

Université de Nantes

FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

École Doctorale SPIGA
Sciences Pour l'Ingénieur, Géosciences, Architecture

Année 2010

N° attribué à la Bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Caractérisation, modélisation de la croissance
photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii*
en photobioréacteur et mise en évidence du
couplage à l'hydrodynamique

Thèse de Doctorat

Discipline : Sciences pour l'Ingénieur

Spécialité : Génie des Procédés

*Présentée
et soutenue publiquement par :*

Hosni TAKACHE

Le 24 juin 2010, devant le jury ci- dessous

Président : Jack LEGRAND (Professeur, Université de Nantes)
Rapporteurs : Gilles PELTIER (Directeur de Recherche au CEA, Cadarache)
Alain BERGEL (Directeur de Recherche au Laboratoire de Génie Chimique à Toulouse)
Examineurs : Marcel JANSSEN (Assistant Professor at Wageningen University, the Netherlands)
Jean-François CORNET (Maître de conférences à l'Université de Clermont-Ferrand, HDR)
Jérémy PRUVOST (Professeur, Université de Nantes)

Directeur de thèse : Jérémy PRUVOST, Professeur, Université de Nantes

Remerciements

Cette page a été la plus difficile à rédiger dans ce mémoire, car toutes les références bibliographiques du monde entier ne peuvent guère m'aider à écrire quelques mots pour remercier des gens qui m'ont aidé, soutenu et encouragé...

Je tiens à remercier en tout premier lieu Jack LEGRAND, directeur du laboratoire GEPEA « Génie des Procédés - Environnement - Agroalimentaire » UMR CNRS 6144, qui m'a donné la chance de venir en France et de continuer mes études supérieures.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Jérémy PRUVOST, mon directeur de thèse pour son aide compétente, son dynamisme, sa rigueur scientifique, son enthousiasme et ses précieux conseils qu'il m'a apportés. Je remercie cet homme pour sa patience, sa disponibilité malgré toutes les tâches et les responsabilités qu'il assume. J'apprécie dans ce chercheur sa qualité humaine, et j'admire sa passion par son travail. C'était un vrai plaisir de travailler avec lui et en même temps une grande fierté d'avoir cette « idole », je lui dis : «tu es le meilleur » ! La confiance que tu m'as accordée ainsi que nos nombreuses discussions m'ont permis de progresser et de mieux appréhender les différentes facettes du métier d'enseignant-chercheur. Soit sûr, Jérémy, de toute mon estime et de mon profond respect pour toi.

Avec beaucoup de respect et trop d'admiration, je remercie du fond de mon cœur Jean-François CORNET, professeur au Laboratoire de Génie Chimique (LGCB) à l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand, pour sa collaboration et son aide tout au long de cette thèse. Je suis très fier de travailler avec cette personne qui connaît les photobioréacteurs aussi bien que les micro-organismes cultivés dedans.

Merci à M. Gilles PELTIER, directeur de recherche au Commissariat à l'Énergie Atomique « CEA » de Cadarache, et M. Alain BERGEL, directeur des recherches CNRS au Laboratoire de Génie Chimique (LGC) de Toulouse, de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Merci également à M. Marcel JANSSEN, professeur assistant à l'Université de Wageningen au Pays-Bas, pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens ensuite à exprimer ma reconnaissance envers les membres des laboratoires GEPEA de Saint Nazaire pour les différentes aides qu'ils m'ont apportées. Je remercie tous les enseignants du GEPEA pour leur encouragement et leur confiance tout au long de cette thèse. Je remercie tout particulièrement le personnel technique du laboratoire car grâce à eux les expérimentations se sont déroulées dans les meilleures conditions. Je pense à Hélène MAREC, la technicienne en instrumentation, qui est derrière la réussite de toutes les thèses en photobioréacteurs au Laboratoire GEPEA et surtout la mienne. Un grand merci à Jocelyne

NICOLLEAU et Sandrine LE PERSON secrétaires du laboratoire GEPEA, pour leur effort de s'occuper des réservations du Jury « un jour de grève national ».

Merci à tous ceux qui ont contribué à la bonne humeur de ce laboratoire et à tous ceux que j'ai eu beaucoup de plaisir à côtoyer pendant ces années et avec qui j'ai passé de très bons moments. Tous les doctorants du GEPEA, je vous remercie pour cette très belle ambiance.

Un très grand merci, avec beaucoup de reconnaissance pour deux personnes qui ont fait un travail exceptionnel en organisant un pot Libanais. Ali et Moemen, je vous remercie pour le pot et je n'oublierai jamais votre aide.

Je dédie ce travail à mon père qui nous a quittés sans avoir le temps d'apprécier les résultats de son sacrifice et son travail pour sa famille. Je présente ce travail modeste à ma mère, ma sœur, mes frères, mes neveux, ma nièce et ma grand-mère qui sont toujours présents dans mon cœur.

J'ai consacré mon dernier paragraphe pour remercier quelqu'un qui a envahi ma vie. Mes remerciements les plus sincères, les plus chaleureux, les plus nobles et les plus affectueux pour quelqu'un qui m'a aidé à supporter le stress et les moments difficiles, et qui était toujours présent pour m'encourager et me tenir la main pour finir cette thèse. Je présente ce travail à Ghadeer, l'ange qui est tombé du ciel et qui a changé ma vie.

Hosni
Saint Nazaire
Juin 2010

Sommaire

Introduction générale.....	11
I. Croissance et modélisation des microalgues en photobioréacteurs.....	15
I.1. Les micro-organismes photosynthétiques.....	15
I.1.1. Introduction.....	15
I.1.2. Le processus global de la photosynthèse.....	15
I.1.3. Conversion de l'énergie lumineuse et transfert d'électrons.....	16
I.1.4. Schéma en Z de la photosynthèse.....	19
I.1.5. La respiration mitochondriale.....	20
I.1.6. Quelques définitions.....	22
I.2. Réponse photosynthétique des microalgues à la lumière.....	23
I.3. Systèmes et modes de culture des microalgues en PBR.....	24
I.3.1. Systèmes de culture.....	24
I.3.2. Modes de culture.....	25
I.3.3. Les différentes géométries de photobioréacteurs.....	27
I.4. Modélisation d'un Photobioréacteur.....	27
I.4.1. Introduction.....	27
I.4.2. L'atténuation lumineuse en photobioréacteur.....	28
I.4.3. Définition de la fraction volumique éclairée en PBR.....	29
I.4.4. Prédiction du transfert radiatif : modèle à deux flux.....	29
I.4.5. Modélisation de la croissance photosynthétique.....	31
I.5. Étude du couplage hydrodynamiques/conversion photosynthétique en PBR.....	34
I.5.1. Mise en circulation des cultures photo-autotrophes.....	34
I.5.2. Différents modes de circulation en PBR.....	34
I.5.3. Les régimes fluctuants de lumière générés par l'hydrodynamique (ou <i>L/D cycles</i>).....	35
I.5.4. Effet d'un régime fluctuant de lumière sur la croissance photosynthétique.....	36
I.5.5. Effet de l'hydrodynamique sur la conversion photosynthétique en PBR.....	38
I.5.6. Interaction des cycles L/D avec le métabolisme énergétique.....	39
I.6. Conclusion sur le couplage hydrodynamique/conversion photosynthétique.....	40
II. Matériel et Méthodes.....	43
II.1. Microalgue d'étude.....	43
II.1.1. Entretien de la souche dans des conditions axéniques.....	43
II.1.2. Milieu de culture.....	44
II.2. Cultures en conditions contrôlées.....	44
II.2.1. Description du Photobioreacteur.....	44
II.2.2. Système d'éclairage.....	49
II.3. Mesure du flux incident en lumière continu.....	50
II.4. Application des cycles de lumière/obscurité.....	51
II.4.1. Introduction.....	51
II.4.2. Vérification de la fiabilité du panneau de DEL.....	52
II.4.2.1. Vérification par Analyse d'image.....	52
II.4.2.1.1. Traitement des résultats.....	53

II.4.2.1.2. Réponse dynamique du panneau durant un éclairage intermittent.....	53
II.4.2.1.3. Vérification des durées et des flux incidents reçus pendant les durées éclairées et sombres.....	53
II.4.2.2. Vérification quantitatives par actinométrie.....	55
II.4.2.2.1. Préparation de la solution réactive.....	55
II.4.2.2.2. Préparation du réactif ferrique.....	56
II.4.2.2.3. Déroulement de la photoréaction.....	56
II.4.2.2.4. Détermination du flux d'énergie lumineuse incident.....	56
II.4.2.2.5. Procédure de mesure en lumière continue et intermittente.....	58
II.4.2.2.6. Résultats expérimentaux.....	58
II.5. Modélisation de la réflexion de l'interface Inox-eau pour le réacteur torique (et validation expérimentale).....	59
II.5.1. Considération théorique.....	59
II.5.1. Procédure de mesure et traitement des résultats.....	60
II.6. Protocoles d'analyse de la suspension microalgale.....	60
II.6.1. Dénombrement cellulaire.....	60
II.6.2. Concentration en biomasse.....	61
II.6.3. Dosage des pigments.....	61
II.6.4. Dosage des sucres totaux.....	62
II.6.5. Dosage des Protéines.....	62
II.6.6. Détermination de la composition élémentaire.....	62
II.7. Détermination de la distribution de taille par analyse d'images.....	64
III. Croissance photolimitée de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en PBR en lumière continue et obtention des productivités volumiques maximales.....	67
Partie I : Étude de la croissance photolimitée de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en PBR sous lumière continue.....	67
III. I.1 Introduction.....	67
III.I.2. Régimes de fonctionnement et productivité volumique en mode continu.....	67
III.I.2.1. Culture photolimitée.....	68
III.I.2.2. Culture en régime cinétique.....	69
III.I.2.3. Culture en limitation physique stricte.....	69
III.I.3. Étude expérimentale de la croissance photolimitée de <i>C. reinhardtii</i> en PBR.....	71
Partie II : Obtention des productivités volumiques maximales.....	73
III. Publication.....	75
Experimental and Theoretical Assessment of Maximum Productivities for the microalgae <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> in Two Different Geometries of Photobioreactors.....	75
III.1. Abstract.....	75
III.2. Introduction and Objectives.....	75
III.3.Theoretical Considerations.....	77
III.4. Materials and Methods.....	80
III.4.1. Microorganism and medium.....	80
III.4.2. Photobioreactors characteristics.....	80
III.4.2.1. Torus PBR.....	80
III.4.2.2. Cylindrical PBR.....	81
III.4.3. Determination of the maximum volumetric biomass productivity.....	81
III.4.4. Analyses.....	82
III.4.4.1. Biomass dry weight.....	82
III.4.4.2. Pigments contents.....	82

III.4.5. Determination of the radiative properties for <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	83
III.4.6. Measurement of photosynthetic activity for different irradiances.....	83
III.4.6.1. Photosynthetic oxygen evolution.....	83
III.4.6.2. Fluorescence measurements.....	83
III.5. Results and Discussion.....	84
III.6. Conclusions and Perspectives.....	91
ACKNOWLEDGMENT.....	93
NOMENCLATURE.....	94
REFERENCES.....	96
APPENDIX.....	99

IV. Établissement d'un modèle cinétique de la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* en photobioréacteurs..... 105

IV.1. Introduction.....	105
IV.2.1. Modélisation de la croissance photosynthétique en PBR.....	105
IV.3. Établissement du modèle cinétique pour <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	106
IV.3.2. Formulation de la loi cinétique.....	108
IV.3.4. Données stœchiométriques.....	110
IV.3.5. Paramètres de la loi et méthodes de détermination.....	111
IV.3.5.1. Rendements quantiques et énergétiques.....	112
IV.3.5.2. Constante de saturation K_r	115
IV.3.5.2.1. Évolution du dégagement photosynthétique d' O_2 en fonction du flux lumineux.....	115
IV.3.6. Détermination du paramètre K_r	118
IV.4. Évolution de la composition pigmentaire en fonction de la densité de flux hémisphérique incidente.....	119
IV.5. Identification et calcul des paramètres.....	121
IV.6. Validation du modèle cinétique.....	122
IV.6.1. Introduction.....	122
IV.6.2. Validation en mode continu et en limitation physique.....	123
IV.7. Le couplage cinétique en photobioréacteurs pour expliquer le phénomène de photoinhibition.....	125
IV.8. Analyse pour des cultures en mode discontinu (<i>batch</i>).....	128
IV.8. 1. Introduction.....	128
IV.8. 2. Culture de <i>C. reinhardtii</i> en <i>batch</i>	128
IV.8. 3. Procédure expérimentale.....	129
IV.8. 4. Résultats et discussion.....	130
IV.8. 4.2. Effet d'un régime cinétique sur la vitesse de croissance.....	130
IV.8. 4.2. Résultats expérimentaux et comparaison aux simulations.....	131
IV.9. Conclusion.....	133

V. Étude des effets des cycles de lumière/obscurité sur la productivité volumique de *Chlamydomonas reinhardtii* en photobioréacteur..... 137

V.1. Introduction.....	137
V.2. Étude de l'effet des cycles de lumière/obscurité en photobioréacteurs.....	139
V.2.1. Génération des cycles de Lumière/obscurité.....	139
V.2.2. Caractérisation des périodes éclairées et sombres en PBR.....	139
V.2.3. Procédure expérimentale pour l'étude des cycles de lumière/obscurité.....	142
V.3. Considérations théoriques dans la représentation de la croissance des microalgues en lumière intermittente.....	143
V.4. Choix du micro-organisme photosynthétique pour étudier l'effet des <i>L/D cycles</i>	145

V.5. Résultats expérimentaux.....	146
V.5.1.Introduction.....	146
V.5.2.Utilisation des expérimentations en cycles intermittents de lumière pour caractériser les cinétiques associées au comportement à l'obscurité.....	147
V.5.3. Résultats expérimentaux pour un temps de cycle variable et une fraction éclairée constant ($\epsilon=0.5$).....	148
V.5.4. Effet de la fraction éclairée pour un période éclairée constante.....	151
V.5.5. Analyse des résultats et mise en évidence du couplage non linéaire avec la réponse photosynthétique.....	153
V.6. Conclusion.....	155
Conclusion Générale.....	160
NOMENCLATURE.....	163
Références Bibliographique.....	169
Annexes.....	177
A.I : Protocoles de dosage des pigments (chlorophylles et caroténoïdes totaux) par extraction à l'acétone 90%.....	179
A.II : Dosage des Sucres Totaux.....	181
A.III : Programme de contrôle/ commande du photobioréacteur torique.....	183
A.III.1 . L'interface d'utilisateur.....	183
A.III.2 . Le Diagramme de programmation.....	184
A.IV. Détermination de la distribution de taille par analyse d'image.....	185
A. IV.1. Microscopie.....	185
A. IV.2. Photographie.....	185
A. IV.3. Analyse d'images.....	185
A. IV.4. Interprétations des résultats obtenus.....	186
A. IV.5. Particule de Tchebychev.....	186
A.V. Modélisation de la teneur en pigment par une approche TPI.....	188
Résumé.....	192

Introduction

Introduction générale

Le domaine de recherche lié à la valorisation des micro-organismes photosynthétiques (en particulier microalgues et cyanobactéries) est en plein essor depuis quelques années. Ces micro-organismes présentent en effet un potentiel important dans divers domaines: production de biomasse, nutrition humaine directe ou indirecte, production de molécules spécifiques (chimie verte), production d'énergie (lipides, hydrogène) et applications environnementales (dépollution d'effluents). Malgré les intérêts ambitieux portés sur cette nouvelle bioressource, l'exploitation à l'échelle industrielle reste très limitée, du fait en grande partie des faibles concentrations en biomasse atteintes et des coûts de production souvent élevés. En tant qu'élément central, le système de production est évident essentiel. Les systèmes clos, appelés photobioréacteurs (PBR), en sont un exemple privilégié dans le sens où ils permettent d'atteindre, de par le niveau élevé de contrôle permis des conditions de culture, les productivités les plus importantes.

Les micro-organismes photosynthétiques se développent le plus souvent sur un mode de croissance autotrophe dans un milieu aqueux contenant les nutriments minéraux essentiels et une source de carbone inorganique, l'ensemble se déroule en présence d'un substrat «clé» la lumière. La lumière est connue comme étant le facteur essentiel gouvernant l'efficacité des PBR, celle-ci introduisant néanmoins une difficulté supplémentaire de conception. La croissance photosynthétique y est directement dépendante, et la présence même des cellules en suspension (absorption, diffusion) amène à une distribution hétérogène de l'énergie lumineuse au sein du volume de culture, au contraire des autres nutriments qui peuvent être répartis d'une façon homogène si les conditions de mélanges sont suffisantes. Schématiquement, cela amène à diviser le volume réactionnel en deux zones : une zone dite photonique où les micro-organismes sont exposés à une quantité de lumière suffisante pour assurer la photosynthèse, et une zone sombre où cette quantité est insuffisante pour assurer la croissance photosynthétique. Une des conséquences est que les cellules, du fait de leur mise en circulation, ne seront pas soumises à un éclairage continu (et ce même si le PBR est éclairée de façon constante) mais à des cycles intermittents de lumière/obscurité lors du passage d'une zone à l'autre. Ce régime fluctuant de lumière induit par l'écoulement peut alors modifier le taux de conversion de la lumière reçue par la cellule, le processus de conversion photosynthétique étant dynamique. Ce phénomène, difficile à appréhender, car résultats des effets combinés du transfert de rayonnement, de l'hydrodynamique et des mécanismes de conversion biologique de l'énergie lumineuse capté, a fait l'objet de plusieurs études au laboratoire GEPEA. Ces études ont débuté avec la thèse de Jérémy Pruvost (thèse soutenue en 2000), et se sont ensuite poursuivies durant la thèse de Laurence Pottier (thèse soutenue en 2005). Ce mémoire en constitue une prolongation.

Pour mettre en évidence ce couplage hydrodynamique/conversion photosynthétique, le travail réalisé au cours de cette thèse s'est organisé en deux grandes parties. La première a consisté en une étude poussée de la croissance de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* en PBR éclairé en lumière continue. Ceci a permis d'établir un modèle cinétique permettant de prédire les productivités volumiques du PBR en fonction des conditions opératoires appliquées, et a également servi de base dans l'étude des cycles d'éclairement proprement dit, objet de la deuxième partie de la thèse. Cette dernière partie a consisté à mettre en place une méthodologie expérimentale permettant de simuler les cycles lumière/obscurité subis au sein du PBR par des cycles maîtrisés en fréquence et en intensité, pour ensuite pouvoir étudier la réponse biologique obtenue dans ces conditions de régime d'éclairement dynamique. Au final, ce manuscrit organisé en cinq chapitres, aborde la caractérisation et la modélisation de la croissance de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* en PBR en lumière continue et intermittente.

Dans le premier chapitre, une étude bibliographique reprend l'état de l'art sur la croissance et la modélisation de la culture des micro-organismes photosynthétiques en autotrophie. Une description des différentes approches abordant la problématique du couplage hydrodynamique/conversion photosynthétique au sein d'une suspension microalgale est également représentée.

Le second chapitre s'intéresse à la présentation des méthodes expérimentales et du matériel utilisé au cours de cette étude.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude des paramètres gouvernant la productivité volumique maximale des PBR. Une partie des expérimentations présentées dans ce chapitre a été effectuée en collaboration avec le Laboratoire LGCB (Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique) de Clermont-Ferrand (en particulier Jean-François Cornet). L'étude menée sur deux PBR de géométries différentes et en limitation physique stricte par la lumière pour différentes valeurs de la densité de flux incidente nous a permis de prouver la validité et la robustesse d'une formule simple et fiable dans la prédiction de la productivité volumique maximale en PBR.

Le quatrième chapitre décrit l'élaboration d'un modèle cinétique de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce modèle est basé sur une approche prédictive reposant sur la Thermodynamique des Processus Irréversibles (TPI) dont l'application sur des systèmes biologiques est relativement récente. Ceci a été également mis en place par une collaboration étroite entre le laboratoire GEPEA et LGCB.

Finalement, le dernier chapitre porte sur la méthodologie d'étude et les résultats obtenus sur les effets dynamiques des cycles d'éclairements sur la conversion photosynthétique. L'interprétation des résultats s'appuie sur les conclusions obtenues en lumière continue aux chapitres trois et quatre, démontrant finalement l'existence de ce couplage pour des gammes de fréquences pouvant être rencontrées en PBR.

Chapitre I : Partie Bibliographique

Résumé:

Ce premier chapitre est dédié à une présentation générale de la croissance autotrophe des micro-organismes photosynthétiques, et à l'état de l'art des différentes approches utilisées dans la modélisation de leur croissance en PBR.

Une revue de la littérature concernant les travaux sur le couplage hydrodynamique/conversion photosynthétique en PBR est finalement présentée, ce couplage faisant l'objet d'une étude expérimentale spécifique dans ce mémoire.

I. Croissance et modélisation des microalgues en photobioréacteurs

I.1. Les micro-organismes photosynthétiques

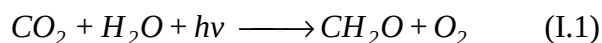
I.1.1. Introduction

On entend par le terme «micro-organismes photosynthétiques», les cyanobactéries, les microalgues et les bactéries photosynthétiques. Les microalgues et les cyanobactéries sont des organismes végétaux qui constituent le phytoplancton aquatique et marin. En tant que micro-organismes procaryotes, les cyanobactéries ne possèdent pas de noyau, au contraire des microalgues de nature eucaryotique. Chez les microalgues, la photosynthèse se déroule dans le chloroplaste qui est un organite cellulaire présent chez les plantes supérieures et certaines algues, et c'est dans les mitochondries que la respiration a lieu. Dans le cas des cyanobactéries dépourvues de chloroplaste, la même chaîne de transporteur d'électrons est impliquée dans la respiration et la photosynthèse. Dans la suite du mémoire, on utilisera le terme microalgue pour désigner les micro-organismes photosynthétiques eucaryotes, et lorsqu'il y aura nécessité, on distinguera entre microalgues (eucaryotes) et cyanobactéries (procaryotes).

Dans les paragraphes suivants, nous expliquons en détails les processus de photosynthèse et de respiration dans le cas des microalgues. Ces deux processus, à la base de l'énergétique cellulaire, sont essentiels dans la compréhension de la croissance de ces organismes et donc dans l'établissement des modèles mathématiques la traduisant.

I.1.2. Le processus global de la photosynthèse

La spécificité des microalgues provient de leur capacité à assimiler les sources de carbone et à faire leur propre matière organique grâce au processus de la photosynthèse, durant lequel l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique. La photosynthèse est ainsi représentée globalement par l'équation (I.1) et la figure (I.1).



La photosynthèse est le seul processus biologique capable de capter l'énergie lumineuse (solaire ou artificielle) pour la transformer en énergie chimique en fixant simultanément le dioxyde de carbone CO_2 et en libérant le dioxygène O_2 .

L'élément de base de la photosynthèse est le photosystème qui permet l'assimilation de l'énergie lumineuse (les photons) et son utilisation pour le

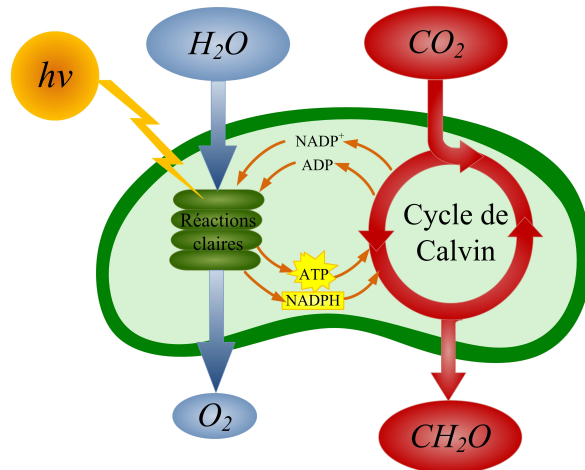


Figure I.1 : Représentation schématique du processus global de la photosynthèse.

fonctionnement de la chaîne photosynthétique. Un photosystème est constitué de deux parties: l'antenne collectrice formée des pigments accessoires (caroténoïdes, chlorophylle b et chlorophylle a), et le centre réactionnel contenant les pigments actifs (chlorophylle a). Il existe deux types de photosystèmes qui fonctionnent en série : le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII). Ces photosystèmes sont associés à différents complexes moléculaires pour former la chaîne photosynthétique de transport d'électrons, intégrée dans la membrane du chloroplaste. Celle-ci se trouve sur la membrane du thylacoïde, délimitant le lumen (intérieur du thylacoïde) et le stroma (extérieur du thylacoïde).

1.1.3. Conversion de l'énergie lumineuse et transfert d'électrons

Les photons captés au niveau des pigments et transmis aux centres réactionnels permettent un transfert d'électrons par une série de réactions d'oxydoréduction à travers la chaîne photosynthétique. Ce transfert est possible grâce aux complexes suivants: le photosystème II (PS II), le cytochrome b_6f , le photosystème I (PS I), la Ferrédoxine NADP réductase (FNR). En plus de ces complexes, trois transporteurs d'électrons interviennent durant le processus : la Plastoquinone Q_B , la Plastocyanine (PC) et la Ferrédoxine (Fd). Les autres éléments clés sont la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP^+), le NADPH (pouvoir réducteur), l'adénosine di phosphate (ADP), le phosphate inorganique (Pi), l'adénosine tri phosphate (ATP), ainsi qu'évidemment les photons ($h\nu$) et l'eau.

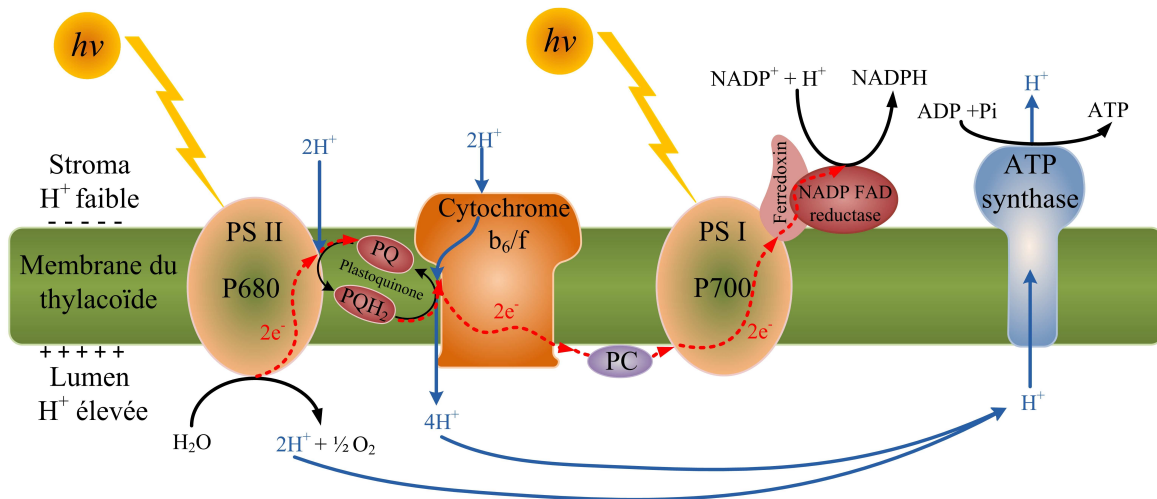


Figure I.2 : Représentation schématique des réactions claires de la photosynthèse.

