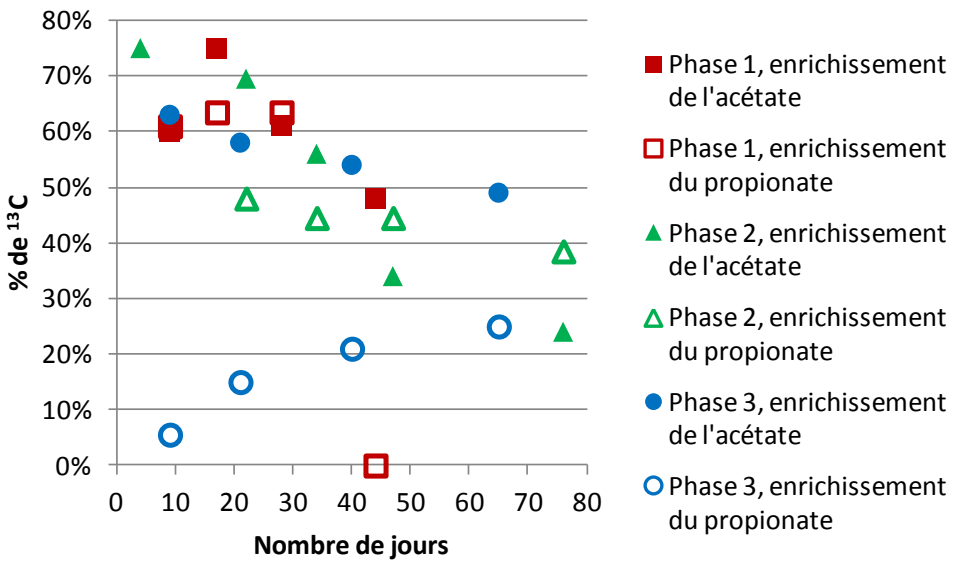


Figure 50 : Enrichissement isotopique de l'acide acétique et de l'acide propionique, expérience IM.

Dans les trois phases, l'enrichissement de l'acide acétique atteint au maximum 75% et est d'environ 60-65% en moyenne (quand il est présent en quantité significative dans le milieu). Par conséquent la totalité ne provient pas de la dégradation de la cellulose mais a d'autres origines. En particulier, les points IM2 (j22) et IM2 (j34) de la phase 2 correspondent à une concentration en acide acétique équivalente dans le milieu, mais ne présentent pas le même enrichissement. On peut penser que la dégradation de biomasse morte est importante et apporte de l'acide acétique non marqué. Le même calcul que pour l'expérience IT montre qu'une autre possibilité serait une production d'acide acétique par réduction du CO_2 du milieu, non enrichi à 100%. Ceci est en accord avec la baisse de CID observée. L'acide propionique est moins enrichi que l'acide acétique (50 à 60 % environ). De la même façon, on peut imaginer qu'une partie de l'acide propionique pourrait avoir pour origine une réaction de propionogenèse à partir d'acide acétique, d'hydrogène et de CO_2.

Ces valeurs mises en regard des valeurs d'enrichissement du méthane pour la phase 1 laissent penser que le méthane provient pour partie de la dégradation de l'acide acétique dans cette phase. Cependant, nous ne disposons pas d'assez de valeurs pour déterminer précisément l'importance des différentes voies métaboliques au cours du temps. L'enrichissement important de l'acide acétique en phase 3 nous

confirme toutefois que toutes les étapes d'hydrolyse et de fermentation de la cellulose ne sont pas stoppées, et que la méthanogenèse acétoclaste est responsable de l'absence de résilience fonctionnelle de la digestion anaérobie.

2.4. Influence des prélèvements liquides

Pour les deux expériences, la répartition du carbone au cours du temps a été estimée dans les différentes phases en tenant compte des prélèvements liquides et de la production de biogaz (Figure 51 et Figure 52).

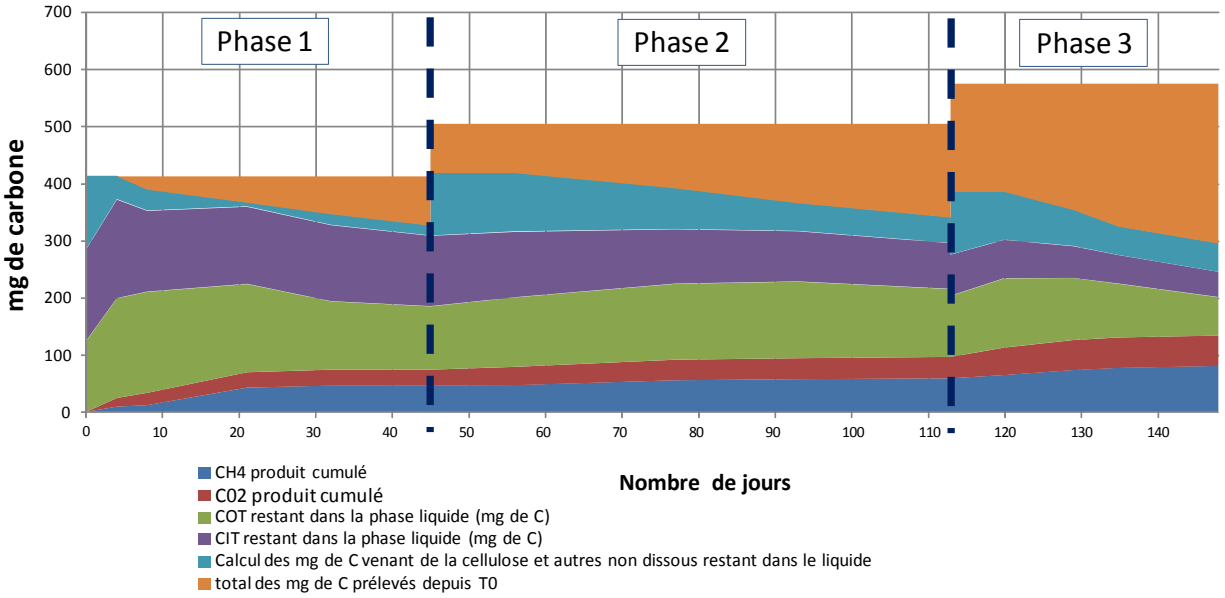


Figure 51 : Répartition du carbone au cours du temps, expérience IT.

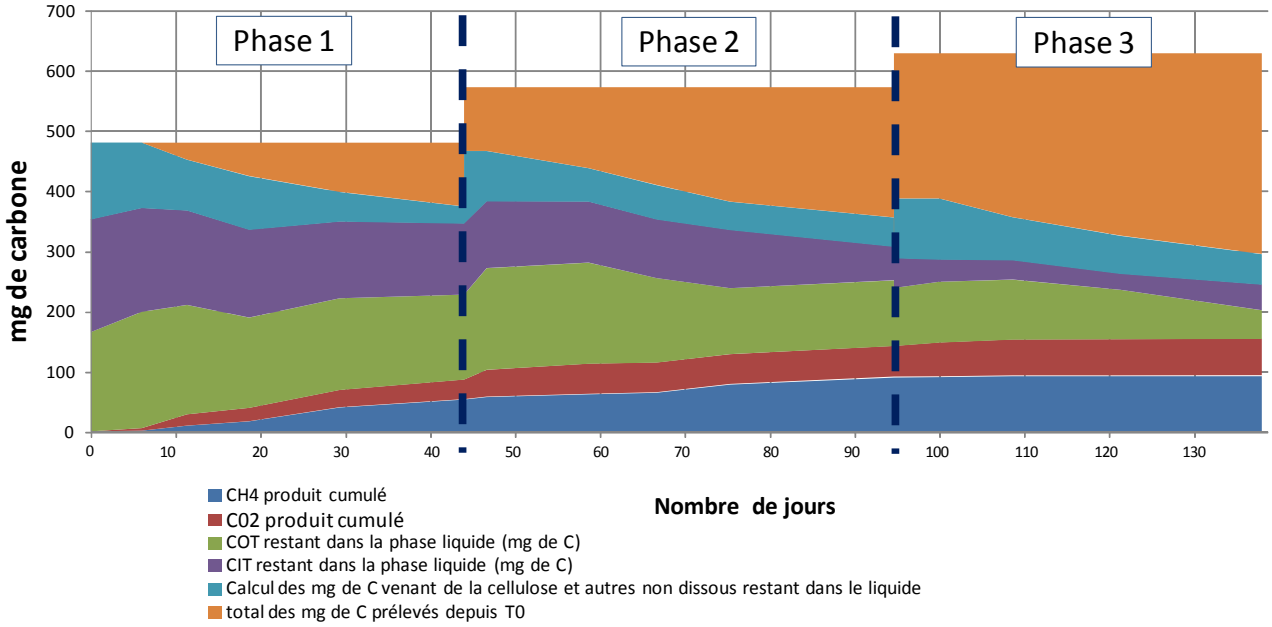


Figure 52 : Répartition du carbone au cours du temps, expérience IM.

Ces graphiques font apparaître l'influence non négligeable des prélèvements liquides sur les flux de carbone. Ceci explique en partie les rendements de conversion de la cellulose en biogaz inférieurs à ceux attendus. On estime en effet que la quantité de carbone assimilée par les microorganismes est d'environ 5% de celle contenue dans la cellulose initiale (*8*) ce qui n'était pas ici suffisant pour expliquer le défaut de production de gaz. Plus précisément, on peut déterminer que pour IT, approximativement 7 mg de C issus de cellulose non dégradée ont été prélevés au cours de la phase 1, 24 mg au cours de la phase 2 et 34 mg au cours de la phase 3. Pour IM il s'agit de 22 mg en phase 1, 27 mg en phase 2 et 43 mg en phase 3. La cinétique de dégradation étant plus élevée pour IT que pour IM, notamment en phase 1, la cellulose reste accumulée moins longtemps, ce qui explique qu'au total une quantité moins importante soit prélevée. Ce résultat confirme également que la conversion de la cellulose en biogaz, même si elle est plus lente, est plus importante pour IM que IT en phase 1, puisque le taux de conversion de la cellulose en biogaz est plus important, même si l'importance des prélèvements est plus grande.

3. Analyses microbiologiques

3.1. Observation des profils ARISA de la diversité totale

Des profils ARISA des communautés archées et bactéries ont été réalisés régulièrement au cours de la dégradation (environ quatre points par phase). Ils sont présentés en annexe (annexe 1) et analysés qualitativement dans les paragraphes suivants.

3.1.1. Expérience IT

3.1.1.1. Archées

Les résultats obtenus pour les archées sont assez reproductibles dans les trois microcosmes dans les trois phases. Pour la première phase, deux communautés sont observées. Un première est présente aux jours 4 et 8, et évolue vers une autre que l'on retrouve aux jours 21 et 32. Peut-être que différentes espèces d'archées sont impliquées au cours de la production de biogaz. Une interviendrait de façon plus précoce (avant le jour 8) et l'autre dans un second temps (les bandes spécifiques commencent à apparaître sur les profils au jour 8).

Au cours de la phase 2, les profils n'évoluent pas, et sont presque les mêmes que le profil final obtenu en fin de phase 1. Les populations d'archées n'ont pas su s'adapter au changement de température et n'ont pas évolué. Ceci est en accord avec l'absence de production de biogaz lors de la phase 2. On peut toutefois noter l'apparition progressive d'une bande qui sera retrouvée en phase 3 d'environ 600 paires de bases.

Lors de cette dernière phase, de nouvelles bandes apparaissent nettement. Les profils obtenus sont un peu différents de ceux de la première phase. Notons également que la diversité observée entre les trois microcosmes semble très proche. Les différences de performance observées entre les réplicats de la phase 3 ne seraient donc pas liées aux populations archées.

3.1.1.2. Bactéries

Pour la première phase on observe de bons réplicats entre les trois microcosmes. La communauté à l'origine de la dégradation de la cellulose peut être observée sur les deux premiers points (jour 4 et 8). Elle est stable entre ces points, et différente de l'inoculum initial. Les deux autres prélèvements (jours 21 et 32) ont été réalisés après la production importante de biogaz, alors que toute la cellulose était déjà dégradée. Ces deux profils sont semblables au profil de l'inoculum initial. Or ce dernier a été « préincubé » sans substrat pendant quelques jours avant d'être congelé puis utilisé. Les bandes observées sur ces profils ARISA correspondent sans doute à des microorganismes recyclant la biomasse morte, et intervenant en fin de dégradation des substrats.

Au cours de la deuxième phase, les profils sont encore très reproductibles entre les trois microcosmes. Des bandes spécifiques apparaissent sur le premier profil (jour 11) et disparaissent pour laisser place à un profil proche de celui observé en fin de dégradation de la phase 1. Les bandes observées sur le premier profil correspondent sans doute aux microorganismes responsables de la dégradation de la cellulose et de la formation d'acide acétique au début de la phase 2. Le système est ensuite peu variant.

Enfin en phase 3 les profils obtenus pour les différents microcosmes sont très variables. Ceci est en accord avec les divergences de comportement observées auparavant (production de gaz, COD, AGV). Les profils se distinguent dès le premier prélèvement, et en fin de dégradation la diversité au sein de chaque microcosme semble ne plus évoluer.

3.1.2. Expérience IM

3.1.2.1. Archées

Notons tout d'abord que les profils obtenus pour les différents réplicats sont très proches. On constate en premier lieu pour la phase 1 que le profil de diversité archée est constant, et qu'il correspond à celui de l'inoculum. Il est déjà adapté aux conditions de température, et n'est donc pas modifié au cours de la première phase.

Une partie du profil de diversité observé en phase 1 se retrouve en début de phase 2 puis évolue et se stabilise rapidement. Cette modification du profil de diversité archées pourrait expliquer que la production de gaz se fasse en deux temps.

Après retour à la température initiale, en phase 3, les profils ne sont pas modifiés. C'est ce qu'on attendait, car seulement une très faible production de biogaz est observée. La population archée n'est plus fonctionnelle et n'évolue plus.

3.1.2.2. Bactéries

De même que pour les archées, nous avons obtenu de bons réplicats d'analyse. Pour la phase 1, on constate que le premier profil (jour 9) est assez proche de l'inoculum initial. Ceci concorde avec la faible latence observée dans la production de biogaz. La biomasse évolue ensuite, et varie peu durant la période qui correspond à la production de biogaz (jour 17 et 28). On peut imaginer que ce profil

correspond aux microorganismes qui dégradent la cellulose et réalisent les étapes suivantes de dégradation. Enfin, on remarque une évolution des profils au jour 44, quand toute la cellulose a été dégradée. Le profil observé est assez proche de celui de l'inoculum initial, comme dans le cas de l'expérience IT on peut supposer qu'il s'agit de microorganismes responsables du recyclage de la biomasse morte.

Après le changement de température, en phase 2 après 4 jours d'incubation, on peut remarquer un profil de diversité complètement différent de ceux observés en phase 1. Il évolue au cours de la dégradation (jour 22) vers un profil qui semble plus divers. Ensuite les profils varient peu (jour 34, 47, 76). On peut toutefois noter des modifications dans l'intensité relative des différentes bandes. La perturbation a induit des changements de diversité importants.

Enfin, lors de la dernière phase, on retrouve des profils de diversité semblables à ceux observés en fin de phase 2. Le système ne semble pas pouvoir revenir à l'état initial de la phase 1, ni même évoluer vers un nouvel état d'équilibre performant, il est bloqué dans l'état de fin de phase 2.

3.1.3. Comparaison entre les deux expériences

3.1.3.1. Archées

- Dans les phases thermophiles

La phase 1 de l'expérience IT et la phase 2 de l'expérience IM présentent des similarités de profil assez importantes. On retrouve des bandes communes à la fois au début et à la fin de l'incubation. Cependant les profils demeurent différents et il est difficile de dénombrer précisément les bandes communes. La comparaison avec la phase 3 de l'expérience IT montre moins de points communs avec les deux autres.

- Dans les phases mésophiles

On peut comparer la phase 2 de l'expérience IT et la phase 3 de l'expérience IM. Dans les deux cas, peu de biogaz est produit et on peut imaginer que les archées sont peu actives et n'ont pas beaucoup évolué après le changement de température. C'est le cas, les profils obtenus sont assez semblables, comme c'était le cas pour ceux de la phase 1 de l'expérience IT et phase 2 de l'expérience IM. C'est le résultat attendu.

3.1.3.2. Bactéries

- Dans les phases thermophiles

Des profils voisins sont observés en fin de phase 1, expérience IT et fin de phase 2, expérience IM. De même, les profils de début de dégradation (jour 4) sont proches. Une partie des microorganismes semble commune, cependant la diversité totale n'est pas semblable.

- Dans les phases mésophiles

Les profils bactériens obtenus au cours des différentes phases mésophiles sont assez différents.

3.1.4. Conclusion

Il semble que des profils voisins entre les deux expériences pour une même température soient observés uniquement en conditions thermophiles. On peut imaginer que la diversité est moins grande dans ces conditions de température ce qui explique cette observation. Cependant, les observations que nous venons de réaliser sur les profils ARISA sont qualitatives et pas entièrement satisfaisantes, l'appréciation des similarités et dissimilarités étant seulement visuelle. Pour obtenir des conclusions plus précises, nous avons fait appel au logiciel StatFingerprints (*276*) pour mieux comprendre et analyser les données obtenues.

3.2. Interprétation statistique des données ARISA

3.2.1. Construction de dendrogrammes de proximité

Afin de comparer les profils entre eux indépendamment de l'observation, nous avons construit des dendrogrammes à l'aide du logiciel StatFingerprints. Les dendrogrammes ont été construits avec l'algorithme de Ward et les distances entre profils calculées par la méthode euclidienne (*284-285*). Les dendrogrammes ont été réalisés avec l'ensemble des points des trois phases des triplicats des expériences IT et IM pour les archées (Figure 53) et les bactéries (Figure 54).

3.2.1.1. Archées

Sur le diagramme obtenu on distingue nettement un premier groupe correspondant aux profils de la première phase de l'expérience IM (cadre avec tirets bleus). Il s'agit des seuls points en conditions mésophiles pour lesquels du biogaz est produit de manière quantitative.

Le second groupe (tiret rouge) correspond à tous les profils des microcosmes ayant été incubés au moins une fois en conditions thermophiles. Parmi celui-ci on voit nettement se distinguer des ensembles correspondants aux inocula thermophiles d'une part et mésophile d'autre part.

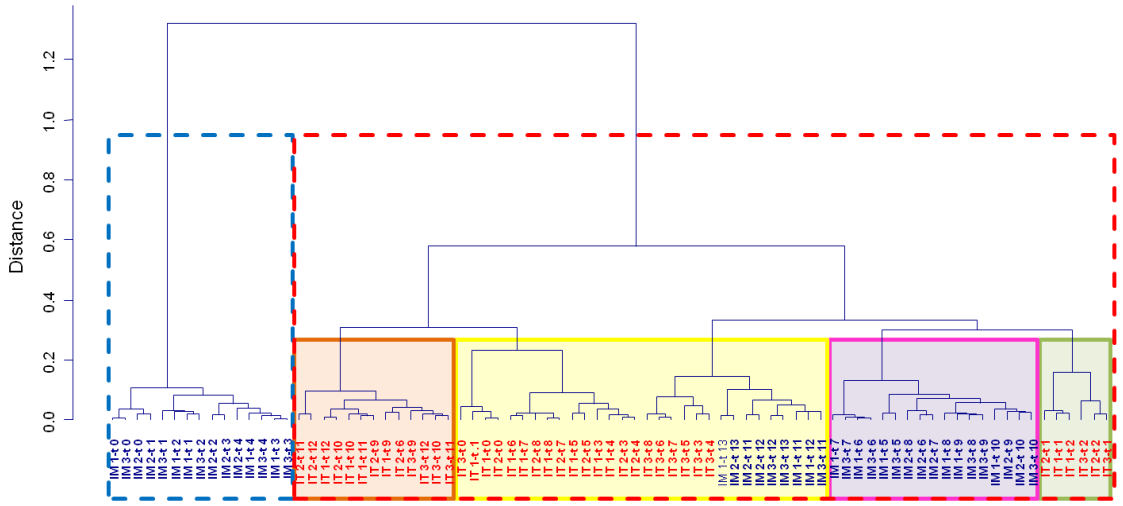


Figure 53 : Dendrogramme de proximité des profils ARISA des archées des expériences IT et IM.

En particulier, les points correspondant au début de la phase 1 de l'expérience IT (production de biogaz) sont isolés (zone verte). Une branche (zone orangée) correspond aux profils de la phase 3 de l'expérience IT (phase active de production de biogaz). Un groupe est constitué par les points de la phase 2 de IM (production de biogaz, zone mauve). Enfin, les points de l'expérience IT et IM pour lesquels on n'observe pas de production de gaz forment les deux derniers groupes (zone jaune). *Gardons à l'esprit que ces profils ARISA permettent d'observer la diversité totale, mais pas la diversité fonctionnelle. Par conséquent, le signal obtenu pour les profils sans production de biogaz pourrait correspondre au signal des archées présentes dans les jours ou la phase précédente, mais inactives au moment de l'observation.*

Les profils archées sont influencés par l'inoculum et la température d'incubation, mais également par le changement de température, en particulier le passage par des conditions thermophiles qui semble induire des modifications irréversibles dans les populations archées. Ceci explique le clivage net obtenu entre les profils.

3.2.1.2. Bactéries

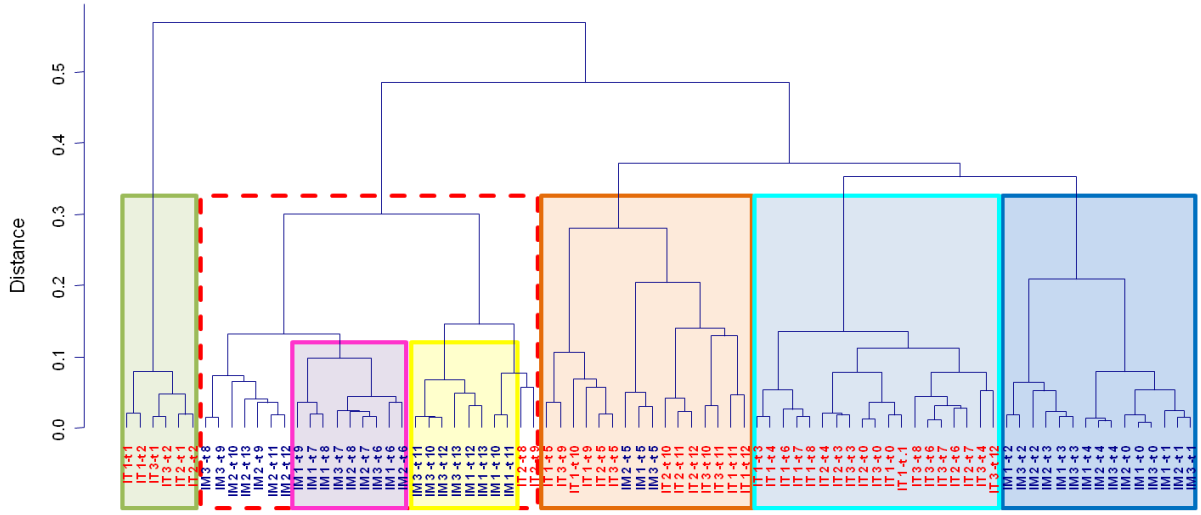


Figure 54 : Dendrogramme de proximité des profils ARISA des bactéries des expériences IT et IM.

Cette fois on distingue un groupe isolé en particulier, il s'agit des premiers points de la phase 1 de l'expérience IT (zone verte), qui correspondent à la phase active de la dégradation de la cellulose en conditions thermophiles par l'inoculum thermophile n'ayant pas subi de perturbation.

Les profils de l'expérience IM forment deux groupes distincts : les profils correspondant à la phase 1 (dégradation de la cellulose en conditions mésophiles par l'inoculum mésophile n'ayant pas subi de perturbation - on remarque d'ailleurs que les réplicats sont bien regroupés, zone bleue), et les profils des points post « choc thermique » (tiret rouge), eux-mêmes divisés en deux sous-groupes, phase 2 (zone mauve) et phase 3 (zone jaune). Ceci laisse penser que chaque choc de température modifie profondément les communautés microbiennes, et que malgré le retour à la température initiale, on ne revient pas à la diversité de départ. Le système est perturbé pour les bactéries également, confirmant les conclusions suggérées par l'observation qualitative des profils.

Les observations sont voisines pour les profils de l'expérience IT. Les profils de la phase 2 (zone cyan) sont regroupés entre eux ainsi que ceux de la phase 3 (zone orange). On peut toutefois noter que les distances entre profils au sein de la phase 3 sont plus importantes que pour la phase 2, ce qui confirme les observations qualitatives réalisées sur la divergence des microcosmes en phase 3 de l'expérience IT (*cf.* 3.1.1). Enfin on remarque que les profils pour la phase 2 de l'expérience IT sont proches de ceux de IM pour la phase 1 (conditions mésophiles).

Chaque phase de chaque expérience est bien distinguée des autres. Les possibilités de composition de communautés microbiennes semblent plus grandes pour les bactéries que pour les archées. On n'observe pas de convergence des flores en conditions thermophiles comme c'était le cas pour les archées.

On peut donc noter avec cette comparaison de profils que même si on observait une résilience fonctionnelle (expérience IT) et une résistance fonctionnelle (expérience IM), elles ne correspondent pas à des résiliences ou résistances de communautés microbiennes, archées ou bactéries, qui ont subi de profondes mutations suite aux changements de température. Voyons comment évolue la diversité globale des microorganismes au cours du temps.

3.2.2. Calcul d'indices de diversité

Le calcul d'indices de diversité permet de regrouper sous une valeur numérique le nombre et l'abondance relative des différents phylotypes d'un échantillon. Le choix de l'indice s'est porté sur celui de Simpson (D') qui est l'un des plus utilisés (*256*). Il représente la probabilité de « tirer » successivement dans l'échantillon deux individus du même phylotype. Il peut être utilisé sous différentes formes dont $-\log D'$. Ainsi les valeurs obtenues sont comprises entre 0 (un seul phylotype) et l'infini pour des échantillons dont la diversité est très importante. Dans notre étude, il n'est pas possible d'assimiler directement le nombre total de bandes sur un gel ARISA au nombre de phylotypes présents dans l'échantillon ou encore l'intensité d'une bande à la fréquence d'un phylotype dans la population, pour les différentes raisons évoquées dans le chapitre introductif (biais de PCR par exemple, ou redondance possible des tailles d'ITS entre deux phylotypes différents *etc.*). Cependant, nous supposons ici que les biais liés à l'ARISA sont reproductibles d'un échantillon à l'autre. Nous avons donc calculé les indices de diversité à partir des profils de diversité obtenus en ARISA pour réaliser des comparaisons qualitatives entre les différents échantillons au cours du temps.

Des box-plot (ou boîtes à moustaches) ont été utilisées pour représenter les valeurs d'indice obtenues pour chaque point de temps. Elles consistent en un rectangle allant du premier quartile au troisième quartile et coupé par la médiane. Les segments aux extrémités indiquent les valeurs extrêmes. Les cercles indiquent les valeurs aberrantes par rapport au reste de la distribution. Ceci permet à la fois de voir la valeur moyenne obtenue et d'observer sa dispersion.

3.2.2.1. Archées

Dans un premier temps, intéressons nous à la diversité pour les archées d'une manière générale en **fonction de la température d'incubation**, quel que soit l'inoculum et quelle que soit la phase de

dégradation (Figure 55). On observe que la valeur moyenne de la diversité est la même, mais que la dispersion est beaucoup plus grande dans les incubations à 35°C qu'à 55°C. Or nous savons que pour une bonne partie des profils mésophiles, aucune production de gaz n'est associée, les archées ne sont sans doute pas actives, les valeurs d'indices calculées ne sont donc peut-être pas aussi significatives, nous le verrons en réalisant une étude plus détaillée. Ce résultat est donc à nuancer.

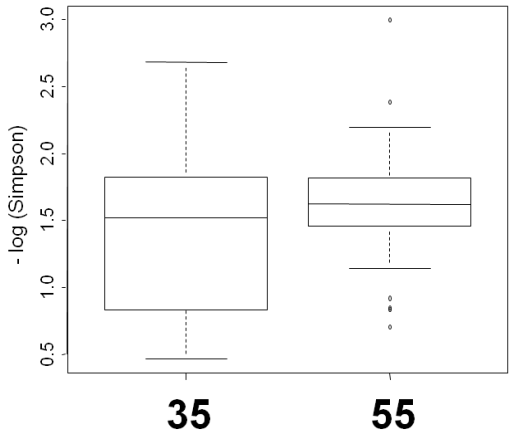


Figure 55 : Evolution de l'indice de Simpson pour les archées en fonction de la température d'incubation.

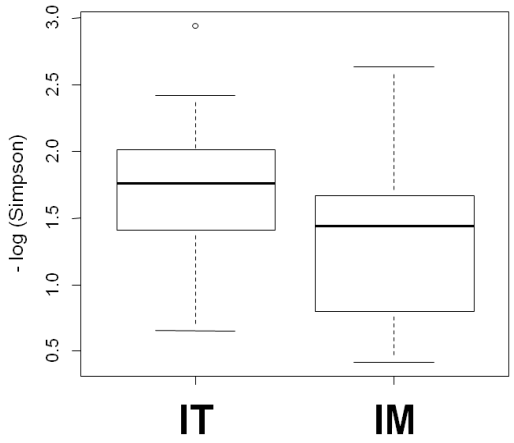


Figure 56 : Evolution de l'indice de Simpson pour les archées en fonction de l'inoculum.

La diversité en **fonction de l'inoculum** (Figure 56) montre une diversité légèrement plus grande pour les profils issus de l'inoculum thermophile que de l'inoculum mésophile pour les archées, à nuancer là encore pour les mêmes raisons.

Plus en détail pour l'**expérience IT**, voyons les indices de diversité obtenus en **fonction des phases et des jours** de l'expérience (Figure 57). On remarque que les valeurs sont plus élevées en phase 2 et en phase 3 qu'en phase 1, c'est-à-dire suite aux perturbations. Dans la phase 2, peu d'archées sont actives (d'après les données de production de biogaz). Aucune archée ne prend le dessus, l'indice de diversité augmente. Rappelons que le calcul de l'indice de Simpson ne tient pas compte de la quantité de microorganismes présents globalement. Si beaucoup d'espèces sont présentes en faible quantité, on peut obtenir des valeurs d'indice de diversité plus élevées que dans un système très actif où seules quelques espèces sont prédominantes. La valeur de l'indice de diversité n'est donc pas un marqueur de l'activité de l'écosystème mais du nombre et de la quantité relative des différentes espèces. Pour la phase 3 on peut penser que de nouvelles espèces profitent peut-être des niches laissées libres suite à la perturbation pour se développer, d'où l'augmentation observée.

Plus précisément, en **fonction du nombre de jours** au sein de chaque phase, on constate que la diversité augmente au cours de l'incubation pour la phase 1 et se stabilise en fin de dégradation, ce qui concorde avec l'observation faite de l'implantation d'une seconde population. Pour la troisième phase au contraire la diversité est minimum au milieu de l'incubation, qui est peut-être le siège d'une transition entre différentes communautés de microorganismes. On peut également remarquer que les valeurs des

indices de diversité sont assez proches entre les différents réplicats, ce qui est en accord avec l'observation réalisée directement à partir des profils de diversité pour les archées.

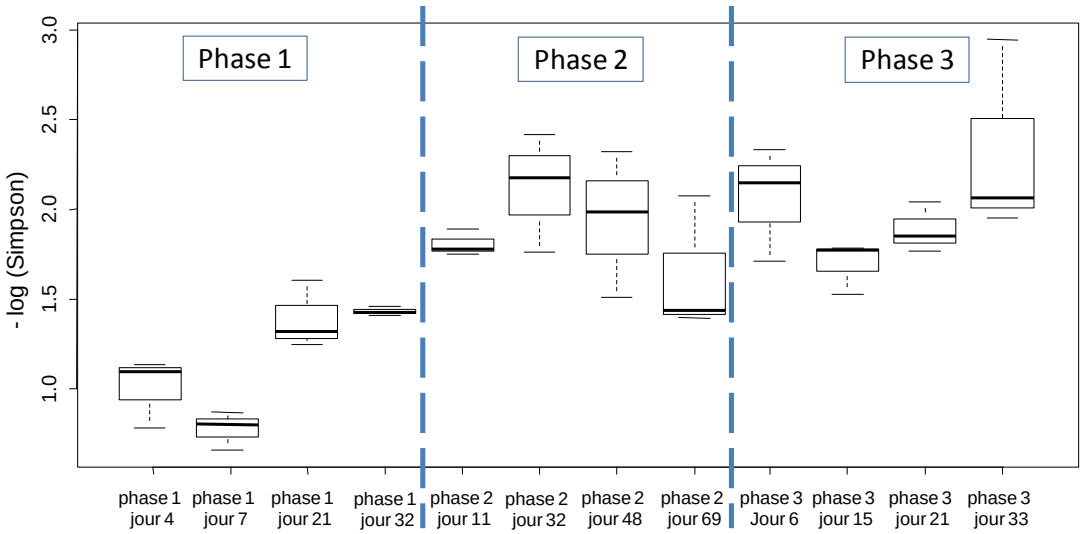


Figure 57 : Evolution de l'indice de Simpson pour les archées au cours de l'expérience IT.

Faisons les mêmes analyses pour **l'expérience IM** (Figure 58). Là encore, la valeur des indices de diversité augmente après les perturbations. Plus précisément, on remarque une augmentation de la diversité **en fonction du nombre de jours** de dégradation pour la phase 1, pour laquelle les valeurs initiales d'indice sont très faibles. Peu de populations dominent le système mais la diversité augmente légèrement au fil de la dégradation. En phase 2, la diversité augmente de façon nette avant de redevenir plus faible. Ceci est à mettre en lien avec la production de gaz en deux temps observée. Les points pour lesquels la diversité est la plus élevée correspondent en effet à la période pendant laquelle seulement une très faible production de gaz est observée. Il y a sans doute à ce moment passage d'une population fonctionnelle à une autre, d'où l'augmentation de diversité observée. Les points de la phase 3 sont moins pertinents, puisqu'ils correspondent à des populations d'archées probablement non actives. On peut noter la forte dispersion des valeurs d'indice.

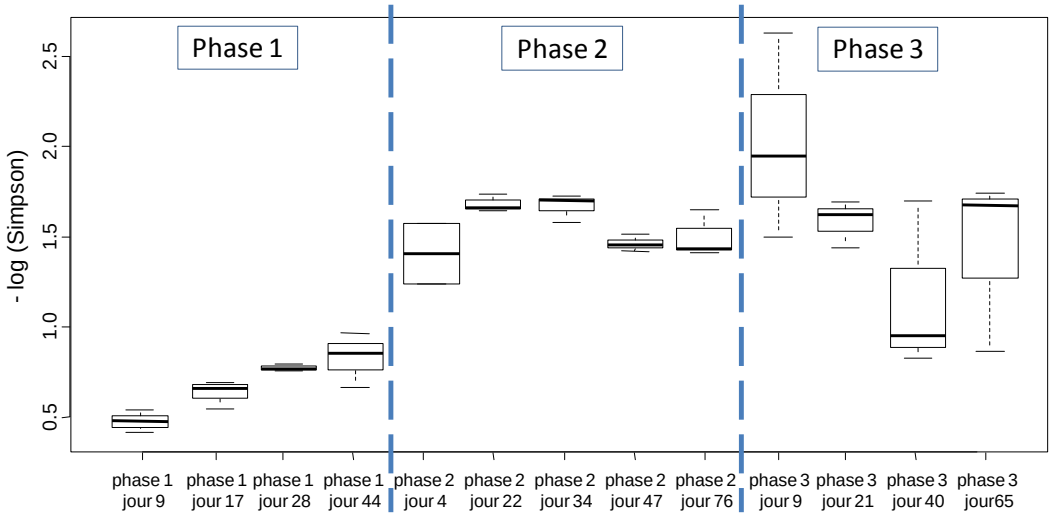


Figure 58 : Evolution de l'indice de Simpson pour les archées au cours de l'expérience IM.

3.2.2.2. Bactéries

De même que pour les archées, voyons comment évolue la diversité en **fonction de la température d'incubation** (Figure 59). Les valeurs moyennes de diversité sont identiques, et la dispersion semble un peu plus faible en conditions thermophiles. Si on compare les résultats **en fonction de l'inoculum** (Figure 60), on observe une diversité un peu plus faible pour l'inoculum thermophile, mais cette fois, la dispersion est équivalente pour les deux inocula.

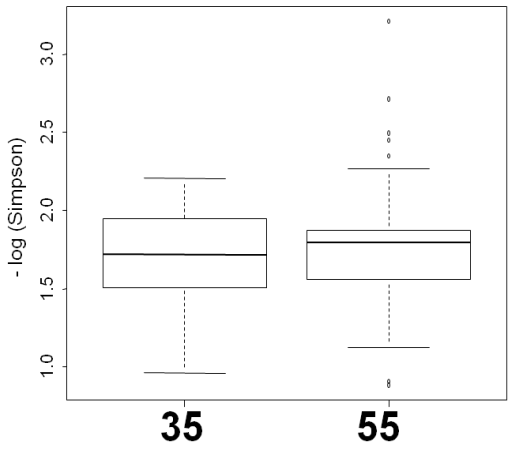


Figure 59 : Evolution de l'indice de Simpson pour les bactéries en fonction de la température.

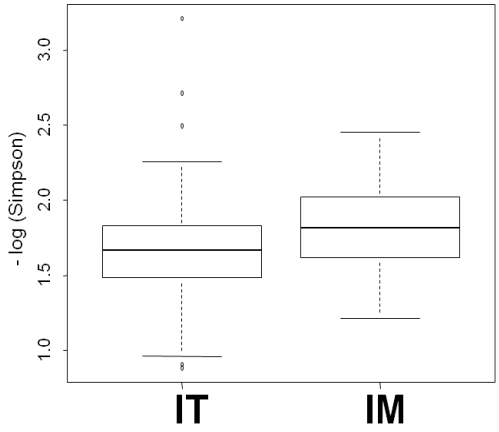


Figure 60 : Evolution de l'indice de Simpson pour les bactéries en fonction de l'inoculum.

Pour l'**expérience IT**, par comparaison des indices de diversité **en fonction de la phase** (Figure 61) on confirme le résultat qualitatif obtenu après observation des profils : la diversité est très dispersée pour la troisième phase, sans doute car les trois réplicats divergent à ce moment. Au contraire, en phase 2 les différents réplicats présentent une diversité proche à chaque point de temps.

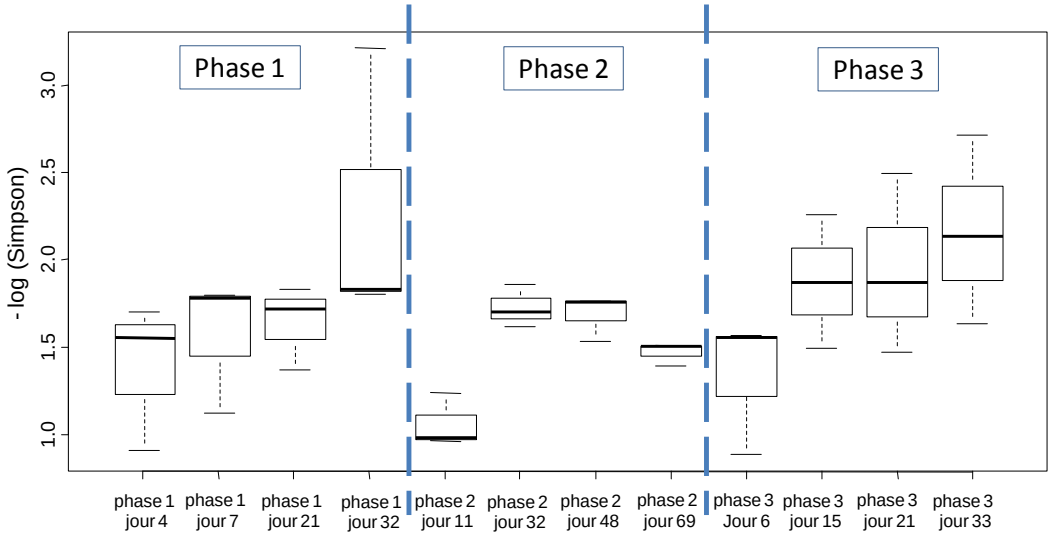


Figure 61 : Evolution de l'indice de Simpson pour les bactéries au cours de l'expérience IT.

Pour la phase 1 l'indice de diversité évolue peu au cours du temps. Ceci est en accord avec l'observation que la production de gaz et d'AGV démarre dès le début de l'incubation. L'inoculum est fonctionnel

dès le départ, n'a pas besoin de s'adapter et sa diversité reste constante au cours du temps. Après changement de température, la diversité chute, beaucoup de bactéries ne résistent pas. Cependant, après quelques temps, la diversité augmente de nouveau au cours de la phase 2. De la même façon, pour la dernière phase la diversité augmente de façon importante au cours du temps. On peut imaginer que cette augmentation de diversité correspond à une réadaptation du système à la température.

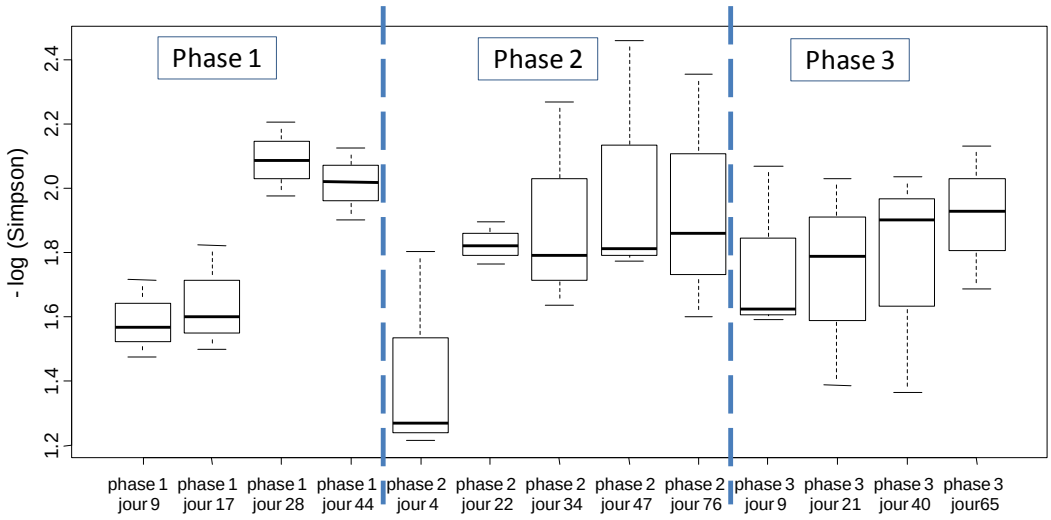


Figure 62 : Evolution de l'indice de Simpson pour les bactéries au cours de l'expérience IM.

Pour l'expérience IM (Figure 62), pour la première phase, on constate que la diversité augmente à mesure que les AGV sont accumulés et que la production de biogaz devient plus importante. On peut supposer qu'il a fallu du temps à la biomasse pour s'adapter pour pouvoir dégrader la cellulose. Ceci va dans le sens de la latence observée dans la production de biogaz. Dans la deuxième phase, la diversité est faible au départ, puis augmente fortement au moment de la production d'AGV, et reste stable jusqu'à la fin de l'incubation. Il y a sélection de la biomasse après changement de température, puis celle-ci se rediversifie avec le temps. Les observations sont voisines pour la phase 3, même si la sélection semble moins importante au départ.

3.2.2.3. Bilan

Les calculs d'indice de diversité montrent une augmentation de la diversité archées suite à la perturbation et une diminution de la diversité bactérienne, qui réaugmente petit à petit avec le temps. On peut penser que les bactéries s'adaptent plus vite au changement de température. Immédiatement après le changement, quelques bactéries se développent et prennent le dessus, d'où un indice faible qui augmente quand d'autres espèces de bactéries sont adaptées ou présentes de façon plus importante. Pour les archées, le temps d'adaptation est plus long, le changement de température bouleverse les équilibres, aucune archée ne domine rapidement, l'indice de diversité augmente. Cette idée générale ne peut être quantifiée de manière précise en raison des différents biais que présente la quantification de l'abondance des espèces suite à l'ARISA. Toutefois, les tendances générales observées sont cohérentes avec les autres données relevées.

3.3. Détermination des populations fonctionnelles

Afin d'obtenir des informations sur les microorganismes fonctionnels au cours de chaque phase, j'ai réalisé des ultracentrifugations d'ADN sur gradient de densité afin d'isoler l'ADN des microorganismes étant intervenu dans la dégradation de la cellulose. Un point du début et de la fin de chacune des phases des expériences IM et IT a été ultracentrifugé. Je ne présenterai que les résultats obtenus en début d'incubation, pour lesquels le cross-feeding est peu important. Parmi ces 6 points, 4 ont été séquencés (ils correspondent aux phases pour lesquelles une production de gaz importante a été observé). Des profils ARISA réalisés sur la fraction lourde (fonctionnelle) de l'ADN recueillie après ultracentrifugation ont été réalisés afin de comparer la diversité fonctionnelle dans les différentes phases.

3.3.1. Gradients d'ultracentrifugation

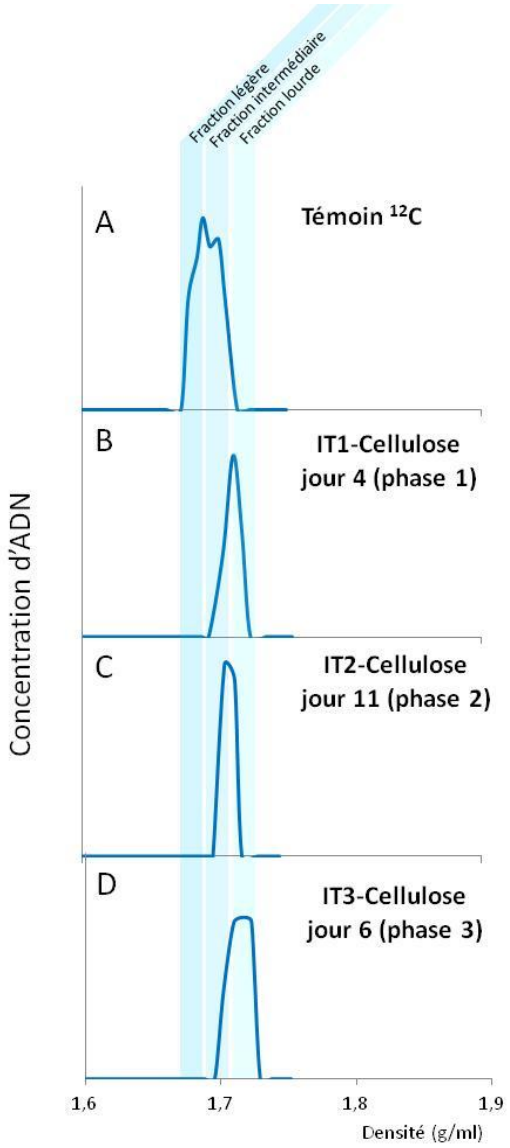


Figure 63 : Profils de densité de l'ADN issus de IT après ultracentrifugation.

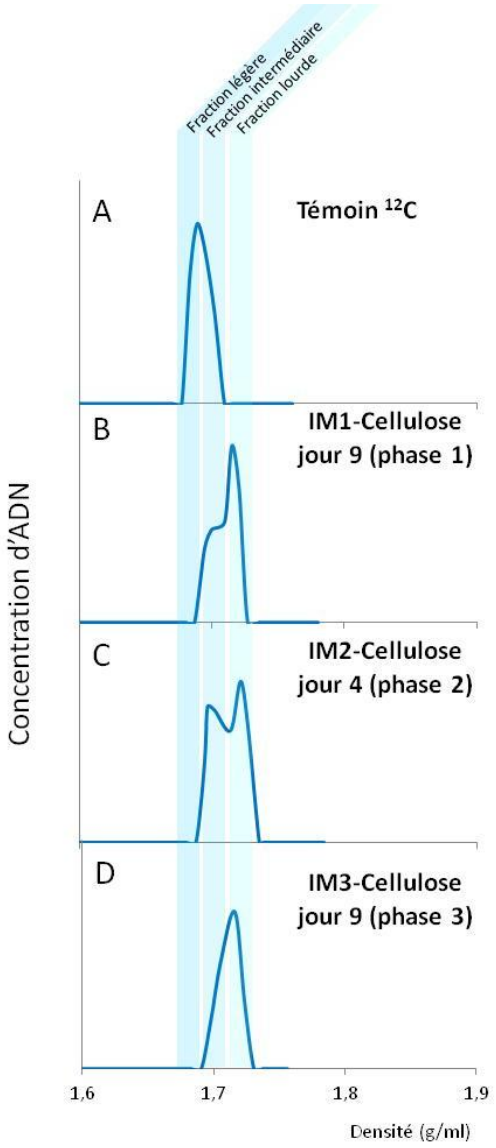


Figure 64 : Profils de densité de l'ADN issus de IM après ultracentrifugation.

Les ADN des échantillons contrôles des incubations avec substrat non enrichi présentent une distribution de densité allant de 1,68 à 1,71 g/ml (Figure 63 A et Figure 64 A). Les ADN des incubations avec substrat enrichi montrent, par comparaison avec les témoins non enrichis, un pic de densité plus élevée au cours du temps. Après l'ultracentrifugation, ce pic a été recueilli en trois fractions différentes, appelées L-DNA, M-DNA, H-DNA, pour respectivement fraction légère (Light-DNA), fraction intermédiaire (Medium-DNA) et fraction lourde (Heavy-DNA). Elles correspondent à une densité moyenne respective de 1,69 – 1,71 – 1,73 g/ml.

La Figure 63 B-C-D présente les profils obtenus aux jours 4 de la phase 1, 11 de la phase 2 et 6 de la phase 3 pour IT. On observe un décalage des profils par rapport au témoin, et donc une augmentation de la proportion de la fraction lourde (H-DNA). La cellulose marquée a bien été assimilée par la biomasse. La Figure 64 B-C-D présente quant à elle les profils obtenus pour IM aux jours 9 de la phase 1, 4 de la phase 2 et 9 de la phase 3. Les mêmes conclusions peuvent être tirées de l'observation de ces profils que pour ceux de IT.

3.3.2. Diversité de la fraction fonctionnelle de l'ADN

Les profils ARISA de la fraction fonctionnelle de l'ADN obtenu après ultracentrifugation de l'ADN pour chaque phase sont rassemblés Figure 65 (Archées IT), Figure 66 (Bactéries IT), Figure 67 (Archées IM) et Figure 68 (Bactéries IM).

3.3.2.1. Expérience IT

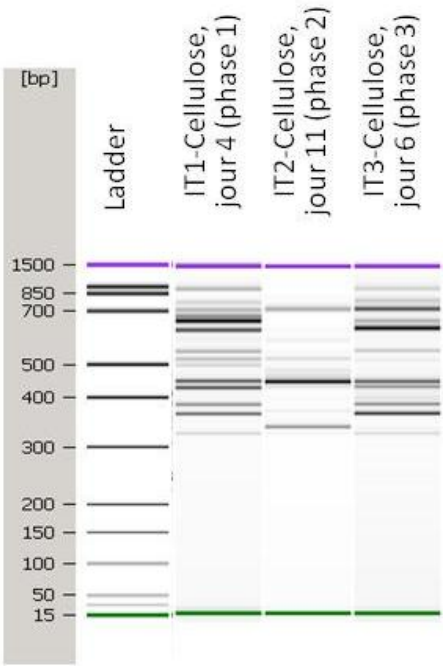


Figure 65 : Profils ARISA de la fraction fonctionnelle archées pour les différentes phases de IT.

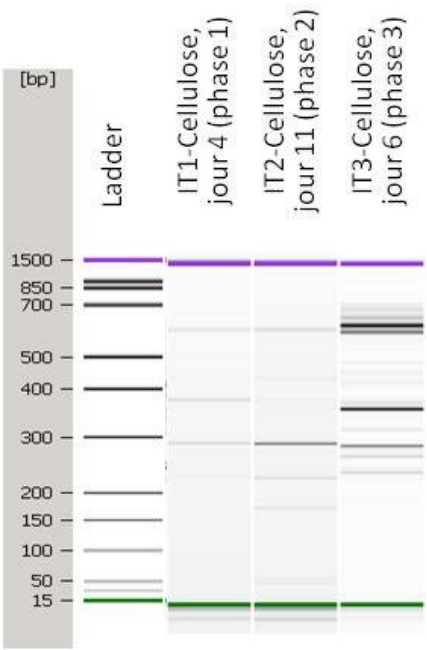


Figure 66 : Profils ARISA de la fraction fonctionnelle bactéries pour les différentes phases de IT.

On observe pour les archées que les profils fonctionnels des phases 1 et 3 sont très proches. Le profil de la phase 2 (pas de production de gaz) comporte les bandes présentes dans les autres phases, mais pas

dans les mêmes proportions. Par conséquent, même si les archées ne sont pas fonctionnelles en phase 2, la modification de température ne semble pas être responsable de modifications capitales dans leur diversité.

Pour les bactéries, le profil fonctionnel est beaucoup plus riche en phase 3 qu'en phase 1. Les principales bandes de la phase 1 sont retrouvées en phase 3, mais ce n'est pas réciproque. Le profil de la phase 2 semble transitoire, entre celui de la phase 1 et celui de la phase 2. Certains microorganismes s'adaptent plus ou moins, et d'autres se développent, pour aboutir à un nouvel équilibre en fin de phase 3. Ces données vont dans le sens des observations physicochimiques déjà réalisées.

3.3.2.2. Expérience IM

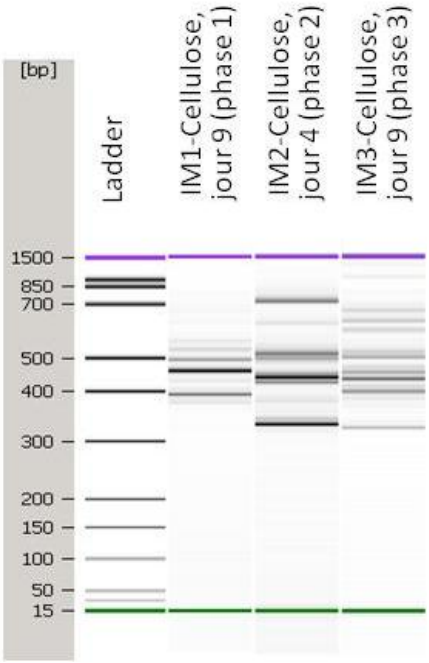


Figure 67 : Profils ARISA de la fraction fonctionnelle archées pour les différentes phases de IM.

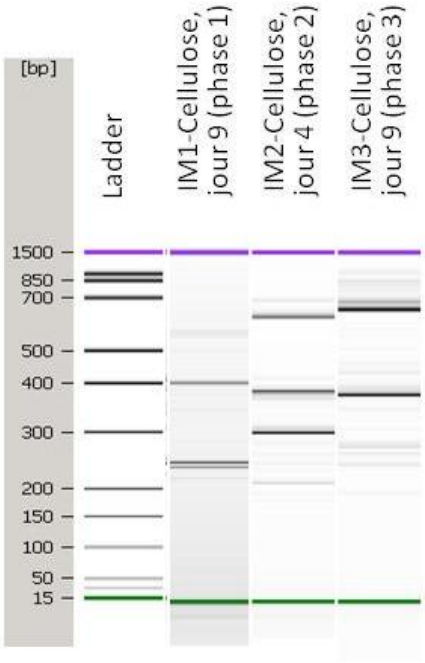


Figure 68 : Profils ARISA de la fraction fonctionnelle bactéries pour les différentes phases de IM.

Dans le cas de IM, les profils fonctionnels archées sont complètement différents entre la phase 1 et la phase 2, les microorganismes impliqués sont différents. Le profil de la phase 3 présente par contre beaucoup de similarités avec celui de la phase 2, les populations archées ne sont plus fonctionnelles et évoluent peu.

Dans le cas des bactéries, on retrouve encore une fois des profils très différents entre les phases 1 et 2. La fraction bactérienne fonctionnelle des microorganismes n'est pas résistante. En phase 3, on ne retourne pas à l'état de la phase 1, mais le profil évolue malgré tout par rapport à celui de la phase 2. La diversité bactérienne, plus importante que la diversité archée permet à quelques microorganismes de se développer malgré tout malgré le choc de température.

3.4. Séquençage de l'ADN

La diversité microbienne mesurée est représentée graphiquement par genres et OTUs pour les archées (Figure 69) et par classes et OTUs pour les bactéries (Figure 70) des échantillons de l'expérience et des inocula (déjà décrit dans la partie matériel et méthodes).

3.4.1. Archées

3.4.1.1. Phase 1

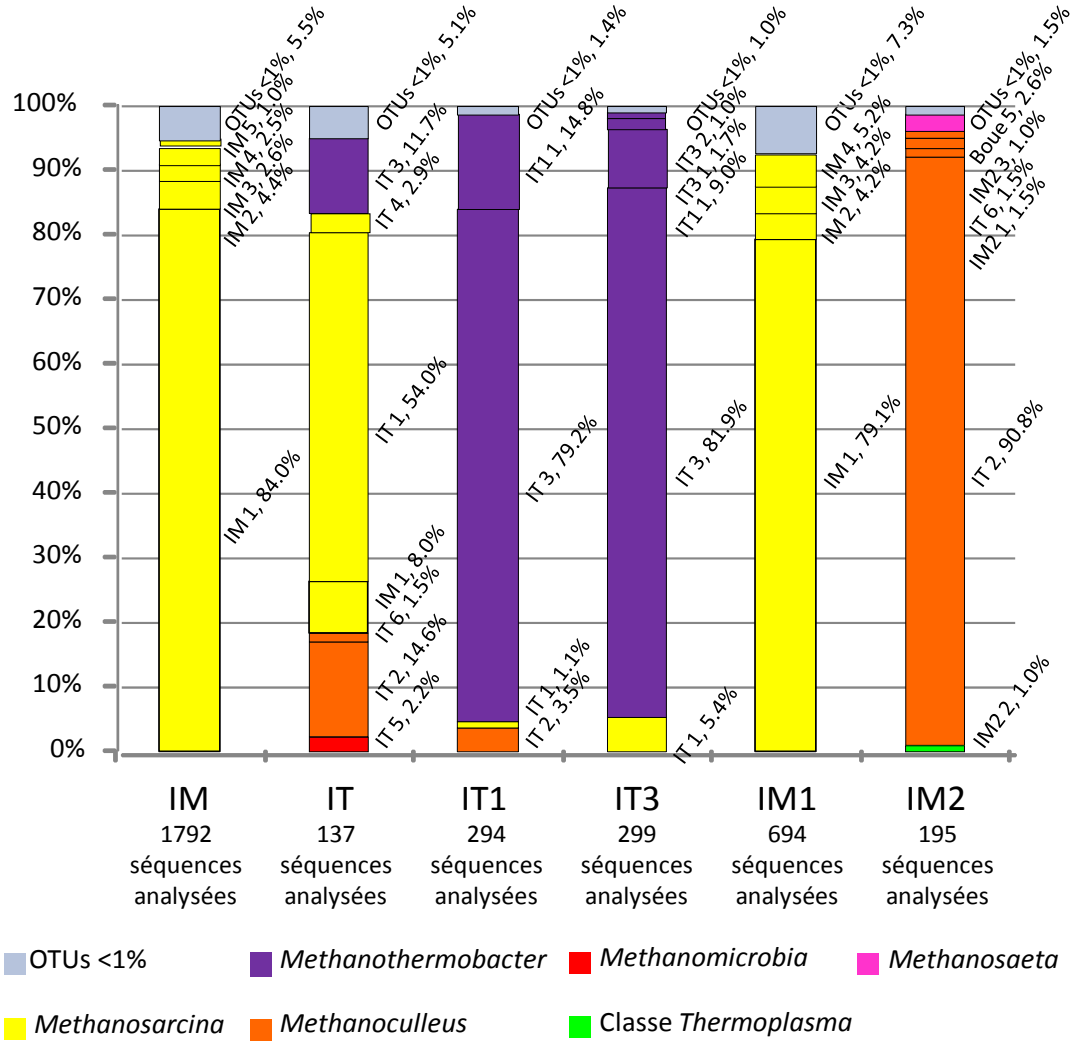


Figure 69 : OTUs archées retrouvés lors du séquençage des échantillons des expériences IM et IT.

Les archées présentes dans la fraction lourde de IT1 sont essentiellement du genre *Methanothermobacter* (95%). Le genre *Methanoculleus* est également représenté (3%) ainsi que *Methanosarcina* (1%). Au total 4 OTUs représentent 99% des séquences. Un OTU de *Methanothermobacter* est largement majoritaire (79%). La comparaison avec l'inoculum de départ montre trois OTUs communs (un OTU des genres *Methanothermobacter*, *Methanoculleus* et *Methanosarcina*) soit 84% des séquences. Cependant, la proportion apparente des différents OTUs est différente de celle de l'inoculum de départ, pour lequel l'OTU de *Methanosarcina* est majoritaire (54% des séquences).

Dans le cas de l'expérience mésophile, pour IM1, l'ensemble des séquences appartient au genre *Methanosarcina*, sous forme de 4 OTUs majoritaires, dont un comptant 79% des séquences. Ces populations sont voisines de celles trouvées dans l'inoculum de départ, à la fois pour l'identité et la proportion relative des différents OTUs. Il n'y a donc pas de changement important par rapport à la diversité apportée en début d'incubation. Aucun OTU n'est commun avec IT1.

3.4.1.2. Après la perturbation

Après le premier choc de température, les populations archées de IM2 sont radicalement différentes de celles de la phase 1. *Methanoculleus* est le genre le plus représenté avec plus de 95% des séquences. Le genre *Methanosaeta* est représenté dans 3% des séquences. Plus en détails, 4 OTUs appartiennent au genre *Methanoculleus* dont un majoritaire (90% des séquences). Un seul est du genre *Methanosaeta* (3% des séquences). Un OTU appartient à la classe *Thermoplasta*. Il n'y a aucun point commun avec les OTUs de IM1. Par contre, l'OTUs majoritaire de IM2 est également retrouvé, mais en proportions beaucoup plus faibles, dans IT1 (3,5%). Suite au changement de température, on a donc une modification très importante de la diversité archées entre la phase 1 et 2 dans l'expérience IM. Il n'y a pas de résistance des populations fonctionnelles lors du passage des conditions mésophiles à thermophiles.

Les archées en phase 3 n'ont pas été séquencées car la production de biogaz semblait très affectée, et que les données ARISA ne montraient pas de différence significative entre les phases 2 et 3. Il n'y a objectivement pas de résilience lors du retour à la température mésophile initiale. De la même façon, l'échantillon de IT en phase 2 n'a pas été séquencé.

Enfin, pour la troisième phase de l'expérience IT, la fraction lourde de l'échantillon IT3 a été séquencée. *Methanothermobacter* est le genre dominant (93% des séquences et 4 OTUs), *Methanosarcina* est présent à 6% (1 OTU). Il y a une grande similarité avec les séquences obtenues au cours de la phase 1 pour IT (plus de 97% des séquences, mais dans des proportions différentes). Le passage par les conditions mésophiles en phase 2 n'a donc pas eu un impact important sur les archées, contrairement à ce qui est observé pour l'expérience IM avec le passage par des conditions thermophiles.

3.4.2. Bactéries

3.4.2.1. Phase 1

Dans le prélèvement IT1, sans distinction d'OTUs mais en prenant en compte l'ensemble des séquences, on retrouve des bactéries de la classe C*lostridia* essentiellement (93%) et quelques microorganismes de la classe *Mollicutes*. Environ 4% des séquences n'ont pas pu être affectées à un groupe bactérien en particulier, la zone séquencée (région V3 de l'ARN 16S) n'étant pas assez discriminante. 7 OTUs principaux ont été identifiés (rassemblant plus de 1% du total des séquences chacun, soit 88% du total des séquences). Ils appartiennent tous à la classe *Clostridia*, avec en particulier un OTU très majoritaire (69% des séquences). Parmi ces OTUs, seulement deux étaient présents à plus de 1% dans l'inoculum initial (soit 3,5% des séquences). Les autres OTUs étaient minoritaires au départ et se sont développés au cours de la dégradation de la cellulose. Il y a donc une modification importante de la diversité bactérienne pour s'adapter à la dégradation de la cellulose.

Dans IM1, sans distinction d'OTUs mais en prenant en compte l'ensemble des séquences, les bactéries identifiées appartiennent aux classes *Spirochaetes* (26%), *Clostridia* (14%), *Bacteroidia* (10%), *Gammaproteobacteria* (7%), *Fibrobacteria* (5%) et au phylum *Alphaproteobacteria* (1%). Par ailleurs, un groupe important composé de 32% des séquences fait partie du phylum *Bacteroidetes* mais les séquences ne permettent pas de les attribuer plus précisément à une classe. 1% des séquences n'a pas pu être affecté à un groupe bactérien en particulier. Au total, 14 OTUs contiennent plus de 1% du total des séquences (86% du total). 4 OTUs appartiennent au phylum *Bacteroidetes* (40% des séquences) dont 2 à la classe *Bacteroidia* (8% des séquences). La classe *Spirochaetes* contient 2 OTUs représentés de manière équivalente, les classes *Clostridia* et *Gammaproteobacteria* 3 OTUs chacune. Enfin, un seul OTU représente toute la classe *Fibrobacteria* et un autre le phylum *Alphaproteobacteria*.

La comparaison de ces OTUs à ceux retrouvés dans l'inoculum initial montre 3 points communs principaux, soit 23% des séquences identifiées (classes *Spirochaetes*, *Clostridia* et *Bacteroidia*). Là encore, une modification importante de la diversité est observée suite à l'introduction de la cellulose.

Enfin, la comparaison des séquences retrouvées dans IM1 et IT1 ne montre aucun OTU en commun dans les deux incubations.