Le processus global peut être décrit par les étapes suivantes:

- Les photons venant d'une source lumineuse (naturelle ou artificielle) sont captés par les antennes collectrices des PSII. L'excitation générée par chaque photon est transmise à travers les molécules pigmentaires (chlorophylles et caroténoïdes) vers les centres réactionnels et ce, quelle que soit la longueur d'onde du photon capté entre 400 et 680 nm. Le centre réactionnel d'un PSII fonctionnant à un équivalent énergétique d'un photon à 680 nm ($E = h \times c / \lambda$), nommé ainsi P680, l'énergie excédentaire (contenue dans les photons de longueur d'onde inférieure) sera dissipée dans les antennes. Les photons captés par l'antenne collectrice et transmis au centre réactionnel, libère des électrons au niveau de ce centre réactionnel, ce dernier passant à un état P680* en libérant des électrons. Les électrons libérés sont ensuite transférés dans la chaîne photosynthétique par le moyen du premier transporteur d'électrons, la plastoquinone Q_B , qui prend aussi deux protons disponibles dans le stroma. Par suite, la plastoquinone passe de son état oxydé (PQ) à un état complètement réduit PQH_2 .
- Simultanément, les électrons rentrant en jeu dans ce transport sont arrachés à l'eau au cours d'une réaction catalysée par le complexe Z (ou complexe tyrosine Z, contenant 4 ions Manganèse) et provoquant une accumulation de quatre charges positives, ce qui va entraîner l'oxydation d'une molécule d'eau (photolyse de l'eau). La photolyse de deux molécules d'eau entraîne la libération de 4 électrons, d'une molécule de dioxygène et de 4 protons. Ces 4 derniers sont libérés dans le lumen contribuant ainsi à la création d'un gradient de protons à travers la membrane thylacoïdale.

- La plastoquinone Q_B transfère les deux électrons vers le complexe du cytochrome b_6f en relâchant en même temps deux protons dans le lumen. Ce transfert est couplé à un pompage de deux protons du cytochrome b_6f également dans le lumen.
- Les électrons sont transférés du cytochrome b_6f au PSI (centre réactionnel) par le moyen d'un transporteur d'électrons, la Plastocyanine (PC) (transporteur soluble dans le lumen). Le fonctionnement du PSI est semblable au fonctionnement du PS II, à la différence près que le PSI (aussi nommé P700) fonctionne à un équivalent énergétique d'un photon à 700 nm (au final, les photons utilisés se situent donc dans la gamme de longueur d'onde 400-700 nm, définissant ainsi le PAR, pour *Photosynthetic Active Radiations*). Tout comme le PS II, les antennes collectrices dirigent l'excitation générée par les photons captés vers le P700 qui passe de son état initial à l'état P700* (le réducteur le plus puissant de la chaîne de transport d'électrons). Le PSI cède deux électrons à la ferrédoxine, ces deux électrons étant remplacés par un électron provenant de la plastocyanine (PC) qui sera alors réduite.
- Les électrons sont cédés à la ferrédoxine qui, à son tour, les transfère à la ferrédoxine NADP réductase (FNR), qui elle-même va céder ces électrons à l'accepteur final, le $NADP^+$ qui se réduit en NADPH en prenant un proton disponible dans le stroma. Ceci va donc accroître le gradient de protons entre les deux côtés de la membrane du thylacoïde, entre le stroma et le lumen.
- Le gradient de protons généré par la chaîne de transport d'électrons va créer une force-proton motrice utilisée pour la synthèse de l'ATP au niveau de l'ATP synthase à partir de l'ADP et du P_i . Ce mécanisme de synthèse d'ATP a été proposé par Mitchell (1966). La synthèse de l'ATP qui a donc lieu en présence de lumière au cours de la photosynthèse, est appelée la photophosphorylation.

Au final, le pouvoir réducteur NADPH et la molécule énergétique ATP sont utilisés pour la fixation du gaz carbonique (CO_2), réaction catalysée par la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase (RubisCO) dans le «Cycle de Calvin». Les produits de cette réaction sont deux molécules de 3-phosphoglycérate, unité de base de la synthèse des lipides, des acides gras, des acides aminés et des acides carboxyliques. La molécule de 3-phosphoglycérate est également le point de départ pour la synthèse de l'hexose P, puis des carbohydrates. Les sucres (comme l'amidon) sont stockés pour ensuite être utilisés comme

source d'énergie (respiration) dans la synthèse des métabolites nécessaires au fonctionnement de l'organisme.

I.1.4. Schéma en Z de la photosynthèse

Le processus mis en jeu au niveau de la chaîne photosynthétique est également nommé le schéma en Z de la photosynthèse (figure I.3). Celui-ci présente les couples redox impliqués dans le transfert photochimique des électrons issus de l'oxydation de l'eau jusqu'à l'accepteur final d'électrons qui est le cofacteur NADP^+ (donnant au final la forme d'un Z).

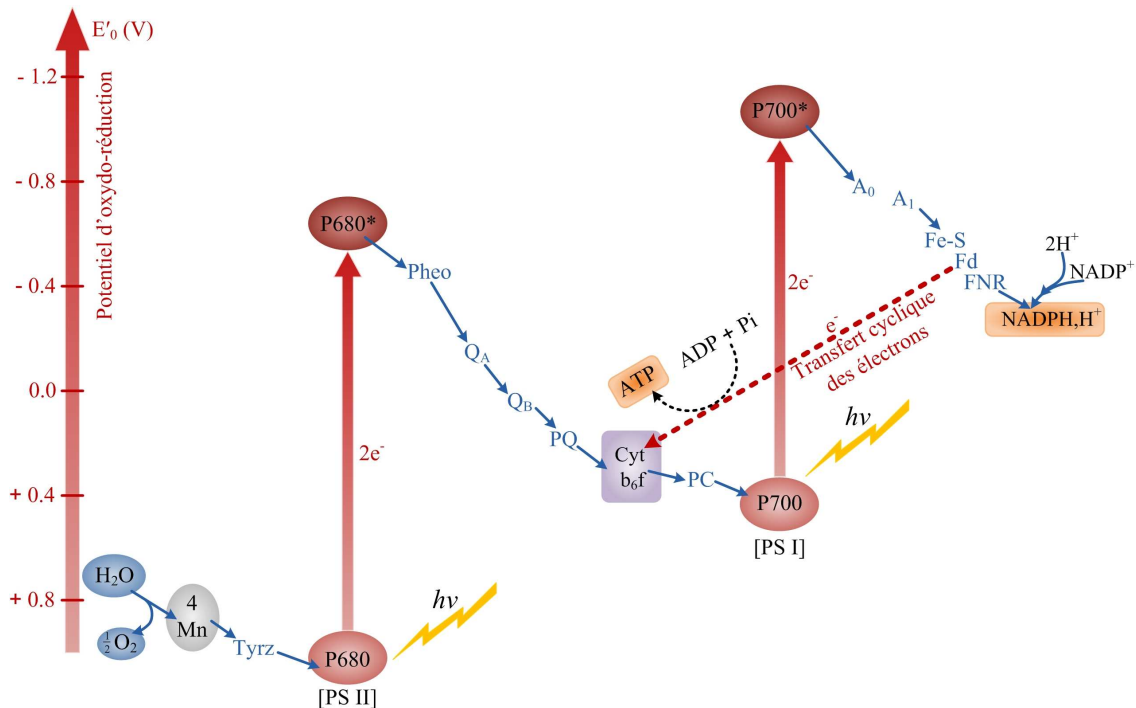


Figure I.3 : Schéma en Z de la photosynthèse et présentation du transfert cyclique et acyclique des électrons.

Ce schéma permet de visualiser le transfert d'électrons acyclique, avec donc transfert des électrons qui se fait entre le premier donneur (l'eau) et le dernier accepteur (NADP^+) où les deux photosystèmes PSII et PSI interviennent pour réaliser les sauts de potentiel nécessaires à cette opération. Ce transfert acyclique (photophosphorylation acyclique) conduit obligatoirement à la synthèse d'ATP et de NADPH. La photophosphorylation acyclique se résume donc à la réaction stœchiométrique suivante :



Il existe également un transfert cyclique, où le transfert d'électrons s'effectue entre la ferredoxine réduite et le complexe $\text{PQ}/\text{cytochrome } b_6f$ sans faire intervenir le PSII. Dans ce cas, il n'y a donc pas de production d'oxygène ni de transfert d'électrons sur le NADP^+ . Le

résultat global de ce flux cyclique d'électrons est le pompage de protons par le complexe du cytochrome b_6f . Par conséquence, cela augmente la force proton-motrice qui va engendrer la synthèse d'ATP sans formation concomitante de NADPH; ce processus, dénommé photophosphorylation cyclique, permet d'augmenter la synthèse de l'ATP par rapport à celle du NADPH.

Au final, il apparaît que l'équation stœchiométrique (I.2) de la photophosphorylation acyclique est trop simpliste pour représenter à elle seule le métabolisme énergétique. Cela suppose que le rapport de la vitesse spécifique de la photophosphorylation sur la vitesse spécifique de réduction des cofacteurs reste égal à 1 (soit un transfert cyclique nul). Ceci n'est pas le cas lorsque des processus anaboliques sont mis en jeu (Cornet 2007). Ces processus demandant des ratios largement supérieurs à 1, et un flux d'électrons cyclique exclusivement réservé à la synthèse d'ATP est nécessaire (photophosphorylation cyclique). Une formulation correcte de ce rapport, (appelé aussi rapport $P/2e^-$, voir la partie I.1.6), qui apparaît comme un moyen pour la cellule d'adapter son métabolisme énergétique à ses besoins, se révèle donc comme un point important d'une modélisation correcte de la croissance photosynthétique. On pourra notamment se référer aux travaux du LGCB sur le sujet (Cornet 2007 en particulier).

1.1.5. La respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale est réalisée par une série de complexes protéiques localisés dans la membrane mitochondriale. Les électrons concernés par ce processus proviennent des NADH et $FADH_2$ produits par le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs) et du NADH cytosolique généré par la glycolyse (dans ce cas le NADH est transporté via des navettes spécifiques). Les électrons sont transférés du NADH au dioxygène par une série de réactions d'oxydoréduction à travers la chaîne de transport d'électrons constituée de quatre complexes protéiques qui sont: la NADH-Coenzyme Q oxydoréductase, la succinate déshydrogénase, la Coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase et la cytochrome oxydase. Les quatre complexes sont aussi appelés respectivement les complexes I, II, III et IV. Le complexe V (l'ATP synthase) quant à lui, catalyse la synthèse de l'ATP. À côté de ces complexes, deux transporteurs mobiles interviennent à savoir l'ubiquinone (Coenzyme Q) et le cytochrome c. Les autres éléments clés intervenant sont le NADH et les électrons en provenant, les protons, le dioxygène (O_2), l'eau (H_2O), l'ADP et le P_i .

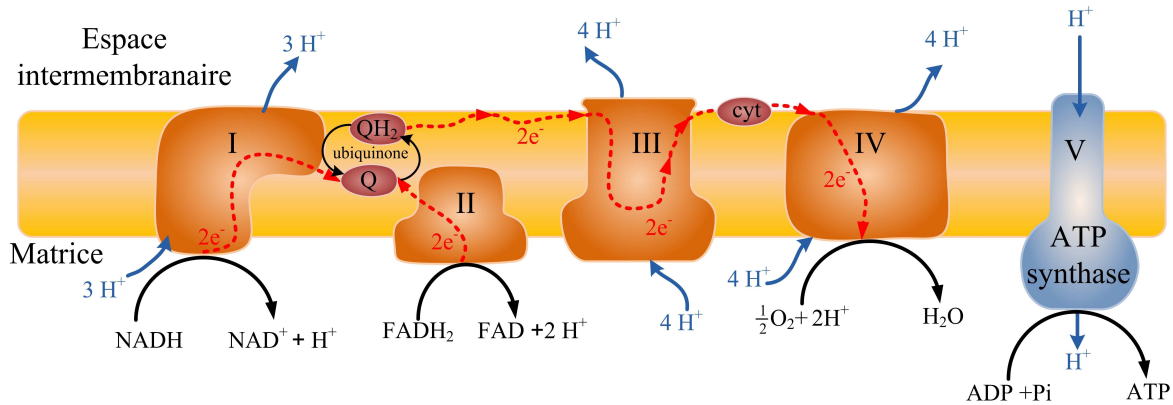


Figure I.4 : Représentation schématique de la phosphorylation oxydative. La chaîne de transport des électrons génère un gradient de protons qui est utilisé pour synthétiser l'ATP.

Le processus de la phosphorylation oxydative représenté sur la figure (I.4) peut être décrit de la façon suivante:

- Deux électrons sont initialement cédés du NADH au complexe I (NADH-Q oxydoréductase), ce transfert étant couplé avec le pompage de deux protons dans l'espace intermembranaire.
- Les deux électrons sont ensuite transférés à l'ubiquinone Q qui se réduit en QH₂. Ce transporteur hydrophobe très mobile transfère ses électrons à la Q-cytochrome c oxydoréductase (complexe III). Ce dernier réduit le cytochrome c (transporteur mobile des électrons), qui est une protéine membranaire périphérique hydrosoluble. Ce transfert est couplé à une libération d'un proton dans l'espace intermembranaire pour chaque électron transporté, sachant que le cytochrome c ne peut transporter qu'un seul électron à chaque fois et le cède au complexe IV (cytochrome c oxydase). Accompagné d'un pompage de protons dans l'espace intermembranaire, ce complexe transfère les électrons à l'O₂, l'accepteur final qui, combiné aux protons et aux électrons, va former H₂O.

La phosphorylation oxydative permet la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et le Pi, cette synthèse étant catalysée par l'ATP synthase grâce à la force-proton motrice générée. La phosphorylation oxydative apparaît donc au final comme un couplage entre respiration cellulaire et formation d'ATP. En effet, la respiration est basée sur le cycle de Krebs où le pyruvate est dégradé en CO₂, tout en produisant (par cycle) une molécule énergétique d'ATP et 4 intermédiaires énergétiques (3 NADH et 1 FADH₂). Cela servira à la production d'ATP dans la chaîne respiratoire comme il a été expliqué ci-dessus.

I.1.6. Quelques définitions

Le rapport de la vitesse spécifique de photophosphorylation ($\bar{J}_{ATP}$) sur la vitesse spécifique de réduction des cofacteurs ($\bar{J}_{NADPH, H^+}$), nommé par commodité ($\bar{J}_{COF}$), est appelé rapport ($P/2e^-$). Il est lié directement au rapport entre les flux cycliques et acycliques de transfert d'électrons:

$$(P/2e^-) = \frac{(\bar{J}_{ATP})}{(\bar{J}_{COF})} \quad (I.3)$$

L'énergétique respiratoire est représentée par le rapport (P/O), défini comme étant le rapport de synthèse d'ATP divisé par le nombre de moles d'oxygène consommé pendant la phosphorylation oxydative:

$$(P/O) = \frac{(n_{ATP})}{(n_{O_2})} \quad (I.4)$$

Tout comme par le rapport ($P/2e^-$), le rapport (P/O) est un élément essentiel dans la représentation et donc la modélisation du métabolisme énergétique des cellules eucaryotes. A noter qu'on utilise également les rapports suivants :

- Le quotient photosynthétique : $Q_P = \frac{(\text{vitesse de production molaire d'O}_2)}{(\text{vitesse de consommation molaire de CO}_2)}$

- Le quotient respiratoire : $Q_R = \frac{(\text{vitesse de production molaire de CO}_2)}{(\text{vitesse de consommation molaire d'O}_2)}$

- QR_{O_2} (*quantum requirement for oxygen production*) représente la quantité de moles de photons nécessaire pour la production d'une mole d'oxygène. La valeur minimale est 8 (valeur théorique), ou en d'autres termes, 8 photons sont nécessaires pour la production d'une molécule de dioxygène. La détermination expérimentale de QR_{O_2} dans les 40 dernières années (surtout dans le cas des microalgues) (Ley and Mauzerall 1982, Ley 1986, Kromkamp et al., 2001) montre néanmoins que ce rapport peut varier entre 8 et 25.

- QR_{CO_2} (*quantum requirement for carbon dioxide fixation*) représente la quantité de photons nécessaire pour fixer une mole de dioxyde de carbone (de façon analogue à QR_{O_2} pour le dioxygène).

I.2. Réponse photosynthétique des microalgues à la lumière

La croissance photosynthétique des microalgues regroupe un ensemble de phénomènes interagissant entre eux. Globalement, elle apparaît directement dépendante de la lumière disponible au sein de la suspension microalgale donnée par l'irradiance G . La dépendance de la réponse photosynthétique à l'irradiance peut être déterminée à partir des expérimentations de mesure de production d'oxygène (Janssen et al., 2003 ; Richmond 2004). Une réponse typique de l'évolution de la réponse photosynthétique exprimée en terme de taux spécifique de production d'oxygène (P_{O_2}) en fonction de l'irradiance reçue par les microalgues est présentée dans la figure (I.5) (adaptée d'après Pruvost 2005). Nous présentons également dans la figure (I.6) une courbe de suivi réel de l'évolution de la production d'oxygène pour la microalgue *C. reinhardtii* (Pottier 2005).

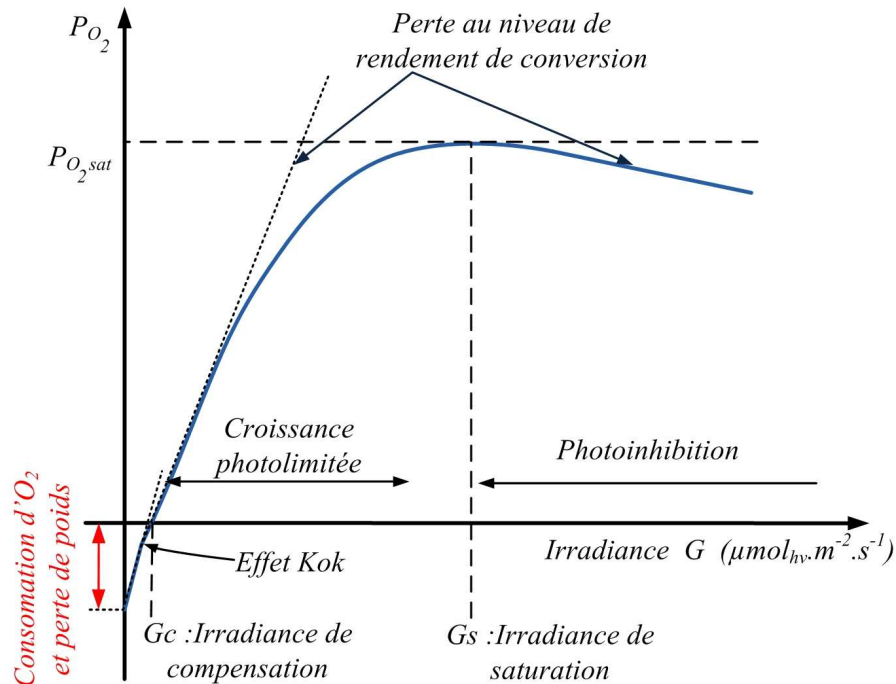


Figure I.5 : Courbe typique de l'évolution de la production d'oxygène d'une microalgue en fonction de l'irradiance G .

La figure (I.5) montre que la relation entre l'oxygène dégagé et l'irradiance reçue est linéaire pour les irradiances supérieures à l'irradiance de compensation (G_c). Cette irradiance de compensation est définie pour une microalgue (eucaryote) comme étant la valeur de l'irradiance pour laquelle un dégagement nul d'oxygène sera observé, en résultat de la production et de la consommation de l'oxygène par contributions respectives de la photosynthèse et de la respiration. Pour une irradiance inférieure à celle de compensation,

le taux d'oxygène consommé par la respiration sera supérieur à la production d'oxygène par photosynthèse, minoritaire dans ces conditions d'éclairement. En augmentant l'irradiance, le dégagement d'oxygène augmentera progressivement jusqu'à atteindre une valeur maximale notée $P_{O_2\text{sat}}$. Pour toute irradiance supérieure à l'irradiance de saturation, une diminution du dégagement d'oxygène sera observée avec l'augmentation de l'irradiance. Ce phénomène, souvent appelé «photoinhibition», est un phénomène complexe qui va engendrer des changements dans la cellule, en particulier au niveau des photosystèmes, ces changements pouvant être réversibles dans le cas où le couple intensité/durée reste modéré.

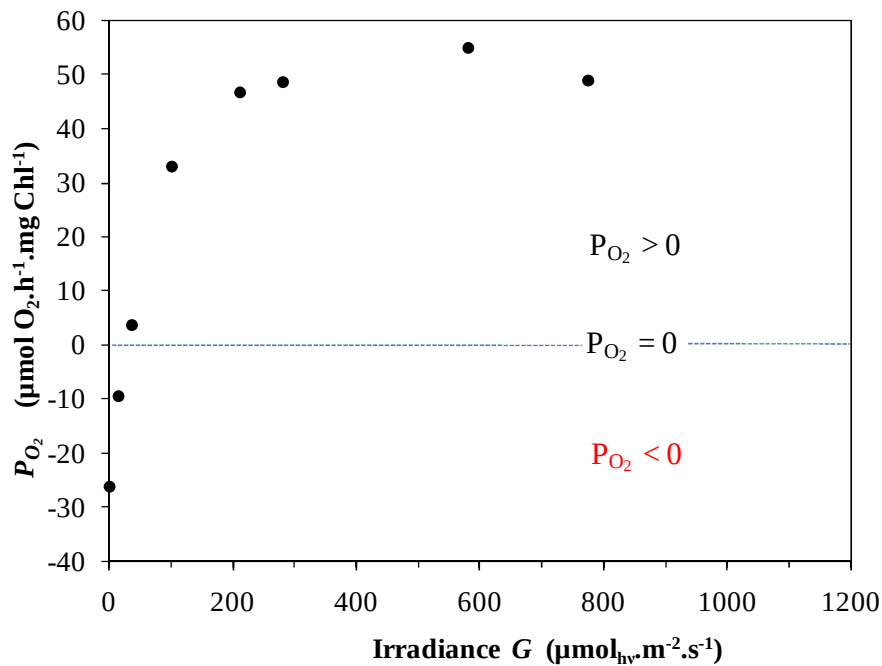


Figure I.6 : Activité photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii* pour une gamme d'irradiance usuellement rencontrée en PBR (données Pottier 2005).

I.3. Systèmes et modes de culture des microalgues en PBR

I.3.1. Systèmes de culture

Dans ce paragraphe, on s'intéressera seulement aux cultures des microalgues en PBR (systèmes fermés). On peut distinguer deux grandes catégories suivant la source lumineuse : les PBR solaires et les PBR à lumière artificielle.

La première catégorie (PBR solaire) est généralement utilisée pour la production en masse, bénéficiant ainsi de la ressource solaire pour la mise en place d'une production industrielle à grande échelle. On citera par exemple les géométries tubulaires utilisés pour les cultures de *Chlorella vulgaris* (alimentation humaine et animale), *Haematococcus pluvialis* (production d'astaxanthine) ou *Arthrospira platensis* (production de biomasse).

Les PBR à lumière artificielle sont utilisés pour des productions à petite échelle. Les différents paramètres (température, pH, agitation etc...) en plus de la lumière peuvent alors être rigoureusement maîtrisés, ce qui rend particulièrement utiles les systèmes en lumière artificielle pour l'étude de la croissance des micro-organismes photosynthétiques et l'optimisation d'un ou plusieurs paramètres.

1.3.2. Modes de culture

Un procédé mettant en œuvre la culture des microalgues autotrophes dans un PBR peut fonctionner sous différents modes. On distingue en particulier le mode discontinu (ou *batch*) et le mode continu.

1.3.2.1. Culture en mode discontinu

Une culture en discontinu est par définition une culture durant laquelle aucun substrat (à l'exception de la lumière, voire le CO₂) sera introduit dans le réacteur. C'est le mode le plus courant dans la culture des microalgues (Richmond 2004). Une quantité définie du milieu de culture et de l'inoculum est injectée dans l'enceinte de culture, où les cellules seront incubées dans des conditions environnementales favorables. Les cultures en mode discontinu sont largement utilisées pour la production commerciale des microalgues, de par la facilité de leur mode opératoire et la simplicité des systèmes de cultures nécessaires.

1.3.2.2. Culture en Continu

Dans le cas des cultures en mode continu, le réacteur sera alimenté en permanence par du milieu neuf contenant les nutriments. Cela nécessite d'effectuer un soutirage afin de garder un volume constant dans le PBR. Bien que ce mode de culture paraisse très intéressant puisqu'il demande moins de main d'œuvre (ensemencement, nettoyage, stérilisation etc...), il est parfois difficile de le mettre en œuvre car plus complexe techniquement (robustesse du fonctionnement des pompes d'alimentation en milieu neuf, du système de régulation de pH, de la température etc...). Ce mode apporte toutefois l'avantage de mener à un état stable de la biomasse, quantitativement et qualitativement. Ceci se révèle notamment intéressant dans le but d'étudier l'effet d'un facteur limitant particulier.

Dans le mode continu, il existe deux façons d'opérer le procédé: le mode *chemostat* et le mode *turbidostat*. Le premier correspond au mode continu pour lequel le milieu neuf est injecté en permanence avec un débit fixe Q_e (débit imposé par la pompe d'alimentation).

En régime stabilisé (volume réactionnel constant), Q_e est égal au débit de sortie de soutirage Q_s (par trop-plein, ou en utilisant une pompe de soutirage). La concentration en biomasse atteinte à l'équilibre dépend du débit d'alimentation imposé. Le mode *turbidostat* est obtenu par fixation de la concentration en biomasse dans le réacteur alors mesurée en ligne. Le système est pour cela asservi à un pilotage de la pompe d'injection du milieu neuf afin de garder une concentration en biomasse constante par dilution de la culture.

À noter qu'il existe un mode de fonctionnement nommé *fed-batch* durant lequel le réacteur est alimenté en continu ou en intermittence par du milieu neuf contenant un ou plusieurs nutriments avec un soutirage périodique de la biomasse produite dans le réacteur. Ce mode de fonctionnement est parfois utilisé dans l'exploitation commerciale des microalgues (Lee, 1997).

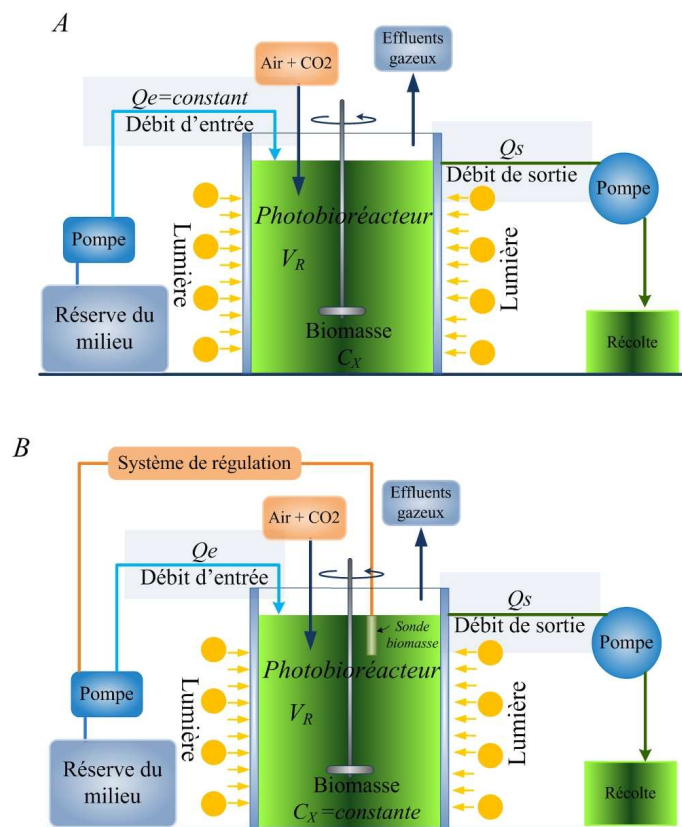


Figure I.7 : Présentation schématique des modes de fonctionnement en continu d'un PBR. A : mode de fonctionnement en *chemostat*, dans ce cas le débit d'entrée est maintenu constant. B : mode de fonctionnement en *turbidostat*, la biomasse est maintenue constante en utilisant une sonde de mesure de biomasse et un système de régulation qui pilote la pompe d'alimentation du milieu neuf (consigne biomasse fixée par l'utilisateur).