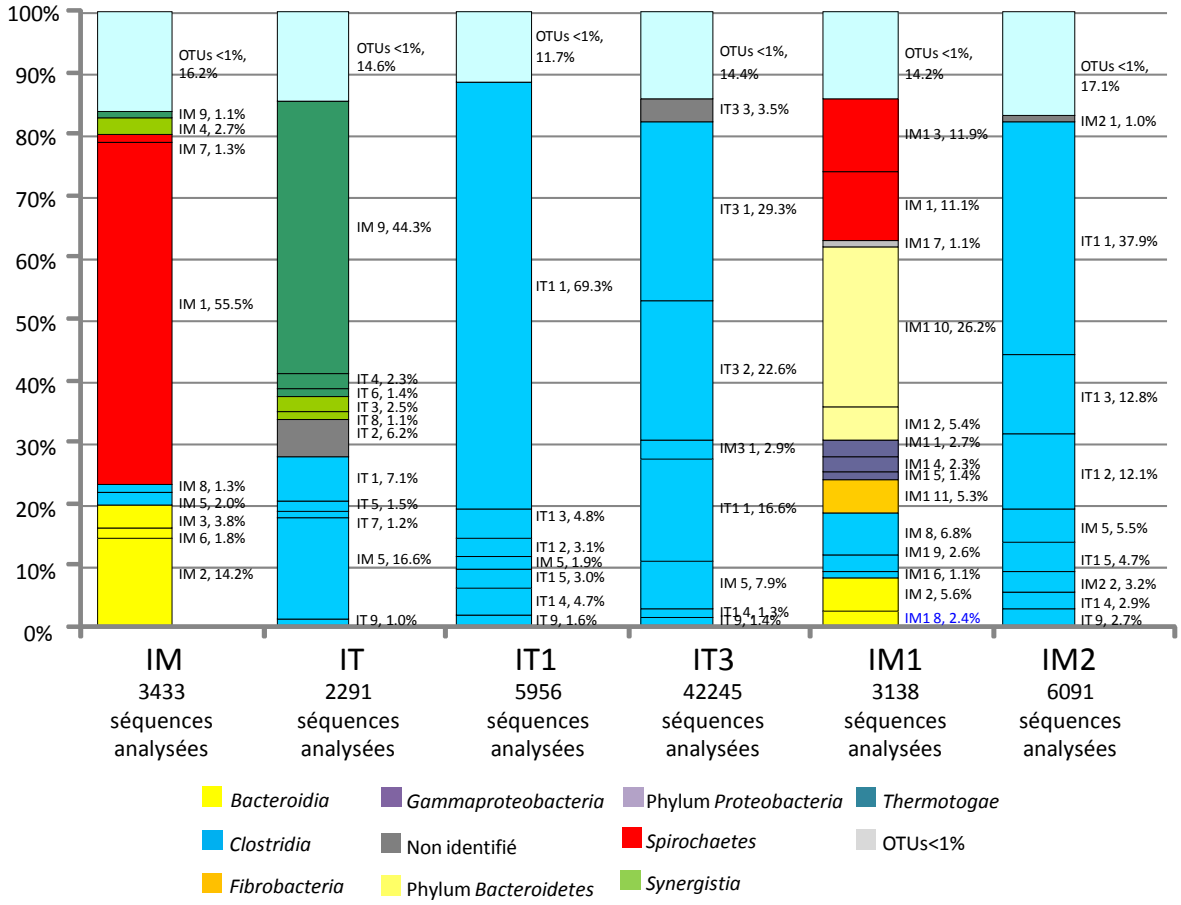


Figure 70 : OTUs bactériens retrouvés lors du séquençage des échantillons des expériences IM et IT.

3.4.2.2. Après la perturbation

Dans le cas de l'expérience IM, la fraction lourde de IM2 (premier prélèvement réalisé au cours de la seconde phase) a été séquencée. Sans distinction d'OTUs mais en prenant en compte l'ensemble des séquences, la classe *Clostridia* est la plus représentée (93% du total des séquences). La classe *Mollicutes* rassemble 1% des séquences et 3% des séquences n'ont pas pu être identifiées précisément. 9 OTUs principaux sont présents, et regroupent 83% des séquences. Par comparaison avec les données OTUs de IM1, on constate qu'aucun des microorganismes présents au cours de la phase 1 n'est présent au cours de la phase 2 dans la fraction fonctionnelle de la biomasse. Le changement de température a eu une influence radicale sur les populations microbiennes actives dans notre système, même les OTUs majoritaires au cours de la phase 1 ne sont pas représentés pendant la phase 2. Il n'y a pas de résistance des microorganismes fonctionnels. La comparaison de ces données de séquences avec celles retrouvées dans IT1 au cours de la phase 1 montre par contre que 7 OTUs principaux sont communs entre les deux incubations, soit 88% des séquences de IT1 et 78% des séquences de IM2. Les points communs entre ces deux échantillons sont donc extrêmement importants. Par ailleurs, les proportions relatives de chacun des OTUs dans les échantillons sont qualitativement les mêmes dans les deux cas. On peut donc conclure que les populations fonctionnelles de ces microcosmes sont les mêmes à ces points de temps. Ce n'était pas le cas pour les archées.

Les échantillons de la phase 3 de IM n'ont pas été séquencés car les productions de biogaz indiquaient une activité très réduite. Pour la même raison, nous avons choisi de ne pas séquencer les échantillons de la phase 2 de IT.

Après retour à la température initiale, IT3 (troisième phase de dégradation) montre, sans distinction d'OTUs mais en prenant en compte l'ensemble des séquences, des séquences composées principalement de *Clostridia* (93%). 6% des bactéries n'ont pas pu être identifiées précisément. 8 OTUs principaux rassemblent 86% des séquences (7 OTUs pour la classe *Clostridia*, et un OTU « non identifié »). La comparaison avec les données d'analyse de IT1 présente des résultats intéressants. Seulement 4 OTUs sont communs, soit 27% des séquences de IT3 et 77% des séquences de IT1. On peut noter que les deux OTUs majoritaires de IT3 n'avaient pas été détectés dans IT1. Ces résultats sont particulièrement intéressants. En effet, même si la classe des microorganismes est la même dans les deux cas, on constate que les OTUs, donc les microorganismes impliqués dans les processus de dégradation de la cellulose sont différents. Par conséquent, au cours de la phase 2 de l'expérience IT, les microorganismes ne sont pas restés uniquement en « dormance » et d'autres ont pris le dessus au cours de la phase 3 afin d'occuper les niches écologiques de la dégradation de la cellulose.

Les données physico-chimiques et ARISA montrent qu'en phase 3 les réplicats de IT se comportent différemment. En particulier, les groupes microbiens sont différents. Il n'était pas possible d'isoler la fraction fonctionnelle dans les trois cas car un seul réplicat contenait de la cellulose marquée. Toutefois, on peut imaginer à la vue des profils ARISA qu'au moins deux incubations (IT1 et IT3) ont une diversité très différente de celle retrouvée en phase 1. Le passage par les conditions mésophiles a donc entrainé d'importantes modifications de diversité, et on ne peut pas parler de résilience écologique en phase 3.

3.4.3. Bilan

En résumé, les données de séquences montrent pour la première phase une forte évolution de la communauté bactérienne par rapport à celle de l'inoculum initial, pour l'expérience thermophile ou mésophile. La communauté des archées évolue beaucoup moins. Après le premier choc de température (phase 2), les populations de IM (archées et bactéries) sont totalement modifiées par rapport à celles de la première phase (IM1 phase 1), par contre elles présentent de nombreux points communs pour les bactéries avec celles retrouvées pour IT en phase 1, mais pas pour les archées. Enfin, en phase 3, après retour à la température initiale pour IT, on retrouve les mêmes archées qu'en phase 1, et la même structure phylogénétique pour les bactéries au niveau des classes avec toutefois des OTUs différents.

4. Discussion

4.1. Performances de dégradation

On trouve quelques exemples dans la littérature de travaux mettant en jeu des modifications de la température au cours de la digestion anaérobie. Les travaux existants montrent à la fois des effets positifs et négatifs sur les performances de dégradation (*286-289*), sans doute à cause de la complexité des groupes microbiens pouvant intervenir dans la méthanisation (*142*). Dans notre expérience, l'inoculum thermophile non perturbé convertit un peu moins de cellulose que l'inoculum mésophile non perturbé mais beaucoup plus rapidement. Ceci va dans le sens des observations de différents auteurs qui montrent que la digestion anaérobie est plus rapide en conditions thermophiles (*190-192*).

4.1.1.Après le premier choc de température

Après le premier choc de température, l'inoculum thermophile (phase 2) a une production et un rendement de méthane beaucoup plus faibles qu'avant la perturbation, ou que l'inoculum mésophile en phase 1. On observe une accumulation d'acide acétique au même niveau que le pic d'accumulation pour IT en phase 1 (600 mg de C/L), mais différente de celle de IM en phase 1 pour lequel de l'acide propionique est présent. L'enrichissement de l'acide acétique produit est plus faible que celui produit en phase 1. Le changement de température a affecté le fonctionnement du bioprocédé et ses performances de dégradation, au moins au niveau de la méthanogenèse, puisque les productions de gaz sont radicalement différentes, mais sans doute aussi au niveau de la fermentation puisque même si la concentration d'acide acétique est la même, son enrichissement est différent. Même après 70 jours, la conversion de la cellulose en biogaz n'atteint pas le niveau de performance des phases 1. Ce résultat est retrouvé par Choorit (*290*) suite au passage progressif d'un digesteur thermophile en conditions mésophiles.

Pour l'inoculum mésophile en phase 2, le niveau de production de biogaz total est voisin de ceux observés en phase 1, cependant la production a lieu en deux temps. Le premier temps correspond à une faible émission de biogaz, composé de 75% de CO_2. Le reste du biogaz est produit après un **temps d'adaptation** de 25 jours, au cours duquel des AGV s'accumulent et la production de biogaz est

arrêtée. D'autres travaux montrent des résultats équivalents avec différents substrats (*290-293*). Seul de l'acide acétique s'accumule, et il n'y a plus d'accumulation d'acide propionique comme on pouvait l'observer en phase 1. L'essentiel du gaz produit au cours du second temps est du méthane, qui représente au total près des deux tiers du biogaz produit en phase 2, ce qui est plus important qu'en phase 1. Comme pour l'inoculum thermophile, la performance du système est affectée par le changement de température, à différents niveaux, mais du point de vue opérationnel cette modification de performance est positive par rapport à la phase 1 puisque même si le taux et la vitesse de conversion de cellulose sont les mêmes, le rendement en méthane est plus important. Les travaux de Choorit montrent, qu'il s'agisse d'une diminution ou d'une augmentation de température, que 43°C est la température critique au-delà de laquelle des modifications de performance importantes sont observées, signes de changements dans l'équilibre des groupes microbiens impliqués. De plus, les réacteurs mésophiles feraient mieux face au changement de température que les réacteurs thermophiles (*290*).

4.1.2. Au retour à la température initiale

Au cours de la troisième phase, au retour à la température initiale, les microcosmes contenant l'inoculum thermophile retrouvent en moyenne la production initiale (phase 1), mais sont très divergents les uns par rapport aux autres. Les performances au niveau individuel sont modifiées pour deux microcosmes sur trois. La perturbation apportée en phase 2 n'a donc pas eu les mêmes conséquences sur les différents microcosmes. Au contraire, les microcosmes préparés avec l'inoculum mésophile ont un comportement similaire entre eux. Ils ne sont pas résilients, et on ne retrouve pas la production des phases 1 ou 2. Le choc de température en phase 2 a eu des conséquences importantes et négatives sur la performance de ces microcosmes. Notons enfin que même si les niveaux de production pour l'expérience IT phase 2 et IM phase 3 sont voisins (seulement 20% de cellulose convertie), le biogaz produit par l'inoculum thermophile est plus riche en méthane (66%) que celui produit par l'inoculum mésophile (20%), la performance n'est donc pas affectée de la même façon dans les deux cas, sans doute car les populations microbiennes n'ont pas été affectées de la même manière, notamment les archées.

Ahn *et al.* retrouvent globalement les mêmes résultats. Ils étudient les effets d'une augmentation ou baisse temporaire de température suivie d'un retour à la normale sur la performance de filtres anaérobies (*294*). Dans le cas de la baisse de température, les auteurs observent une moindre efficacité et production de biogaz, ainsi qu'une accumulation d'AGV. Dans le cas de l'augmentation de température, une adaptation de quelques jours est nécessaire pour obtenir un bon fonctionnement des digesteurs. Après retour à la température initiale, les microorganismes thermophiles semblent plus résilients que les mésophiles, qui sont beaucoup plus affectés par l'augmentation de température que par la baisse (production de biogaz, ratio de méthane dans le biogaz, AGV, etc.).

Les changements brutaux de températures ont donc d'importantes conséquences sur les performances des bioprocédés. Le passage de conditions mésophiles à thermophiles permet après quelques jours d'adaptation d'obtenir un plus fort rendement en méthane dans le biogaz, mais rend le retour aux conditions mésophiles impossible. Pour l'inoculum thermophile, le passage à 35°C n'est pas positif en

termes de performances, et le retour à la température initiale aboutit à des modifications importantes de rendement de dégradation, augmentation ou diminution, même si elles restent en moyenne équivalentes à la performance initiale pour les microcosmes étudiés.

4.2. Voies métaboliques mises en jeu

4.2.1. Expérience IT

Au cours de IT phase 1, le fort ratio CH_4/CO_2 laisse penser que la méthanogenèse hydrogénotrophe a lieu. Les données isotopiques sur les gaz et sur l'acide acétique vont dans le même sens, ainsi que les données de séquençage (les archées du genre *Methanothermobacter,* hydrogénotrophes (*295*), sont dominantes), même si cette voie de synthèse du méthane ne semble pas être la seule et que la méthanogenèse acétoclaste a lieu également. En phase 2, peu de gaz est produit, mais cette fois des quantités équivalentes de CO_2 et de CH_4 sont produites (légèrement plus de méthane). La quantité de carbonates diminue très légèrement au cours de cette phase. La méthanogenèse hydrogénotrophe n'a sans doute plus lieu, ou est très affectée, et est remplacée par de la méthanogenèse acétoclaste, peu active. Ceci est en accord avec le résultat fréquemment trouvé dans la littérature de la prédominance de la méthanogenèse hydrogénotrophe en conditions thermophiles mais de sa moindre importance face à la méthanogenèse acétoclaste en conditions mésophiles (*142, 296*). On peut noter de plus qu'il y a production et accumulation d'AGV, ce qui suggère que la consommation d'acide acétique et la production de biogaz sont les étapes les plus pénalisées par le changement de température. Les autres étapes sont encore actives, même si les performances ou schémas de dégradation ont sans doute évolué. De plus, l'enrichissement de l'acide acétique à cette étape (60%) suggère qu'il n'est pas produit uniquement par dégradation de la cellulose, une partie est peut-être issue de la dégradation de la biomasse morte de la phase 1, bien que des mécanismes tels que la réduction du CO_2 (enrichi à moins de 20% au cours de cette période) en acide acétique contribuent probablement aussi (homoacétogenèse). Enfin en phase 3, on observe des comportements différents pour les différents microcosmes, signe que les voies métaboliques empruntées sont différentes. En particulier, l'accumulation d'acide acétique, qui est le principal AGV retrouvé à cette étape, est différente d'un microcosme à l'autre. Cependant, l'absence de données isotopiques pour chacun des réplicats à chacune des phases et le bruit de fond important apporté par l'acide acétique non enrichi de la phase 2 ne permettent pas de conclure.

4.2.2. Expérience IM

Au cours de IM phase 1, à la fois du CO_2 et du CH_4 sont produits. Les données isotopiques des gaz suggèrent que la méthanogenèse acétoclaste domine. Les archées dominantes sont du genre *Methanosarcina*, et peuvent produire le méthane selon un métabolisme acétoclaste ou hydrogénotrophe (*295*). Au cours de IM phase 2 par contre, on observe une production en deux temps. Pendant le premier temps, à la fois CO_2 et CH_4 sont produits, on peut penser que le métabolisme mis en jeu en début de cette phase est le même que celui de la phase 1. Au cours du second temps, seul du CH_4 est produit, ce qui laisse imaginer que seule la méthanogenèse hydrogénotrophe se réalise. Les données de

séquençage indiquent également que les archées du genre *Methanoculleus*, hydrogénotrophes (*295*) sont dominantes. Cabirol (*297*) observe lors du passage d'une boue de conditions mésophiles à thermophiles une rapide adaptation des acétotrophes puis une augmentation de la proportion d'hydrogénotrophes. On note également une importante accumulation d'acide acétique en début de seconde phase, qui est ensuite consommé, sans doute par des microorganismes réalisant l'oxydation de l'acide acétique (décrit par Zinder (*298*)). Les produits de cette réaction sont utilisés lors de la méthanogenèse hydrogénotrophe pour produire le méthane. La méthanogenèse acétoclaste n'a plus lieu, une syntrophie s'établit entre un méthanogène qui utilise l'acide acétique et un méthanogène qui utilise l'hydrogène, formant la voie majeure de dégradation de l'acide acétique. Schnurer *et al.* ont mis en évidence que cette syntrophie était prédominante dans les systèmes perturbés, et que les archées responsables étaient du genre *Methanoculleus* (*299*). McHugh l'observe par exemple en passant de conditions mésophiles à psychrophiles (*300*). Noll l'observe également dans du sol de rizière incubé à 45°C (*301*). De plus, Krakat remarque que dans les digesteurs thermophiles les archées hydrogénotrophes dominent, même quand l'inoculum utilisé contient à la fois des acétoclastes et des hydrogénotrophes (*296*), ce qui est également notre cas. Par ailleurs, comme dans l'expérience IT phase 2, l'acide acétique n'est pas enrichi à 100%. Des mécanismes mettant en jeu la réduction du CO_2 en acide acétique pourraient expliquer ce résultat. De même, les valeurs mesurées pour l'acide propionique laissent penser que celui-ci également est issu, au moins partiellement, de la conversion de l'acide acétique. Ceci est surprenant car les températures thermophiles sont considérées comme non favorables à l'homoacétogenèse (*302*). Une autre explication de ce résultat serait la dégradation d'une partie de la biomasse de la phase précédente suite au changement de température. La diminution de l'enrichissement de l'acide acétique après 20 jours d'incubation, quand la voie de méthanogenèse change (et donc une partie de la biomasse) conforte cette hypothèse. Enfin en dernière phase la production de méthane est totalement arrêtée. De l'acide acétique marqué ^{13}C s'accumule, signe que les premières étapes de dégradation se déroulent toujours, même si encore une fois une partie de cet acide acétique ne provient pas directement de la dégradation de la cellulose. Par contre les archées méthanogènes ne sont plus fonctionnelles, les acétoclastes n'ont pas résisté au changement de température, et les hydrogénotrophes ne sont pas actifs en conditions mésophiles. La production de biogaz s'arrête donc.

4.2.3. Bilan

Dans ces résultats, on voit que la température conditionne les voies métaboliques mises en jeu, en particulier la méthanogenèse (*303-304*) pour laquelle les données mesurées dans notre expérience permettent le plus d'interprétation. Les méthanogènes semblent particulièrement sensibles et conditionnent le déroulement du procédé puisqu'elles sont indispensables pour la production de biogaz. Ainsi on peut penser qu'une perturbation de la fonction méthanogène affecte par effet de domino les fonctions hydrolytiques et fermentatives. Beaucoup d'études de l'influence de la température sur la méthanogenèse en conditions mésophiles et thermophiles ont donc été réalisées (*305*). Griffin *et al.* rapportent que les méthanogènes sont le groupe limitant lors de l'adaptation aux conditions thermophiles d'un digesteur d'ordures ménagères (*306*). Moins de travaux ont été réalisés sur l'influence de la température sur l'hydrolyse et l'acidogenèse. Pourtant les températures optimales ne sont pas les

mêmes pour les différentes étapes de la digestion anaérobie pour un même inoculum (*307*). Par exemple, la vitesse d'hydrolyse dépend beaucoup de la température car l'hydrolyse est une réaction biochimique catalysée par des enzymes sensibles à la température (*308*). Dans notre système, on peut noter, pour les deux inocula, que le processus de fermentation est affecté. En effet, on observe qu'une partie des AGV provient directement de la dégradation de la cellulose, mais qu'une autre partie est produite par réduction du CO_2 ou de l'acide acétique. Cependant ce mécanisme n'est pas présent tout le temps. Pour obtenir plus d'informations sur les perturbations subies par les trois premières étapes de la méthanisation, des données supplémentaires sur les intermédiaires réactionnels formés et leur concentration seraient nécessaires. Cependant l'acquisition de ces données demande des méthodes analytiques puissantes et fastidieuses, et leur interprétation est très difficile du fait du nombre extrêmement important de réactions concomitantes, elles nécessiteraient le calage et l'utilisation d'un modèle mathématique.

4.3. Structure des communautés

4.3.1. Température et diversité microbienne

Quelques remarques générales sur la structure des communautés peuvent être tirées des résultats obtenus. Les communautés en conditions mésophiles des différentes phases d'expérience sont beaucoup plus diverses qu'en conditions thermophiles, peut-être à cause d'une diversité plus grande des microorganismes adaptés aux conditions mésophiles (*142, 204*). De même la variabilité est plus grande chez les bactéries que chez les archées comme signalé par différents auteurs ((*142*) par exemple). Par ailleurs, le passage par des conditions d'incubation thermophiles laisse une empreinte sur les communautés microbiennes, en particulier les archées, comme le montre le dendrogramme de proximité des profils ARISA. **La sélection imposée par les conditions thermophiles est donc plus stricte que celle imposée par les conditions mésophiles, et elle ne permet pas de retour en arrière.** De nombreux auteurs font également état de changement de la composition de la communauté archées ou bactéries avec la température (*142, 204, 303-304*). Conrad remarque qu'après passage par des conditions thermophiles, un inoculum mésophile ne revient à l'état qu'il avait à l'origine si et seulement s'il est ensemencé à nouveau avec de l'inoculum mésophile (*142*).

Les conditions de température définissent donc la structure et la fonction des communautés microbiennes. Suite au changement de température, les communautés évoluent. **Se pose la question de l'origine des microorganismes qui se développent.** Dans le cas du passage mésophile à thermophile, les microorganismes sont-ils des mésophiles présents initialement qui s'adaptent aux nouvelles conditions de température, ou s'agit-il plutôt de thermophiles qui étaient présents en faibles quantités et qui se développent suite au changement de température dans les niches laissées libres par les microorganismes mésophiles qui ne sont plus fonctionnels ? Inversement, lors du passage des conditions thermophiles aux conditions mésophiles, les microorganismes fonctionnels sont-ils des thermophiles qui peuvent être actifs en conditions mésophiles ou alors des mésophiles ayant survécu aux températures thermophiles et redevenant actifs après le changement de température? Les

conditions de température ont-elles uniquement une influence sur l'activité des microorganismes ou également sur leur survie ? Diverses situations sont observées dans les résultats obtenus.

4.3.2. Situations observées

4.3.2.1. Inoculum thermophile

Pour IT phase 1, il semble que deux communautés archées interviennent successivement dans la production de biogaz. Les archées retrouvées dans les séquences sont d'ailleurs différentes de celles de l'inoculum initial. Après changement de température, les productions de gaz, les résultats ARISA et le dendrogramme de proximité des profils montrent que les populations archées n'évoluent pas par rapport à la fin de la phase 1. Même si elles ne sont pas extrêmement actives, elles ne sont pas remplacées par d'autres populations fonctionnelles. Certaines se développent sans doute faiblement, d'où l'augmentation de la diversité dans le milieu. En phase 3 de nouvelles bandes apparaissent dans les profils ARISA, mais les populations archées restent proches de celles de la phase 1, et les profils de diversité fonctionnels sont semblables. Les différences de métabolismes de dégradation entre les microcosmes ne semblent pas dues aux archées.

Pour les bactéries de IT, on observe en phase 1 des profils correspondants aux microorganismes dégradant la cellulose et ses intermédiaires, et en fin d'incubation d'autres profils de bactéries réalisant d'autres fonctions dans le système (la cellulose et ses intermédiaires sont *a priori* déjà dégradés à ce moment). La diversité augmente au cours du temps. Les observations sont les mêmes en phase 2, on peut toutefois noter que les profils de diversité ne sont pas similaires, ce qui montre que le changement de température a eu un effet également sur les populations de bactéries. En particulier celui-ci a provoqué une baisse importante de la diversité en début de phase, montrant que seuls certains microorganismes ont été sélectionnés après la perturbation. Par la suite, de nouvelles bactéries prennent le dessus, sans doute car celles de la phase 1 ne sont pas fonctionnelles en conditions mésophiles, ou alors se développent moins vite car elles sont moins adaptées. En dernière phase on observe de grosses divergences entre les réplicats. Le changement de température a provoqué des modifications importantes dans l'équilibre des communautés microbiennes, et celles-ci ne retournent pas à leur état d'équilibre initial, comme le confirment les données de séquence.

4.3.2.2. Inoculum mésophile

Pour IM en phase 1 la diversité archée observée n'est pas différente de celle de l'inoculum (genre *Methanosarcina*), elle semble adaptée aux conditions de température. Les indices de diversité sont donc très faibles tout au long de cette phase. Après le choc thermique, la diversité évolue progressivement, ce qui est en accord avec la production de biogaz en deux temps. Les indices de diversité augmentent suite à la perturbation, puis leur valeur se stabilise. Au cours de la première étape de production, les microorganismes actifs sont certainement des mésophiles qui s'adaptent au changement de température (d'où la production observée sans latence) cependant elles ne sont plus fonctionnelles au bout de quelques jours, et des thermophiles présentes de façon minoritaire dans l'inoculum initial prennent le dessus et sont responsables de la deuxième étape de production, hydrogénotrophe (archées du genre

Methanoculleus). Dans ce cas, le choc de température ne semble pas bloquant sans doute car des microorganismes capables de réaliser les différentes fonctions se développent en conditions thermophiles et sont fonctionnels, ce qui n'était pas le cas dans la situation miroir (expérience IT). Enfin en phase 3, les profils sont invariants, très peu de biogaz est produit, les communautés microbiennes archées sont figées, plus rien ne se passe après la baisse de température. Les archées résiduelles de la phase 2 (hydrogénotrophes) ne sont plus actives ou adaptées aux conditions de température et les archées de la phase 1 (acétoclastes) n'ont pas survécu au changement de température.

Pour les bactéries de IM phase 1, on observe que le système met quelques jours à s'adapter. La population reste au départ proche de celle de l'inoculum initial. Ceci ce traduit par une latence dans la production des intermédiaires et du biogaz, jusqu'à ce que la biomasse soit bien adaptée (nouveau profil de diversité, seulement 23% des séquences retrouvées dans l'inoculum initial). L'indice de diversité augmente alors. En fin d'expérience, on retrouve comme pour IT une communauté proche de celle de l'inoculum initial. Le changement de température provoque une diminution importante de la diversité, des microorganismes sont sélectionnés (aucun point commun entre la diversité en phases 1 et 2), et fait évoluer la communauté vers un état présentant des points communs avec IT phase 1 (88% de séquences communes), mais distinct malgré tout, comme le confirme le dendrogramme. En phase 3, la diversité diminue légèrement. Contrairement à ce qui était observé en phase 2 pour IT, les populations évoluent peu (on le voit également sur le dendrogramme), et produisent malgré tout des AGV, dont une partie est marquée et provient donc de la dégradation de la cellulose. Les homoacétogènes de la phase 2 sont sans doute encore actifs en phase 3, même s'ils sont moins performants.

4.3.3. Bilan

Ces résultats peuvent être confrontés à différentes observations trouvées dans la littérature. Chen rapporte qu'un faible pourcentage des thermophiles est présent dans les boues mésophiles mais ils peuvent servir au développement rapide d'une communauté thermophile en cas de modification de température (*309*). De même, Chachkhiani fait une caractérisation des microorganismes impliqués dans le démarrage d'un digesteur thermophile à partir d'un inoculum mésophile et conclut que les espèces dominantes retrouvées ne sont pas des mésophiles adaptées aux conditions thermophiles, mais des thermophiles déjà présents dans l'inoculum à un niveau très faible qui deviennent dominantes en conditions anaérobies (*310*). Dans notre cas, aucune bactérie de la phase 1 de IM n'est retrouvée en phase 2. Néanmoins, Iranpour remarque qu'une augmentation lente de température peut aboutir au développement d'une culture dominée par des organismes mésophiles thermotolérants plutôt que de véritables thermophiles, cependant les digesteurs obtenus sont instables (*311*). Conrad *et al.* incubent du sol de rizière selon des gradients de températures (*142*). Aux températures extrêmes, le comportement est soit thermophile, soit mésophile, mais aux températures intermédiaires (42-46°C), on a un mélange des deux comportements (tant pour le métabolisme que pour la structure des communautés). Quelques travaux plus précis ont été réalisés sur les méthanogènes. Lau montrent qu'un choc de température a moins d'effet négatif sur les méthanogènes acétotrophes que sur les autres (*312*). Ahring *et al.* montrent après passage de 55°C à 65°C que de nouvelles modifications des communautés archées ont lieu (*197*).

En particulier, la quantité de méthanogènes hydrogénotrophes est moins importante. Enfin, Pender *et al.* étudient les modifications de la diversité suite à une augmentation de température dans un réacteur (mésophile vers thermophile) et constate que la quantité de *Methanosaeta*, qui étaient prédominantes en conditions mésophiles, diminue puis disparait (*200*). Ils observent également une baisse de diversité générale des méthanogènes suite à l'augmentation de température.

La réponse aux questions soulevées n'est donc pas générale, mais spécifique des températures d'incubations et des modalités de modification de ces températures. **Pour chaque microorganisme existent des températures où l'activité est optimale, et au-delà desquelles le microorganisme ne peut pas survivre.** Les modifications de température dans notre expérience ont sélectionné des microorganismes et donc des fonctions métaboliques. Des inventaires moléculaires détaillés réalisés régulièrement au cours du temps permettront de comprendre le devenir des microorganismes d'une phase à l'autre et d'identifier spécifiquement comment chaque population est affectée par les modifications de température. Les 4 échantillons séquencés donnent tout de même de premiers éléments de réponse.

4.4. Changements irréversibles au passage par les conditions thermophiles

Une asymétrie de comportement des inocula face au changement de température est observée. L'inoculum thermophile n'est pas résistant au changement de température, mais semble résilient après retour à la température initiale. La situation contraire est observée pour l'inoculum mésophile. Il semble que le passage par les conditions d'incubation thermophiles modifie irréversiblement les communautés microbiennes et leur fonctionnalité. Les situations peuvent être nuancées en fonction de l'inoculum.

Pour IT, le passage aux conditions mésophiles en phase 2 ne se traduit pas par un arrêt complet du fonctionnement du système. La cellulose est dégradée au moins partiellement cependant aucune autre nouvelle archée ne s'implante malgré les quantités d'acide acétique à dégrader importantes et la niche laissée libre. Le système n'est pas capable d'atteindre un fonctionnement normal en conditions mésophiles, il ne reste pas d'archée mésophile fonctionnelle dans le microcosme. Après retour à la température initiale, les systèmes retrouvent leur fonctionnalité, même si les triplicats présentent de fortes différences. Des équilibres stochastiques se sont établis en phase 2 dans les microcosmes qui ont évolué différemment après retour aux conditions thermophiles et sont différents de la phase 1.

Pour l'inoculum mésophile, le passage aux conditions thermophiles entraîne des modifications importantes des communautés, mais le système reste performant. Par contre, après retour aux conditions de température initiales en phase 3, le système ne peut pas revenir en arrière. Au retour à 35°C, les thermophiles de la phase 2 ne sont plus actifs. De plus, la période d'incubation à 55°C a entraîné des modifications irréversibles dans les populations mésophiles initiales, qui ne sont plus capables de recoloniser les incubations et d'être fonctionnelles. En particulier les méthanogènes sont sans doute plus influencées car la redondance fonctionnelle est moins importante pour elles que pour les bactéries. En particulier, il semble que les acétoclastes ne résistent pas au choc de température, et

que les hydrogénotrophes soient peu actives en conditions mésophiles. Cette hypothèse est confortée par les observations de l'expérience IT phase 2.

On peut en conclure que différents microorganismes mésophiles ne peuvent pas résister à l'augmentation de température, alors que les microorganismes thermophiles survivent à des températures plus basses. La croissance optimale de chaque espèce de microorganisme se déroule autour d'une gamme de température limitée. Quand ce niveau de température est dépassé, le taux de croissance chute rapidement en raison de la dénaturation de protéines clés. La perte de fonction de ces microorganismes a de l'influence sur toute la chaîne de dégradation (*309, 313*). En particulier, les archées ont un rôle très important dans la perte de fonction du système. Les données de séquences montrent qu'à la fois archées et bactéries sont influencées par le changement de température, cependant, l'influence semble être plus grande sur la croissance des archées, comme le montre le dendrogramme des profils ARISA. La modification de température engendre un blocage des processus réactionnels méthanogènes du passage thermophile à mésophile, qui a peut-être par la suite des conséquences sur les processus fermentatifs et la diversité bactérienne à cause d'une inhibition par accumulation des produits de fermentation. Dans notre expérience l'inoculum mésophile contenait une diversité suffisamment importante pour que certains microorganismes puissent se développer et être fonctionnels en conditions thermophiles. Cependant, les mésophiles présents initialement en phase 1, notamment les archées, n'ont pas résisté à l'augmentation de la température de la phase 2, et ne sont donc plus disponibles au retour en phase 3 à la température de 35°C, ce qui explique qu'il n'y ait plus de biogaz produit. Dans le cas de l'inoculum thermophile, une faible production de méthane est observée en phase 2. On peut penser qu'une partie des microorganismes thermophiles est encore active à 35°C, ou alors que la diversité de l'inoculum thermophile est plus importante que celle de l'inoculum mésophile après le choc de température de la phase 2 (on a alors sélectionné uniquement les microorganismes résistants aux conditions thermophiles parmi ceux présents dans l'inoculum mésophile initial). De fait, il contient sans doute plus de microorganismes fonctionnels en conditions mésophiles, ce qui explique la production observée, même si la dégradation n'est pas optimale. On retrouve des cas voisins dans la littérature. Le retour à l'état initial après augmentation de température peut être accéléré par une réinoculation avec l'inoculum mésophile (*142*) sinon une nouvelle adaptation est longue, même sur des réacteurs en continu (*293, 314*). Le passage par les conditions thermophiles enlève au système des bactéries et archées qui sont fonctionnellement cruciales et exclusivement mésophiles d'où la perte de fonctionnalité plus ou moins longue (*291*). Des situations comparables sont possibles dans d'autres gammes de température. Cha *et al.* observe que le passage de conditions mésophiles à psychrophiles entraînent une perte de l'activité d'acidogenèse pendant plusieurs jours (*314*). Enfin Peck remarque qu'une augmentation brève de température a des conséquences moins fortes sur le retour à la normale qu'une augmentation longue, qui provoque des modifications irréversibles (*315*).

Les différences de performances observées entre les différentes phases ne sont donc pas uniquement liées à des métabolismes différents aux différents temps, mais à une sélection irréversible des

microorganismes en conditions thermophiles, en particulier les méthanogènes qui présentent moins de redondance fonctionnelle que les bactéries

4.5. Diversité, écologie et fonctionnalité

Le rôle de la biodiversité dans la stabilité et le fonctionnement des écosystèmes a été bien étudié (*cf.* partie introductive du manuscrit). Ces études montrent globalement qu'il existe une corrélation positive entre diversité et productivité et résilience des systèmes (*243, 316-317*). Cependant, Ives and Carpenter 2007 ont montré que la diversité-stabilité dépend du contexte (*318*). Par exemple, dans le cas de Conrad (*142*), certains groupes de méthanogènes semblent être primordiaux à la fois en conditions thermophiles et mésophiles (*Methanobacteriales* et *Methanosarcinaceae*). D'autres groupes sont présents, mais particulièrement spécifiques d'une température, alors que ces deux groupes permettent de faire le lien entre les deux conditions de température et de maintenir la fonction. **Tous les microorganismes n'ont donc pas la même valeur dans la stabilisation du système, et seule l'information sur la diversité ne suffit pas à prédire la future stabilité du système.**

Dans notre expérience, le passage par les conditions thermophiles entraîne une chute drastique de la diversité au sein des incubations. En particulier une grande partie des microorganismes mésophiles ne survit pas à ces conditions de température. A l'inverse, même si leur activité semble réduite, les thermophiles se maintiennent en vie dans des conditions mésophiles de température. Cependant, ceci n'est pas sans effet sur les populations et la stabilité du système. Scheffer *et* Carpenter ont mis en avant trois façons différentes qu'un écosystème peut avoir de réagir face à des perturbations : un changement doux, un changement profond lorsqu'on atteint un niveau critique, ou plus d'un état stable pour différentes conditions (*319*). On retrouve le premier cas en phase 2 de l'expérience IT, le deuxième cas lors du passage à la phase 2 de IM. Le changement à cette phase ne permet pas le retour en arrière en phase 3. Enfin le troisième cas se retrouve lors de la phase 3 de l'expérience IT après retour à la température initiale. On peut à ce titre noter le résultat de Kim qui dit que les procédés thermophiles ont une moindre stabilité à cause d'une biodiversité plus faible (*320*).

Par ailleurs, différentes études montrent que la stabilité fonctionnelle ne signifie pas stabilité des communautés de microorganismes (*251*), comme nous l'observons. Le système est constamment dynamique, n'est jamais à l'équilibre et continue d'évoluer même si le bilan du procédé demeure constant. On peut sans doute expliquer cette stabilité fonctionnelle par une importante redondance fonctionnelle au sein des communautés de microorganismes, en particulier les bactéries. Une telle diversité permet d'assurer résistance et résilience des systèmes. Le vivant n'est jamais à l'équilibre. Cette dynamique permet une constante adaptation des systèmes aux perturbations biotiques et abiotiques auxquelles ils sont soumis. Dans notre cas, au cours de IM phase 2, la diversité du système a été considérablement réduite. La redondance fonctionnelle n'est plus là pour assurer le bon fonctionnement du système en phase 3. C'est également ce qu'observe Wu (*203*). Le passage en conditions thermophiles a entrainé une perte de diversité irréversible dans la communauté de départ. Le changement brutal de température permet uniquement aux microorganismes fonctionnels à 55°C de se développer, les autres ne survivent pas. Au retour aux conditions mésophiles, cette perte de diversité,

notamment chez les méthanogènes, a pour conséquence une perte de fonctionnalité, dans la mesure où la redondance fonctionnelle n'est plus suffisante pour stabiliser la fonction. La perte de fonctionnalité méthanogène entraîne sans doute par la suite une perte de fonctionnalité fermentative, puis de toute la digestion. Il faudrait renouveler la diversité pour que le système redémarre (*142*), les changements de température ont sélectionné de manière radicale et définitive la diversité, la fonction ne peut pas être maintenue. Cette expérience illustre la variété des réactions possibles de l'écosystème microbien auxquelles on peut être confronté en actionnant des leviers d'ingénierie écologique.

5. Conclusion-bilan

Les changements de température ont des conséquences importantes sur le fonctionnement des bioprocédés de digestion anaérobie. Le passage par les conditions thermophiles rend impossible le fonctionnement en conditions mésophiles. Certaines étapes ou microorganismes ont été bloqués. Ces résultats ouvrent donc des perspectives intéressantes en termes d'ingénierie écologique des bioprocédés. On peut tout d'abord noter que pour un fonctionnement optimal, un digesteur anaérobie ne doit pas dépasser une température de fonctionnement, si cette température est changée de façon importante et brutalement, les fonctions du systèmes se perdent et ne se retrouvent plus en conditions mésophiles. Pour modifier les processus métaboliques il est donc préférable de réaliser des chocs froids. Par ailleurs, même sans variation de température, la diversité des microorganismes évolue sans cesse, mais lentement (*cf.* témoins). Les modifications de température permettent d'engendrer une variation beaucoup plus rapide des communautés. Ceci permet de jouer sur la vitesse de variabilité de la diversité. Prenons ainsi l'exemple d'un digesteur thermophile. Il semble intéressant de faire fonctionner le système à haute température car la cinétique de dégradation est plus élevée et car on imagine qu'il dérivera moins (car la variabilité des microorganismes thermophiles est moins grande). Si l'on observe un problème de comportement du réacteur (comme vu en phase 3 des témoins de l'expérience IT), il est possible de diminuer temporairement la température pour remodeler l'inoculum, et de repasser ensuite à la température opératoire initiale pour que le système fonctionne à nouveau, avec une biomasse modifiée, dans de nouvelles conditions plus stables. De la même façon, on peut perturber un système mésophile non satisfaisant en augmentant la température, puis le réinoculer afin de lui faire retrouver des caractéristiques mésophiles préférables. On peut aussi imaginer inhiber spécifiquement la méthanogenèse par montée brutale de la température suivi d'un retour aux températures opératoires (par exemple pour des bioprocédés dont l'objet n'est pas la production de méthane mais de bioéthanol par exemple). Les modifications ponctuelles de température semblent donc être un outil de choix pour faciliter le contrôle des processus et modifier les populations microbiennes.

On peut appliquer des caractéristiques au levier température : il n'est pas symétrique, il n'est pas réversible. C'est un outil pour élaborer l'ingénierie écologique et pour pouvoir l'utiliser pleinement, il faudra caractériser plus précisément l'influence du levier température sur la plasticité et la fonctionnalité du système. En particulier, les modalités du changement de température (rapide ou lent, changement important ou non) aboutissent à des résultats différents (*321*) et feront partie des variables d'ajustement (*322*) de ce levier pour obtenir les impacts souhaités sur le bioprocédé.

– Influence d’une fonctionnalisation préalable de la biomasse

1. Introduction

En conditions anaérobies, la dégradation des matériaux ligno-cellulosiques en méthane est réalisée par plusieurs groupes de microorganismes au cours des quatre phases de la méthanisation : hydrolyse, acidogenèse, acétogenèse et méthanogenèse (*9*). Au sein de ces quatre étapes, différentes voies métaboliques sont possibles pour dégrader un même substrat. Elles sont catalysées par des microorganismes variés, consommant et produisant des métabolites spécifiques. Un réseau complexe d'interactions existe entre ces groupes de microorganismes, mais il reste peu caractérisé. Cependant, la nature de ce réseau est à l'origine, dans les bioréacteurs, d'une succession particulière de réactions aboutissant à des cinétiques et des rendements spécifiques de conversion des substrats (la cellulose en particulier) en biogaz. Cette succession de réactions est directement liée à la nature des microorganismes interagissant. Ainsi, l'orientation vers un chemin réactionnel de dégradation plutôt qu'un autre (et par conséquent la performance du bioprocédé) dépendra de la composition de la communauté microbienne présente dans le milieu.

Jouer sur la combinaison des groupes microbiens de l'inoculum pourrait donc permettre d'influencer le déroulement de la digestion anaérobie. Cela ouvrirait à terme la porte à la perspective de construire et d'associer de façon optimale des flores spécifiques aux substrats à dégrader en fonction des objectifs d'exploitation. Avant cela, il faut déterminer comment construire facilement de nouvelles communautés microbiennes et mieux documenter les conséquences de modifications écologiques sur les performances de dégradation des bioréacteurs.

Dans ce sens, la finalité de cette expérience est de voir si, à partir d'une diversité microbienne initiale identique, on peut produire *in situ* de nouvelles communautés microbiennes, qui dégraderont par la suite la cellulose selon des processus métaboliques spécifiques. Les possibilités de modelage écologique d'une même communauté de départ ont pour cela été étudiées, ainsi que les conséquences de ce modelage sur la dégradation de la cellulose et les microorganismes fonctionnels alors impliqués. Différents types de modelages étaient possibles. Nous avons choisi de les réaliser en incubant une même communauté microbienne complexe dans différents bioréacteurs avec des molécules simples. De cette façon, nous avons stimulé les groupes fonctionnels spécifiques de la digestion anaérobie des molécules utilisées. Cette incubation préliminaire a permis de constituer de nouvelles communautés microbiennes (spécialisées dans la dégradation de molécules choisies). Les conséquences de cette « fonctionnalisation » de l'inoculum initial sur la dégradation de la cellulose en termes métaboliques et écologiques ont été étudiées pour chaque bioréacteur.

Pour réaliser cette expérience, un inoculum mésophile de référence (également utilisé pour les autres expériences présentées dans ce manuscrit) a été incubé avec quatre substrats simples (acide propionique, acide butyrique, glucose ou cellobiose), intermédiaires potentiels dans la dégradation de la cellulose. J'ai ainsi favorisé la croissance des microorganismes impliqués dans la dégradation de ces substrats, et modifié les communautés microbiennes de l'inoculum initial. Afin de m'assurer que les communautés seraient modifiées de façon importante, trois injections successives du même substrat simple ont été réalisées avant d'ajouter la cellulose (chaque nouvelle injection intervenant quand la

production de biogaz due à l'injection précédente était terminée). Après cette première phase de préadaptation, la biomasse fonctionnalisée a été mise en présence de cellulose. La figure suivante (Figure 33) présente le protocole expérimental utilisé.

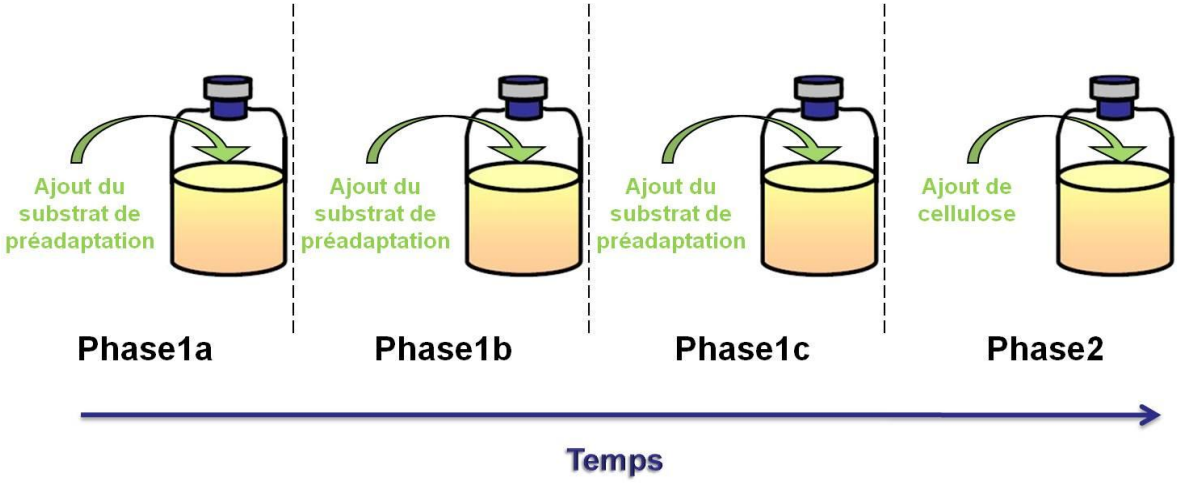


Figure 71 : Phases d'incubation de l'expérience de fonctionnalisation.
Préadaptation de la biomasse (phase 1a-b-c) puis étude de la dégradation de la cellulose (phase 2).

Des duplicats expérimentaux ont été réalisés. Les différents microcosmes sont appelés respectivement $IM_{Pro}1/2$, $IM_{But}1/2$, $IM_{Glu}1/2$ et $IM_{Cell}1/2$ selon que le substrat utilisé pour la préadaptation était de l'acide propionique, de l'acide butyrique, du glucose ou du cellobiose. Pour étudier la fraction fonctionnelle des microorganismes, de la cellulose marquée (^{13}C) a été introduite dans un des deux microcosmes de chaque duplicat après la préadaptation (le microcosme 1). La Figure 34 résume le déroulement de l'incubation des duplicats réalisés pour chaque substrat de préadaptation.

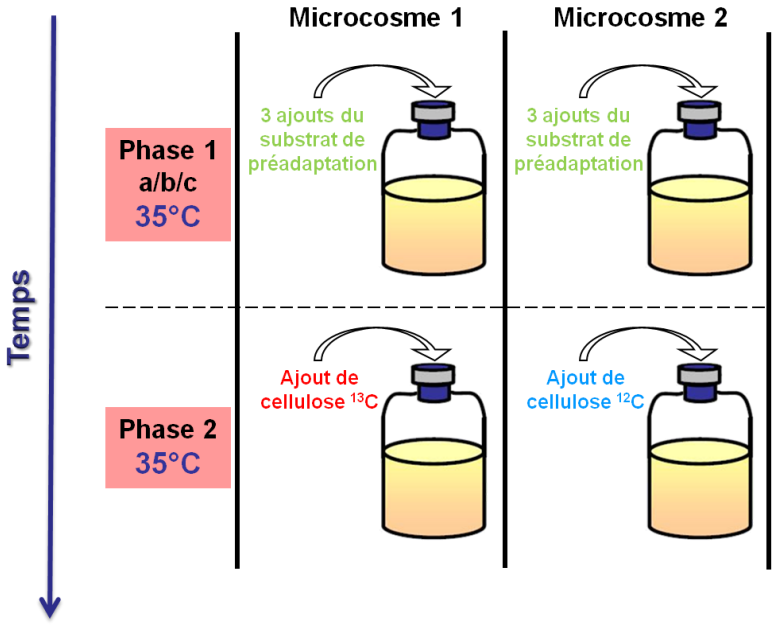


Figure 72 : Représentation schématique des duplicats de l'expérience de fonctionnalisation.
La cellulose marquée ^{13}C est introduite dans le microcosme 1.

La présentation des résultats sera divisée en deux parties. La première partie exposera rapidement les données concernant la préadaptation afin d'estimer son influence sur les communautés de microorganismes, et d'établir si elles ont été modelées et fonctionnalisées. La seconde partie décrira de façon plus détaillée la dégradation de la cellulose ainsi que les microorganismes impliqués. Une expérience symétrique a été réalisée en conditions thermophiles. Les résultats de cette expérience n'ont pas encore été analysés et ne seront pas présentés dans ce manuscrit, mais feront l'objet d'une valorisation ultérieure.

2. Préadaptation

2.1. Données physico-chimiques

Aucun substrat marqué n'a été utilisé au cours de la phase 1. Les principales données physico-chimiques présentées ici concernent donc les productions de biogaz et d'intermédiaires, en particulier les AGV. Elles sont présentées simultanément pour les quatre substrats de préadaptation. Par ailleurs, au cours de la préadaptation, seul un prélèvement liquide a été réalisé au début de la phase 1a et à la fin de chacune des phases 1a, 1b et 1c (dégradation de biogaz juste terminée), afin de ne pas ôter un volume trop important de liquide dans les incubations, et de permettre un plus grand nombre de prélèvements au cours de la phase 2. Un nombre limité de résultats d'analyse est donc disponible. Pour cette raison, les données obtenues seront parfois présentées de manière qualitative dans cette partie.

2.1.1. Productions de gaz

Les graphiques suivants (Figure 73) présentent les productions de méthane et de dioxyde de carbone mesurées pour les trois phases de la préadaptation de chaque groupe de microcosmes. La valeur moyenne a été calculée pour les deux réplicats, et les barres d'erreur représentent les écarts-types[8].

Les évolutions de la concentration de N_2, O_2, N_2O, NH_3, H_2S et H_2 dans le ciel gazeux des microcosmes ont également été suivies au cours du temps. Cependant, dans les différents microcosmes de cette série d'expérience, le niveau de ces gaz est quasi constant (évolution de moins de 1% de la quantité mesurée).

2.1.1.1. Préadaptation avec l'acide propionique

Pour les trois phases, le taux de conversion de l'acide propionique en biogaz est important. Il est légèrement plus faible pour la phase 1a, ce qui pourrait être dû à une assimilation du carbone liée à une croissance microbienne plus importante suite à la mise en place des flores fonctionnelles de dégradation de l'acide propionique. Une différence remarquable est la diminution du temps de latence avant le démarrage de la production de biogaz entre la phase 1a et la phase 1c qui passe de 30 jours pour 1a à 10 jours pour 1b et finalement disparait pour 1c. Cependant, seul le temps de latence semble modifié, mais

[8] Afin de se placer dans des conditions équivalentes pour chacune des paires de microcosmes, les quantités de substrat de préadaptation apportées ont été ajustées afin d'amener une concentration constante de carbone organique (1,2 g/l = 100 mmoles de carbone/l). Les productions de gaz des différents microcosmes ont été exprimées en mg de carbone de gaz produit, puis normalisées par la quantité de carbone introduite au début de chaque phase (mg), pour mieux visualiser l'avancement de la dégradation.

pas la cinétique qui semble la même dans les trois phases. Le consortium de biomasse fonctionnelle est donc plus réactif (sans doute présent en quantité plus importante, ou moins sensible aux inhibitions) à mesure que le nombre de phases est important, mais pas plus « efficace ». Des voies métaboliques et des microorganismes spécifiques ont dû être activés pendant la phase 1a, et sont disponibles plus rapidement en phase 1b puis 1c car le système est adapté à la dégradation de l'acide propionique.

Enfin, prêt de 75% du biogaz produit pour la phase 1a est composé de méthane, et ce chiffre évolue à 60% pour la phase 1b et ne change plus pour 1c, signe que le métabolisme de la méthanogenèse a sans doute peu évolué entre les phases 1b et 1c, mais a peut-être été modifié par rapport à 1a.

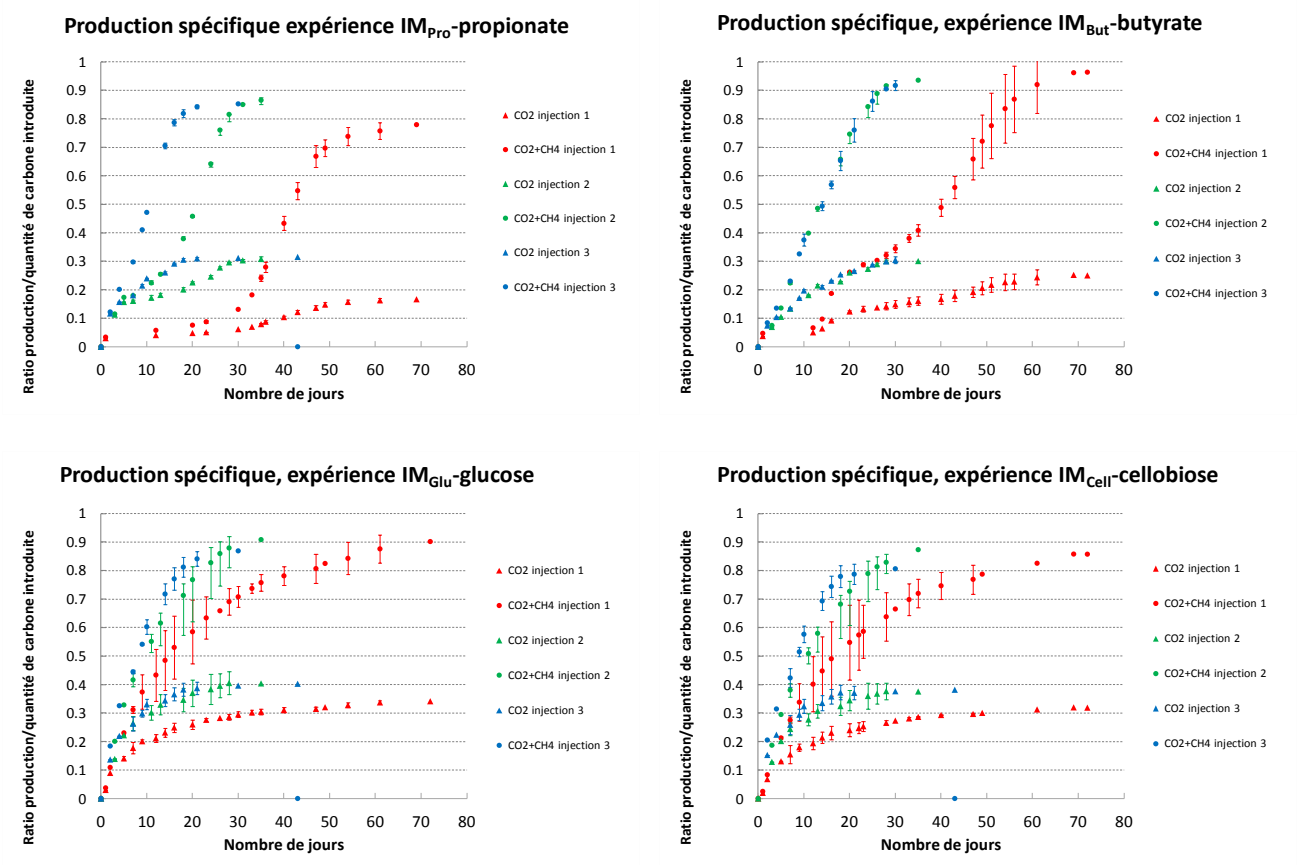


Figure 73 : Taux de conversion spécifique des substrats de préadaptation en gaz pour les trois phases initiales de l'expérience de fonctionnalisation.
Les barres d'erreur correspondent aux écart-types (n=2).

2.1.1.2. Préadaptation avec l'acide butyrique

L'allure de production de biogaz pour l'acide butyrique est la même pour 1b et 1c. Les principales différences relevées avec 1a sont le temps de latence (11 jours pour 1a, 0 jour pour 1b et 1c), la cinétique de production (moins élevée pour 1a). Le taux final de production de biogaz et le pourcentage de méthane (67%) sont les mêmes pour les trois phases.

Comme pour IM_{Pro}, la flore microbienne s'adapte au fur et à mesure des phases à la dégradation de l'acide propionique (temps de latence moindre, ou cinétique plus rapide par exemple), et cette

adaptation est plus rapide que pour IM_{Pro} (phase 1b et 1c identiques, même taux de méthane dans le biogaz pour les trois phases, etc.) et atteint un optimum puisqu'elle n'évolue plus.

2.1.1.3. Préadaptation avec le glucose

L'allure des courbes semble plus complexe dans ce cas. Il n'y a pas de temps de latence dans la production de biogaz, cependant la cinétique est plus rapide à mesure que le nombre d'injections déjà réalisées est important, signe là encore que les populations sont adaptées et plus nombreuses et donc plus efficaces. Le taux de conversion du glucose en biogaz est équivalent pour les trois phases, mais le ratio de méthane dans la production cumulée est moins important pour 1b et 1c (55%) que pour 1a (65%). Enfin on peut noter des écarts-types entre les duplicats plus importants que ceux observées dans les deux paragraphes précédents.

2.1.1.4. Préadaptation avec le cellobiose

Là encore, l'allure des courbes semble plus complexe, en raison des écart-types importants observés. Comme pour le glucose, il n'y a pas de temps de latence dans la production de biogaz, cependant la cinétique est plus rapide à mesure que le nombre d'injections déjà réalisées est important. Le taux de conversion du cellobiose en biogaz est équivalent pour les trois phases, mais le ratio de méthane est moins important pour 1b et 1c (53%) que pour 1a (64%).

2.1.1.5. Bilan

Un temps de latence est observé seulement pour IM_{Pro} et IM_{But} mais pas pour IM_{Glu} ou IM_{Cell}. Ce temps de latence diminue d'une phase à l'autre pour IM_{Pro} et IM_{But} jusqu'à disparaitre. Au contraire, la cinétique évolue peu pour IM_{Pro} et IM_{But}, mais est plus importante d'une phase à l'autre pour IM_{Glu} et IM_{Cell}. Dans tous les cas, on imagine que les populations sont plus adaptées et plus nombreuses au cours du temps et à mesure que les phases se succèdent. Du fait que les groupes fonctionnels de microorganismes limitant (peu présents dans l'inoculum initial) ne sont sans doute pas les mêmes dans les différentes préadaptations, cette adaptation/croissance des populations se traduit pour les préadaptations avec les AGV par une diminution du temps de latence, et pour les préadaptations avec les autres molécules (sucres) par une augmentation de la cinétique globale. Ces observations seront discutées en fin de ce chapitre.

Par ailleurs, les duplicats sont assez proches pour IM_{Pro} et IM_{But}, mais sont moins proches pour IM_{Glu} et IM_{Cell}. En regardant plus en détail les résultats, on s'aperçoit que la production observée pour $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}2$ est identique. Le même résultat est observé pour $IM_{Glu}2$ et $IM_{Cell}1$. Ces paires de microcosmes fonctionnent comme des duplicats alors qu'elles sont constituées d'incubations *a priori* différentes. Ce résultat est à retenir pour la suite de l'interprétation des données, et sera à préciser en le confrontant aux autres analyses.

2.1.2. Carbone organique et inorganique dissous

Les valeurs de carbone organique et inorganique au temps initial (avant ajout des substrats) ainsi qu'à la fin de chaque phase sont identiques (moins de 10% d'écart), le COD ou le CID de la phase liquide (autre que le substrat) ne semble donc pas être métabolisé dans cette expérience et n'apporte pas d'indications particulières sur les mécanismes mis en jeu (environ 1750 mg/l pour le COD et 2750 mg/l pour le CID).

2.1.3. Acides gras volatils

Les principaux acides gras volatils identifiés dans ces incubations sont l'acide acétique, l'acide propionique, et l'acide butyrique dans les incubations IM_{But} uniquement. Les graphiques suivants présentent les valeurs mesurées pour IM_{Pro} et IM_{But} (Figure 74), et IM_{Glu} et IM_{Cell} (Figure 75). Les lignes verticales figurent la date des trois injections successives de substrat de la phase 1.

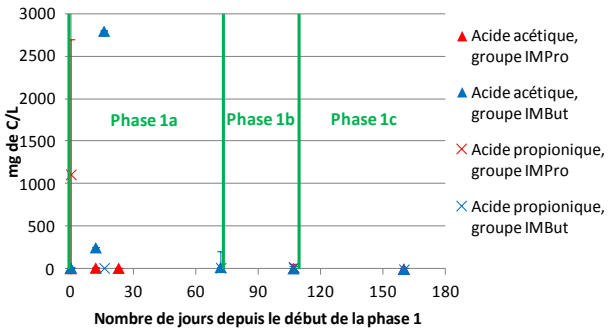


Figure 74 : Production d'AGV pour les incubations du groupe IM_{Pro} et IM_{But} pendant la préadaptation. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

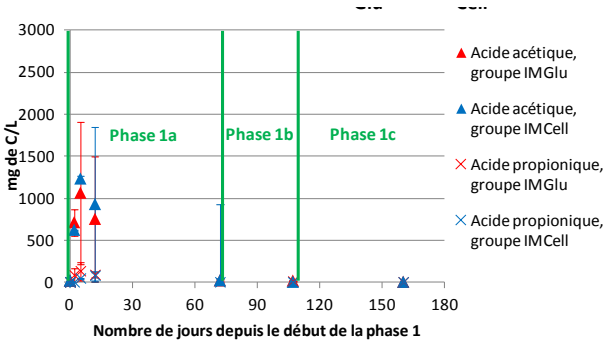


Figure 75 : Production d'AGV pour les incubations du groupe IM_{Glu} et IM_{Cell} pendant la préadaptation. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

Pour IM_{Pro} et IM_{But}, on remarque comme pour les productions de gaz que les écarts-types des accumulations d'AGV sont très faibles entre les duplicats, alors qu'ils sont importants pour IM_{Glu} et IM_{Cell}. Pour IM_{Pro}, on ne mesure pas d'accumulation d'acide acétique au cours du temps (en particulier lors de la phase 1a pour laquelle le plus grand nombre de données sont disponibles), alors que la dégradation de l'acide butyrique dans IM_{But} semble passer par l'accumulation d'acide acétique. Toutefois le faible nombre de points d'analyse ne permet aucune conclusion.

Le résultat le plus intéressant qu'on peut tirer de ces données vient d'une observation séparée des résultats obtenus pour les duplicats de IM_{Glu} et IM_{Cell} (non présentée ici). Elle montre que les incubations $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}2$ ont le même comportement (accumulation importante d'acide acétique, 1800-1900 mg/L au maximum au cours de la phase 1a) alors que les incubations $IM_{Glu}2$ et $IM_{Cell}1$ présentent une accumulation d'acide acétique plus faible (500-600 mg/L au maximum au cours de la phase 1a). $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}2$ sont donc plus proches du groupe IM_{But} et $IM_{Glu}2/IM_{Cell}1$ plus proches du groupes IM_{Pro} en ce qui concerne les productions d'AGV, mais sont surtout très proches entre elles, ce qui rappelle les observations réalisées sur les productions de biogaz, résultat non attendu. L'absence de

prélèvement au cours des phases 1b et 1c ne permet pas de savoir si cette tendance se confirme et s'affirme à mesure que les flores microbiennes sont de plus en plus fonctionnalisées.

2.2. Analyses microbiologiques

2.2.1. ARISA

Des profils ARISA archées (Figure 76) et bactéries (Figure 77) ont été réalisés à partir des différents prélèvements effectués pour les différentes incubations. Dans cette partie nous comparerons tout d'abord les résultats obtenus pour le dernier prélèvement (fin de phase 1c) de chacune des incubations. Ce prélèvement correspond à l'état final obtenu après la fonctionnalisation par les différents substrats mais également à l'état initial des communautés microbiennes des microcosmes au moment où on introduira la cellulose. Les cadres de couleur mettent en évidence des bandes communes entre les incubations.

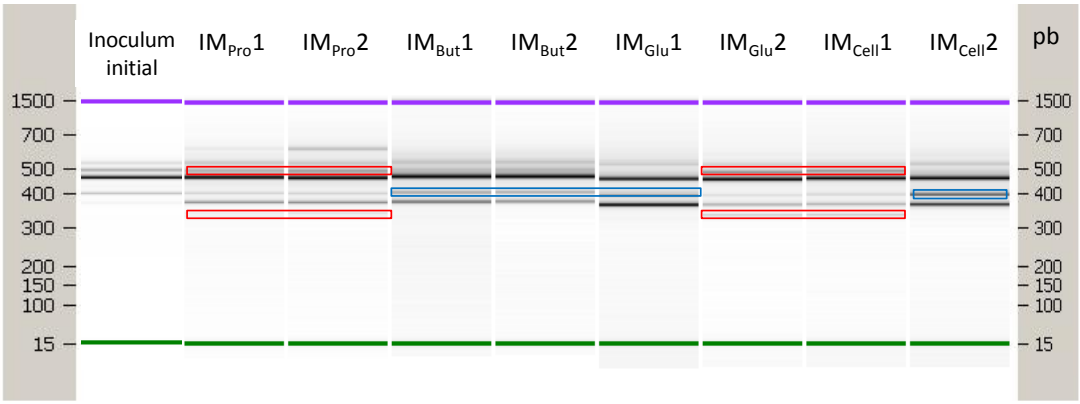


Figure 76 : Profils ARISA archées obtenus en fin de phase 1c, expérience de fonctionnalisation.