La figure (I.7) reprend schématiquement les deux modes de cultures continus. Quelques paramètres importants y sont définis :

- Q_e est le débit d'alimentation en milieu neuf (L/h)
- Q_s est le débit de soutirage de la biomasse (sachant que $Q_e = Q_s$) (L/h)
- V_R est le volume effectif de la suspension algale dans le réacteur (L ou m³)
- C_X est la concentration en biomasse (g/L)
- D est le taux de dilution (taux de renouvellement du milieu) (h⁻¹)
- τ est le temps de résidence (ou temps de passage) (h)

avec :

$$D = \frac{Q_s}{V_R} \qquad \tau = \frac{V_R}{Q_s} = \frac{1}{D} \qquad (I.5)$$

1.3.3. Les différentes géométries de photobioréacteurs

Le potentiel des micro-organismes photosynthétiques, que ce soit pour la production de biomasse, de molécules à haute valeur ajoutée ou de bioénergies, a mis les chercheurs travaillant dans l'ingénierie des PBR devant un défi qu'il faut surmonter. Celui-ci consiste à développer les systèmes de production à différentes échelles (laboratoires, pilotes, exploitation industrielle de grande taille) tout en cherchant toujours une meilleur productivité de leurs systèmes.

Il existe une large diversité de géométries de PBR (Pulz et Scheibenbogen, 1998 ; Tredici, 1999 ; Pultz 2001 ; Carvalho et al., 2006), expliquée par le besoin de maximiser l'apport de lumière (solaire ou artificielle) à la culture. Malgré cette large diversité de conception, les PBR sont généralement divisés en deux grandes catégories, à savoir les réacteurs plats et les réacteurs cylindriques. Pour plus de renseignements sur les géométries existantes, on pourra se référer à Pruvost (2009), Carvalho et al. (2006) et Pulz (2001).

1.4. Modélisation d'un Photobioréacteur

1.4.1. Introduction

Un PBR est un procédé permettant de cultiver des micro-organismes photosynthétiques. La modélisation d'un PBR consiste alors à traduire les interactions physico-biologiques qui y interviennent par des relations mathématiques pour pouvoir, par exemple, prédire l'évolution de la biomasse dans le réacteur en fonction de sa géométrie ou des conditions appliquées.

Comme dit auparavant, dans le cas d'une culture en PBR, la croissance des micro-organismes autotrophes est liée à la photosynthèse qui est fonction de l'irradiance disponible (non homogène dans tout le volume du réacteur). Ceci rend la modélisation des PBR très spécifique. Afin de modéliser un PBR, il faut ainsi idéalement caractériser la distribution locale du champ de rayonnement au sein de la culture puis en déduire la réponse biologique des cellules. Cela permet au final de calculer les performances du PBR.

1.4.2. L'atténuation lumineuse en photobioréacteur

Quelle que soit sa géométrie (tubulaire, rectangulaire) et quelle que soit la source d'éclairement (solaire ou artificielle), un PBR sera le siège d'un gradient de lumière au sein de la suspension microalgale. Ce gradient dû notamment à l'absorption de l'énergie lumineuse capturée par les pigments de la cellule est dépendant de plusieurs facteurs: la géométrie du réacteur, la position de la source lumineuse, les caractéristiques du flux captés (densité hémisphérique du flux incident, part collimaté-diffus du flux, spectre d'émission), et les propriétés optiques du milieu et de la biomasse (fonction de la concentration, de la pigmentation, de la taille et de la forme des cellules).

La figure (I.8) présente un schéma typique de l'atténuation de l'énergie photonique dans un PBR rectangulaire éclairé d'un seul côté. Dans ce cas, l'atténuation a lieu suivant une direction unique appelée profondeur de culture et notée z . Différentes approches sont utilisées pour caractériser cette atténuation dans un PBR, comme la loi de Lambert-Beer (loi simple et fréquemment utilisée), ou des modèles plus complexes de transfert de rayonnement (modèle à deux flux qui sera présenté par la suite).

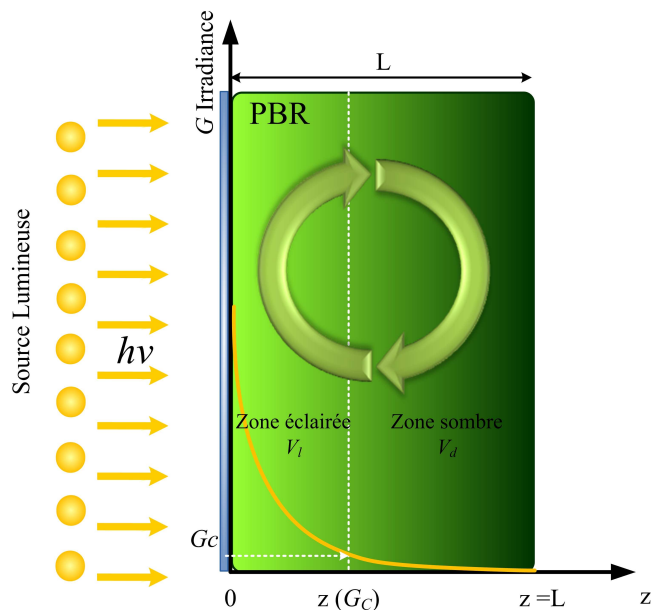


Figure I.8 : Représentation schématique de l'atténuation lumineuse par une culture de micro-organismes photosynthétiques dans un PBR plan éclairé d'un seul côté par une source lumineuse (vue de côté d'un PBR plan d'épaisseur L).

1.4.3. Définition de la fraction volumique éclairée en PBR.

En prenant en considération l'atténuation lumineuse et en partant de la définition du point de compensation pour une microalgue (paragraphe 1.2), le réacteur de volume réactionnel V_R peut être divisé en un volume éclairé V_l et un volume sombre V_d . La fraction volumique éclairée est alors définie comme suit (Cornet 2001, Cornet 2009):

$$\gamma = \frac{V_l}{V_R} \quad (\text{I.6})$$

Comme il sera montré ultérieurement, ce paramètre est essentiel dans la compréhension du fonctionnement du PBR. Il servira notamment comme paramètre de contrôle du régime de fonctionnement d'un PBR (voir chapitre III).

1.4.4. Prédiction du transfert radiatif : modèle à deux flux

Pour modéliser le transfert radiatif dans une suspension microalgale, les phénomènes physiques subits par la lumière doivent être pris en compte, à savoir l'absorption des photons par la pigmentation des micro-organismes, ainsi qu'un autre phénomène aussi important que le premier en culture concentrée (usuellement rencontrée en PBR), à savoir la diffusion de la lumière par les cellules.

Le modèle à deux flux apparaît comme bien adapté dans ce cas, dans la mesure où les deux phénomènes d'absorption et de diffusion de lumière sont pris en compte (Cornet et al., 1995, 1998).

Le modèle à deux flux est obtenu par simplification de l'équation du transfert radiatif. En introduisant l'hypothèse d'une atténuation monodimensionnelle, la propagation de la lumière (pour une longueur d'onde donnée λ) est ainsi considérée seulement suivant l'axe z , dans deux directions opposées (I_λ^+ et I_λ^-) afin de prendre en compte la partie rétrodiffusée du flux lumineux (I_λ^-).

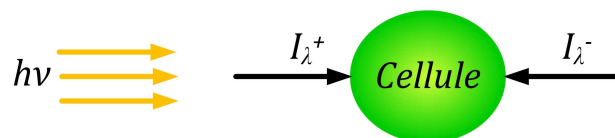


Figure I.9 : Représentation schématique du modèle à deux flux avec le sens de propagation du flux lumineux (I_λ^+) et sa partie rétrodiffusée (I_λ^-).

L'intensité spécifique I_λ permet de définir:

- L'irradiance : $G_\lambda = \iint_{4\pi} I_\lambda d\omega$

- La densité de flux d'énergie radiante $q_\lambda = \iint_{4\pi} I_\lambda \cos \theta d\omega$

où: $d\omega$ est l'angle solide qui définit un faisceau de radiations.

θ l'angle polaire incident.

Dans le cas d'un flux incident normal (perpendiculaire à la surface optique) et d'un champ de rayonnement quasi-collimaté, les équations différentielles à résoudre sont les suivantes :

$$\begin{cases} \frac{dI_\lambda^+}{dz} = -Ea_\lambda \cdot C_X I_\lambda^+ - Es_\lambda \cdot C_X \bar{b}_{2\lambda} (I_\lambda^+ - I_\lambda^-) \\ \frac{dI_\lambda^-}{dz} = Ea_\lambda \cdot C_X I_\lambda^- - Es_\lambda \cdot C_X \bar{b}_{2\lambda} (I_\lambda^+ - I_\lambda^-) \end{cases} \quad (I.7)$$

- où :
- Ea_λ : coefficient d'absorption massique spectrale
 - Es_λ : coefficient de diffusion massique spectrale
 - $\bar{b}_{2\lambda}$: fraction rétrodiffusée du rayonnement
 - C_X : concentration en biomasse dans la culture
 - I_λ^+ : intensité spécifique dans la direction (+)
 - I_λ^- : intensité spécifique dans la direction (-)

La résolution, avec des conditions aux limites appropriées donne l'irradiance $G_\lambda(z)$ pour une profondeur z au sein de la culture:

$$G_\lambda(z) = I_\lambda^+(z) + I_\lambda^-(z) \quad (I.8)$$

Les conditions aux limites dépendent des conditions d'éclairage et de la géométrie du PBR. Dans le cas du réacteur torique ayant une section carrée, une face optique normale au flux incident et une partie en arrière du PBR avec un coefficient de réflectivité ρ (où $\rho=0$ pour un matériau complètement transparent et $\rho=1$ pour une réflexion totale), on obtient les conditions aux limites suivantes :

$$\begin{cases} z=0, & I_\lambda^+ = q_{\lambda,0} \\ z=L, & I_\lambda^- = \rho I_\lambda^+ \end{cases} \quad (I.9)$$

(avec $q_{\lambda,0}$ le flux incident et L la profondeur du réacteur).

Prenant compte de ces conditions aux limites et de l'hypothèse d'un flux incident quasi-collimaté dans le modèle à deux flux, l'expression analytique de l'irradiance spectrale $G_\lambda(z)$ est donnée par (Pottier et al., 2005):

$$\frac{G_\lambda(z)}{q_{\lambda,0}} = \frac{2[\rho(1+\alpha_\lambda)\exp(-\delta_\lambda L) - (1-\alpha_\lambda)\exp(-\delta_\lambda L)]\exp(\delta_\lambda z) + [(1+\alpha_\lambda)\exp(\delta_\lambda L) - \rho(1-\alpha_\lambda)\exp(\delta_\lambda L)]\exp(-\delta_\lambda z)}{(1+\alpha_\lambda)^2 \exp(\delta_\lambda L) - (1-\alpha_\lambda)^2 \exp(-\delta_\lambda L) - \rho(1-\alpha_\lambda^2)\exp(\delta_\lambda L) + \rho(1-\alpha_\lambda^2)\exp(-\delta_\lambda L)} \quad (\text{I.10})$$

avec : $\delta_{2\lambda} = C_X \sqrt{Ea_\lambda(Ea_\lambda + 2\bar{b}_{2\lambda}Es_\lambda)}$, le coefficient d'extinction,

et $\alpha_{2\lambda} = \sqrt{\frac{Ea_\lambda}{Ea_\lambda + 2\bar{b}_{2\lambda}Es_\lambda}}$, le module de diffusion linéaire.

En connaissant la teneur en pigments de la microalgue cultivée en PBR et sa distribution de taille, les propriétés radiatives Ea_λ , Es_λ et $\bar{b}_{2\lambda}$ peuvent être déterminées théoriquement d'une façon totalement prédictive en utilisant la théorie de Lorenz-Mie et l'approximation de diffraction anormale (Van de Hulst, 1981; Cornet, 2007).

Il faut indiquer que des comparaisons entre les profils d'atténuation obtenues théoriquement en utilisant le modèle à deux flux et ceux mesurés expérimentalement ont montré que le modèle prédictif proposé par Pottier et al. (2005) prédit correctement le profil d'irradiance dans le PBR torique qui sera utilisé dans cette étude.

On notera également que les équations sont données ici pour une longueur d'onde λ . Si le spectre de lumière est polychromatique, les équations peuvent être intégrées sur un spectre donné. Il est également possible de travailler en longueur d'onde moyenne, ce qui réduit les temps de calcul (Pottier et al., 2005).

1.4.5. Modélisation de la croissance photosynthétique

1.4.5.1. Modèles cinétiques existants

Dans la littérature, plusieurs modèles cinétiques ont été proposés pour décrire la croissance des micro-organismes photosynthétiques (Aiba, 1982; Muller-Feuga 1999). Ces modèles cinétiques peuvent être regroupés en deux catégories à savoir les modèles de représentation et les modèles de connaissance.

Les modèles dits de représentation sont simples d'utilisation mais sont basés sur quelques paramètres globaux pas forcément reliés à des phénomènes biologiques identifiés dans la cellule. Ces modèles reposent souvent sur une relation mathématique simple (de type hyperbolique, exponentielle, ...) qui nécessite un calage des paramètres y figurant en se

basant sur les essais expérimentaux. Ce type d'approche a donc des limites évidentes si on cherche une représentativité importante (constantes à réajuster). Citons parmi les modèles de représentation les plus utilisés :

- **Le modèle de Monod (1942)**: ce modèle est couramment appliqué dans le cas de la croissance de cultures bactériennes pour relier la population à une ressource limitante. Pour les micro-organismes photosynthétiques, la loi est utilisée sous la forme suivante :

$$\mu = \mu_{max} \frac{G}{K_G + G} \quad (I.11)$$

- où :
- μ est la vitesse spécifique de croissance
 - μ_{max} est la vitesse spécifique maximale de croissance
 - G est l'irradiance à l'intérieur du réacteur
 - K_G est la constante de demi-saturation (traduit l'affinité du micro-organisme pour le substrat G).

- **Modèle de Andrews-Haldane (1968)** : Cette formulation permet de prendre en compte l'effet inhibiteur du substrat limitant lorsque ce dernier est en excès. Cette loi a été utilisée par plusieurs auteurs pour les microalgues sujettes à la photoinhibition (Aiba 1982 ; Molina Grima et al., 1996; Pruvost et al., 2008 ; Fouchard et al., 2009). Elle est donnée par:

$$\mu(G) = \mu_{max} \frac{G}{G + K_I + \frac{G^2}{K_{II}}} - \mu_s \quad (I.12)$$

où :

K_I est la constante de saturation ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

K_{II} est la constante d'inhibition ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Le terme μ_s correspond à la respiration, souvent considérée comme constante.

Ces modèles, couramment employés, reposent sur une formulation d'un taux spécifique de croissance μ , qui d'après Cornet (2007), représente « une erreur structurelle » car s'il possède une signification physiologique bien établie pour les micro-organismes aérobies, ce n'est pas le cas pour les micro-organismes photosynthétiques. On notera également qu'il convient de bien formuler le substrat, ici l'irradiance G . Pour simplification, une grandeur moyenne G_{moy} est souvent employée (irradiance moyennée sur le volume du réacteur). Comme il sera largement montré par la suite, ce raisonnement ne peut mener à une

représentation correcte du fonctionnement d'un PBR (sauf à ajuster les paramètres cinétiques en conséquence). Pour plus de précision, les valeurs locales de l'irradiance au sein de la culture doivent être employées (Pottier et al., 2005 ; Pruvost et al., 2008 ; Fouchard et al., 2009).

1.4.5.2. L'analyse des flux métaboliques

Récemment, des approches plus poussées ont été proposées pour présenter la croissance photosynthétique, comme par exemple celles basées sur l'analyse des flux métaboliques, ou sur la thermodynamique des processus irréversibles. Dans l'analyse des flux métaboliques, une approche biochimiquement structurée permet d'évaluer les vitesses de fonctionnement des différentes réactions constituant le réseau métabolique. Ceci permet de caractériser l'état physiologique d'un micro-organisme en culture dans un milieu contrôlé. Citons notamment les travaux de Cogne et al. (2003) dans lesquels un réseau métabolique pour la croissance en autotrophie de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* a été proposé. Ce réseau métabolique comprend 121 réactions et 134 métabolites en incluant la synthèse de la biomasse, la production d'un exopolysaccharide (EPS) associé à la croissance, et les aspects liés à l'énergétique cellulaire.

1.4.5.3. L'approche TPI (Thermodynamique des Processus Irréversibles)

La thermodynamique des processus irréversibles est une approche originale dont les applications dans la modélisation des systèmes biologiques est assez récente. Elle a été notamment mise en œuvre dans le cadre des métabolismes aérobies conventionnels (bactéries, mitochondries) par Stucki (1978) et Dussap (1988). Cette approche a également permis d'établir un modèle de croissance de micro-organismes photosynthétiques en PBR, par une analyse énergétique du schéma en Z de la photosynthèse (Cornet 2007). Cette méthode présente l'avantage d'être totalement prédictive mais elle nécessite un très lourd investissement théorique. Cornet et al. (2003) l'ont déjà appliquée chez la bactérie *Rhodospirillaceae* pour des cultures photohétérotrophes, ainsi que Cornet et Dussap (2009) pour des cultures autotrophes de la cyanobactérie *Arthrospira platensis*. Pour ce dernier cas, le modèle mis en place a permis de valider les résultats obtenus dans différentes géométries de PBR, et pour différentes conditions de croissance (discontinues, continues, semi continues).

Ce type de modèle de connaissance, pour lequel la formulation du couplage sera basée sur les rendements énergétiques introduisant des paramètres liés au processus de la

photosynthèse, a été adopté pendant ce travail. Il sera présenté plus en détails dans le chapitre IV.

1.5. Étude du couplage hydrodynamiques/conversion photosynthétique en PBR

1.5.1. Mise en circulation des cultures photo-autotrophes

À l'exception des applications pour lesquelles les cellules sont immobilisées et capables de pousser sur substrat solide, les micro-organismes photo-autotrophes sont mis en circulation afin d'éviter leur décantation au fond du réacteur ou la formation de biofilms. La mise en circulation des cellules dans le PBR est également importante au niveau des transferts, comme le transfert gaz/liquide et le transfert des nutriments entre les cellules et le milieu de culture. On notera cependant que les conditions hydrodynamiques pourront avoir un impact direct sur la vitalité des cellules fragiles aux cisaillements générés par l'agitation. Certains micro-organismes photosynthétiques sont en effet très sensibles aux forts cisaillements, et les conditions hydrodynamiques seront alors un paramètre critique (Barbosa et al., 2004; Sanchez Miron et al., 2003; Wu et Merchuk, 2002). Finalement, comme il sera repris ensuite, le mélange hydrodynamique peut améliorer l'accès à la lumière des cellules (Pulz et al., 1998).

1.5.2. Différents modes de circulation en PBR

La plupart des PBR sont agités par injection d'air (un exemple est donné sur la figure (1.10)). Dans le PBR, le mélange de la suspension microalgale est assuré par une circulation due à la différence de poids de colonne de fluide de part et d'autre de la paroi interne. Le fluide se met alors en mouvement, provoquant ainsi une mise en circulation globale (principe *air-lift*).

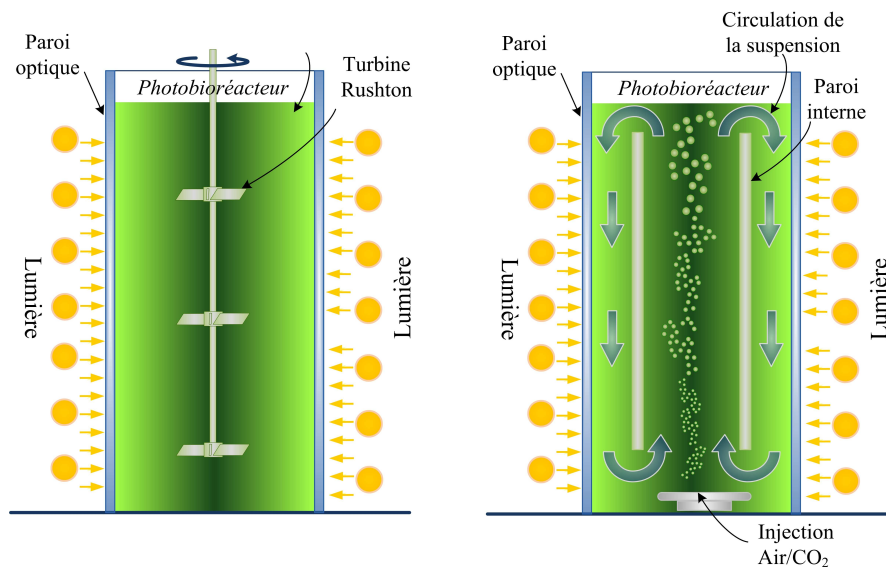


Figure 1.10 : Principe de fonctionnement d'un réacteur *air-lift* (PBR à droite). Le PBR à gauche présente une coupe transversale d'un PBR cylindrique à chambre annulaire éclairée radialement.

Il existe d'autres systèmes de mise en circulation par agitation mécanique (hélice marine, turbine à disque Rushton etc...). L'agitation mécanique est souvent rencontrée dans le cas des petits volumes, surtout dans des applications à l'échelle laboratoire.

1.5.3. Les régimes fluctuants de lumière générés par l'hydrodynamique (ou L/D cycles)

Un PBR est toujours caractérisé par un champ de rayonnement hétérogène dû à l'absorption et la diffusion de la lumière par les cellules en suspension. Les cellules auprès de la paroi optique (la face exposée à la source lumineuse) sont donc soumises à une forte intensité tandis que celles au fond de la culture reçoivent une faible lumière, voire sont à l'obscurité totale si la culture est très concentrée (Phillips et al., 1954). Du fait de la mise en circulation et du déplacement généré suivant le gradient de lumière, les cellules reçoivent donc des fluctuations de lumière en passant d'une zone à l'autre (voir figure I.8 pour une représentation schématique de l'atténuation de lumière en PBR et la présence des deux zones éclairée et sombre). Ce régime fluctuant de lumière, rencontré dans tout PBR ayant une zone sombre, a été largement décrit dans la littérature (Burlew, 1953, Grobbelaar et al., 1996 ; Richmond 2004 ; Janssen et al., 1999, 2001). Il est connu sous le nom de cycles de lumière /obscurité ou *Light/Dark cycles*, (nommé souvent *L/D cycles*).

Dans le cas des micro-organismes procaryotes, ayant la même chaîne de transporteur d'électrons, ce phénomène ne joue pas un rôle très important dans l'exploitation biologique de la lumière. Gonzalez de la Vara et Gomez-Lojero, (1986) ont ainsi montré dans leurs travaux que la respiration s'inhibe à la lumière dans le cas des cyanobactéries (*Spirulina maxima*). Le temps nécessaire pour que la respiration se mette en place quand les cellules passent de la lumière à l'obscurité est d'une minute environ (Cornet, 1992). Le régime fluctuant de lumière n'aura donc pas d'effet dans le cas des micro-organismes procaryotes, sauf si le temps de résidence dans la zone sombre est supérieur à une minute (environ).

Par contre, dans le cas des microalgues (eucaryotes) où la cellule possède deux chaînes de transporteurs d'électrons du fait de l'existence simultanée des processus de photosynthèse et de respiration, un régime d'éclairement fluctuant sera susceptible d'altérer la conversion photosynthétique instantanée du micro-organisme photosynthétique en jouant par exemple sur les processus de photosynthèse et de respiration. Il n'est toutefois pas aisé de démontrer expérimentalement l'effet des cycles *L/D* dans un PBR. La difficulté provient du fait que pour un régime de lumière donné, si on essaie de modifier les conditions hydrodynamiques (par augmentation de la vitesse d'agitation par exemple), d'un côté on favorisera les

phénomènes de transfert (effet positif), et d'un autre côté on augmentera les contraintes de cisaillements (effet négatif). En plus de ces deux effets, si un couplage hydrodynamique avec la conversion photosynthétique existe, alors la biomasse variera ce qui changera le gradient de lumière et par suite, les cycles L/D . Le découplage de l'ensemble des effets générés par un simple changement hydrodynamique est donc quasi impossible expérimentalement. De plus, ces cycles de lumière/obscurité sont caractérisés par des fréquences et des amplitudes, avec des valeurs rarement définies avec précision en PBR du fait de la dépendance de ces cycles à la fois à l'écoulement et au champ du rayonnement, chacun étant un problème en soi à résoudre. Toutes ces raisons expliquent pourquoi dans la littérature, les effets de l'écoulement en PBR sur la croissance sont étudiés le plus souvent d'une façon empirique.

1.5.4. Effet d'un régime fluctuant de lumière sur la croissance photosynthétique

L'étude de l'effet de la lumière intermittente sur la conversion photosynthétique a débuté avec Brown et Escombe en 1905 sur les feuilles des plantes supérieures, où les auteurs ont utilisé une source de lumière avec un disque rotatif ayant un secteur permettant le passage de la lumière. Ils ont constaté qu'avec une lumière intermittente de 25% en moins par rapport à une lumière continue, le taux de la photosynthèse restait inchangé. La quantité de dioxyde de carbone réduit a permis de montrer une amélioration de la conversion photosynthétique par rapport à des expérimentations en lumière continue. Une autre étude menée sur *Chlorella* par Warburg (1919 et 1920), dans laquelle un disque rotatif à moitié plein et permettant de générer des cycles de lumière/obscurité de même durée et avec des fréquences dépendantes de la vitesse de rotation du disque, a montré que le quotient photosynthétique dépendait de la fréquence de la lumière intermittente et que celui-ci augmentait de 10% pour une fréquence de 0.0667 Hz (un temps de cycle de 15 secondes) et de 100% pour une fréquence de 133 Hz (un temps de cycle de 7.5 millisecondes) par comparaison à une lumière continue.

Les études sur l'effet d'un régime fluctuant de lumière sur la croissance des microalgues (*Chlorella pyrenoidosa*) se sont poursuivies avec Emerson et Arnold (1932) et avec Weller et Frack (1941), et ensuite avec Rieke et Gaffron (1942) sur la microalgue *Scenedesmus*. Dans les trois études, il a été démontré que l'utilisation des flashes de lumière à forte intensité conduit à une meilleure exploitation si ces flashes sont séparés par des périodes sombres d'une fréquence adéquate. Ce phénomène, observé pour des fréquences rapides des flashes (10 Hz voire plus) a été appelé le «*flashing light effect*». L'effet supposé

se situe ici par une interaction directe entre le mécanisme de captation, le transfert dans les antennes et la conversion primaire au niveau de la chaîne photosynthétique (dynamique du schéma en Z). Il a été supposé par ces auteurs qu'une forte turbulence dans la culture, où les cellules seront exposées à des alternances de périodes à forte lumière près de la paroi optique et de périodes sombres en fond de culture, pourra avoir le même effet que ces flashes de lumière.

L'étude des effets d'un régime fluctuant de lumière sur la conversion photosynthétique a connu une évolution marquante avec les travaux de Terry (1986). D'après Terry, il existe deux réponses idéales des micro-organismes photosynthétiques à un régime fluctuant de lumière :

- la première réponse, nommée « réponse sans intégration » (*no integration*, d'après Terry), suppose que la conversion photosynthétique de la lumière reçue par la cellule pendant la phase éclairée est instantanée et que chaque photon est utilisé avec le même rendement comparé à un éclairage continu. Dans ce cas, on suppose que les fluctuations de lumière seront donc « vues » par chaque cellule avec un temps de réponse instantané.

- la deuxième réponse suppose que l'appareil photosynthétique ne répond pas dynamiquement aux fluctuations de lumière qui ne seront donc pas « vues » par le micro-organisme photosynthétique. La croissance sera le résultat de la quantité moyenne d'énergie lumineuse reçue par la cellule. La réponse est alors avec intégration temporelle complète (*full integration*, d'après Terry). Dans ce cas, le temps de réponse biologique sera donc infini.

Même s'il est possible que des micro-organismes présentent l'une ou l'autre de ces réponses, il est également possible que certains auront une réponse réelle intermédiaire. Cette réponse, qui sera discutée dans le dernier chapitre, suppose la présence d'un certain temps d'activation et de désactivation de la chaîne photosynthétique lorsque la cellule est soumise à des cycles intermittents de lumière/obscurité. On dira alors qu'il y a intégration partielle.

Janssen et al., 1999 et 2000 ont également étudié l'effet des cycles de lumière/obscurité sur la croissance de différents espèces de microalgues (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana* et *Dunaliella tertiolecta*) et pour des *L/D cycles* de durée moyenne (13-87 secondes, 6-25 secondes ; 15s). L'originalité de ces travaux provient de la durée des cycles de lumière/obscurité appliqués qui sont dans le même ordre de grandeur que les cycles réels rencontrés en PBR. Les auteurs ont montré que les effets des cycles appliqués dépendent

fortement de la microalgue cultivée (ceci sera discuté plus en détails dans le dernier chapitre).

Wu et Merchuk (2001) ont également étudié l'effet de cycles L/D en utilisant un réacteur partiellement couvert (par du papier aluminium). Dans leurs travaux, la croissance de *Porphyridium sp.* a été étudiée pour différentes valeurs de la densité de flux incidente (110, 220 et 550 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), montrant également un effet pour certaines périodes d'éclairement, en particulier avec des flux incidents élevés générant une photoinhibition de l'appareil photosynthétique. Les auteurs ont de plus essayé de modéliser la croissance des microalgues par un modèle dynamique. Pour cela, les auteurs se sont servis du modèle à trois états de Eilers et Peeters (1998) dont les paramètres ont été identifiés suite à leurs expérimentations. Ce modèle a ensuite été étendu à la prise en compte de l'effet hydrodynamique dans un PBR air-lift.

1.5.5. Effet de l'hydrodynamique sur la conversion photosynthétique en PBR

La caractérisation du régime fluctuant de lumière rencontré en PBR est un problème complexe, qui nécessite de prendre en compte à la fois l'hydrodynamique dans le PBR et le transfert de rayonnement. Une méthode complète est discutée dans Pruvost et al. (2008) qui a appliqué une approche Lagrangienne pour prédire les trajectoires, et donc les cycles d'éclairement subis par des cellules en circulation dans un PBR (plus de détails seront donnés dans le chapitre V). Les effets d'un potentiel couplage hydrodynamique/conversion peuvent être considérés de deux types :

- Le premier effet est dit global et est induit par le mélange non-idéal dans le PBR. Il est lié au gradient de lumière et à la nature locale de la réponse photosynthétique des micro-organismes. Ainsi, une modification dans les conditions de mélange peut entraîner une modification dans le temps de résidence des cellules dans différentes zones du PBR, influençant la croissance résultante dans le PBR en privilégiant par exemple une croissance dans les zones éclairées. Bien qu'il était discuté par certains auteurs (Luo et Al-Dahhan, 2004), cet effet ne peut en réalité exister. Pruvost et al. (2008) ont en effet montré que cela induisait une modification des conditions de transfert de rayonnement dans la culture, contrebalançant exactement cet effet supposé.
- L'autre type d'effet est dynamique. Il est donc lié aux cycles de lumière/obscurité (L/D cycles). Cela comporte différentes réponses spécifiques:

1. Interaction avec le mécanisme primaire de captation de transfert dans la chaîne photosynthétique. Il s'agit ici du « *flashing light effect* » intervenant à des fréquences élevées de 10 Hz ou plus (interaction directe avec le schéma en Z).
2. Limitation de la « photoinhibition » par réduction des périodes d'exposition à forte irradiance (photoinhibition sur courte période) (Wu et Merchuk (2001))
3. Interaction avec le métabolisme énergétique général de l'algue (Cornet 2007).

Les deux premiers ont été discutés dans les paragraphes précédents, quant au dernier effet, il est repris dans le paragraphe suivant.

1.5.6. Interaction des cycles L/D avec le métabolisme énergétique

Si on suppose que les passages successifs de chaque cellule dans les différentes profondeurs de culture peuvent avoir un impact sur la conversion photosynthétique, alors l'hydrodynamique peut conduire à une modification de la lumière effectivement utilisée pour la croissance. D'une façon simple et conventionnelle, on considère que le couplage entre un écoulement et une vitesse de réaction peut se produire si les deux phénomènes présentent des constantes de temps du même ordre de grandeur (Cornet 2007).

Processus dynamique considéré au sein du métabolisme	$Da_I = \frac{\tau_{\text{advection}}}{\tau_{\text{réaction}}}$	Phénomène qui gouverne le procédé
Vitesse de croissance de la biomasse	10^{-5}	réaction
Échelle de temps minimum pour l'utilisation de la thermodynamique phénoménologique linéaire	10^{-3}	réaction
Chaînes de transporteurs d'électrons. Pools ATP et NAD(P)/NAD(P)H ₂ et leur couplage photosynthèse/respiration	1	couplage
Étape limitant du transfert d'excitations dans les Unités photosynthétiques	10^6	hydrodynamique
Photolyse de l'eau au photosystème II (production d'O ₂)	10^{11}	hydrodynamique

Tableau I.1 : Ordres de grandeurs des nombres de Damköhler rencontrés en PBR pour différents processus dynamiques du métabolisme (ces valeurs sont pour des cuves agitées ; des estimations plus précises peuvent être réalisées pour un type et une géométrie de réacteur donnés, et pour le phénomène caractérisant l'étape limitante qui gouverne donc le procédé (D'après Cornet 2007).

À partir de ce raisonnement, Cornet (2007) a présenté une analyse détaillée basée sur l'utilisation du nombre de Damköhler généralisé Da_I défini comme le rapport des temps caractéristiques de l'advection sur celui de la réaction. Le tableau (I.1) présente une estimation des nombres de Damköhler en réacteur agité mécaniquement et différentes

étapes caractéristiques du métabolisme photosynthétique. Un couplage hydrodynamique peut se produire si le nombre de Damköhler est environ égal à 1 (en pratique une fourchette entre 0.1 et 20 est plus souvent mentionnée). Ainsi, si un couplage hydrodynamique/conversion photosynthétique existe, il devrait concerner les chaînes de transporteurs d'électrons et les métabolites énergétiques associés (ATP et nucléotides cofacteurs) qui servent notamment à définir le rendement quantique. Il s'agirait alors de phénomènes dynamiques au niveau des membranes des thylacoïdes ou des chloroplastes (voire des mitochondries en respiration) qui peuvent se produire à l'occasion de passages lumière/obscurité avec une constante de temps fixée à la fois par l'hydrodynamique et le degré de limitation physique par le transfert de rayonnement.

1.6. Conclusion sur le couplage hydrodynamique/conversion photosynthétique

Les différents travaux menés sur le sujet montrent que la résolution d'un tel problème reste très difficile, vu le peu de connaissances de chacun des effets qui le constituent, et compte-tenu de la confusion courante entre conditions de culture en masse en PBR et les conditions classiques de croissance (cultures diluées). La majeure partie des expérimentations de la littérature est en effet obtenue dans ces dernières conditions. Or, comme il sera montré dans ce mémoire, la mise en culture diluée amène à un comportement du PBR très différent des cultures denses qui sont privilégiées en conditions classiques de production.

Dans tous les cas, si un couplage existe entre hydrodynamique et conversion photosynthétique, il nécessite de développer des modèles dynamiques spécifiques, en vue d'optimiser les conditions de production à cet égard. L'établissement d'un tel modèle passe par une caractérisation expérimentale précise des effets dynamiques d'éclairement sur les performances cinétiques des cultures de microalgues. Ceci constitue un des objectifs du travail présenté dans ce mémoire et sera détaillé dans le dernier chapitre.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Résumé:

Ce chapitre présente l'ensemble des dispositifs (matériels, protocoles) utilisés lors des expérimentations effectuées durant cette étude. Il est consacré à la présentation du photobioréacteur et du système d'éclairage ainsi que de la souche et du milieu de culture.

La vérification de la fiabilité du panneau de Diodes Électroluminescentes (DEL) a été effectuée par deux méthodes, l'une qualitative (Analyse d'images) et l'autre quantitative (Actinométrie), permettant ainsi de valider le dispositif pour imposer des créneaux de lumière maîtrisés en intensité et fréquence pour l'étude des régimes fluctuants sur la croissance photosynthétique.

Enfin, une partie de ce chapitre décrit les méthodes générales de caractérisation et de suivi de culture.

II. Matériel et Méthodes

II.1. Microalgue d'étude

La souche utilisée durant cette étude est la souche sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii* (référéncée 137AH) provenant du Laboratoire de Thomas Happe d'Allemagne (numéro de collection CC124), et fournie par le Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues (LB3M) du Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) de Cadarache, France.

II.1.1. Entretien de la souche dans des conditions axéniques

Cette souche est conservée dans de l'azote liquide au LB3M du CEA. Durant les expérimentations, les précultures sont entretenues au laboratoire GEPEA en conditions axéniques sur des boîtes de Pétri en milieu TAP (Tris-Acétate-Phosphate) (Harris 1989). Ces boîtes ont été conservées dans un incubateur réfrigéré d'entretien de souche (FIRLABO ICFI, France) à 4°C et à faible éclairage ($\sim 40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Un repiquage a été réalisé tous les mois, afin de minimiser les risques de dérive génétique.

Dans le cas de *Chlamydomonas reinhardtii* (et éventuellement toute autre souche), les expérimentations ont montré que plusieurs repiquages en fiole Erlenmeyer (au moins 4) sont nécessaires pour adapter la souche aux nouvelles conditions de culture en milieu liquide (phase d'adaptation pour le passage du milieu solide sur boîte au milieu liquide en fiole Erlenmeyer). La souche a alors été cultivée dans des fioles Erlenmeyer de 500 ml contenant du milieu TAP. Les précultures sont repiquées toutes les semaines (en fin de la phase exponentielle de croissance) de façon à avoir en permanence du matériel biologique ayant des états physiologiques les plus équivalents possibles pour l'ensemencement du réacteur. Ces précultures sont placées à 25°C dans un incubateur Innova 44 (New Brunswick Scientific), et reçoivent une lumière continue d'environ $100 \mu\text{mol}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

II.1.2. Milieu de culture

II.1.2.1. En préculture

Le milieu TAP (milieu hétérotrophe classique) a été utilisé pour la culture et les repiquages de *C. reinhardtii* en fiole Erlenmeyer. Ce milieu a la composition suivante (en g.L⁻¹) (Harris 1989): NH₄Cl, 0.4; MgSO₄.7H₂O, 0.1; CaCl₂.2H₂O, 0.05; KH₂PO₄, 0.056; K₂HPO₄, 0.108 : 2.42 Tris-Base et 1 ml d'acide acétique glacial (99%) et 1 ml de la solution Hutner (éléments traces).

II.1.2.1. En réacteur

Le milieu autotrophe adopté pour la culture en réacteur présente l'avantage de ne contenir aucun élément organique et d'être complètement reconstitué à partir d'eau osmosée et de sels minéraux. Les concentrations des sels minéraux dans ce milieu permettent d'atteindre une biomasse de 2 g.L⁻¹ (en dessous, aucune limitation par les nutriments n'est rencontrée dans le réacteur, et donc seule la lumière est le substrat limitant). La composition du milieu autotrophe (en g/l) est la suivante : NH₄Cl, 1.45; MgSO₄.7H₂O, 0.281; CaCl₂.2H₂O, 0.05; KH₂PO₄, 0.609; NaHCO₃ 1.68 et 1 mL de la solution Hutner.

** A noter que les précultures préparées sur du milieu TAP ont été transvasées dans des godets de centrifugation stériles sous une hotte à flux laminaire. Ensuite, les godets ont été centrifugés à 2000 rpm à 25°C pendant 5 minutes dans une centrifugeuse SOVRALL RC6PLUS (Thermo Electron corporation). Le culot est resuspendu dans du milieu autotrophe (dans des conditions axéniques), et il servira à ensemercer le PBR.*

II.2. Cultures en conditions contrôlées

II.2.1. Description du Photobioreacteur

Les cultures ont été menées dans le PBR torique développé au sein du laboratoire GEPEA. Ce PBR a fait l'objet de plusieurs études théoriques (Pruvost et al., 2004 a&b ; Pruvost et al., 2006) montrant son intérêt notamment au niveau de la maîtrise des conditions de transfert de rayonnement et de l'hydrodynamique. Ce PBR a déjà servi au laboratoire GEPEA en particulier pour l'étude des voies de production d'hydrogène chez *C. reinhardtii* (thèse de S. Fouchard 2006, et thèse de B. Degrenne 2009).

Le réacteur est en inox (type 316L), sauf pour la face avant faite de matériau transparent (polycarbonate) pour l'apport de lumière dans le PBR. Le réacteur fait 1.5 L de volume avec une section carrée de 4 cm de côté, ce qui permet de le modéliser comme un réacteur plan avec une profondeur $L=4$ cm et présentant une atténuation de lumière

monodirectionnelle (le flux incident étant perpendiculaire à la face optique plane). La surface spécifique éclairée du réacteur définie par le ratio de la surface éclairée sur le volume total de culture est nommée a_{light} . Elle est donnée par :

$$a_{light} = \frac{\text{Surface éclairée}}{\text{Volume réactionnel du réacteur}} = \frac{S_{light}}{V_R} = \frac{1}{L} = 25\text{m}^{-1} \quad (\text{II.1})$$

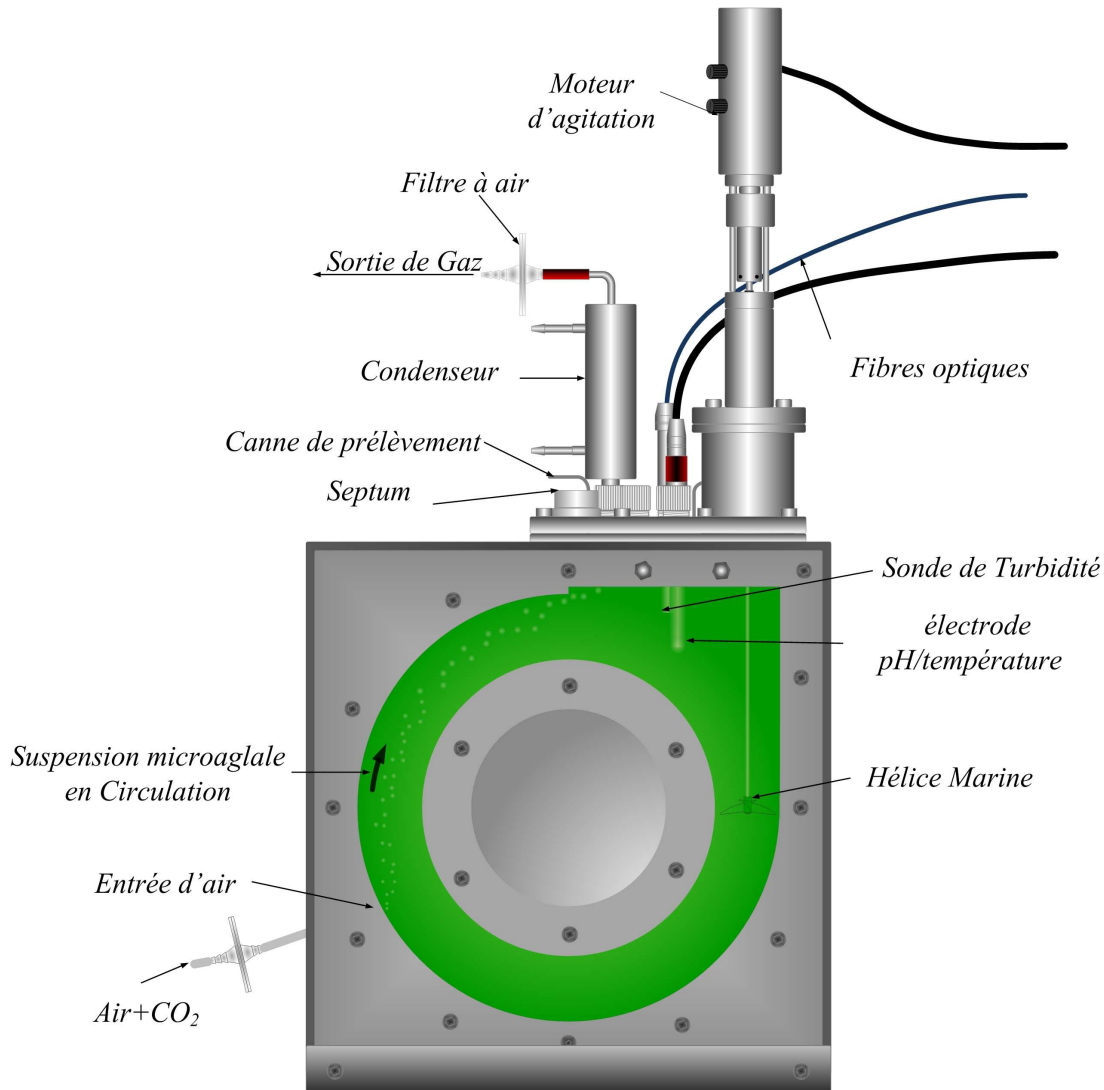


Figure II.1 : Schéma du réacteur torique utilisé au cours de cette étude.

Sur la platine supérieure en inox, différents piquages permettent de recevoir des sondes et des canules afin de contrôler les paramètres de culture (pH, température) et de mener des cultures en mode continu (canules injection et soutirage) ainsi que pour faire les prélèvements nécessaires pour le dosage et les analyses. Cette platine supporte :

- une sonde pH / température 3253SG/120/Pt100,
- une sonde de turbidité (InPro 8200/S(H), Mettler Toledo),

- un évent passant à travers un condenseur et isolé par un filtre à gaz (Sartorius 0,22 μM),
- une canne vers une pompe doseuse d'injection du milieu neuf,
- une canne de prélèvement reliée à une pompe péristaltique (Masterflex),
- un septum pour le prélèvement par seringue.

Le contrôle du réacteur est effectué par le logiciel LAbVIEW en utilisant une carte d'acquisition DAQmx. Quelques exemples d'acquisitions pour le suivi PBR sont donnés dans la figure (II.2).

Le pH est régulé par injection de CO_2 gazeux au cours de la culture afin de maintenir des conditions optimales de pH pour la croissance des microalgues et de subvenir aux besoins en carbone dissous (substrat maintenu également non limitant pendant toute cette étude). Ainsi, dès que le pH dépasse la valeur consigne de 7.5, une électrovanne permet l'injection de CO_2 se dissolvant ensuite dans la suspension microalgale, provoquant ainsi une acidification du milieu et donc la régulation du pH.

La température est maintenue à 25°C à l'aide d'un ventilateur (ebmpaspt, 4314 NGN, Allemagne) collé sur la face arrière du réacteur. A noter également que le réacteur est équipé d'une double enveloppe permettant la circulation de liquide provenant d'un cryostat pour la régulation de la température. La double enveloppe est utilisée seulement dans le cas où le refroidissement par le ventilateur est insuffisant (en particulier avec des éclaircissements incidents élevés).

Une sonde de turbidité permet de mener des cultures en *turbidostat* par maintien de la concentration de la suspension microalgale constante, par pilotage d'une pompe doseuse (Stepdos® pump 08/RC, KNF Neuberger) et ajout de milieu nutritif stérile dans le réacteur. Simultanément, une pompe péristaltique (*Masterflex*) tournant en continu et branché à la canne de soutirage permet de recueillir la récolte. En mode *chemostat*, le débit d'alimentation est imposé fixe, sans asservissement à la sonde biomasse (voir la partie I.3.2 du chapitre I pour une description des modes *chemostat* et *turbidostat*).

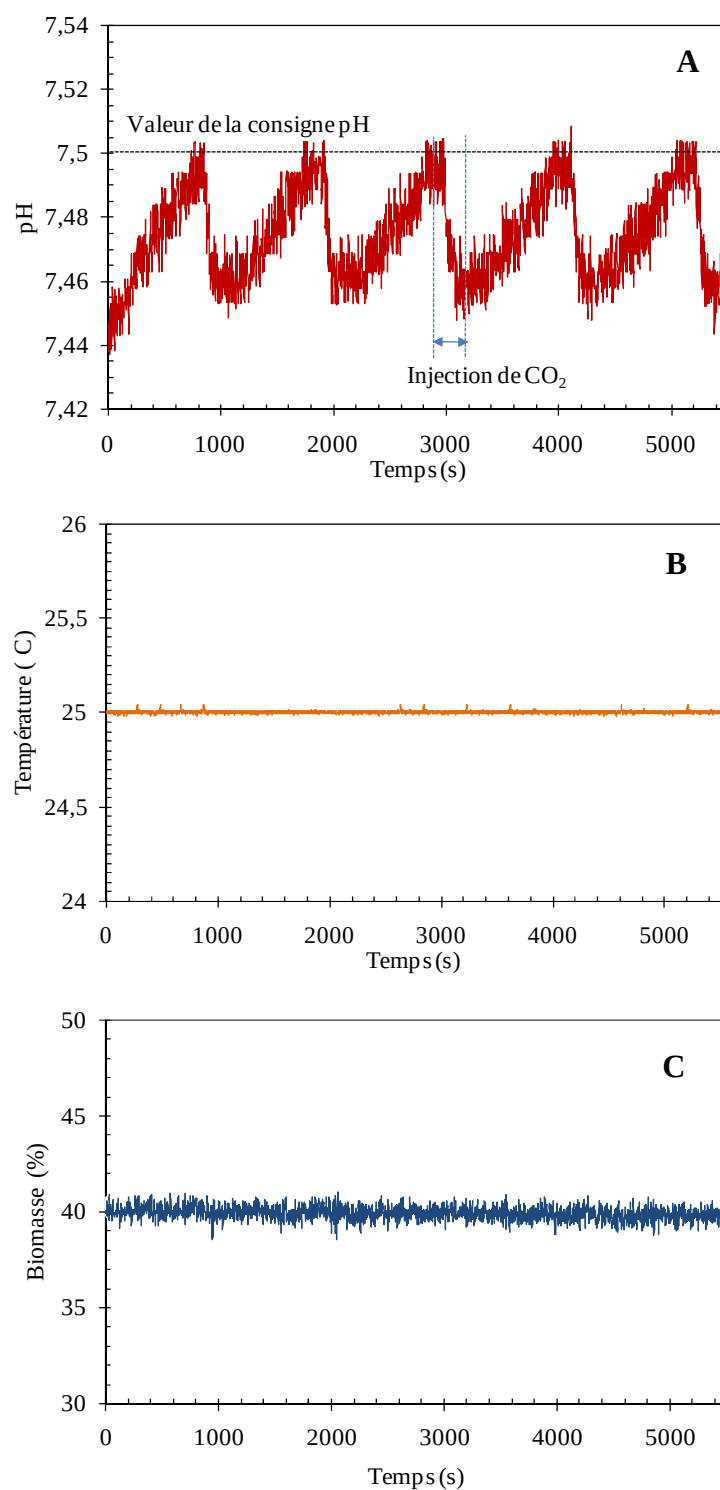


Figure II.2 : Exemple de suivi sur le PBR torique. Les graphes A, et B représentent les graphes de suivi et de régulation du pH et de la température (consigne 7.5 et 25 °C respectivement). Le graphe C est celui d'une estimation de la biomasse en mode *turbidostat* en utilisant la sonde de turbidité (consigne à 40%).

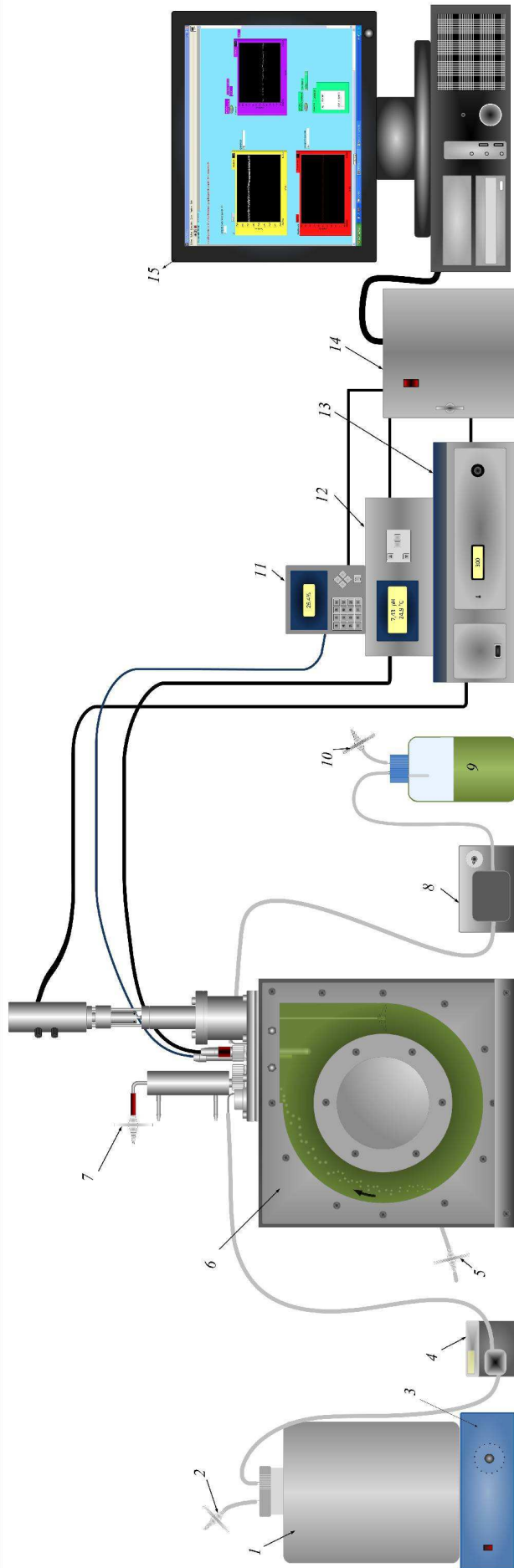


Figure II.3 : Schéma de l'ensemble du système complet (sans la source de lumière) utilisé au Laboratoire GEPEA pour effectuer des cultures en conditions contrôlées, il comporte :

- | | | |
|--------------------------------|--|--|
| 1. Milieu neuf stérile | 8. Pompe péristaltique Masterflex | 14. Boîtier d'alimentation de contrôle et de régulation du système |
| 2,5,7,10 . Filtre à air 0.22µm | 9. Récolte | 15. écran de Visualisation (pH, température, Biomasse etc...) |
| 3. Agitateur magnétique | 11. Transmetteur de la sonde Turbidité | |
| 4. Pompe doseuse 08RC | 12. Transmetteur pH/ température | |
| 6. Réacteur Torique | 13. Boîtier d'alimentation et de régulation de vitesse de l'hélice d'agitation | |

II.2.2. Système d'éclairage

II.2.2.1. Introduction

La lumière est l'un des paramètres les plus importants dans le fonctionnement des PBR. C'est le substrat limitant principal dans la croissance des micro-organismes photosynthétiques et c'est donc lui qui va «piloter» les performances du PBR en termes de vitesse spécifique de croissance.

La lumière est une grandeur spectrale et de même l'absorption de la lumière par les microalgues dépend de la longueur d'onde du spectre de cette lumière. Le spectre utile pour la photosynthèse de *C. reinhardtii* est défini entre 400 et 700 nm et il est connu sous le nom de «radiations photosynthétiquement actives», (pour l'anglais : *Photosynthetic Active Radiation*, PAR), car c'est dans ce domaine de longueurs d'onde que les microalgues absorbent la lumière et l'utilise pour leur croissance photosynthétique (voir la partie I.1.3 du chapitre I pour plus de détails). Un panneau de diodes électroluminescentes a été utilisé ici comme source de lumière artificielle.