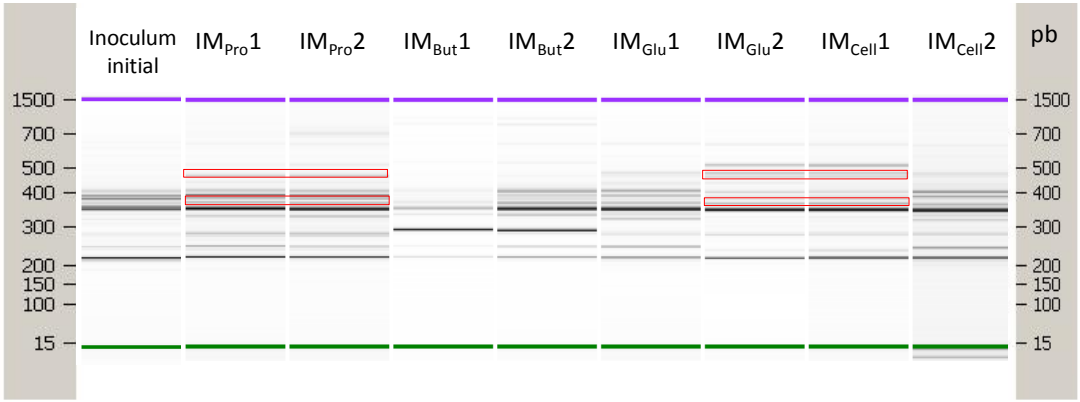


Figure 77 : Profils ARISA bactéries obtenus en fin de phase 1c, expérience de fonctionnalisation.

Les profils archées sont peu différents entre eux. Des différences d'intensité peuvent toutefois être observées par rapport à l'inoculum initial. On peut remarquer une très grande similarité pour les paires $IM_{Pro}1$ et $IM_{Pro}2$, $IM_{But}1$ et $IM_{But}2$, $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}2$, $IM_{Glu}2$ et $IM_{Cell}1$. De plus, des bandes semblent communes dans les groupes $IM_{Pro}1$, $IM_{Pro}2$, $IM_{Glu}2$ et $IM_{Cell}1$ (remarquées en rouge) et $IM_{But}1$, $IM_{But}2$, $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}2$ (remarquées en bleu).

Une diversité plus importante est observée entre les profils bactéries, notamment en comparaison avec l'inoculum initial. Encore une fois, on observe une similarité très importante pour les paires $IM_{Pro}1$ et $IM_{Pro}2$, $IM_{But}1$ et $IM_{But}2$, $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}2$, $IM_{Glu}2$ et $IM_{Cell}1$. Quelques bandes spécifiques au groupe $IM_{Pro}1$, $IM_{Pro}2$, $IM_{Glu}2$ et $IM_{Cell}1$ peuvent également être distinguées.

Ces résultats montrent que la préadaptation a eu une influence non nulle et non équivalente sur les profils de diversité. En effet des différences sont observées selon le substrat de préadaptation et par rapport à l'inoculum initial (en particulier pour les bactéries). Un modelage de la diversité de départ a donc été réalisé par la préadaptation. De plus, comme nous l'avons observé pour les productions de gaz et l'accumulation des AGV, les duplicats des groupes IM_{Glu} et IM_{Cell} ne sont pas reproductibles, par contre les paires $IM_{Glu}1/IM_{Cell}2$ et $IM_{Glu}2/IM_{Cell}1$ le sont, et présentent des bandes communes avec IM_{But} et IM_{Pro} respectivement. Pour mieux documenter cette dernière observation, j'ai choisi de réaliser une étude générale de tous les profils ARISA réalisés au cours de la période de préadaptation. Elle est présentée dans le paragraphe suivant.

2.2.2. Analyse statistique des profils ARISA

Afin de comparer tous les prélèvements réalisés pendant la phase 1 (a, b et c) de manière plus globale, et indépendamment de l'observation, j'ai utilisé l'outil StatFingerprints (*276*) afin de réaliser des ACP de tous les profils ARISA réalisés au cours de ces expériences pour les bactéries et les archées. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 78 et la Figure 79. Chacune des huit incubations est représentée par un pictogramme différent. Pour une même incubation, j'ai choisi des tailles croissantes de pictogramme en fonction du nombre de jours entre le prélèvement et le début de l'incubation (le pictogramme du premier prélèvement est le plus petit, le pictogramme du dernier prélèvement est le plus grand). Ceci permet de pondérer visuellement les profils en fonction de l'avancement de la préadaptation et de mieux rendre compte de la réussite de la fonctionnalisation et du modelage des communautés. Enfin, suite aux observations déjà réalisées dans les paragraphes précédents, j'ai choisi d'adopter un code couleur différent pour les incubations $IM_{Pro}1$, $IM_{Pro}2$, $IM_{Glu}2$ et $IM_{Cell}1$ (en rouge) et les incubations $IM_{But}1$, $IM_{But}2$, $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}2$ (en bleu) pour voir si les points communs déjà observés se retrouvaient également tout au long de la préadaptation dans les profils ARISA.

Pour les bactéries, on observe très nettement une zone « rouge » et une zone « bleue ». Quelques points rouges sont proches de points bleus, mais il s'agit de petits pictogrammes, correspondant donc aux premiers prélèvements, au moment où la préadaptation n'est pas encore complètement effective. On observe donc toujours bien, comme pour les données précédentes, un regroupement des incubations $IM_{Pro}1$, $IM_{Pro}2$, $IM_{Glu}2$ et $IM_{Cell}1$ d'une part et $IM_{But}1$, $IM_{But}2$, $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}2$ d'autre part pour les profils de diversité bactérienne totale. Comme attendu, dans le groupe rouge, les profils de $IM_{Pro}1/IM_{Pro}2$ et $IM_{Glu}2/IM_{Cell}1$ sont légèrement distincts, ainsi que $IM_{But}1/IM_{But}2$ et $IM_{Glu}1/IM_{Cell}2$ dans le groupe bleu, ce qui est logique puisque les substrats n'étaient pas identiques pour ces incubations. Par conséquent, même si certains pics ARISA sont spécifiques du substrat (glucose ou cellobiose en particulier dont la dégradation fait intervenir davantage de groupes fonctionnels), d'autres sont communs au sein du groupe rouge (ou bleu), d'où des écarts faibles dans le positionnement des profils dans le cadre de l'ACP pour les incubations rouges et pour les incubations bleues.

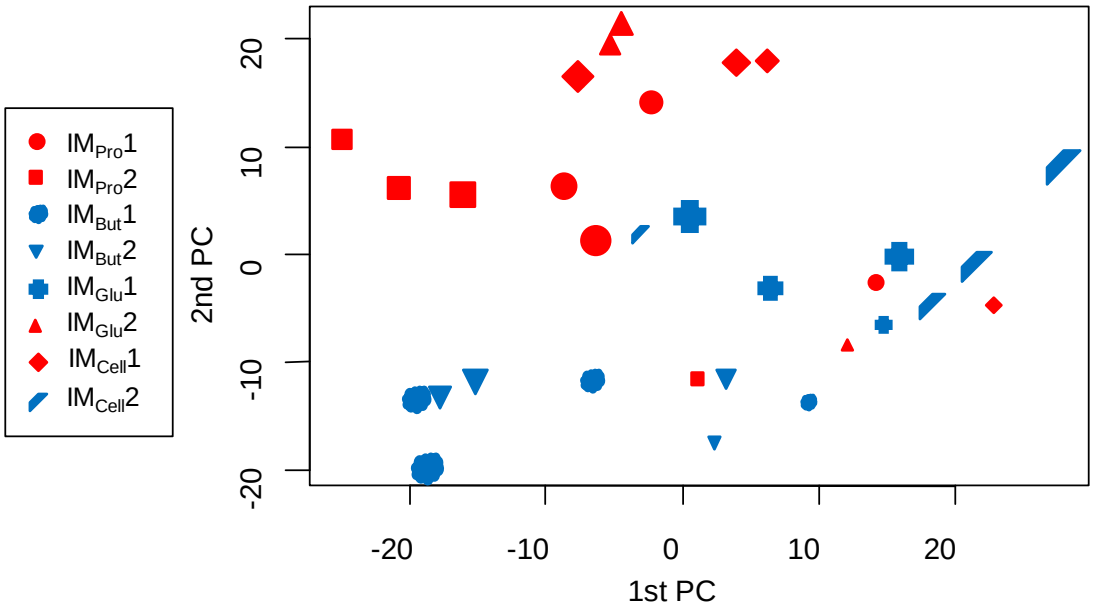


Figure 78 : Analyse en composante principale des profils ARISA des bactéries de la phase de préadaptation. La taille du pictogramme grandit en fonction de l'avancement de la préadaptation. Les couleurs rouges et bleues distinguent les deux groupes d'incubations identifiées dans les paragraphes précédents. L'axe 1 représente 34% de la diversité, l'axe 2 18%.

Les résultats obtenus pour les archées ne montrent pas un clivage des couleurs du même type que celui qui est observé pour les bactéries. On remarque plutôt une évolution de profils différents pour les premiers prélèvements de la préadaptation (coin supérieur gauche pour IM_{Pro} et IM_{But}, et milieu droit pour IM_{Glu} et IM_{Cell}) vers une situation commune (coin inférieur gauche) pour les différentes incubations en fin de préadaptation. La préadaptation a donc eu une influence moindre sur les profils de diversité archées que bactéries, malgré tout, on observe des modifications au fur et à mesure de la préadaptation.

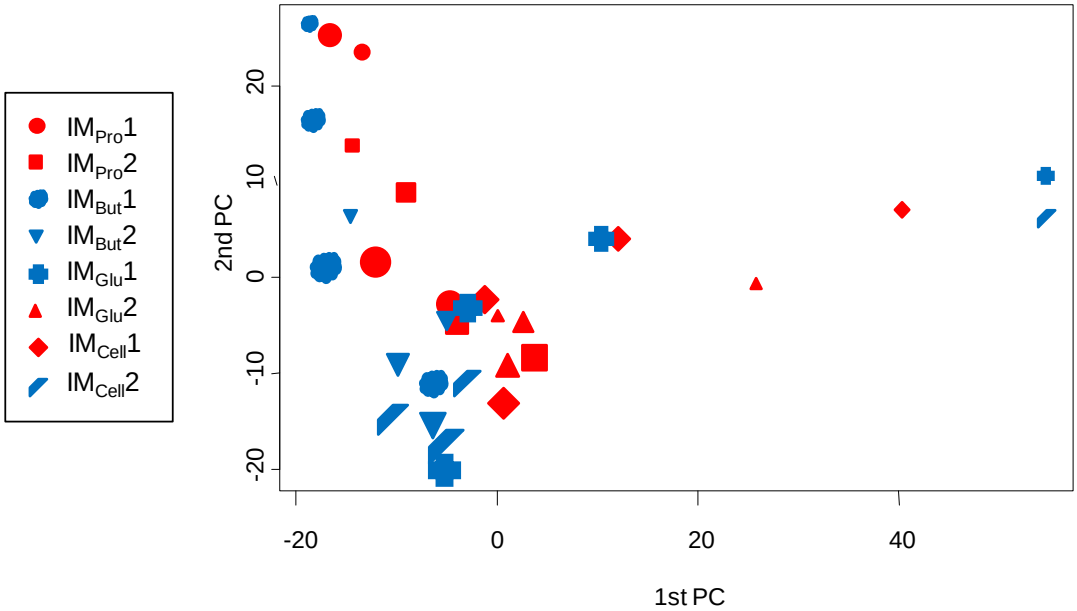


Figure 79 : Analyse en composante principale des profils ARISA des archées de la phase de préadaptation. La taille du pictogramme grandit en fonction de l'avancement de la préadaptation. Les couleurs rouges et bleues distinguent les deux groupes d'incubations identifiées dans les paragraphes précédents. L'axe 1 représente 56% de la diversité, l'axe 2 27%.

2.2.3. Séquençage de l'ADN

Afin de dresser un état des lieux plus précis de la population en fin de période de préadaptation et juste avant l'ajout de la cellulose, les ADNs du dernier prélèvement réalisé en phase 1c pour $IM_{Pro}1$ et $IM_{But}1$ ont été séquencés. Il n'était pas possible de séquencer l'ADN de chaque incubation. Nous avons sélectionné arbitrairement $IM_{Pro}1$ et $IM_{But}1$ pour représenter les deux groupes qui ont été évoqués plus haut, les analyses ARISA confortant l'observation de forte similarité des microorganismes au sein de ces deux groupes. Les résultats sont représentés graphiquement page 166 et 168 (Figure 98 et Figure 99).

2.2.3.1. Archées

Après la période de préadaptation, les principales séquences d'archées retrouvées dans IM_{Pro} (1107 séquences analysées) appartiennent aux genres *Methanosarcina* (77% des séquences, 4 OTUs principaux) et *Methanoculleus* (20% des séquences, 5 OTUs principaux). Quelques séquences affiliées au genre *Methanosaeta* sont également identifiées (à peine 1%). Un OTU du genre *Methanosarcina* est largement majoritaire (67% des séquences). C'était également l'OTU majoritaire dans l'inoculum de départ (84% des séquences). Les 3 autres OTUs du genre *Methanosarcina* étaient également présents au départ, par contre les OTUs du genre *Methanoculleus* étaient présents à moins de 1% à l'origine et se sont développés au cours de la période de préadaptation. 11,7% des séquences appartiennent à des OTUs comportant moins de 1% du total des séquences.

La même analyse avec IM_{But} (1171 séquences analysées) montre également que les archées appartiennent principalement aux *Methanosarcina* (68% des séquences, 4 OTUs) et *Methanoculleus* (31% des séquences, 7 OTUs). L'OTU majoritaire est le même que pour IM_{Pro} (59% des séquences), et de la même façon les OTUs communs avec l'inoculum de départ sont ceux du genre *Methanosarcina*. 8,9% des séquences appartiennent à des OTUs comportant moins de 1% du total des séquences.

La comparaison de IM_{Pro} et IM_{But} montre que seuls 2 OTUs du genre *Methanoculleus* sont spécifiques de IM_{But} (3% des séquences). Les autres OTUs sont communs entre les deux groupes d'incubations. Toutefois, la participation relative de chaque OTU au nombre total de séquences n'est pas la même pour les deux incubations. La préadaptation par deux AGV différents a donc eu des conséquences proches sur les populations archées de ces deux incubations. L'étape de la méthanogenèse n'est pas la plus influencée par la préadaptation, mais on remarque tout de même le développement d'archées du genre *Methanoculleus* qui n'étaient pas présentes dans l'inoculum de départ.

2.2.3.2. Bactéries

En fin de période de préadaptation, les bactéries de IM_{Pro} (3384 séquences analysées) appartiennent essentiellement aux classes *Spirochaetes* (32%), *Bacteroidia* (19%), *Clostridia* (12%), *Synergistia* (2,5%) et *Vadinha* 17 (2,5%). Des microorganismes des classes *Anaerolineae, Thermotogae* sont également présents à plus de 1%. Notons enfin que 25% des séquences bactériennes obtenues n'ont pas pu être identifiées car les fragments correspondant n'étaient pas assez discriminants. Au total, on dénombre 9 OTUs comportant au moins 1% de l'ensemble des séquences (78% des séquences au total). Si on compare les

données obtenues avec les résultats de séquençage de l'inoculum de départ, on observe que seulement 47% des séquences trouvées dans IM_{Pro} étaient déjà présentes à plus de 1% dans l'inoculum de départ (dans des proportions différentes), soit 4 OTUs (l'OTU représentant la classe *Spirochaetes*, 3 OTUs de la classe *Bacteroidia*). Les autres OTUs se sont développés à partir de microorganismes qui étaient minoritaires à l'origine. En particulier, toutes les séquences pour lequel l'identification précise à une classe ou même un phylum n'a pas pu être réalisée appartiennent au même OTU (25%), qui n'était pas présent initialement. Dans le cas de l'acide propionique, la préadaptation a donc eu un effet important sur les communautés bactériennes de l'inoculum de départ.

Pour IM_{But} (2162 séquences analysées), les mêmes classes principales sont représentées, mais dans des proportions différentes : *Bacteroidia* (40%), *Spirochaetes* (21%), *Clostridia* (20%), *Synergistia* (4,6%). On retrouve également des microorganismes des classes *Fibrobacteria*. Cette fois, seuls 7,6% des séquences n'ont pas pu être attribuées phylogénétiquement, elles appartiennent à deux OTUs non retrouvés dans IM_{Pro}. 12 OTUs principaux (présents à plus de 1%) constituent 77% des séquences. Par comparaison avec l'inoculum de départ, on calcule que seuls 4 OTUs présents initialement à plus de 1% sont conservés pour former 59% des séquences au total. Il s'agit des 4 mêmes OTUs que pour IM_{Pro}, mais leur importance relative n'est pas la même.

Ainsi, si on compare maintenant avec les résultats obtenus pour IM_{Pro}, on trouve 6 OTUs communs, soit 50% du total des séquences de IM_{Pro} et 63% du total des séquences de IM_{But}. Il y a donc une base commune pour les deux incubations, mais, contrairement à ce qui était observé pour les archées, la préadaptation semble tout de même avoir eu une influence importante sur les populations de bactéries, et on obtient en fin de période de préadaptation des populations à environ 50% distinctes dans les deux microcosmes. Les OTUs non communs sont de la classe *Clostridia* dans les deux cas, ou alors non identifiés. Par ailleurs, les OTUs communs, qui appartiennent aux classes Spirochaetes (1 OTU), Synergistia (1OTU) et Bacteroidia (4 OTUs) sont présents dans des proportions différentes dans les deux incubations. Les OTU des classes *Spirochaetes* et *Synergistia* sont présents en quantité bien moindre dans IM_{But} alors que les OTUs *Bacteroidia* sont beaucoup plus représentés. Il est toutefois difficile de commenter la fonction précise des microorganismes de ces OTUs car leurs plus proches parents ne sont pas des microorganismes cultivés

Il est difficile également d'estimer dans quelle mesure l'utilisation de systèmes batch conditionne l'évolution de la population et en particulier favorise la persistance de microorganismes non fonctionnels dans le milieu (en particulier les OTUs présents dans l'inoculum initial). Cependant, on peut tout de même conclure dans cette expérience que la structure globale des communautés bactériennes est véritablement différente d'une incubation à l'autre en fin de période de préadaptation et différente de celle de l'inoculum initial. L'objectif de former de nouveaux assemblages fonctionnels de microorganismes a donc été atteint.

2.3. Bilan de la période de préadaptation

Le suivi des données physicochimiques et l'analyse des profils ARISA montrent une évolution des microcosmes dans le temps, à la fois du point de vue métabolique et écologique. Selon le substrat

utilisé, les modifications sont plus ou moins importantes et nécessitent plus ou moins d'injections avant d'aboutir à des populations et des performances stabilisées. Les conclusions des données de séquence obtenues ainsi que des profils ARISA en fin de période de préadaptation montrent l'influence de la préadaptation sur les communautés microbiennes bactériennes mais également archées dans IM_{Pro} et IM_{But} par rapport à l'inoculum initial. Des populations microbiennes différentes de l'inoculum de départ et non identiques dans toutes les incubations ont été obtenues, en particulier pour les bactéries. Cette première phase de l'expérience a donc permis de réaliser un modelage de l'inoculum de départ pour construire de nouveaux assemblages microbiens. Ce modelage semble se réaliser de manière plutôt aléatoire pour la préadaptation avec le glucose et le cellobiose, où les réplicats divergent. Dans le cas de la préadaptation avec les AGV, le modelage semble plus déterministe pour les deux duplicats qui se comportent de la même façon. Par ailleurs, une dichotomie en deux groupes semble se dessiner. Sera-t-elle persistante durant la dégradation de la cellulose ?

3. Dégradation de la cellulose

Après la première étape de l'expérience, de la cellulose a été introduite dans les bioréacteurs préadaptés. Les évolutions physicochimiques et microbiologiques ont été analysées pour chaque bioréacteur. Les données obtenues seront présentées pour chacun des bioréacteurs, ou, par souci de simplification, par groupe pour les bioréacteurs ayant des comportements similaires (sous forme de valeur moyenne et écart type).

3.1. Données physico-chimiques

3.1.1. Productions de gaz

Deux groupes d'incubations présentent un rendement et une cinétique de production distincts. Ils seront nommés par la suite groupes A et B. Le premier groupe (groupe A, représenté en rouge) est composé de $IM_{Pro}1$, $IM_{Pro}2$, $IM_{Glu}2$ et $IM_{Cell}1$ et le second (groupe B, représenté en bleu) est composé de $IM_{But}1$, $IM_{But}2$, $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}2$. On retrouve donc pour la production de biogaz la dichotomie observée au cours de la préadaptation.

Au sein des deux groupes, les réplicats sont bons, les écarts-types sont très faibles, parfois proches de zéro. Pour le groupe A on observe une production légèrement plus importante de biogaz (55% de la cellulose convertie contre 50% pour le groupe B). Cette production est réalisée plus rapidement pour le groupe A que pour le groupe B. Dans les deux cas, environ 7 jours de latence sont observés avant qu'il n'y ait production importante de biogaz. Dans les deux cas également, le méthane et le dioxyde de carbone sont produits simultanément. Le ratio final de production de méthane est équivalent (54% pour le groupe B et 56% pour le groupe A). Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues pour des bioréacteurs témoins non-préadaptés de dégradation de la cellulose pour lesquels ce ratio est d'environ 65%. Après 40 jours d'incubation, l'essentiel du biogaz a été produit.

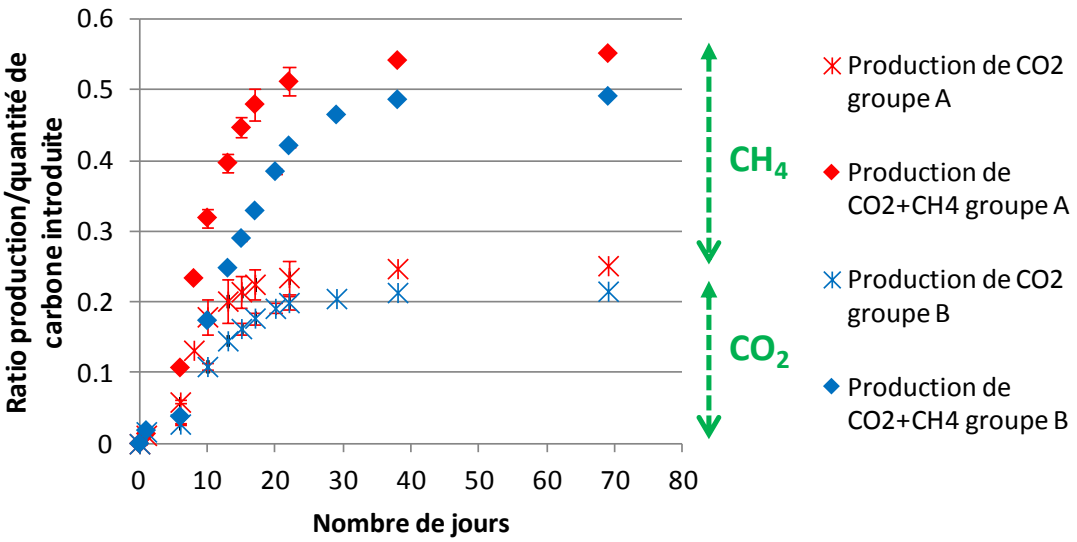


Figure 80 : Taux de conversion de la cellulose en biogaz, expérience de fonctionnalisation. Les valeurs moyennes sont calculées pour les 4 incubations de chaque groupe (groupe A en rouge : $IM_{Pro}1$, $IM_{Pro}2$, $IM_{Glu}2$ et $IM_{Cell}1$ et groupe B en bleu : $IM_{But}1$, $IM_{But}2$, $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}2$). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=4).

Les évolutions de la concentration de N_2, O_2, N_2O, NH_3, H_2S et H_2 dans le ciel gazeux des microcosmes ont également été suivies au cours du temps. Dans les différents microcosmes, la quantité de ces gaz est quasi constante (évolution de moins de 1%).

3.1.2. Carbone organique et inorganique dissous

On retrouve la dichotomie en groupes A et B, plutôt dans la dynamique d'évolution que dans le niveau des valeurs de COD et CID.

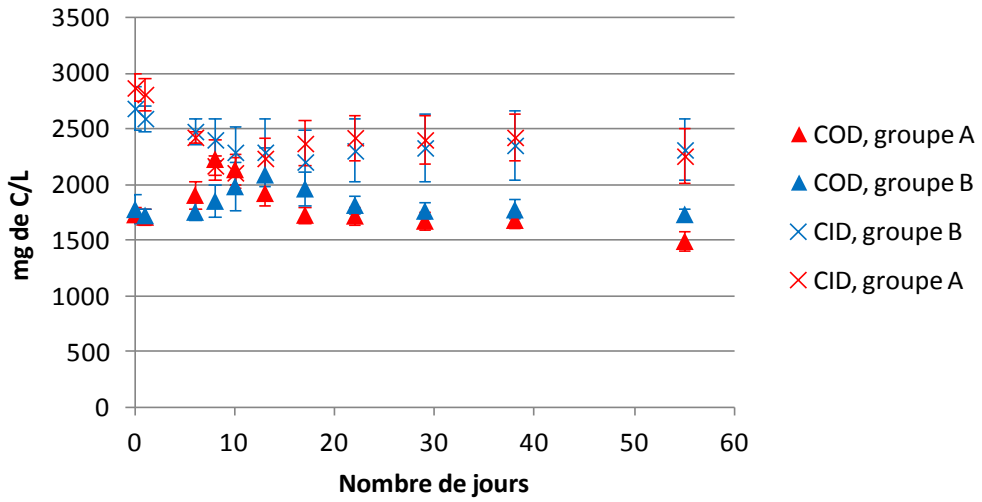


Figure 81 : Concentration en COD et CID, groupes A et B, expérience de fonctionnalisation. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=4).

Les valeurs mesurées évoluent peu au cours du temps. On observe pour le groupe A une légère augmentation du COD entre 5 et 10 jours d'incubation, suivie d'une décroissance pour retourner au niveau de départ après 15 jours d'incubation. La même évolution se produit quelques jours plus tard

pour le groupe B, mais l'augmentation est légèrement plus faible. Ceci est en accord avec la production plus précoce et plus importante de biogaz observée pour A que pour B. Les valeurs de COD et CID restent néanmoins équivalentes au début et à la fin de l'incubation, le carbone présent dans la phase liquide n'a donc pas été catabolisé de manière significative.

3.1.3. Acides gras volatils

Le principal AGV retrouvé au cours de l'expérience est l'acide acétique. Seules de faibles quantités d'acide propionique ont été détectées, les concentrations en acide butyrique étaient inférieures à la limite de détection des instruments de mesure. On peut encore une fois distinguer deux comportements pour les groupes A et B.

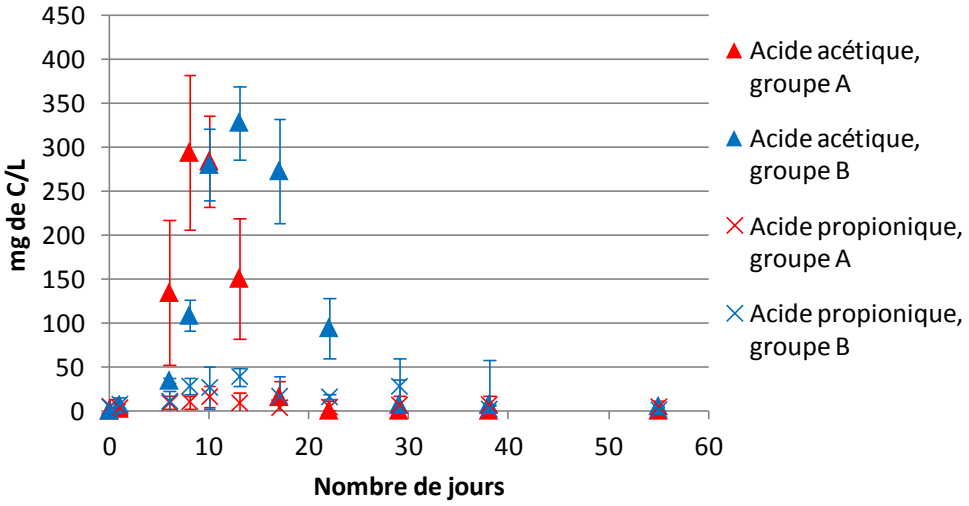


Figure 82 : Concentration en AGV, groupes A et B, expérience de fonctionnalisation. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=4).

La production et la consommation de l'acide acétique du groupe A sont plus rapides que pour le groupe B, en accord avec les valeurs de COD et de production de gaz. Par ailleurs, le pic de concentration d'acide acétique pour le groupe A est légèrement plus faible que pour le groupe B. L'épuisement de l'acide acétique correspond dans les deux cas approximativement au début du plateau de production de biogaz.

3.2. *Analyses isotopiques*

3.2.1. Biogaz

Les échantillons prélevés et envoyés pour étudier la composition isotopique du biogaz par GC-IRMS dans cette expérience ont été accidentellement détruits lors de l'analyse sans que nous puissions récupérer les valeurs. Je n'ai donc pas pu obtenir ces valeurs, ni faire analyser les échantillons de nouveau.

3.2.2. Acides gras volatils

Les analyses isotopiques révèlent la présence d'acide acétique et d'acide propionique marqués. Suite à la dichotomie en deux groupes observée pour les concentrations en AGV, j'ai choisi de présenter les valeurs moyennes obtenues pour le groupe A ($IM_{Pro}1$ et $IM_{Cell}1$) et le groupe B ($IM_{But}1$ et $IM_{Glu}1$).

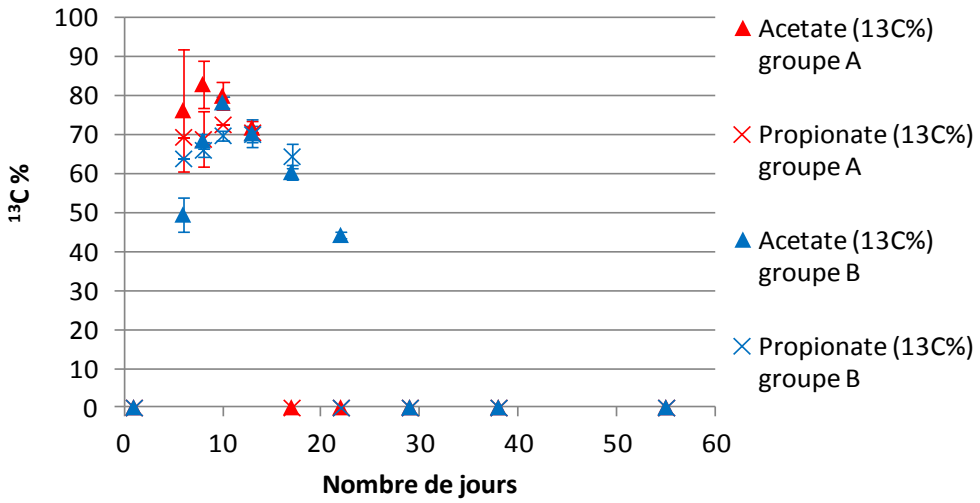


Figure 83 : Enrichissement isotopique des AGV pendant la dégradation de la cellulose, expérience de fonctionnalisation.
Valeur moyenne pour les incubations avec cellulose enrichie du groupe A ($IM_{Pro}1$ et $IM_{Cell}1$) et du groupe B ($IM_{But}1$ et $IM_{Glu}1$). Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=2).

Les AGV sont très enrichis dès le départ, signe que la cellulose est bien à l'origine de leur production. Notons que la valeur maximale d'enrichissement observée n'est pas de 100%, cependant, ces valeurs sont équivalentes voire supérieures à celles obtenues pour des expériences similaires de dégradation de la cellulose mais sans fonctionnalisation préalable de la biomasse (pour lesquelles on obtient des valeurs de l'ordre de 70% pour l'acide acétique et 65% pour l'acide propionique). La différence vient probablement du fait que dans les expériences présentées dans ce chapitre, les sources de carbone exogène non enrichi ont déjà été consommées au cours de la phase 1. L'acide acétique non enrichi est donc en partie produit par homoacétogenèse et l'acide propionique par conversion de l'acide acétique. On note qu'il n'y a pas de différence significative d'enrichissement des AGV entre les groupes A et B. On remarque cependant que pour le groupe A, les AGV sont enrichis plus fortement plus tôt, et que la valeur d'enrichissement redevient nulle plus tôt, ce qui confirme que la dégradation est plus rapide dans ce cas.

3.3. Analyses microbiologiques

3.3.1. Détermination des populations fonctionnelles

Afin d'obtenir des informations sur les microorganismes fonctionnels au cours de la phase 2, j'ai réalisé des ultracentrifugations d'ADN sur gradient de densité afin d'isoler l'ADN des microorganismes intervenant dans la dégradation de la cellulose. Ces ultracentrifugations ont été réalisées pour les quatre incubations $IM_{Pro}1$, $IM_{But}1$, $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}1$, qui contenaient du ^{13}C.

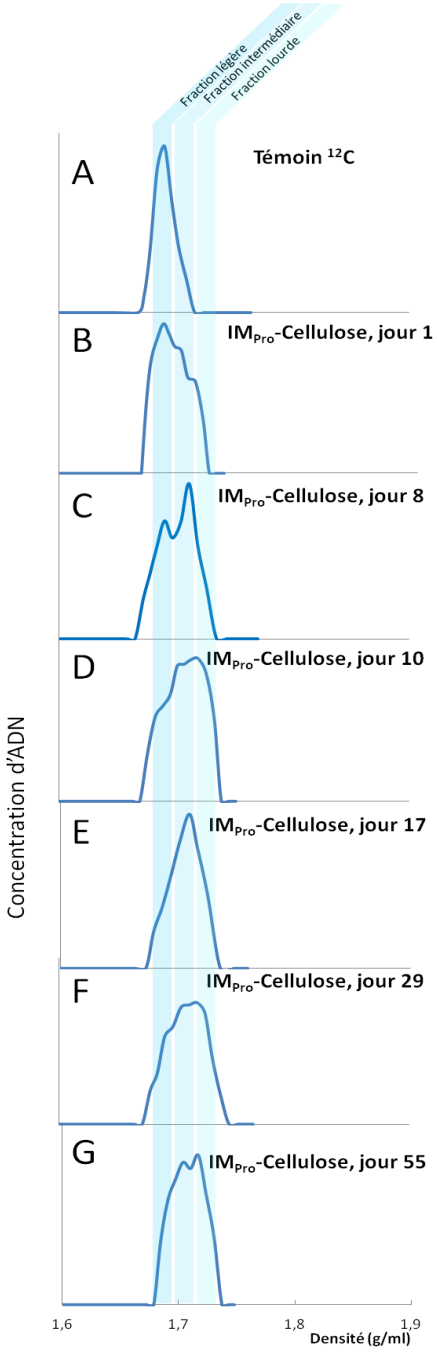


Figure 84 : Profils de densité de l'ADN issu de IM_{Pro} après ultracentrifugation.

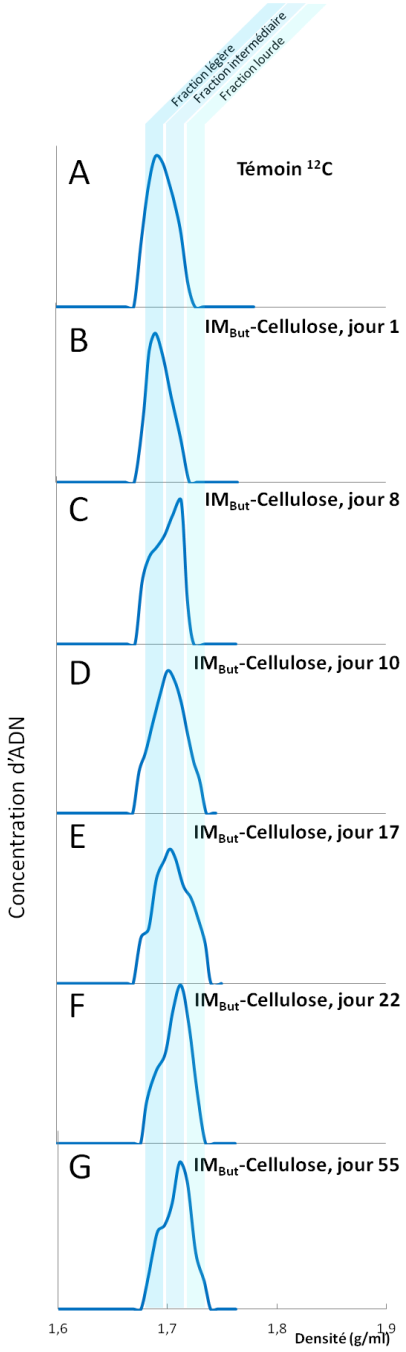


Figure 85 : Profils de densité de l'ADN issu de IM_{But} après ultracentrifugation.

Les ADN des échantillons contrôles des incubations avec substrat non enrichi présentent une distribution de densité allant de 1,68 à 1,71 g/ml (Figure 84 A, Figure 85 A, Figure 86 A et Figure 87 A). Les ADN des incubations avec substrat enrichi montrent, par comparaison avec les témoins non enrichis, un pic de densité plus élevée au cours du temps. Après l'ultracentrifugation, ce pic a été recueilli en trois fractions différentes, appelées L-DNA, M-DNA, H-DNA, pour respectivement fraction légère (Light-DNA), fraction intermédiaire (Medium-DNA) et fraction lourde (Heavy-DNA). Elles correspondent à une densité moyenne respective de 1,69 – 1,71 – 1,73 g/ml. La Figure 84 B-C-D-

E-F-G présente les profils obtenus aux jours 1, 8, 10, 17, 29, 55 pour $IM_{Pro}1$. On observe une augmentation de la proportion de la fraction lourde (H-DNA) du jour 1 au jour 55. Ce résultat suggère une assimilation progressive du carbone marqué par la biomasse microbienne. Les mêmes conclusions peuvent être tirées pour $IM_{But}1$, $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}1$ (Figure 85, Figure 86 et Figure 87).

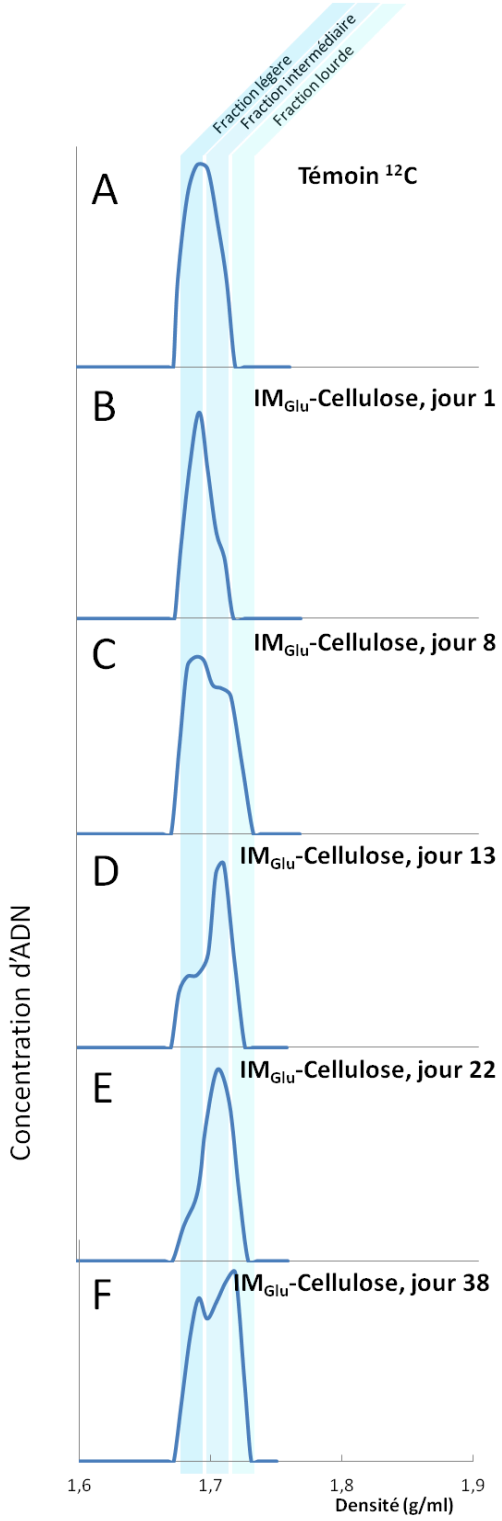


Figure 86 : Profils de densité de l'ADN issu de IM_{Glu} après ultracentrifugation.

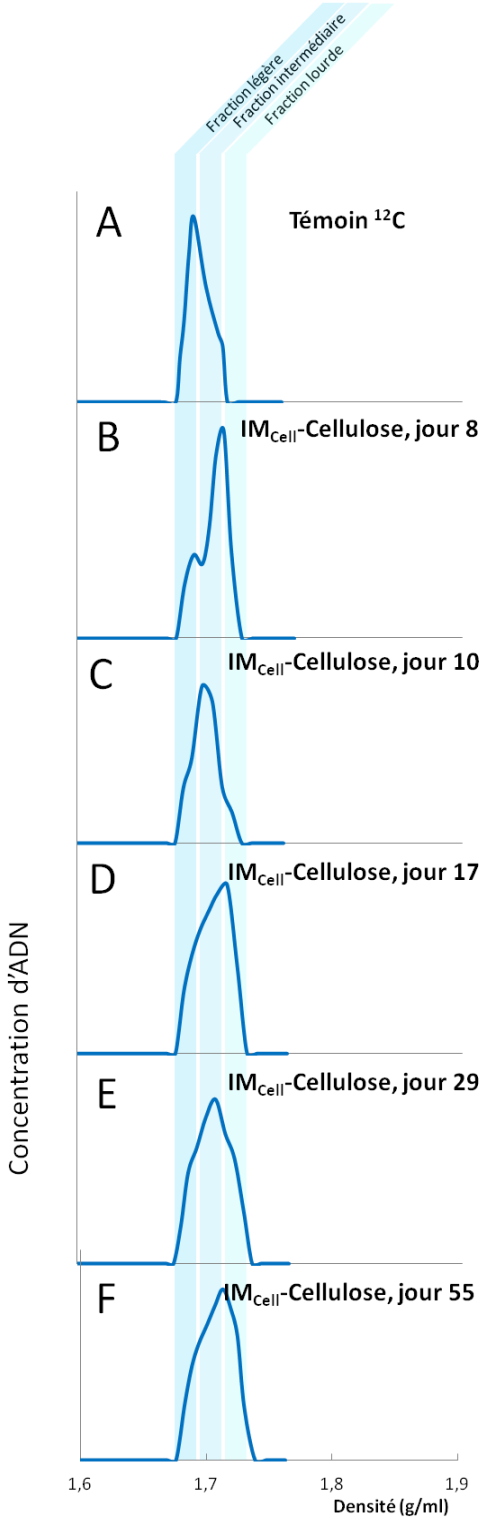


Figure 87 : Profils de densité de l'ADN issu de IM_{Cell} après ultracentrifugation.

3.3.2. Observation des profils ARISA de la diversité totale et de la diversité fonctionnelle

3.3.2.1. Diversité totale

Suite à la dichotomie des incubations observée au regard des données physico-chimiques, j'ai comparé les profils ARISA des incubations de chaque groupe entre eux. La dichotomie est toujours présente. Du fait de la très grande ressemblance des profils au sein de chaque groupe, j'ai donc choisi de ne présenter dans cette partie qu'une seule évolution de profils représentative. Les données issues de chacune des incubations seront traitées globalement (*cf.* 3.3.3).

- Archées

Les profils ARISA archées obtenus au cours du temps pour les groupes A et B sont présentés dans les Figure 88 et Figure 89.

Pour les profils archées du groupe A, on constate une diversification des profils au cours du temps, à mesure que le biogaz est produit. Une bande vers 390 pb se développe tout au long de l'incubation. Plus particulièrement, à partir du jour 10 une bande vers 450 devient de plus en plus intense jusqu'au jour 22, c'est-à-dire à la fin de la production de biogaz.

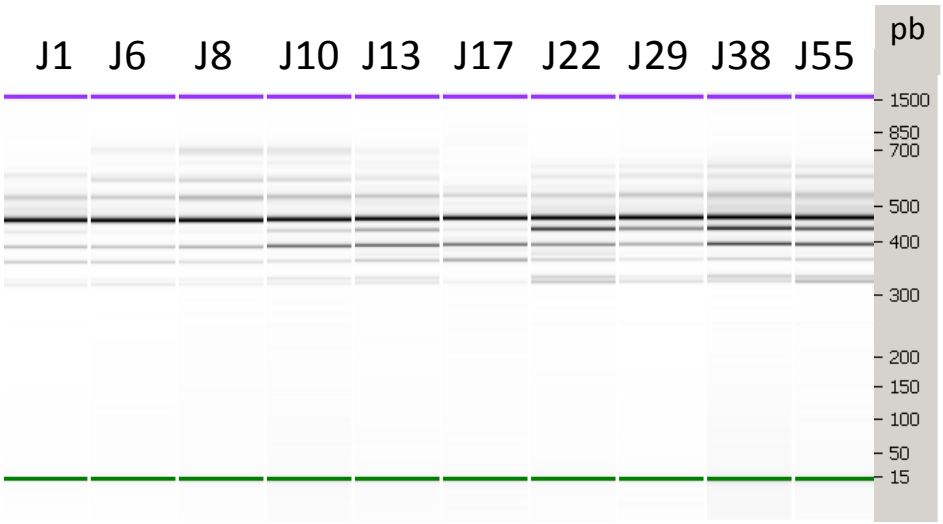


Figure 88 : Evolution des profils ARISA archées au cours du temps pour le groupe A, expérience de fonctionnalisation.

Les observations sont très voisines pour le groupe B, les bandes observées sont assez similaires à celles du groupe A. Cependant, on peut remarquer que si la bande à 450 pb devient également de plus en plus intense au cours du temps, elle n'apparaît vraiment qu'à partir du jour 13, en cohérence avec le fait que la production de biogaz est plus tardive pour ce groupe que pour le groupe A. On peut également remarquer des différences d'intensité dans les bandes par rapport au groupe A, notamment pour la bande vers 390 pb et une autre à 350 pb. Enfin, une bande présente vers 560 pb pour le groupe A n'est pas présente dans les profils du groupe B.

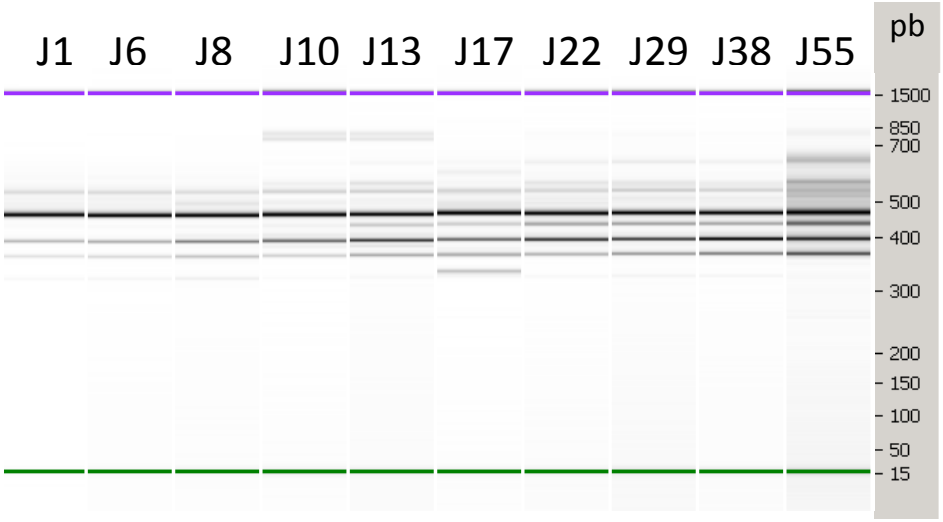


Figure 89 : Evolution des profils ARISA archées au cours du temps pour le groupe B, expérience de fonctionnalisation.

- Bactéries

Les profils ARISA bactéries obtenus au cours du temps pour les groupes A et B sont présentés dans les Figure 90 et Figure 91.

Pour le groupe A, on observe des changements importants à partir du jour 8. Les profils sont alors assez stables jusqu'au jour 17. Ensuite certaines bandes s'intensifient, et les profils se maintiennent jusqu'au jour 29. Enfin la diversité évolue de nouveau légèrement sur les deux derniers points. Ces observations qualitatives sont cohérentes avec les données physicochimiques : les jours 1 à 6 voient les premières étapes de la dégradation de la cellulose se réaliser, puis les jours 8 à 17 correspondent à l'accumulation et consommation de l'acide acétique. La production de biogaz diminue ensuite, pour être quasi nulle après le jour 29.

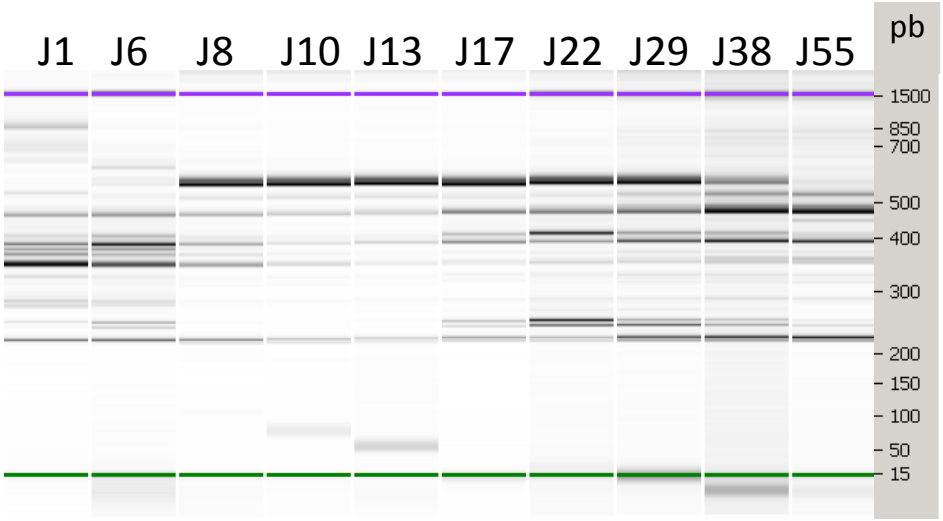


Figure 90 : Evolution des profils ARISA bactéries au cours du temps pour le groupe A, expérience de fonctionnalisation.

Pour le groupe B, on constate que les deux premiers profils sont équivalents (jour 1 et 6), comme c'était le cas pour le groupe A. Néanmoins, le profil du jour 8 a encore beaucoup de points communs avec les deux premiers. Les profils restent alors assez stables plus longtemps, jusqu'au jour 22 environ. Ceci est en accord avec l'accumulation et la consommation d'acide acétique qui sont plus tardives et longues pour le groupe B que pour le groupe A. Les profils évoluent donc également plus lentement. A partir du jour 29, on observe à nouveau des modifications de profils, la production de gaz est terminée, il y a sans doute des processus réactionnels autres que la dégradation de la cellulose qui se mettent en place.

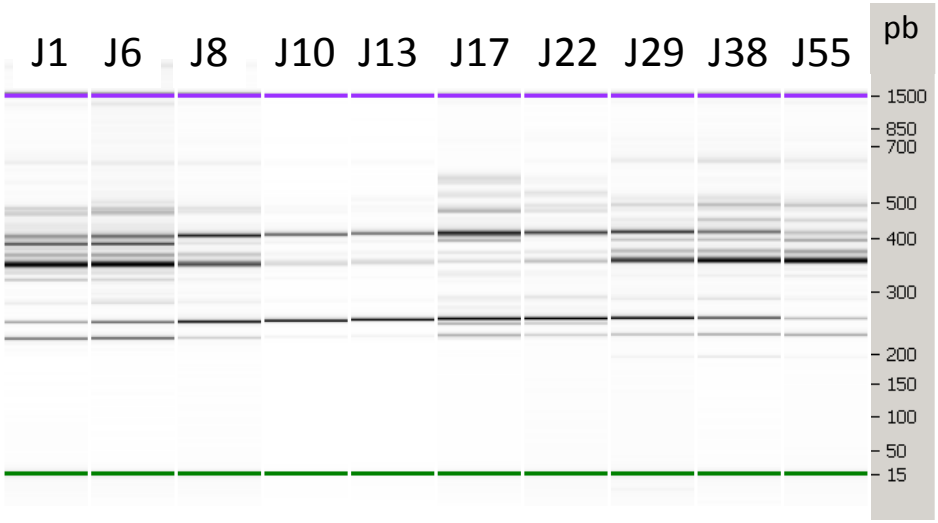


Figure 91 : Evolution des profils ARISA bactéries au cours du temps pour le groupe B, expérience de fonctionnalisation.

Par ailleurs, la comparaison détaillée des bandes ARISA entre les profils des deux groupes montre quelques bandes communes dans les deux groupes d'incubation, en particulier aux jours 1 et 6 mais une grande partie de ces bandes est spécifique de chaque groupe, comme le montrera une analyse statistique plus détaillée, présentée dans les paragraphes suivants. La fonctionnalisation a abouti à des profils de diversité totale différents pour les bactéries des groupes A et B.

3.3.2.2. Diversité fonctionnelle

Après ultracentrifugation de l'ADN, des profils ARISA ont été réalisés à partir de la fraction lourde de l'ADN, pour observer les profils de diversité fonctionnelle.

- Archées

La figure suivante (Figure 92) présente l'évolution de la fraction fonctionnelle archées au cours du temps pour le groupe A. Les cadres de couleur signalent les dates pour lesquelles les profils fonctionnels des deux incubations réplicats ($IM_{Pro}1$ et $IM_{Cell}1$) réalisées avec de la cellulose marquée sont disponibles.

On peut tout d'abord comparer les paires de profils obtenus aux mêmes dates pour les incubations $IM_{Pro}1$ et $IM_{Cell}1$. Ces profils sont assez proches tout au long de l'incubation. Ils présentent quelques différences d'intensité aux jours 8 et 10, principalement une bande à 560 pb qui est plus intense pour $IM_{Cell}1$. Ces différences s'amenuisent à mesure que la dégradation de la cellulose progresse, et les profils

obtenus aux jours 17, 29 et 55 sont très proches. Les différences d'intensité peuvent s'expliquer par une différence de l'importance relative des microorganismes dans chaque incubation, ou par des biais expérimentaux liés à l'extraction d'ADN, à la séparation de l'ADN au cours de l'ultracentrifugation ou encore à la PCR. Cependant, ces différences sont faibles, et on peut conclure que les fractions fonctionnelles archées sont semblables dans les deux incubations.

Par ailleurs, au cours du temps des modifications sont également visibles dans la diversité fonctionnelle du groupe : apparition de bandes vers 560 pb et 680 pb aux jours 8 et 10, puis inférieures à 400 pb après le jour 17. Les dynamiques temporelles d'évolution de la diversité fonctionnelle des archées sont donc elles aussi semblables dans $IM_{Pro}1$ et $IM_{Cell}1$.

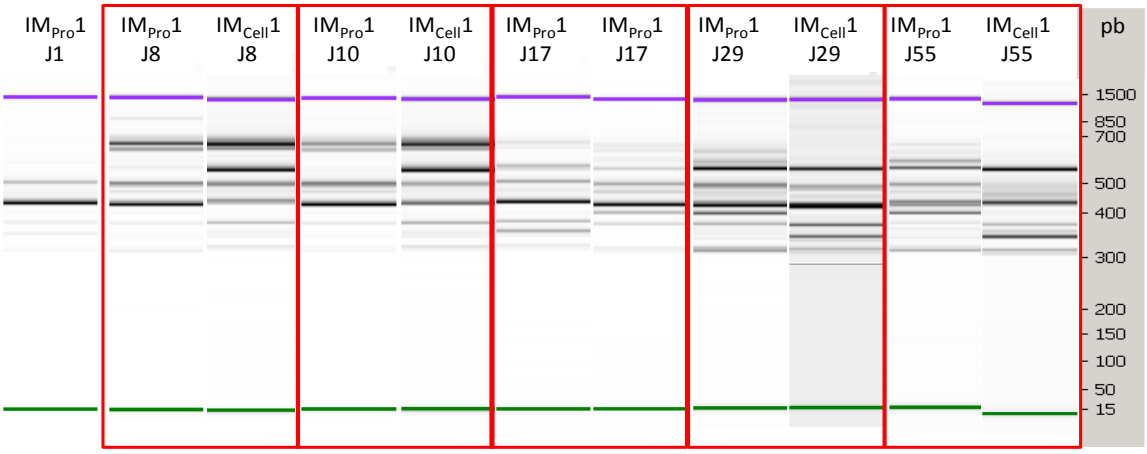


Figure 92 : Evolution de la diversité fonctionnelle des archées, groupe A, expérience de fonctionnalisation. Les cadres rouges signalent des profils réalisés aux mêmes dates pour des incubations différentes.

La Figure 93 présente les résultats obtenus pour le groupe B. Dans ce cas, les profils obtenus pour $IM_{But}1$ et $IM_{Glu}1$ aux jours 1, 8 et 22 sont équivalents. La diversité fonctionnelle est donc la même dans les deux incubations de ce groupe.

Les principales modifications observées au cours du temps pour le groupe sont l'apparition de bandes vers 520 et 710 pb à partir du jour 8 et inférieures à 400 pb par la suite.

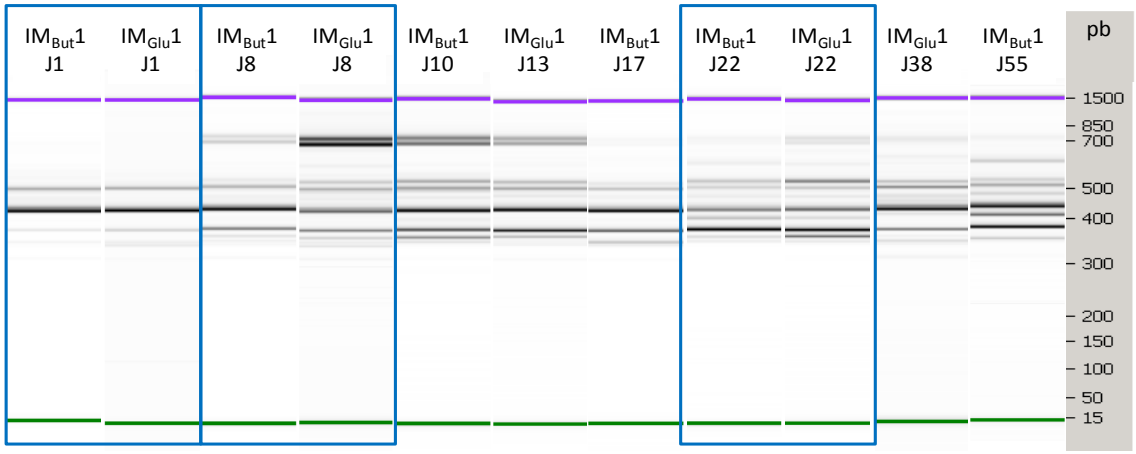


Figure 93 : Evolution de la diversité fonctionnelle des archées, groupe B, expérience de fonctionnalisation. Les cadres bleus signalent des profils réalisés aux mêmes dates pour des incubations différentes.

La comparaison avec les profils fonctionnels entre groupe A et groupe B montre quelques différences comme par exemple une bande à 560 pb et 680 pb et quelques bandes inférieures à 350 pour le groupe A, ou encore une double bande vers 510-520 pb, une double bande vers 710-730 pb présentes pour le groupe B mais pas pour le groupe A. En particulier les bandes vers 560 pb et 680 pb pour le groupe A pourraient correspondre aux archées du genre *Methanosaeta* retrouvées lors du séquençage (*cf.* 3.3.4.2.) (l'ARISA réalisée dans les mêmes conditions sur une souche pure de *Methanosaeta concilii* présente des bandes à 520, 560 et 676 pb).

On peut noter que certaines des bandes observées dans la fraction fonctionnelle étaient peu visibles dans les profils de diversité totale. Elles ont été mises en valeur grâce à leur isolement dans la fraction enrichies de l'ADN après ultracentrifugation. De même, on pouvait observer dans la diversité totale le développement de l'intensité de certaines bandes au cours du temps, qui sont au contraire présentes dès le départ dans la diversité fonctionnelle (450 pb pour les groupes A et B notamment). Il s'agit sans doute d'une espèce présente de manière quantitative par rapport aux autres espèces fonctionnelles, et qui prend de l'importance au sein de la population totale.

- Bactéries

Les mêmes comparaisons ont été réalisées à partir de la fraction fonctionnelle obtenue pour les bactéries. La Figure 94 présente les résultats obtenus pour le groupe A. Comme cela a été observé pour les profils archées, les profils obtenus aux mêmes jours pour $IM_{Pro}1$ et $IM_{Cell}1$ sont qualitativement identiques, ils contiennent les mêmes bandes, mais celles-ci sont parfois présentes à des intensités légèrement différentes, pour les mêmes raisons que celles évoquées plus haut. Au cours du temps on n'observe pas de modification brutale des profils, l'évolution se fait en douceur, certaines bandes prenant plus ou moins d'importance.

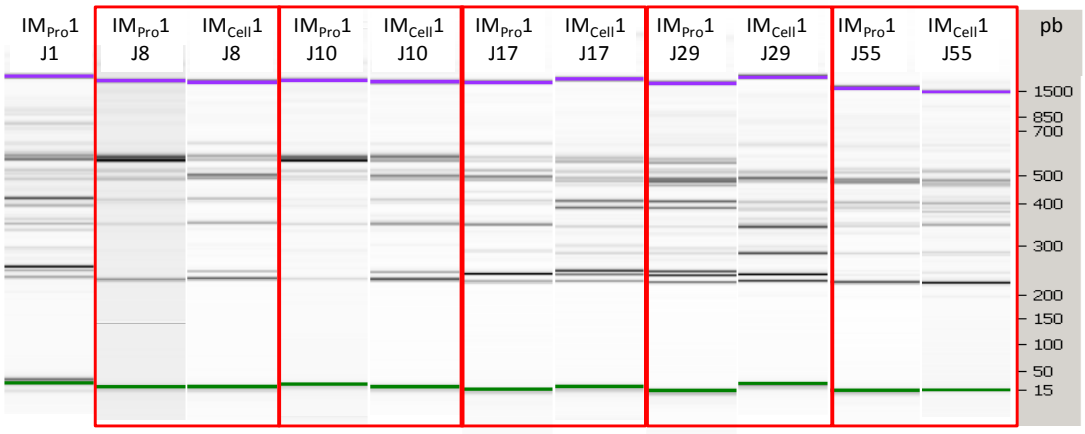


Figure 94 : Evolution de la diversité fonctionnelle des bactéries, groupe A, expérience de fonctionnalisation. Les cadres rouges signalent les dates pour lesquelles les profils de deux incubations distinctes sont disponibles.

Pour le groupe B (Figure 95), la comparaison entre les profils de $IM_{But}1$ et $IM_{Glu}1$ réalisés aux mêmes jours montrent des profils très proches (mis à part une bande vers 250 pb pour $IM_{But}1$). Dans ce cas également on peut conclure comme pour le groupe A que la fraction fonctionnelle bactérie est quasi

similaire pour les différentes incubations du groupe. On n'observe pas non plus de modification brutale de la diversité au cours du temps, celle-ci se fait de manière continue.

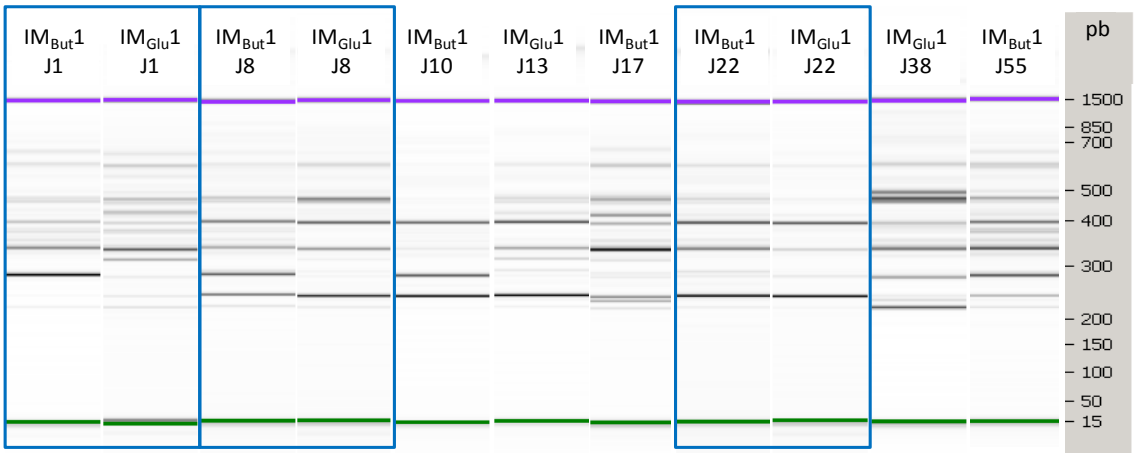


Figure 95 : Evolution de la diversité fonctionnelle des bactéries, groupe B, expérience de fonctionnalisation. Les cadres bleus signalent les dates pour lesquelles les profils fonctionnelles de deux incubations du groupe sont disponibles.

Sans les détailler, la diversité étant trop grande pour tenter de relier la longueur des bandes à l'identité des microorganismes, on peut noter que des différences très importantes sont observées dans les profils fonctionnels des deux groupes d'incubations. Les fractions fonctionnelles bactériennes sont donc différentes pour les deux groupes.