II.2.2.2. Panneau des diodes électroluminescentes

Plusieurs raisons expliquent l'utilisation des diodes électroluminescentes « DEL » (ou en anglais LED pour *Light Emitting Diode*) pour éclairer les cultures en PBR :

- L'homogénéité et la facilité de contrôle de l'intensité lumineuse (primordiale pour effectuer des cultures en conditions contrôlées),
- La nature collimaté du champ de rayonnement,
- L'intensité lumineuse élevée pouvant être atteinte,
- Un échauffement modéré par comparaison aux tubes fluorescents,
- Leur robustesse et leur durée de vie importante (environ 5 ans),

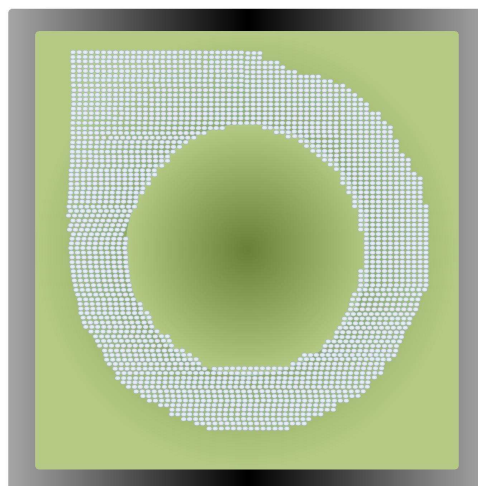


Figure II.4 : Panneau de DEL

- Leur capacité de répondre instantanément aux cycles intermittents de lumière, même à hautes fréquences.

Au total, 1500 DELs blanches (NSPW500CS, NICHIA) ont été fixées sur un support formant le circuit imprimé. Le contrôle de l'intensité de lumière générée par ce panneau se fait grâce à un générateur de tension (GW instek PSH 3610 A) par une simple variation du voltage appliqué. Les figures II.4 et II.5 montrent successivement le panneau de diodes et le

spectre correspondant, mesuré ici en utilisant un spectroradiancemètre (TriOS GmbH, Oldenburg Germany) piloté par le logiciel MSDA_XE.

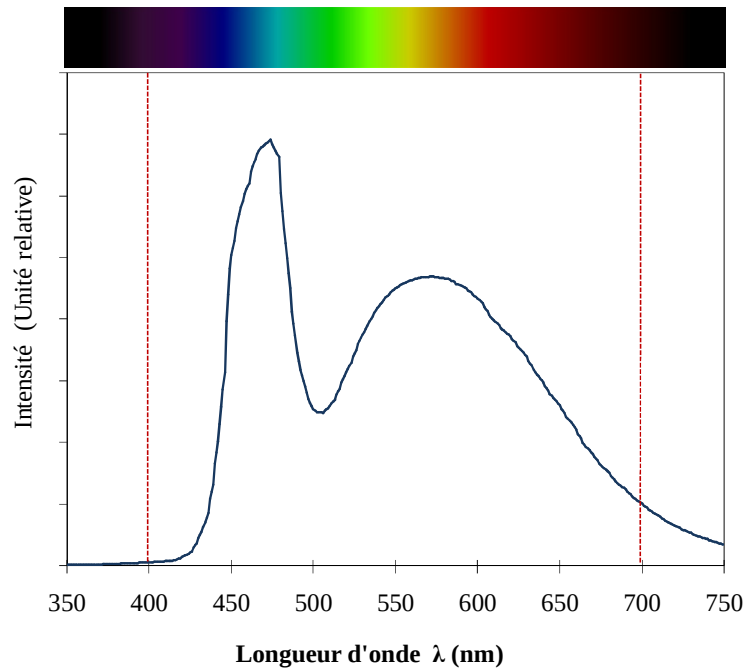


Figure II.5 : Spectre d'émission du panneau de DEL.

II.3. Mesure du flux incident en lumière continu

Comme déjà précisé dans le paragraphe précédent, le flux lumineux incident est imposé par le voltage appliqué au moyen d'un générateur de tension (la distance entre le réacteur et le panneau de DEL est fixée à 2.5 cm pendant tous les essais expérimentaux).

La densité de flux hémisphérique photonique incidente q_{γ} communément appelée PFD (pour Photon Flux Density) et donnée en ($\mu\text{mol}_{\text{h}\nu}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a été déterminée grâce à un capteur quantique plan (LI-COR LI-190-SA, Lincoln, NE). Ce dernier est combiné à un calculateur (DataLogger) de type LI-COR 1400 (Li-COR, Lincoln, Allemagne) mesurant le flux incident sur une surface plane (angle solide 2π) entre 400 et 700 nm (PAR). Le capteur est placé sur la paroi interne de la face optique du réacteur et la densité du flux incident quasi-homogène a été confirmée

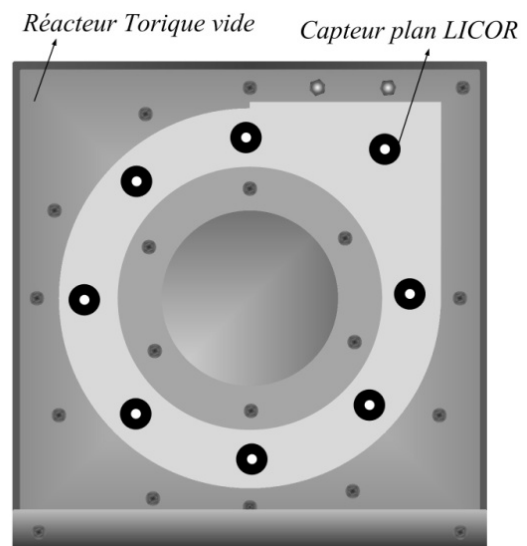


Figure II.6 : Position des huit points de mesure du capteur plan pour la détermination de la densité de flux incidente reçue par la culture.

durant ces mesures effectuées à huit positions différentes comme représentées sur la figure (II.6). Les huit mesures ont ensuite été moyennées afin de calculer la valeur du flux incident moyen en surface du réacteur.

La figure (II.7) présente le flux incident pour différents voltages. Cela illustre la facilité d'ajustement de la densité de flux hémisphérique incidente en surface du PBR par simple régulation de voltage.

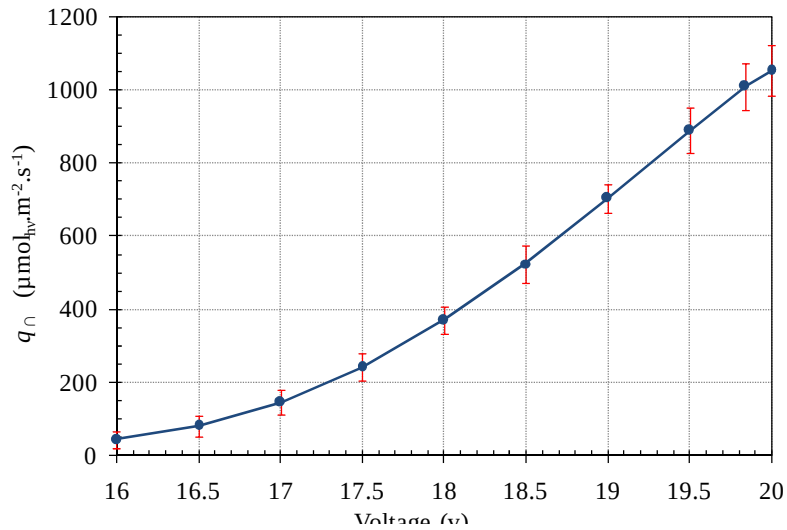


Figure II.7 : Courbe de calibration du panneau de diodes électroluminescentes.

II.4. Application des cycles de lumière/obscurité

II.4.1. Introduction

Le Panneau de DEL permet la génération de cycles de lumière/obscurité (L/D) grâce au logiciel LAbVIEW et en utilisant une commande On/Off à l'entrée des DEL. Le diagramme de programmation qui contrôle les acquisitions et la régulation des paramètres mesurés (température, pH, biomasse) et le pilotage du panneau de diodes est donné en annexe A.III.1.

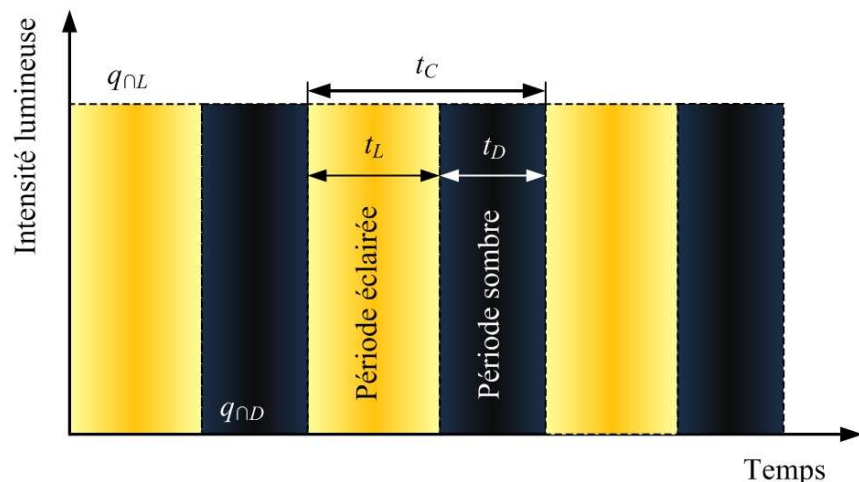


Figure II.8 : Exemple typique de cycles de lumière/obscurité créés par le panneau de DEL utilisé au cours de cette étude ; t_C , t_L et t_D représentent respectivement la durée d'un cycle complet, la durée de la période éclairée et la durée de la période sombre.

Théoriquement, les diodes ont une réponse instantanée à « l'interrupteur » On/Off du logiciel de contrôle LAbVIEW, et les cycles créés sont présentés sur la figure (II.8), où :

- t_L est la période pendant laquelle les DEL seront allumées. La densité de flux incident en surface du réacteur sera alors égale à $q_{\cap,L}$.
- t_D est la période pendant laquelle, les DEL seront éteintes. Dans ce cas, le flux incident $q_{\cap,D}$ sera nul.
- $t_C = t_L + t_D$ représente un cycle complet de lumière obscurité.
- $\varepsilon = t_L / t_C$ est la fraction éclairée.

II.4.2. Vérification de la fiabilité du panneau de DEL

Différentes mesures ont été réalisées en vue de vérifier la réponse réelle du panneau lumineux à une large gamme de différents cycles imposés théoriquement. Cette vérification porte sur deux aspects : le premier aspect est la réponse d'un point de vue temporelle, et l'autre aspect concerne le flux incident émis durant les périodes éclairées d'un point de vue intensité et stabilité.

II.4.2.1. Vérification par Analyse d'image

Une caméra Nikon de DANTEC DYNAMICS dotée d'un capteur CCD d'une résolution maximale de 1600×1186 pixels a servi dans l'acquisition des séquences d'images du panneau de DEL. La caméra est placée en face du panneau à une distance précise de façon à avoir tout le panneau cadré dans l'image. Suivant les fréquences des cycles appliqués, le pas de temps Δt entre deux images consécutives a été choisi de façon à avoir $\Delta t \ll t_L$. Le logiciel FlowManager permet de stocker les images sous format jpg et emf. Les images sont ensuite analysées sous Matlab, où deux méthodes de calcul ont été utilisées pour déterminer le niveau de gris moyen correspondant à l'intensité émise par l'ensemble des DEL;

- La première (appelée histogramme) est basée sur l'histogramme de niveau de gris calculé directement sous Matlab par une approche globale appliquée sur toute l'image.
- La deuxième (appelée centre) est basée sur la mesure du niveau de gris (NG) au centre de chaque DEL (l'image est discrétisée en niveau de gris permettant ainsi une mesure locale du NG de chaque DEL, les valeurs étant ensuite moyennées sur toutes les DEL).

II.4.2.1.1. Traitement des résultats

Dans tous les essais, le voltage était fixé à 17.4 V (flux incident théorique de $220 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pendant la phase éclairée et 0 V pendant la phase obscure. Un essai en lumière continu a servi comme référence (17.4 V), et différents cycles ont été testés (60, 20, 3 et 1 secondes) pour une fraction éclairée $\varepsilon=0.5$.

II.4.2.1.2. Réponse dynamique du panneau durant un éclairage intermittent

Afin de déterminer la dynamique du panneau et sa réponse aux cycles intermittents imposés, une analyse d'image a été réalisée pour une large gamme de périodes de cycles allant de 2 à 120 secondes et une fraction éclairée $\varepsilon=0.5$. Après acquisition des images, le niveau de gris moyen (correspondant à la lumière émise par toutes les DEL dans le panneau) est calculé pour chaque image acquise et pour chaque période des différents cycles.

Les résultats pour tous les cycles ont montré une réponse instantanée du panneau avec une incertitude de 67 ms sur les périodes éclairées/obscurées expliquée par la limitation dans le pas de temps $\Delta t=67$ ms permise entre deux photos successives. Le Figure II.9 présente la réponse dynamique mesurée du panneau pour une période de cycle $t_C=6\text{s}$.

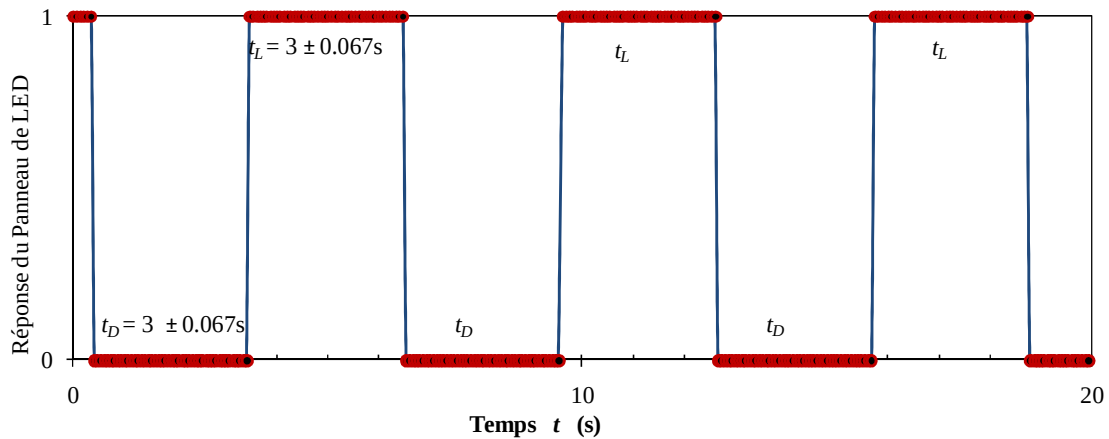


Figure II.9 : Réponse dynamique du panneau de DEL à un éclairage intermittent à $\varepsilon=0.5$ avec $t_C= 6$ secondes. Cette mesure est obtenue par une analyse d'images du panneau pour un cycle complet où 1 indique que le panneau est allumé (On), et 0 qu'il est éteint (Off).

II.4.2.1.3. Vérification des durées et des flux incidents reçus pendant les durées éclairées et sombres

Le tableau (II.1) récapitule les résultats d'analyse du niveau de gris des images acquises pour différents cycles. Ces résultats montrent que les valeurs expérimentales des durées des cycles imposés sont en accord parfait avec les temps des cycles théoriques, pour les deux méthodes appliquées (histogramme et centre). L'incertitude est ici due à une

limitation au niveau technique des performances du système utilisé dans l'acquisition des images soit par le nombre d'images, acquises pour les cycles de 60 secondes, soit par le pas de temps Δt entre deux images pour les cycles rapides (20, 30 et 1s).

Conditions d'éclairage	N° cycle	Durée de la période éclairée ou sombre		$\overline{NG}$ moyenné sur une période	
	L = light, D = Dark	Durée (s)	Δt entre deux images (s)	Méthode	
				Centres	Histogrammes
continu	-	-	1	251	251
				$\overline{NG} = 251$	
$t_L = t_D = 60 \text{ s}$	1 (L)	59.00	1	250	250
	2 (D)	59.00	1	0	8
	3 (L)	59.00	1	250	250
	4 (D)	59.00	1	0	8
	5 (L)	59.00	1	250	250
	$\overline{t_L}$	59.00	erreur = $\pm 1 \text{ s}$	250	250
	$\overline{t_D}$	59.00	erreur = $\pm 1 \text{ s}$	0	8
$t_L = t_D = 20 \text{ s}$	1 (L)	19.75	0.54	250	250
	2 (D)	19.20	0.54	0	8
	3 (L)	19.73	0.54	250	250
	4 (D)	19.20	0.54	0	8
	5 (L)	19.73	0.54	250	250
	6 (L)	19.20	0.54	0	8
	7 (D)	19.73	0.54	250	250
	$\overline{t_L}$	19.20	erreur = $\pm 0.54 \text{ s}$	250	250
	$\overline{t_D}$	19.74	erreur = $\pm 0.54 \text{ s}$	0	8
$t_L = t_D = 3 \text{ s}$	1 (D)	2.95	0.067	0	8
	2 (L)	2.94	0.067	250	250
	3 (D)	2.94	0.067	0	8
	4 (L)	2.94	0.067	250	250
	5 (D)	2.96	0.067	0	8
	6 (L)	2.95	0.067	250	250
	7 (D)	2.95	0.067	0	8
	$\overline{t_L}$	2.95	erreur = $\pm 0.067 \text{ s}$	250	250
	$\overline{t_D}$	2.94	erreur = $\pm 0.067 \text{ s}$	0	8
$t_L = t_D = 1 \text{ s}$	1 (L)	0.92	0.067	250	250
	2 (D)	0.92	0.067	0	8
	3 (L)	0.94	0.067	250	250
	4 (D)	0.94	0.067	0	8
	5 (L)	0.94	0.067	250	250
	6 (D)	0.94	0.067	0	8
	7 (L)	0.94	0.067	250	250
	$\overline{t_L}$	0.93	erreur = $\pm 0.067 \text{ s}$	250	250
	$\overline{t_D}$	0.93	erreur = $\pm 0.067 \text{ s}$	0	8

Tableau II.1 : Résultats de la vérification des durées et des intensités des cycles L/D créés par le panneau de DEL. Le niveau de gris moyenné $\overline{NG}$ peut avoir des valeurs entre 0 (noir) et 255 (blanc).

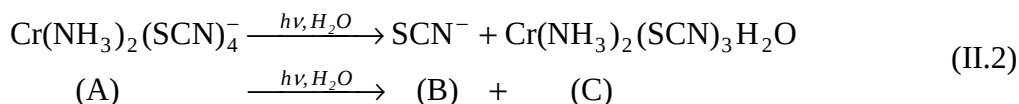
Pour les deux méthodes utilisées (histogramme et centre), le niveau de gris moyen mesuré durant les phases éclairées en fonctionnement cycles L/D est le même que celui en éclairage continu (écart inférieur à 0.5%). Aucune différence en niveau de gris moyen n'a été observée pour les valeurs mesurées au cours d'une période éclairée donnée.

Ces mesures permettent au final de vérifier la fiabilité du panneau d'un point de vue qualité des cycles appliqués avec un temps de réponse en adéquation avec les cycles en créneau programmés, une mise en régime quasi-instantanée et un éclairage homogène. Le paragraphe suivant vise à valider quantitativement les flux appliqués lors des cycles (l'analyse en niveau de gris ne donnant qu'une information relative sur ce point).

II.4.2.2. Vérification quantitatives par actinométrie

L'actinométrie est incontestablement une des méthodes les mieux adaptées à la caractérisation rigoureuse des densités de flux incidentes puisqu'il s'agit de mettre en œuvre, dans le PBR, une réaction photochimique dont on connaît le rendement quantique dans le domaine de radiation du visible employé (350-650 nm), et dont l'avancée sera alors directement fonction des photons utiles alors captés dans le volume réactionnel.

La molécule considérée est un complexe du chrome connu commercialement sous le nom de sel de Reinecke. La réaction est la suivante :



II.4.2.2.1. Préparation de la solution réactive

Le sel de Reinecke est disponible dans le commerce sous la forme d'un sel d'ammonium (pureté 97 %) et doit être préalablement transformé en sel de potassium, l'ion ammonium étant un inhibiteur de la réaction photochimique.

Pour cela, une quantité de sel d'ammonium de Reinecke nécessaire pour atteindre une concentration de 0,015 mol.l⁻¹ est dissoute à l'abri de la lumière (bouteille fumée) dans une solution de KOH à 0,1 mol.l⁻¹. Pour améliorer la dissolution, la solution est agitée en permanence avec un barreau magnétique et est chauffée à 40 °C sans toutefois dépasser cette température (le sel de Reinecke étant détruit à des températures supérieures à 40 °C). A cette concentration en KOH, le pH est de 12,85 et les ions ammonium sont présents à 0,03 % dans la solution. La solution est ensuite refroidie dans la glace et agitée vigoureusement jusqu'à élimination complète de l'ammoniac. Enfin, elle est acidifiée avec

du H_2SO_4 à 98% jusqu'à un pH compris entre 3 et 5 (dans cette gamme de pH, le rendement quantique de la réaction est connu et constant, $\Xi = 0,3 \text{ mol A / mol de photon}$).

II.4.2.2.2. Préparation du réactif ferrique

Parallèlement, le réactif ferrique est préparé pour pouvoir doser les ions thiocyanate formés (l'espèce dosée est l'ion complexe rouge sang $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$ obtenu par réaction des ions ferrique Fe^{3+} avec les ions thiocyanate SCN^-). Il s'agit d'un réactif à 0,1 mole/l de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ dans une solution à 0,5 mole/l de HClO_4 .

II.4.2.2.3. Déroulement de la photoréaction

Le sel de Reinecke est versé dans le réacteur et quelques millilitres de la solution non irradiée sont gardés à l'obscurité pour le blanc. La solution est agitée en permanence et sa température régulée à 23°C. La solution est alors éclairée avec un flux lumineux incident donné, et des échantillons sont prélevés à des intervalles de temps réguliers (toutes les 8 minutes). Chaque échantillon est traité avec 3 volumes de réactif ferrique et 20 volumes d'eau distillée. La concentration en ions thiocyanate libérés notée C_B est déterminée par la mesure de la densité optique à 450 nm, connaissant le coefficient molaire d'extinction $\varepsilon = 3400 \pm 200 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

II.4.2.2.4. Détermination du flux d'énergie lumineuse incident

La concentration choisie en sel de Reinecke C_A ($0,015 \text{ mol.l}^{-1}$) est suffisamment élevée pour que toutes les radiations incidentes soient absorbées durant l'expérimentation (tant que C_A est supérieure à $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$). L'observable macroscopique sur le réacteur est donc la vitesse volumétrique moyenne de réaction, obtenue par intégration des vitesses locales au sein du réacteur et donnée, avec un rendement quantique constant, par :

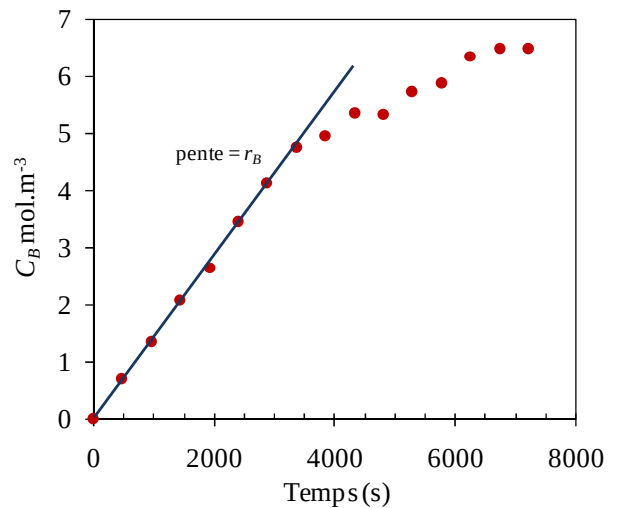


Figure II.10 : Exemple de cinétique d'apparition du thiocyanate.

$$\langle r_B \rangle = -\langle r_A \rangle = \frac{dC'_B}{dt} = \Xi \langle \mathcal{A}_0 \rangle = \Xi a_{\text{light}} q_{\text{app}} \quad (\text{II. 3})$$

Le terme $\langle \mathcal{A}_0 \rangle$ est connu comme la valeur maximale de la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie radiante (VVMAER), a_{light} est la surface spécifique illuminée (dans le cas d'un réacteur rectangulaire elle vaut $1/L$), et $q_{\cap,app}$ la valeur de la densité de flux incidente apparente.

Dans ce cas, la vitesse volumétrique molaire de thiocyanate libéré, r_B , est constante et peut être déterminée à partir du coefficient directeur de la droite représentant la concentration C_B en fonction du temps, ce qui permet aisément d'accéder à la valeur de la densité de flux incidente apparente par:

$$q_{\cap,app} = \frac{\langle r_B \rangle}{\Xi a_{light}} \quad (\text{II. 4})$$

La densité de flux apparente $q_{\cap,app}$ correspond à la valeur de densité de flux émise sur l'ensemble du spectre considéré et ne prend pas en compte les photons émis par les DEL qui n'ont pas été absorbés et n'ont donc pas réagi. Ainsi, la densité de flux incidente réelle $q_{\cap,réel}$ sera obtenue à partir d'un coefficient de correction $\mathfrak{R}$ qui tient compte de l'efficacité d'absorption des photons incidents et sera calculé à partir du spectre d'émission des lampes et du coefficient $\mathfrak{R}$ à l'aide de l'éq. (II.3) par :

$$\mathfrak{R} = \frac{q_{\cap,app}}{q_{\cap,réel}} = \frac{\langle \mathcal{A} \rangle}{\langle \mathcal{A}_0 \rangle} \cong \sum_{i=1}^N f_{i,\lambda} [1 - \exp(-\Lambda' E a'_{i,\lambda} C'_{A0} U)] \Delta \lambda_i \quad (\text{II. 5})$$

Dans cette équation :

- f_{λ} (en nm^{-1}) est la fraction de densité photonique incidente pour le domaine spectral λ .
- le terme Λ' caractérise le champ de radiation $\Lambda' = 1$ en collimaté (notre cas) et $\Lambda' = 2$ en diffus.
- U représente la dimension caractéristique du réacteur ($U = 0.04 \text{ m}^{-1}$ pour le réacteur torique).
- C'_{A0} est la concentration initiale du sel de Reinecke, $C'_{A0} = 15 \text{ mol.m}^{-3}$.
- $E a'_{\lambda}$ est le coefficient d'absorption spectrale du sel de Reinecke.

Dans le cas des DEL équipant le PBR torique, on trouve un coefficient de correction $\mathfrak{R}$ valant 0.88. La valeur réelle de la densité de flux incidente moyenne $q_{\cap,réel}$ est ainsi déterminée à partir de $\mathfrak{R}$ et $q_{\cap,app}$:

$$q_{\cap,réel} = \frac{q_{\cap,app}}{\mathfrak{R}} \quad (\text{II. 6})$$

Une dernière correction est nécessaire pour obtenir la valeur de la densité de flux incidente moyenne $q_{\cap}$ et qui peut être comparée à la valeur mesurée par le capteur quantique (mesurant les radiations photosynthétiquement actives). Cette correction est obtenue en multipliant la valeur de $q_{\cap, réel}$ par l'intégrale de f_{λ} entre 400 et 700 nm (gamme de sensibilité du capteur quantique) d'après l'équation suivante :

$$q_{\cap} = q_{\cap, réel} \int_{\lambda=400}^{\lambda=700} f_{\lambda} d\lambda \quad (\text{II. 7})$$

II.4.2.2.5. Procédure de mesure en lumière continue et intermittente

Les expérimentations réalisées sont choisies soigneusement pour deux raisons. La première est parce que ce genre de mesure demande un échantillonnage pendant deux heures toutes les 8 minutes dans une salle obscure (expérimentation relativement lourde), la seconde raison étant purement financière, le sel de Reinecke coûtant cher (270 €/100g). La valeur choisie du flux incident ($220 \mu\text{mol}_{\text{h}_v} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) est égale à celle qui sera appliquée en culture en lumière intermittente (voir chapitre V) (la valeur étant fixée par mesure par le capteur quantique et correspondant à un voltage de 17.4 V). Trois expérimentations ont été réalisées ; un essai en lumière continue qui sert comme témoin pour déterminer $q_{\cap}$ et deux autres en éclairage intermittent ($t_L = 60$ et 1 s) pour la même fraction éclairée $\varepsilon=0.5$.

II.4.2.2.6. Résultats expérimentaux

La valeur de la densité de flux incidente moyenne $q_{\cap}$ en lumière continue obtenue par actinométrie vaut $210 \pm 15 \mu\text{mol}_{\text{h}_v} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est légèrement différent de la valeur obtenue par le capteur plan. Ce dernier surestime légèrement la valeur du flux incident, l'erreur de 5% étant toutefois largement acceptable par rapport à la précision expérimentale de mesure par le capteur (10%) et la réaction actinométrique (7 %) (à noter également que ce capteur doit être réétalonné une fois tous les deux ans). Les valeurs de la densité du flux incident obtenues par actinométrie pendant la phase éclairée $q_{\cap, L}$ pour les deux cas de l'éclairage intermittent ($t_L = 60$ et 1 sec) sont respectivement 210 ± 15 et $207 \pm 15 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Ceci permet de conclure, grâce aux mesures quantitatives par actinométrie et aux mesures qualitatives par analyse d'image, que le panneau peut générer des cycles de lumière/obscurité tout à fait fiables en termes de fréquence, d'intensité et de dynamique.

II.5. Modélisation de la réflexion de l'interface Inox-eau pour le réacteur torique (et validation expérimentale)

II.5.1. Considération théorique

Le fond du PBR torique est en inox, ce qui génère une réflexion à prendre en compte dans les calculs de transfert de rayonnement (pour $z=L$). Pour un rayonnement quasi collimaté et une incidence quasi normale, la réflexion à une paroi [milieu 1 / Inox (milieu 2)] s'écrit (Siegel et Howell, 2002) :

$$\rho(L) = \frac{(n_2 - n_1)^2 + (\kappa_2 - \kappa_1)^2}{(n_2 + n_1)^2 + (\kappa_2 + \kappa_1)^2} \quad (\text{II. 8})$$

avec : n_1, n_2 représente respectivement l'indice optique de réfraction du milieu 1 et 2.

κ_1 et κ_2 représente respectivement l'indice optique d'extinction du milieu 1 et 2.

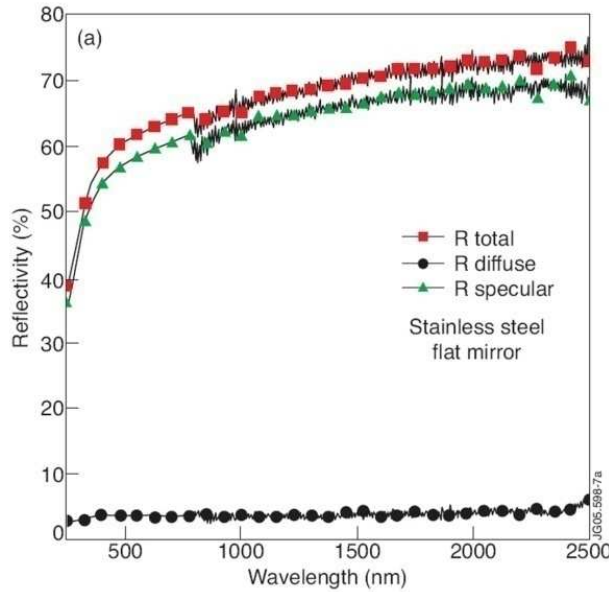


Figure II.11 : Réflectivités totale, spéculaire et diffuse pour l'inox inoxydable mesurées avec un spectrophotomètre (reproduit d'après le rapport de la EFDA –JET–PR(05)47).

Comme le montre la Figure (II.11), pour un inox poli miroir, cette réflexion est essentiellement spéculaire (conforme avec une hypothèse collimaté-collimaté). Toujours pour du poli miroir, les propriétés optiques de l'inox peuvent être déterminées à partir du travail de Demont et al. (1981). On constate que ces propriétés varient très sensiblement avec la longueur d'onde, mais dans le PAR, la variation est quasi linéaire (Voitsenya et al., 2004; Demont et al., 1981). On aura donc une excellente approximation en prenant la valeur à 550 nm. On obtient alors :

$$n_2^{550} \approx 1,6$$

$$\kappa_2^{550} \approx 3,0$$

Ainsi, si le milieu 1 est de l'air, $n_1^{550} \approx 3,0$ et $\kappa_1^{550} \approx 0$, l'équation (II.8) donne alors $\rho(0) = 0.595$. Cette valeur est en parfait accord avec les courbes de réflexion données dans les documents EFDA et Voitsenya et al. (2004).

II.5.1. Procédure de mesure et traitement des résultats

Le capteur quantique sphérique US-SQS/LI utilisé au laboratoire mesure un débit de fluence photonique ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), c'est-à-dire la lumière provenant de toutes les directions de l'espace sur une surface sphérique (angle solide 4π). Étant donnée sa petite taille (3 mm de diamètre), on peut considérer que le débit de fluence énergétique mesuré est égal à l'irradiance (Pottier et al., 2005).

Le coefficient de réflectivité de l'inox ρ_{inox} peut être obtenu directement par mesure d'irradiance. Il est alors donné par le rapport $\rho_{\text{inox}} = (G_{\text{inox}} - G_{\text{noir}}) / G_{\text{noir}}$, où G_{inox} est la valeur de l'irradiance mesurée par le capteur sphérique en réacteur (donc avec paroi en inox) et G_{noir} la valeur obtenue en répétant la même expérience mais en recouvrant la plaque inox avec du papier noir (pas de réflexion). Les mesures réalisées dans le réacteur torique pour deux intensités et pour différentes distances de la paroi optique (0, 2 et 3 cm) ont donné une valeur constante du coefficient de réflexion de 0.6 ± 0.02 (mesure réalisées dans l'air). Cette valeur est en accord avec la valeur théorique calculée à partir de l'équation (II.8) dans le cas où le milieu 1 est l'air. L'utilisation de l'équation (II.8) dans le cas d'une culture en conditions réelles contenant une suspension microalgale avec $n_1^{550} = 1.334$ et $\kappa_1^{550} = 0$ nous permet de corriger le coefficient de réflectivité dans le réacteur inox en conditions de culture, conduisant à la valeur à prendre en compte pour les calculs :

$$\rho(L) = 0.515 \quad (\text{II. 9})$$

II.6. Protocoles d'analyse de la suspension microalgale

II.6.1. Dénombrement cellulaire

Un hématimètre de type Malassez (profondeur 0.2 mm) comportant une grille gravée sur le verre et délimitant une surface de 5 mm^2 permet d'évaluer le nombre de cellules contenues dans 1 mm^3 de suspension. La grille est remplie grâce à une pipette Pasteur avec un échantillon dilué à l'éthanol afin d'immobiliser les cellules (se déplaçant grâce à deux flagelles), et la préparation est observée au microscope optique (objectif 40). Le comptage sur hématimètre permet par

exemple, à côté d'autres critères (contenu en pigments, concentration en biomasse, taux de dilution dans le cas des cultures en *turbidosat*) de vérifier que le régime permanent est atteint dans le réacteur lors de cultures continues.

II.6.2. Concentration en biomasse

En fonction de la concentration cellulaire, 5 à 15 ml de la suspension microalgale sont filtrés à travers un filtre en fibre de verre (Whatman 0.7 μm) pesé (préalablement séché). La biomasse est ensuite lavée avec de l'eau déminéralisée pour éliminer les sels minéraux. Le filtre est ensuite placé à l'étuve à 110°C pendant 24 heures, refroidi au dessiccateur pour quelques minutes puis pesé à nouveau. La concentration en biomasse est calculée à partir de la différence de masse du filtre avant et après séchage à l'étuve sur le volume du prélèvement. Elle représente la moyenne de trois réplicats. La valeur notée C_X est exprimée en (kg/m^3 ou g/l).

II.6.3. Dosage des pigments

Un volume V_1 (ml) de culture contenant 5 à 10×10^6 cellules/ml est centrifugé à 13000 rpm pendant 2 minutes à 4°C (Centrifugeuse MIKRO 22R[®], Suisse). Le culot est ensuite suspendu dans un volume V_2 (ml) d'acétone à 90% (vol.) pendant 24h à 4°C et à l'obscurité. Par la suite, les débris cellulaires sont séparés par centrifugation (13000 rpm, 2 minutes, 4°C) et l'absorbance du surnageant contenant les pigments dissous dans l'acétone a été mesurée avec un spectrophotomètre (Jenway, Angleterre) à 480, 630, 645, 665 et 750 nm. Trois réplicats ont été préparés. La chlorophylle *a*, *b* et les caroténoïdes de protection (PPC pour *PhotoProtective Carotenoids*) sont déterminés en utilisant les relations suivantes (Strickland et Parsons, 1968):

$$C_{\text{Chl-a}} = \{11.6 (DO_{665} - DO_{750}) - 1.31 (DO_{645} - DO_{750}) - 0.14(DO_{630} - DO_{750})\} V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

$$C_{\text{Chl-b}} = \{20.7 (DO_{645} - DO_{750}) - 4.34 (DO_{665} - DO_{750}) - 4.42 (DO_{630} - DO_{750})\} V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

$$C_{\text{PPC}} = \{4.0 (DO_{480} - DO_{750})\}. V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

où l est l'épaisseur de la cuvette (1 cm).

Une deuxième procédure d'extraction des pigments a été testée afin de confirmer les teneurs mesurées par extraction à l'acétone, le contenu en pigments étant une donnée essentielle dans le calcul de propriétés radiatives du milieu et par suite, du transfert de lumière au sein de la culture. Dans ce cas là, l'acétone a été remplacée par le méthanol (potentiellement plus efficace). En utilisant les

équations adéquates (Ritchie, 2006, Ritchie 2008), les teneurs en pigments mesurées par extraction au méthanol ont été en accord parfait avec les valeurs mesurées après extraction à l'acétone, validant ainsi cette dernière. Enfin, lorsqu'il s'agit de choisir entre plusieurs solvants, on préfère la manipulation avec le solvant le moins toxique (l'acétone dans ce cas).

II.6.4. Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés par colorimétrie à 484 nm par la méthode de Dubois et al. (1956), après hydrolyse de l'échantillon avec de l'acide sulfurique fumant (98%) en présence du phénol (50g/l). Le *D*-glucose est utilisé comme standard (le protocole d'analyse des sucres totaux est détaillé dans l'Annexe A.II).

II.6.5. Dosage des Protéines

Le dosage des protéines est réalisé par une méthode colorimétrique (Lowry et al., 1951). Cette méthode combine l'utilisation des ions Cu^{2+} et du réactif de Folin-Ciocalteu, une solution d'un mélange d'acide phosphomolybdique et d'acide phosphotungstique qui réagit avec Cu^+ . Cu^+ provient de la réduction de Cu^{2+} par des résidus d'acides aminés facilement oxydables comme la cystéine, le phénol de la tyrosine, l'indole de la tryptophane. Le mécanisme exact de la réaction reste incertain, mais la réaction du réactif de Folin avec Cu^+ donne des dérivés extrêmement colorés en bleu dont l'intensité peut être mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 750 nm. L'albumine sérique bovine (BSA) a servi à l'établissement de la gamme étalon.

II.6.6. Détermination de la composition élémentaire

Afin de déterminer la composition d'un milieu nutritif non limitant et contenant les substrats minéraux nécessaires à la croissance des microalgues, la composition élémentaire de la biomasse a été analysée. Cette analyse a été faite au Service Central d'Analyse (USR-59 / CNRS) à Solaize.

Pour cela, un volume de la suspension microalgale contenant 50 mg de biomasse prélevée dans le réacteur a été centrifugé, rincé à l'eau osmosée puis centrifugé de nouveau. Le culot est ensuite lyophilisé pendant 48 h (Lyophilisateur RP2V[®], Serail, Argenteuil, France).

La composition de la biomasse en éléments (C, H, O, N, S, P) est déterminée comme suit :

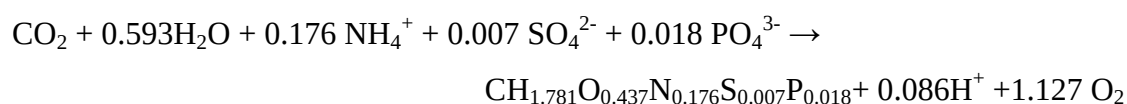
- **Détermination du carbone et de l'hydrogène** : par combustion totale à 1500°C sous courant d'oxygène ou d'hélium/oxygène. Les échantillons sont respectivement transformés en dioxyde de carbone et en eau. Le dioxyde de carbone et l'eau sont

quantifiés soit par catharométrie (conductimétrie thermique) soit par détecteur spécifique infrarouge.

- **Détermination de l'azote :** par combustion totale du prélèvement analytique à 1050°C sous courant d'hélium et d'oxygène. L'azote des échantillons est transformé en divers oxydes d'azote. Les oxydes d'azote sont réduits en azote moléculaire avant d'être mesuré par catharométrie.
- **Détermination du soufre :** par combustion totale du prélèvement analytique à 1350°C sous courant d'oxygène. Le soufre des échantillons est quantifié à l'aide d'un détecteur spécifique infrarouge, l'analyseur utilisé étant de marque LECO (modèle SC144).
- **Détermination de l'oxygène :** par pyrolyse totale du prélèvement analytique à 1080°C sous courant d'azote. L'oxygène des composés de pyrolyse obtenu est transformé en monoxyde de carbone par passage sur charbon actif à 1120°C.

II.6.6.1 Résultats expérimentaux

La composition élémentaire de *C. reinhardtii* a été déterminée pour une large gamme de conditions opératoires (q_{O_2}) (tableau II.2). Cette analyse a été utilisée notamment pour estimer la consommation en macronutriments. Cette composition évoluant peu, une stœchiométrie moyenne caractérisant les taux de conversion des substrats en produits finaux a été établie en se basant sur la conversion des éléments (C, H, O, N, S, P) (Roels 1983) :



Élément	q_{O_2} ($\mu\text{mol}_{\text{h}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)			Moyenne f. massique %	Moyenne f. molaire %	Moyenne f. C-molaire %
	200	500	1000			
C	46.8	45.6	48.74	47.07	3.922	1.000
H	7.047	6.74	7.17	6.99	6.986	1.781
N	9.48	9.63	9.89	9.67	0.691	0.176
O	25.57	28.7	28.01	27.45	1.715	0.437
S	-	0.77	0.89	0.83	0.026	0.007
P	2.38	2.51	1.730	2.21	0.071	0.018

Tableau II.2 : Composition élémentaire de *C. reinhardtii* pour une large gamme de conditions opératoires (voir chapitre III pour les conditions opératoires exactes).

Les coefficients des éléments de la biomasse ont été normalisés par rapport au carbone. A partir de sa composition élémentaire, la masse C-molaire de *C. reinhardtii* a été calculée et vaut $M_X = 24.02 \text{ g.C-mol}^{-1}$.

II.7. Détermination de la distribution de taille par analyse d'images

La détermination de la distribution de taille des cellules est faite par une analyse d'images avec un système comprenant un microscope optique (Zeiss Axioplan) équipé d'un objectif plan apochromatique en immersion et doté d'une caméra numérique Cooplix 4500 (Nikon, Japon) (voir Annexe A.V pour plus de détails). Après une analyse d'images, la taille des cellules est déterminée à l'aide du logiciel Optimas 6.5 (Media Cybernetics, Inc.). En appliquant l'approximation de "diffraction anormale" (Van de Hulst, 1981; Cornet, 2007) avec la forme modèle des particules (particule de Tchebychev dans le cas *C. reinhardtii*) obtenue par analyses d'image des microalgues, la mesure de contenu en pigments et la connaissance de leur coefficients massiques d'absorption *in vivo*, les propriétés optiques de *C. reinhardtii* ont été déterminées (soit le coefficient d'absorption massique E_a , le coefficient diffusion massique E_s et la fraction rétrodiffusée b) (pour plus de détails voir Pottier et al., 2005; Cornet 2007). La détermination des paramètres a été réalisée en prenant en compte la distribution de taille hétérogène des cellules assimilée à une distribution de type log-normale, caractérisée par un rayon moyen et un écart-type. Les caractéristiques de taille de *C. reinhardtii* sont données dans le tableau ci-dessous :

Forme modèle	Caractéristiques de taille
Approximation sphère	Rayon sphère équivalent, $r_{32} = 4.27 \mu\text{m}$ Écart-type = 0.71
Particule de Tchebychev	Rayon moyen, $a_0 = 4.1 \mu\text{m}$ Epsilon = 0.084 (paramètre de déformation) $n = 2$ (ordre)
Traitement par distribution log-normale	Rayon équivalent moyen = 4.02 Ecart-type = 1.18

Tableau II.3 : Caractéristiques de taille de *Chlamydomonas reinhardtii*.

*Chapitre III: Étude expérimentale de la croissance photolimitée de *Chlamydomonas reinhardtii* en PBR en lumière continue et obtention des productivités volumiques maximales*

Résumé:

*L'objectif de ce chapitre est de caractériser le comportement cinétique de *C. reinhardtii* en photolimitation sous lumière continue, et en particulier la relation entre le transfert de rayonnement et la productivité obtenue. Pour cela, différentes cultures ont été menées dans le PBR torique en photolimitation et pour différentes valeurs de la fraction éclairée. Les résultats expérimentaux obtenus serviront notamment dans les chapitres suivant du mémoire. Le chapitre comporte deux parties. Dans la première partie les différents régimes de fonctionnement d'un PBR seront présentés. En deuxième partie, les performances maximales seront discutées. Cette partie a fait l'objet d'une publication et sera présentée sous cette forme. Les productivités volumiques maximales expérimentales des cultures en limitation physique stricte seront comparées aux valeurs prédites par une formule publiée par Cornet et Dussap (2009). La validation sera réalisée sur deux PBR de géométries différentes et ayant la même surface spécifique, l'un rectangulaire et l'autre cylindrique. L'ensemble des résultats de ce chapitre a permis de mettre en évidence les paramètres les plus importants gouvernant la productivité maximale en PBR.*

III. Croissance photolimitée de Chlamydomonas reinhardtii en PBR en lumière continue et obtention des productivités volumiques maximales

Partie I : Étude de la croissance photolimitée de Chlamydomonas reinhardtii en PBR sous lumière continue

III. I.1 Introduction

Le photobioréacteur (PBR) en tant que procédé de culture de micro-organismes photosynthétiques, nécessite un apport d'énergie photonique aux micro-organismes cultivés. Cette énergie photonique est distribuée d'une façon hétérogène dans le PBR quelle que soit sa géométrie, les conditions hydrodynamiques, la densité de flux incidente et la concentration en biomasse. Ceci est dû aux phénomènes d'absorption et de diffusion de la lumière par les microalgues. La quantité de lumière disponible au sein de la culture pour chaque microalgue est donc différente de la densité de flux incidente appliquée en surface du PBR. Il en résulte que les productivités du PBR sont directement dépendantes des conditions de transfert de rayonnement au sein de la culture. Ce chapitre montre notamment comment la fraction volumique éclairée (voir la définition donnée dans l'équation I.6) liée directement à ces conditions de transfert de rayonnement, permet de définir le régime de fonctionnement du PBR.

III. I.2. Régimes de fonctionnement et productivité volumique en mode continu

Dans un réacteur de volume réactionnel V_R cultivant une microalgue donnée en mode continu (*chemostat* ou *turbidosat*), la productivité volumique en biomasse est obtenue par réalisation d'un bilan matière. Le temps de résidence τ (où le taux de dilution $D=1/\tau$) sera défini à partir du débit d'alimentation du milieu neuf (ou soutirage de la récolte) et du volume réactionnel du réacteur selon l'équation (I.4). Dans le cas où le réacteur est considéré comme parfaitement agité, la concentration en biomasse C_X sera alors liée à la cinétique de production de biomasse, représentée par $\langle r_X \rangle$ (vitesse volumétrique moyenne de croissance de la biomasse dans le PBR, ou VVMCB), selon :

$$\frac{dC_X}{dt} = \langle r_X \rangle - \frac{C_X}{\tau} = \langle r_X \rangle - C_X \cdot D \quad (\text{III.1})$$

Lorsque le réacteur atteint le régime permanent (hypothèse de l'état pseudo-stationnaire), aucune variation de la concentration en biomasse n'est observée dans le réacteur. La productivité dans ce cas est donnée par :

$$\frac{dC_X}{dt} = 0 \Rightarrow \langle r_X \rangle = C_X \times D = \frac{C_X}{\tau} \quad (\text{III.2})$$

La productivité volumique P_V du PBR est donnée à tout instant par la quantité de biomasse récoltée, selon:

$$P_V = \frac{C_X}{\tau} = C_X \times D \quad (\text{III.3})$$

En régime permanent, on a donc : $\langle r_X \rangle = P_V$.

Pour la même densité de flux incidente, la productivité du réacteur dépend donc des valeurs du taux de dilution D et de la biomasse C_X . Selon le taux de dilution appliqué, on distingue trois régimes de fonctionnement du PBR : le régime cinétique, le régime de limitation par la lumière et le régime de limitation physique stricte. Ceux-ci sont représentés schématiquement sur la figure (III.1). Ils sont directement dépendants des conditions de transfert de rayonnement au sein de la culture. Dans la mesure où cela constitue un point essentiel de la compréhension du fonctionnement d'un PBR, une description détaillée est donnée ci-après.

III.1.2.1. Culture photolimitée

Ce régime correspond à l'état « A » du réacteur présenté dans la figure (III.1). Dans ce cas, le taux de dilution D est très faible avec une concentration en biomasse C_X élevée conduisant à la présence d'une zone sombre dans le réacteur (avec des irradiances locales dans cette zone sombre inférieures à l'irradiance de compensation). Le point de compensation $z(G_C)$, où l'irradiance de compensation est obtenue, est localisé à l'intérieur du réacteur ($0 < z(G_C) < L$). Pour une culture photolimitée, la fraction volumique éclairée est strictement inférieure à 1 ($0 < \gamma < 1$). Dans ce cas, la culture est en limitation par la lumière, l'absorption de la lumière captée étant totale. Si l'organisme présente une respiration à la lumière (eucaryote), une perte de productivité sera obtenue provenant de la forte influence de la respiration prédominante dans la phase sombre.

III.1.2.2. Culture en régime cinétique

Ce régime correspond à l'état « B » du réacteur présenté dans la figure (III.1). Il a lieu lorsque l'intensité lumineuse est très élevée et/ou la concentration en biomasse (C_{X2}) est trop faible. Dans ce cas, le point de compensation $z(G_C)$ est situé hypothétiquement en-dehors du volume réactionnel V_R du PBR, menant à une fraction volumique éclairée supérieure à 1 ($\gamma > 1$). Les cellules reçoivent alors un excès de lumière conduisant à un régime de fonctionnement très particulier nommé le régime cinétique. Ce régime est caractérisé par une transmission d'une partie de la lumière reçue au travers du PBR qui mène donc à des faibles performances, dues à une absorption incomplète de l'énergie disponible et au fait que les fortes irradiances dans le milieu de culture conduisent à des efficacités énergétiques médiocres des réactions primaires de la chaîne photosynthétiques (Cornet 2009). Dans ce cas, les cellules doivent s'adapter au fonctionnement imposé et leur métabolisme peut s'en retrouver fortement modifié (Cornet 2007). On pourra par exemple observer une formation d'agglomérats et de bio-films. Ce régime de fonctionnement doit donc être évité en PBR. Il est cependant rencontré fréquemment, notamment en phase de démarrage où la concentration en biomasse est très faible. Ce point sera traité spécifiquement dans le chapitre IV (paragraphe IV.8.2).

III.1.2.3. Culture en limitation physique stricte

Ce régime correspond à l'état « C » du réacteur présenté dans la figure (III.1). Dans ce cas, tous les photons incidents sont absorbés dans le réacteur et utilisés dans les réactions de la photosynthèse. Ce régime de fonctionnement implique que le réacteur entier est éclairé ($V_R = V_l$) avec le point de compensation localisé exactement au fond du réacteur $z(G_C) = L$. Il n'y a alors pas de zone sombre et la condition $\gamma = 1$ est alors obtenue. Pour un micro-organisme eucaryote (microalgue) cela correspond, comme il sera montré ensuite, à la productivité volumique maximale $P_{V_{max}}$, obtenue pour une concentration en biomasse optimale notée $(C_X)_{opt}$. Ce régime est donc l'idéal de fonctionnement pour la production de biomasse de microalgues. Il peut être appliqué en mode continu ou discontinu. Ce dernier nécessite cependant de faire varier la densité de flux incidente de façon à ce que le réacteur reste en limitation physique stricte par la lumière lors de la croissance des cellules photosynthétiques (mode *luminostat* d'après Cornet et Dussap, 2003).

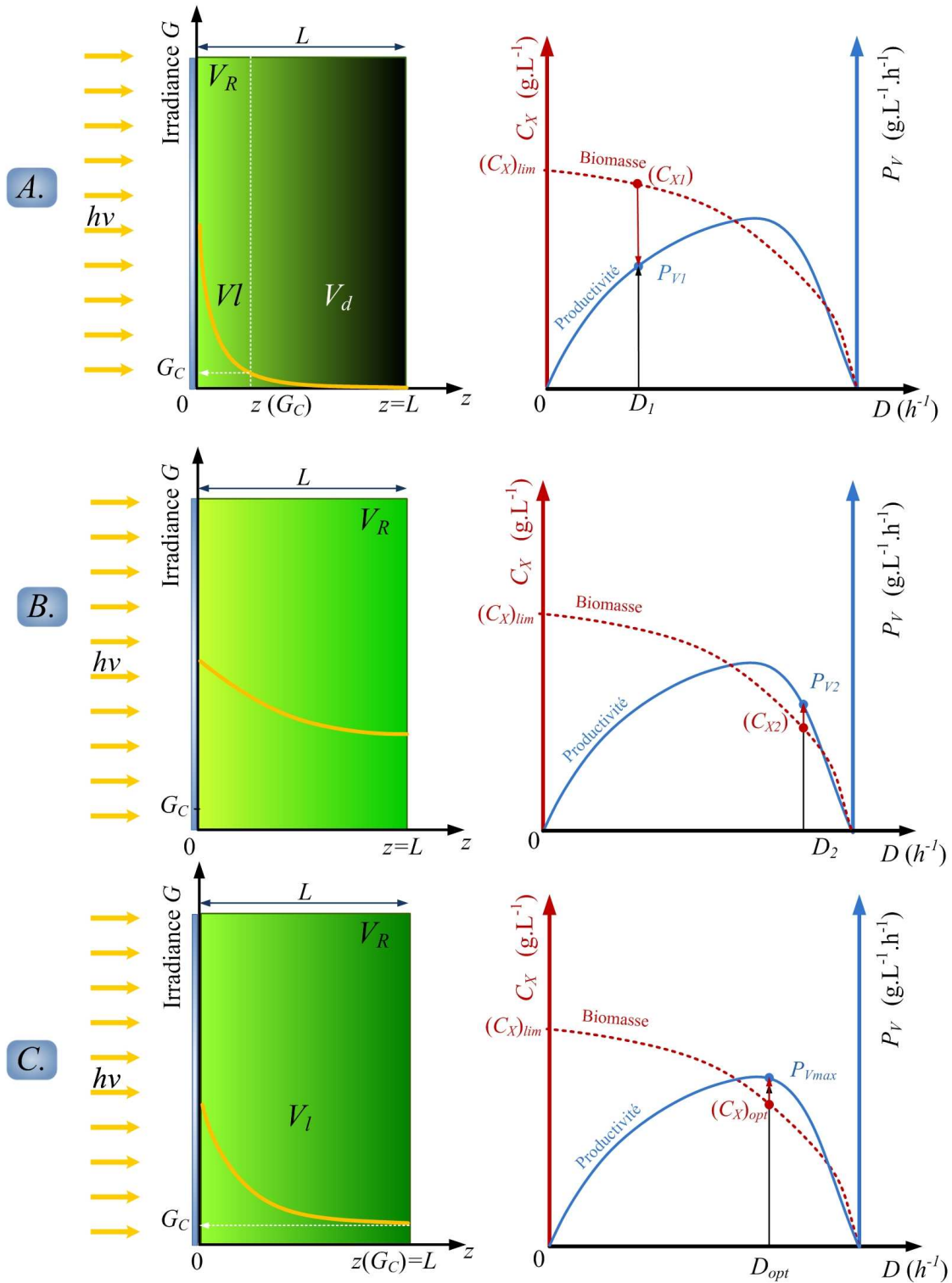


Figure III.1 : Représentations des différents régimes de fonctionnement rencontrés lors de la culture des microalgues (eucaryotes) en PBR. Les schémas à gauche représentent une vue latérale d'un PBR rectangulaire éclairé d'un seul côté. Pour chaque régime de fonctionnement, la productivité et la biomasse correspondante sont présentées dans les graphes à droite. A : culture photolimitée, B : culture en régime cinétique, C : limitation physique stricte par la lumière. $(C_X)_{lim}$ représente la concentration limite atteinte lorsque le réacteur fonctionne en mode *batch*.