3.3.2.3. Bilan

Les profils ARISA de diversité totale donnent un aperçu général de l'évolution des populations et des points communs entre les différents groupes. L'analyse des profils ARISA de la fraction fonctionnelle de l'ADN obtenue après ultracentrifugation permet d'aller plus loin et d'observer précisément les microorganismes impliqués dans la dégradation de la cellulose. Ainsi, on peut conclure des observations de ces profils qu'au sein d'un même groupe, les différentes incubations montrent une diversité fonctionnelle proche. Entre les groupes, comme pour la diversité totale, des différences sont observées. Peu nombreuses chez les archées, elles sont beaucoup plus importantes pour les bactéries, mais difficilement quantifiables. En effet, les observations réalisées sur les profils ARISA sont uniquement qualitatives et pas entièrement satisfaisantes, l'appréciation des similarités et dissimilarités étant seulement visuelle. La difficulté est d'autant plus importante que le grand nombre de profils réalisés ne permet pas d'en comparer et d'en ordonner l'ensemble directement. J'ai donc fait appel au logiciel StatFingerprints (*276*) pour mieux comprendre et analyser les données obtenues.

3.3.3. Interprétation statistique des données ARISA

Afin de comparer l'ensemble des profils entre eux indépendamment de l'observation, j'ai réalisé une ACP pour les archées (Figure 96) et construit des dendrogrammes pour les bactéries (Figure 97) à partir de tous les profils ARISA réalisés au cours de ces expériences. L'objectif était de vérifier l'homogénéité des comportements des incubations des groupes A et B pour la **population totale**, de voir la dynamique d'évolution des profils au cours du temps et d'observer les différences entre les deux

groupes. Le choix d'une représentation sous forme d'une ACP pour les archées et d'un dendrogramme pour les bactéries a été fait car ils permettaient de visualiser au mieux l'évolution de la diversité totale dans chaque cas.

3.3.3.1. Archées

Dans cette ACP, chaque microcosme est représenté par un pictogramme. Les pictogrammes du groupe A sont représentés en rouge, et ceux du groupe B sont représentés en bleu. Afin de simplifier le schéma, le nom et la date des prélèvements n'ont pas été figurés. Cependant, on remarque une influence importante de la durée d'incubation sur la position des profils dans le diagramme pour les deux groupes. Afin de visualiser les tendances d'évolution des profils archées au cours du temps, j'ai utilisé des flèches de couleurs (rouge pour le groupe A, bleu pour le groupe B) qui montrent l'évolution de la position des profils de diversité totale à mesure qu'on avance dans le temps et dans la dégradation de la cellulose.

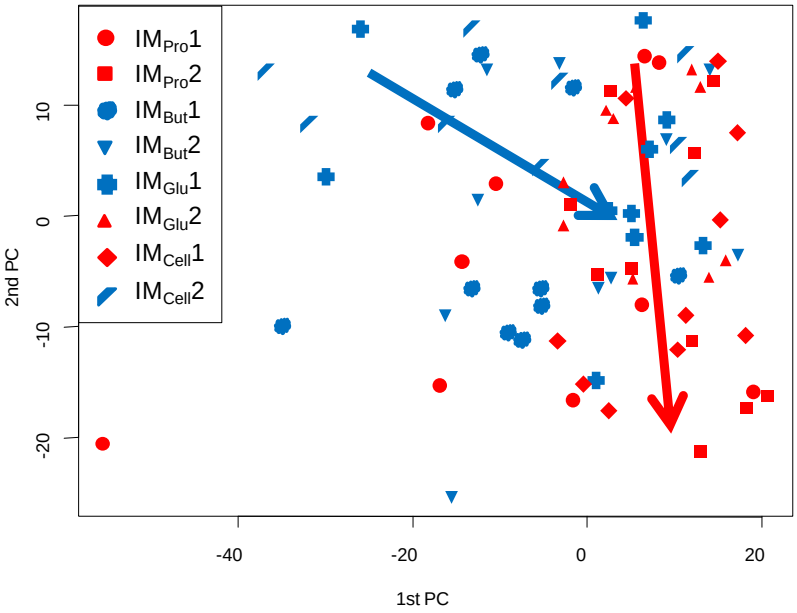


Figure 96 : Analyse en composantes principales des profils ARISA des archées de la phase 2, expérience de fonctionnalisation.
Les flèches marquent l'évolution des profils dans le temps pour le groupe A (rouge) et le groupe B (bleu). L'axe 1 représente 53% de la diversité, l'axe 2 16%.

On observe pour les deux groupes que les profils sont situés au départ dans la partie supérieure du cadre, puis évoluent vers le coin inférieur droit pour le groupe A et pour le milieu droit pour le groupe B. L'évolution se fait différemment et aboutit à un résultat différent pour les deux groupes. Au cours du temps, les différents profils des deux groupes passent tout de même par des zones communes, même si l'état final est différent, ce qui confirme qualitativement les observations réalisées avec l'observation des profils ARISA.

3.3.3.2. Bactéries

Dans le cas des bactéries, j'ai préféré une représentation sous forme d'un dendrogramme. Il a été construit avec l'algorithme de Ward et des distances entre profils calculées par la méthode euclidienne

(choix d'après les articles d'Hartmann (*285*) et de Tlili (*284*)). Des zones remarquables ont été entourées et colorées.

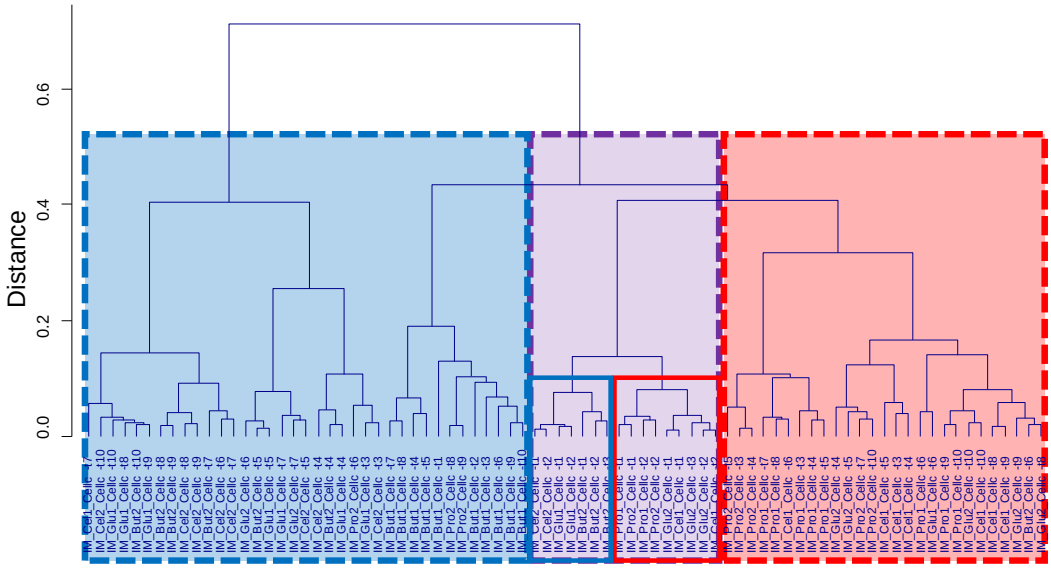


Figure 97 : Dendrogramme de proximité des profils ARISA des bactéries, phase 2, expérience de fonctionnalisation.
Le dendrogramme est construit en utilisant l'algorithme de Ward et les distances euclidiennes entre profils. Le cadre mauve contient les profils issus des premiers prélèvements réalisés pour le groupe A (rouge) et le groupe B (bleu). Les cadres rouges et bleus contiennent les profils des prélèvements suivants, pour respectivement le groupe A et le groupe B.

Sur ce dendrogramme, on peut tout d'abord distinguer en mauve au milieu les profils qui correspondent au début des incubations d'une manière générale. Parmi ce groupe, deux sous-groupes distincts peuvent être observés. Il s'agit des profils du groupe A (entourés en trait rouge plein) et des profils du groupe B (entourés en trait bleu plein). Par ailleurs, deux autres grands groupes distincts sont identifiés. A gauche, en bleu les autres profils du groupe B, et à droite, en rouge les autres profils du groupe A. Les profils correspondant au groupe A sont regroupés sur une même branche, à droite du dendrogramme. Les profils du groupe B sont un peu plus différenciés, et regroupés sur deux branches, qui sont malgré tout proches entre elles.

On remarque donc ici que la diversité bactérienne totale des groupes A et B forme des groupes distincts, d'autant plus distincts que la dégradation de la cellulose est avancée. Par ailleurs les profils des différentes incubations d'un même groupe sont bien regroupés, en accord avec la similarité des mesures physico-chimiques pour les deux groupes.

Pour les points correspondant au début de la dégradation, il semble qu'il y ait une plus grande similarité entre les profils de diversité totale des deux groupes. C'est ce qui avait été observé en comparant les profils bactéries de diversité totale aux jours 1 et 6. On peut imaginer que ces points communs sont dus à l'apparition de groupes fonctionnels responsables notamment de l'hydrolyse de la cellulose et qui n'avaient pas été activés au cours de la phase de préadaptation. Par ailleurs tous les groupes fonctionnels ne sont pas encore activés ou visibles dans les profils ARISA, d'où les points communs plus importants que dans la suite de la dégradation.

La phase 1 de l'expérience a donc bien modelé les populations menant à des profils de diversité bactérienne différents après l'apport d'un même substrat, la cellulose.

3.3.4. Séquençage de l'ADN

L'ADN lourd de deux échantillons a été séquencé après ultracentrifugation. Nous avons choisi un échantillon du groupe A et un échantillon du groupe B. Il s'agit de IM_{Pro}1-Cellulose après 17 jours d'incubation et IM_{But}1-Cellulose après 17 jours d'incubation également. Ces deux dates correspondent à une dégradation importante de la cellulose (environ la moitié du biogaz a été produite) mais avant que trop de cross-feeding n'ait eu lieu. La diversité microbienne mesurée est représentée graphiquement par genre et OTUs pour les archées (Figure 98) et par classes et OTUs pour les bactéries (Figure 99). Il n'était pas possible de séquencer plus de points, cependant la comparaison des profils ARISA de diversité fonctionnelle montre que les populations actives sont les mêmes dans les différentes incubations du groupe A ou du groupe B. On peut donc considérer que les incubations analysées sont représentatives du groupe.

3.3.4.1. Archées

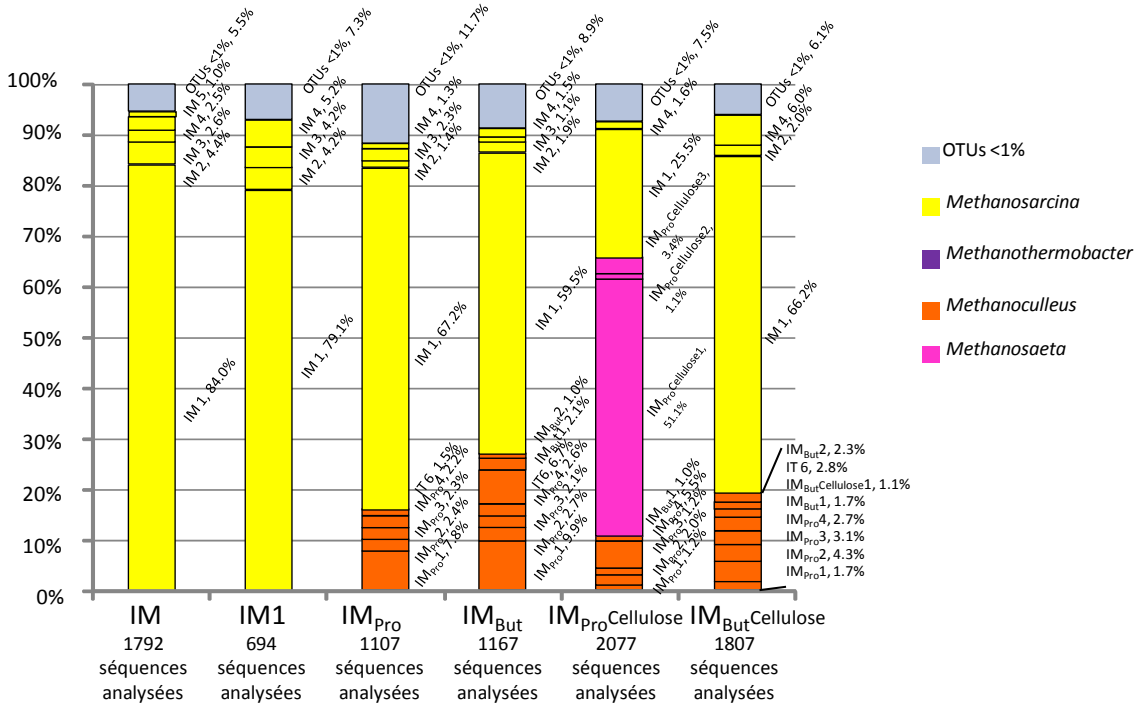


Figure 98 : Composition de la diversité des archées des échantillons de l'expérience de fonctionnalisation.

La communauté des archées retrouvée dans la fraction lourde de IM_{Pro}1-Cellulose après 17 jours d'incubation (2077 séquences analysées) est composée essentiellement de microorganismes des genres *Methanosaeta* (56%, 3 OTUs), *Methanosarcina* (29%, 2 OTUs) et *Methanoculleus* (14%, 4 OTUs). Au total, 9 OTUs ont été dénombrés. Ils étaient présents en fin de période de préadaptation, sauf les OTUs du genre *Methanosaeta*. Deux d'entre eux étaient toutefois détectés à moins de 1% dans IM_{Pro} en fin de préadaptation. La communauté est donc très différente de celle de la fin de préadaptation.

La communauté retrouvée dans la fraction lourde de IM_{But}1-Cellulose est différente (1807 séquences analysées). Les archées majoritaires appartiennent aux groupes *Methanosarcina* (77%, 3OTUs) et *Methanoculleus* (21%, 8 OTUs). Au total, 11 OTUs différents sont identifiés. Ces OTUs étaient tous présents en fin de préadaptation dans IM_{But} (une OTUs de *Methanoculleus* était cependant présente à moins de 1%). La population n'a donc pas été modifiée de façon importante comme c'est le cas pour IM_{Pro}-Cellulose.

Par ailleurs, 6 OTUs (2 du genre *Methanosarcina*, 4 du genre *Methanoculleus)* sont communs entre les fractions lourdes de IM_{Pro}1-Cellulose et IM_{But}1-Cellulose, soit 84% des séquences de IM_{But}1-Cellulose et 37% des séquences de IM_{Pro}1-Cellulose. Une des principales différences vient des séquences du genre *Methanosaeta* qui ne sont retrouvées que pour IM_{Pro}1-Cellulose. A titre de comparaison, les données de séquence de la fraction lourde d'un microcosme dégradant la cellulose mais sans préadaptation de l'inoculum révèlent la présence de microorganismes du genre *Methanosarcina* uniquement (4 OTUs), soit 77% de séquences communes entre IM_{But}1-Cellulose et cette expérience, contre seulement 27% pour IM_{Pro}1-Cellulose.

Les populations archées sont donc très différentes entre les deux groupes (A et B) suite à la préadaptation. Pour le groupe B, l'allure de la population correspond à celle qui avait été identifiée en fin de la phase 1c. Au contraire, pour le groupe A, des différences considérables sont observées par rapport à la communauté de la fin de la période de préadaptation. L'arrivée d'archées du genre *Methanosaeta* est la différence la plus importante. Elles ne sont pas détectées dans le groupe B en fin de préadaptation ou pendant la dégradation de la cellulose, ni dans une situation sans préadaptation. Cette observation est surprenante. Différentes références de la littérature montrent que la compétition entre *Methanosaeta* et *Methanosarcina* pour la méthanogenèse acétoclaste est favorable à la première lorsque les concentrations d'AGV, en particulier d'acide acétique sont faibles et que les digesteurs sont en fonctionnement modéré. Dans les cas contraires, *Methanosarcina* est favorisé (*306, 323-324*). Dans notre cas, les différences de concentration en AGV ne sont pas flagrantes. Ces derniers sont toutefois métabolisés plus rapidement et s'accumulent moins longtemps dans le milieu pour le groupe A.

3.3.4.2. Bactéries

La communauté bactérienne de la fraction lourde de IM_{Pro}1-Cellulose après 17 jours de dégradation est très diverse (16460 séquences analysées). Elle est composée de bactéries des classes *Clostridia* (35%, 6 OTUs principaux), *Bacteroidia* (15%, 4 OTUs principaux), *Synergistia* (13%, 4 OTUs principaux), *Spirochaetes* (5,1%, 1 OTU principal), *Anaerolineae* (4,5%, 2 OTUs principaux), *Thermotogae* (3,5%, 1 OTUs principaux) et également des phylums *Armatimonadetes* (1 OTU) et *Bacteroidetes* (non résolu au niveau de la classe, 2 OTUs) à des plus faibles pourcentages. 7,7% des séquences n'ont pas pu être identifiées (2 OTUs). 23 OTUs représentent plus de 1% de l'ensemble des séquences, et regroupent au total 70% de la diversité séquencée. Certains sont communs avec ceux identifiés lors du séquençage de IM_{Pro} en fin de préadaptation (*Bacteroidia, Spirochaetes* par exemple) et d'autres non, notamment appartenant aux classes *Clostridia*. Il s'agit sans doute de microorganismes actifs lors de l'hydrolyse de la cellulose (*325*). Ces groupes fonctionnels n'avaient pas été activés lors de la préadaptation avec l'acide propionique, et étaient donc minoritaires dans IM_{Pro}. On retrouve au total 6 OTUs (soit 19% des

séquences de IM_{Pro}-Cellulose) dans la biomasse de fin de préadaptation, et seulement 2 OTUs issus de l'inoculum du début de l'expérience (11% des séquences).

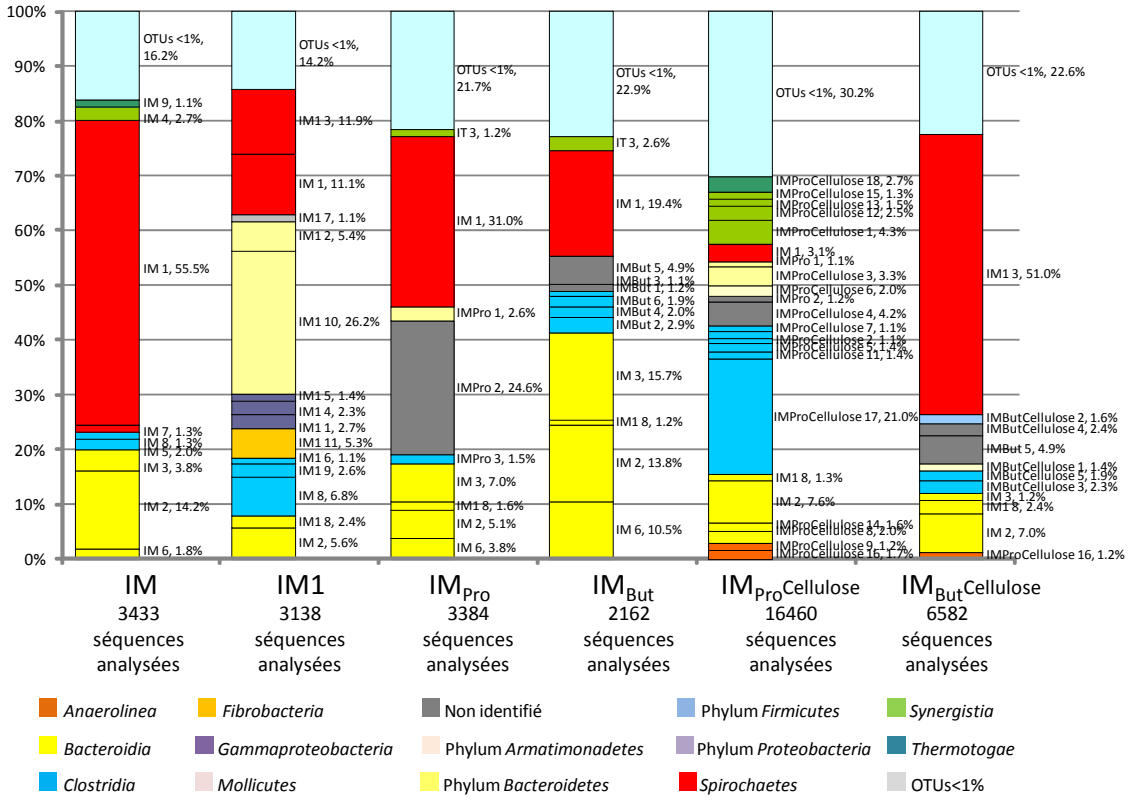


Figure 99 : Composition de la diversité des bactéries des échantillons de l'expérience de fonctionnalisation.

La population bactérienne de la fraction lourde de IM_{But}1-Cellulose après 17 jours de dégradation est quant à elle composée d'une diversité moins importante (5382 séquences analysées) : classes *Spirochaetes* (56%, 1 OTU principal), *Bacteroidia* (13%, 3 OTUs principaux), *Clostridia* (11%, 2 OTUs principaux), et également *Anaerolineae* (1 OTU principal), *Mollicutes* (1 OTU principal) et phylum Firmicutes (1 OTU principal) à des plus faibles pourcentages. 8,7% des séquences n'ont pas pu être identifiées (2 OTUs). 11 OTUs principaux regroupent 77% du nombre total de séquences. 6 de ces OTUs sont communs avec la biomasse de fin de préadaptation, ce qui représente 67% des séquences. La biomasse est donc beaucoup plus conservée dans ce cas que ce qui était observé pour le groupe A, comme pour les archées. Par ailleurs 3 des OTUs étaient déjà présents dans l'inoculum initial, mais constituent seulement 9% du total des séquences de l'échantillon.

Les seuls points communs entre la fraction lourde de ces deux incubations sont des membres des classes *Bacteroidia* et *Anaerolineae*, soit 14% de séquences communes pour IM_{Pro}-Cellulose et 12% pour IM_{But}-Cellulose. Ce chiffre est très faible, pourtant, les groupes fonctionnels des microorganismes intervenant notamment dans l'hydrolyse de la cellulose et dans les premières étapes de la dégradation n'avaient pas été activés lors de la préadaptation. Des microorganismes similaires auraient donc pu se développer dans les deux groupes pour réaliser ces fonctions, mais **il semble que l'étape de préadaptation n'ait pas seulement eu une influence importante sur les étapes de la fin de la**

dégradation mais sur l'ensemble des chaînes métaboliques de la digestion, y compris les premières étapes de l'hydrolyse de la cellulose.

Enfin, on peut noter que si on compare les OTUs retrouvés lors de la dégradation de la cellulose dans cette expérience à ceux d'autres expériences réalisées avec le même inoculum de départ, mais sans préadaptation (introduction directe de la cellulose avec l'inoculum mésophile, résultats présentés dans le chapitre concernant l'influence de changements de température, IM1), on trouve 3 OTUs en commun pour IM_{Pro}, soit 12% des séquences, alors que pour IM_{But}, 4 OTUs sont communs, qui représentent 62% du total des séquences. Dans les deux cas, on a donc des différences nettes par rapport à une situation sans préadaptation, et ces différences sont extrêmement importantes pour IM_{Pro}.

3.3.5. Bilan

Les données de séquences montrent de fortes différences entre les groupes A et B pendant la dégradation de la cellulose suite à la préadaptation. Les populations du groupe B pendant la dégradation de la cellulose restent proches de celles observées en fin de période de préadaptation pour ce même groupe. Des différences plus importantes sont observées pour le groupe A. La dégradation de la cellulose apporte plus de modifications dans les populations, à la fois bactéries et archées. De plus, la comparaison avec une expérience sans préadaptation de la biomasse montre une proximité plus importante du groupe B que du groupe A. Les modifications apportées par la préadaptation dans le groupe A semblent donc plus importantes que celles apportées par la préadaptation du groupe B. Cependant, dans les deux cas, on peut conclure que le modelage réalisé au cours de l'étape de préadaptation a conduit à deux compositions différentes des populations microbiennes au cours de la dégradation de la cellulose en phase 2, et différentes d'une situation sans préadaptation préalable.

4. Discussion

Dans cette discussion nous reviendrons sur les objectifs de cette expérience : d'une part évaluation de la possibilité de modeler des communautés microbiennes complexes à l'aide d'une préadaptation de cette biomasse avec des substrats simples, et d'autre part effet de ce modelage sur la dégradation de la cellulose en termes écologiques et métaboliques.

4.1. Un modelage réussi mais surprenant

4.1.1. Réactions de l'inoculum initial face à différents substrats

Au cours de la première phase de l'expérience, un même inoculum a été alimenté de façon répétée avec différents substrats. Selon les substrats introduits, des schémas de dégradation différents ont été observés.

Dans le cas de la préadaptation avec l'acide propionique, une latence avant la production de biogaz est observée, qui diminue au fur et à mesure des injections. La cinétique reste inchangée, mais le ratio de méthane dans le biogaz évolue de la première à la deuxième injection, puis est stable. Les fortes concentrations d'acide propionique dans le milieu sont connues pour être inhibitrices de la croissance

de certains microorganismes, en particulier les archées (*326*). Après la première injection (phase 1a), on peut imaginer que l'acide propionique apporté se dégrade lentement car peu de microorganismes adaptés sont présents. La forte concentration inhibe les archées qui ne produisent pas de biogaz immédiatement. Après plusieurs injections et le développement de groupes fonctionnels spécifiques, l'acide propionique s'accumule moins longtemps, les archées sont fonctionnelles immédiatement et la production se fait sans latence, avec un ratio de méthane stable.

Pour l'acide butyrique, il semble qu'il faille aussi un temps d'adaptation après la première injection (latence, cinétique plus lente) mais dès la deuxième injection la population est adaptée et développée. Là encore, sans doute les groupes fonctionnels responsables de la dégradation de l'acide butyrique ne sont pas prêts ou pas présents en quantité suffisante et ne démarrent pas immédiatement en phase 1a, mais le système s'adapte plus vite que dans le cas de l'acide propionique.

Pour le glucose et le cellobiose, il n'y a pas de temps de latence. Les microorganismes fonctionnels sont déjà présents, au moins partiellement, et non inhibés. On peut imaginer que leur nombre augmente à mesure des injections, par conséquent la cinétique est de plus en plus rapide. Elle augmente constamment au cours des phases pour ces substrats : il y a de plus en plus de microorganismes adaptés. Il est difficile de dire quelle étape de la dégradation est la plus limitante dans ce cas.

Par ailleurs, on remarque que dans le cas de la préadaptation avec des AGV, la cinétique semble avoir atteint un maximum. Le flux métabolique est saturé rapidement bien que la croissance microbienne ait lieu d'une phase à l'autre. Le processus métabolique ne serait donc pas limité uniquement par la densité des microorganismes, mais aussi par le substrat. Celui-ci est peut-être rapidement internalisé par des microorganismes. L'augmentation du nombre de ces microorganismes fonctionnels d'une phase à l'autre permettrait une internalisation totale des AGV plus rapide, et donc un démarrage des fonctions méthanogènes plus précoce, d'où une latence diminuée. L'internalisation des substrats aurait également pour conséquence un découplage entre leur disparition dans le milieu et leur consommation effective, celle-ci se faisant toujours au même rythme dans les microorganismes les ayant internalisés. Ceci expliquerait la cinétique constante d'une phase à l'autre. Dans le cas des sucres, la cinétique continue d'augmenter avec la densité de microorganismes, et donc le nombre de « biocatalyseurs ».

4.1.2. Le modelage aboutit à des situations différentes…

Les profils ARISA en fin de période de préadaptation montrent bien que même si les communautés microbiennes dans chaque cas conservent des points communs, elles ont évolué par rapport à l'inoculum initial et de façon déconcertée les unes par rapport aux autres. Plus précisément, les ACP réalisées à partir des différents prélèvements de la première phase montrent des évolutions différentes pour les différents bioréacteurs à mesure des injections de substrat, en particulier pour les bactéries pour qui les différences sont plus importantes, sans doute en raison d'une diversité plus grande que pour les archées. Le modelage à l'aide de préadaptation avec des substrats nous a permis d'obtenir de nouvelles communautés microbiennes qui ne sont pas toutes identiques entre elles en fin de période de préadaptation. Les résultats de séquençage le confirment de manière quantitative pour deux des

incubations. L'objectif de produire plusieurs communautés microbiennes nouvelles à partir d'une diversité initiale identique est donc atteint.

4.1.3. ... et à un cas surprenant

Plus précisément, comme attendu, les profils ARISA et les données physico-chimiques indiquent des comportements similaires pour les duplicats IM_{Pro} et IM_{But}. Les conclusions ne sont toutefois pas les mêmes pour les duplicats IM_{Glu} et IM_{Cell}. Il semble dans ces cas que des groupes fonctionnels différents se soient développés dans les incubations jumelles, ce qui entraîne des performances de dégradation différentes également. Le glucose et le cellobiose étant des molécules de nature chimique différente de l'acide butyrique et de l'acide propionique, on peut imaginer qu'un nombre plus important de voies métaboliques peut être mis en jeu. Des variations cinétiques entre des réactions élémentaires sont peut-être à l'origine de concentrations différentes d'intermédiaires. Même si les états de départ étaient les mêmes dans les deux duplicats de IM_{Glu} et IM_{Cell}, du fait de ces légères différences, ou d'un effet stochastique, ils ont emprunté des voies différentes, catalysées par des microorganismes différents pour dégrader les mêmes substrats, ce qui explique que les duplicats ne se comportent pas de la même façon.

Par ailleurs, on remarque que contre toute attente, $IM_{Glu}1/IM_{Cell}2$ et $IM_{Glu}2/IM_{Cell}1$ forment des paires en ce qui concerne les productions de biogaz, les productions d'AGV et les profils ARISA. Les mêmes voies métaboliques catalysées par les mêmes microorganismes ont été développées pour un bioréacteur de IM_{Glu} et un autre de IM_{Cell} alors qu'un autre schéma de dégradation a été développé dans les deux autres bioréacteurs. Ce résultat est *a priori* surprenant. On pouvait s'attendre à ce que les réacteurs n'évoluent pas tous de la même façon, mais pas à ce qu'ils reforment de nouvelles paires. Le cellobiose et le glucose sont des substrats proches et ils peuvent activer les mêmes microorganismes responsables de mêmes voies métaboliques, ce qui favorise sans doute la possibilité d'obtenir des schémas de dégradation équivalents pour les deux substrats dans notre cas. Nous discuterons plus longuement cette singularité dans les paragraphes suivants.

Une plus grande proximité des profils ARISA pour les incubations $IM_{Glu}1/IM_{Cell}2$ et IM_{Pro} d'une part, et $IM_{Glu}2/IM_{Cell}1$ et IM_{But} d'autre part, se remarque déjà et se confirmera au cours de la phase 2.

4.1.4. Efficacité et pertinence de la méthode de modelage

Après trois injections successives d'un substrat simple dans les bioréacteurs, des communautés différentes entre elles et différentes de la biomasse initiale ont été développées. Le comportement de l'inoculum initial n'est pas le même avec les différents substrats, et il faut un temps d'adaptation plus ou moins long avant d'obtenir une réponse stable et reproductible après chaque injection. Se pose notamment la question du nombre d'injections nécessaires pour modifier la biomasse et obtenir des patrons de diversité vraiment différents de l'inoculum de départ et caractéristiques de la dégradation du substrat. En effet, les systèmes utilisés sont des systèmes batch. La biomasse « non fonctionnelle », à laquelle la dégradation du substrat de préadaptation ne fait pas appel n'est donc pas éliminée du milieu liquide rapidement, mais devient minoritaire à mesure que les groupes fonctionnels se développent et qu'elle meurt ou est consommée faute d'être active. Un nombre d'injections de substrat suffisant est

donc nécessaire pour construire de nouvelles communautés fonctionnelles de microorganismes totalement différentes de l'inoculum de départ.

Dans notre cas, les résultats de séquençage montrent que la préadaptation a renouvelé de façon plus importante la biomasse dans le cas de l'acide propionique que dans le cas de l'acide butyrique. Malgré tout, plus de 50% de la biomasse fonctionnalisée est commune avec la biomasse de départ. Parmi ces 50%, il n'est pas possible d'établir précisément quelle part représente des microorganismes spectateurs ou conservés car ils sont acteurs de la dégradation du substrat. Des ajouts de substrats supplémentaires, ou l'utilisation d'un système continu permettraient d'être certain de ne sélectionner que les microorganismes impliqués dans les processus de dégradation des substrats utilisés, mais, notre objectif, qui était de former des communautés différentes de la communauté initiale, a tout de même été atteint avec trois injections successives. La méthode de modelage utilisée est donc satisfaisante et permet de produire de nouvelles structures microbiennes à partir d'un même inoculum de départ.

4.2. Dégradation de la cellulose : deux schémas métaboliques et écologiques se distinguent

La comparaison des données physico-chimiques et microbiologiques de cette expérience avec d'autres obtenues dans le cadre d'une expérience de dégradation de la cellulose avec une biomasse non préadaptée montre des différences métaboliques notamment dans les ratios de production de biogaz, la production des intermédiaires, l'enrichissement des AGV ou encore des différences dans la composition des populations fonctionnelles ou de la diversité. Le modelage de la phase 1 a donc eu une influence sur le métabolisme de dégradation de la cellulose et les populations impliquées. Le Tableau 12 résume les principales caractéristiques de chaque incubation.

Tableau 12 : Récapitulatif des résultats physicochimiques et microbiologiques obtenus pour les incubations de l'expérience de fonctionnalisation et les témoins.

Incubation	Taux de conversion de la cellulose en biogaz	Ratio de méthane dans le biogaz total produit	AGV principaux (valeur et enrichissement en ^{13}C à la date du pic d'accumulation maximum,)	Séquences d'ADN communes avec une situation sans préadaptation	Archées majoritaires
$IM_{Pro}1$	55%	55%	Acide acétique (262 mg de C/l, 79% de ^{13}C à j8) Acide propionique (22 mg de C/L, 64% de ^{13}C à j8)	Archées : 27% Bactéries : 12%	*Methanosaeta* 56% *Methanosarcina* 29% *Methanoculleus* 14%
$IM_{Pro}2$	53%	55%	Acide acétique (260 mg de C/l à j8) Acide propionique (27 mg de C/L à j8)		
$IM_{But}1$	49%	57%	Acide acétique (323 mg de C/l, 73% de ^{13}C à j13) Acide propionique (30 mg de C/L, 72% de ^{13}C à j13)	Archées : 77% Bactéries : 62%	*Methanosarcina* 77% *Methanoculleus* 21%
$IM_{But}2$	49%	57%	Acide acétique (248 mg de C/l à j13) Acide propionique (32 mg de C/L à j13)		
$IM_{Glu}1$	49%	55%	Acide acétique (354 mg de C/l, 68% de ^{13}C à j13) Acide propionique (22 mg de C/L, 69% de ^{13}C à j13)		
$IM_{Glu}2$	61%	54%	Acide acétique (356 mg de C/l à j8) Acide propionique (27 mg de C/L à j10)		
$IM_{Cell}1$	53%	55%	Acide acétique (374 mg de C/l, 87% de ^{13}C à j8) Acide propionique (18 mg de C/L, 74% de ^{13}C à j8)		
$IM_{Cell}2$	50%	56%	Acide acétique (386 mg de C/l à j13) Acide propionique (73 mg de C/L à j13)		
Incubation sans préadaptation	63%	65%	Acide acétique (410 mg de C/l, 70% de ^{13}C à j17) Acide propionique (180 mg de C/L, 65% de ^{13}C à j17)	Archées : 100% Bactéries : 100%	*Methanosarcina 100%*

4.2.1. Préadaptation avec l'acide propionique ou l'acide butyrique

Ce tableau montre que les deux paires d'incubations issues de la fonctionnalisation avec l'acide propionique d'une part, et l'acide butyrique d'autre part se comportent de la même façon. Dans les deux cas, la préadaptation avec un même substrat a permis d'aboutir à un même schéma de dégradation de la cellulose pour les réplicats. La fonctionnalisation avec l'acide butyrique semble conduire à une diversité et à des schémas métaboliques relativement proches d'une incubation non fonctionnalisée. La fonctionnalisation avec l'acide propionique semble au contraire conduire à une modification beaucoup plus importante de la flore, l'abondance des archées du genre *Methanosaeta* ainsi que les nombreuses différences observées dans les flores bactériennes l'illustrant en particulier.

L'étape de préadaptation a permis dans le cas de ces deux substrats de réaliser un forçage métabolique de l'inoculum de départ, de manière sensiblement équivalente dans chaque paire de duplicats (d'après les données physico-chimiques et d'ARISA), et particulièrement différent d'une situation « non forcée » avec l'acide propionique. Les conséquences en termes de performance de dégradation de la cellulose sont visibles mais devront être précisées à l'aide d'analyses physico-chimiques plus poussées. Le forçage réalisé avec ces substrats semble par ailleurs conduire à des situations stables puisque les deux réplicats se comportent de la même façon et qu'aucun signe de disfonctionnement de la digestion de la cellulose n'est observé.

4.2.2. Préadaptation avec le glucose ou le cellobiose

Dans ce cas, les incubations réplicats ne se comportent pas de la même façon. La dégradation de la cellulose a lieu selon des schémas différents, à la fois en termes de caractéristiques physico-chimiques mais également écologiques. Malgré cette absence de répétabilité au sein des deux groupes, on observe le même comportement chez $IM_{Glu}2$ et $IM_{Cell}1$ d'une part et $IM_{Glu}1$ et $IM_{Cell}2$ d'autre part, ce qui était attendu suite aux constatations faites au cours de la phase 1. Les données ARISA et physico-chimiques sont similaires pour ces nouvelles paires. Les quatre incubations ne permettent d'obtenir que deux états de diversité, selon un regroupement deux à deux surprenant.

La préadaptation ne donne donc dans ce cas pas le résultat attendu, les substrats utilisés ne permettent pas de réaliser un forçage métabolique univoque. De plus, les molécules utilisées (cellobiose et glucose) étant de nature chimique proche, on aboutit à des résultats similaires pour des préadaptations « différentes ». Le cellobiose ne semble pas apporter une spécificité à l'inoculum de départ différente de celle qu'apporte le glucose.

4.2.3. Un comportement singulier

Un phénomène singulier observé au cours de cette expérience est le regroupement des différentes incubations issues de préadaptations différentes selon 2 groupes. En effet, on s'attend, suite aux résultats de la préadaptation, à ce que les biomasses modelées de la même façon aient le même comportement de dégradation de la cellulose. C'est ce qui est observé pour les paires IM_{Pro}, IM_{But}, et $IM_{Glu}1/IM_{Cell}2$ ainsi que $IM_{Glu}2/IM_{Cell}1$. Cependant, seulement deux patrons de dégradation de la cellulose sont obtenus et pas quatre comme autant de groupes obtenus en fin de préadaptation. Ce

résultat est tout à fait inattendu, et encore plus surprenant que le regroupement des paires $IM_{Glu}1/IM_{Cell}2$ et $IM_{Glu}2/IM_{Cell}1$.

Les analyses physicochimiques réalisées ne permettent pas de distinguer précisément les différences métaboliques, cependant, les cinétiques et l'accumulation des intermédiaires mesurés montrent que des phénomènes différents sont en jeu dans les deux groupes. Des points communs existent, la dégradation passe par l'acide acétique, et dans les deux cas on ne peut pas observer d'accumulation importante d'un autre AGV. Ce résultat ne signifie pas que les voies métaboliques et les intermédiaires sont les mêmes dans les deux cas. Si toutefois elles étaient les mêmes, les différences cinétiques et de performance observées indiquent que les groupes fonctionnels n'ont pas la même composition, les transformations ne se faisant pas au même rythme. Les données de séquençage réalisé sur la fraction fonctionnelle d'une incubation de chaque groupe confirment que les populations sont très différentes.

4.3. Prédétermination des communautés écologiques ou évolution stochastique ?

La question du regroupement en deux groupes « métaboliques » seulement est intéressante. Les similarités physico-chimiques décrites dans les résultats ne permettent pas de retracer en détail les chemins métaboliques empruntés dans les deux cas mais les données écologiques donnent des indices pour imaginer les raisons de ce comportement singulier.

4.3.1. Quelles étapes conditionnent l'évolution des processus ?

Dans les paires d'incubation IM_{Pro} et IM_{But}, seuls les microorganismes des groupes fonctionnels de la fin de la digestion anaérobie sont activés, contrairement au cas des paires IM_{Glu} et IM_{Cell}, où des groupes intervenant plus en amont sont présents. Les populations obtenues en fin de modelage sont donc différentes pour ces paires d'incubations, plus d'éléments de la chaîne réactionnelle de dégradation de la cellulose étant présents pour IM_{Glu} et IM_{Cell}. Malgré tout, après ajout de cellulose, on n'observe pas plus de latence pour les incubations des groupes de IM_{Pro} et IM_{But} que pour celles de IM_{Glu} ou IM_{Cell}. Le facteur limitant dans la chaîne réactionnelle menant de la cellulose à la production de biogaz provient sans doute d'autres microorganismes, absents dans toutes les biomasses modelées en phase 1, et intervenant encore plus tôt encore dans la dégradation de la cellulose. Il s'agit probablement de microorganismes responsables de son hydrolyse. Leur développement est responsable de la latence observée pour la production de gaz. Pendant l'hydrolyse de la cellulose, les microorganismes de l'acidogenèse se développent, notamment pour IM_{Pro} et IM_{But}. Leur développement ainsi que le développement des microorganismes hydrolysant la cellulose est sans doute conditionné par la nature des microorganismes présents pour réaliser la suite de la dégradation et fortement développés au cours de la période de préadaptation. Leur présence créé une aspiration des voies précédentes. En effet, la présence de microorganismes capables de réaliser une syntrophie ou encore d'éliminer facilement des intermédiaires permet d'éviter les goulots d'étranglement et facilite le développement de la population microbienne associée à la production l'intermédiaire en question, qui ne s'accumule pas. Ceci entraîne l'ensemble de la dégradation vers des voies métaboliques particulières, en fonction du développement observé en phase 1.

4.3.2. Déterminisme ou stochastisme ?

On peut se poser la question du devenir de la biomasse modelée suite à l'ajout de cellulose. Les données de séquençage montrent que des changements profonds ont eu lieu entre la biomasse en fin de phase 1 et celle observée au cours de la phase 2, en particulier pour le groupe A. La totalité des groupes microbiens n'avait pas été activée au cours de la première phase. Le développement des microorganismes responsables de l'ensemble des étapes de la dégradation de la cellulose pouvait se faire de manière prédéterminée, ou stochastique. Pour les réplicats IM_{Pro} et IM_{But}, on peut penser que le modelage de la phase 1 avec un substrat très simple impose le développement de communautés assez spécifiques, qui déterminent l'évolution future au moment de l'ajout de la cellulose. Dans le cas de IM_{Glu} et IM_{Cell}, le fait que les réplicats n'évoluent pas de la même façon dès la préadaptation semble plutôt indiquer un comportement stochastique au moment de la préadaptation, le substrat utilisé, plus complexe, offrant plus de possibilités. Dès ce moment, les biomasses ont évolué différemment, vers une voie ou une autre. De manière stochastique, les microorganismes responsables de la fin de la dégradation se sont développés de façon similaire à IM_{Pro} ou IM_{But} en phase 1. Ceci a conditionné les populations et prédétermine la suite de la dégradation de la cellulose. Les dernières étapes de la digestion anaérobie semblent donc déterminantes et aiguillent toute la dégradation. Dans le même sens, on note que la diversité du groupe A est très modifiée au cours de la dégradation de la cellulose par rapport à la préadaptation. Une grande partie des groupes fonctionnels nécessaires pour dégrader la cellulose n'était pas présente, malgré tout, le développement de quelques groupes fonctionnels en particulier lors de la phase 1 a suffit à orienter des changements écologiques importants mais similaires pour 4 incubations. Ces changements ne sont d'ailleurs pas un obstacle à une meilleure cinétique et performance de dégradation puisque le groupe A est légèrement plus performant que le groupe B.

4.3.3. Pourquoi n'y a-t-il que deux schémas de dégradation de la cellulose ?

Un résultat majeur de ce travail est que les incubations évoluent selon **deux voies différentes seulement**. Les différents indicateurs microbiologiques et physico-chimiques utilisés montrent des similarités importantes au sein des groupes A et B. En particulier, les profils ARISA de diversité fonctionnelle sont semblables au cours du temps au sein des groupes. C'est étonnant, notamment pour les incubations IM_{Glu} et IM_{Cell} pour lesquelles la préadaptation avec le glucose ou le cellobiose aurait pu amener à des états de diversité plus nombreux et différents de ceux de la préadaptation avec les AGV, moins complexes.

Au-delà du substrat utilisé pour réaliser la préadaptation, d'autres facteurs sont donc certainement très importants et conditionnent l'évolution des communautés microbiennes, comme par exemple les paramètres physico-chimiques ou la composition de l'inoculum de départ. La contrainte imposée par ces facteurs permet le forçage selon deux schémas différents, mais semble limiter les autres possibilités d'évolution. A partir d'un inoculum provenant d'un digesteur industriel de déchets ménagers recevant donc des substrats très variés, le champ des configurations possibles semble limité pour un substrat pourtant relativement complexe, la cellulose. En plus de la préadaptation, la conjugaison de différents

facteurs, conditions expérimentales ou répartition des microorganismes dans l'inoculum original, conditionne l'évolution de la biomasse. Il faut identifier précisément la nature de ces paramètres et pondérer leur importance par rapport à une fonctionnalisation de la biomasse avec une molécule donnée. Certains substrats, comme l'acide propionique ou l'acide butyrique, mis en jeu dans les étapes ultimes de la digestion anaérobie, semblent en effet imposer des contraintes plus fortes pour la réalisation du forçage métabolique.

5. Bilan : la préadaptation comme levier environnemental pour modifier les communautés de microorganismes

En terme opérationnel, la préadaptation pourrait être intéressante pour ne sélectionner que quelques microorganismes dans une population complexe afin de réaliser la dégradation de la matière organique selon un schéma particulier, favorable pour l'opérateur d'un point de vue cinétique, de rendement ou encore produisant des intermédiaires d'intérêt. Limiter « les possibilités » métaboliques de dégradation de la matière pourrait de plus permettre d'éviter les comportements inattendus, si toutefois la sélection d'une biomasse spécialisée et de diversité restreinte n'entraîne pas d'instabilité du digesteur. En fonction des substrats utilisés, différentes possibilités sont séduisantes. Une biomasse préadaptée avec de l'acide propionique par exemple sera sans doute intéressante pour éviter les accumulations d'acide propionique dans les bioréacteurs, qui sont souvent la cause de dysfonctionnement ou d'instabilité des installations industrielles.

Toutefois, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mesurer la part de déterminisme apportée par la fonctionnalisation par rapport à celle imposée par la composition de l'inoculum de départ et les conditions environnementales. Les résultats obtenus semblent indiquer qu'un modelage spécifique des populations pour orienter spécifiquement la dégradation de la cellulose serait envisageable. Il faut documenter plus précisément les évolutions des populations suite à la préadaptation, et comparer l'effet d'une même préadaptation sur des inocula différents ou dans des conditions différentes, afin d'évaluer la répétabilité de la préadaptation d'une situation à l'autre. Par ailleurs un inventaire plus précis des métabolites produits ou cours de la dégradation peut être intéressant pour mieux mettre en valeur les bénéfices possibles de ces préadaptations.

Enfin, il faut également mieux documenter la nature des substrats utilisables pour réaliser la préadaptation. Les évolutions stochastiques comme celles observées avec le glucose ou le cellobiose sont peu souhaitables d'un point de vue opérationnel car peuvent générer des comportements inattendus ou non souhaités. Des substrats amenant à des situations déterminées sont sans doute préférables. Il faut par ailleurs que leur effet soit assez fort pour que les modifications induites soient résistantes et permettent une digestion stable. Cette méthode semble offrir des possibilités simples intéressantes de modelage des populations et des comportements métaboliques. Il faut néanmoins préciser les connaissances acquises afin de limiter la part d'incertain associé à cette démarche, et consolider les briques supplémentaires apportées à l'ingénierie écologique des bioprocédés par la préadaptation avec un substrat simple.

– Effet de la co-inoculation de biomasses exogènes

1. Introduction

La cellulose n'est pas facilement hydrolysée dans les bioprocédés, ce qui limite la cinétique de la digestion anaérobie (*327*) et l'efficacité des bioprocédés anaérobies. Afin de modifier la dégradation de la cellulose et la production de méthane, une voie intéressante pourrait être de bouleverser les équilibres des communautés de microorganismes des bioprocédés par apport d'une biomasse exogène, ou bioaugmentation. Même si la bioaugmentation est définie au sens large comme l'apport de microorganismes spécifiques dans un système dans le but de favoriser un processus du procédé en général (*328-330*), la plupart des travaux concernant la bioaugmentation en conditions anaérobies trouvés dans la littérature l'utilisent dans des objectifs plus limités : par exemple améliorer le démarrage de nouveaux digesteurs (*331-332*), réduire les odeurs (*238, 333*), améliorer la dégradation d'une molécule (*236-237*) ou faciliter le retour à la normale après des perturbations dans le fonctionnement (*234, 334*). Plus généralement, l'apport d'une biomasse exogène pourrait être envisagé comme une perturbation du système permettant de conduire à un nouvel équilibre du bioprocédé, pouvant se caractériser par des performances différentes. Au cours de ma thèse, j'ai étudié les conséquences de l'apport de deux types très différents de biomasses exogènes sur le fonctionnement de bioréacteurs anaérobies dégradant de la cellulose ou du foin : du contenu ruminal de vache et une boue issue d'un bassin d'aérateur de station d'épuration.

La première série d'expérience faisait appel à une biomasse naturelle particulièrement spécialisée et performante dans son milieu en conditions anaérobies. En effet, des systèmes digestifs animaux tels que ceux présents dans les ruminants ou dans les termites ont, forts de millions d'années d'évolution, une capacité à dégrader très efficacement la cellulose malgré des temps de séjour beaucoup plus faibles que dans les bioprocédés (*225*). Plusieurs études mettant en jeu des microorganismes du rumen dans des digesteurs anaérobies ont été réalisées dans ce sens (*335-337*). La conception de procédés mimant les systèmes digestifs animaux constitue une autre piste de travail prometteuse (*222-223*). Toutefois, des observations macroscopiques suggèrent que ces flores ruminales pourraient avoir du mal à s'implanter dans les procédés industriels anaérobies (*338*). Dans cette première série d'expériences, je me suis intéressé au potentiel d'expression des propriétés de flores cellulolytiques ruminales dans un digesteur anaérobie et aux perturbations induites sur l'équilibre du digesteur par la bioaugmentation.

Une seconde série d'expériences avait pour objectif de voir l'effet de l'apport d'une boue de bassin d'aération de station d'épuration dans un digesteur anaérobie. Cette biomasse industrielle est *a priori* non adaptée et non fonctionnelle dans les conditions environnementales recréées dans un digesteur anaérobie, puisqu'étant issue d'un réacteur alimenté en permanence par des eaux usées et de l'oxygène. Toutefois, même si la plus grande partie de cette biomasse ne pourrait vraisemblablement pas s'implanter dans un digesteur anaérobie, elle pourrait, comme le contenu ruminal, entraîner une modification des équilibres microbiens et de la répartition des niches écologiques au sein de la biomasse du bioprocédé.

Le contenu ruminal a été sélectionné parmi les biomasses naturelles car il était facilement disponible et présentait des caractéristiques microbiennes idéales pour favoriser la dégradation de la cellulose. La boue de bassin d'aération de station d'épuration était un inoculum industriel à la fois non adapté *a priori* aux conditions expérimentales des bioréacteurs (anaérobies) mais contenant toutefois une diversité très importante de microorganismes.

Pour réaliser les deux séries d'expériences, les deux biomasses exogènes étudiées ont été co-inoculées (18% de biomasse exogène) dans différents bioréacteurs avec un inoculum anaérobie de référence, provenant d'un digesteur industriel d'ordures ménagères. Certains bioréacteurs ont été alimentés avec de la cellulose (marquée ^{13}C, 2 bioréacteurs par expérience, ou non marquée, 1 bioréacteur par expérience) ou du foin (2 bioréacteurs par expérience). Le foin a été choisi afin de tenter de maximiser l'implantation de l'inoculum ruminal. Des témoins sans substrat ont également été réalisés (2 bioréacteurs par expérience). Au total, sept incubations ont été préparées pour chaque expérience, selon le schéma expérimental suivant (Figure 33).

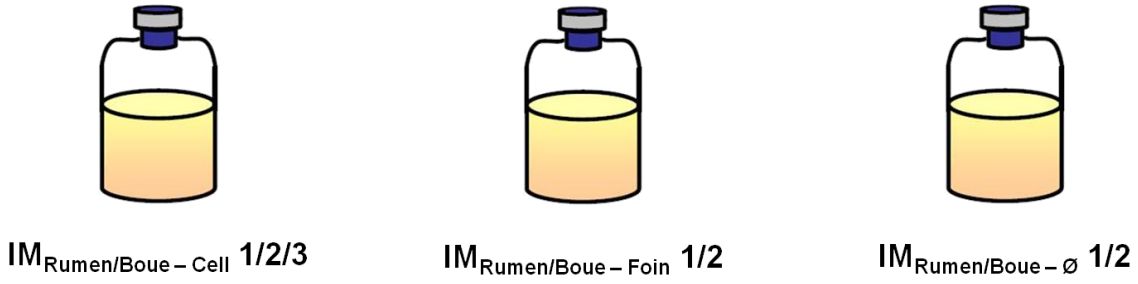


Figure 100 : Microcosmes réalisés pour les expériences de co-inoculation.

Les différents microcosmes sont appelés respectivement $IM_{Rumen/Boue\text{-}Cell/Foin/Ø}$ selon que la biomasse exogène est le contenu ruminal ou la boue de bassin d'aération, et que le substrat utilisé est de la cellulose (triplicat), du foin (duplicat) ou qu'il n'y a pas de substrat (duplicat). Seuls les résultats obtenus pour les microcosmes dégradant la cellulose (plus riches que les résultats obtenus pour les microcosmes dégradant le foin, en raison de l'utilisation de substrat marqué ^{13}C) seront présentés en détail dans ce chapitre. Les résultats obtenus pour les deux types de co-inoculation seront décrits en parallèle.

2. Données physico-chimiques

2.1. Productions de gaz

Afin de s'affranchir de la contribution comme substrat de la co-inoculation à la production de biogaz (par apport de carbone organique métabolisable, ou dégradation d'une partie de la biomasse par exemple), les productions de gaz des témoins sans substrat ont été soustraites aux valeurs obtenues pour les microcosmes dégradant la cellulose afin de n'obtenir que la contribution de la cellulose à la production de biogaz. Les productions obtenues, exprimées en mg de carbone de gaz produit, ont été normalisées par la quantité de carbone introduite sous forme de cellulose (mg). Les valeurs présentées correspondent aux valeurs moyennes pour les 3 bioréacteurs co-inoculés avec la biomasse exogène et

avec apport de cellulose. Dans chaque cas, les 3 bioréacteurs avaient des comportements voisins et les réplicats sont très semblables.

2.1.1.Co-inoculation avec le contenu ruminal

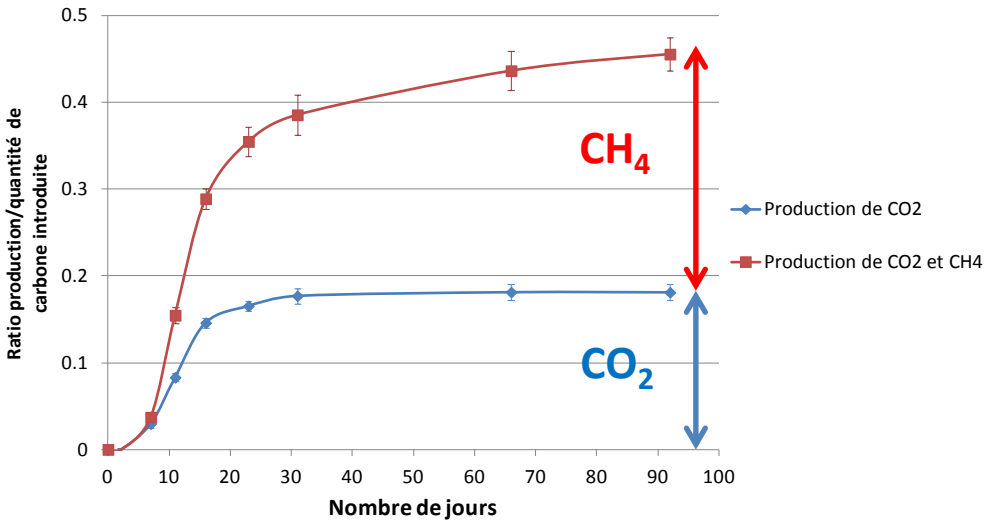


Figure 101 : Taux de conversion de la cellulose en biogaz, expérience IM_{Rumen}.
Les barres d'erreur correspondent aux écarts-type (n=3).

Les réplicats présentent des comportements similaires. Le démarrage de la production de gaz est rapide, et entre 8 et 24 jours, à la fois du méthane et du dioxyde de carbone sont produits. Par la suite, seul du méthane est produit. La production semble terminée après 70 jours. Au total, environ 60% du biogaz produit est composé de méthane.

2.1.2. Co-inoculation avec la boue de bassin d'aération

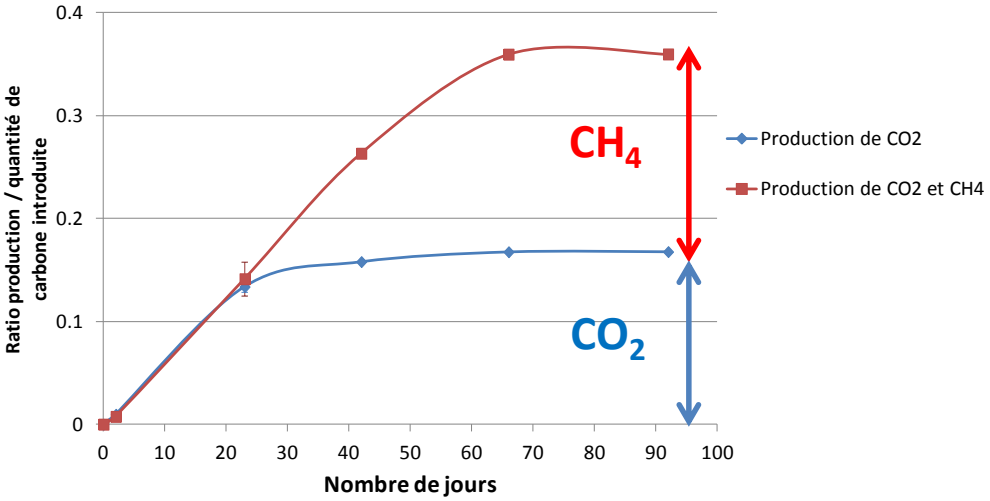


Figure 102 : Taux de conversion de la cellulose en biogaz, expérience IM_{Boue}.
Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (n=3).

Les réplicats présentent des comportements similaires. Le démarrage de la production est immédiat. Dans un premier temps (jour 0 à jour 20), seul du dioxyde de carbone est produit. Dans un second

temps (jour 20 à jour 70), seul du méthane est produit. La production semble ensuite terminée. Environ 52% du biogaz produit est constitué de méthane.

2.1.3. Bilan

On peut retenir que pour les deux expériences, le démarrage de la production de biogaz est rapide. Dans les deux cas cette production se fait en deux temps. La première partie de la production est composée d'un mélange de CO_2 et CH_4 pour IM_{Rumen}, et de CO_2 uniquement pour IM_{Boue}. Dans un second temps seul du méthane est produit, ce qui suggère une méthanogenèse hydrogénotrophe. Dans les deux cas, la production semble achevée après 70 jours, on peut toutefois noter des cinétiques différentes. La cinétique est rapide au début pour IM_{Rumen}, puis ralentit, alors qu'elle semble constante pour IM_{Boue}. Enfin, le ratio de méthane ainsi que la quantité de cellulose convertie en biogaz sont plus importants pour IM_{Rumen} que IM_{Boue}.

A titre de comparaison, j'obtiens pour des bioréacteurs identiques mais non co-inoculés avec une biomasse exogène, 60 à 70% de conversion de la cellulose en biogaz contenant environ 65% de méthane.

Les évolutions de la concentration de N_2, O_2, N_2O, NH_3, H_2S et H_2 dans le ciel gazeux des microcosmes ont également été suivies au cours du temps. Dans les différents microcosmes de cette série d'expérience, la quantité de ces gaz est quasi constante (évolution de moins de 1%).

2.2. *Analyses physicochimiques de la phase liquide*

2.2.1. Carbone organique et inorganique dissous

2.2.1.1. Co-inoculation avec le contenu ruminal

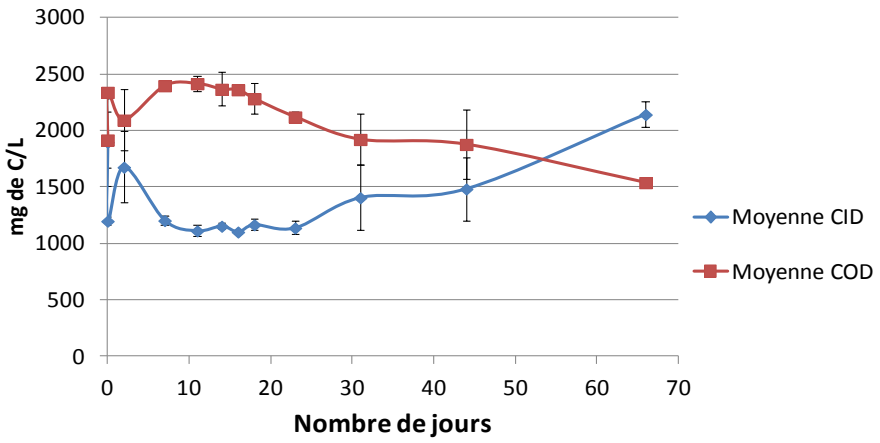


Figure 103 : Concentration en carbone organique et inorganique dissous, expérience IM_{Rumen}. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3).

Conformément à ce qui est attendu, la valeur des COD augmente au début de la dégradation, puis diminue fortement assez rapidement, ce qui correspond à la production des intermédiaires de dégradation de la cellulose puis à leur dégradation sous forme de biogaz. On constate également au jour 0 un apport important de COD avec le contenu ruminal (environ 500 mg/L) (Figure 103).

2.2.1.2. Co-inoculation avec la boue de bassin d'aération

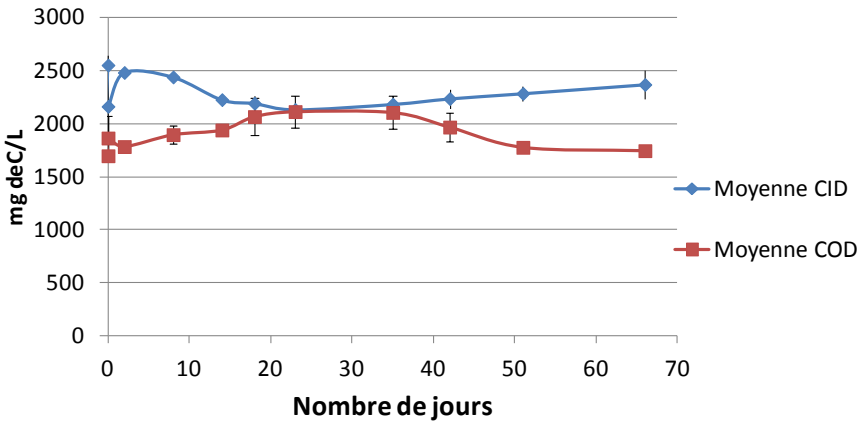


Figure 104 : Concentration en carbone organique et inorganique dissous, expérience IM_{Boue}. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3).

Là encore, on retrouve une augmentation puis une diminution des valeurs de carbone organique dissous (Figure 104). Cependant elles évoluent moins rapidement que dans le cas de la co-inoculation avec le contenu ruminal, la dégradation est moins rapide, ce que confirment les données sur le biogaz. Enfin, notons que la co-inoculation avec la boue de bassin d'aération apporte du COD, mais en faible quantité par rapport à IM_{Rumen} (environ 200 mg/L). Le niveau des CID est plus important que pour IM_{Rumen}.

2.2.2. Acides gras volatils

Les principaux AGV détectés au cours de ces expériences sont l'acide acétique et l'acide propionique. Dans le cas de IM_{Rumen}, une quantité importante d'AGV a été apportée avec le contenu ruminal.

2.2.2.1. Co-inoculation avec le contenu ruminal

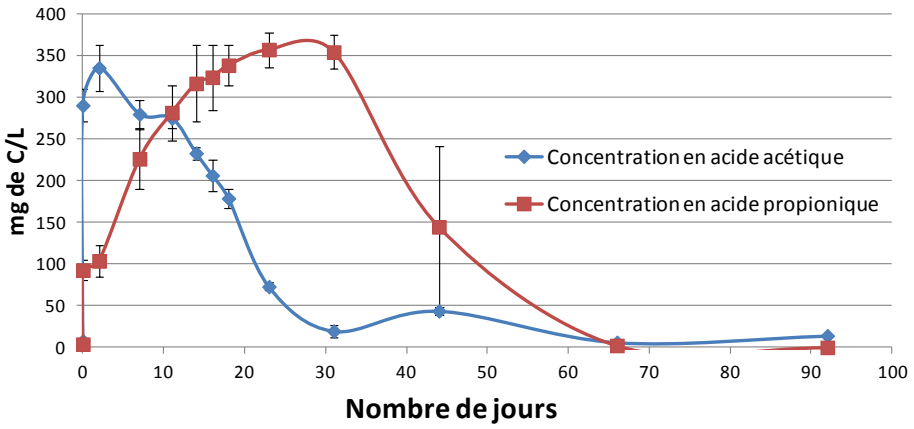


Figure 105 : Concentration en AGV, expérience IM_{Rumen}. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3).

Une quantité importante d'AGV est présente au départ (300 mg/l d'acide acétique et 100 mg/l d'acide propionique), apportée avec le contenu ruminal. La concentration d'acide acétique augmente dès le début de l'incubation, puis stagne avant de diminuer. On peut supposer qu'entre les jours 0 et 15, de l'acide acétique est produit, et qu'il s'accumule plus ou moins en fonction de sa dégradation. Il est entièrement consommé en 25 jours environ. L'acide propionique s'accumule entre les jours 0 et 20, et n'est dégradé que lorsque tout l'acide acétique a été consommé. Il est entièrement consommé après 55 jours environ. Son épuisement correspond à l'arrêt de la production de biogaz. L'acide propionique s'accumule à un niveau important, supérieur à celui de l'acide acétique. Cependant, il est difficile d'estimer la quantité totale d'acide acétique produit, celui-ci étant consommé en même temps qu'il est produit.