III.1.3. Étude expérimentale de la croissance photolimitée de *C. reinhardtii* en PBR

Cette étude expérimentale a été réalisée sur des cultures continues de *C. reinhardtii* dans le PBR torique en lumière continue. Les expérimentations ont été divisées en deux catégories:

- La première concerne les essais effectués en limitation physique stricte ($\gamma \cong 1$). Les résultats expérimentaux sont présentés dans le tableau II.1. Ces essais ont été réalisés dans le but de déterminer le point de compensation de la souche étudiée et de définir les performances maximales du PBR. La productivité volumique expérimentale a été comparée à la productivité théorique prédite grâce aux travaux donnés dans Cornet et Dussap (2009).
- La seconde série de mesure a été effectuée en cultivant la souche étudiée en photolimitation ($\gamma < 1$). Les résultats expérimentaux sont présentés dans le tableau II.2. Ces essais ont permis d'étudier l'influence de la présence d'une zone sombre sur la productivité de *C. reinhardtii*.

L'ensemble de ces points a servi de base aux travaux réalisés dans la suite de ce mémoire et sera discuté dans la suite. Les résultats de productivités maximales ont également fait l'objet d'une publication présentée ci-après.

q_{γ} ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	110	200	300	400	500	600	1000	
Taux de dilution D (h^{-1})	0.032	0.041	0.054	0.057	0.058	0.061	0.039	
Concentration en biomasse C_X ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	0.35	0.41	0.47	0.51	0.57	0.60	1.1	
Productivité volumique P_V ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	1.1×10^{-3}	1.6×10^{-3}	2.5×10^{-3}	2.9×10^{-3}	3.3×10^{-3}	3.7×10^{-3}	4.3×10^{-3}	
Teneurs en pigments (% biomasse sèche)	$Chl\ a$	2.00	1.75	1.65	1.57	1.50	1.35	1.10
	$Chl\ b$	0.80	0.73	0.68	0.65	0.6	0.55	0.45
	PPC	0.60	0.55	0.48	0.45	0.4	0.38	0.35
Sucres totaux (% biomasse sèche)	14.5	11.3	13.0	14.0	15.6	16.6	14.3	
Protéines (% biomasse sèche)	42.1	31.3	30.6	36.5	35.5	26.4	24.4	

Tableau III.1 : Tableaux résumant les points expérimentaux obtenus en cultivant la microalgue *C. reinhardtii* dans le PBR torique en limitation physique ($\gamma \approx 1$) en lumière continue.

q_{γ} ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	110	700	1000	
Taux de dilution D (h^{-1})	0.012	0.017	0.020	
Concentration en biomasse C_X ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	0.60	1.36	1.47	
Productivité volumique P_V ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.72×10^{-2}	2.3×10^{-2}	2.9×10^{-2}	
Teneurs en pigments (% biomasse sèche)	<i>Chl a</i>	2.17	1.58	1.33
	<i>Chl b</i>	0.90	0.67	0.51
	<i>PPC</i>	0.64	0.56	0.42
Sucres totaux (% biomasse sèche)	18.1	16.3	14.3	
Protéines (% biomasse sèche)	38.2	35.5	27.8	

Tableau III.2 : Tableaux résumant les points expérimentaux obtenus en cultivant la microalgue *C. reinhardtii* dans le PBR torique en photolimitation sous lumière continue ($\gamma\approx 0.5$).

Partie II : Obtention des productivités volumiques maximales

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet de la publication intitulée «**Experimental and Theoretical Assessment of Maximum Productivities for the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Two Different Geometries of Photobioreactors**», Takache H., Christophe G., Cornet J.-F., Pruvost J ; *Biotechnol. Prog.*, 2010, Volume 26 Issue 2, 431 - 440.

Dans cette publication, les productivités volumiques maximales de deux PBR de géométries différentes (cuve cylindrique et réacteur torique) ont été comparées aux performances cinétiques maximales prédites grâce à une formule publiée par Cornet et Dussap (2009), cette formule ayant été validée préalablement pour des cultures d'une cyanobactérie (*A. platensis*). Les résultats confirment que la formule, appliquée ici pour une microalgue, prédit également avec fiabilité les performances maximales des deux PBR. De plus, ce travail a permis, grâce à la comparaison des deux PBR, de mettre en évidence les trois paramètres d'ingénierie gouvernant la productivité volumique maximale dans un PBR, à savoir:

1. la densité de flux hémisphérique photonique incidente $q_{\odot}$,
2. la fraction éclairée γ qui doit être rigoureusement égale à l'unité pour un micro-organisme eucaryote tel *C. reinhardtii* (photolimitation stricte),
3. la surface spécifique éclairée a_{light} .

Cette conclusion permet notamment de rationaliser un débat courant en ingénierie des PBR, à savoir la très forte dépendance des résultats aux géométries utilisées. Il est ici montré que, si ces trois critères sont égaux, les mêmes performances seront atteintes que le réacteur soit plan, cylindrique, tubulaire ou autre...

Le PBR torique a déjà été présenté dans le chapitre II. Le PBR cylindrique utilisé au LGCB est donné dans la figure (II.2). Une description plus détaillée est donnée ci-après.

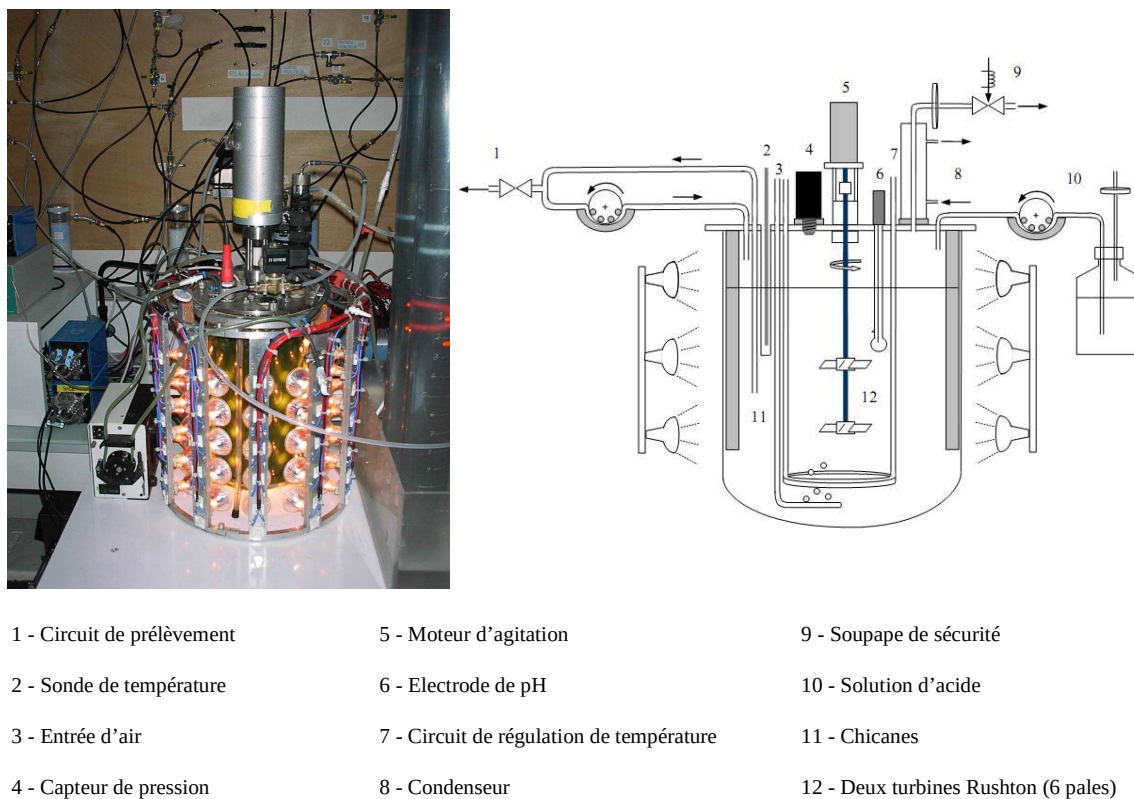


Figure III.2: Photographie (gauche) et représentation schématique (à droite) du PBR cylindrique utilisé au Laboratoire LGCB (Université Blaise Pascal -Clermont Ferrand).

III. Publication

Experimental and Theoretical Assessment of Maximum Productivities for the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Two Different Geometries of Photobioreactors

III.1. Abstract

The validity of a simple, reliable and useful recently published formula enabling to calculate the maximum volumetric biomass productivities in photobioreactors was investigated through the cultivation of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Experimental maximum kinetic performances accurately obtained in two different, artificially lightened torus-plane and cylindrical reactors having the same specific illuminated area confirmed the availability, power and robustness of such formula. The predictive kinetic parameters previously proposed and validated with cyanobacteria were then proved general and robust in case of eukaryotic microalgae, as postulated in the founding article. In this case, an additional criterion requiring rigorous control of the working illuminated fraction $\gamma = 1 \pm (15\%)$ inside the reactor is demonstrated. For this, the usefulness and reliability of a generalized two-flux model accurately describing the radiation field inside turbid culture media of *C. reinhardtii* was also established in this article. These important results contribute to identify the main engineering factors governing light-limited photobioreactors functioning and then to clarify some misinterpretations widely reported in the literature. Together with the referenced previous work, this article gives a framework towards optimal conception of photobioreactors on a strong physical basis.

Keywords: *Photobioreactors, kinetics, predictive model, maximum productivity, Chlamydomonas reinhardtii*

III.2. Introduction and Objectives

The idea that photosynthesis will play a crucial role in the near future in the engineering framework (i.e. controlling optimized conditions for production, intensified plants and short time constants) progressively prevails in the bioengineering community. In this prospect, among the existing technologies, the cultivation of photosynthetic microorganisms in closed photobioreactors (PBR) enabling higher productivities and optimized control of minerals and water fluxes, appears as an interesting alternative. In fact,

participating in a sustainable and renewable carbon cycle, microalgae are considered as potential valuable sources of biofuels, raw molecules for chemistry or high-value products for food, cosmetic or pharmaceutical industries (Spolaore *et al.*, 2006).

Because of the specific requirement of light distribution as an energy source inside the culture medium of any PBR, a great variety of concepts exists in the specialized literature (Carvalho *et al.*, 2006; Eriksen, 2008) and there is an important attempt at developing reliable engineering tools for simulation, control, design and scale-up of PBR (Janssen *et al.*, 2002). Additionally, there is also a need, in this scientific community, to clarify the debate on the respective contribution of the engineering factors and biological factors (linked to the strain itself) in reaching maximum kinetic performances of PBR. As an interesting contribution of these wide-spreading objectives, a simple formula predicting maximum (only) volumetric productivities of light-limited PBR as a function of engineering factors was recently published and validated for different geometries and designs of reactors (Cornet and Dussap, 2009). Even if the authors postulated that it was widely available for many wild strains of photosynthetic microorganisms, proofs have only been given for the cyanobacterium *Arthrospira platensis* and the robustness of the approach, mainly for eukaryotic microorganisms, remains an open question.

This work is clearly devoted to the validation of the proposed useful formula (Cornet and Dussap, 2009) in case of eukaryotic microorganisms cultivation, i.e. microalgae, and to a discussion on the additional radiative transfer criterion which needs to be satisfied in defining maximum kinetic performances of PBR. It presents experimental results of maximum biomass productivities obtained on two very different (in volume and geometry) PBR cultivating the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*, but having the same specific illuminated area a_{light} . The conditions and method used to guarantee that the reported productivities are really maximum performances of the considered PBR are explained and discussed. These results should demonstrate, as stated by the previous reported formula (Cornet and Dussap, 2009), that maximum volumetric productivities of PBR with the same specific area a_{light} and the same hemispherical incident photon flux density (PFD) are equal and independent of any particular geometry or any cultivated microorganism having low respiration in light. They should also confirm the large domain of validity and the ability of the proposed formula to give correct assessment of maximum biomass productivities in PBR cultivating microalgae, i.e. the predictive character of the proposed theoretical values of parameters enabling to easily formulate the coupling between volumetric radiant light power density absorbed and kinetic rates.

Finally, the relevance of a generalized two-flux method in solving the radiative transfer equation in PBR with proper boundary conditions will also be analyzed and discussed. This approach enables, for the considered microorganism, to calculate with sufficient accuracy the working illuminated fraction inside the reactor and then provide a predictive theoretical tool in controlling maximum performances of any kind of PBR involving a one-dimensional light transfer assumption.

III.3. Theoretical Considerations

As explained in the introductive section, the definition of the maximum volumetric performances of PBR was recently examined by Cornet and Dussap (2009) who developed a useful and practical simple formula, validated in numerous different geometries of reactors, but only with the prokaryotic cyanobacterium *Arthrospira platensis*. As established in the previous paper, the formula proposed for the calculation of maximum biomass productivities in any PBR is only available if the reactor is physically limited by the light transfer mechanism. This supposes at least that the mean radiant light power density absorbed $\langle \mathcal{A} \rangle$ is maximum (all the incident non-reflected photons are absorbed in the vessel), which in turn is verified only if the working illuminated fraction γ is lower or equal to one $\gamma = V_l / V \leq 1$ (Cornet and Dussap, 2009). This γ fraction, defined from the volume in which the irradiance field is higher than the irradiance of compensation G_C for the photosynthesis of a given microorganism (net positive growth rate), enables to write the total dry mass productivity in the PBR as the sum of two integral terms with light and dark zones characterizing different local metabolic and kinetic rates as (Cornet *et al.*, 1992):

$$\langle r_X \rangle = \frac{1}{V} \iiint_V r_X dV = \gamma \frac{1}{V_l} \iiint_{V_l} r_{X,l} dV + (1 - \gamma) \frac{1}{V_d} \iiint_{V_d} r_{X,d} dV \quad (1)$$

For cyanobacteria having common electron carrier chains for photosynthesis and respiration (Gonzalez de la Vara *et Gomez-Lojero*, 1986), the second integrand $r_{X,d}$ is always zero except for long residence times in the dark (not compatible with the conception of efficient PBR), and then, the maximum productivity $\langle r_X \rangle_{max}$ is obtained for any value $\gamma \leq 1$. On the contrary, it is not the case for eukaryotic microalgae like *Chlamydomonas* having differentiated chloroplasts and mitochondria with independent respiration in the dark (the second integral term is negative). In this case, obtaining maximum productivities requires a very accurate control of the radiation field to rigorously ensure the condition $\gamma = 1$ (all incident photons absorbed, but no dark zone in the PBR with irradiances lower

than G_C). This is indeed the only way to have the second integral term vanishing in eq. (1), and because the integrand of the first term is always positive, this leads to a maximization of the productivity for a given microalga as defined by the criterion:

$$\begin{aligned} \max[\langle r_X \rangle] &\Rightarrow \gamma = 1 \text{ or } V_l = V \\ \text{then } \langle r_X \rangle_{\max} &= \frac{1}{V} \iiint_V r_{X,l} dV \end{aligned} \quad (2)$$

Clearly, this objective is never possible when operating in *batch* conditions due to a rapid appearance of a dark zone (Pruvost *et al.*, 2008), demonstrating the crucial importance to develop continuous and quasi-steady-state PBR to obtain higher performances. The control of the illuminated volume fraction to $\gamma = 1$, i.e. working in luminostat (Cornet *et al.*, 2003), requires in fact specific experimental methods (or specific model calculations) as explained hereafter, but guarantees to reach maximum volumetric productivities if it is fulfilled. In this case only, the useful and general equation recently published (Cornet and Dussap, 2009) holds true, as explained in this article considering eukaryotic microorganisms. Additionally, for a quasi-collimated hemispherical incident photon flux density (PFD) $q_\cap$ (as is the case for the two lighting systems used in this study), the degree of collimation $n = \infty$, and considering that for the two reactors, the design dark volume fraction on the illuminated area $f_d = 0$, it is possible to write the corresponding equation in a very simple form as:

$$\langle r_X \rangle_{\max} = \rho_M \bar{\phi} \frac{2\alpha}{1+\alpha} a_{\text{light}} K \ln \left[1 + \frac{q_\cap}{K} \right] = \rho_M \bar{\phi} \frac{K}{q_\cap} \ln \left[1 + \frac{q_\cap}{K} \right] \langle \mathcal{A} \rangle_{\max} \quad (3)$$

The writing of the right hand side in eq. (3) enables to understand the physical and physiological meanings of this powerful and concise formula. It clearly demonstrates that the maximum biomass productivity of a given PBR is reached when the spatially-averaged radiant light power density absorbed $\langle \mathcal{A} \rangle$ is maximum. In this case, the maximum volumetric rate of absorbed light is converted to maximum biomass growth rate from a quasi-constant time-averaged quantum yield $\bar{\phi}$ (depending only on the Nitrogen-source for the conservative photons), and an energetic yield ρ for the dissipative photons which decreases when increasing the value $q_\cap$ of the PFD (with a logarithmic law, independent of a first approximation of the PBR geometry). It has already been discussed (Cornet and Dussap, 2009) that the kinetic parameters formulating the radiant light coupling in this equation, i.e. the maximum energetic yield $\rho_M = 0.8$, and the mean mass quantum yield

$\bar{\phi} \cong 2.4 \times 10^{-9} \text{ kg}_X \cdot \mu\text{mol}_{hv}^{-1}$ (for ammonia, the nitrogen source considered in this study) had predictive values independent of the considered microorganism. Moreover, the linear scattering modulus $\alpha = \sqrt{Ea/(Ea + 2bEs)}$ is a lumped parameter aggregating the radiative properties of any microorganism, i.e. the mass absorption coefficient Ea , the mass scattering coefficient Es , and the back-scattered fraction $b = \frac{1}{2} \int_{\pi/2}^{\pi} p(\theta, \theta') \sin \theta d\theta$. These properties must be obtained from predictive calculations as explained in M&M Section for the particular case of *Chlamydomonas reinhardtii* or by experimental determination (Berberoglu *et al.*, 2008) (if it is not possible, the value $\alpha = 0.9$ should be taken as a good approximation). The last important kinetic parameter appearing in eq. (3) is the half saturation constant for photosynthesis K . Even if a mean value was proposed in the already cited previous work (Cornet and Dussap, 2009), this parameter may have different values for a given microorganism and should be rigorously determined in each case. Fortunately, this experimental determination can be easily done by performing carefully independent calibrated experiments. In our case, we have used both oxygen evolution and fluorescence measurements of algae samples (see M&M Section). Plotting in all cases $1/r_{O_2}$ or $1/r_{\Phi}$ versus $1/G$ (data not shown) gives the following value for our strain of *C. reinhardtii*:

$$K = 110 \pm 20 \mu\text{mol}_{hv} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \quad (4)$$

It finally appears from eqs. (2 and 3) that the maximum productivity mainly depends on three engineering factors which are the working illuminated fraction $\gamma = 1$, the specific illuminated area of the PBR $a_{light} = S_{light} / V$ and the mean incident hemispherical PFD q_{Ω} onto the same surface (which is imposed for solar outdoor PBR). In this work, in order to be definitely demonstrative, we decided to investigate maximum performances in two kinds of PBR geometrically completely different, but having the same specific illuminated area a_{light} (see M&M Section), by varying the incident PFD in a large range of operating conditions. In this case, eq. (3) clarifies that the maximum productivities obtained in the two PBR for a given PFD should be the same, because all the other previously detailed parameters are independently calculated by a knowledge approach of the photosynthesis. Additionally, results should also demonstrate that controlling the illuminated fraction $\gamma = 1$ is a sufficient condition to apply eq. (3) in a predictive manner when working with eukaryotic microalgae.

III.4. Materials and Methods

III.4.1. Microorganism and medium

A *Chlamydomonas reinhardtii* wild type strain, coded 137 AH and provided by the CEA (Commissariat à l'Energie Atomique, Cadarache, France) was used in the study. The microorganism was cultivated in an autotrophic medium with the following composition (g.L⁻¹): NH₄Cl, 1.45; MgSO₄.7H₂O, 0.281; CaCl₂.2H₂O, 0.05; KH₂PO₄, 0.609; NaHCO₃, 1.68 (for torus PBR with pH regulation by CO₂ injection) and 8.4 (for cylindrical PBR with pH regulation by H₂SO₄ injection), with 1mL of Hutner's trace elements solution. This medium composition assumes no nutrient limitation inside the PBR at least up to 2 g/L for dry biomass concentration. For all experiments in PBR, a temperature of 25°C and a pH of 7.5 were controlled.

III.4.2. Photobioreactors characteristics

III.4.2.1. Torus PBR

A torus-shaped photobioreactor agitated by a marine impeller was used. Because of the plane front surface and the square-sectioned torus channel, no curved surfaces are presented perpendicularly to the light emission. This PBR can thus be regarded as in the more general group of "flat panel" type, presenting one-dimensional light attenuation along the depth of culture x perpendicular to the optical flat surface (see ref. 11 for a more detailed description of the bioreactor). The torus PBR is of 1.5 L working volume and has an optical path of 4 cm giving a specific illuminated area $(1/L)a_{light}$ of 25 m⁻¹ without design dark fraction ($f_d = 0$) on the illuminated surface (Cornet *et al.* Dussap 2009). The PBR is made in stainless steel (type 316L), except the optical surface (front side) in transparent material (polycarbonate). The reflection of the water-stainless steel interface at the rear of the reactor R_s is equal to 0.515.

The torus PBR was illuminated using 1500 white LEDs (light Emitting Diodes, NSPW500CS, NICHIA) enabling PFD variation by simple voltage adjustment. PFD was measured using a plane cosine quantum sensor (LI-COR LI-190-SA, Lincoln, NE) which measures photosynthetically active radiation (PAR) in the 400 to 700 nm waveband received in a 2π solid angle. PFD was measured on the back side of the optical surface to take into account light attenuation crossing this surface. The quasi-homogeneous incident PFD was confirmed in a previous study (Pottier *et al.*, 2005) and measured here by averaging measurements at eight different locations.

Temperature and pH were monitored (sensor Mettler Toledo SG 3253) and controlled by air blowing and carbon dioxide injection respectively. The PBR was operated in continuous mode; biomass concentration was monitored on-line (biomass sensor InPro 8200/S(H), Mettler Toledo) for a functioning in turbidostat mode (see hereafter) and the input liquid flow rate was controlled (Stepdos® pump 08/RC, KNF Neuberger) for a functioning in chemostat mode (culture was then harvested by overflowing, keeping the volume of the reactor constant).

III.4.2.2. Cylindrical PBR

The cylindrical PBR used was a cylindrical stirred vessel (Applikon) of 5 L working volume radially illuminated by 55 halogen lamps (Claude BAB 38°, 20W, 12 V) and agitated by two rushton turbines. Temperature was controlled with an internal coiled heat exchanger and the pH was regulated using 1 mol/L H₂SO₄. The internal diameter of the reactor was 16 cm giving a specific illuminated area ($4/D$) a_{light} of 25 m⁻¹ with a totally illuminated surface (the design dark fraction $f_d = 0$) (Cornet and Dussap, 2009). The quasi-homogeneous incident hemispherical PFD was determined in the PAR using multi-points measurements with a cosine quantum sensor (LI-190-SA, LI-COR, Lincoln, NE) and confirmed by actinometry (Cornet *et al.*, 1997). Different PFD were obtained by varying the voltage of the lamps. The PBR operated in continuous mode, the residence time τ in the reactor being modified and controlled by imposing the input liquid flow rate (peristaltic pump, Masterflex) and maintaining a constant level by means of a capacitive probe (Endress Hauser).

III.4.3. Determination of the maximum volumetric biomass productivity

For a given hemispherical incident PFD q_γ , the experimental determination of the maximum biomass volumetric productivity $\langle r_X \rangle_{max}$ is of crucial importance, considering the objectives of this work. As explained in the Theoretical Section, this maximum productivity is reached when the working illuminated fraction γ in the PBR is rigorously equal to one for eukaryotic microalgae. Because the field of radiation or the γ fraction depends on the biomass concentration C_X (modifying the biomass productivity $\langle r_X \rangle$ for a given residence time τ), and to have a completely independent method of determination, the maximum productivities have been sought for each experiment by varying the residence time τ in the reactor in order to verify the criterion for the maximum of $\langle r_X \rangle$:

$$\frac{\partial \langle r_X \rangle}{\partial t} = 0 \quad (5)$$

Each productivity was determined by averaging biomass concentrations at steady-state and finally, the maximum productivity was deduced from the optimal biomass concentration $(C_X)_{opt}$, corresponding then to a working illuminated fraction $\gamma = 1$ (which verifies eq. 5), applying the mass balance for a stationary continuous culture:

$$\langle r_X \rangle_{max} = \frac{(C_X)_{opt}}{\tau} \quad (6)$$

Once the maximum productivity was obtained with the previous optimal conditions, the PBR was run in turbidostat mode by regulating the biomass concentration C_X inside the reactor for the torus PBR, and maintained in chemostat mode by fixing the input flow rate for the cylindrical PBR over at least six residence times. All the experimental determinations involved in this study (biomass concentration, pigment content...) were then conducted and reported in the Results Section of the article.

III.4.4. Analyses

III.4.4.1. Biomass dry weight

Depending on the cells concentration, 5 to 15 ml of algal suspension were filtered through a pre-dried pre-weighed glass-fiber filter (Whatman GF/F, 0.7 μm). Biomass concentration was washed with distilled water to eliminate the minerals. The filter was dried at 110°C for 24 hours, cooled in a dessicator and then weighed again. The final value was the average of three replicates.

III.4.4.2. Pigments contents

Culture samples of volume V_1 , containing 5 to 10×10^6 cells/mL, were centrifuged (13000 rpm, 2 minutes, 4°C). Subsequently the pellet was suspended in V_2 ml acetone 90% (vol.) overnight. The cells fragments were then separated by centrifugation (13000 rpm, 2 minutes, 4°C) and the optical density of the supernatant containing the pigments dissolved in acetone was measured with a spectrophotometer at 480, 630, 645, 665 and 750 nm (Jenway, England or Safas MC2, Monaco).

Three replicates were prepared and the chlorophyll *a*, *b* and the photo-protective carotenoids (PPC) were determined using the following relationships (Strickland and Parsons, 1968):

$$C_{Chl-a} = \{11.6 (OD_{665} - OD_{750}) - 1.31 (OD_{645} - OD_{750}) - 0.14 (OD_{630} - OD_{750})\} V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

$$C_{Chl-b} = \{20.7 (OD_{665} - OD_{750}) - 4.34 (OD_{665} - OD_{750}) - 4.42 (OD_{630} - OD_{750})\} V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

$$C_{PPC} = \{4.0 (OD_{480} - OD_{750})\} V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

where l is the cell path length (1 cm).

III.4.5. Determination of the radiative properties for *Chlamydomonas reinhardtii*

The optical properties (complex refractive index) of *Chlamydomonas* cells were determined from the pigment content as explained elsewhere (Pottier *et al.*, 2005). The radiative properties (i.e. the mass absorption coefficient Ea , the scattering coefficients Es and the backscattered fraction b) were then computed using the generalized Lorenz-Mie theory with the anomalous diffraction approximation (Van de Hulst, 1981; Cornet, 2007). As already shown in Pottier *et al.* (2005), *Chlamydomonas reinhardtii* cells were considered as Tchebychev particles $T_2(0.084)$ of order two, with a deformation parameter $\varepsilon = 0.084$ (Mishchenko and Travis, 1998). This representation was confirmed for any of the cultivation conditions considered. A size distribution of log-normal type with an equivalent radius of 4.0 μm and a deviation parameter $\ln \sigma = 0.17$ was retained. It must be noticed that this theoretical assessment of the radiative properties of *C. reinhardtii* from only basic knowledge as optical properties, shape and size distribution can also be performed from an experimental approach, as recently demonstrated (Berberoglu *et al.*, 2008).