Note : dans les expériences avec le foin en substrat, des cinétiques équivalentes sont observées, mis à part que l'accumulation d'acide acétique est plus importante et celle d'acide propionique beaucoup moins importante.

2.2.2.2. Co-inoculation avec la boue de bassin d'aération

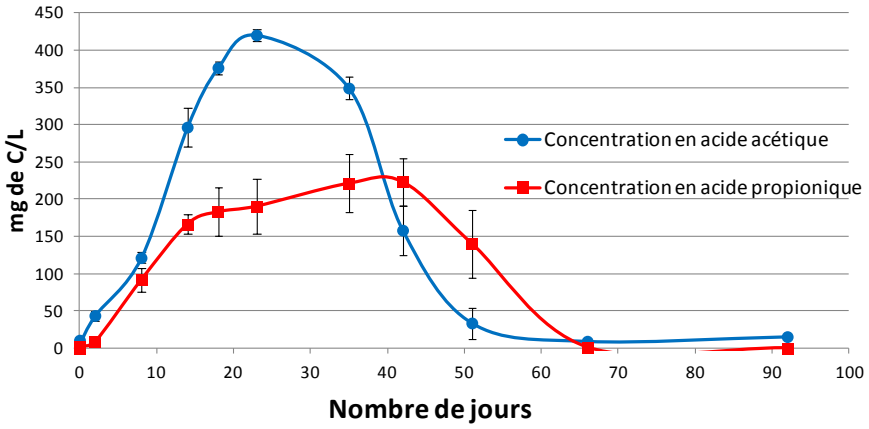


Figure 106 : Concentration en AGV, expérience IM_{Boue}.
Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=3).

Dans cette expérience, le niveau d'AGV est nul en début d'incubation. L'acide acétique et l'acide propionique se forment à la même vitesse jusqu'au jour 10, puis l'acide acétique est formé préférentiellement, jusqu'au jour 24 environ. A partir de cette date, sa concentration diminue et tout l'acide acétique est consommé au jour 50. L'acide propionique s'accumule jusqu'au jour 40 et n'est consommé que lorsque tout l'acide acétique a été consommé. Au jour 65, tous les AGV ont été consommés, en accord avec la fin de la production de biogaz.

2.2.2.3. Bilan

Les profils d'accumulation et de dégradation des AGV sont différents dans les deux expériences. Dans les deux cas cependant, les AGV majoritairement retrouvés sont l'acide acétique et l'acide propionique. L'acide acétique est dégradé préférentiellement, et l'acide propionique n'est dégradé que lorsque tout l'acide acétique a été consommé. L'acide acétique s'accumule à un niveau équivalent dans les deux

expériences (400 mg de C/L), cependant une partie de l'acide acétique provient du contenu ruminal pour IM_{Rumen}. Le niveau d'acide propionique est en revanche différent dans les deux expériences (225 mg de C/L pour IM_{Boue} et 375 mg de C/L pour IM_{Rumen}). Les cinétiques sont également différentes. La vitesse de production est dans les deux cas importante au début, mais ralentit plus rapidement pour IM_{Boue} que pour IM_{Rumen} pour qui elle reste supérieure à la production d'acide acétique. De plus, la formation-dégradation de l'acide acétique est plus longue pour IM_{Boue} que pour IM_{Rumen} (50 jours/25 jours). La durée de dégradation de l'acide propionique est par contre équivalente (environ 20 jours).

2.3. Analyses isotopiques

Les analyses isotopiques ont été réalisées sur deux réplicats d'incubation (les deux bioréacteurs contenant de la cellulose ^{13}C) et les valeurs présentées sont les moyennes des résultats obtenus. Notons que les valeurs mesurées correspondent à l'enrichissement du gaz ou des AGV accumulés dans le système, et ne sont pas une valeur de la production instantanée. Elles donnent tout de même une indication qualitative sur les phénomènes en jeu.

2.3.1. Gaz

Seuls quelques points au cours de la dégradation ont pu être analysés. Les valeurs obtenues pour les deux bioréacteurs réplicats sont identiques (Tableau 13).

Tableau 13 : Enrichissement isotopique des gaz pour l'expérience de co-inoculation.

Expérience	Nombre de jours	Enrichissement du méthane	Enrichissement du dioxyde de carbone
IM_{Rumen}	7	9%	9%
	11	24%	12%
	14	32%	16%
	31	34%	18%
IM_{Boue}	14	13%	11%
	31	42%	19%

Les pourcentages mesurés sont inférieurs à 50%. Ceci est en accord avec les valeurs d'enrichissement mesurées pour les AGV (voir plus loin). Une grande partie du carbone ne provient pas de la cellulose, mais a été apportée lors de la co-inoculation, sous forme de carbone organique dissous ou solide contenu avec la biomasse dans l'inoculum, ou encore par la biomasse elle-même qui aura été dégradée. L'enrichissement plus faible au jour 14 et plus élevé au jour 31 pour IM_{Boue} que pour IM_{Rumen} suggère que dans l'expérience IM_{Boue}, le carbone ne provenant pas de la cellulose commencerait à se dégrader en premier, et que la cellulose se dégraderait dans un second temps seulement, alors qu'ils se dégraderaient en parallèle dans IM_{Rumen} pour qui les valeurs d'enrichissement des gaz sont importantes dans le début de la dégradation. Dans des expériences voisines sans co-inoculation, l'enrichissement du méthane atteint 50-55% après 30 jours mais est seulement de 18% après 15 jours. C'est la tendance observée

pour IM_{Boue}, mais pas pour IM_{Rumen} où le méthane est enrichi plus vite en ^{13}C, peut-être suite à une dégradation plus précoce de la cellulose et de ses sous-produits ?

2.3.2. Acides gras volatils

Les analyses isotopiques révèlent la présence d'acide acétique, de l'acide propionique et d'acide butyrique marqués dans le système. L'acide butyrique est malgré tout présent en quantités bien moindres et les valeurs mesurées sont à la limite de détection de l'appareil. Nous ne présenterons donc ici que les données d'acide acétique et d'acide propionique.

2.3.2.1. Co-inoculation avec le contenu ruminal

La composition isotopique des AGV (Figure 107) augmente de manière significative entre les jours 0 et 11. Ceci correspond à la dégradation de la cellulose en AGV. La composition isotopique de l'acide propionique est ensuite stable jusqu'au jour 31. Cette observation est en accord avec la non-évolution de la concentration d'acide propionique dans le milieu à ce moment, et suggère qu'il n'y a ni production ni consommation d'acide propionique entre les jours 20 et 31. Au contraire, l'acide acétique est consommé de manière préférentielle depuis le début de l'incubation. Après 16 jours, sa composition isotopique diminue. La dégradation de la cellulose en AGV est probablement terminée, et l'acide acétique nouvellement formé ne vient pas de la cellulose marquée mais d'une autre source de substrat non marqué et dilue l'acide acétique marqué. De la même façon, après le jour 31, la composition isotopique de l'acide propionique diminue et atteint 0 lorsque tout l'acide propionique issu de la dégradation de la cellulose a été consommé.

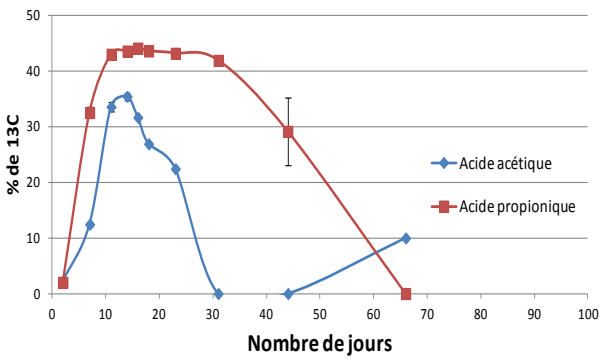


Figure 107 : Enrichissement isotopique des AGV, expérience IM_{Rumen}.
Les barres d'erreur représentent les écarts-type (n=2).

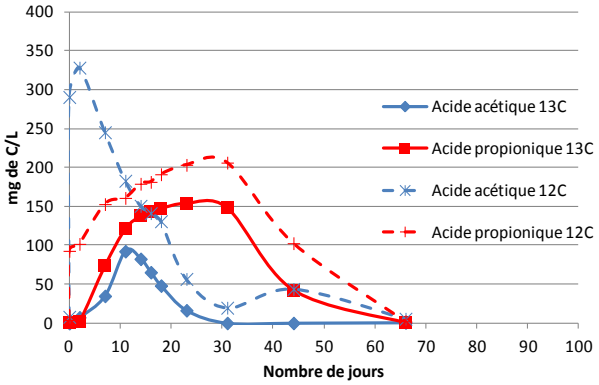


Figure 108 : Evolution de la concentration en AGV enrichis et non enrichis, expérience IM_{Rumen}.

La Figure 108 illustre ces observations. Elle représente l'accumulation des AGV au cours du temps en faisant la distinction entre les AGV marqués ^{13}C et non marqués, afin de mieux identifier la contribution de la cellulose à la production d'AGV, une forte quantité de substrats exogènes étant présente dans cette expérience.

On observe que le pic d'accumulation d'acide acétique provenant de la cellulose est au jour 10 environ, le maximum d'accumulation d'acide propionique marqué est atteint peu après. Une faible production

d'acide acétique non enrichi vers 20 et 45 jours correspond peut-être à la dégradation d'une partie de la biomasse.

2.3.2.2. Co-inoculation avec la boue de bassin d'aération

De la même façon, la composition isotopique des AGV (Figure 109) augmente de manière significative tout au début de la dégradation (avant le jour 15). L'enrichissement de l'acide propionique est constant tant qu'il est présent en quantité importante, ce qui suggère qu'il est produit à partir d'une même source d'enrichissement constant ou à partir de plusieurs sources de carbone mais à la même vitesse. L'enrichissement de l'acide acétique passe au contraire par une valeur intermédiaire vers le jour 8. La décroissance des valeurs d'enrichissement s'explique de la même façon que dans l'expérience de co-inoculation avec le contenu ruminal.

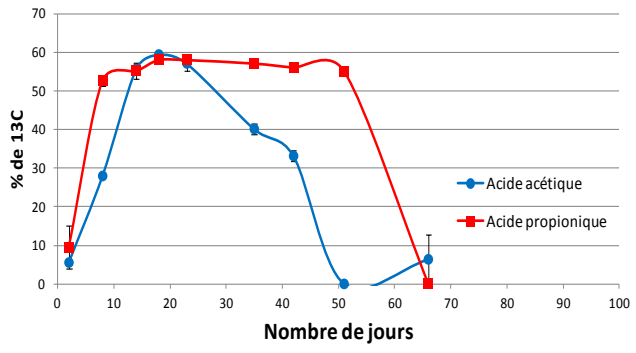


Figure 109 : Enrichissement isotopique des AGV, expérience IM_{Boue}.
Les barres d'erreur représentent les écarts-type (n=2).

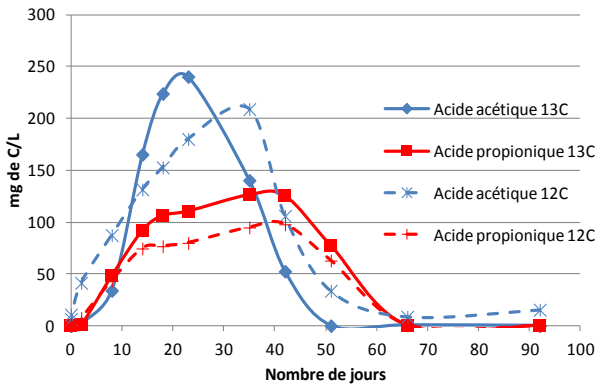


Figure 110 : Evolution de la concentration en AGV enrichis et non enrichis, expérience IM_{Boue}.

La Figure 110 illustre ces observations. Elle représente l'accumulation des AGV au cours du temps en faisant la distinction entre les AGV marqués ^{13}C et non marqués, afin de mieux identifier la contribution de la cellulose.

Les acides propioniques marqués ou non marqués sont produits au même rythme, au contraire, on observe que les productions d'acide acétique marqué et non marqué sont plus distinctes. Le pic d'accumulation d'acide acétique provenant de la cellulose est atteint à environ 23 jours, alors que le pic d'acide acétique non enrichi est atteint vers 40 jours. La dégradation d'une quantité importante de matière organique non enrichie, peut-être la boue, démarre plus tôt mais se réalise plus lentement que celle de la cellulose.

2.3.2.3. Bilan

Les valeurs de l'enrichissement isotopique semblent indiquer que la dégradation est moins rapide pour IM_{Boue} que pour IM_{Rumen}. Dans les deux cas, l'acide propionique est consommé après l'acide acétique. On peut par ailleurs noter que les valeurs d'enrichissement des AGV sont plus importantes pour IM_{Boue} que IM_{Rumen}, même si elles n'atteignent pas celles d'expériences similaires, sans co-inoculation (acide acétique enrichi à 75% et acide propionique à 65%). L'apport de carbone exogène (^{12}C) avec la boue de

bassin d'aération (hors biomasse) est moins important que pour le contenu ruminal. Par ailleurs, on peut penser qu'une partie de la biomasse des inocula exogènes, *a priori* non adaptée aux conditions environnementales du bioréacteur, se dégrade dans cette expérience et explique que l'enrichissement des AGV ne soit pas équivalent à celui d'expériences sans bioaugmentation. Les graphiques présentant l'évolution des concentrations des AGV marqués et non marqués permettent d'estimer à quel moment se réalise cette dégradation.

2.4. Influence des prélèvements liquides

Pour les deux expériences, la répartition du carbone au cours du temps a été estimée en tenant compte des prélèvements liquides et de la production de biogaz. Les graphiques suivants (Figure 111 et Figure 112) présentent la répartition du carbone dans la phase liquide, ainsi que la quantité et la forme du carbone prélevé avec les échantillons liquides. La quantité de substrats non dissous au début de chaque incubation est calculée comme la somme de la quantité de cellulose introduite, et de la quantité de carbone potentiellement dégradable apportée par la biomasse exogène (estimée à partir de la mesure de la matière volatile et de l'analyse élémentaire des biomasses). La quantité de carbone apportée avec l'inoculum issu du digestat mésophile a été négligée, car celui-ci est stabilisé et on le considère adapté aux conditions environnementales imposées dans le bioréacteur.

2.4.1. Co-inoculation avec le contenu ruminal

Au départ, 105,4 mg de carbone non soluble sont introduits sous forme de cellulose, ainsi qu'environ 62 mg de carbone non soluble (157 mg de matière volatile) avec le contenu ruminal.

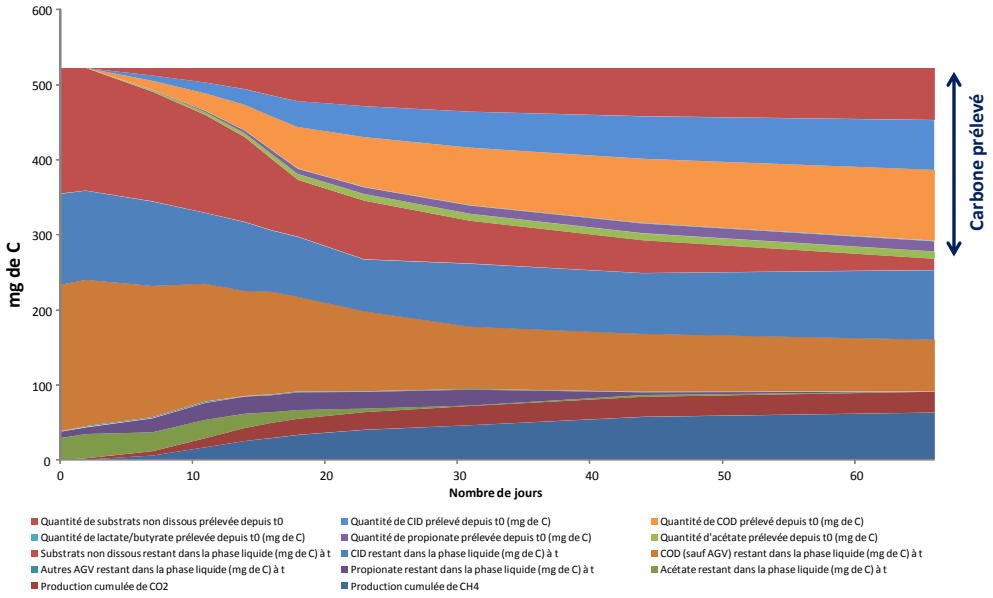


Figure 111 : Répartition du carbone au cours du temps, expérience IM_{Rumen}.

Au total, environ la moitié du carbone présent initialement a été exportée sous forme de prélèvements liquides. En particulier, une quantité importante de substrat non dissous (70 mg) et d'AGV (25 mg) n'ont pas pu être dégradés car ôtés du bioréacteur. On peut noter qu'une partie des COD (hors AGV) a été dégradée (sans doute apportée par le contenu ruminal, environ 30 mg). Enfin, quasiment la totalité

des substrats non solubles a été dégradée (ou prélevée) à la fin de l'incubation (il reste environ 15 mg de carbone).

2.4.2. Co-inoculation avec la boue de bassin d'aération

Au départ, 105,4 mg de carbone non soluble sont introduits sous forme de cellulose, ainsi qu'environ 45 mg de carbone non soluble (110 mg de matière volatile) avec la boue de bassin d'aération.

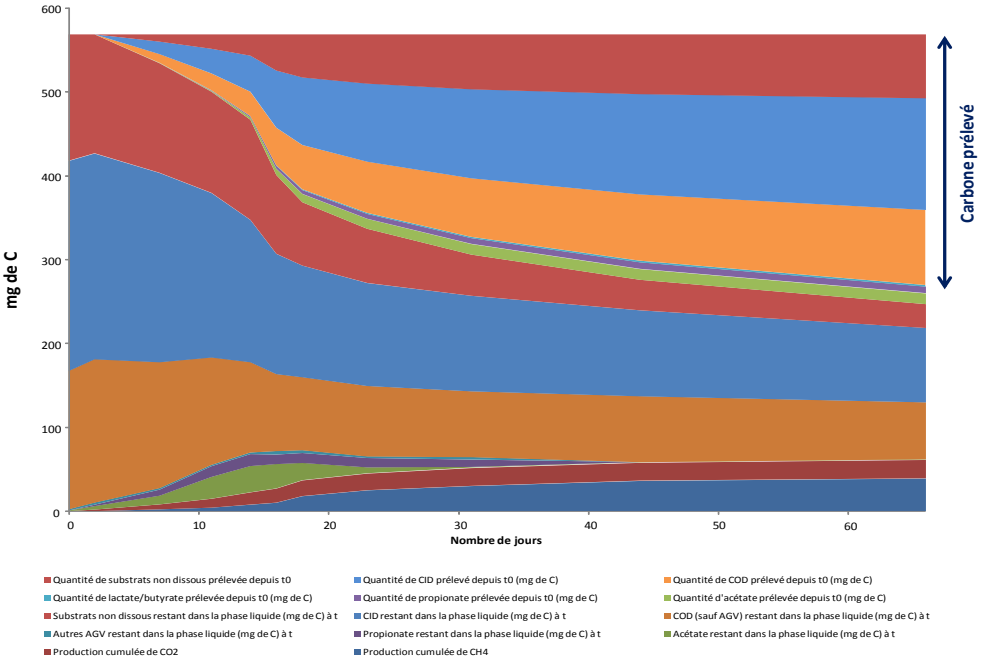


Figure 112 : Répartition du carbone au cours du temps, expérience IM_{Boue}.

Au total, plus de la moitié du carbone présent initialement a été exportée sous forme de prélèvements liquides. En particulier, une quantité importante de substrat non dissous (75 mg) et d'AGV (21 mg) n'ont pas pu être dégradés car ôtés du bioréacteur. En fin d'incubation, environ 28 mg de substrats non solubles sont encore présents dans le bioréacteur. On peut noter qu'une petite quantité de CID a été consommée (environ 15mg).

2.4.3. Bilan

Ces graphiques font apparaître l'influence non négligeable des prélèvements liquides sur les flux de carbone. Une grande partie des substrats ou des intermédiaires de dégradation sont prélevés avant de pouvoir être convertis en biogaz. Ceci explique en partie les rendements apparents de conversion de la cellulose en biogaz inférieurs à ceux attendus. On estime en effet que la quantité de carbone assimilée par les microorganismes est d'environ 5% de celle contenue dans la cellulose initiale (*8*) ce qui n'était pas ici suffisant pour expliquer le défaut de production de gaz. On peut de plus noter que le maximum de concentration des AGV ainsi que la production de gaz sont plus tardifs dans l'expérience IM_{Boue} que dans IM_{Rumen}. Par conséquent, une partie plus importante d'intermédiaires ou de cellulose non dégradée a été ôtée avec les prélèvements liquides pour IM_{Boue}, ce qui peut expliquer en partie la production de biogaz plus faible observée.

3. Analyses microbiologiques

3.1. Détermination des populations fonctionnelles

Pour les deux expériences IM_{Rumen} et IM_{Boue}, les ADN de l'ensemble des échantillons prélevés au cours du temps dans l'une des incubations réalisée avec de la cellulose marquée ont été extraits et ultracentrifugés dans un gradient de CsCl. Après ultracentrifugation, l'évolution au cours du temps des profils concentration d'ADN/densité de l'ADN obtenus a été observée.

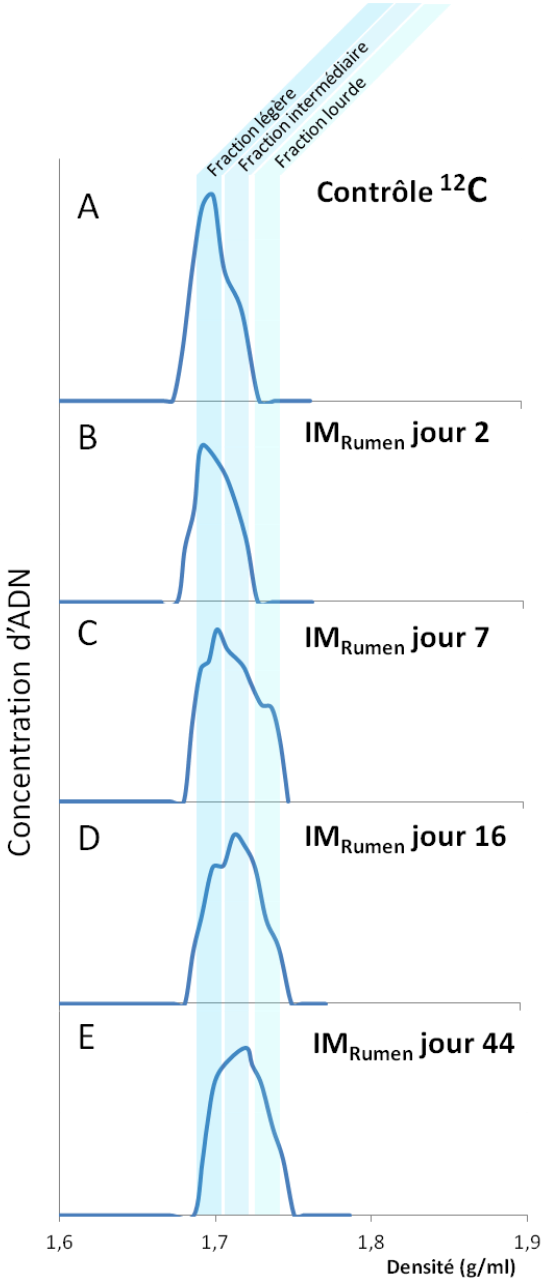


Figure 113 : Profils de densité de l'ADN issu de IM_{Rumen} après ultracentrifugation.

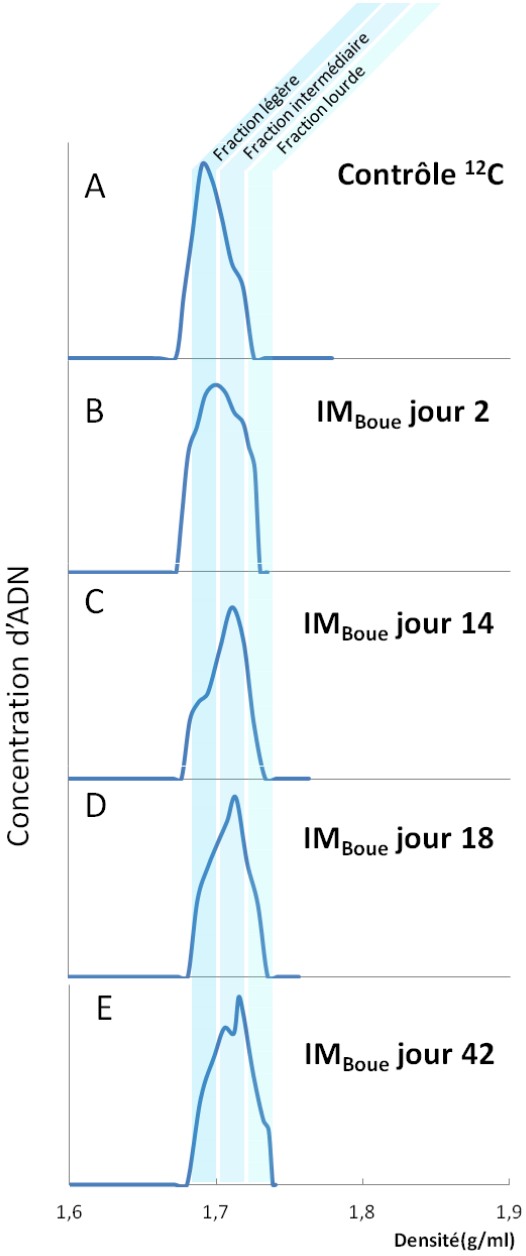


Figure 114 : Profils de densité de l'ADN issu de IM_{Boue} après ultracentrifugation.

Les ADN des échantillons contrôles des incubations avec substrat non enrichi présentent une distribution de densité allant de 1,68 à 1,71 g/ml (Figure 86 A et Figure 87 A). Les ADN des incubations avec substrat enrichi montrent, par comparaison avec les témoins non enrichis, un pic de densité plus élevée. Au cours du protocole d'ultracentrifugation, ce pic a été recueilli en trois fractions différentes, appelées L-DNA, M-DNA, H-DNA, pour respectivement la fraction légère (Light-DNA), une fraction intermédiaire (Medium-DNA) et la fraction lourde (Heavy-DNA). Elles correspondent à une densité moyenne respective de 1,69 – 1,71 – 1,73 g/ml. La Figure 86 B-C-D-E présente les profils obtenus aux jours 2, 7, 16 et 44 pour IM_{Rumen}. On observe une augmentation de la proportion de la fraction lourde du jour 2 au jour 44. Ce résultat suggère une assimilation progressive du carbone marqué par la biomasse microbienne. La Figure 87 B-C-D-E présente quant à elle les profils obtenus aux jours 2, 14, 23 et 42 pour IM_{Boue}. Les mêmes conclusions peuvent être tirées de l'observation des profils.

3.2. Observation des profils ARISA de la diversité totale et de la diversité fonctionnelle

Des profils ARISA des communautés archées et bactéries ont été réalisés régulièrement au cours de la dégradation (environ 12 points au cours de l'incubation), ainsi que sur les fractions lourdes, légères et intermédiaires de l'ADN après ultracentrifugation de l'ADN.

3.2.1. Co-inoculation avec du contenu ruminal

3.2.1.1. Diversité totale

La principale évolution observée au cours du temps sur les profils archées est l'augmentation de l'intensité d'une bande à 390 pb (Figure 115). Les profils archées sont assez stables au cours du temps.

Figure 115 : Evolution des profils ARISA des archées, expérience IM_{Rumen}.

De même, les profils de diversité observés pour les bactéries (

Figure 116) sont relativement stables au cours du temps. Quelques changements peuvent cependant être observés dans les profils, et reliés aux données physico-chimiques. Au jour 2, une bande (bande A, 280 pb) apparaît sur les profils et reste présente jusqu'au jour 14. Elle disparaît ensuite, ce qui correspond à la diminution de la concentration d'acide acétique, et possiblement à la fin de la production d'acide acétique. Entre les jours 14 et 31, une autre bande apparaît (bande B, 240 pb). Ces dates correspondent à une dégradation importante de l'acide acétique. Enfin, de nouvelles bandes entre 350 et 500 pb apparaissent sur les profils après le jour 31 et pourraient correspondre à des microorganismes dégradant l'acide propionique.

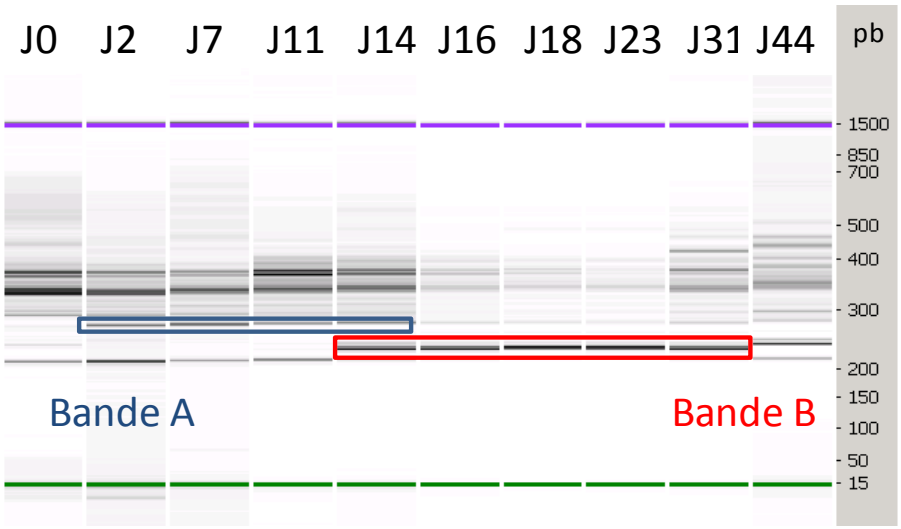


Figure 116 : Evolution des profils ARISA des bactéries, expérience IM_{Rumen}.

3.2.1.2. Diversité fonctionnelle

Des informations plus précises peuvent être obtenues à partir des profils ARISA bactériens des fractions lourdes et légères de l'ADN après ultracentrifugation. Les figures suivantes (Figure 117) présentent les profils obtenus aux jours 2, 16 et 44.

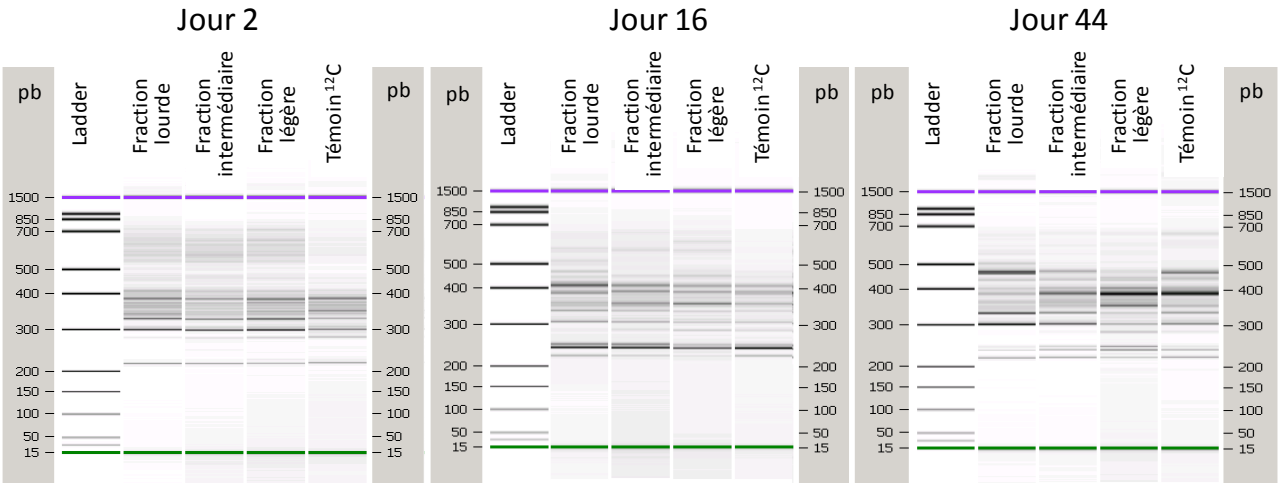


Figure 117 : Diversité fonctionnelle bactérienne, jour 2, 16 et 44, expérience IM_{Rumen}.
Profils des fractions lourdes, intermédiaires, légères et de l'incubation témoin avec substrat non marqué.

Au jour 2, aucune différence n'est observée entre la fraction lourde et légère. Le ^{13}C de la cellulose n'est pas encore assez incorporé dans les microorganismes. Au jour 16, l'intensité des bandes à 240 (bande B), 300, 330 et 400 pb est plus importante dans la fraction lourde que dans la légère. Au contraire, la bande à 350 pb est moins intense. Les différences entre les profils ARISA lourds et légers sont plus importantes car l'enrichissement en ^{13}C est plus important. Finalement, au jour 44, les différences sont encore plus claires. Les bandes à 300, 330 et 470 pb sont retrouvées dans la fraction lourde, alors que les bandes à 350 et 395 et 410 pb sont retrouvées spécifiquement dans la fraction légère.

Par ailleurs, les profils ARISA réalisés sur les archées après le SIP confirment que la bande à 390 pb trouvée dans les profils réalisés avec l'ADN total correspondent à un microorganisme retrouvé dans la fraction lourde de l'ADN (résultats non montrés)

3.2.2. Co-inoculation avec la boue de bassin d'aération

3.2.2.1. Diversité totale

Dans cette expérience également, peu de modifications de profils sont observées pour les archées (Figure 118). L'intensité d'une bande à 390 pb augmente au cours de l'incubation.

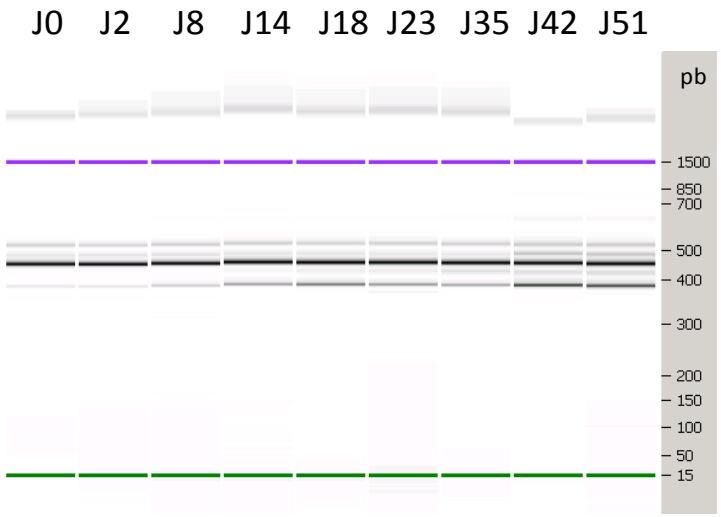


Figure 118 : Evolution des profils ARISA des archées, expérience IM_{Boue}.

Les profils obtenus pour les bactéries montrent plus d'évolution (Figure 119). Le premier changement important qui est observé est l'augmentation de l'intensité des bandes à 380 et 500 pb entre les jours 2 et 8. Cette période correspond à la dégradation de la cellulose et à la production des AGV. Les microorganismes de ces bandes sont sans doute responsables de cette dégradation, ce qui est conforté par le fait que l'intensité des bandes diminue entre les jours 14 et 18 lorsque la dégradation de la cellulose est terminée. Entre les jours 14 et 18, une bande apparaît vers 240 pb et se maintient tout au long de la dégradation de l'acide acétique. Le microorganisme correspondant est donc sans doute impliqué dans cette dégradation. Enfin, entre les jours 23 et 42, on peut observer l'apparition de différentes bandes à 220 pb et entre 350 et 500 pb. La grande diversité observée à ce moment est sans doute due à la réalisation concomitante de différents processus métaboliques.

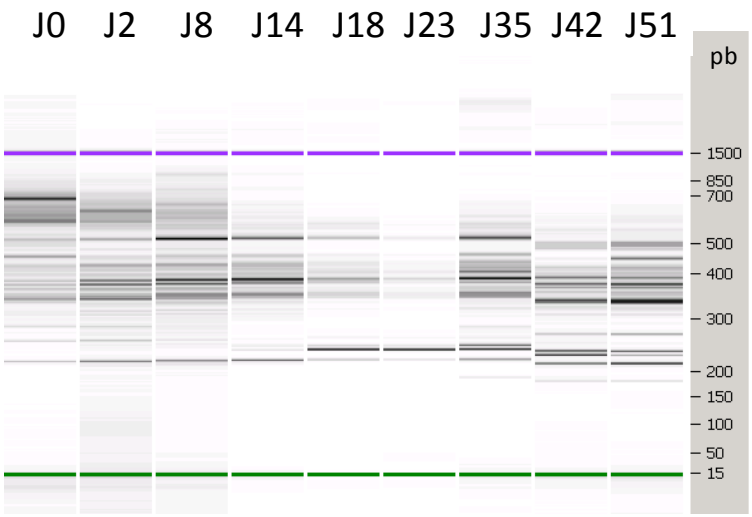


Figure 119 : Evolution des profils ARISA des bactéries, expérience IM_{Boue}.

3.2.2.2. Diversité fonctionnelle

De la même façon que pour la co-inoculation avec du contenu ruminal, la diversité fonctionnelle bactérienne a été comparée à différents points de temps (jours 2, 18 et 42) après ultracentrifugation de l'ADN (Figure 120).

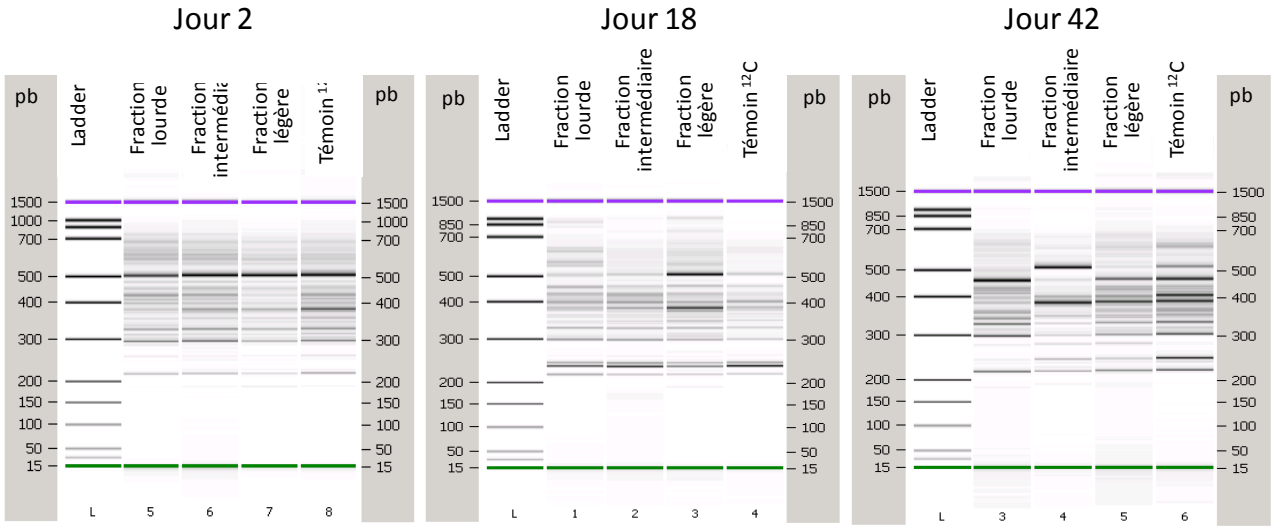


Figure 120 : Diversité fonctionnelle bactérienne, jour 2, 18 et 42, expérience IM_{Boue}.
Profils des fractions lourdes, intermédiaires, légères et de l'incubation témoin avec substrat non marqué.

Au jour 2, on n'observe pas de différence entre les profils lourds et les profils légers, ce qui est logique car la dégradation de la cellulose n'est pas encore assez amorcée. Au jour 18, des différences peuvent être remarquées. Deux bandes visibles à 390 et 510 pb sont retrouvées dans la fraction légère, elles correspondent à des microorganismes non impliqués dans la dégradation de la cellulose. Au contraire, une bande à 240 pb est retrouvée principalement dans la fraction lourde et correspond donc à un microorganisme potentiellement impliqué dans la dégradation de la cellulose ou d'un de ses sous-produits, probablement l'acide acétique (*cf.* paragraphe précédent). Enfin au jour 42, on observe de

nouveau des bandes spécifiques de la fraction légère (250, 390 et 410 pb), et d'autres spécifiques de la fraction lourde (entre 300 et 380 pb, ou encore 480 pb), déjà remarquées dans l'étude des profils de diversité totale.

Les mêmes observations pour les archées (données non montrées) permettent de conclure que la bande à 390 pb est bien retrouvée dans les profils lourds et correspond donc à un microorganisme potentiellement impliqué dans la chaîne de dégradation de la cellulose.

3.2.3. Comparaison entre les différentes expériences

L'étude parallèle des données de fingerprinting et des données physico-chimiques (gaz et AGV) permet d'envisager diverses hypothèses et de dégager de grandes tendances quant aux acteurs possibles des différentes voies métaboliques mises en jeu. L'utilisation des marqueurs isotopiques permet de pousser encore plus loin ces hypothèses et de les préciser. Cependant, il est difficile de faire directement le lien entre les évolutions des fingerprints et l'identité des microorganismes mis en jeu. Des expériences de clonage et séquençage des différentes bandes ARISA d'intérêt seraient nécessaires pour identifier précisément les microorganismes susceptibles d'intervenir dans les réactions métaboliques identifiées. Malgré tout, ces observations permettent de consolider les hypothèses soulevées quant au déroulement de la dégradation de la cellulose et des autres substrats carbonés dans le bioréacteur, et dessinent un lien entre évolution de la diversité microbienne et avancement de la dégradation. Enfin, on peut noter que les profils ARISA archées obtenus pour les deux types de co-inoculation sont très similaires, il faudra confronter ce résultat aux données de séquençage obtenues.

3.3. Interprétation statistique des données ARISA

Les observations que nous venons de réaliser sur les profils ARISA sont uniquement qualitatives et pas entièrement satisfaisantes, l'appréciation des similarités et dissimilarités étant seulement visuelle. La difficulté est d'autant plus importante que le grand nombre de profils réalisés ne permet pas de comparer et d'ordonner tous les profils les uns par rapport aux autres. Pour obtenir des conclusions plus précises, j'ai fait appel au logiciel StatFingerprints (*276*) pour mieux comprendre et analyser les données obtenues et tracé des ACP à partir des profils de diversité totale des incubations IM_{Rumen}, IM_{Boue} et de témoins non co-inoculés.

3.3.1. Archées

Sur le diagramme obtenu pour les archées (Figure 121), on remarque que les points de chaque expérience forment des groupes assez compacts. Les profils correspondant aux situations sans co-inoculation forment un groupe isolé. Les groupes des deux expériences avec co-inoculation présentent une zone de recouvrement. Les points de cette zone de recouvrement ne semblent pas présenter de caractéristique particulière. On peut conclure de ce diagramme que la co-inoculation a modifié les profils de diversité des archées de manière visiblement assez équivalente pour les deux biomasses exogènes.

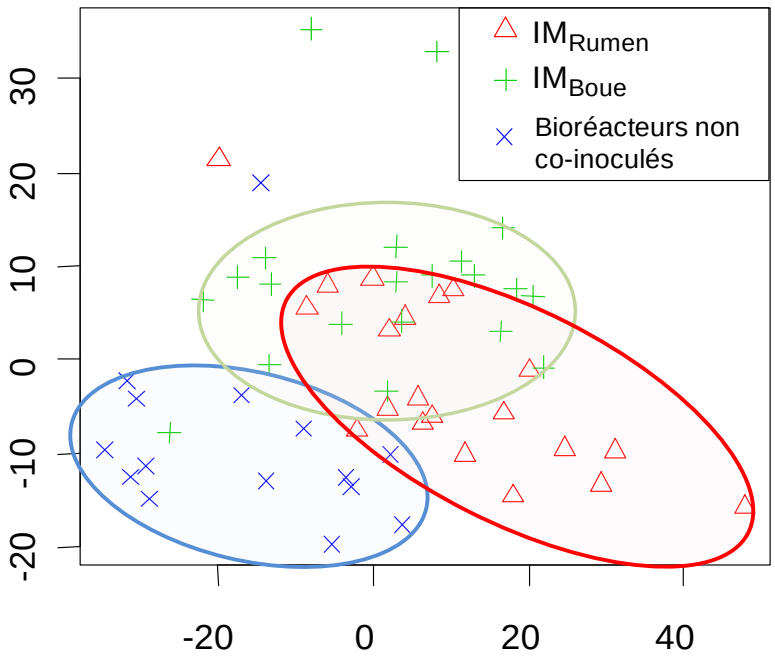


Figure 121 : ACP des profils ARISA archées des expériences IM_{Rumen}, IM_{Boue} et des témoins non co-inoculés. L'axe 1 représente 68% de la diversité, l'axe 2 18%.

3.3.2. Bactéries

La même représentation avec les bactéries donne des résultats un peu différents.

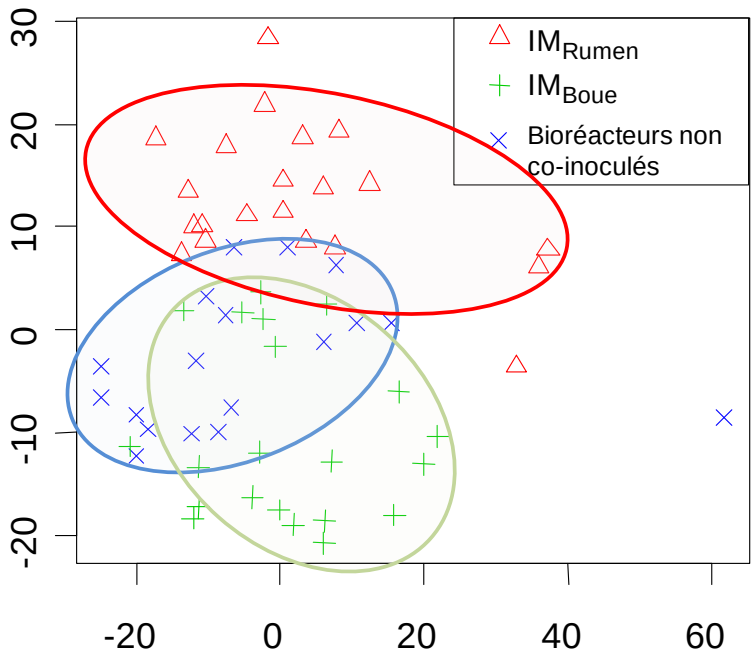


Figure 122 : ACP des profils ARISA bactéries des expériences IM_{Rumen}, IM_{Boue} et des témoins non co-inoculés. L'axe 1 représente 25% de la diversité, l'axe 2 22%.

L'évolution des profils de l'expérience de co-inoculation avec le contenu ruminal par rapport à la situation sans co-inoculation est nette. Les profils sont différents. Pour la co-inoculation avec la boue de bassin d'aération, des différences par rapport aux profils sans co-inoculation sont également

clairement visibles. Quelques profils de IM_{Boue} sont tout de même mêlés aux profils des expériences sans co-inoculation. Il s'agit des prélèvements les plus tardifs, on peut imaginer qu'à ce moment l'essentiel de la dégradation de la cellulose est achevé et que des populations moins spécifiques sont présentes dans les deux expériences (microorganismes recyclant la biomasse morte par exemple). Enfin, il est important de noter que la différence entre les profils des expériences IM_{Rumen} et IM_{Boue} est beaucoup plus importante pour les bactéries que pour les archées.

3.3.3. Bilan

Cette représentation permet d'observer les tendances de modification de la **diversité totale** suite à la co-inoculation. Les tendances sont différentes pour archées et bactéries.

Pour les archées, dans les deux cas, la co-inoculation conduit à un décalage des populations d'archées. Ceci est peut-être à mettre en lien avec la quantité très importante de méthane dans le biogaz observée en seconde partie de la production de biogaz. Les modifications observées sont du même type dans les deux expériences, en accord avec la ressemblance des profils ARISA notée plus haut.

Pour les bactéries les profils de IM_{Boue} et de l'expérience sans co-inoculation sont plus proches entre eux qu'avec les profils de l'expérience IM_{Rumen}. La perturbation apportée par la co-inoculation de rumen sur la diversité totale est peut-être plus importante. Différentes hypothèses explicatives sont envisageables. Un nombre plus important de substrats exogènes est apporté dans IM_{Rumen} que dans IM_{Boue}, ce qui pourrait expliquer le développement de communautés microbiennes différentes. Une autre hypothèse serait que les microorganismes du rumen ont survécu quelques jours dans les bioréacteurs avant de mourir induisant des profils plus différents. D'autre part la diversité bactérienne étant plus importante que la diversité archées, les possibilités d'états d'équilibre sont plus nombreuses, d'où des situations plus variées. Quoiqu'il en soit, l'influence de la co-inoculation sur les populations bactériennes n'est pas le même pour les deux biomasses exogènes utilisées, mais il est dans chaque cas important.

3.4. Séquençage de l'ADN

La région V2-V3 (bactéries) ou V3-V4 (archées) de l'ADNr 16S a été amplifiée à partir des extractions réalisées sur les différents inocula (Boue de bassin d'aération, contenu ruminal et digestat anaérobie) et a été pyrosequencée, ainsi que des amplicons issus de la fraction lourde d'un échantillon de IM_{Rumen} au jour 16 et de IM_{Boue} au jour 18. Ces dates ont été choisies car elles correspondent à une étape où environ un tiers du méthane a été produit, et à un décalage net dans les profils de densité pour l'ADN (Figure 86 D et Figure 87 D). Ces échantillons semblaient présenter le meilleur compromis pour à la fois identifier clairement les microorganismes impliqués dans les processus cataboliques tout en limitant les biais possibles dus au cross-feeding. Les figures suivantes résument les résultats obtenus pour les archées (Figure 123), et pour les bactéries (Figure 124) pour les différents échantillons.

3.4.1.1. Archées

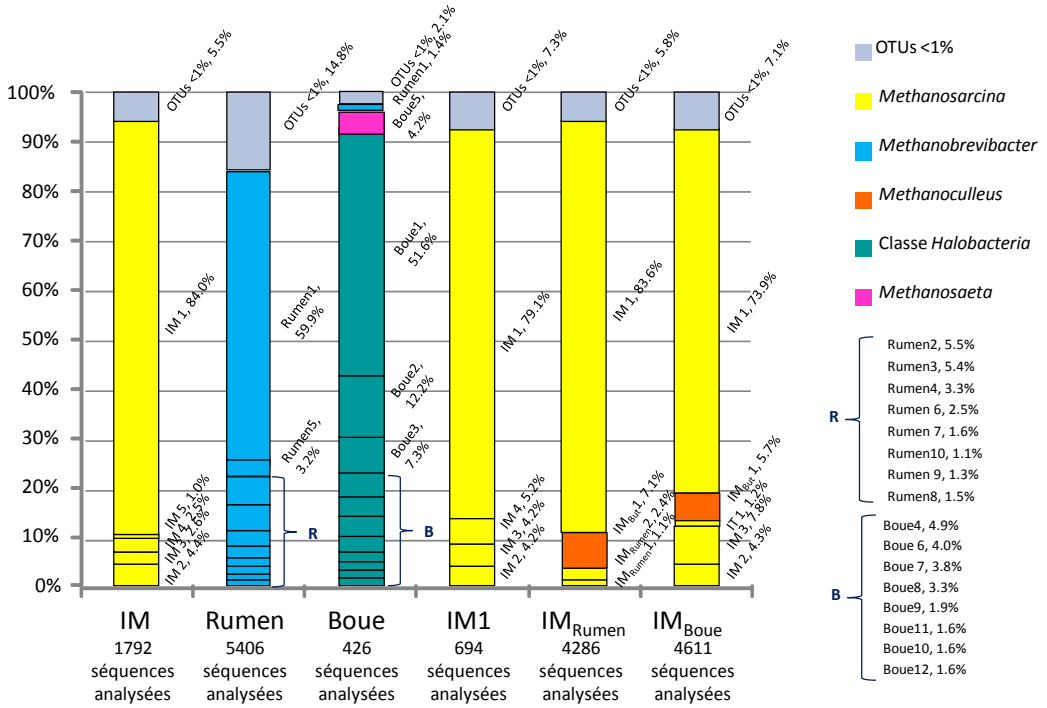


Figure 123 : Composition de la communauté archées des échantillons de l'expérience de co-inoculation.

Le digestat anaérobie utilisé comme inoculum contient uniquement des archées du genre *Methanosarcina* (5 OTUs principaux, dont un ultra majoritaire). Les populations d'archées du contenu ruminal sont principalement du genre *Methanobrevibacter* (93% du total des séquences, dont 10 OTUs principaux). Les autres OTUs représentent moins de 1% des séquences. La boue d'aérateur contient des archées de la classe *Halobacteria* (93,9%, 11 OTUs), du genre *Methanosaeta* (1 OTU, 4,2%) et du genre *Methanobrevibacter* (1,9%, 1 OTU principal). Il n'y a pas de point commun entre les OTUs des biomasses exogènes et du digestat anaérobie. Seul un OTU du genre *Methanobrevibacter* est commun entre la boue d'aérateur et le contenu ruminal.

Methanosarcina devient le genre dominant dans le réacteur de l'expérience IM_{Rumen} après 16 jours d'incubation (90% de la population, 3 OTUs, l'un d'eux contient plus de 84% des séquences) ainsi que dans le réacteur de l'expérience IM_{Boue} (91,5% des séquences, 4 OTUs), les autres séquences étant du genre *Methanoculleus* (7,1% pour IM_{Rumen}, 5,7% pour IM_{Boue}, 1 OTU identique pour les deux expériences). Les communautés des deux réacteurs sont assez semblables (79,7% de séquences communes pour IM_{Boue} et 90,7% pour IM_{Rumen}). Ces OTUs étaient tous présents à l'origine dans le digestat anaérobie (certains comptaient moins de 1% des séquences cependant), et aucun ne provient du contenu ruminal ou de la boue anaérobie. Les archées de ces deux biomasses ne se sont pas adaptées et développées dans les conditions environnementales du bioréacteur de dégradation de la cellulose.

La fraction fonctionnelle d'une expérience similaire de dégradation de la cellulose mais sans co-inoculation montre la présence d'archées du genre *Methanosarcina* à 100% dans la population archées, sous forme de 4 OTUs principaux, donc un est commun avec IM_{Rumen} (84% des séquences) et 4 communs avec IM_{Boue} (91,5% des séquences). Ceci montre que l'influence de la co-inoculation sur le

développement des populations archées est faible mais non nulle, la différence principale venant de la présence des archées du genre *Methanoculleus* dans les réacteurs co-inoculés, et des proportions relatives des différents OTUs de *Methanosarcina*.

3.4.1.2. Bactéries

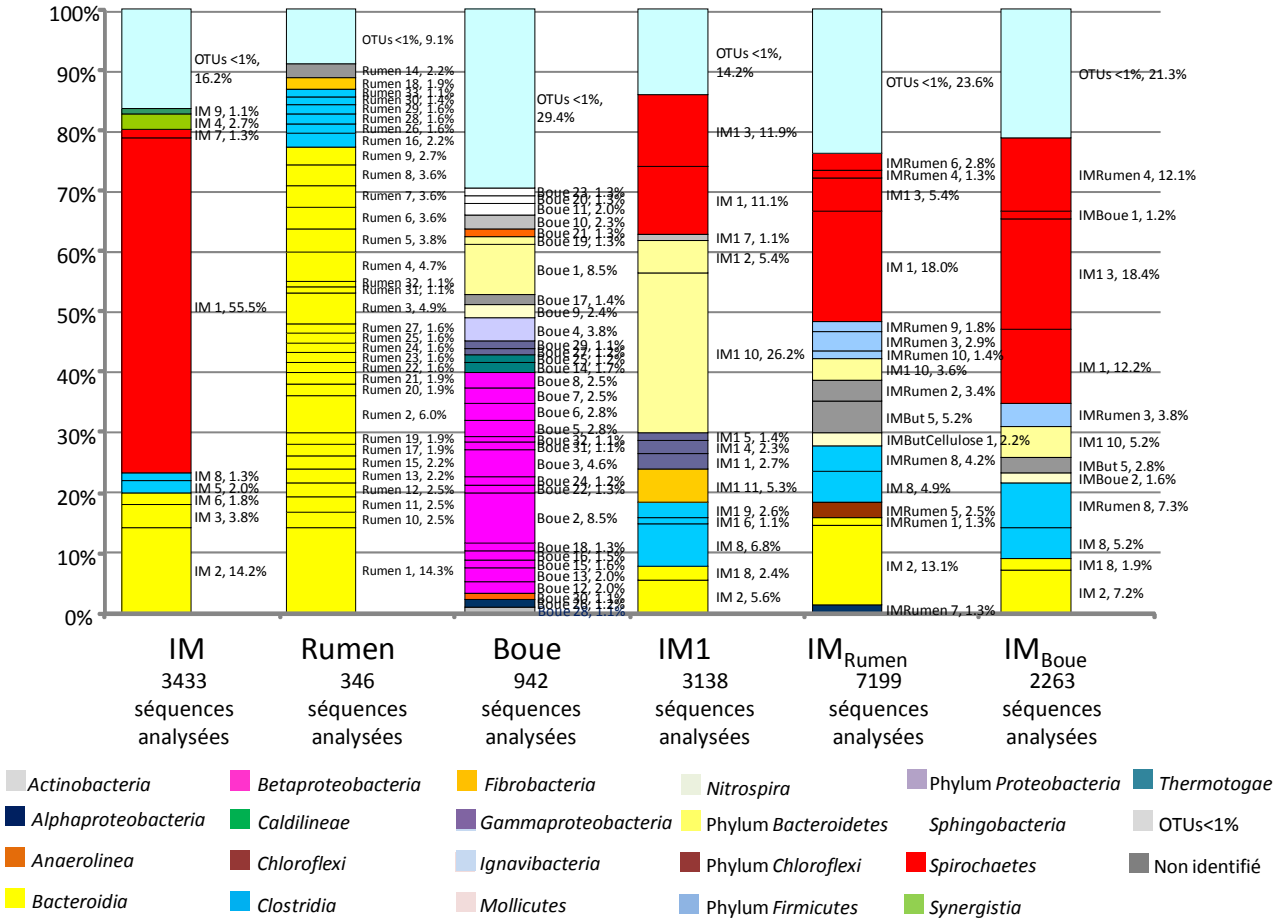


Figure 124 : Composition de la population bactérienne des échantillons de l'expérience de co-inoculation.

Les bactéries retrouvées dans l'inoculum industriel appartiennent aux classes *Spirochaetes* (59%, 2 OTUs principaux), *Bacteroidia* (21%, 3 OTUs principaux), *Clostridia* (9%, 2 OTUs principaux), *Synergistia* (6%, 1 OTU principal) et *Thermotogae* (1 %, 1 OTU principal). Ces microorganismes sont fréquemment retrouvés dans les digesteurs anaérobies (*281*). Au total, 9 OTUs principaux sont présents (contenant plus de 1% du nombre total de séquences). 16,2% des séquences appartiennent à des OTUs contenant moins de 1% du nombre total de séquences.

Les bactéries identifiées dans le contenu ruminal appartiennent aux classes *Bacteroidia* (77,2%, 25 OTUs), *Clostridia* (9,6%, 6 OTUs), *Fibrobacteria* (1,9%, 1 OTU). 2,2% des séquences forment 1 OTU bactérien non identifié. 33 OTUs principales (90,9% du nombre total de séquences) ont au total été identifiées dans le contenu ruminal. Aucune de ces OTUs n'est commune avec celles trouvées dans le digestat anaérobie.

La boue de bassin d'aération présente également une diversité bactérienne très importante comme c'est souvent le cas dans ce type de milieu. Au total, 32 OTUs principaux ont été identifiés représentant

70,1% des séquences. Parmi eux, 15 OTUs (36,6% des séquences) appartiennent à la classe *Betaproteobacteria*, 2 OTUs (2,3%) à la classe *Gammaproteobacteria,* 1 OTU (1,1%) à la classe *Alphaproteobacteria*, 1 OTU (1,1%) au phylum *Proteobacteria* sans que la classe puisse être identifiée (2,3%). 3 OTUs (4,6%) appartiennent à la classe *Sphingobacteria*, 2 OTUs au phylum *Bacteroidetes* (9,8%) sans que la classe puisse être identifiée. 2 OTUs appartiennent à la classe *Caldilineae* (2,9%), 1 OTU (1,1%) à la classe *Anaerolinea,* 1 OTU (1,3%) au phylum *Chloroflexi* sans que la classe puisse être identifiée, 1 OTU (3,8%) appartient à la classe *Ignavibacteria*, 1 OTU (2,4%) à la classe *Nitrospira*, 1 OTU (1,1%) à la classe *Actinobacteria* et 1 OTU (1,4%) est non identifié. Enfin, 29,9% des séquences appartiennent à des OTUs représentant moins de 1% du total des séquences, ce qui confirme la diversité très importante de ce système.

Les bactéries retrouvées dans IM_{Rumen} pendant la dégradation de la cellulose ont été comparées à celles trouvées dans les inocula. 17 OTUs principaux ont été identifiés (plus de 1% des séquences totales chacun). Les principales classes retrouvées sont *Spirochaetes* (29%, 4 OTUs principaux), *Bacteroidia* (16%, 2 OTUs principaux), *Clostridia* (14%, 2 OTUs principaux), *Mollicutes* (7%, 1 OTU principal), *Alphaproteobacteria* (6%, 1 OTU principal), *Chloroflexi* (2%, 1 OTU principal). Plusieurs séquences ont seulement pu être affectées à des phylums (*Firmicutes*, 4%, 3 OTUs - *Bacteroidetes*, 4%, 1 OTU) et 10% des séquences de bactéries (2 OTUs) n'ont pas été identifiées. 23,6% des séquences appartiennent à un OTU contenant moins de 1% du nombre total de séquences. Une comparaison détaillée de séquences sur la base des OTUs montre que les microorganismes identifiés lors de la dégradation de la cellulose n'appartiennent à aucun des OTUs retrouvés dans le contenu ruminal. Par contre, 36% des séquences (3 OTUs, classes *Spirochaetes*, *Bacteroidia, Clostridia*) sont originaires du digestat anaérobie. D'autres espèces retrouvées lors de la dégradation de la cellulose (*Spirochaetes*, *Mollicutes*, *Bacteroidia*) sont également retrouvées dans le digestat anaérobie (et pas dans le rumen), mais représentaient moins de 1% des séquences. Des espèces sous-dominantes dans le digestat initial ont probablement conquis plusieurs niches écologiques au cours de dégradation de la cellulose.

De la même façon, l'identité des bactéries retrouvées dans la fraction fonctionnelle de l'ADN de IM_{Boue} pendant la dégradation de la cellulose a été comparée à celle des inocula initiaux. 12 OTUs principaux (78,7% des séquences) sont identifiés. 4 OTUs (43,9% des séquences) appartiennent à la classe *Spirochaetes,* 2 OTUs (12,5% des séquences) à la classe *Clostridia* et 1 OTU (3,8% des séquences) au phylum *Firmicutes.* 2 OTUs (9,1% des séquences) appartiennent à la classe *Bacteroidia* et 1 OTU (5,2% des séquences) au phylum *Bacteroidetes.* 1 OTU (1,1% des séquences) appartient à la classe *Mollicutes* et un OTU représentant 2,8% des séquences n'a pas pu être identifié. La comparaison détaillée des OTUs montre qu'aucune espèce issue de la boue d'aérateur ne s'est implantée dans les digesteurs de cellulose. Comme pour l'expérience IM_{Rumen}, 3 OTUs sont originaires du digestat anaérobie (24,6% des séquences). Il s'agit des mêmes OTUs que pour IM_{Rumen}, mais dans des proportions différentes.

La comparaison des séquences de IM_{Boue} et IM_{Rumen} montre 9 OTUs communs, soit 74,1% des séquences de IM_{Boue} et 58,7% des séquences de IM_{Rumen}. Il y a donc une importante part de diversité commune dans ces deux expériences, cependant les proportions de chacun des OTUs sont différentes dans les différents bioréacteurs. Certains de ces OTUs étaient présents à moins de 1% dans le digestat

anaérobie initial ou non détectés. L'apport d'une biomasse exogène a créé des conditions favorables à la croissance de ces microorganismes et à leur établissement dans les bioréacteurs.

Enfin, si on compare ces échantillons à une expérience similaire de dégradation de la cellulose mais sans bioaugmentation (expérience IM1, voir chapitres précédents), on trouve 5 OTUs communs avec IM_{Rumen} (45 % des séquences) et 6 OTUs communs avec IM_{Boue} (50 % des séquences). Dans les deux cas, il s'agit des mêmes OTUs, mais dans des proportions différentes. La perturbation apportée semble avoir eu des conséquences importantes sur l'équilibre de diversité bactérienne au sein des digesteurs de cellulose.

3.4.1.3. Bilan

L'analyse des données de séquences montre que les flores ruminales ou issues de la boue d'aérateur ne se sont pas implantées dans les digesteurs, malgré la disponibilité de la cellulose comme substrat organique principal. Cependant, même si aucune espèce n'a réussi à s'implanter dans les digesteurs, des effets de la co-inoculation sur la diversité microbienne ont été observés. La co-inoculation a conduit à une modification de la diversité bactérienne dans le digesteur.

L'indice de diversité de Shannon, calculé à partir de la proportion relative de chacun des OTUs de chaque échantillon illustre les modifications de diversité. Le Tableau 14 regroupe les indices de diversité de Shannon pour les archées pour l'ensemble des échantillons séquencés dans cette expérience. Cet indice est le plus élevé pour les deux biomasses exogènes. Les valeurs de l'indice de diversité dans le digestat anaérobie ou dans des digesteurs de cellulose co-inoculés avec le rumen, la boue d'aérateur ou non co-inoculés sont du même ordre. La co-inoculation a donc eu un effet limité sur la diversité archées des bioréacteurs.

Tableau 14 : Indice de diversité de Shannon calculé à partir de la proportion relative des OTUs archées pour les échantillons de l'expérience de co-inoculation.

Echantillon	Digestat anaérobie	Contenu ruminal	Boue d'aérateur	IM_{Rumen}	IM_{Boue}	IM1 (non co-inoculé)
Indice de Shannon	1,2	3,3	3,2	1,2	1,8	1,5

Les mêmes calculs réalisés avec les OTUs bactériens montrent des résultats différents (Tableau 15).

Tableau 15 : Indice de diversité de Shannon calculé à partir de la proportion relative des OTUs bactériens pour les échantillons de l'expérience de co-inoculation.

Echantillon	Digestat anaérobie	Contenu ruminal	Boue d'aérateur	IM_{Rumen}	IM_{Boue}	IM1 (non co-inoculé)
Indice de Shannon	3,5	9,0	8,7	5,9	4,9	4,2

On retrouve une très forte diversité dans les deux biomasses exogènes. Par comparaison, le niveau de diversité dans les deux réacteurs co-inoculés est plus faible, mais plus important que dans le réacteur non co-inoculé ou dans le digestat anaérobie initial. La co-inoculation a donc eu pour conséquence une augmentation de la diversité bactérienne au sein des différents bioréacteurs. En particulier, les équilibres

et la proportion relative des différents OTUs a été modifiée, et des OTUs initialement sous-dominants et peu représentés ont pu se développer.

Pour les deux biomasses exogènes, la co-inoculation a permis de modifier environ la moitié de la population bactérienne. Les modifications induites par les deux biomasses sont différentes. On retrouve les résultats qualitatifs obtenus par l'analyse statistique des données ARISA.

4. Discussion

Dans le but d'évaluer les conséquences de la co-inoculation sur le fonctionnement des bioréacteurs de dégradation de la cellulose, les dynamiques métaboliques et écologiques ont été analysées.

4.1. Dynamiques métaboliques

Pour estimer plus précisément l'importance de la dégradation de la cellulose et des co-inocula dans les différentes incubations, des calculs de bilan matière ont été réalisés. Ces calculs ont notamment été effectués à partir des graphiques présentés au paragraphe 2.4. Ils prennent en compte l'influence des prélèvements liquides qui ôtent du bioréacteur des métabolites issus de la digestion de la cellulose et des inocula avant leur dégradation en biogaz. Le taux de dégradation de la cellulose a été déduit de ces calculs et des données isotopiques d'analyse des AGV des incubations avec substrat marqué. La dégradation des «co-inocula » a quant à elle été estimée à partir des données obtenues pour les contrôles sans cellulose. Ces calculs (non détaillés dans ce chapitre) indiquent qu'environ 95% de la cellulose marquée a été catabolisée dans l'expérience IM_{Rumen} et dans l'expérience IM_{Boue}. Les 5% restant ont possiblement été incorporés dans la biomasse. La fonction « dégradation de la cellulose » se réalise donc très efficacement. La quantité de cellulose catabolisée est sensiblement équivalente dans les deux cas, bien que le taux de conversion de la cellulose en biogaz soit différent, en raison d'une influence différente des prélèvements liquides. D'autre part, j'ai calculé qu'environ 66% (respectivement 60%) du carbone organique contenu initialement dans le contenu ruminal (la boue de bassin d'aération) ont été catabolisés. Cette estimation montre qu'en plus de la cellulose, une partie importante des co-inocula a été digérée comme substrat. Dans le cas de IM_{Boue}, cette quantité est plus faible notamment car l'apport de ^{12}C exogène facilement disponible était plus faible.

Deux observations intéressantes peuvent également être faites à partir des données obtenues pour IM_{Rumen} et IM_{Boue} qui distinguent ces expériences d'autres incubations de cellulose sans co-inoculation. Une **accumulation d'acide propionique est observée**. Les accumulations d'acide propionique sont souvent considérées comme des indications d'une instabilité des processus (*339*). Même si la dégradation de la cellulose démarre rapidement dans ces systèmes, la co-inoculation pourrait être responsable de **perturbations** dans les voies métaboliques de dégradation ayant pour conséquence une accumulation de l'acide propionique.

Pour IM_{Rumen}, l'acide propionique ne commence à être dégradé qu'au jour 20, quand tout l'acide acétique est consommé. A partir de ce moment, il n'y a plus de production de dioxyde de carbone, mais seulement de méthane, ce qui laisse penser que la **méthanogenèse hydrogénotrophe est dominante**.

Cette observation peut être liée à une sensibilité accrue à l'inhibition par l'acide propionique de la voie acétoclaste par rapport à la voie hydrogénotrophe. Dans cette expérience, la voie métabolique employée pourrait être la dégradation de l'acide propionique suivie de l'oxydation syntrophique de l'acide acétique. Après séparation de l'ADN par SIP, les archées dominantes dans la fraction lourde au jour 16 sont du genre *Methanosarcina*. Ces archées peuvent être des méthanogènes soit hydrogénotrophes, soit acétoclastes. Cette observation suggère par conséquent un changement dans les voies métaboliques de la méthanogenèse associé à une communauté d'archées stable dominée par des membres du genre *Methanosarcina*, comme déjà décrit (*340*).

Pour IM_{Boue}, les observations sont légèrement différentes. L'accumulation d'acide propionique est moins importante. Celle-ci est concentrée au début de l'incubation, puis augmente peu ensuite. Peut-être que comme pour IM_{Rumen}, l'accumulation d'acide propionique est le signe d'une perturbation, mais celle-ci semble moins importante pour IM_{Boue}, le système se stabilisant de nouveau plus rapidement. De même, la production seulement de méthane à partir du jour 20 suggère une évolution du métabolisme vers la méthanogenèse hydrogénotrophe, par des archées dominées par le genre *Methanosarcina*. Enfin, les données isotopiques suggèrent que la dégradation de la cellulose ^{13}C par rapport aux autres substrats non enrichis serait plus tardive dans IM_{Boue} que IM_{Rumen}, où elle est importante dès le début de l'incubation.

Les différences métaboliques entre les deux expériences sont donc plutôt de l'ordre cinétique pour la dégradation de la cellulose, et d'intensité de la perturbation induite dans les systèmes, qui se traduit par une quantité plus ou moins importante d'acide propionique accumulé. L'orientation des voies métaboliques vers la méthanogenèse hydrogénotrophe est également caractéristique de ces expériences par rapport à des témoins sans co-inoculation. La fonction globale « dégradation de la cellulose » ne semble pas donc affectée par rapport à une situation sans co-inoculation, même si son déroulement est modifié.

4.2. Dynamiques écologiques

4.2.1. Devenir des biomasses co-inoculées

4.2.1.1. Contenu ruminal

Même si on observe une dégradation efficace de la cellulose, tous les microorganismes initialement présents dans les inocula ne s'adaptent pas et ne se mettent pas en place dans les microcosmes. Plus précisément, pour IM_{Rumen}, aucune espèce trouvée dans le contenu ruminal n'est retrouvée dans le bioréacteur après 16 jours, alors que plusieurs espèces du digestat anaérobie demeurent actives. La co-inoculation n'a pas permis l'expression au même niveau d'à la fois la biomasse naturelle (contenu ruminal) et industrielle (digestat anaérobie) au cours de la dégradation de la cellulose. Les deux inocula sont en concurrence pour la réalisation d'un processus fonctionnel. La flore industrielle est plus polyvalente que la flore naturelle et résiste probablement mieux aux changements de paramètres. Au contraire, les espèces du rumen, hautement spécialisées, ne se sont pas adaptées et établies dans les microcosmes, même si les conditions expérimentales étaient conçues pour faciliter l'implantation de

cette flore. En effet, 18% de l'inoculum était composé de flore ruminale, la cellulose est un substrat adapté pour ces microorganismes et le système expérimental utilisé était un système batch, permettant de prévenir le lavage des microorganismes du rumen. Cependant les fonctions ruminales n'ont pas pu s'exprimer, même si les paramètres expérimentaux étaient au-delà de ce qui pourrait raisonnablement être atteint dans un contexte industriel.

D'autres paramètres spécifiques sont sans doute nécessaires et doivent être mieux pris en compte. Ainsi, il a été montré dans des études antérieures que les membres d'une communauté microbienne du rumen ont des besoins nutritionnels spécifiques afin de solubiliser la cellulose à une vitesse optimale (*341-343*). Les conditions environnementales du rumen sont relativement stables au cours du temps (température, pH, CO_2, H_2 et sels) et la flore ruminale croît généralement dans des conditions environnementales très stables. Des modifications de ces paramètres peuvent être pénalisantes (*224, 226, 232*). Dans les conditions environnementales d'un digesteur d'ordure ménagères, la flore ruminale ne survit probablement pas ou n'est pas assez efficace pour se développer et concurrencer des microorganismes plus polyvalents. Une autre hypothèse est que la flore ruminale a été consommée par d'autres microorganismes venant du digestat anaérobie. En effet, d'importantes quantités d'intermédiaires non marqués ont été mesurées dans les réacteurs au cours de la dégradation. Ils sont présents en quantité beaucoup plus importante que dans des expériences de dégradation de la cellulose réalisées sans co-inoculation. Les bilans matière montrent que les intermédiaires ^{12}C ne sont pas issus uniquement du carbone dissous introduit lors du démarrage des incubations, mais également du carbone organique non dissous (les inocula, et en particulier le contenu ruminal). Si on prend en compte ces différents problèmes potentiels, la non mise en place de la flore ruminale n'est pas surprenante.

Toutefois, on note que même si la biomasse ruminale ne s'est pas implantée, seules 45% des séquences sont équivalentes à une incubation sans co-inoculation avec du contenu ruminal. Les conséquences de l'apport de cette biomasse sur le déroulement du bioprocédé ne sont donc pas neutres, nous reviendrons plus en détail sur ces aspects dans les paragraphes suivants.

4.2.1.2. Boue de bassin d'aération

Il était attendu que les microorganismes de la boue de bassin d'aération ne se développent pas dans les bioréacteurs anaérobies. C'est ce qui est observé pour les archées et pour les bactéries. Ces microorganismes n'ont pas survécu et ont été éliminés, ce qui explique une forte production d'intermédiaires ^{12}C. Toutefois, cette biomasse est responsable de la mise en place dans le bioréacteur d'une diversité nouvelle, et a déplacé les niches écologiques existantes. Certains microorganismes minoritaires dans le digestat anaérobie ont profité de niches écologiques perturbées pour s'implanter, et ont peut-être pris la place de microorganismes présents dans le digestat anaérobie initial.

Même si comme prévu aucun des microorganismes de la boue de bassin d'aération ne s'est mis en place dans nos bioréacteurs anaérobies, ils ont eu une influence non négligeable sur la diversité observée lors de la dégradation de la cellulose, et on constate seulement 50% de points communs dans les séquences

bactériennes si on compare les données à celle d'une expérience réalisée dans les mêmes conditions exactement mais sans co-inoculation.

4.2.2. Vers une exploitation du potentiel enzymatique de biomasses exogènes

La mise à profit du potentiel enzymatique de biomasses performantes fait partie des objectifs d'expériences de co-inoculation. Dans cette étude, l'expérience IM_{Rumen} a mis en avant les contraintes et les difficultés rencontrées lors d'une tentative d'exploitation des propriétés du contenu ruminal. Il faut déterminer quelles sont ces limitations afin de les contourner.

Le manque d'une compréhension suffisante du microbiote ruminal est un des défauts de connaissances principaux qui retarde une utilisation effective des fonctions ruminales (*344*). Des études de métagénomique à grande échelle (*345*) du contenu ruminal fourniront des informations clés sur les gènes, les enzymes et les microorganismes impliqués dans la dégradation de la cellulose, mais une meilleure compréhension des besoins des populations ruminales est nécessaire pour être capable de simuler les stratégies digestives animales afin d'obtenir une digestion anaérobie plus efficace des composés ligno-cellulosiques et d'autres résidus. Copier les systèmes digestifs animaux nécessite une reproduction méticuleuse des pressions de sélection qui sont rencontrées dans le rumen (paramètres physico-chimiques, interactions entre la flore et l'animal hôte, etc.) qui permettent la croissance de la flore et l'expression des fonctions. La co-inoculation simple n'est pas suffisante pour exploiter les potentialités du rumen. Il faut aller plus loin, et intégrer à la fois les contraintes métaboliques, environnementales et écologiques nécessaires à la mise en place de l'équilibre enzymatique idéal pour reproduire les performances de systèmes digestifs animaux dans des bioréacteurs industriels de dégradation de déchets.

De nombreuses expériences en conditions aérobies montrent que l'implantation de microorganismes exogènes est possible (*251, 328-329, 346-349*), il faut trouver les conditions à apporter pour mettre en place des communautés plus spécifiques dans les digesteurs anaérobies . Pour ce faire, une étape pourrait être la mise en place et l'exploitation dans un premier temps d'une seule composante des biomasses d'intérêt, en choisissant par exemple un microorganisme spécifique (dans le cas du contenu ruminal une souche pure d'un microorganisme cellulolytique comme *Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus albus etc.*). Cirne utilise par exemple une bactérie lipolytique dans ce sens pour améliorer la digestion anaérobie de graisses de cuisine (*237*). On peut imaginer que les contraintes environnementales associées à une seule espèce seraient moins rigoureuses que celles nécessaires pour une communauté entière. Le contrôle et l'optimisation des paramètres nécessaires à l'implantation d'un seul type de microorganismes pourraient ainsi être facilités et permettraient de poser les jalons nécessaires à l'implantation ultérieure d'une biomasse complexe. Il faut toutefois garder à l'esprit que le développement optimal d'une espèce dans une communauté complexe n'est pas dû uniquement aux conditions physico-chimiques du milieu, mais également aux interactions avec les autres composantes de la biomasse, qui peuvent gêner son implantation (compétition ou prédation par un microorganisme du digesteur anaérobie, ou absence d'une interaction positive avec une autre espèce de la biomasse

d'origine, comme dans le cas des associations syntrophiques par exemple). La mise en place des propriétés de flores naturelles dans des digesteurs anaérobies n'est donc pas simple, mais les résultats obtenus à différentes échelles fourniront des éléments nouveaux pour avancer dans l'exploitation du potentiel enzymatique de flores naturelles particulièrement adaptées à la dégradation de la cellulose.

4.2.3. D'une perturbation à un nouvel état d'équilibre

4.2.3.1. Modification de la diversité

Même si l'implantation des biomasses co-inoculées avec le digestat anaérobie n'est observée ni dans le cas de IM_{Rumen}, ni dans le cas de IM_{Boue}, on observe une modification significative de la communauté fonctionnelle et totale en comparaison à des expériences sans co-inoculation. La diversité microbienne a été bouleversée de façon importante dans chaque cas. Ce bouleversement se traduit de différentes manières.

Une modification est observée dans les profils ARISA de diversité totale entre les incubations co-inoculées et non co-inoculées. Les résultats des ACP illustrent ces évolutions. Pour les archées, on observe une évolution de la répartition des principaux représentants suite à la co-inoculation, associée à une méthanogenèse hydrogénotrophe majoritaire, comme observé par Neumann (*350*) qui réalise une bioaugmentation avec du compost. Pour les bactéries, on atteint un nouvel état d'équilibre également. Un changement clair est observé dans les profils ARISA entre les échantillons des bioréacteurs co-inoculés et non co-inoculés. La fonction dégradation de la cellulose ne semble pas altérée cependant, même si l'accumulation d'acide propionique indique que des changements métaboliques sont sans doute intervenus, modifiant probablement le déroulement de la dégradation. Dans le même sens, des changements importants sont observés dans les données de séquences de la fraction fonctionnelle de l'ADN après 16 ou 18 jours d'incubation en comparaison à l'inoculum industriel initial ou à un témoin non co-inoculé. Moins de la moitié des séquences bactériennes retrouvées appartiennent à des OTUs présents dans le témoin non co-inoculé. L'indice de Shannon calculé à partir de la distribution des OTUs dans la population fonctionnelle des bioréacteurs montre enfin une diversité bactérienne plus importante dans les incubations co-inoculées que dans les témoins non co-inoculés.

La co-inoculation a perturbé l'équilibre de diversité qui était présent au sein du digestat anaérobie, et plusieurs niches écologiques ont été conquises, exploitées ou créées par des espèces qui étaient sous-dominantes dans les inocula initiaux. L'équilibre initial a été modifié, de nouveaux microorganismes ont eu la possibilité de se développer, ce qui a eu pour conséquence une augmentation de la diversité. Toutefois les raisons de cette perturbation ne sont pas évidentes.

4.2.3.2. Diversité de l'écosystème, fonctionnement et stabilité

La modification de diversité observée associée à une non implantation des microorganismes de la biomasse exogène peut sembler surprenante. En effet, les microorganismes exogènes auraient simplement pu être utilisés comme substrat, sans entraîner de changement dans les populations fonctionnelles et dans les voies métaboliques mises en jeu. Cependant, un réseau complexe d'interactions existe au sein des écosystèmes (microbiens) qui explique les conséquences importantes

qu'a eues l'arrivée de la biomasse exogène. Les systèmes macroscopiques fournissent un cadre théorique pour mieux comprendre l'importance et le rôle de ces interactions.

En effet, beaucoup d'études ont été réalisées à l'échelle des écosystèmes macroscopiques sur les liens entre diversité, fonctionnement et stabilité des écosystèmes. Il est couramment admis qu'il existe un lien positif entre diversité et stabilité, et diversité et fonctions (*351*). Cependant, ces liens ne sont pas simples, et forment des équilibres délicats. Ils sont régis par de nombreux paramètres, spécifiques des écosystèmes étudiés. Divers paramètres ont été identifiés à l'échelle macroscopique. De Ruiter les définit comme des flux d'énergie (*352*) entre les différentes composantes de l'écosystème. En particulier, les chaînes trophiques, les associations de fonctions, ou encore des caractéristiques spécifiques des espèces de l'écosystème jouent un rôle déterminant dans les liens entre la diversité et le fonctionnement de l'écosystème (*353*). A la fois les interactions entre et au sein des niveaux trophiques sont à prendre en compte (*354*). Il faut intégrer ces différents éléments pour mieux appréhender et comprendre les mécanismes et interactions entre biodiversité et fonctionnement des écosystèmes.

Dans notre cas, la co-inoculation peut être responsable d'une série d'effets dans l'écosystème microbien, qui se traduisent par une modification de la diversité dans le digesteur industriel. L'influence des biomasses exogènes peut s'interpréter à différents niveaux. L'apport par exemple de nouveaux substrats avec la biomasse exogène, ou l'utilisation de la biomasse exogène elle-même comme substrat modifie les réseaux trophiques ainsi que les flux d'énergie au sein du bioréacteur. Ceci est peut être à l'origine d'un déséquilibre de la biodiversité. En effet, la modification des espèces dominantes (et donc de la proportion relative des différentes composantes d'une biomasse complexe ou eveness) peut avoir des conséquences sur l'équilibre des populations et le métabolisme (*241, 355*), et pas seulement les pertes (ou gains) de diversité. Dans le même sens, l'introduction de nouveaux microorganismes, même s'ils ne s'implantent pas, pourrait aussi avoir modifié l'équilibre des communautés fonctionnelles et créé de nouveaux arrangements microbiens.

L'apport d'une biomasse exogène peut par conséquent produire dans un premier temps des modifications minimes qui vont modifier les flux d'énergies entre les différentes espèces et aboutir à la formation d'un nouvel équilibre, toujours capable de réaliser les fonctions principales, mais de composition différente.

5. Bilan : la co-inoculation comme levier environnemental pour l'ingénierie écologique

5.1. Imiter les systèmes performants

La rareté des enzymes qui déconstruisent efficacement les polysaccharides végétaux représente un goulot d'étranglement majeur pour les bioprocédés industriels de dégradation de la cellulose. Une solution serait de concevoir les bioréacteurs pour contrôler et amplifier les réactions biochimiques qui ont lieu dans la nature, en particulier dans le rumen des vaches. Cependant, cette étude a démontré que l'expression des propriétés cellulolytiques de la flore du rumen dans un digesteur anaérobie co-inoculé

avec une biomasse industrielle n'est pas facile. Le développement de techniques imitant des animaux a encore des leçons à apprendre de la stratégie digestive des ruminants, et les études futures devraient viser à identifier les processus clés de l'écosystème, ainsi que les composants et les conditions environnementales nécessaires à croissance de la flore du rumen. Cela générera de nouvelles cibles pour la manipulation bénéfique des fonctions du rumen au sein des digesteurs anaérobies de déchets solides.

5.2. Modifier la diversité microbienne

Ces expériences ont également montré les conséquences de la co-inoculation sur le fonctionnement de digesteurs anaérobies de cellulose, et en particulier sur la diversité microbienne de ces bioprocédés. La co-inoculation pourrait, au-delà de permettre l'implantation de microorganismes particulièrement compétents pour les processus étudiés, constituer un levier pour modifier les populations d'un digesteur. Elle permettrait de redistribuer l'importance des différents microorganismes au sein des écosystèmes microbiens, de jouer sur la diversité...

Les conséquences positives pour le fonctionnement du bioprocédé seraient une modification de ses performances. Gessner s'intéresse par exemple à la décomposition de la biomasse dans des écosystèmes naturels et note que des changements de diversité d'espèces au sein et au travers des différents niveaux trophiques peuvent significativement modifier la décomposition (*356*). Plus particulièrement Cardinale (*357*) s'intéresse aux effets d'interactions positives entre individus. L'auteur observe que la production de biomasse est plus importante pour des populations de plantes en mélange que pour des monocultures en moyenne. Des interactions positives entre espèces sont à l'origine d'une augmentation de leur rendement de production. A la fois le nombre et le type d'espèces dans un écosystème ont un impact significatif sur la production. La co-inoculation pourrait permettre de redistribuer et d'augmenter la diversité afin améliorer les performances (*241*). Le maintien d'une diversité importante est par ailleurs essentiel car celui-ci est souvent associé à la capacité des écosystèmes à résister à des perturbations (*352*).

Il faut caractériser plus précisément ce levier pour juger de sa pertinence. Il faut déterminer en particulier si les modifications de diversité apportées seront suffisamment pérennes pour permettre la constitution d'un bioprocédé stable, associé à des modifications de performance positive pour la gestion. Il serait également intéressant de mieux comprendre les flux d'énergie au sein des écosystèmes microbiens afin de déterminer quel type de biomasse exogène utiliser pour modifier la diversité des digesteurs anaérobies. La co-inoculation semble toutefois être un outil de choix pour faire évoluer la composition des communautés microbiennes d'un bioprocédé tout en gardant les fonctions principales.

– Discussion générale

La problématique de recherche visait à évaluer les conséquences écologiques et métaboliques de l'application de leviers environnementaux aux écosystèmes microbiens complexes de bioprocédés anaérobies. Dans un premier, la pertinence et les limites de la démarche expérimentale qui a été utilisée pour répondre à cette problématique seront discutés. Une synthèse des réponses qu'y apportent les résultats obtenus sera présentée et mise en perspective. La troisième partie de cette discussion évoquera d'autres pistes à explorer et quelques perspectives pour aller plus loin dans la réflexion et l'étude. Enfin, la dernière partie reviendra sur les objectifs de travail et fera un bilan sur la possible mise en place d'une démarche d'ingénierie écologique des communautés microbiennes dans les bioprocédés de traitement anaérobie des déchets ligno-cellulosiques

1. Pertinence et limites de la démarche expérimentale

1.1. Conception du schéma expérimental

Différents leviers environnementaux ont été sélectionnés au début du travail de thèse. L'approche expérimentale nécessitait de limiter ce choix. Nous avons opté pour des leviers les plus variés possibles, s'apparentant à des modifications de paramètres opératoires courants, comme la température, ou plus éloignés des paramètres de gestion classiques des bioprocédés comme la préadaptation de la biomasse ou la co-inoculation. La pertinence de chacun a déjà été discutée au cours de la synthèse bibliographique, et les résultats obtenus la confirme (*cf.* paragraphe 2). Les conséquences de l'application des leviers ont pu être comparées à des situations dans lesquelles aucun levier environnemental n'avait été appliqué.

Dans certains cas, les conséquences des perturbations apportées auraient pu s'expliquer de différentes façons. Nous nous sommes efforcés de concevoir les différentes expériences pour pouvoir distinguer les facteurs responsables de modifications métaboliques ou écologiques. Par exemple dans le cas de l'expérience de changement de température, la résistance et la résilience d'un inoculum mésophile ont été évaluées. Une expérience symétrique a été réalisée avec un inoculum thermophile pour pouvoir distinguer l'effet d'une modification de la température et d'un retour à la normale de l'effet du passage des conditions mésophiles à thermophiles ou thermophiles à mésophiles. Dans le cas de l'expérience de co-inoculation, une biomasse potentiellement adaptée aux conditions environnementales d'un digesteur et une biomasse non adaptée ont été utilisées afin de distinguer l'effet d'un apport de biomasse exogène quelconque et l'effet d'une biomasse susceptible de s'implanter dans le milieu et d'y être très performante.

Les travaux menés ne permettent pas d'obtenir des informations exhaustives sur l'ensemble des effets possibles de l'application d'un levier environnemental, mais en étudient un panel représentatif. Il est certain que d'autres paramètres auraient été pertinents, il nous a cependant fallu nous restreindre à quelques-uns seulement. Une réflexion sur d'autres paramètres possibles sera présentée au paragraphe 3.1.

Une autre limite du schéma expérimental mis en œuvre était le choix de travailler sur des bioréacteurs modèles, de constitution plus simple que des bioréacteurs industriels. Dans l'étude avec ces bioréacteurs modèles, des paramètres tels que configuration et géométrie du procédé, transferts et mélanges, dimensionnement etc. ne sont pas pris en compte alors qu'ils peuvent être très importants dans des systèmes industriels. J'ai fait volontairement le choix d'utiliser un système modèle simplifié et de me focaliser sur l'étude des processus microbiens. La démarche entreprise était une première étape de l'ingénierie écologique des bioprocédés, dont l'objectif était d'évaluer les possibilités offertes par l'utilisation de leviers environnementaux à travers l'étude de leur influence sur les processus microbiens. L'utilisation de systèmes simplifiés a permis d'étudier objectivement ces processus tout en limitant les contraintes expérimentales. D'autres étapes seront nécessaires pour mettre en place une ingénierie écologique dans des systèmes industriels.

1.2. Les moyens expérimentaux

1.2.1. Le système d'étude

Le système d'étude qui a été retenu consiste en des incubations de cellulose dans de petits microcosmes anaérobies fonctionnant en discontinu. L'utilisation de la cellulose se justifie par le fait qu'elle est représentative d'une partie essentielle des déchets amenés dans les bioprocédés de traitement anaérobie. C'est de plus un substrat simple et reproductible. Elle est certes moins complexe qu'une matrice de déchets réels, mais du fait de sa taille importante permet tout de même la mobilisation de l'ensemble des étapes de la digestion anaérobie et donc une étude avancée des processus microbiens impliqués. De la cellulose d'origine bactérienne a été utilisée. Sa structure cristalline est proche de celle de la biomasse naturelle, et il était possible de l'obtenir à la fois enrichie en carbone 13 à 100% ou à un enrichissement naturel.

Les inocula utilisés proviennent de digesteurs anaérobies d'ordures ménagères, mésophiles et thermophiles. Ils ont été utilisés car ils contiennent une quantité importante de biomasse, ainsi qu'une diversité importante, dont les groupes fonctionnels nécessaires à la dégradation de la cellulose. Leur comportement n'est pas représentatif de celui de l'ensemble des digesteurs, mais est caractéristique de celui que peuvent avoir des systèmes industriels.

Le milieu est saturé, condition nécessaire pour obtenir des cinétiques de dégradation suffisamment élevées. Le liquide utilisé est du lixiviat centrifugé, théoriquement adapté à la croissance des microorganismes des inocula et présentant un pouvoir tampon important. C'est un exemple des simplifications réalisées dans le système modèle par rapport à un système industriel, mais qui ne pénalisent pas l'étude des processus microbiens.

De la même façon, les petits microcosmes batch utilisés reconstituent des écosystèmes microbiens représentatifs de bioprocédés anaérobies pour l'étude des processus de dégradation. Ils présentent l'avantage de permettre la réalisation d'un nombre important d'incubations en parallèle et étaient nécessaires pour pouvoir utiliser des substrats marqués (coût trop important des substrats marqués dans des volumes plus importants ou des systèmes continus). Néanmoins, dans les systèmes batch, à l'inverse d'un système continu, la biomasse qui ne participe pas au processus de dégradation n'est pas

lessivée, mais reste présente dans le microcosme. Elle est donc prise en compte dans l'analyse de la diversité totale, même si sa proportion diminue peu à peu par rapport à celle des populations fonctionnelles. La méthodologie SIP permet toutefois d'isoler l'information spécifique liée à la dégradation de la cellulose.

Une autre limitation de ces systèmes vient de leur petite taille. Les prélèvements effectués pour réaliser les analyses sont à l'origine d'un retrait de matière organique important dont il faut tenir compte pour réaliser les bilans matière.

1.2.2. Les outils utilisés

1.2.2.1. Utilisation de cellulose marquée ^{13}C

L'utilisation de substrat marqué au carbone 13 a permis d'isoler l'information fonctionnelle liée à la chaîne de dégradation de la cellulose. C'est un outil majeur pour l'étude des écosystèmes microbiens complexes afin d'obtenir des informations métaboliques et écologiques précises sur les processus étudiés. Certes les systèmes batch avec un substrat unique assurent une sélection des microorganismes, mais il est difficile de déterminer son importance, notamment sur des courtes durées. Dans cette étude, les grandes tendances mesurées à l'échelle des populations totales auraient permis un degré d'interprétation et de compréhension moins rigoureux, en particulier pour les techniques fournissant des informations précises, comme le séquençage de l'ADN. La méthode de stable isotope probing et les techniques associées ont dans ce sens beaucoup apporté à ce travail, même si elles n'ont pas été appliquées à l'ensemble des réplicats pour des raisons de coût (par exemple, les fractions lourdes et légères d'un des échantillons après SIP ont été séquencées et on observe des différences dans la diversité des deux fractions).

1.2.2.2. Fingerprinting et traitement statistique

La diversité des populations microbiennes est un concept difficile à appréhender et à mesurer. Les techniques d'empreintes moléculaires permettent d'obtenir rapidement à grande échelle des profils de composition de la communauté microbienne afin d'estimer les dynamiques de population. Elles ont l'inconvénient, comme d'autres techniques moléculaires, de présenter des biais (extraction d'ADN, PCR, etc. qui ont été détaillés dans la synthèse bibliographique). Elles sont donc un outil pour observer des tendances d'évolution, des résultats qualitatifs mais pas quantitatifs. La méthode de fingerprinting choisie pour ce travail est l'ARISA, car elle a pu être facilement et rapidement mise en œuvre. Dans nos expériences, nous avons considéré que même si des biais pouvaient exister, ils agissaient de façon reproductible entre les échantillons et qu'il était donc acceptable de comparer entre eux leur profil (afin de limiter l'influence de ces biais, l'ensemble des procédures expérimentales a été réalisé de façon homogène pour tous les échantillons).

Au cours du travail réalisé, une grande partie des données concernant la fraction totale des microorganismes a été analysée de manière statistique. Les traitements statistiques permettent l'analyse simultanée d'un jeu de données important, qui ne serait pas réalisable par comparaison visuelle pour autant de profils différents. Pour les réaliser, le package StatFingerprints a été utilisé. Il permet d'aligner

les profils les uns par rapport aux autres et de les normaliser, pour les rendre plus homogènes avant les analyses. Les analyses statistiques n'ont pas été réalisées sur la fraction fonctionnelle en raison d'un nombre insuffisant de profils. Cependant, les tendances observées pour la dynamique des profils de diversité totale étaient souvent corrélées à la dynamique des profils de diversité fonctionnelle. Le résultat des analyses statistiques de diversité totale est donc un bon **indicateur global** de l'effet des perturbations appliquées sur la dégradation de la cellulose, l'échelle d'observation étant la communauté et pas l'espèce.

1.2.2.3. Séquençage

La population fonctionnelle a été analysée par pyroséquençage. Cette méthode nous a permis d'obtenir un nombre important de séquences pour chaque échantillon (de l'ordre du millier) et donc une bonne image de la diversité. Seule une partie de l'ADNr 16S a été séquencée. Le séquençage d'une portion seulement de l'ADNr 16S présentait l'inconvénient d'obtenir des séquences pas forcément suffisamment discriminantes pour identifier précisément les microorganismes au niveau de l'espèce (*358*). Les résultats montrent que seuls quelques OTUs bactériens n'ont pas pu être attribués à une division taxonomique (10), ou seulement à un phylum (14) sur 150 OTUs majoritaires. Cette méthode semble donc suffisamment discriminante pour les bactéries retrouvées dans nos incubations. Pour les archées, exception faite de l'échantillon de boue d'aérateur, tous les OTUs ont pu être affectés au moins à un genre, sauf 3 OTUs affectés seulement à une classe parmi 42 OTUs en tout. Les OTUs de la boue d'aérateur sont affectés à la classe *Halobacteria* seulement (11 sur 12). La méthode utilisée n'est donc pas discriminante pour cette classe, mais elle n'est *a priori* pas fréquemment retrouvée dans les digesteurs anaérobies.

1.2.2.4. Perspectives méthodologiques

Les techniques utilisées ont permis d'obtenir des informations à la fois sur la dynamique globale des communautés, et sur l'identité précise des microorganismes. Toutefois, d'autres analyses de biologie moléculaires étaient envisageables pour les préciser.

L'identification des microorganismes responsables des différentes bandes ARISA pourrait compléter l'étude de dynamique des communautés qui a été réalisée. Dans ce but, j'ai réalisé un développement méthodologique spécifique, (non présenté dans ce manuscrit), permettant de faire le lien entre bandes ARISA et identité des microorganismes impliqués. Il a pu être validé sur plusieurs échantillons. Toutefois, j'ai eu la possibilité de réaliser du pyroséquençage sur les échantillons d'ADN et n'ai donc pas utilisé ce protocole pour obtenir les résultats présentés dans ce manuscrit. Il pourrait être utile dans des études où des données de pyroséquençage ne sont pas disponibles, ou pour identifier le microorganisme responsable d'un signal ARISA spécifique.

Par ailleurs, les développements du séquençage haut-débit et des méthodes d'analyse des données, ainsi que la réduction du coût de ces techniques pourraient permettre le recours plus systématique au pyroséquençage afin d'analyser les dynamiques de diversité. Ceci pourrait même dans certains cas remplacer les techniques de fingerprinting utilisées actuellement et apporter un niveau d'informations supplémentaire.

Enfin, l'identification des microorganismes par séquençage permet de construire des sondes oligonucléotidiques spécifiques pour réaliser des hybridations de type FISH. Celles-ci pourraient être utilisées pour préciser les effets d'une perturbation sur la structure et l'arrangement spatial des microorganismes (interactions syntrophiques ou adhésion à la cellulose par exemple). La méthode de SIMSISH présentée dans la synthèse bibliographique et dont j'ai évalué la précision pour la mesure de la composition isotopique de cellules uniques (travail non présenté dans ce manuscrit mais qui fait l'objet d'un article) permettrait quant à elle de mesurer le niveau d'incorporation de carbone 13 dans les microorganismes impliqués dans la dégradation de la cellulose et de mesurer leur implication dans les processus suite à la perturbation apportée par le levier environnemental.

2. Perturbations ou leviers environnementaux ?

Quelles sont les réponses apportées par ce travail au questionnement initial ? Les trois types de leviers sélectionnés ont permis d'observer des effets différents sous les angles métaboliques et écologiques. Il convient de valider que ces leviers sont bien des leviers environnementaux au sens de l'ingénierie écologique et non de « simples » perturbations de l'équilibre de l'écosystème. Il faut également comparer et faire une synthèse des effets observés afin d'avoir un aperçu global des conséquences de l'application de ces leviers dans nos systèmes.

2.1. Effets métaboliques

Le tableau suivant (Tableau 16) résume quelques-unes des caractéristiques métaboliques mesurées pour les différentes incubations réalisées au cours de cette thèse. On observe dans les résultats obtenus des variations à différents niveaux. Les leviers environnementaux appliqués sont responsables de modifications dans le rendement de production de méthane, dans les quantités d'AGV accumulées ou encore dans leur enrichissement. L'analyse détaillée de ces résultats au fil des différents chapitres a également montré des différences importantes dans les cinétiques de dégradation et de production des intermédiaires. Une accumulation importante de propionate n'est par exemple observée que dans l'inoculum mésophile non perturbé (IM1) et dans les expériences de co-inoculation. Le propionate n'est par contre jamais retrouvé en quantité importante en conditions thermophiles, même si l'inoculum de base était mésophile. D'autres exemples permettent également de conclure que suite à l'application de leviers environnementaux, le fonctionnement métabolique des systèmes a été perturbé par rapport à une situation pour laquelle aucun levier n'aurait été appliqué. Malgré tout, la fonction « dégradation de la cellulose en biogaz » se réalise presque toujours (mis à part dans IM3 et IT2 où la méthanogenèse est stoppée).

Cette comparaison des données métaboliques amène à distinguer différents niveaux d'effets des leviers environnementaux. Ils peuvent affecter les fonctions primaires du procédé (dégradation des déchets, production de biogaz) ou des caractéristiques secondaires (rendements ou intermédiaires métaboliques différents par exemple). Le levier température a ainsi un effet sur les fonctions primaires du bioprocédé, provoquant dans certains cas l'arrêt de la production de biogaz. En revanche, dans le cas de la co-inoculation ou de la fonctionnalisation, l'effet du levier est ressenti sur des caractéristiques secondaires

uniquement, et pas sur les fonctions primaires (du biogaz est toujours produit). Il est donc possible d'affecter de manière différentielle le fonctionnement du procédé. Ceci s'explique par une influence différente des leviers sur les communautés microbiennes.

Tableau 16 : Récapitulatif des résultats physico-chimiques obtenus pour les différentes incubations réalisées.

Incubation	Ratio de méthane dans le biogaz total produit	AGV principaux (valeur et enrichissement en ^{13}C à la date du pic d'accumulation maximum,)	enrichissement en ^{13}C du méthane (maximum mesuré)	enrichissement en ^{13}C du dioxyde de carbone (maximum mesuré)
IM1	57%	Acide acétique (400 mg de C/l, 75% de ^{13}C à j18) Acide propionique (200 mg de C/L, 63% de ^{13}C à j28)	75	63
IM2	67%	Acide acétique (350 mg de C/l, 70% de ^{13}C à j22) Acide propionique (pas d'accumulation, 50% de ^{13}C)	70	50
IM3	20%	Acide acétique (325 mg de C/l, 54% de ^{13}C à j40) Acide propionique (50 mg de C/L, 20% de ^{13}C à j40)	54	20
IT1	58%	Acide acétique (600 mg de C/l, 80% de ^{13}C à j8) Acide propionique (pas d'accumulation, 70% de ^{13}C)	80	70
IT2	50%	Acide acétique (700 mg de C/l, 62% de ^{13}C à j32) Acide propionique (pas d'accumulation, 53% de ^{13}C)	62	53
IT3	53%	Acide acétique (1150 mg de C/l, 40% de ^{13}C à j6) Acide propionique (pas d'accumulation, 25% de ^{13}C)	40	25
IM_{Pro}Cellulose	55%	Acide acétique (300 mg de C/l, 80% de ^{13}C à j8) Acide propionique (20 mg de C/L, 70% de ^{13}C à j20)	80	70
IM_{But}Cellulose	56%	Acide acétique (325 mg de C/l, 80% de ^{13}C % à j13) Acide propionique (35 mg de C/L, 70% de ^{13}C à j35)	80	70
IM_{Boue}	60%	Acide acétique (275 mg de C/l, 35% de ^{13}C à j40) Acide propionique (370 mg de C/L, 43% de ^{13}C à j30)	35	43
IM_{Rumen}	52%	Acide acétique (420 mg de C/l, 60% de ^{13}C à j25) Acide propionique (225 mg de C/L, 58% de ^{13}C à j42)	60	58

2.2. *Effets écologiques*

2.2.1. Mise en perspective globale de l'effet de certains paramètres

Avant de comparer en détail les effets écologiques des leviers utilisés, on peut prendre du recul et commenter l'influence de différents paramètres sur les communautés microbiennes qui réalisent les processus de dégradation. Des études statistiques réalisées sur un grand nombre de profils ARISA m'ont ainsi permis de mettre en évidence l'influence de plusieurs facteurs sur la diversité microbienne.

2.2.1.1. Température

L'étude des changements de température a montré que ce levier était particulièrement puissant et important pour modifier les populations microbiennes des digesteurs de cellulose. J'ai comparé à l'aide d'une ACP tous les profils ARISA réalisés au cours de ma thèse, sans aucune distinction, pour les archées d'une part et bactéries d'autre part. La position des différents profils dans les ACP est représentée dans les graphiques suivants (Figure 125 et Figure 126), selon trois axes principaux. Les profils correspondant à des incubations thermophiles sont représentés en rouge, les profils correspondant à des incubations mésophiles sont en noir.

Dans les deux cas, on distingue un clivage entre les points noirs et les points rouges. Cette représentation met en évidence une influence très nette de la température sur la diversité microbienne, archées et bactéries. On peut rappeler que les profils représentés dans les graphiques ci-dessus correspondent à des incubations extrêmement variées, soumises à des perturbations diverses, et pour lesquelles les substrats utilisés sont différents (acide propionique, acide butyrique, glucose, cellobiose, foin, cellulose). Malgré tout, les profils sont bien regroupés par température. La température semble

être un des facteurs conditionnant le plus la diversité microbienne dans nos systèmes, ce qui renforce la pertinence de changements de température comme levier environnemental, à utiliser avec précaution toutefois vu leur influence. Celle-ci peut être très importante et affecter les fonctions primaires des bioprocédés.

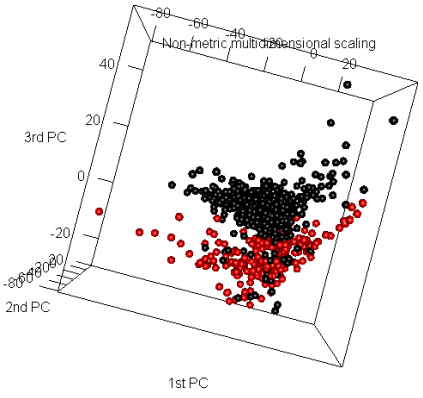


Figure 125 : Sensibilité de la diversité des archées à la température.

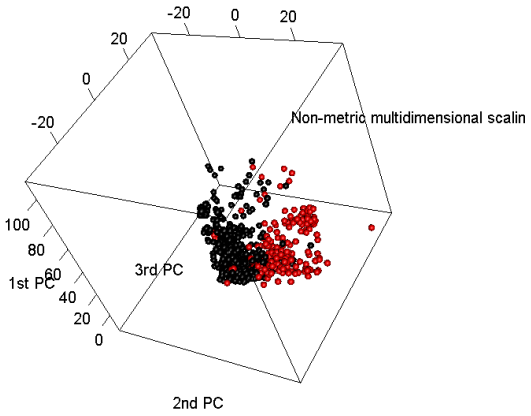


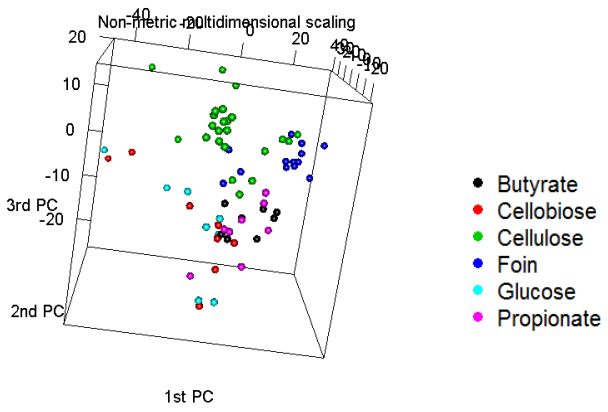
Figure 126 : Sensibilité de la diversité des bactéries à la température.

La sensibilité à la température est visualisée à travers la représentation graphique d'une ACP réalisée avec l'ensemble des profils ARISA réalisés au cours de la thèse. Les profils correspondant à des incubations mésophiles sont en noir, les profils correspondant à des incubations thermophiles sont en rouge.

2.2.1.2. Influence du substrat

J'ai voulu évaluer au cours d'un autre traitement statistique l'influence du substrat sur l'évolution de la diversité totale des différents microcosmes. Pour cela, j'ai sélectionné parmi les profils ARISA réalisés ceux correspondant à la dégradation de différents substrats par le même inoculum de départ, et dans les mêmes conditions expérimentales (pas de perturbation appliquée au système). Au total, six substrats différents ont été utilisés (acide propionique, acide butyrique, glucose, cellobiose, foin, cellulose). Les figures suivantes présentent la représentation sur trois axes des ACP obtenues pour les profils archées (Figure 127) et bactéries (Figure 128).

Dans les deux représentations, la cellulose, le foin, l'acide propionique et l'acide butyrique forment des groupes distincts. Les communautés microbiennes associées à leur dégradation sont différentes. Les points correspondant au glucose et au cellobiose sont mélangés entre eux et forment un groupe moins ramassé. La diversité fonctionnelle des microcosmes dégradant ces deux substrats semble équivalente, mais plus dispersée que pour les autres substrats. Ce résultat est cohérent avec les observations réalisées au cours de l'expérience de préadaptation. On peut conclure de cette analyse que le substrat a une influence importante sur l'évolution de la diversité de l'inoculum avec lequel il est incubé. Ceci valide l'utilisation de la préadaptation pour modifier les populations microbiennes. Par ailleurs, ces observations montrent que des évolutions de la diversité totale d'un même inoculum incubé avec différents substrats peuvent être observées par ARISA, même si le système expérimental utilisé est un système batch. Ceci conforte la validité des analyses réalisées à partir des profils de diversité totale.



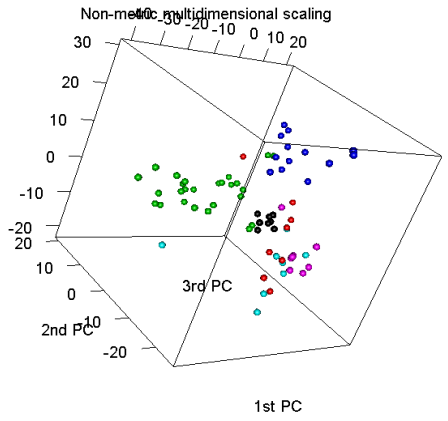


Figure 127 : Sensibilité de la diversité des archées au substrat. L'axe 1 représente 60% de la diversité, l'axe 2 16%, l'axe 3 6%.

Figure 128 : Sensibilité de la diversité des bactéries au substrat. L'axe 1 représente 25% de la diversité, l'axe 2 14%, l'axe 3 12%.

La sensibilité à la température est visualisée à travers la représentation graphique d'une ACP réalisée avec une sélection des profils ARISA réalisés au cours de la thèse. Les profils sont figurés dans une couleur correspondant au substrat utilisé.

2.2.2. Diversité totale suite à l'application de leviers

Les comparaisons des profils ARISA ou les analyses statistiques des profils au sein des différentes expériences ont montré une influence importante et différente des leviers environnementaux sur la diversité totale de chaque microcosme. D'une manière plus globale, on peut comparer l'influence des leviers environnementaux sur la population totale de l'ensemble des incubations réalisées. Les figures suivantes (Figure 129 et Figure 130) présentent des représentations graphiques en trois dimensions d'ACP réalisées à partir des profils ARISA des archées et des bactéries de chaque incubation réalisée en conditions mésophiles. Les groupes d'incubations sont distingués par des points de couleurs différentes.

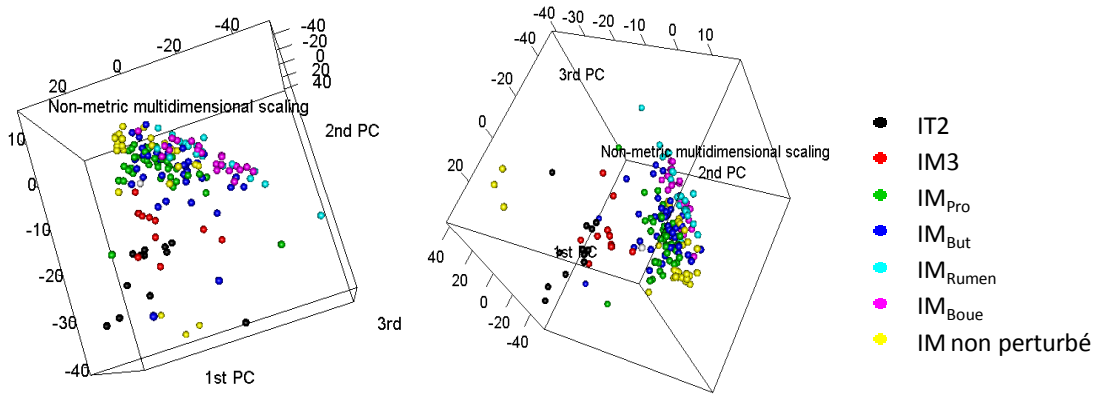


Figure 129 : Représentation graphique d'une ACP mettant en évidence les évolutions de diversité totale des archées suite à l'application de différentes perturbations à un même inoculum initial. L'axe 1 représente 36% de la diversité, l'axe 2 29%, l'axe 3 12%.

Pour les archées, des points sont clairement à l'écart du groupe central (points noirs et rouges). Il s'agit des profils des expériences de changement de température après perturbation (IT2 et IM3). Les profils ont été réalisés après le passage de conditions thermophiles à mésophiles. Ceci confirme, à une échelle

plus importante, le résultat déjà observé dans l'étude de changements de température d'une influence très importante du passage par les conditions thermophiles pour les populations d'archées, plus importante que celle des autres leviers. En effet, les points des autres expériences sont plus rapprochés, mais forment malgré tout des sous-groupes de couleurs. Dans ces cas, les leviers environnementaux sont responsables d'une modification de la diversité plus modérée, et homogène au sein de chaque expérience. Ceci peut être mis en lien avec les deux types d'effets des leviers décrits plus haut. Les changements radicaux de la biomasse ont un effet sur les fonctions primaires, alors que les changements moins importants ont un effet sur les caractéristiques secondaires uniquement.

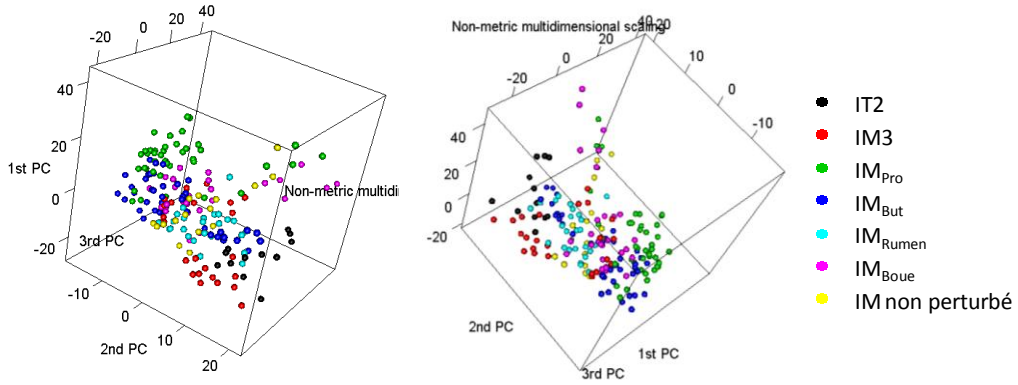


Figure 130 : Représentation graphique d'une ACP mettant en évidence les évolutions de diversité totale des bactéries suite à l'application de différentes perturbations à un même inoculum initial. L'axe 1 représente 26% de la diversité, l'axe 2 21% et l'axe 3 9%.

Les conclusions obtenues après observation de l'ACP réalisée à l'aide des profils bactériens sont voisines. Le clivage dû à la température n'est pas net comme dans le cas des archées (c'est attendu, puisque dans les expériences IM3 et IT2 les bactéries restent fonctionnelles, la modification de l'effet primaire du procédé est due aux archées et pas aux bactéries) cependant les différents points de chaque expérience forment des sous-groupes distincts. Ceci confirme comme pour les archées que les différents leviers environnementaux ont eu des influences différentes sur les populations bactériennes de l'inoculum initial, mais homogènes au sein de chaque expérience.

2.2.3. Diversité fonctionnelle

Le tableau suivant résume les indices de diversité de Shannon pour les populations fonctionnelles calculés à partir de la proportion relative des OTUs dans chaque échantillon.

Tableau 17 : Indices de diversité de Shannon calculés pour les populations fonctionnelles à partir de la proportion relative des OTUs pour les différentes incubations.

Nom de l'échantillon	IM1	IM2	IT1	IT3	IM_{Pro}	IM_{But}	IM_{Rumen}	IM_{Boue}
Diversité des archées	1,5	0,8	1,1	1,0	2,7	2,4	1,7	1,2
Diversité des bactéries	4,2	4,1	2,4	3,6	5,8	4,1	4,9	5,9

Le calcul de cet indice nous a donné les premiers éléments pour estimer les conséquences des différents leviers environnementaux sur les populations fonctionnelles. Les leviers n'ont pas la même influence sur l'indice de diversité. Par ailleurs, les évolutions des indices de diversité pour les archées et pour les

bactéries ne sont pas corrélées, ce qui suggère que les différentes composantes de la biomasse ne réagissent pas forcément de la même façon à un même levier environnemental.

Pour préciser ces résultats, on peut comparer la composition microbienne des archées et des bactéries pour les différentes expériences. Des graphiques présentés en annexe (annexes 4 et 5) font le bilan de la composition par genre et OTUs pour les populations d'archées, et par classe et OTUs pour les populations de bactéries.

Pour les archées, au-delà des OTUs, la répartition par genre est modifiée suite à l'application des leviers environnementaux. Le choc de température est responsable d'une modification totale du genre méthanogène dominant de *Methanosarcina* vers *Methanoculleus*. Les archées de ce genre sont également retrouvées suite aux autres perturbations, mais en quantité bien moindre et minoritaire par rapport à *Methanosarcina*. Dans le cas de la préadaptation avec le propionate, le genre *Methanosaeta* devient majoritaire. Le choc de température de l'inoculum thermophile n'a par contre pas de conséquences très importantes sur le genre des archées retrouvées. On peut en conclure que les différents leviers ont une influence différente sur l'évolution de la population des archées impliquées dans la dégradation de la cellulose. Ils peuvent être à l'origine d'un renouvellement total des populations, avec un nouveau genre majoritaire, ou peuvent au contraire ils peuvent n'avoir pour conséquence qu'une faible modification de la proportion relative des différents OTUs. Il est à nouveau possible de lier l'importance de ces modifications aux conséquences sur les fonctions primaires ou caractéristiques secondaires des bioprocédés.

Pour les bactéries, on peut faire le même type d'observation sur les classes identifiées. Des modifications plus ou moins importantes sont retrouvées selon les leviers. Pour l'inoculum mésophile, le changement de température est responsable d'un changement radical des populations. Pour les autres leviers (co-inoculation et préadaptation), les mêmes grandes classes de bactéries sont retrouvées, mais dans des proportions différentes, ou avec des OTUs différents, signe là encore d'une action différentielle des leviers environnementaux sur les populations.

2.3. Conclusion

Le travail réalisé a permis de mettre en évidence l'influence de différents leviers environnementaux sur les dynamiques métaboliques et écologiques de microcosmes dégradant la cellulose en conditions anaérobies. Des effets plus ou moins importants sont observés, sur les fonctions primaires ou les caractéristiques secondaires des procédés. Ils traduisent l'importance des modifications des communautés microbiennes suite à l'application des leviers. Ainsi dans certains cas, ils permettent de réaliser un modelage spécifique des communautés microbiennes (fonctionnalisation), de déplacer l'équilibre de diversité (co-inoculation, ou modification de température dans le cas de IT), ou encore de changer radicalement la biomasse fonctionnelle (modification de température dans le cas de IM). Certains sont plus puissants que d'autres. En ce sens les leviers appliqués ne sont pas de simples perturbations mais rejoignent bien les attentes de l'ingénierie écologique. En particulier, la possibilité d'agir sur les fonctions primaires ou les caractéristiques secondaires offre des possibilités de gestions nouvelles, comme on pourra le voir dans le paragraphe 4.

3. Perspectives de travail

Sur la base de nos résultats, nous pouvons envisager d'autres leviers environnementaux possibles. Nous tenterons également d'évoquer les possibilités et les questions relatives au passage de l'application de ces leviers d'un système expérimental à un système industriel.

3.1. Autres leviers environnementaux possibles

Le levier environnemental, qui permet de modifier l'équilibre de l'écosystème, peut être vu comme une façon de réaliser un forçage des populations microbiennes pour passer à d'autres états d'équilibre, potentiellement plus favorables pour le système ou les fonctions que l'on souhaite en tirer. Les caractéristiques « idéales » de ces leviers ont été évoquées dans la synthèse bibliographique. Ils doivent permettre de simplifier et de réduire la quantité de travail et d'énergie qui serait à mettre en œuvre pour réaliser la même transformation sans recourir à l'ingénierie écologique et ils ne doivent pas avoir « d'effets secondaires » qui iraient à l'encontre du bénéfice obtenu. Sous l'éclairage de nos résultats, nous pouvons définir d'autres leviers possibles pour réaliser l'ingénierie écologique des bioprocédés.

3.1.1. Paramètres physico-chimiques du procédé

Le pH, la concentration en certains sels ou ions (sels d'aluminium, phosphate, ammonium par exemple) ou autres molécules (AGV par exemple) (*359-362*) pourraient être utilisés pour modifier les équilibres microbiens au sein du bioprocédé, la croissance des microorganismes pouvant être affectée de façon différente par ces paramètres. La revue de Chen présente plusieurs des paramètres pouvant affecter des étapes de la digestion anaérobie (*363*). Ces leviers auront potentiellement un effet sur un grand nombre de microorganismes du milieu, avec le risque d'effets positifs annulés par des effets négatifs. Ils semblent plus intéressants pour un remodelage global des communautés que pour un effet ciblé. De la même façon que la température, ils pourraient avoir des effets sur les fonctions primaires des bioprocédés.

D'autres paramètres de fonctionnement du bioréacteur, comme les aspects hydrodynamiques par exemple (mélange ou non du réacteur, type d'agitation, fréquence d'alimentation, etc.) (*364*) ont également une influence sur le développement microbien et pourraient être utilisés pour orienter et modifier les équilibres écologiques. Dans ce cas, l'objectif peut être de favoriser la croissance de certains microorganismes plutôt que d'autres (par exemple plus ou moins sensibles à l'agitation, avec des temps de doublement plus ou moins importants etc.). Voyons quelques exemples : Carrero-Colon montre que des ajouts répétés de nutriments à des boues activées engendrent différentes structures de communautés microbiennes en fonction de la fréquence des ajouts, sans doute suite à des évolutions stochastiques (*365*). La compétition entre les méthanogènes acétoclastes ayant différentes cinétiques de croissance peut quant à elle être manipulée en alimentant le digesteur d'une manière spécifique (*366*). Ces derniers leviers semblent plutôt être indiqués dans les situations où les microorganismes à privilégier sont connus, ainsi que les conditions qui vont favoriser leur croissance ou défavoriser celle des autres microorganismes. Les ajustements sont plus fins, et permettront des modifications des caractéristiques secondaires des procédés.

3.1.2. Elimination ou sélection de microorganismes

Afin de modifier les communautés microbiennes, on peut tenter d'éliminer certains groupes de microorganismes. Un traitement par antibiothérapie permettrait par exemple d'altérer les communautés microbiennes (*367*), soit de manière spécifique et anticipée, soit de façon aléatoire afin de créer un nouvel équilibre. De la même façon, l'utilisation de phages ou de virus permettrait de lutter contre certains microorganismes (*9, 211, 368*). Cette méthode présenterait l'avantage de pouvoir être très spécifique et donc l'inconvénient d'être difficile à mettre en place en raison de la nécessité de produire des virus également très spécifiques. Elle s'adresserait à des problèmes ciblés mais suffisamment typiques pour justifier son développement. Plus simplement, l'utilisation de molécules pour « empoisonner » une partie de la biomasse (des micropolluants par exemple (*369-370*)) pourrait également être un outil pour modifier et remodeler les communautés microbiennes. On peut aussi imaginer des traitements par chauffage ou par aération (*371*) dans le même sens. Ces deux derniers leviers auraient des effets plus globaux et moins précis. Selon l'intensité des leviers, les effets pourraient être ressentis sur le fonctionnement primaire, ou sur des fonctions secondaires uniquement.

3.1.3. Faciliter le travail des microorganismes

Dans une optique différente, on pourrait envisager de codigérer des substrats particuliers avec les déchets afin d'essayer de tirer des bénéfices des phénomènes de priming-effect (détaillés dans la synthèse bibliographique). L'objectif serait un effet global sur tout l'écosystème microbien, n'impliquant pas forcément un remodelage des communautés de microorganismes, mais plutôt une augmentation des cinétiques et rendements.

3.1.4. Possibilité d'utiliser une combinaison de différents leviers

Afin de pousser plus loin le raisonnement et d'affiner la gestion des communautés microbiennes, on peut imaginer à termes utiliser différents leviers de manière simultanée ou successive. Les leviers présentés dans les paragraphes précédents peuvent avoir un effet global ou ciblé, impliquer des changements plus ou moins importants dans les communautés microbiennes, modifier ou non les groupes fonctionnels et l'importance relative des fonctions réalisées, primaires ou secondaires. Les axes de travail sont donc multiples et à différents niveaux pour résoudre des problèmes variés.

3.2. Vers un changement d'échelle

En conclusion de ce travail se pose la question de l'application des résultats obtenus à des bioprocédés de taille importante, ou d'une manière plus générale du changement d'échelle de l'ingénierie écologique microbienne de laboratoire à l'ingénierie écologique de digesteurs industriels.

Les travaux réalisés à l'échelle du laboratoire permettent de donner des pistes de réflexion et des indications sur l'influence de leviers environnementaux sur la réalisation des processus microbiens de la digestion anaérobie. Ils ont été réalisés dans des bioréacteurs modèles, qui ne reflètent pas l'ensemble des contraintes des systèmes industriels. Par ailleurs, les leviers environnementaux ont été appliqués à des inocula caractéristiques et représentatifs de ceux retrouvés dans les digesteurs industriels, et si les

conclusions générales observées dans les expériences de la thèse seront sans doute voisines sur d'autres inocula, les conclusions spécifiques pourront varier. Il faudra donc évaluer ce qui relève d'effets généraux ou particuliers avant d'appliquer les leviers environnementaux.

Pour passer de l'ingénierie écologique des processus microbiens de la digestion anaérobie à l'ingénierie écologique de réacteurs industriels, d'autres étapes de recherche seront nécessaires. Il faudra définir les conditions et les moyens de l'application des leviers en prenant en compte les contraintes spécifiques des systèmes industriels, notamment leur caractère plus complexe (taille beaucoup plus importante, configuration et géométrie de procédé, processus de transfert, technologies de mélange, inhomogénéité du contenu des réacteurs etc.). Le type d'alimentation des digesteurs (alimentation avec des substrats variés, non régulière, apport en continu de déchet, et donc de biomasse nouvelle avec le déchet, ou alimentation par bâchée avec renouvellement important du contenu du réacteur etc.) pourra également influencer la pérennité de l'effet des perturbations apportées. Ces différences seront autant de paramètres spécifiques des digesteurs dont il faudra tenir compte dans l'ajustement des leviers environnementaux. Le travail réalisé fournit un cadre général de l'ingénierie écologique des acteurs clés des bioprocédés, les microorganismes.

4. La mise en place de l'ingénierie écologique des communautés microbiennes des bioprocédés est-elle possible ?

4.1. La question de l'échelle d'observation

L'objectif des travaux était d'évaluer la possibilité de mettre en place une démarche d'ingénierie écologique des communautés microbiennes dans les bioprocédés de traitement anaérobie des déchets ligno-cellulosiques. Les travaux ont montré l'influence de différents leviers sur la digestion anaérobie de la cellulose. Même s'ils ne sont pas applicables directement à l'échelle industrielle, ils ouvrent des pistes intéressantes pour mettre en place l'ingénierie écologique dans ces systèmes. L'enjeu est un véritable changement dans le mode de gestion des bioprocédés. En effet, certaines limitations de la gestion par paramètres opératoires ont mis en avant l'importance de la composante microbienne et de sa prise en compte pour mieux gérer les bioprocédés. Pour en tenir compte, une mutation de la gestion des bioprocédés vers l'ingénierie écologique s'impose. Elle implique des changements profonds dans la façon de gérer les bioprocédés. Ainsi il faut passer d'une gestion par paramètres opératoires à une gestion par leviers environnementaux. Pour cela, il suffit simplement de changer d'échelle d'observation et de mieux prendre en compte les microorganismes, les relations qui existent entre eux, et l'influence des paramètres opératoires sur ces interactions ainsi que le bilan opérationnel du bioprocédé. La clé se trouve dans une meilleure compréhension et utilisation de la boîte noire. Les schémas suivant peuvent illustrer cette mutation.

4.2. Le bioprocédé

Le premier schéma représente une gestion d'un bioprocédé du point de vue de l'ingénieur à l'aide de paramètres opératoires (Figure 131). Les mesures du bilan opératoire du bioprocédé se font à l'aide de la mesure du flux entrant (déchets introduits) et du flux sortant (biogaz, digestat produit). La conception du bioprocédé lui-même (forme, volume, etc.) conditionne partiellement le déroulement de la dégradation. Les paramètres de contrôle sont les paramètres opératoires (température ou agitation par exemple). Conception et paramètres ont le plus souvent été choisis de façon empirique pour répondre à une demande particulière (digestion de déchets de l'industrie agro-alimentaire par exemple). Les objectifs du bioprocédé sont schématiquement l'élimination des déchets ou de la charge organique introduite, et la production de biogaz et d'un digestat stabilisé (ses « fonctions primaires »). Son efficacité est mesurée à travers la cinétique et le taux de dégradation. C'est une boîte noire et le déroulement des réactions de dégradation et le rôle des microorganismes à l'intérieur de cette boîte noire ne sont pas pris en compte directement.

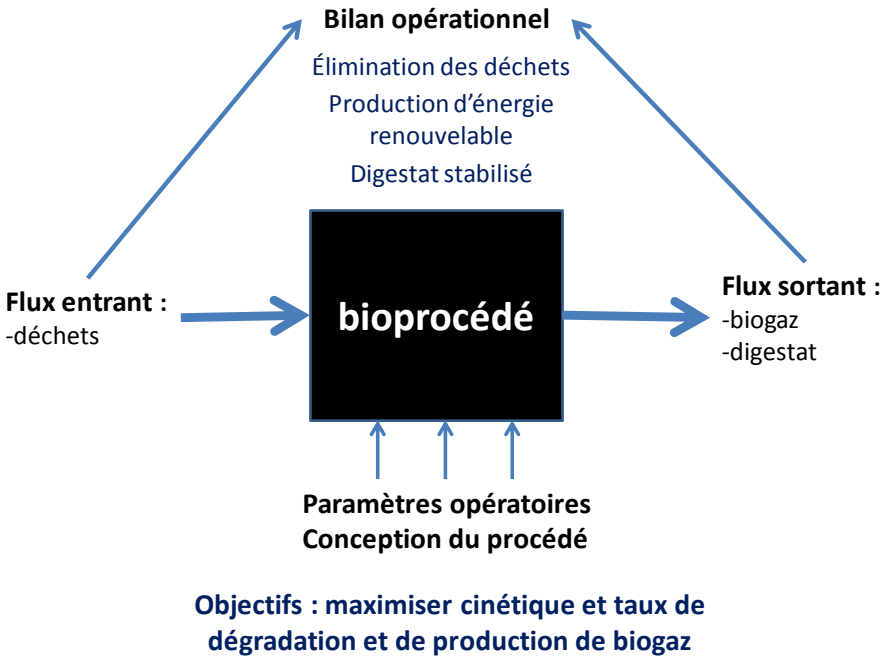


Figure 131 : Le bioprocédé du point de vue de l'ingénieur.

4.3. L'écosystème

Pourtant, le bioprocédé peut être considéré comme un écosystème microbien à part entière. Le second schéma illustre le fonctionnement d'un écosystème quelconque (Figure 132). Le même type de fonctionnement peut être retrouvé à l'intérieur de la boîte noire. Dans ce cas, des populations microbiennes complexes sont les acteurs et la boîte noire du bioprocédé est l'écosystème. Les populations interagissent entre elles et forment des réseaux d'énergie et des chaînes trophiques, comme celles qu'on peut retrouver dans un écosystème macroscopique. La matière extérieure, le substrat à la base de la chaîne trophique est le déchet qui est peu à peu transformé en biomasse, digestat et biogaz. Cette dégradation passe par un ensemble d'intermédiaires qui sont consommés par différents groupes

de microorganismes. Des flux de matière, d'énergie et d'interactions (syntrophie, compétition, mutualisme, etc.) se développent entre les membres de l'écosystème. Le système est influencé par les conditions environnementales auxquelles il est soumis, et qui sont le reflet des paramètres subis, (ou appliqués par l'opérateur dans le cas des bioprocédés). L'objectif de l'écosystème microbien est d'exploiter l'énergie libre de Gibbs des substrats afin de survivre et de se reproduire. Les conséquences macroscopiques de la réalisation de cet objectif sont en conditions anaérobies la production de biogaz et de digestat le plus stabilisé possible (les microorganismes agissent pour maximiser la récupération d'énergie). L'efficacité, du point de vue des microorganismes, se mesure au maintien dans l'écosystème et à la quantité de biomasse produite.

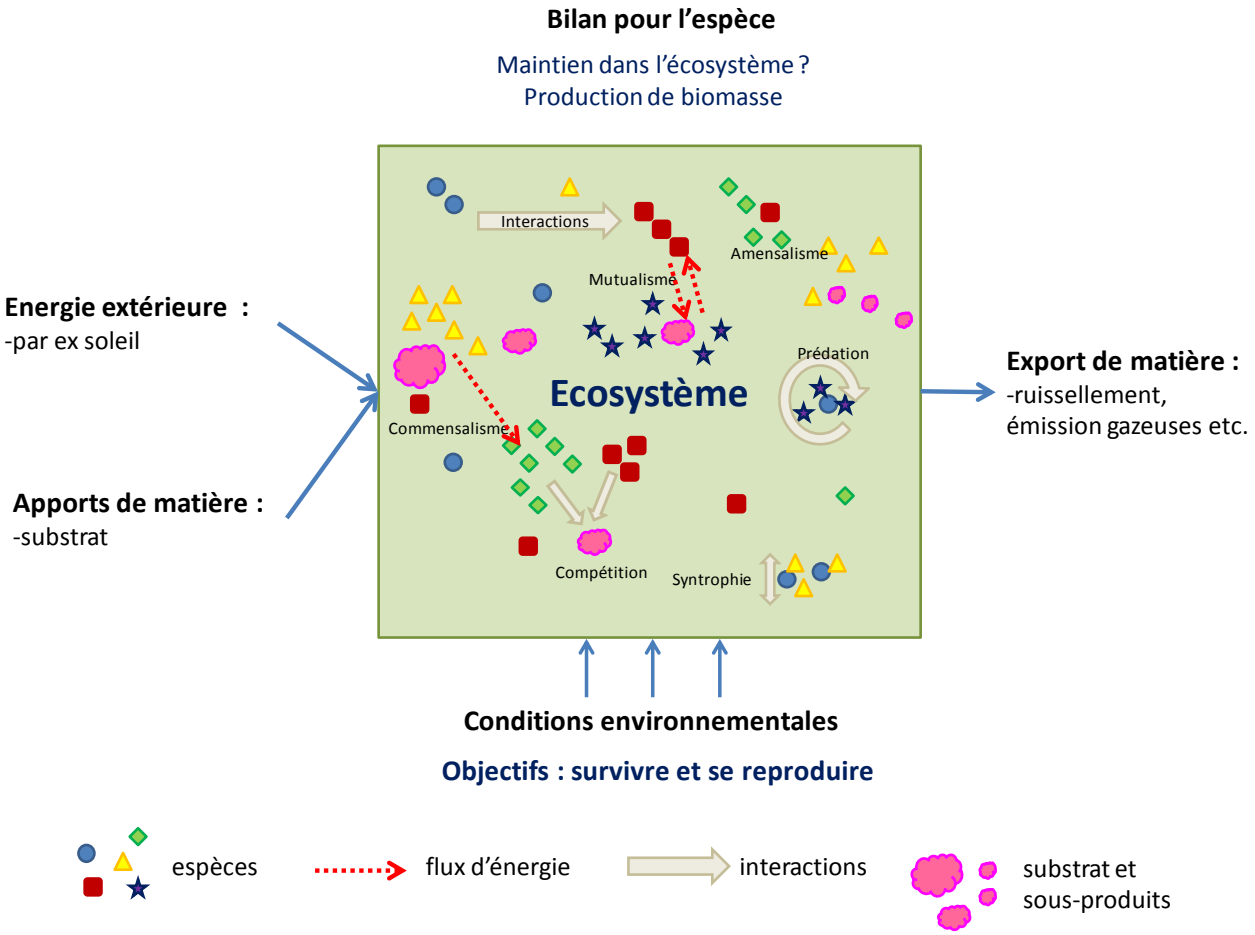


Figure 132 : Interactions et flux d'énergie et de matière dans un écosystème.

4.4. Réunir bioprocédé et écosystème

On peut faire un lien entre les deux schémas précédents pour tenter de représenter ce que serait l'ingénierie écologique des bioprocédés (Figure 133). Cette fois, le bioprocédé ne serait plus une boîte noire mais son contenu serait pris en compte dans la gestion en tant qu'écosystème microbien. Le bilan opérationnel serait vu comme un service écosystémique (élimination des déchets, production d'énergie renouvelable etc.). Les outils pour moduler le fonctionnement du bioprocédé (les populations et leur activité) seraient les leviers environnementaux. La conception des bioprocédés pourraient également être ajustée dans le même sens. Les objectifs de ces systèmes seraient en premier lieu, du point de vue

macroscopique et des usagers, de maximiser la dégradation des déchets et la production d'énergie renouvelable (fonction primaire), et du point de vue microscopique et des microorganismes de survivre et de se reproduire. Ces deux finalités, chacune à leur échelle, sont totalement convergentes.

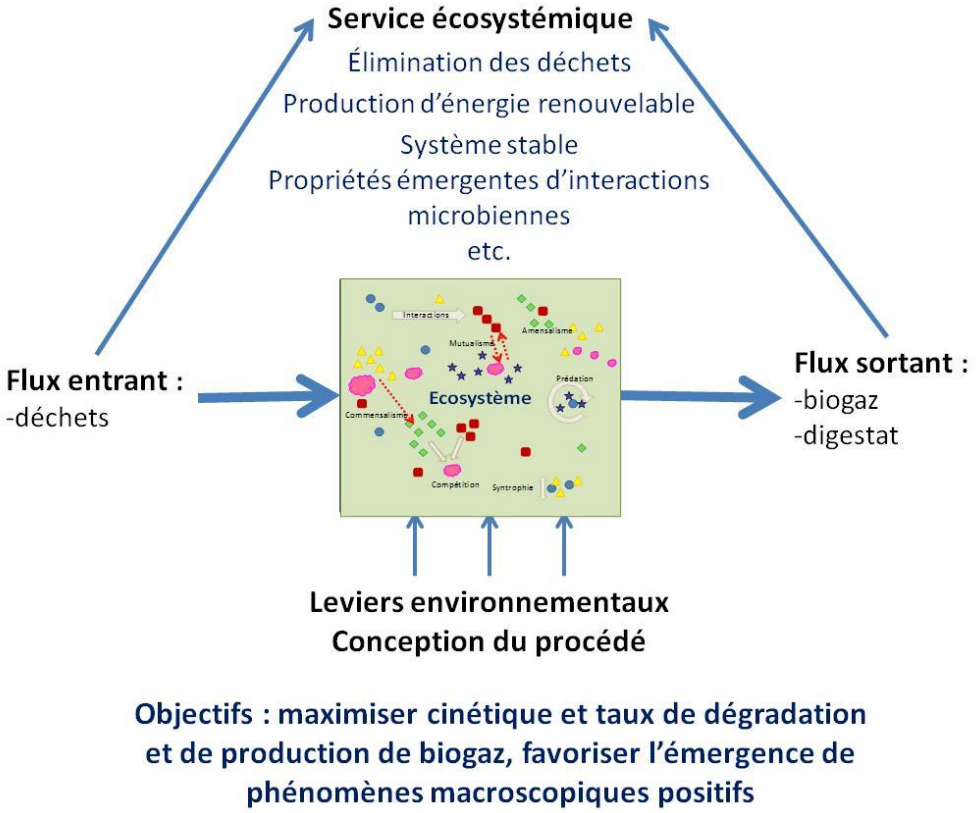


Figure 133 : L'ingénierie écologique des bioprocédés ?

Par ailleurs, de nouvelles finalités se dessinent et semblent accessibles dans de tels systèmes. Elles résultent de l'ensemble des interactions simples qui règnent au sein de l'écosystème (à l'échelle des microorganismes), desquelles résulte une propriété complexe (à l'échelle du bioprocédé). Dans cet objectif, on peut raisonner la conception et la gestion d'un bioprocédé pour induire un ensemble d'interactions microscopiques simples menant à un rendu macroscopique positif pour l'usager (les « caractéristiques secondaires » évoquées au paragraphe 2). Par exemple, au-delà de la dégradation des déchets et de la production de biogaz, des objectifs supplémentaires pour les usagers seraient par exemple le maintien d'un système stable, ou encore la possibilité de ramener un système dysfonctionnant à la stabilité. Même si le concept de stabilité est encore largement discuté, il semble que l'ensemble des interactions entre les membres de l'écosystème définisse largement la stabilité du système. Agir sur ces interactions par l'intermédiaire des leviers environnementaux pourrait avoir un effet sur le maintien ou le retour à un état stable. Dans le même sens, on peut raisonner la conception d'un procédé afin de favoriser une propriété émergente à travers un processus de sélection. On peut illustrer cette idée par quelques exemples : en conditions anaérobies, la formation de granules dans les UASB (Upflow anaerobic sludge blanket) est induite par la géométrie particulière de ces procédés ; dans le cas du traitement des eaux résiduaires bioprocédés aérobies, les systèmes de décanteurs avec recyclage des boues ont introduit une sélection sur la capacité des microorganismes à décanter et ont

ainsi conduit à favoriser l'émergence d'un service écosystémique nouveau (apparition des flocs, respect des normes de rejets en matières en suspension, etc.) ; des processus de recyclage de la biomasse différents (par exemple avec une membrane) induiraient l'apparition, via la sélection, de communautés qui ont des propriétés émergentes différentes (et donc potentiellement un autre service écosystémique).

4.5. Conclusion

Deux points essentiels peuvent être retenus de cette comparaison pour mieux circonscrire les possibilités offertes par l'ingénierie écologique des bioprocédés et les moyens de sa mise en place.

La relation diversité/fonction dans l'écosystème résulte à la fois de l'enchaînement des fonctions élémentaires catalysées par les différents groupes de microorganismes mais aussi de déterminants autres, comme des facteurs biotiques ou des interactions locales au sein de la communauté (compétition, prédation, mutualisme, facteurs environnementaux, prédation, présence de phages…) ou des facteurs environnementaux. Une question centrale en écologie est de comprendre comment l'accumulation successive d'un ensemble d'interactions locales peut **faire émerger** des phénomènes perceptibles à plus grande échelle. Ainsi, au-delà d'assurer de façon optimale les fonctions primaires de dégradation des déchets et production de biogaz, le service écosystémique recherché peut en effet être une propriété émergente d'interactions simples au sein de l'écosystème (stabilité, réduction des quantités de molécules inhibitrices, élimination des odeurs etc.). Il faudra identifier les possibilités offertes et trouver le moyen de les sélectionner.

Pour cela, une des clés dans la gestion des bioprocédés consiste sans doute à déterminer la bonne échelle d'observation et de représentation des phénomènes, et à définir l'écosystème et ses frontières. Les indicateurs macroscopiques de fonctionnement des écosystèmes relèvent de préoccupations sociétales (performance, stabilité). A l'inverse en se plaçant au niveau des individus, la diversité microbienne est la résultante de multiples interactions locales et imperceptibles individuellement à l'échelle du bioprocédé. Le bon niveau d'observation permettra de décrire les processus de façon cohérente, et de guider leur fonctionnement à travers l'application de leviers environnementaux. Le travail de l'ingénierie écologique consiste à transcrire les services écosystémiques recherchés en pressions de sélection qui s'exercent via des paramètres opératoires ou encore des conceptions de procédés afin d'exploiter le mieux possible les propriétés préexistantes des communautés et de favoriser l'émergence de propriétés complémentaires via l'implantation de communautés adéquatement sélectionnées.

En faisant évoluer l'échelle d'étude des systèmes, la mise en place de l'ingénierie écologique des communautés microbiennes des bioprocédés est donc possible, elle permettra d'améliorer les services écosystémiques originels (dégradation des déchets et production de biogaz) mais également d'en apporter de nouveaux (services écosystémiques secondaires).

– Conclusion générale

Les ingénieurs des bioprocédés ont souvent été démunis pour prendre en compte le fonctionnement de l'écosystème microbien. Ce dernier s'adapte et évolue en fonction des pressions environnementales qui sont imposées par le fonctionnement du bioprocédé, et cette dynamique peut avoir des conséquences sur les fonctions microbiennes exprimées ainsi que sur le bilan du bioprocédé. Il faut prendre en compte l'écosystème microbien et l'intégrer parmi les paramètres explicites de l'amélioration du procédé. Dans ce sens, l'ingénierie écologique fournit un cadre nouveau pour travailler à des solutions de gestion des bioprocédés innovantes et optimisées. Afin de la mettre en place et d'en bénéficier, il faut circonscrire ses possibilités mais aussi ses contraintes et les moyens de la mettre en place.

Le travail réalisé au cours de cette thèse avait pour objectif d'apporter de premiers éléments de réponse et d'évaluer la possibilité de réaliser une ingénierie écologique des processus microbiens de la digestion anaérobie. L'influence de trois catégories de leviers environnementaux a été étudiée. Des expériences de changement de température ont montré l'influence importante de ce paramètre sur les communautés microbiennes, en particulier les archées. Elles ont mis en évidence le caractère irréversible du passage par les conditions thermophiles et les potentialités offertes par les chocs de température pour modifier la biomasse. L'expérience de fonctionnalisation de la biomasse a montré qu'un modelage des populations microbiennes par préadaptation avec des substrats simples était possible. Elle a conduit à des schémas de dégradation de la cellulose spécifiques. Ce modelage a fortement contraint l'évolution d'une biomasse au départ *a priori* très variée. Enfin, des expériences de co-inoculation ont mis en avant la difficulté d'exploiter directement les propriétés enzymatiques de flores cellulolytiques performantes, mais également les possibilités de modifier les équilibres de diversité au sein de la biomasse du bioprocédé.

Ces expériences ont montré qu'il est possible de manipuler les populations microbiennes des bioprocédés anaérobies de traitement des déchets ligno-cellulosiques et les processus de dégradation associés. La mise en place de l'ingénierie écologique des bioprocédés semble donc possible. Pour y parvenir, des étapes supplémentaires sont nécessaires. Il faudra caractériser plus largement l'effet des leviers environnementaux sur les propriétés de la communauté microbienne d'une part, les relations entre ces propriétés et les services écosystémiques des bioprocédés d'autre part.

Une réflexion plus approfondie sur les moyens d'appliquer les leviers à des systèmes industriels est également nécessaire. Le réglage précis de ces leviers pour obtenir les impacts souhaités devra également être réalisé à l'échelle industrielle. Il faudra prendre en compte les contraintes spécifiques des systèmes industriels, notamment leur caractère plus complexe que les systèmes de laboratoire.

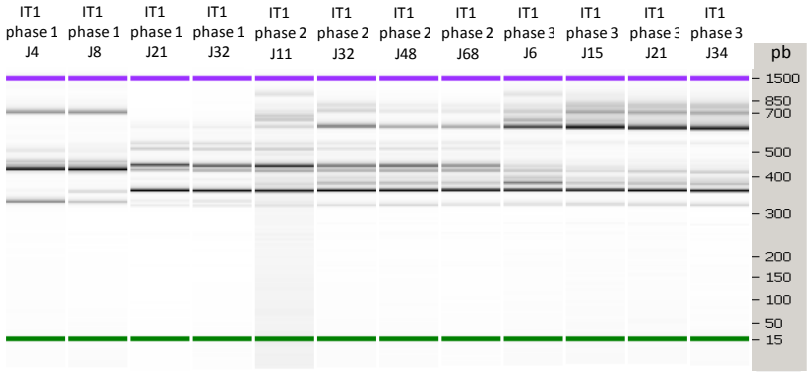
En complément, des travaux sur la conception des bioprocédés pourront également être des outils de l'ingénierie écologique, toujours dans l'objectif de maximiser les services écosystémiques comme la production de biogaz, l'élimination de déchets ou l'émergence de nouvelles propriétés bénéfiques pour l'utilisateur.

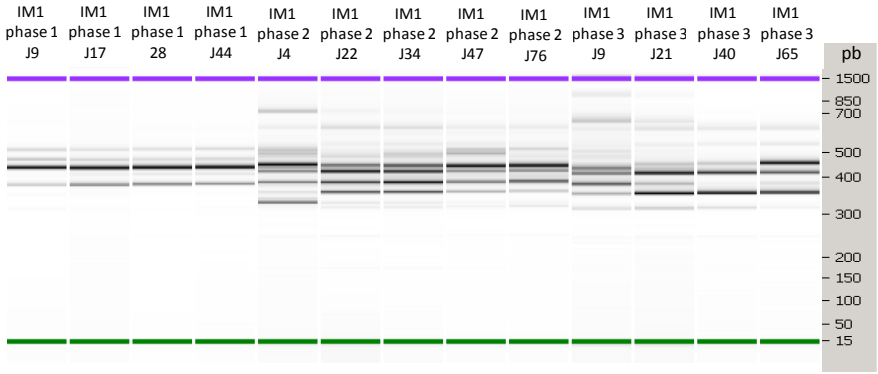
Les microorganismes jouent des rôles essentiels dans les processus de dégradation de la matière organique. Ces propriétés de dégradation sont exploitées de manière intensive par l'homme au sein des bioprocédés de traitement des déchets. L'application de l'ingénierie écologique contribuera à aller plus

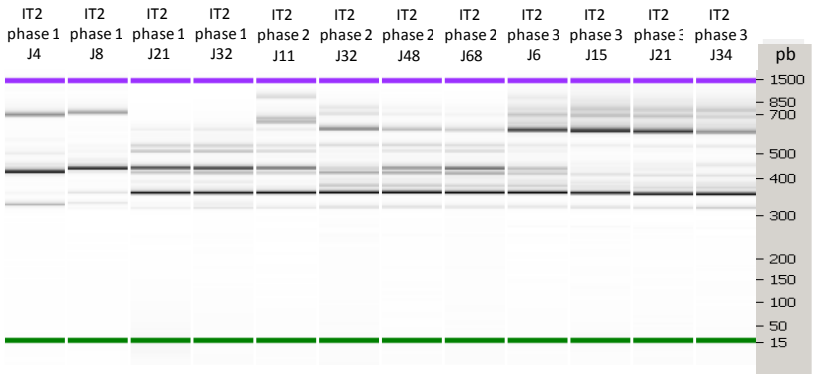
en avant encore dans l'exploitation des capacités des microorganismes à travers la mise en place d'une nouvelle démarche de gestion des bioprocédés. Cette démarche se fera à l'échelle de l'écosystème microbien.

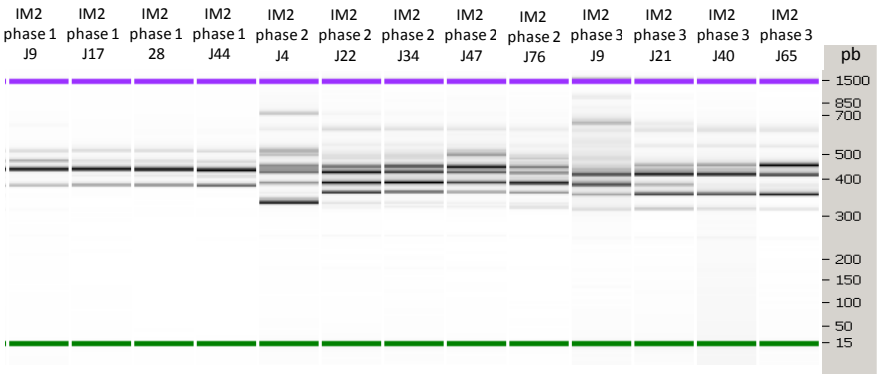
– Annexes

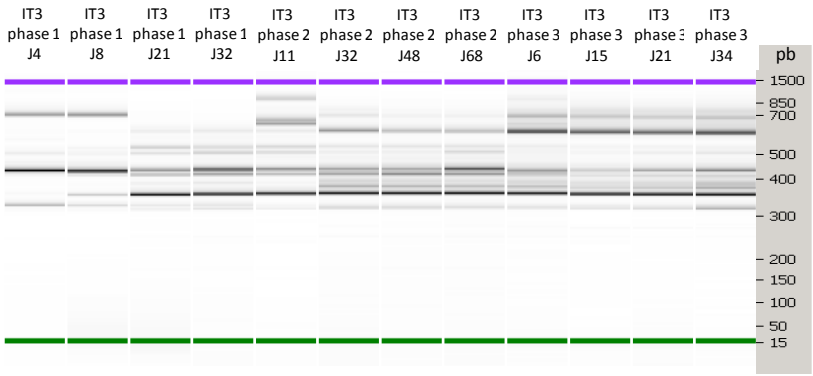
Annexe 1 : Profils ARISA des expériences de changements de température, archées

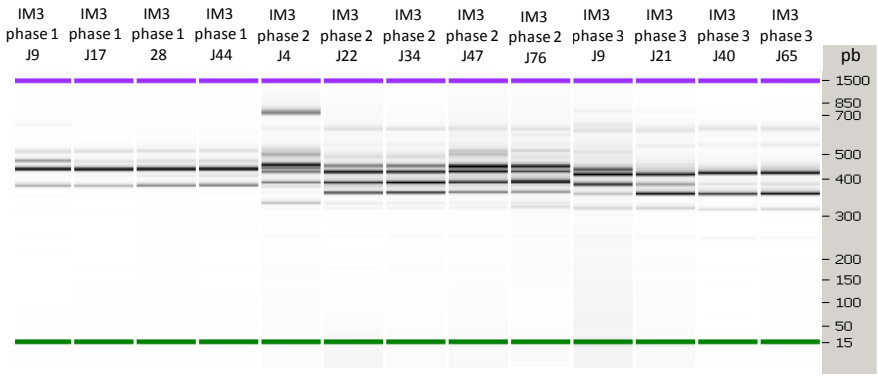




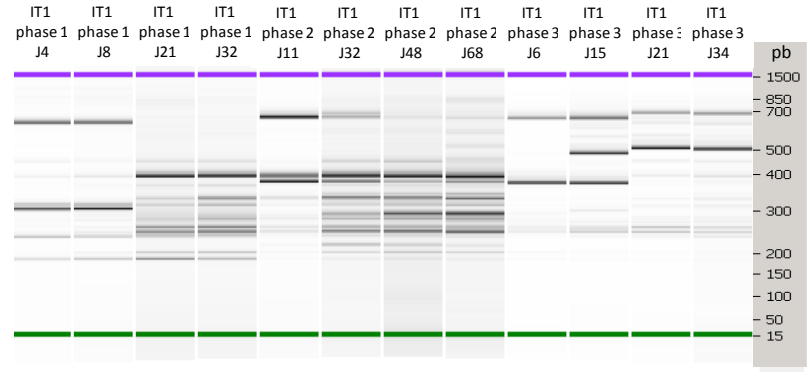


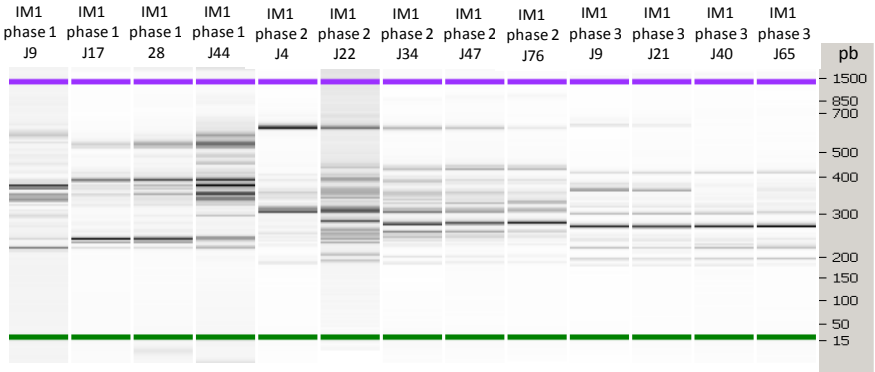


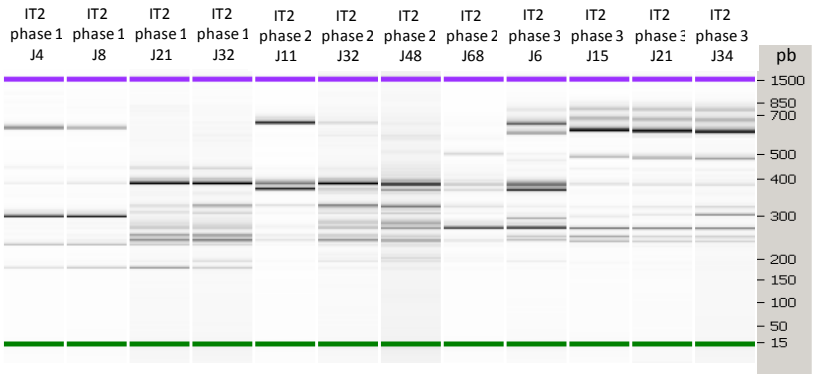


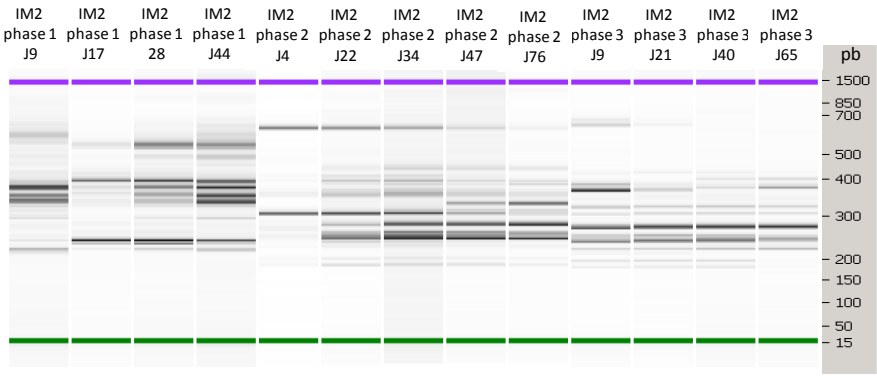


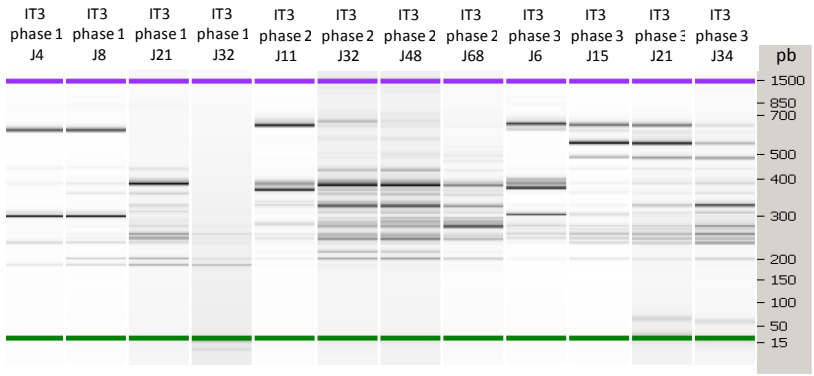
Annexe 1 : Profils ARISA des expériences de changements de température, bactéries

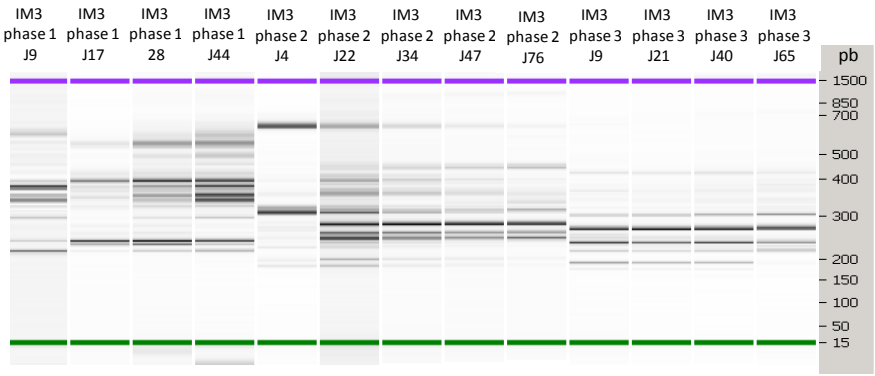












Annexe 2 : Liste des OTUs identifiés et nom du plus proche parent pour les bactéries

nom OTU	Consensus Lineage	IM	IT	Rumen	Boue	IT1	IT3	IM1	IM2	IM_{Pro}	IM_{But}	IM_{Pro} Cellulose	IM_{But} Cellulose	IM_{Rumen}	IM_{Boue}
Boue 1	Bacteroidetes;				8.5%										
Boue 2	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;g__Dechloromonas;s__Uncultured_bacterium;				8.5%										
Boue 3	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;				4.6%										
Boue 4	Chlorobi;c__Ignavibacteria;g__Phos-he36;s__Uncultured_bacterium;				3.8%										
Boue 5	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;g__Propionivibrio;s__Uncultured_bacterium;				2.8%										
Boue 6	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;g__Variovorax;s__Uncultured_acidovorax_sp.;				2.8%										
Boue 7	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;g__Leptothrix;s__Uncultured_bacterium;				2.5%										
Boue 8	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;g__Uliginosibacterium;s__Uncultured_bacterium;				2.5%										
Boue 9	Nitrospirae;c__Nitrospira;g__Nitrospira;				2.4%										
Boue 10	Proteobacteria;				2.3%										
Boue 11	Bacteroidetes;c__Sphingobacteria;g__Terrimonas;s__Uncultured_bacterium;				2.0%										
Boue 12	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;g__Nitrosomonas;s__Uncultured_bacterium;				2.0%										
Boue 13	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;				2.0%										
Boue 14	Chloroflexi;c__Caldilineae;g__Uncultured;				1.7%										
Boue 15	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;g__Dechloromonas;s__Uncultured_bacterium;				1.6%										
Boue 16	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;g__Propionivibrio;s__Uncultured_bacterium;				1.5%										
Boue 17	Oc31;c__Uncultured_bacterium;g__Oc31;s__Uncultured_bacterium;				1.4%										
Boue 18	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;				1.3%										
Boue 19	Bacteroidetes;				1.3%										
Boue 20	Bacteroidetes;c__Sphingobacteria;g__Uncultured;				1.3%										
Boue 21	Chloroflexi;c__Tk10;g__Tk10;				1.3%										
Boue 22	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;				1.3%										
Boue 23	Bacteroidetes;c__Sphingobacteria;g__Uncultured;				1.3%										
Boue 24	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;g__Sc-i-84;				1.2%										
Boue 25	Chloroflexi;c__Caldilineae;g__Uncultured;				1.2%										
Boue 26	Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;				1.2%										
Boue 27	Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;				1.2%										
Boue 28	Actinobacteria;c__Actinobacteria;g__Tetrasphaera;s__Uncultured_bacterium;				1.1%										
Boue 29	Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;g__Dokdonella;s__Uncultured_bacterium;				1.1%										
Boue 30	Chloroflexi;c__Anaerolineae;g__Uncultured;				1.1%										
Boue 31	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;g__Sc-i-84;s__Uncultured_bacterium;				1.1%										
Boue 32	Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;				1.1%										
IM 1	Spirochaetes;c__Spirochaetes;g__W27;s__Uncultured_bacterium;	55.5%						11.1%		31.0%	19.4%	3.1%		18.0%	12.2%
IM 2	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Vadinbc27_wastewater-sludge_group;s__Uncultured_bacteroidetes_bacterium;	14.2%						5.6%		5.1%	13.8%	7.6%	7.0%	13.1%	7.2%
IM 3	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Proteiniphilum;s__Uncultured_bacterium;	3.8%								7.0%	15.7%		1.2%		
IM 4	Synergistetes;c__Synergistia;g__Synergistaceae;s__Uncultured_bacterium;	2.7%													
IM 5	Firmicutes;c__Clostridia;g__Opb54;s__Uncultured_bacterium;	2.0%	16.6%			1.9%	7.9%		5.5%						
IM 6	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Proteiniphilum;s__Uncultured_bacterium;	1.8%								3.8%	10.5%				
IM 7	Spirochaetes;c__Spirochaetes;	1.3%													
IM 8	Firmicutes;c__Clostridia;g__Caldicoprobacter;s__Uncultured_bacterium;	1.3%						6.8%						4.9%	5.2%
IM 9	Thermotogae;c__Thermotogae;g__060f05-b-sd-p93;s__Uncultured_bacterium;	1.1%	44.3%												
IM1 1	Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;g__Acinetobacter;							2.7%							
IM1 2	Bacteroidetes;							5.4%							
IM1 3	Spirochaetes;c__Spirochaetes;g__Treponema;							11.9%					51.0%	5.4%	18.4%
IM1 4	Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;g__Vibrio;							2.3%							
IM1 5	Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;g__Stenotrophomonas;							1.4%							
IM1 6	Firmicutes;c__Clostridia;g__Incertae_sedis;							1.1%							
IM1 7	Proteobacteria;							1.1%							
IM1 8	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Petrimonas;							2.4%		1.6%	1.2%	1.3%	2.4%		1.9%
IM1 9	Firmicutes;c__Clostridia;g__Sedimentibacter;s__Uncultured_bacterium;							2.6%							
IM1 10	Bacteroidetes;							26.2%						3.6%	5.2%
IM1 11	Fibrobacteres;c__Fibrobacteria;g__Fibrobacter;							5.3%							

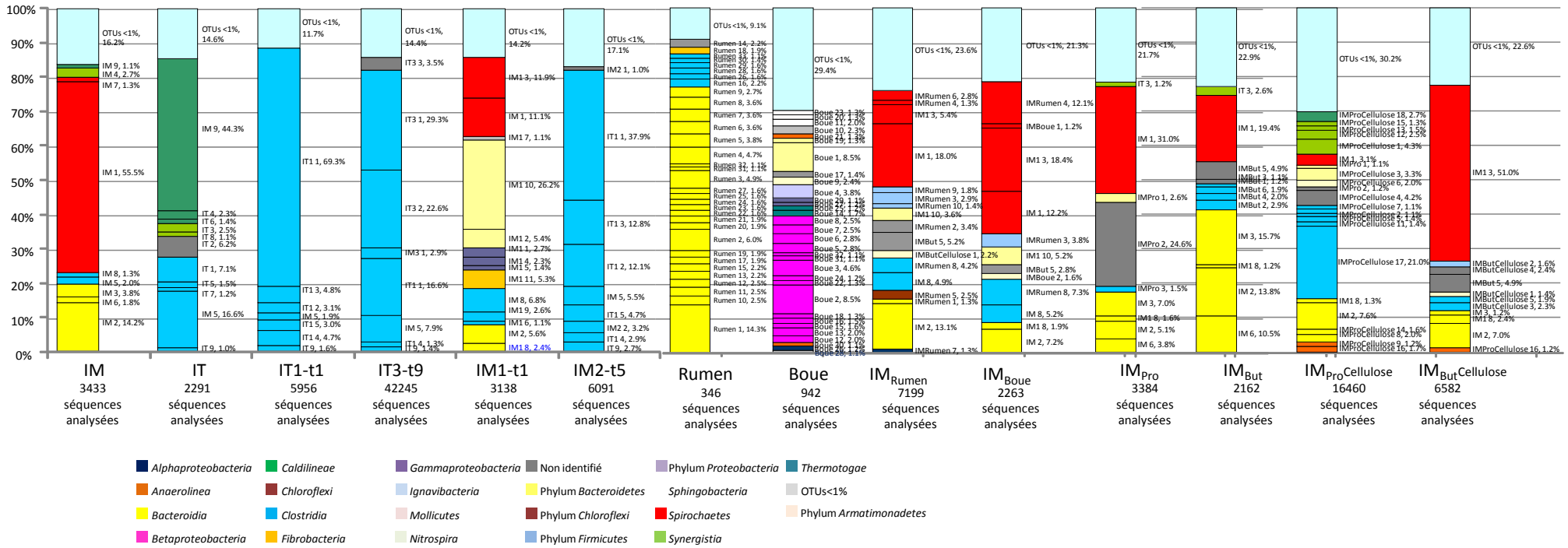
IM2 1	Root;k__Bacteria;								1.0%						
IM2 2	Firmicutes;c__Clostridia;g__Tepidimicrobium;s__Uncultured_bacterium_tbr1-1;								3.2%						
IM3 1	Firmicutes;c__Clostridia;						2.9%								
IMBoue 1	Spirochaetes;c__Spirochaetes;g__Treponema;s__Bacterium_enrichment_culture_clone_bbmc-12;														1.2%
IMBoue 2	Tenericutes;c__Mollicutes;g__Acholeplasma;														1.6%
IMBut 1	Candidate_division_op9;c__Uncultured_bacterium;g__Candidate_division_op9;s__Uncultured_bacterium;										1.2%				
IMBut 2	Firmicutes;c__Clostridia;g__Syntrophomonas;										2.9%				
IMBut 3	Firmicutes;c__Clostridia;g__Syntrophomonas;s__Uncultured_syntrophomonas_sp.;										1.1%				
IMBut 4	Firmicutes;c__Clostridia;g__Uncultured;s__Bacterium_enrichment_culture_clone_bbmc-1;										2.0%				
IMBut 5	Root;k__Bacteria;										4.9%		4.9%	5.2%	2.8%
IMBut 6	Firmicutes;c__Clostridia;g__Anaerobranca;										1.9%				
IMButCellulose 1	Tenericutes;c__Mollicutes;g__Acholeplasma;s__Uncultured_bacterium;												1.4%	2.2%	
IMButCellulose 2	Firmicutes;												1.6%		
IMButCellulose 3	Firmicutes;c__Clostridia;												2.3%		
IMButCellulose 4	Root;k__Bacteria;												2.4%		
IMButCellulose 5	Firmicutes;c__Clostridia;g__Uncultured;s__Clostridium_sp._jc3;												1.9%		
IMPro 1	Bacteroidetes;c__Vadinha17;g__Vadinha17;s__Uncultured_bacterium;									2.6%		1.1%			
IMPro 2	Root;k__Bacteria;									24.6%		1.2%			
IMPro 3	Firmicutes;c__Clostridia;g__Uncultured;s__Uncultured_bacterium_bc09;									1.5%					
IMProCellulose 1	Synergistetes;c__Synergistia;g__Uncultured;											4.3%			
IMProCellulose 2	Firmicutes;c__Clostridia;											1.1%			
IMProCellulose 3	Bacteroidetes;											3.3%			
IMProCellulose 4	Root;k__Bacteria;											4.2%			
IMProCellulose 5	Firmicutes;c__Clostridia;g__Uncultured;s__Uncultured_anaerovorax_sp.;											1.4%			
IMProCellulose 6	Armatimonadetes;											2.0%			
IMProCellulose 7	Firmicutes;c__Clostridia;g__Ruminococcaceae;s__Uncultured_clostridiales_bacterium;											1.1%			
IMProCellulose 8	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__M2pb4-65_termite_group;s__Uncultured_bacterium;											2.0%			
IMProCellulose 9	Chloroflexi;c__Anaerolineae;g__Uncultured;											1.2%			
IMProCellulose 10	Firmicutes;c__Clostridia;											1.1%			
IMProCellulose 11	Firmicutes;c__Clostridia;											1.4%			
IMProCellulose 12	Synergistetes;c__Synergistia;g__Aminobacterium;s__Aminobacterium_colombiense_dsm_12261;											2.5%			
IMProCellulose 13	Synergistetes;c__Synergistia;g__Uncultured;											1.5%			
IMProCellulose 14	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Vadinbc27_wastewater-sludge_group;s__Uncultured_bacterium;											1.6%			
IMProCellulose 15	Synergistetes;c__Synergistia;g__Uncultured;s__Bacterium_enrichment_culture_clone_bbmc-14;											1.3%			
IMProCellulose 16	Chloroflexi;c__Anaerolineae;											1.7%	1.2%		
IMProCellulose 17	Firmicutes;c__Clostridia;											21.0%			
IMProCellulose 18	Thermotogae;c__Thermotogae;g__Kosmotoga;s__Uncultured_thermotogales_bacterium;											2.7%			
IMRumen 1	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Alkaliflexus;s__Ruminofilibacter_xylanolyticum;													1.3%	
IMRumen 2	Root;k__Bacteria;													3.4%	
IMRumen 3	Firmicutes;													2.9%	3.8%
IMRumen 4	Spirochaetes;c__Spirochaetes;g__Treponema;s__Bacterium_enrichment_culture_clone_bbmc-3;													1.3%	12.1%
IMRumen 5	Chloroflexi;c__Chloroflexi;g__Herpetosiphon;s__Uncultured_chloroflexi_bacterium;													2.5%	
IMRumen 6	Spirochaetes;c__Spirochaetes;g__Gzkb75;s__Uncultured_bacterium;													2.8%	
IMRumen 7	Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;g__Balneimonas;													1.3%	
IMRumen 8	Firmicutes;c__Clostridia;													4.2%	7.3%
IMRumen 9	Firmicutes;													1.8%	
IMRumen 10	Firmicutes;													1.4%	
IMRumen 11	Bacteroidetes;c__Sphingobacteria;g__Flavisolibacter;														
IT 1	Firmicutes;c__Clostridia;g__D8a-2;s__Uncultured_thermoanaerobacteriaceae_bacterium;		7.1%												
IT 2	Candidate_division_op9;c__Uncultured_bacterium;g__Candidate_division_op9;s__Uncultured_bacterium;		6.2%												
IT 3	Synergistetes;c__Synergistia;g__Aminobacterium;s__Uncultured_bacterium;		2.5%							1.2%	2.6%				
IT 4	Thermotogae;c__Thermotogae;g__060f05-b-sd-p93;s__Uncultured_thermotogae_bacterium;		2.3%												
IT 5	Firmicutes;c__Clostridia;g__Gelria;s__Uncultured_bacterium;		1.5%												
IT 6	Thermotogae;c__Thermotogae;g__060f05-b-sd-p93;s__Uncultured_bacterium;		1.4%												
IT 7	Firmicutes;c__Clostridia;g__Opb54;s__Uncultured_bacterium;		1.2%												
IT 8	Synergistetes;c__Synergistia;g__Anaerobaculum;s__Uncultured_bacterium;		1.1%												
IT 9	Firmicutes;c__Clostridia;g__Opb54;s__Uncultured_firmicutes_bacterium;		1.0%			1.6%	1.4%		2.7%						

IT1 1	Firmicutes;c__Clostridia;					69.3%	16.6%		37.9%						
IT1 2	Firmicutes;c__Clostridia;g__Uncultured;s__Uncultured_clostridium_sp.;					3.1%			12.1%						
IT1 3	Firmicutes;c__Clostridia;					4.8%			12.8%						
IT1 4	Firmicutes;c__Clostridia;					4.7%	1.3%		2.9%						
IT1 5	Firmicutes;c__Clostridia;g__Halocella;s__Uncultured_bacterium;					3.0%			4.7%						
IT3 1	Firmicutes;c__Clostridia;g__Incertae_sedis;						29.3%								
IT3 2	Firmicutes;c__Clostridia;g__Uncultured;s__Uncultured_bacterium_tbr1-10;						22.6%								
IT3 3	Root;k__Bacteria;						3.5%								
Rumen 1	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;s__Uncultured_rumen_bacterium_4c3d-1;			14.3%											
Rumen 2	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;s__Uncultured_rumen_bacterium;			6.0%											
Rumen 3	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;s__Prevotella_ruminicola;			4.9%											
Rumen 4	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Rc9_gut_group;s__Uncultured_rumen_bacterium;			4.7%											
Rumen 5	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Rc9_gut_group;s__Uncultured_rumen_bacterium;			3.8%											
Rumen 6	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;			3.6%											
Rumen 7	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;s__Uncultured_rumen_bacterium_3c3d-16;			3.6%											
Rumen 8	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;s__Uncultured_rumen_bacterium;			3.6%											
Rumen 9	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Rc9_gut_group;s__Uncultured_rumen_bacterium;			2.7%											
Rumen 10	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;			2.5%											
Rumen 11	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;s__Uncultured_rumen_bacterium;			2.5%											
Rumen 12	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;			2.5%											
Rumen 13	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;s__Uncultured_rumen_bacterium;			2.2%											
Rumen 14	Candidate_division_sr1;c__Uncultured_rumen_bacterium;g__Candidate_division_sr1;s__Uncultured_rumen_bacterium;			2.2%											
Rumen 15	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Rc9_gut_group;s__Uncultured_rumen_bacterium;			2.2%											
Rumen 16	Firmicutes;c__Clostridia;			2.2%											
Rumen 17	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;s__Uncultured_rumen_bacterium;			1.9%											
Rumen 18	Fibrobacteres;c__Fibrobacteria;g__Fibrobacter;			1.9%											
Rumen 19	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Rc9_gut_group;s__Uncultured_rumen_bacterium;			1.9%											
Rumen 20	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;s__Uncultured_rumen_bacterium;			1.9%											
Rumen 21	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;			1.9%											
Rumen 22	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;s__Uncultured_rumen_bacterium;			1.6%											
Rumen 23	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Prevotella;s__Uncultured_rumen_bacterium;			1.6%											
Rumen 24	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__S24-7;s__Uncultured_rumen_bacterium;			1.6%											
Rumen 25	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Rc9_gut_group;s__Uncultured_rumen_bacterium;			1.6%											
Rumen 26	Firmicutes;c__Clostridia;			1.6%											
Rumen 27	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Rc9_gut_group;			1.6%											
Rumen 28	Firmicutes;c__Clostridia;g__Pseudobutyrivibrio;			1.6%											
Rumen 29	Firmicutes;c__Clostridia;g__Uncultured;			1.6%											
Rumen 30	Firmicutes;c__Clostridia;			1.4%											
Rumen 31	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;			1.1%											
Rumen 32	Bacteroidetes;c__Bacteroidia;g__Rc9_gut_group;s__Uncultured_rumen_bacterium;			1.1%											
Rumen 33	Firmicutes;c__Clostridia;			1.1%											

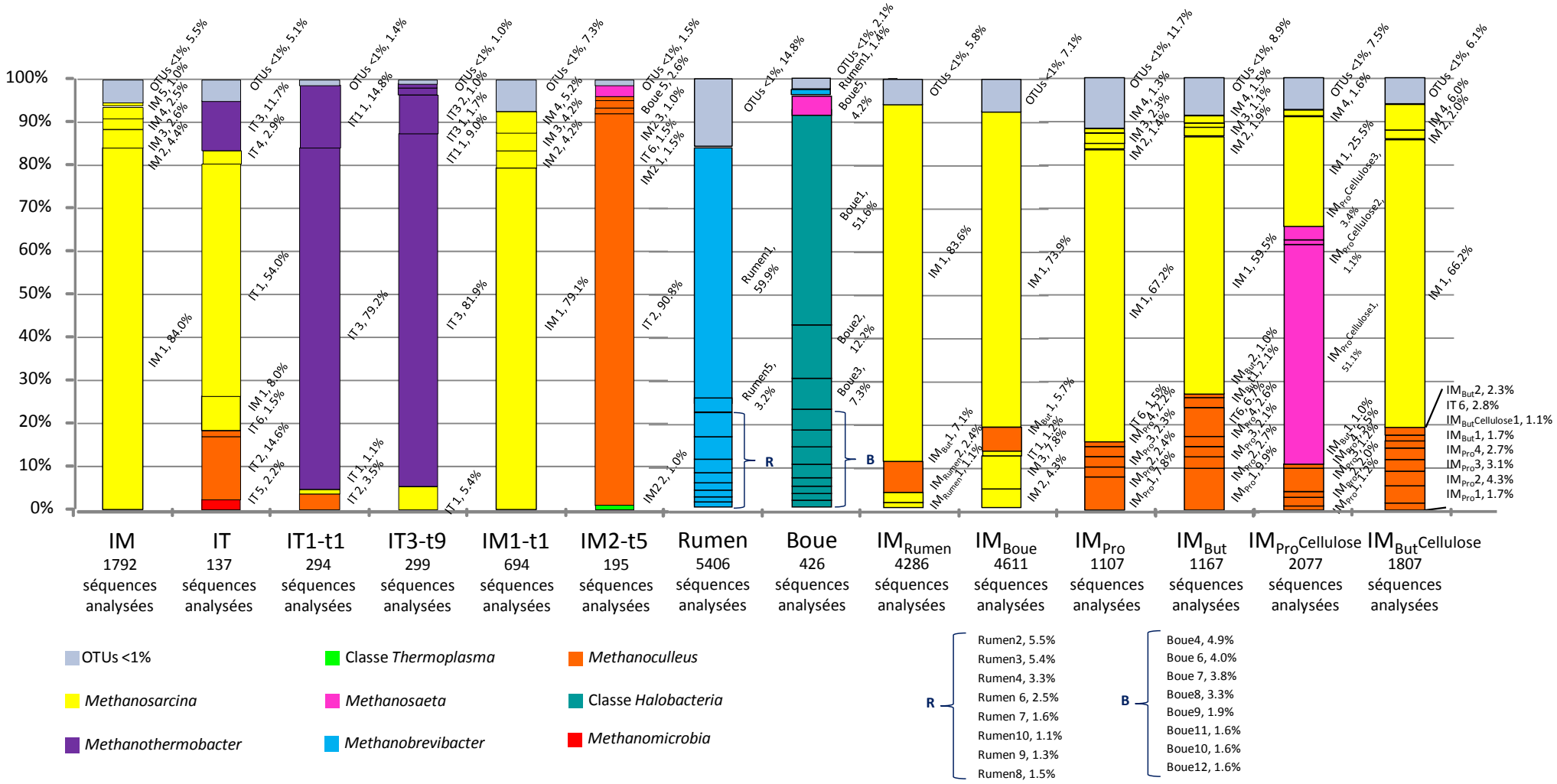
Annexe 3 : Liste des OTUs identifiés et nom du plus proche parent pour les archées

nom OTU	Consensus Lineage	IM	IT	Rumen	Boue	IT1	IT3	IM1	IM2	IM_{Pro}	IM_{But}	IM_{Pro} Cellulose	IM_{But} Cellulose	IM_{Rumen}	IM_{Boue}
Boue 1	c__Halobacteria;g__Candidatus_parvarchaeum;				51.6%										
Boue 10	c__Halobacteria;g__Candidatus_parvarchaeum;				1.6%										
Boue 11	c__Halobacteria;				1.6%										
Boue 12	c__Halobacteria;g__Deep_sea_hydrothermal_vent_gp_6(dhveg-6);				1.6%										
Boue 2	c__Halobacteria;g__Miscellaneous_euryarchaeotic_group(meg);s__Uncultured_archaeon;				12.2%										
Boue 3	c__Halobacteria;				7.3%										
Boue 4	c__Halobacteria;g__Candidatus_parvarchaeum;				4.9%										
Boue 5	c__Methanomicrobia;g__Methanosaeta;s__Uncultured_archaeon;				4.2%				2.6%						
Boue 6	c__Halobacteria;g__Deep_sea_hydrothermal_vent_gp_6(dhveg-6);s__Uncultured_euryarchaeote;				4.0%										
Boue 7	c__Halobacteria;g__Candidatus_parvarchaeum;				3.8%										
Boue 8	c__Halobacteria;g__Candidatus_parvarchaeum;				3.3%										
Boue 9	c__Halobacteria;g__Candidatus_parvarchaeum;				1.9%										
IM 1	c__Methanomicrobia;g__Methanosarcina;	84.0%	8.0%					79.1%		67.2%	59.5%	25.5%	66.2%	83.6%	73.9%
IM 2	c__Methanomicrobia;g__Methanosarcina;	4.4%						4.2%		1.4%	1.9%		2.0%		4.3%
IM 3	c__Methanomicrobia;g__Methanosarcina;	2.6%						4.2%		2.3%	1.1%				7.8%
IM 4	c__Methanomicrobia;g__Methanosarcina;	2.5%						5.2%		1.3%	1.5%	1.6%	6.0%		
IM 5	c__Methanomicrobia;g__Methanosarcina;	1.0%													
IM2 1	c__Methanomicrobia;g__Methanoculleus;s__Methanoculleus_thermophilus;								1.5%						
IM2 2	c__Thermoplasmata;g__Vadinca11_gut_group;s__Uncultured_archaeon;								1.0%						
IM2 3	c__Methanomicrobia;g__Methanoculleus;s__Methanoculleus_thermophilus;								1.0%						
IMBut 1	c__Methanomicrobia;g__Methanoculleus;										2.1%		1.7%	7.1%	5.7%
IMBut 2	c__Methanomicrobia;g__Methanoculleus;										1.0%		2.3%		
IMButCellulose 1	c__Methanomicrobia;g__Methanoculleus;												1.1%		
IMPro 1	c__Methanomicrobia;g__Methanoculleus;									7.8%	9.9%	1.2%	1.7%		
IMPro 2	c__Methanomicrobia;g__Methanoculleus;s__Uncultured_euryarchaeote;									2.4%	2.7%	2.0%	4.3%		
IMPro 3	c__Methanomicrobia;g__Methanoculleus;									2.3%	2.1%	1.2%	3.1%		
IMPro 4	c__Methanomicrobia;g__Methanoculleus;									2.2%	2.6%	5.5%	2.7%		
IMProCellulose 1	c__Methanomicrobia;g__Methanosaeta;s__Unidentified_archaeon;											51.1%			
IMProCellulose 2	c__Methanomicrobia;g__Methanosaeta;s__Unidentified_archaeon;											1.1%			
IMProCellulose 3	c__Methanomicrobia;g__Methanosaeta;s__Unidentified_archaeon;											3.4%			
IMRumen 1	c__Methanomicrobia;g__Methanosarcina;													2.4%	
IMRumen 2	c__Methanomicrobia;g__Methanosarcina;s__Uncultured_archaeon;													1.1%	
IT 1	c__Methanomicrobia;g__Methanosarcina;s__Uncultured_euryarchaeote;		54.0%			1.1%	5.4%								1.2%
IT 2	c__Methanomicrobia;g__Methanoculleus;		14.6%			3.5%			90.8%						
IT 3	c__Methanobacteria;g__Methanothermobacter;s__Uncultured_archaeon;		11.7%			79.2%	81.9%								
IT 4	c__Methanomicrobia;g__Methanosarcina;s__Uncultured_euryarchaeote;		2.9%												
IT 5	c__Methanomicrobia;		2.2%												
IT 6	c__Methanomicrobia;g__Methanoculleus;s__Uncultured_euryarchaeote;		1.5%						1.5%	1.5%	6.7%		2.8%		
IT1 1	c__Methanobacteria;g__Methanothermobacter;s__Uncultured_archaeon;					14.8%	9.0%								
IT3 1	c__Methanobacteria;g__Methanothermobacter;s__Uncultured_archaeon;						1.7%								
IT3 2	c__Methanobacteria;g__Methanothermobacter;s__Uncultured_archaeon;						1.0%								
Rumen 1	c__Methanobacteria;g__Methanobrevibacter;s__Uncultured_archaeon;			59.9%	1.4%										
Rumen 10	c__Methanobacteria;g__Methanobrevibacter;s__Uncultured_archaeon;			1.1%											
Rumen 2	c__Methanobacteria;g__Methanobrevibacter;s__Uncultured_methanogenic_archaeon;			5.5%											
Rumen 3	c__Methanobacteria;g__Methanobrevibacter;s__Uncultured_archaeon;			5.4%											
Rumen 4	c__Methanobacteria;g__Methanobrevibacter;s__Uncultured_archaeon;			3.3%											
Rumen 5	c__Methanobacteria;g__Methanobrevibacter;s__Uncultured_archaeon;			3.2%											
Rumen 6	c__Methanobacteria;g__Methanobrevibacter;s__Uncultured_archaeon;			2.5%											
Rumen 7	c__Methanobacteria;g__Methanobrevibacter;s__Uncultured_archaeon;			1.6%											
Rumen 8	c__Methanobacteria;g__Methanobrevibacter;s__Uncultured_archaeon;			1.5%											
Rumen 9	c__Methanobacteria;g__Methanobrevibacter;s__Uncultured_archaeon;			1.3%											

Annexe 4 : Diversité des bactéries par classe et OTUs



Annexe 5 : Diversité des archées par genre et OTUs



– Références bibliographiques

1. ADEME. (2009) Les déchets en chiffres.
2. ADEME. (2009) Enquête collecte 2007.
3. Reinhart, D. R., T. G. Townsend. . (1998) Landfill Bioreactor Design and Operation., *Lewis Publishers, Boca Raton, NY:189 pages*.
4. Bouchez, T., Barina, G., Duquennoi, C., Vigneron, V., Budka, A., and Audic, J.-M. (2005) Vers une nouvelle génération de centres de stockage bioactifs, *Revue "Techniques - Sciences - Méthodes" - ASTEE*, 66.
5. Rowe, R. K., and Islam, M. Z. (2009) Impact of landfill liner time-temperature history on the service life of HDPE geomembranes, *Waste Management 29*, 2689-2699.
6. FNADE. *www.fnade.org*.
7. Ademe. (1993) Méthode de caractérisation des Ordures Ménagères, *Connaitre pour agir-Manuel de base*.
8. Eleazer, W. E., Odle Iii, W. S., Wang, Y. S., and Barlaz, M. A. (1997) Biodegradability of municipal solid waste components in laboratory- scale landfills, *Environmental Science and Technology 31*, 911-917.
9. Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., and Pretorius, I. S. (2002) Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews 66*, 506-577.
10. ADEME. (2003) ITOM 2002.
11. Horton, R., and Hawkes, D. (1981) The Design of Anaerobic Digesters, *Studies in Environmental Science 9*, 143-150.
12. Moletta, R. (1989) Control and utilisation of anaerobic digestors, *Revue Des Sciences De L'Eau 2*, 265-293.
13. Taconi, K. A., Zappi, M. E., Todd French, W., and Brown, L. R. (2007) Feasibility of methanogenic digestion applied to a low pH acetic acid solution, *Bioresource Technology 98*, 1579-1585.
14. Ten Brummeler, E., Hulshoff Pol, L. W., and Dolfing, J. (1985) Methanogenesis in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at pH 6 on an acetate-propionate mixture, *Applied and Environmental Microbiology 49*, 1472-1477.
15. Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological Reviews 59*, 143-169.
16. Johnson, D. B. (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms, *FEMS Microbiology Ecology 27*, 307-317.
17. Watson-Craick, I., L. ,Robin Jones (1995) Selected approaches for the investigation of microbial interactions, *Microbiology of landfill sites*.
18. Pace, N. R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere, *Science 276*, 734-740.
19. Von Mering, C., Hugenholtz, P., Raes, J., Tringe, S. G., Doerks, T., Jensen, L. J., Ward, N., and Bork, P. (2007) Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments, *Science 315*, 1126-1130.
20. Curtis, T. (2007) Theory and the microbial world, *Environmental Microbiology 9*, 1.
21. Briones, A., and Raskin, L. (2003) Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability, *Current Opinion in Biotechnology 14*, 270-276.
22. Rittmann, B. E., Hausner, M., Loffler, F., Love, N. G., Muyzer, G., Okabe, S., Oerther, D. B., Peccia, J., Raskin, L., and Wagner, M. (2006) A vista for microbial ecology and environmental biotechnology, *Environmental Science and Technology 40*, 1096-1103.
23. Curtis, T. (2006) Microbial ecologists: It's time to 'go large', *Nature Reviews Microbiology 4*, 488.
24. Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution, *Microbiological Reviews 51*, 221-271.

25. Laguerre, G., Allard, M. R., Revoy, F., and Amarger, N. (1994) Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes, *Applied and Environmental Microbiology 60*, 56-63.

26. Moyer, C. L., Dobbs, F. C., and Karl, D. M. (1994) Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii, *Applied and Environmental Microbiology 60*, 871-879.

27. Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., and Forney, L. J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology 63*, 4516-4522.

28. Marsh, T. L. (1999) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products, *Current Opinion in Microbiology 2*, 323-327.

29. Spiegelman, D., Whissell, G., and Greer, C. W. (2005) A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities, *Canadian Journal of Microbiology 51*, 355-386.

30. Garcia-Martinez, J., Acinas, S. G., Antan, A. I., and Rodriguez-Valera, F. (1999) Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity, *Journal of Microbiological Methods 36*, 55-64.

31. Fisher, M. M., and Triplett, E. W. (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities, *Applied and Environmental Microbiology 65*, 4630-4636.

32. Ranjard, L., Poly, F., and Nazaret, S. (2000) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to soil environment, *Research in Microbiology 151*, 167-177.

33. Muyzer, G., De Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology 59*, 695-700.

34. Rosenbaum, V., and Riesner, D. (1987) Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts, *Biophysical Chemistry 26*, 235-246.

35. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., and Hayashi, K. (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction, *Genomics 5*, 874-879.

36. Hong, H., Pruden, A., and Reardon, K. F. (2007) Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage, *Journal of Microbiological Methods 69*, 52-64.

37. Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2006) Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments, *Journal of Microbiological Methods 66*, 165-169.

38. Zinger, L., Gury, J., Giraud, F., Krivobok, S., Gielly, L., Taberlet, P., and Geremia, R. A. (2007) Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: Toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil, *Microbial Ecology 54*, 203-216.

39. Dorigo, U., Volatier, L., and Humbert, J. F. (2005) Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities, *Water Research 39*, 2207-2218.

40. Head, I. M., Saunders, J. R., and Pickup, R. W. (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms, *Microbial Ecology 35*, 1-21.

41. Maarit Niemi, R., Heiskanen, I., Wallenius, K., and Lindstram, K. (2001) Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia, *Journal of Microbiological Methods 45*, 155-165.

42. Mathieu-Daudé, F., Welsh, J., Vogt, T., and McClelland, M. (1996) DNA rehybridization during PCR: The 'Cot effect' and its consequences, *Nucleic Acids Research 24*, 2080-2086.

43. Wintzingerode, F. V., Gebel, U. B., and Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis, *FEMS Microbiology Reviews 21*, 213-229.

44. Crosby, L. D., and Criddle, C. S. (2003) Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity, *BioTechniques 34*, 790-802.

45. Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., Janssen, P. H., Hippe, H., and Stackebrandt, E. (1996) Clostridium paradoxum DSM 7308(T) contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences, *Microbiology 142*, 2087-2095.

46. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of Bacteriology 173*, 697-703.

47. Suzuki, M. T., and Giovannoni, S. J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR, *Applied and Environmental Microbiology 62*, 625-630.

48. Reysenbach, A. L., Giver, L. J., Wickham, G. S., and Pace, N. R. (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction, *Applied and Environmental Microbiology 58*, 3417-3418.

49. Kopczynski, E. D., Bateson, M. M., and Ward, D. M. (1994) Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology 60*, 746-748.

50. Brown, M. V., Schwalbach, M. S., Hewson, I., and Fuhrman, J. A. (2005) Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: Development and application to a time series, *Environmental Microbiology 7*, 1466-1479.

51. Strous, M. (2007) Data storm, *Environmental Microbiology 9*, 10-11.

52. Hugenholtz, P., Goebel, B. M., and Pace, N. R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity, *Journal of Bacteriology 180*, 4765-4774.

53. Marco, D. (2010) Metagenomics: Theory, Methods and Applications, *Caister Academic Press*.

54. Pace, N. D. S., DJ Lane, GJ Olsen (1985) Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences, *ASM News 51*, 4-12.

55. Allen, E. E., and Banfield, J. F. (2005) Community genomics in microbial ecology and evolution, *Nature Reviews Microbiology 3*, 489-498.

56. Hugenholtz, P., Tyson, G. W., and Blackall, L. L. (2002) Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 179*, 29-42.

57. Behrens, S., Rahland, C., Inacio, J., Huber, H., Fonseca, Ã., Spencer-Martins, I., Fuchs, B. M., and Amann, R. (2003) In situ accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes, *Applied and Environmental Microbiology 69*, 1748-1758.

58. Bouvier, T., and Del Giorgio, P. A. (2003) Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports, *FEMS Microbiology Ecology 44*, 3-15.

59. Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J., and Pace, N. R. (1988) Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells, *J. Bacteriol. 170*, 720-726.

60. Zarda, B., Amann, R., Wallner, G., and Schleifer, K. H. (1991) Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA-targeted oligonucleotides, *Journal of General Microbiology 137*, 2823-2830.

61. DeLong, E. F., Wickham, G. S., and Pace, N. R. (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells, *Science 243*, 1360-1363.

62. Amann, R. I., Krumholz, L., and Stahl, D. A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology, *Journal of Bacteriology 172*, 762-770.

63. Crocetti, G., Murto, M., and Björnsson, L. (2006) An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH), *Journal of Microbiological Methods 65*, 194-201.

64. Gray, N. D., and Head, I. M. (2001) Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria, *Environ Microbiol 3*, 481-492.

65. Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R., and Murrell, J. C. (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology, *Nature 403*, 646-649.

66. Meselson, M., and Stahl, F. W. (1958) The replication of DNA in escherichia coli, *Proceedings of the National Academy of Sciences 44*, 671-682.

67. Dumont, M. G., and Murrell, J. C. (2005) Stable isotope probing - linking microbial identity to function, *Nat Rev Microbiol 3*, 499-504.

68. Friedrich, M. W. (2006) Stable-isotope probing of DNA: Insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes, *Current Opinion in Biotechnology 17*, 59-66.

69. Madsen, E. L. (2006) The use of stable isotope probing techniques in bioreactor and field studies on bioremediation, *Current Opinion in Biotechnology 17*, 92-97.

70. Neufeld, J. D., Wagner, M., and Murrell, J. C. (2007) Who eats what, where and when? Isotope-labelling experiments are coming of age, *ISME Journal 1*, 103-110.

71. Neufeld, J. D., Vohra, J., Dumont, M. G., Lueders, T., Manefield, M., Friedrich, M. W., and Murrell, J. C. (2007) DNA stable-isotope probing, *Nature Protocols 2*, 860-866.

72. Wagner, M., Nielsen, P. H., Loy, A., Nielsen, J. L., and Daims, H. (2006) Linking microbial community structure with function: Fluorescence in situ hybridization-microautoradiography and isotope arrays, *Current Opinion in Biotechnology 17*, 83-91.

73. Cupples, A. M., and Sims, G. K. (2007) Identification of in situ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil microorganisms using DNA-stable isotope probing, *Soil Biology and Biochemistry 39*, 232-238.

74. Haichar, F. E. Z., Achouak, W., Christen, R., Heulin, T., Marol, C., Marais, M. F., Mougel, C., Ranjard, L., Balesdent, J., and Berge, O. (2007) Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing, *Environmental Microbiology 9*, 625-634.

75. Osaka, T., Ebie, Y., Tsuneda, S., and Inamori, Y. (2008) Identification of the bacterial community involved in methane-dependent denitrification in activated sludge using DNA stable-isotope probing, *FEMS Microbiology Ecology 64*, 494-506.

76. Cebron, A., Bodrossy, L., Chen, Y., Singer, A. C., Thompson, I. P., Prosser, J. I., and Murrell, J. C. (2007) Identity of active methanotrophs in landfill cover soil as revealed by DNA-stable isotope probing, *FEMS Microbiology Ecology 62*, 12-23.

77. Buckley, D. H., Huangyutitham, V., Hsu, S. F., and Nelson, T. A. (2008) 15N2-DNA-stable isotope probing of diazotrophic methanotrophs in soil, *Soil Biology and Biochemistry 40*, 1272-1283.

78. Oka, A. R., Phelps, C. D., McGuinness, L. M., Mumford, A., Young, L. Y., and Kerkhof, L. J. (2008) Identification of critical members in a sulfidogenic benzene-degrading consortium by DNA stable isotope probing, *Applied and Environmental Microbiology 74*, 6476-6480.

79. Chen, Y., Dumont, M. G., Neufeld, J. D., Bodrossy, L., Stralis-Pavese, N., McNamara, N. P., Ostle, N., Briones, M. J. I., and Murrell, J. C. (2008) Revealing the uncultivated majority: Combining DNA

stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomic analyses of uncultivated Methylocystis in acidic peatlands, *Environmental Microbiology 10*, 2609-2622.

80. Chen, Y., Vohra, J., and Murrell, J. C. (2010) Applications of DNA-stable isotope probing in bioremediation studies, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 599*, 129-139.

81. Rasche, F., Lueders, T., Schloter, M., Schaefer, S., Buegger, F., Gattinger, A., Hood-Nowotny, R. C., and Sessitsch, A. (2009) DNA-based stable isotope probing enables the identification of active bacterial endophytes in potatoes, *New Phytologist 181*, 802-807.

82. Nicholson, W. L., Fedenko, J., and Schuerger, A. C. (2009) Carbon-13 (13C) labeling of bacillus subtilis vegetative cells and spores: Suitability for DNA stable isotope probing (DNA-SIP) of spores in soils, *Current Microbiology 59*, 9-14.

83. Woo, J. S., Park, J., Quensen Iii, J. F., Rodrigues, J. L. M., Seliger, L., Tsoi, T. V., Zylstra, G. J., and Tiedje, J. M. (2009) DNA-stable isotope probing integrated with metagenomics for retrieval of biphenyl dioxygenase genes from polychlorinated biphenyl-contaminated river sediment, *Applied and Environmental Microbiology 75*, 5501-5506.

84. Qiu, Q., Conrad, R., and Lu, Y. (2009) Cross-feeding of methane carbon among bacteria on rice roots revealed by DNA-stable isotope probing, *Environmental Microbiology Reports 1*, 355-361.

85. Tourna, M., Freitag, T. E., and Prosser, J. I. (2010) Stable isotope probing analysis of interactions between ammonia oxidizers, *Applied and Environmental Microbiology 76*, 2468-2477.

86. Martineau, C., Whyte, L. G., and Greer, C. W. (2010) Stable isotope probing analysis of the diversity and activity of Methanotrophic bacteria in soils from the Canadian high Arctic, *Applied and Environmental Microbiology 76*, 5773-5784.

87. Winderl, C., Penning, H., Netzer, F. V., Meckenstock, R. U., and Lueders, T. (2010) DNA-SIP identifies sulfate-reducing Clostridia as important toluene degraders in tar-oil-contaminated aquifer sediment, *ISME Journal 4*, 1314-1325.

88. Jones, M. D., Crandell, D. W., Singleton, D. R., and Aitken, M. D. (2011) Stable-isotope probing of the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterial guild in a contaminated soil, *Environmental Microbiology*.

89. Gupta, V., Smemo, K. A., Yavitt, J. B., and Basiliko, N. (2011) Active Methanotrophs in Two Contrasting North American Peatland Ecosystems Revealed Using DNA-SIP, *Microbial Ecology*, 1-8.

90. Herrmann, S., Kleinsteuber, S., Chatzinotas, A., Kuppardt, S., Lueders, T., Richnow, H. H., and Vogt, C. (2010) Functional characterization of an anaerobic benzene-degrading enrichment culture by DNA stable isotope probing, *Environmental Microbiology 12*, 401-411.

91. Radajewski, S., McDonald, I. R., and Murrell, J. C. (2003) Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms, *Current Opinion in Biotechnology 14*, 296-302.

92. Cadisch, G., Espana, M., Causey, R., Richter, M., Shaw, E., Morgan, J. A. W., Rahn, C., and Bending, G. D. (2005) Technical considerations for the use of 15N-DNA stable-isotope probing for functional microbial activity in soils, *Rapid Communications in Mass Spectrometry 19*, 1424-1428.

93. McDonald, I., Radajewski, S., and Murrell, J. (2005) Stable isotope probing of nucleic acids in methanotrophs and methylotrophs: A review, *ORG GEOCHEM 36*, 779-787.

94. Wackett, L. P. (2004) Stable isotope probing in biodegradation research, *Trends Biotechnology 22*, 153-154.

95. Manefield, M., Whiteley, A. S., Griffiths, R. I., and Bailey, M. J. (2002) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny, *Applied Environmental Microbiology 68*, 5367-5373.

96. Griffiths, R. I., Manefield, M., Ostle, N., McNamara, N., O'Donnell, A. G., Bailey, M. J., and Whiteley, A. S. (2004) 13CO2 pulse labelling of plants in tandem with stable isotope probing: methodological considerations for examining microbial function in the rhizosphere, *J Microbiol Methods 58*, 119-129.

97. Manefield, M., Whiteley, A. S., Ostle, N., Ineson, P., and Bailey, M. J. (2002) Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function, *Rapid Commun Mass Spectrometry 16*, 2179-2183.

98. Lueders, T., Manefield, M., and Friedrich, M. W. (2004) Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients, *Environmental Microbiology 6*, 73-78.

99. Manefield, M., Griffiths, R. I., Leigh, M. B., Fisher, R., and Whiteley, A. S. (2005) Functional and compositional comparison of two activated sludge communities remediating coking effluent, *Environmental Microbiology 7*, 715-722.

100. Mahmood, S., Paton, G. I., and Prosser, J. I. (2005) Cultivation-independent in situ molecular analysis of bacteria involved in degradation of pentachlorophenol in soil, *Environmental Microbiology 7*, 1349-1360.

101. Kasai, Y., Takahata, Y., Manefield, M., and Watanabe, K. (2006) RNA-based stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasoline-contaminated groundwater, *Applied and Environmental Microbiology 72*, 3586-3592.

102. Lueders, T., Kindler, R., Miltner, A., Friedrich, M. W., and Kaestner, M. (2006) Identification of bacterial micropredators distinctively active in a soil microbial food web, *Applied and Environmental Microbiology 72*, 5342-5348.

103. Lu, Y., Lueders, T., Friedrich, M. W., and Conrad, R. (2005) Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing, *Environmental Microbiology 7*, 326-336.

104. Rangel-Castro, J. I., Killham, K., Ostle, N., Nicol, G. W., Anderson, I. C., Scrimgeour, C. M., Ineson, P., Meharg, A., and Prosser, J. I. (2005) Stable isotope probing analysis of the influence of liming on root exudate utilization by soil microorganisms, *Environmental Microbiology 7*, 828-838.

105. Jehmlich, N., Schmidt, F., Von Bergen, M., Richnow, H. H., and Vogt, C. (2008) Protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) reveals active species within anoxic mixed cultures, *ISME Journal 2*, 1122-1133.

106. Jehmlich, N., Schmidt, F., Hartwich, M., Von Bergen, M., Richnow, H. H., and Vogt, C. (2008) Incorporation of carbon and nitrogen atoms into proteins measured by protein-based stable isotope probing (Protein-SIP), *Rapid Communications in Mass Spectrometry 22*, 2889-2897.

107. Jehmlich, N., Schmidt, F., Taubert, M., Seifert, J., Von Bergen, M., Richnow, H. H., and Vogt, C. (2009) Comparison of methods for simultaneous identification of bacterial species and determination of metabolic activity by protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) experiments, *Rapid Communications in Mass Spectrometry 23*, 1871-1878.

108. Jehmlich, N., Schmidt, F., Taubert, M., Seifert, J., Bastida, F., Von Bergen, M., Richnow, H. H., and Vogt, C. (2010) Protein-based stable isotope probing, *Nature Protocols 5*, 1957-1966.

109. Taubert, M., Jehmlich, N., Vogt, C., Richnow, H. H., Schmidt, F., von Bergen, M., and Seifert, J. (2011) Time resolved protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) analysis allows quantification of induced proteins in substrate shift experiments, *Proteomics 11*, 2265-2274.

110. Pan, C., Fischer, C. R., Hyatt, D., Bowen, B. P., Hettich, R. L., and Banfield, J. F. (2011) Quantitative tracking of isotope flows in proteomes of microbial communities, *Molecular and Cellular Proteomics 10*.

111. Amann, R., Snaidr, J., Wagner, M., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1996) In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community, *Journal of Bacteriology 178*, 3496-3500.

112. Nielsen, J. L., Christensen, D., Kloppenborg, M., and Halkjar Nielsen, P. (2003) Quantification of cell-specific substrate uptake by probe-defined bacteria under in situ conditions by microautoradiography and fluorescence in situ hybridization, *Environmental Microbiology 5*, 202-211.

113. Huang, W. E., Griffiths, R. I., Thompson, I. P., Bailey, M. J., and Whiteley, A. S. (2004) Raman microscopic analysis of single microbial cells, *Analytical Chemistry 76*, 4452-4458.

114. Orphan, V. J., C. H. House, K. U. Hinrichs, K. D. McKeegan, and E. F. DeLong. . (2001) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis., *Science 293:*.

115. Peteranderl, R., and Lechene, C. (2004) Measure of carbon and nitrogen stable isotope ratios in cultured cells, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry 15*, 478-485.

116. Guerquin-Kern, J. L., Wu, T. D., Quintana, C., and Croisy, A. (2005) Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy), *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 1724*, 228-238.

117. Li, T., Wu, T. D., Mazéas, L., Toffin, L., Guerquin-Kern, J. L., Leblon, G., and Bouchez, T. (2008) Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS, *Environmental Microbiology 10*, 580-588.

118. Halm, H., Musat, N., Lam, P., Langlois, R., Musat, F., Peduzzi, S., Lavik, G., Schubert, C. J., Singha, B., Laroche, J., and Kuypers, M. M. M. (2009) Co-occurrence of denitrification and nitrogen fixation in a meromictic lake, Lake Cadagno (Switzerland), *Environmental Microbiology 11*, 1945-1958.

119. Musat, N., Halm, H., Winterholler, B., Hoppe, P., Peduzzi, S., Hillion, F., Horreard, F., Amann, R., Jorgensen, B. B., and Kuypers, M. M. M. (2008) A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105*, 17861-17866.

120. Behrens, S., Losekann, T., Pett-Ridge, J., Weber, P. K., Ng, W. O., Stevenson, B. S., Hutcheon, I. D., Relman, D. A., and Spormann, A. M. (2008) Linking microbial phylogeny to metabolic activity at the single-cell level by using enhanced element labeling-catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization (EL-FISH) and NanoSIMS, *Applied and Environmental Microbiology 74*, 3143-3150.

121. Kerstens, H. M. J., Poddighe, P. J., and Hanselaar, A. G. J. M. (1995) A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry 43*, 347-352.

122. Li, T. (2007) Groupes microbiens fonctionnels impliqués dans la méthanisation de la cellulose et du méthanol : diversité, fonction et influence de la température, *Thèse de doctorat*

123. Moletta, R. (1993) Anaerobic processing: From the smallest to the largest, *La digestion anaérobie : du plus petit au plus grand*, 16-25.

124. Christensen, T. H., and P.Kjeldsen. (1989) Basic Biochemical Processes in Landfills. Sanitary Landfilling: Process, Technology and Environmental Impact.

125. Stams, A. J. M. (1994) Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology 66*, 271-294.

126. Zhou, G. M., and Fang, H. H. P. (1998) Competition between methanogenesis and sulfidogenesis in anaerobic wastewater treatment, *Water Science and Technology 38*, 317-324.

127. Ladisch, M. R., Lin, K. W., Voloch, M., and Tsao, G. T. (1983) Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass, *Enzyme and Microbial Technology 5*, 82-102.

128. Kogel-Knabner, I. (2002) The macromolecular organic composition of Plant and microbial residues as inputs to soil organic matter, *Soil Biology and Biochemistry 34*, 139-162.

129. Farquhar, G. J., and Rovers, F. A. (1973) Gas production during refuse decomposition, *Water, Air, and Soil Pollution 2*, 483-495.

130. Barlaz, M. A., Ham, R. K., and Schaefer, D. M. (1990) Methane production from municipal refuse: A review of enhancement techniques and microbial dynamics, *Critical Reviews in Environmental Control 19*, 557-584.

131. Barlaz, M. A., Schaefer, D. M., and Ham, R. K. (1989) Bacterial Population Development and Chemical Characteristics of Refuse Decomposition in a Simulated Sanitary Landfill, *Appl. Environ. Microbiol. 55*, 55-65.

132. Bouallagui, H., Torrijos, M., Godon, J. J., Moletta, R., Ben Cheikh, R., Touhami, Y., Delgenes, J. P., and Hamdi, M. (2004) Microbial monitoring by molecular tools of a two-phase anaerobic bioreactor treating fruit and vegetable wastes, *Biotechnology Letters 26*, 857-862.

133. Casserly, C., and Erijman, L. (2003) Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor, *International Biodeterioration and Biodegradation 52*, 7-12.

134. Delbes, C., Moletta, R., and Godon, J. J. (2001) Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digestor ecosystem, *FEMS Microbiology Ecology 35*, 19-26.

135. McHugh, S., Carton, M., Mahony, T., and O'Flaherty, V. (2003) Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors, *FEMS Microbiology Letters 219*, 297-304.

136. McInerney, J. O., Wilkinson, M., Patching, J. W., Embley, T. M., and Powell, R. (1995) Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a deep-sea deposit feeder, *Applied and Environmental Microbiology 61*, 1646-1648.

137. Archer D B, K. B. H. (1990) The microbiology and control of anaerobic digestion, *In : Wheatley A. Anaerobic Digestion A waste treatment technology (Critical Reports in Applied Chemistry, Vol. 31) Elsevier Applied Science for SCI, London and New York, 43-92*.

138. Pelmont, J. (2000) Bactéries et environnement, Adaptations physiologiques *Collection Grenoble Sciences*.

139. McInerney, M. J., Mackie, R. I., and Bryant, M. P. (1981) Syntrophic association of a butyrate-degrading bacterium and Methanosarcina enriched from bovine rumen fluid, *Applied and Environmental Microbiology 41*, 826-828.

140. Chen, A. C., Ohashi, A., and Harada, H. (2003) Acetate synthesis from H2/CO2 in simulated and actual landfill samples, *Environmental Technology 24*, 435-444.

141. Daverio, E., Spanjers, H., Bassani, C., Ligthart, J., and Nieman, H. (2003) Calorimetric investigation of anaerobic digestion: Biomass adaptation and temperature effect, *Biotechnology and Bioengineering 82*, 499-505.

142. Conrad, R., Klose, M., and Noll, M. (2009) Functional and structural response of the methanogenic microbial community in rice field soil to temperature change, *Environmental Microbiology 11*, 1844-1853.

143. Doi, R. H., Kosugi, A., Murashima, K., Tamaru, Y., and Han, S. O. (2003) Cellulosomes from mesophilic bacteria, *Journal of Bacteriology 185*, 5907-5914.

144. Doi, R. H., and Kosugi, A. (2004) Cellulosomes: Plant-cell-wall-degrading enzyme complexes, *Nature Reviews Microbiology 2*, 541-551.

145. Bayer, E. A., Shimon, L. J. W., Shoham, Y., and Lamed, R. (1998) Cellulosomes - Structure and ultrastructure, *Journal of Structural Biology 124*, 221-234.

146. Odum, H. T. (1962) Man and Ecosystem, *Proceedings, Lockwood Conference on the Suburban Forest and Ecology. Bulletin Connecticut Agric. Station*.

147. Mitsch, W. J., and Joergensen, S. E. (1989) *Ecological engineering: An introduction to ecotechnology*.

148. Odum, H. T., Siler, W. L., Beyers, R. J., and Armstrong, N. (1963) *Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Tex. 9*, 374-403.

149. Mitsch, W. J., and JÃ¸rgensen, S. E. (2003) Ecological engineering: A field whose time has come, *Ecological Engineering 20*, 363-377.

150. Bergen, S. D., Bolton, S. M., and Fridley, J. L. (1997) Ecological engineering: Design based on ecological principles, In *Paper - American Society of Agricultural Engineers* (Anon, Ed.), ASAE, Minneapolis, MN, USA.

151. Bagge, E., Sahlstrom, L., and Albihn, A. (2005) The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants, *Water Research 39*, 4879-4886.

152. Mitsch, W. J. (1993) Ecological engineering: A cooperative role with the planetary life-support system, *Environmental Science and Technology 27*, 438-445.

153. Mitsch, W. J. (1998) Ecological engineering--the 7-year itch, *Ecological Engineering 10*, 119-130.

154. Mitsch, W. J., and Day Jr, J. W. (2004) Thinking big with whole-ecosystem studies and ecosystem restoration - A legacy of H.T. Odum, *Ecological Modelling 178*, 133-155.

155. Mitsch, W. J., and Jørgensen, S. E. (2004) Ecological engineering and ecosystem restoration.

156. Gattie, D. K., Smith, M. C., Tollner, E. W., and McCutcheon, S. C. (2003) The emergence of ecological engineering as a discipline, *Ecological Engineering 20*, 409-420.

157. Mitsch, W. J., and Wilson, R. F. (1996) Improving the success of wetland creation and restoration with know-how, time, and self-design, *Ecological Applications 6*, 77-83.

158. Bergen, S. D., Bolton, S. M., and Fridley, J. L. (2001) Design principles for ecological engineering, *Ecological Engineering 18*, 201-210.

159. He, J. Z., Ge, Y., Xu, Z., and Chen, C. (2009) Linking soil bacterial diversity to ecosystem multi functionality using backward-elimination boosted trees analysis, *Journal of Soils and Sediments 9*, 547-554.

160. Fierer, N., Bradford, M. A., and Jackson, R. B. (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria, *Ecology 88*, 1354-1364.

161. Blaxter, M. (2003) Molecular systematics: Counting angels with DNA, *Nature 421*, 122-124.

162. Adams, B. J. (2001) The species delimitation uncertainty principle, *Journal of Nematology 33*, 153-160.

163. Noor, M. A. F. (2002) Is the biological species concept showing its age?, *Trends in Ecology and Evolution 17*, 153-154.

164. Theron, J., and Cloete, T. E. (2000) Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Community Structure in Natural Environments, *Critical Reviews in Microbiology 26*, 37-57.

165. Staley, J. T. (2006) The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 361*, 1899-1909.

166. Konstantinidis, K. T., and Tiedje, J. M. (2007) Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead, *Current Opinion in Microbiology 10*, 504-509.

167. Konstantinidis, K. T., Ramette, A., and Tiedje, J. M. (2006) Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers, *Applied and Environmental Microbiology 72*, 7286-7293.

168. Buckley, M., and Roberts, R. J. (2006) Reconciling microbial systematics and genomics, *A report from the american academy of microbiology*.

169. Klenk, H. P., and Göker, M. (2010) En route to a genome-based classification of Archaea and Bacteria?, *Systematic and Applied Microbiology 33*, 175-182.

170. Dommergues, Y., and Mangenot, F. (1970) Ecologie microbienne du sol *Dunod Masson Ho*.

171. Lensi, R. (2002) La place de la composante microbienne du sol dans des approches de diagnostic et d'ingénierie écologique, *Journée Agriculture, forêts, pêche : nature exploitée et ingénierie écologique*

172. Reiss, J., Forster, J., Cassio, F., Pascoal, C., Stewart, R., and Hirst, A. G. (2010) When microscopic organisms inform general ecological theory, In *Advances in Ecological Research*, pp 45-85.

173. Reiss, J., Bailey, R. A., Cassio, F., Woodward, G., and Pascoal, C. (2010) Assessing the contribution of micro-organisms and macrofauna to biodiversity-ecosystem functioning relationships in freshwater microcosms, In *Advances in Ecological Research*, pp 151-176.

174. Ramirez, I., Volcke, E. I. P., Rajinikanth, R., and Steyer, J. P. (2009) Modeling microbial diversity in anaerobic digestion through an extended ADM1 model, *Water Research 43*, 2787-2800.

175. Schoen, M. A., Sperl, D., Gadermaier, M., Goberna, M., Franke-Whittle, I., Insam, H., Ablinger, J., and Wett, B. (2009) Population dynamics at digester overload conditions, *Bioresource Technology 100*, 5648-5655.

176. Ozkan-Yucel, U. G., and Gakiay, C. F. (2010) Application of ADM1 model to a full-scale anaerobic digester under dynamic organic loading conditions, *Environmental Technology 31*, 633-640.

177. Purdy, K. J., Hurd, P. J., Moya-Laraño, J., Trimmer, M., Oakley, B. B., Woodward, G., and Guy, W. (2010) Systems Biology for Ecology: From Molecules to Ecosystems, In *Advances in Ecological Research*, pp 87-149, Academic Press.

178. Morales, S. E., and Holben, W. E. (2011) Linking bacterial identities and ecosystem processes: Can 'omic' analyses be more than the sum of their parts?, *FEMS Microbiology Ecology 75*, 2-16.

179. Schmidt, J. K., Riedele, C., Regestein, L., Rausenberger, J., and Reichl, U. (2011) A novel concept combining experimental and mathematical analysis for the identification of unknown interspecies effects in a mixed culture, *Biotechnology and Bioengineering 108*, 1900-1911.

180. Jørgensen, S. E. (2009) Applications in Ecological Engineering, *Academic Press*.

181. Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., and de Carvalho, C. C. C. R. (2011) Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes, *Biodegradation 22*, 231-241.

182. Fu, S., Fan, H., Liu, S., Liu, Y., and Liu, Z. (2009) A bioaugmentation failure caused by phage infection and weak biofilm formation ability, *Journal of Environmental Sciences 21*, 1153-1161.

183. Bouchez, T., Patureau, D., Dabert, P., Juretschko, S., Doré, J., Delgenès, P., Moletta, R., and Wagner, M. (2000) Ecological study of a bioaugmentation failure, *Environmental Microbiology 2*, 179-190.

184. Brenner, K., You, L., and Arnold, F. H. (2008) Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology, *Trends in Biotechnology 26*, 483-489.

185. Sabra, W., Dietz, D., Tjahjasari, D., and Zeng, A. P. (2010) Biosystems analysis and engineering of microbial consortia for industrial biotechnology, *Engineering in Life Sciences 10*, 407-421.

186. Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L., and Jimenez-Diaz, R. (2004) Production of plantaricin NC8 by Lactobacillus plantarum NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria, *Archives of Microbiology 181*, 8-16.

187. Rittmann, B. E. (2010) Environmental biotechnology in water and wastewater treatment, *Journal of Environmental Engineering 136*, 348-353.

188. Nachaiyasit, S., and Stuckey, D. C. (1995) Microbial response to environmental changes in an anaerobic baffled reactor (ABR), *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology 67*, 111-123.

189. Hector, A., and Bagchi, R. (2007) Biodiversity and ecosystem multifunctionality, *Nature 448*, 188-190.

190. Sanchez, E., Borja, R., Weiland, P., Travieso, L., and Martin, A. (2001) Effect of substrate concentration and temperature on the anaerobic digestion of piggery waste in a tropical climate, *Process Biochemistry 37*, 483-489.

191. Van Lier, J. B., Tilche, A., Ahring, B. K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., Hulshoff Pol, L. W., Lens, P., and Verstraete, W. (2001) New perspectives in anaerobic digestion, In *Water Science and Technology*, pp 1-18.

192. Zabranska, J., Atapovo, J., Wachtl, R., Jenloek, P., and Dohanyos, M. (2000) The activity of anaerobic biomass in thermophilic and mesophilic digesters at different loading rates, In *Water Science and Technology*, pp 49-56, Int Water Assoc, Athens, Greece.

193. Sahlstrom, L. (2003) A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants, *Bioresource Technology 87*, 161-166.

194. Gallert, C., and Winter, J. (1997) Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: Effect of ammonia on glucose degradation and methane production, *Applied Microbiology and Biotechnology 48*, 405-410.

195. Angelidaki, I., and Ahring, B. K. (1994) Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: Effect of temperature, *Water Research 28*, 727-731.

196. Sanchez, E., Borja, R., Weiland, P., Travieso, L., and MartÃ-n, A. (2000) Effect of temperature and pH on the kinetics of methane production, organic nitrogen and phosphorus removal in the batch anaerobic digestion process of cattle manure, *Bioprocess Engineering 22*, 247-252.

197. Ahring, B. K., Ibrahim, A. A., and Mladenovska, Z. (2001) Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure, *Water Research 35*, 2446-2452.

198. Hernon, F., Forbes, C., and Colleran, E. (2006) Identification of mesophilic and thermophilic fermentative species in anaerobic granular sludge, In *Water Science and Technology*, pp 19-24.

199. Levèn, L., Eriksson, A. R. B., and SchnÃ¼rer, A. (2007) Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste, *FEMS Microbiology Ecology 59*, 683-693.

200. Pender, S., Toomey, M., Carton, M., Eardly, D., Patching, J. W., Colleran, E., and O'Flaherty, V. (2004) Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors, *Water Research 38*, 619-630.

201. Sekiguchi, Y., Yamada, T., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., and Kamagata, Y. (2003) Anaerolinea thermophila gen. nov., sp. nov. and Caldilinea aerophila gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain bacteria at the subphylum level, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53*, 1843-1851.

202. Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Syutsubo, K., Ohashi, A., Harada, H., and Nakamura, K. (1998) Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis, *Microbiology 144*, 2655-2665.

203. Wu, X. L., and Conrad, R. (2001) Functional and structural response of a cellulose-degrading methanogenic microbial community to multiple aeration stress at two different temperatures, *Environmental Microbiology 3*, 355-362.

204. Leven, L., Eriksson, A. R. B., and Schnurer, A. (2007) Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste, *Fems Microbiology Ecology 59*, 683-693.

205. Conrad, R. (2002) Control of microbial methane production in wetland rice fields, *Nutr. Cycl. Agroecosyst. 64*, 59-69.

206. Veeken, A., Kalyuzhnyi, S., Scharff, H., and Hamelers, B. (2000) Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste, *Journal of Environmental Engineering 126*, 1076-1081.

207. Kaspar, H. F., and Wuhrmann, K. (1978) Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge, *Applied and Environmental Microbiology 36*, 1-7.

208. Siegert, I., and Banks, C. (2005) The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors, *Process Biochemistry 40*, 3412-3418.

209. Gourdon, R., and Vermande, P. (1987) Effects of propionic acid concentration on anaerobic digestion of pig manure, *Biomass 13*, 1-12.

210. Ahring, B. K., and Westermann, P. (1988) Product Inhibition of Butyrate Metabolism by Acetate and Hydrogen in a Thermophilic Coculture, *Appl. Environ. Microbiol. 54*, 2393-2397.

211. Moletta, R. (2007) Methanisation: General aspects, *La méthanisation: Aspects géneraux*, 29-32.

212. Bingeman, C. W., Varner, J. E., and Martin, W. P. (1953) The Effect of the Addition of Organic Materials on the Decomposition of an Organic Soil, *Soil Science Society of America Journal 17*, 34-38.

213. Kuzyakov, Y., Friedel, J. K., and Stahr, K. (2000) Review of mechanisms and quantification of priming effects, *Soil Biology and Biochemistry 32*, 1485-1498.

214. Fontaine, S., Mariotti, A., and Abbadie, L. (2003) The priming effect of organic matter: A question of microbial competition?, *Soil Biology and Biochemistry 35*, 837-843.

215. Hamer, U., and Marschner, B. (2005) Priming effects in different soil types induced by fructose, alanine, oxalic acid and catechol additions, *Soil Biology and Biochemistry 37*, 445-454.

216. Hamer, U., and Marschner, B. (2005) Priming effects in soils after combined and repeated substrate additions, *Geoderma 128*, 38-51.

217. Blagodatskaya, E., and Kuzyakov, Y. (2008) Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: Critical review, *Biology and Fertility of Soils 45*, 115-131.

218. Kuzyakov, Y. (2010) Priming effects: Interactions between living and dead organic matter, *Soil Biology and Biochemistry 42*, 1363-1371.

219. Guenet, B., Danger, M., Abbadie, L., and Lacroix, G. (2010) Priming effect: Bridging the gap between terrestrial and aquatic ecology, *Ecology 91*, 2850-2861.

220. Adney, W. S., Rivard, C. J., Shiang, M., and Himmel, M. E. (1991) Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass and wastes - Cellulases and related enzymes, *Applied Biochemistry and Biotechnology 30*, 165-183.

221. Breznak, J. A., and Brune, A. (1994) Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites, *Annual review of entomology. Vol. 39*, 453-487.

222. Godon, J. J., Arcemisbéhère, L., Escudié, R., Bize, A., Guillot, A., Li, T., Miambi, E., Robert, A., and P., S. J. (2010) How to get 500 million years of experience in anaerobic digestion: animal mimicking, *Proceedings, 12th World congress on anaerobic digestion*.

223. Bayané, A., and Guiot, S. R. (2011) Animal digestive strategies versus anaerobic digestion bioprocesses for biogas production from lignocellulosic biomass, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology 10*, 43-62.

224. Russell, J. B., Muck, R. E., and Weimer, P. J. (2009) Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen, *Fems Microbiology Ecology 67*, 183-197.

225. Weimer, P. J., Russell, J. B., and Muck, R. E. (2009) Lessons from the cow: What the ruminant animal can teach us about consolidated bioprocessing of cellulosic biomass, *Bioresource Technology 100*, 5323-5331.

226. Miron, J., Ben-Ghedalla, D., and Morrison, M. (2001) Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria, *Journal of Dairy Science 84*, 1294-1309.

227. Yanagita, K., Kamagata, Y., Kawaharasaki, M., Suzuki, T., Nakamura, Y., and Minato, H. (2000) Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of Methanomicrobium mobile by fluorescence in situ hybridization, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 64*, 1737-1742.

228. Stewart, C. S., and Bryant, M. P. (1988) The rumen bacteria, *The rumen microbial ecosystem. Elsevier Applied Science, London and New York (P.N. HOBSON)*.

229. Skillman, L. C., Evans, P. N., Strumpl, C., and Joblin, K. N. (2006) 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen, *Letters in Applied Microbiology 42*, 222-228.

230. Morrison, M., Pope, P. B., Denman, S. E., and McSweeney, C. S. (2009) Plant biomass degradation by gut microbiomes: more of the same or something new?, *Current Opinion in Biotechnology 20*, 358-363.

231. Kobayashi, Y., Shinkai, T., and Koike, S. (2008) Ecological and physiological characterization shows that Fibrobacter succinogenes is important in rumen fiber digestion - Review, *Folia Microbiologica 53*, 195-200.

232. Weimer, P. J. (1996) Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster?, *Journal of Dairy Science 79*, 1496-1502.

233. Goldstein, R. M., Mallory, L. M., and Alexander, M. (1985) Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation, *Applied and environmental microbiology 50*, 977-983.

234. Schauer-Gimenez, A. E., Zitomer, D. H., Maki, J. S., and Struble, C. A. (2010) Bioaugmentation for improved recovery of anaerobic digesters after toxicant exposure, *Water Research 44*, 3555-3564.

235. Schauer-Gimenez, A. E., Maki, J. S., Struble, C. A., and Zitomer, D. H. (2010) Bioaugmentation With Hydrogen Utilizers for Anaerobic Digester Recovery, *Proceedings of the Water Environment Federation*.

236. Angelidaki, I., and Ahring, B. K. (2000) Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure, In *Water Science and Technology*, pp 189-194, Barcelona, Spain.

237. Cirne, D. G., Björnsson, L., Alves, M., and Mattiasson, B. (2006) Effects of bioaugmentation by an anaerobic lipolytic bacterium on anaerobic digestion of lipid-rich waste, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology 81*, 1745-1752.

238. Duran, M., Tepe, N., Yurtsever, D., Punzi, V. L., Bruno, C., and Mehta, R. J. (2006) Bioaugmenting anaerobic digestion of biosolids with selected strains of Bacillus, Pseudomonas, and Actinomycetes species for increased methanogenesis and odor control, *Applied Microbiology and Biotechnology 73*, 960-966.

239. McMahon, K. D., Martin, H. G., and Hugenholtz, P. (2007) Integrating ecology into biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology 18*, 287-292.

240. Tilman, D. (1999) The ecological consequences of changes in biodiversity: A search for general principles, *Ecology 80*, 1455-1474.

241. Worm, B., and Duffy, J. E. (2003) Biodiversity, productivity and stability in real food webs, *Trends in Ecology and Evolution 18*, 628-632.

242. Tilman, D., Reich, P. B., and Knops, J. M. H. (2006) Biodiversity and ecosystem stability in a decade-long grassland experiment, *Nature 441*, 629-632.

243. Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., Hooper, D. U., Huston, M. A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., and Wardle, D. A. (2001) Ecology: Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges, *Science 294*, 804-808.

244. Loreau, M., Mouquet, N., and Gonzalez, A. (2003) Biodiversity as spatial insurance in heterogeneous landscapes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100*, 12765-12770.

245. Loreau, M. (2000) Biodiversity and ecosystem functioning: Recent theoretical advances, *Oikos 91*, 3-17.

246. France, K. E., and Duffy, J. E. (2006) Diversity and dispersal interactively affect predictability of ecosystem function, *Nature 441*, 1139-1143.

247. Cottingham, K. L., Brown, B. L., and Lennon, J. T. (2001) Biodiversity may regulate the temporal variability of ecological systems, *Ecology Letters 4*, 72-85.

248. Levin, S. A. (2000) Multiple scales and the maintenance of biodiversity, *Ecosystems 3*, 498-506.

249. Kaewpipat, K., and Grady Jr, C. P. L. (2002) Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors, In *Water Science and Technology*, pp 19-27.

250. Fernandez, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., and Tiedje, J. (1999) How stable is stable? Function versus community composition, *Applied and Environmental Microbiology 65*, 3697-3704.

251. Zumstein, E., Moletta, R., and Godon, J. J. (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis, *Environmental Microbiology 2*, 69-78.

252. Hoshino, T., Terahara, T., Yamada, K., Okuda, H., Suzuki, I., Tsuneda, S., Hirata, A., and Inamori, Y. (2006) Long-term monitoring of the succession of a microbial community in activated sludge from a circulation flush toilet as a closed system, *FEMS Microbiology Ecology 55*, 459-470.

253. Botton, S., Van Heusden, M., Parsons, J. R., Smidt, H., and Van Straalen, N. (2006) Resilience of microbial systems towards disturbances, *Critical Reviews in Microbiology 32*, 101-112.

254. McMahon, K. D., Zheng, D., Stams, A. J. M., Mackie, R. I., and Raskin, L. (2004) Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge, *Biotechnology and Bioengineering 87*, 823-834.

255. Kapley, A., De Baere, T., and Purohit, H. J. (2007) Eubacterial diversity of activated biomass from a common effluent treatment plant, *Research in Microbiology 158*, 494-500.

256. Bent, S. J., and Forney, L. J. (2008) The tragedy of the uncommon: Understanding limitations in the analysis of microbial diversity, *ISME Journal 2*, 689-695.

257. Shannon, C. E. (1948) A Mathematical Theory of Communication, *Bell System Technical Journal 27*, 379-423.

258. Simpson, E. H. (1949) Measurement of Diversity, *Nature 163*, 688.

259. Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A., and Moffett, B. F. (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities, *Fems Microbiology Ecology 43*, 1-11.

260. Hill, T., C. J. , Walsh, K., A. , Harris, J., A., and Moffett, B., F. . (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities, *FEMS Microbiology Ecology 43*, 1-11.

261. Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A. M., Rizzi, A., Zanardini, E., Sorlini, C., Corselli, C., and Daffonchio, D. (2004) Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities, *Appl. Environ. Microbiol. 70*, 6147-6156.

262. Fisher, M. M., and Triplett, E. W. (1999) Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities, *Appl. Environ. Microbiol. 65*, 4630-4636.

263. Schloss, P. D., Hay, A. G., Wilson, D. B., and Wlker, L. P. (2003) Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting, *FEMS Microbiology Ecology 46*, 1-9.

264. Kent, A. D., Yannarell, A. C., Rusak, J. A., Triplett, E. W., and McMahon, K. D. (2007) Synchrony in aquatic microbial community dynamics, *ISME Journal 1*, 38-47.

265. Nelson, D. R., and Mele, P. M. (2007) Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations, *Soil Biology and Biochemistry 39*, 340-351.

266. Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., and Verstraete, W. (2008) How to get more out of molecular fingerprints: Practical tools for microbial ecology, *Environmental Microbiology 10*, 1571-1581.

267. Pavoine, S., Love, M. S., and Bonsall, M. B. (2009) Hierarchical partitioning of evolutionary and ecological patterns in the organization of phylogenetically-structured species assemblages: Application to rockfish (genus: Sebastes) in the Southern California Bight, *Ecology Letters 12*, 898-908.

268. Pavoine, S., and Dolédec, S. (2005) The apportionment of quadratic entropy: A useful alternative for partitioning diversity in ecological data, *Environmental and Ecological Statistics 12*, 125-138.

269. Hines, J. E., Boulinier, T., Nichols, J. D., Sauer, J. R., and Pollock, K. H. (1999) COMDYN: Software to study the dynamics of animal communities using a capture-recapture approach, *Bird Study 46*, S209-S217.

270. Gagnaire, D. Y., and Taravel, F. R. (1980) Biosynthesis of bacterial cellulose from D-glucose uniformly enriched in 13C, *103*, 133-143.

271. Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K. H., and Wagner, M. (2002) Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment, *Applied and Environmental Microbiology 68*, 5064-5081.

272. Casamayor, E. O., Massana, R., Benlloch, S., Ovreås, L., Díez, B., Goddard, V. J., Gasol, J. M., Joint, I., Rodríguez-Valera, F., and Pedrós-Alió, C. (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern, *Environmental Microbiology 4*, 338-348.

273. Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A. M., Rizzi, A., Zanardini, E., Sorlini, C., Corselli, C., and Daffonchio, D. (2004) Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities, *Applied and Environmental Microbiology 70*, 6147-6156.

274. Holben, W. E., Feris, K. P., Kettunen, A., and Apajalahti, J. H. A. (2004) GC Fractionation Enhances Microbial Community Diversity Assessment and Detection of Minority Populations of Bacteria by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, *Applied and Environmental Microbiology 70*, 2263-2270.

275. Smith, D. M., Snow, D. E., Rees, E., Zischkau, A. M., Hanson, J. D., Wolcott, R. D., Sun, Y., White, J., Kumar, S., and Dowd, S. E. (2010) Evaluation of the bacterial diversity of pressure ulcers using bTEFAP pyrosequencing, *BMC Medical Genomics 3*, 1-12.

276. Michelland, R. J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., and Cauquil, L. (2009) StatFingerprints: A friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles, *Molecular Ecology Resources 9*, 1359-1363.

277. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pẽa, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., and Knight, R. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nature Methods 7*, 335-336.

278. Caporaso, J. G., Bittinger, K., Bushman, F. D., Desantis, T. Z., Andersen, G. L., and Knight, R. (2010) PyNAST: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment, *Bioinformatics 26*, 266-267.

279. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., and Cole, J. R. (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy, *Applied and Environmental Microbiology 73*, 5261-5267.

280. Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M., and Tiedje, J. M. (2009) The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis, *Nucleic Acids Research 37*, D141-D145.

281. Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., and Sghir, A. (2009) Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge, *ISME Journal 3*, 700-714.

282. Van Lier, J. B., Rebac, S., and Lettinga, G. (1997) High-rate anaerobic wastewater treatment under psychrophilic and thermophilic conditions, In *Water Science and Technology*, pp 199-206, Elsevier Science Ltd, Amsterdam, Neth.

283. Grossin-Debattista, J. (2011) Fractionnements isotopiques (13C/12C) engendrés par la méthanogenèse : apports pour la compréhension des processus de biodégradation lors de la digestion anaérobie, *Thèse de doctorat*.

284. Tlili, A., Dorigo, U., Montuelle, B., Margoum, C., Carluer, N., Gouy, V., Bouchez, A., and Bérard, A. (2008) Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron. An experimental study simulating flooding events in a small river, *Aquatic Toxicology 87*, 252-263.

285. Hartmann, M., and Widmer, F. (2006) Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices, *Applied and Environmental Microbiology 72*, 7804-7812.

286. Chaxton, J. P., and Bakert, T. (1999) Effect of CO2 enrichment and elevated on temperatur on methane emissions form rice, Oryza sativa, *Global Change Biology 5*, 587-599.

287. Cheng, W., Chander, K., and Inubushi, K. (2000) Effects of elevated CO2and temperature on methane production and emission from submerged soil microcosm, *Nutr. Cycl. Agroecosyst. 58*, 339-347.

288. Watanabe, A., Yamada, H., and Kimura, M. (2005) Analysis of temperature effects on seasonal and interannual variation in CH4 emission from rice-planted pots, *Agriculture, Ecosystems and Environment 105*, 439-443.

289. Allen Jr, L. H., Albrecht, S. L., Colon-Guasp, W., Covell, S. A., Baker, J. T., Pan, D., and Boote, K. J. (2003) Methane Emissions of Rice Increased by Elevated Carbon Dioxide and Temperature, *Journal of Environmental Quality 32*, 1978-1991.

290. Choorit, W., and Wisarnwan, P. (2007) Effect of temperature on the anaerobic digestion of palm oil mill effluent, *Electronic Journal of Biotechnology 10*, 376-385.

291. Lindorfer, H., Waltenberger, R., Kellner, K., Braun, R., and Kirchmayr, R. (2008) New data on temperature optimum and temperature changes in energy crop digesters, *Bioresource Technology 99*, 7011-7019.

292. Bolzonella, D., Battistoni, P., Mata-Alvarez, J., and Cecchi, F. (2003) Anaerobic digestion of organic solid waste: Process behaviour in transient conditions, In *Water Science and Technology*, pp 1-8.

293. Bouakova, A., Dohanyos, M., Schmidt, J. E., and Angelidaki, I. (2005) Strategies for changing temperature from mesophilic to thermophilic conditions in anaerobic CSTR reactors treating sewage sludge, *Water Research 39*, 1481-1488.

294. Ahn, J. H., and Forster, C. F. (2002) The effect of temperature variations on the performance of mesophilic and thermophilic anaerobic filters treating a simulated papermill wastewater, *Process Biochemistry 37*, 589-594.

295. Liu, Y., and Whitman, W. B. (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea, In *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp 171-189.

296. Krakat, N., Westphal, A., Schmidt, S., and Scherer, P. (2010) Anaerobic digestion of renewable biomass: Thermophilic temperature governs methanogen population dynamics, *Applied and Environmental Microbiology 76*, 1842-1850.

297. Cabirol, N., Fernandez, F. J., Mendoza, L., and Noyola, A. (2003) Acclimation of mesophilic anaerobic sludge to thermophilic conditions: PCR genera detection methodology, In *Water Science and Technology*, pp 81-86.

298. Zinder, S. H. (1994) Syntrophic acetate oxidation and ‘‘reversible acetogenesis.’’ In ‘‘Acetogenesis’’, *Chapman & Hall, New York.*, 386–415.

299. Schnurer, A., Zellner, G., and Svensson, B. H. (1999) Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors, *FEMS Microbiology Ecology 29*, 249-261.

300. McHugh, S., Carton, M., Collins, G., and O'Flaherty, V. (2004) Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewaters at 16-37Â°C, *FEMS Microbiology Ecology 48*, 369-378.

301. Noll, M., Klose, M., and Conrad, R. (2010) Effect of temperature change on the composition of the bacterial and archaeal community potentially involved in the turnover of acetate and propionate in methanogenic rice field soil, *FEMS Microbiology Ecology 73*, 215-225.

302. Akutsu, Y., Li, Y.-Y., Harada, H., and Yu, H.-Q. (2009) Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch, *International Journal of Hydrogen Energy 34*, 2558-2566.

303. Chin, K. J., Lukow, T., and Conrad, R. (1999) Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil, *Applied and Environmental Microbiology 65*, 2341-2349.

304. Fey, A., and Conrad, R. (2000) Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil, *Applied and Environmental Microbiology 66*, 4790-4797.

305. Hegde, G., and Pullammanappallil, P. (2007) Comparison of thermophilic and mesophilic one-stage, batch, high-solids anaerobic digestion, *Environmental Technology 28*, 361-369.

306. Griffin, M. E., McMahon, K. D., Mackie, R. I., and Raskin, L. (1998) Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids, *Biotechnology and Bioengineering 57*, 342-355.

307. Donoso-Bravo, A., Retamal, C., Carballa, M., Ruiz-Filippi, G., and Chamy, R. (2009) Influence of temperature on the hydrolysis, acidogenesis and methanogenesis in mesophilic anaerobic digestion: parameter identification and modeling application, *Water Science Technology 60*, 9-17.

308. Sanders, W. T. M. (2001) Anaerobic hydrolysis during digestion of complex substrates.

309. Chen, M. (1983) Adaptation of mesophilic anaerobic sewage fermentor populations to thermophilic temperatures, *Applied and Environmental Microbiology 45*, 1271-1276.

310. Chachkhiani, M., Dabert, P., Abzianidze, T., Partskhaladze, G., Tsiklauri, L., Dudauri, T., and Godon, J. J. (2004) 16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure, *Bioresource Technology 93*, 227-232.

311. Iranpour, R., Oh, S., Cox, H. H., Shao, Y. J., Moghaddam, O., Kearney, R. J., Deshusses, M. A., Stenstrom, M. K., and Ahring, B. K. (2002) Changing mesophilic wastewater sludge digestion into thermophilic operation at Terminal Island Treatment Plant, *Water environment research 74*, 494-507.

312. Lau, I. W. C., and Fang, H. H. P. (1997) Effect of temperature shock to thermophilic granules, *Water Research 31*, 2626-2632.

313. Rittmann, B. E., and McCarty, P. L. (2001) Environmental Biotechnology: Principles and Applications, *McGraw-Hill Book Co., New York.*

314. Cha, G. C., Chung, H. K., and Chung, J. C. (1997) Suppression of acidogenic activities due to rapid temperature drop in anaerobic digestion, *Biotechnology Letters 19*, 461-464.

315. Peck, M. W., Skilton, J. M., Hawkes, F. R., and Hawkes, D. L. (1986) Effects of temperature shock treatments on the stability of anaerobic digesters operated on separated cattle slurry, *Water Research 20*, 453-462.

316. Tilman, D., Wedin, D., and Knops, J. (1996) Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems, *Nature 379*, 718-720.

317. Engelhardt, K. A. M., and Ritchie, M. E. (2001) Effects of macrophyte species richness on wetland ecosystem functioning and services, *Nature 411*, 687-689.

318. Ives, A. R., and Carpenter, S. R. (2007) Stability and diversity of ecosystems, *Science 317*, 58-62.

319. Scheffer, M., and Carpenter, S. R. (2003) Catastrophic regime shifts in ecosystems: Linking theory to observation, *Trends in Ecology and Evolution 18*, 648-656.

320. Kim, M., Ahn, Y. H., and Speece, R. E. (2002) Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic, *Water Research 36*, 4369-4385.

321. Iranpour, R., Cox, H. H. J., Fan, S., Abkian, V., Kearney, R. J., and Haug, R. T. (2005) Short-term and long-term effects of increasing temperatures on the stability and the production of volatile sulfur compounds in full-scale thermophilic anaerobic digesters, *Biotechnology and Bioengineering 91*, 199-212.

322. El-Mashad, H. M., Zeeman, G., van Loon, W. K. P., Bot, G. P. A., and Lettinga, G. (2004) Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure, *Bioresource Technology 95*, 191-201.

323. Angenent, L. T., Sung, S., and Raskin, L. (2002) Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste, *Water Research 36*, 4648-4654.

324. McMahon, K. D., Stroot, P. G., Mackie, R. I., and Raskin, L. (2001) Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions—II: microbial population dynamics, *Water Research 35*, 1817-1827.

325. Li, T., Mazéas, L., Sghir, A., Leblon, G., and Bouchez, T. (2009) Insights into networks of functional microbes catalysing methanization of cellulose under mesophilic conditions, *Environmental Microbiology 11*, 889-904.

326. Baker, S. K. (1999) Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis, *Australian Journal of Agricultural Research 50*, 1293-1298.

327. Verstraete, W., Debeer, D., Pena, M., Lettinga, G., and Lens, P. (1996) Anaerobic bioprocessing of organic wastes, *World journal of microbiology & biotechnology 12*, 221-238.

328. Stevens, N. C. A. (1989) The application of bioaugmentation to waste water treatment, *International Biodeterioration 25*, 87-95.

329. Rittmann, B. E., and Whiteman, R. (1994) Bioaugmentation: a coming of age, *Water Quality International 1*, 12-16.

330. Deflaun, M. F., and Steffan, R. J. (2003) Bioaugmentation, In *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, John Wiley & Sons.

331. Saravanane, R., Murthy, D. V. S., and Krishnaiah, K. (2001) Bioaugmentation and anaerobic treatment of pharmaceutical effluent in fluidized bed reactor, *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering 36*, 779-791.

332. Saravanane, R., Murthy, D. V. S., and Krishnaiah, K. (2001) Bioaugmentation and treatment of cephalexin drug-based pharmaceutical effluent in an upflow anaerobic fluidized bed system, *Bioresource Technology 76*, 279-281.

333. Tepe, N., Yurtsever, D., Duran, M., Mehta, R. J., Bruno, C., and Punzi, V. L. (2008) Odor control during post-digestion processing of biosolids through bioaugmentation of anaerobic digestion, *Water Science and Technology 57*, 589-594.

334. Tale, V. P., Maki, J. S., Struble, C. A., and Zitomer, D. H. (2011) Methanogen community structure-activity relationship and bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters, *Water Research 45*, 5249-5256.

335. Barnes, S. P., and Keller, J. (2003), pp 155-162.

336. Blasig, J. D., Holtzapple, M. T., Dale, B. E., Engler, C. R., and Byers, F. M. (1992) Volatile fatty acid fermentation of AFEX-treated bagasse and newspaper by rumen microorganisms, *Resources, Conservation and Recycling 7*, 95-114.

337. Gijzen, H. J., Lubberding, H. J., Verhagen, F. J., Zwart, K. B., and Vogels, G. D. (1987) Application of rumen microorganisms for an enhanced anaerobic degradation of solid organic waste materials, *Biological Wastes 22*, 81-95.

338. O'Sullivan, C. A., and Burrell, P. C. (2007) The effect of media changes on the rate of cellulose solubilisation by rumen and digester derived microbial communities, *Waste Management 27*, 1808-1814.

339. Barnes, S. P., and Keller, J. (2003) Cellulosic waste degradation by rumen-enhanced anaerobic digestion, *Water Science and Technology 48*, 155-162.

340. Qu, X., Mazéas, L., Vavilin, V. A., Epissard, J., Lemunier, M., Mouchel, J. M., He, P. J., and Bouchez, T. (2009) Combined monitoring of changes in δ13CH4 and archaeal community structure during mesophilic methanization of municipal solid waste, *FEMS Microbiology Ecology 68*, 236-245.

341. Hu, Z. H., Wang, G., and Yu, H. Q. (2004) Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values, *Biochemical Engineering Journal 21*, 59-62.

342. Stack, R. J., and Cotta, M. A. (1986) Effect of 3-phenylpropanoic acid on growth of and cellulose utilization by cellulolytic ruminal bacteria, *Applied and Environmental Microbiology 52*, 209-210.

343. Stack, R. J., Hungate, R. E., and Opsahl, W. P. (1983) Phenylacetic acid stimulation of cellulose digestion by Ruminococcus albus 8, *Applied and Environmental Microbiology 46*, 539-544.

344. Firkins, J., Yu, Z. (2006) Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen, *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress, Sejrsen K, Hvelplund T & Nielsen MO, eds - Wageningen Academic Publisher, Wageningen, the Netherlands.*, 19-54.

345. Hess, M., Sczyrba, A., Egan, R., Kim, T. W., Chokhawala, H., Schroth, G., Luo, S., Clark, D. S., Chen, F., Zhang, T., Mackie, R. I., Pennacchio, L. A., Tringe, S. G., Visel, A., Woyke, T., Wang, Z., and Rubin, E. M. (2011) Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen, *Science 331*, 463-467.

346. Singer, A. C., van der Gast, C. J., and Thompson, I. P. (2005) Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation, *Trends in Biotechnology 23*, 74-77.

347. Leu, S. Y., and Stenstrom, M. K. (2010) Bioaugmentation to improve nitrification in activated sludge treatment, *Water Environment Research 82*, 524-535.

348. Zhao, L., Guo, J., Yang, J., Wang, L., and Ma, F. (2009) Bioaugmentation as a tool to accelerate the start-up of anoxic-oxic process in a full-scale municipal wastewater treatment plant at low temperature, *International Journal of Environment and Pollution 37*, 205-215.

349. Bartrolí, A., Carrera, J., and Pérez, J. (2011) Bioaugmentation as a tool for improving the start-up and stability of a pilot-scale partial nitrification biofilm airlift reactor, *Bioresource Technology 102*, 4370-4375.

350. Neumann, L., and Scherer, P. (2011) Impact of bioaugmentation by compost on the performance and ecology of an anaerobic digester fed with energy crops, *Bioresource Technology 102*, 2931-2935.

351. Schwartz, M. W., Brigham, C. A., Hoeksema, J. D., Lyons, K. G., Mills, M. H., and Van Mantgem, P. J. (2000) Linking biodiversity to ecosystem function: Implications for conservation ecology, *Oecologia 122*, 297-305.

352. De Ruiter, P. C., Neutel, A. M., and Moore, J. C. (1998) Biodiversity in soil ecosystems: The role of energy flow and community stability, *Applied Soil Ecology 10*, 217-228.

353. Reiss, J., Bridle, J. R., Montoya, J. M., and Woodward, G. (2009) Emerging horizons in biodiversity and ecosystem functioning research, *Trends in Ecology and Evolution 24*, 505-514.

354. Duffy, J. E., Cardinale, B. J., France, K. E., McIntyre, P. B., Thébault, E., and Loreau, M. (2007) The functional role of biodiversity in ecosystems: Incorporating trophic complexity, *Ecology Letters 10*, 522-538.

355. Hillebrand, H., Bennett, D. M., and Cadotte, M. W. (2008) Consequences of dominance: A review of evenness effects on local and regional ecosystem processes, *Ecology 89*, 1510-1520.

356. Gessner, M. O., Swan, C. M., Dang, C. K., McKie, B. G., Bardgett, R. D., Wall, D. H., and Hättenschwiler, S. (2010) Diversity meets decomposition, *Trends in Ecology and Evolution 25*, 372-380.

357. Cardinale, B. J., Wright, J. P., Cadotte, M. W., Carroll, I. T., Hector, A., Srivastava, D. S., Loreau, M., and Weis, J. J. (2007) Impacts of plant diversity on biomass production increase through time because of species complementarity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104*, 18123-18128.

358. Claesson, M. J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J. R., Ross, R. P., and O'Toole, P. W. (2010) Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions, *Nucleic Acids Research*.

359. Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2006) Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester, *Applied and Environmental Microbiology 72*, 1623-1630.

360. Kadam, P. C., and Boone, D. R. (1996) Influence of pH on ammonia accumulation and toxicity in halophilic, methylotrophic methanogens, *Applied and Environmental Microbiology 62*, 4486-4492.

361. Conrad, R., Klose, M., and Claus, P. (2000) Phosphate inhibits acetotrophic methanogenesis on rice roots, *Applied and Environmental Microbiology 66*, 828-831.

362. Fernandez, A. S., Hashsham, S. A., Dollhopf, S. L., Raskin, L., Glagoleva, O., Dazzo, F. B., Hickey, R. F., Criddle, C. S., and Tiedje, J. M. (2000) Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose, *Applied and Environmental Microbiology 66*, 4058-4067.

363. Chen, Y., Cheng, J. J., and Creamer, K. S. (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review, *Bioresource Technology 99*, 4044-4064.

364. Krakat, N., Schmidt, S., and Scherer, P. (2011) Potential impact of process parameters upon the bacterial diversity in the mesophilic anaerobic digestion of beet silage, *Bioresource Technology 102*, 5692-5701.

365. Carrero-Colon, M., Nakatsu, C. H., and Konopka, A. (2006) Microbial community dynamics in nutrient-pulsed chemostats, *FEMS Microbiology Ecology 57*, 1-8.

366. Conklin, A., Stensel, H. D., and Ferguson, J. (2006) Growth kinetics and competition between Methanosarcina and Methanosaeta in mesophilic anaerobic digestion, *Water Environment Research 78*, 486-496.

367. Nwosu, V. C., and Ladapo, J. A. (1999) Antibiotic response and plasmid profile of bacteria isolated from a landfill, *Current Microbiology 39*, 249-253.

368. Polson, S. W., Wilhelm, S. W., and Wommack, K. E. (2011) Unraveling the viral tapestry (from inside the capsid out), *ISME Journal 5*, 165-168.

369. Ladapo, J. A., and Nwosu, V. (1999) Growth response of landfill bacteria to different concentrations of heavy metals, *Journal of Environmental Biology 20*, 1-5.

370. Fedorak, P. M., and Hrudey, S. E. (1984) The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis, *Water Research 18*, 361-367.

371. Tang, Y., Shigematsu, T., Ikbal, Morimura, S., and Kida, K. (2004) The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester, *Water Research 38*, 2537-2550.

Résumé

Dans le but d'évaluer la possibilité de mise en place une ingénierie écologique des processus microbiens de la digestion anaérobie dans les bioprocédés, différents leviers environnementaux ont été appliqués à des digesteurs de cellulose. Le premier levier étudié, de nature physico-chimique, était la température. Le deuxième faisait appel à une adaptation préalable d'une biomasse complexe par incubation avec des molécules simples avant mise en présence de cellulose. Le dernier consistait en la co-inoculation de diverses biomasses exogènes avec une boue anaérobie. Les conséquences des perturbations apportées par ces leviers sur les dynamiques métaboliques et écologiques de bioréacteurs anaérobies dégradant de la cellulose ont été évaluées. Différents indicateurs physico-chimiques ont été utilisés pour caractériser la dégradation de la cellulose (production de molécules intermédiaires, production de gaz, etc.). Les outils de la biologie moléculaire ont permis de caractériser les dynamiques microbiennes à l'échelle des communautés (par fingerprinting ARISA) ou des individus (par pyroséquençage de l'ADNr 16S). L'utilisation d'isotopes stables (cellulose marquée ^{13}C), a permis de réaliser un traçage précis des flux de matières (intermédiaires de dégradation de la cellulose enrichis en ^{13}C) et des microorganismes impliqués dans la chaîne de dégradation de la cellulose (groupes microbiens fonctionnels identifiés par la technique de « stable isotope probing »). Les expériences de changements de température ont montré l'influence importante de ce paramètre sur les communautés microbiennes, en particulier les archées. Elles ont mis en évidence le caractère asymétrique de l'effet de la température sur les communautés microbiennes et les conséquences irréversibles du passage par les conditions thermophiles. Ces propriétés ouvrent des perspectives intéressantes pour exploiter les chocs de température afin de modifier les propriétés de la biomasse. L'expérience de fonctionnalisation de la biomasse à l'aide de quatre molécules simples (acide propionique, acide butyrique, glucose et cellobiose) montre qu'un modelage des populations microbiennes par préadaptation est possible. Une fois en contact avec la cellulose, les biomasses fonctionnalisées génèrent des schémas de dégradation et des structures de communautés qui se répartissent de manière inattendue en deux catégories seulement. Ce résultat suggère qu'il est possible d'orienter les états d'équilibre d'une communauté microbienne complexe par préadaptation fonctionnelle. Enfin, des expériences de co-inoculation ont mis en avant la difficulté d'exploiter directement les propriétés enzymatiques de flores cellulolytiques performantes mais également les possibilités de modifier les équilibres de diversité au sein de la biomasse du bioprocédé. Ces expériences suggèrent qu'un paramètre tel que la diversité de la communauté d'un bioprocédé pourrait être manipulé par bioaugmentation. Ce travail démontre que nous disposons d'ores et déjà d'un certain nombre d'outils pour élaborer une ingénierie écologique des bioprocédés à travers une nouvelle démarche de gestion qui se place à l'échelle de l'écosystème microbien et des services associés.

Abstract

In order to evaluate the possibility of establishing an ecological engineering of microbial processes of anaerobic digestion in bioprocesses, different environmental levers were applied to cellulose digesters. The first lever studied was temperature. The second involved preadaptation of a complex biomass by incubation with simple molecules, before addition of cellulose. The third lever consisted in co-inoculating various exogenous biomasses with anaerobic sludge. The consequences of these levers on metabolic and ecological dynamics of cellulose-degrading anaerobic bioreactors were evaluated. Different physicochemical indicators were used to characterize cellulose degradation (intermediate production, gas production, etc.). Molecular biology tools enabled the characterization of microbial dynamics at the community level (ARISA fingerprinting) or individual level (16S rDNA pyrosequencing). The use of stable isotopes (13C-labeled cellulose) enabled the accurate tracing of both material flows (13C enriched cellulose intermediates) and microorganisms involved in the cellulose degradation chain (functional microbial groups were identified by "stable isotope probing" technique). Temperature changes showed the significant influence of this parameter on microbial communities, especially Archaea. The asymmetric nature of temperature effect on microbial communities, and the irreversible consequences of incubation in thermophilic conditions were highlighted. These properties open interesting perspectives for the use of temperature shocks to modify biomass properties. A biomass functionalization experiment was performed with simple molecules (propionic acid, butyric acid, glucose and cellobiose). It showed that shaping microbial communities through substrate adaptation was possible. Once in contact with the cellulose, functionalized biomasses generated patterns and structures of degradation communities who unexpectedly formed two categories only. This result suggests that it is possible to direct the equilibrium states of a complex microbial community by functional preadaptation. Finally, co-inoculation experiments highlighted the difficulty of directly exploiting the enzymatic properties of efficient cellulolytic flora. But, they also highlighted the possibility of changing biomass diversity balance in bioprocesses. Thus these experiments suggest that a parameter such as community diversity can be manipulated by bioaugmentation in bioprocesses. This work demonstrates that several tools are available to develop an ecological engineering of bioprocesses, through a new management approach at the microbial ecosystem (and related services) level.