III.4.6. Measurement of photosynthetic activity for different irradiances

III.4.6.1. Photosynthetic oxygen evolution

A Clark-type oxygen electrode of a (platinum cathode / silver anode) and a potassium chloride electrolyte was used to measure the production (or consumption) of oxygen by *Chlamydomonas reinhardtii* for different light intensities (measuring dissolved oxygen). A volume of 1.5 mL microalgal suspension with low pigment content (less than 4 μg of chlorophyll *a* / mL of culture, in order to neglect any light attenuation) is placed in the experimental device and then measurements are performed at 25°C for different PFD.

III.4.6.2. Fluorescence measurements

The saturation pulse method (adapted from Schreiber *et al.*, 1998) was used to measure the photosynthetic yield Φ_{PSII} using WaterPAM chlorophyll fluorimeter (Walz, Germany). The cuvette was filled with 5 mL of diluted suspension and dark-adapted for 15-

20 minutes. The algal suspension was stirred with an accessory stirring device mounted on top of the cuvette. After dark adaptation, a saturating light pulse (SP) was applied to measure F_0 and F_m . A constant incident light flux was then applied and F', F'_m were measured, giving the photosynthetic yield $\Phi_{PSII} = (F'_m - F') / F'_m$ using the Saturation Pulse Method. Experiments were repeated for different incident light fluxes to determine evolution of photosynthetic yields as a function of received light.

III.5. Results and Discussion

Experiments have been performed in continuous mode for different values of the incident hemispherical PFD q_Ω in the two PBR (torus and cylindrical). For each experiment, the maximum dry mass productivity $\langle r_X \rangle_{max}$ has been sought by varying the residence time in the reactor as described in the M&M Section in order to determine the optimal biomass concentration $\langle r_X \rangle_{max}$, corresponding to a working illuminated fraction $\gamma = 1$. As an example of the procedure, the typical results obtained in the flat torus PBR for an incident PFD $q_\Omega = 110 \mu\text{mol}_{hv} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ are reported on Figure (III.3). They clearly demonstrate that a maximum biomass productivity of $(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-2} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ is reached in this reactor for an optimal biomass concentration of $0.35 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ (γ fraction = 1) and a residence time of 30 hours. For lower residence times (i.e. lower biomass concentrations), the PBR operates in kinetic regime and photons are wasted at the rear surface of the reactor, leading to a lower biomass productivity. On the contrary, for higher residence times (i.e. higher biomass concentrations), a dark zone appears in the reactor, the γ fraction becomes lower than unity, so the respiration also contributes to decrease the biomass productivity.

Interestingly, Figure (III.3) also shows that keeping the working illuminated fraction γ around $1 \pm 15\%$ as it is the case of the three experimental points close to the maximum productivity $\langle r_X \rangle_{max}$ leads to only small differences ($\pm 10\%$), considering the standard deviation of the results (see hereafter and Table (III.2)). As a consequence, it appears difficult to use this experimental method for an accurate determination of the γ fraction, and in any case, the use of a predictive light transfer model is preferable (see hereafter and Appendix), once the irradiance of compensation G_C for the considered microorganism is known.

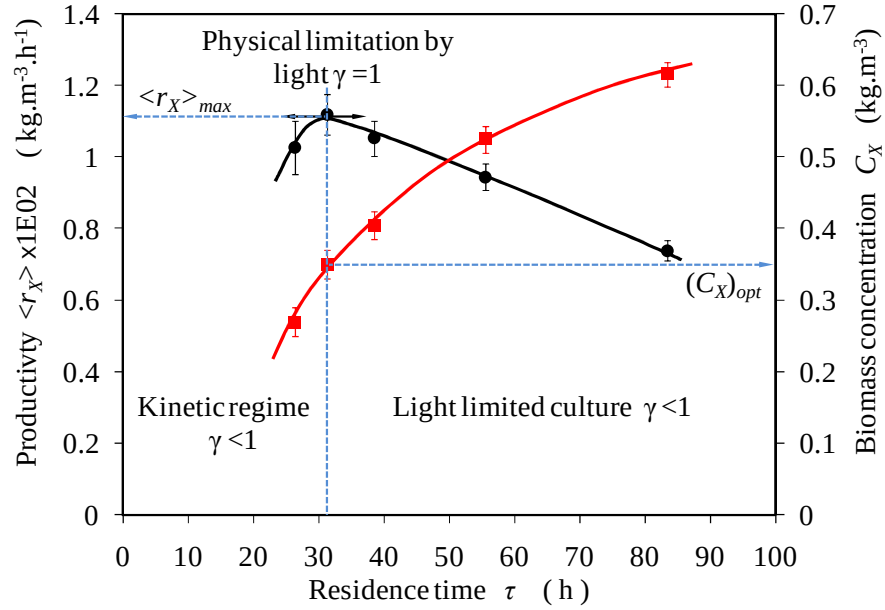


Figure III.3 : Experimental determination of the maximum biomass productivity (●) by varying the residence time in a flat torus PBR operating in continuous mode and illuminated by one side with an incident PFD $q_\gamma = 110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The corresponding biomass concentrations (■) are also reported. The optimal biomass concentration $(C_X)_{opt} = 0.35 \text{ kg.m}^{-3}$ corresponds to a working illuminated fraction $\gamma = 1$ and then to the maximum biomass productivity $\langle r_X \rangle_{max}$. For lower residence times (kinetic regime) or higher residence times (light limited culture with dark zone, $\gamma < 1$), the experimental biomass productivity decreases.

Interestingly, Figure (III.3) also shows that keeping the working illuminated fraction γ around $1 \pm 15\%$ as it is the case of the three experimental points close to the maximum productivity $\langle r_X \rangle_{max}$ leads to only small differences ($\pm 10\%$), considering the standard deviation of the results (see hereafter and Table (III.2)). As a consequence, it appears difficult to use this experimental method for an accurate determination of the γ fraction, and in any case, the use of a predictive light transfer model is preferable (see hereafter and Appendix), once the irradiance of compensation G_C for the considered microorganism is known.

Such efficient experimental method was nevertheless used in this work to approach the maximum biomass productivities ($\pm 10\%$) in the two PBR of different geometries for four values of the incident PFD preliminary defined ($q_\gamma = 50, 110, 500, 1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) in the engineering domain. For each steady-state regime, the optimal biomass concentration and the pigment content of the cells were determined, according to the maximum biomass productivity obtained. Independently of the geometry of the PBR used, the obtained results for pigment and biomass concentrations have demonstrated that the pigment content of the cells only varied with the incident PFD for *Chlamydomonas reinhardtii*. This clearly

appears on Table (III.1) which summarizes for the two PBR the decrease in mean pigment content at steady-state when increasing the incident PFD, together with the predictive values of the corresponding radiative properties, calculated from the method developed in the M&M Section, and necessary for applying light transfer model in each PBR.

Incident PFD $q_{\odot}$ ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	50	110	500	1000
Chlorophyll- <i>a</i> content (% DM)	2.3 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Chlorophyll- <i>b</i> content (% DM)	0.90 ± 0.06	0.80 ± 0.07	0.60 ± 0.04	0.45 ± 0.03
Carotenoids content (% DM)	0.70 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.35 ± 0.01
Mass absorption coefficient E_a (m^2/kg)	220 ± 10	200 ± 20	160 ± 10	130 ± 20
Mass scattering coefficient E_s (m^2/kg)	830 ± 50	850 ± 80	890 ± 70	910 ± 80
Back-scattered fraction b (dimensionless)	$0.0081 \pm 1 \cdot 10^{-4}$	$0.0080 \pm 1 \cdot 10^{-4}$	$0.0077 \pm 1 \cdot 10^{-4}$	$0.0080 \pm 1 \cdot 10^{-4}$

Table III.1: Mean pigment contents and radiative properties of *Chlamydomonas reinhardtii* 137 AH cultivated in autotrophic medium in two different PBR (flat-torus and cylindrical) and for different values of the incident PFD $q_{\odot}$. The pigment contents, only dependent on the incident PFD in any geometry, result from averaged values for the two PBR with the corresponding deviations.

On the other hand, the kinetic performances obtained for each incident PFD, i.e. the maximum volumetric biomass productivities in the two PBR are summarized on Table (III.2). These results confirm in the first place that, considering the standard deviations, there are no significant differences in the maximum productivities obtained for a given incident PFD $q_{\odot}$, as stated by the fact that the two engineering factors ($\gamma \cong 1$ and $a_{\text{light}} = 25 \text{ m}^{-1}$) are the same for the two kinds of PBR (see Theoretical Section). Thus, this result has to be related to the general discussion on PBR geometry influence on biomass productivities, and especially when comparing geometries of cylindrical (or tubular) and flat-panel type (most of PBR geometries falling into those two general categories). If the light-limiting transfer phenomenon is accurately controlled at the optimum (for a given incident PFD $q_{\odot}$, $\gamma = 1$ then $\langle \mathcal{A} \rangle = \langle \mathcal{A} \rangle_{\text{max}}$), only the specific illuminated area of the PBR, a_{light} , appears responsible for the maximum performances reached in steady-state continuous mode (optimal biomass concentration), demonstrating the relevance of the theoretical analysis developed above. In the second place, the results also agree with the maximum theoretical productivities calculated from eq (3) and postulated in the founding

article with an accuracy of 15% (Cornet et Dussap 2009) related to the different hypotheses postulated to establish the simple macroscopic formula. This confirms again the general interest and usefulness of the formula, extended here to the case of eukaryotic cells without further adaptation. Compared to prokaryotic cells having common electron carriers chains and no short-time respiration in the dark (Gonzalez de la Vara *et Gomez-Lojero*, 1986), the light fraction γ must be controlled more rigorously inside the PBR ($\gamma = 1$ instead of $\gamma \leq 1$) to reach the physical limitation by light corresponding to maximal performances, a dark zone having a negative effect due to the respiration of eukaryotic cells in the dark.

Incident PFD $q_{\square}$ ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	PBR geometry	Optimal biomass concentration (C_X) _{opt} ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	Experimental productivity ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	Theoretical maximal productivity (eq. 3) $\langle r_X \rangle_{\text{max}} \pm 15\%$ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	Deviation (%)	Calculated working illuminated fraction γ
50	Flat-torus	nd	nd	7.0×10^{-3}	nd	nd
	Cylindrical	0.25	$(6.2 \pm 0.6) \times 10^{-3}$		- 12	1.0
110	Flat-torus	0.35	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	1.3×10^{-2}	- 15	1.0
	Cylindrical	0.35	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$		- 8	0.86
500	Flat-torus	0.60	$(3.3 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	3.2×10^{-2}	+ 3	1.0
	Cylindrical	0.45	$(3.1 \pm 0.3) \times 10^{-2}$		- 3	1.0
1000	Flat-torus	1.1	$(4.6 \pm 0.5) \times 10^{-2}$	4.3×10^{-2}	+ 6	0.79
	Cylindrical	1.0	$(4.4 \pm 0.5) \times 10^{-2}$		+ 2	0.78

Table III.2: Experimental biomass productivities and corresponding optimal biomass concentrations obtained in two different PBR (flat-torus and cylindrical) cultivating *Chlamydomonas reinhardtii* at different incident PFD. Comparison with the theoretical maximum productivity $\langle r_X \rangle_{\text{max}}$ calculated using eq. (3). As explained in the text, this theoretical value is the same for the two PBR at a given PFD because they have the same illuminated specific area a_{light} . The γ fraction is also given, as calculated from the irradiance profiles theoretically demonstrated in Appendix.

This fine control of the working illuminated fraction $\gamma = 1 (\pm 15\%)$ clearly requires a thorough and physically consistent description of the light transfer problem in complex turbid media together with confident predictive values of the radiative properties for the considered microorganism (Table (III.1)). As already demonstrated (Pottier *et al.*, 2005) for the particular case of *Chlamydomonas reinhardtii*, the two-flux method provides a quite good approximation if the one-dimensional assumption can be done on the PBR. A generalization of this method, presented in Appendix of this paper, has been developed and used here to treat the two considered geometries of reactors.

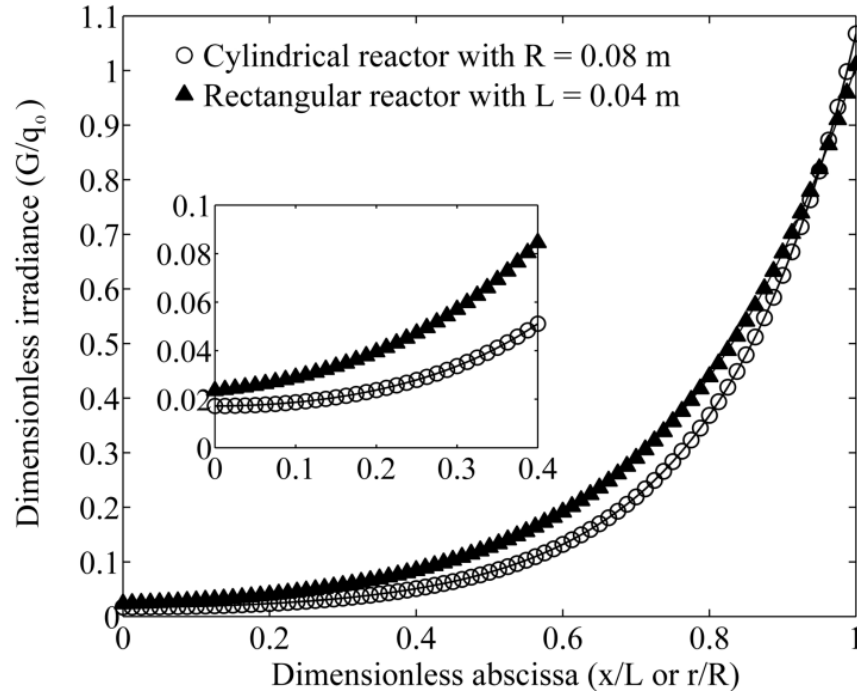


Figure III.4: Comparison of the normalized irradiance profiles (G/q_0) versus the normalized abscissa for the two kinds of PBR used in this study, corresponding to the case of maximum biomass productivity at incident PFD $q_0 = 500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. For the rectangular and torus PBR ($\blacktriangle$), the optimal concentration was $(C_X)_{\text{opt}} = 0.6 \text{ kg.m}^{-3}$ and the effective length was $L = 0.04 \text{ m}$ (solution given by eq. A9 in appendix); for the cylindrical PBR ($\circ$), the optimal concentration was $(C_X)_{\text{opt}} = 0.45 \text{ kg.m}^{-3}$ and the effective radius was $R = 0.08 \text{ m}$ (solution given by eq. A10 in appendix).

As an example, Figure (III.4) displays the normalized irradiance profiles (from the generalized two-flux method developed in appendix) in both PBR vs. normalized abscissa for $q_0 = 500 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ according to the results presented in Table (III.2), i.e. a mean maximum productivity of $3.2 \times 10^{-2} \text{ kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ for the two PBR and an optimal biomass concentration $(C_X)_{\text{opt}} = 0.6 \text{ kg.m}^{-3}$ for the rectangular torus PBR and $(C_X)_{\text{opt}} = 0.45 \text{ kg.m}^{-3}$ for the cylindrical PBR. At first sight, it clearly appears that different irradiance profiles are obtained in the two PBR, mainly considering first the differences of geometries and of characteristic lengths ($L = 0.04 \text{ m}$ for the rectangular torus PBR and $R = 0.08 \text{ m}$ for the cylindrical one), and second, the differences in optimal biomass concentrations experimentally observed for the determination of the maximum productivity in each geometry. Nevertheless, a zoom on Figure (III.4) clearly demonstrates in this very didactic example that almost the same irradiance is observed in the two PBR at the abscissa $x/L = r/R = 0$. Following the definition of the working illuminated fraction γ which is equal to $\gamma = 1$ in both cases (maximal productivities, hence no dark zone), this corresponds to the irradiance of compensation G_C of *C. reinhardtii*. Because this work was also aimed

at properly defining the value of the irradiance of compensation for *C. reinhardtii*, the calculation was repeated on all the experiments depicted in Table (III.2), using the light transfer model and the PFD-related radiative properties given by Table (III.1) with the corresponding optimal biomass concentration. Averaging all the irradiances obtained at the boundaries $x/L = r/R = 0$ eventually gives a good assessment of this irradiance of compensation for this strain of *Chlamydomonas reinhardtii*, namely:

$$G_C = 10 \pm 3 \mu\text{mol}_{hv} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \quad (7)$$

This value is probably the most accurate one that can be reached at the reactor scale, because the methodology developed in this work is the only way to conciliate radiant light transfer (pigment content, optical and radiative properties, field of irradiance), kinetics coupling (maximum biomass productivity with $\gamma=1$) in a complete energetically-consistent approach (thermodynamic analysis of the Z-scheme for the calculation of $\bar{\phi}$ and use of $\langle \mathcal{A} \rangle_{max}$ corresponding to the radiant light power density exchanged in the internal energy balances on both the photonic and material phases). Knowing G_C enables to recalculate the exact value of the working illuminated fraction γ corresponding to the experimental conditions actually stabilized in turbidostat or chemostat functioning for all the results depicted in Table (III.2). As explained above, the last column of Table (III.2) demonstrates that all the calculated γ fractions (with the high accuracy of the light transfer model) were obtained around the optimal condition $\gamma = 1 \pm 15\%$ (leading to the maximum biomass productivity within the experimental error deviation), except for the experiments at an incident PFD $q_\gamma = 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ where they are slightly lower. This small discrepancy probably comes in this case from a slight overestimation of the experimental biomass concentrations, explaining both higher experimental biomass productivities (in comparison to eq. 3) and lower γ fractions. For this high incident PFD indeed, the experimental optimal residence time is short, and the biomass concentration rather high, so it is more difficult to obtain very accurate values of these parameters considering that a small deviation of the flow rate can significantly modify the biomass concentration and consequently the productivity.

In addition to the obvious interest of the previous formula as a generic tool for PBR engineering, its use is also of practical interest. During the tests, the maximum volumetric productivity was indeed obtained by modifying progressively the residence time in the PBR. This long and tedious work can be achieved more simply, knowing the predictive

radiative properties (Ea, Es, b) and using them in the generalized two-flux method (or other more accurate method such as differential ordinates method). Thus, predicting the irradiance inside the PBR allows the theoretical determination of the optimal biomass concentration $(C_X)_{opt}$ corresponding to $\gamma=1$ in any geometry. If it is then possible to operate in turbidostat mode, the automatic adjustment of the residence time to achieve the requested biomass concentration will lead straightforwardly to the maximal productivity. In chemostat mode, eq. (3) will be used to assess the theoretical maximum biomass productivity, giving then the optimal residence time $\tau = \langle r_X \rangle_{max} / (C_X)_{opt}$ of the operation in a predictive manner.

It must be noticed that eq. (3) does not allow to determine the volumetric biomass productivity $\langle r_X \rangle$ for any value of the residence time in the PBR (see Figure (III.3)), but only maximal volumetric biomass productivity. If necessary, this more general objective requires having a general kinetic law, formulating the coupling between light transfer and biological kinetics and giving rise to the determination of local productivities before averaging them as written on eq. (1). This approach on eukaryotic microorganisms requiring further investigations remains out of the scope of this article and will be investigated later by the authors. However, if we are only interested in predicting the maximum volumetric biomass productivity, eq. (3) thus appears here to be very useful, practical and robust.

All of the previous results confirm that the criterion $\gamma=1$ (or here $G(0/L)=G(0/R)=G_C$) is only sufficient to guarantee maximum volumetric biomass productivities in PBR, independently of the geometry (for the same specific illuminated area) of the reactor and of the irradiance profile that was found different for the two types of PBR investigated (see Figure (III.4)). As explained in the founding article (Cornet and Dussap, 2009), this observation is just a consequence of the first principle of thermodynamics applied to the photonic and material phases of the reactor, involving that the maximum performances are fixed by the mean spatial volumetric radiant light power density $\langle \mathcal{A} \rangle_{max}$ absorbed in the PBR (see eq. 3) which becomes maximum as soon as $\gamma=1$ for any autotrophic microorganism. This emphasizes again (Cornet *et al.*, 1994; Cornet *et al.*, 1998; Pruvost *et al.*, 2008; Cornet and Dussap, 2009) that a physically-consistent understanding of PBR can never rely on the use of a mean spatial irradiance

$\langle G \rangle$ or I_{av} as is often the case in the specialized literature (Molina Grima *et al.*, 1996; Luo and Al-Dahan, 2003; Yun and Park, 2003). This kind of analysis in coupling radiant light transfer and growth kinetics generally leads to misinterpretations in kinetic modeling of PBR with a possible violation of the first principle of thermodynamics (see Pruvost *et al.*, 2008 for a detailed discussion in the particular case of hydrodynamics influence on light conversion in PBR). In the same way, this demonstrates that seeking to develop mutant strains of microalgae with small photosynthetic antenna (Beckmann *et al.*, 2009; Mitra *et al.* 2008) having lower absorption coefficients is not a good engineering solution to the development of optimal PBR because, in this case, it becomes more difficult to fulfill the condition $\gamma = 1$. On the contrary, the development of efficient large-scale PBR must rely on an important increase of both the specific illuminated area a_{light} and the biomass concentration $(C_X)_{opt}$ in continuous mode. Additionally, from an energetic point of view, it must be pointed out that the results presented in this paper, both at the light transfer model level (Figure (III.4)) and at the kinetic level (Table (III.2)) prove that the developed general formula (eq. 3) gives a good assessment of the decrease in energetic yield of conversion when increasing the incident PFD onto the reactor, whatever the geometry of the PBR, as long as a correct value of the half saturation constant K is provided (as initially postulated by the authors).

III.6. Conclusions and Perspectives

In this article, a useful, simple and practical formula predicting (only) the maximum volumetric biomass productivities in PBR, recently validated for cyanobacteria, was validated for eukaryotic microalgae using *Chlamydomonas reinhardtii*. This experimental validation was performed in two different PBR having the same specific illuminated area a_{light} , but with different conception (geometry and volume), corresponding to the two types of PBR most usually encountered, namely cylindrical and flat panel PBR. In this article, a useful, simple and practical formula predicting (only) the maximum volumetric biomass productivities in PBR, recently validated for cyanobacteria, was validated for eukaryotic microalgae using *Chlamydomonas reinhardtii*. This experimental validation was performed in two different PBR having the same specific illuminated area a_{light} , but with different conceptions (geometry and volume), corresponding to the two types of PBR most usually encountered, namely cylindrical and flat panel PBR. These two PBR having the same specific illuminated area, the same maximal volumetric biomass productivities were achieved for a given incident PFD

according to the proposed formula, thus confirming the purpose of this work. In addition, the maximal performances in both PBR were in complete agreement with theoretical maximal productivities assessed using the simple formula with its previously published predictive parameters calculated by knowledge approach of photosynthesis (except for the weak variable α and K specific parameters which have been identified more accurately for *C. reinhardtii*). This clearly confirms the considerable interest of this approach and the robustness of the published formula for a first estimate of the maximum kinetic performances of PBR, independently of the cultivated microorganism (cyanobacteria or microalgae), as stated and postulated in the founding article.

Nevertheless, the obtained results for the microalgae *C. reinhardtii* also demonstrated that for eukaryotic microorganisms having short-time respiration in the dark, it was necessary to accurately control the field of radiation in the PBR in order to reach the maximum biomass productivity, verifying that the illuminated working fraction remained in the range $\gamma = 1 \pm 15\%$. As established in this paper, this control may be accurately done in a predictive manner, using for this microorganism a generalized two-flux method with independent calculation of the radiative properties (mainly depending on the pigment content and the shape of the cells) to solve the radiative transfer equation in the PBR, and leading to a very good assessment of the optimal biomass concentration fulfilling the criterion $\gamma = 1$ in continuous luminostat functioning. Thus, this optimal concentration can be easily controlled if it is possible to operate in turbidostat, or lead to the assessment of the optimum residence time in the reactor by combining this value with the simple validated formula for $\langle r_X \rangle_{max}$ if working in chemostat.

Finally, this article confirms that the optimal engineering of PBR mainly consists in managing only three basic parameters which are the specific illuminated area a_{light} , the illuminated working volume fraction in the photobioreactor γ , and the mean value of the incident hemispherical PFD $q_\cap$ (if it is not imposed as in the case of solar PBR), independently of most of the biological microorganism characteristics. Considering the experimental and theoretical difficulties of the presented work, the obtained results appear satisfactorily, thereby contributing to make sense and coherence with the scientific methodology debated along this article.

However, it must be emphasized that, in spite of its robustness, the proposed formula is limited to assess the maximum kinetic performance of photobioreactors. Further studies will aim at extending this predictive approach to the general determination of biomass

productivity in PBR cultivating eukaryotic microorganisms, both in kinetic regime and in light-limited conditions with low values of the illuminated fraction. This will require developing and validating a general local kinetics law properly formulating the coupling with any field of radiation, at different levels of description, considering the relaxation phenomena involved in the so-called dynamic light-dark cycles. Clearly, this additional work is also necessary when considering solar PBR for which the incident PFD is continuously varying with time. In this case, as discussed in our first paper (Cornet et Dussap 2009), the use of eq. (3) is always possible by defining a mean averaged incident PFD (during a given period of time) enabling to obtain a theoretical maximum biomass productivity in a given location. Nevertheless, practically speaking, this value remains a hypothetical optimum because the actual control of a working illuminated fraction $\gamma = 1$ appears indeed rigorously impossible considering the dynamic of incident PFD variations. However, in this situation, eq. (3) and the theoretical analysis performed along this article may still keep some interest for engineering considerations providing both a value for the target of optimal biomass productivities together with theoretical tools for radiative transfer enabling to develop for example predictive functional control (Richalet et O'Donovan, 2009) of the solar PBR to approach the maximum time-averaged productivity.

ACKNOWLEDGMENT

A part of this work has been founded by the “PhotobioH2” ANR Program (French National Program), and by the European FP7-Program “SolarH2”.

NOMENCLATURE

a_{light}	Specific illuminated area for any given photobioreactor	[m ⁻¹]
$\mathcal{A}$	Local volumetric radiant power density absorbed	[μmol.s ⁻¹ .m ⁻³]
b	Back-scattered fraction for radiation	[dimensionless]
c_1	Generalized abscissa in any one-dimensional frame of reference	[m]
C_X	Biomass concentration	[kg.m ⁻³ or g.L ⁻¹]
D	Total diameter of the cylindrical photobioreactor	[m]
Ea	Mass absorption coefficient	[m ² .kg ⁻¹]
Es	Mass scattering coefficient	[m ² .kg ⁻¹]
f_d	Design dark volume fraction of any photobioreactor	[dimensionless]
G	Local spherical irradiance	[μmol.s ⁻¹ .m ⁻²]
I	Specific radiant intensity (Luminance)	[μmol.s ⁻¹ .m ⁻²]
K	Half saturation constant for photosynthesis	[μmol.s ⁻¹ .m ⁻²]
L	Total length of the rectangular photobioreactor	[m]
m	Number of angle for the considered frame of reference	[-]
$p(\theta, \theta')$	Phase function for scattering	[dimensionless]
q	Photon flux density in the PAR	[μmol.s ⁻¹ .m ⁻²]
$q_\cap$	Hemispherical incident photon flux density (PFD) in the PAR	[μmol.s ⁻¹ .m ⁻²]
r	Radius in cylindrical coordinates	[m]
r_X	Biomass volumetric growth rate (productivity)	[kg.m ⁻³ .h ⁻¹]
R	Total radius of the cylindrical photobioreactor	[m]
R_S	Specular reflected fraction of light for the stainless steel wall at the rear of the torus reactor	[dimensionless]
S_{light}	Illuminated surface of any photobioreactor	[m ²]
V	Volume	[m ³ or L]
V_ℓ	Illuminated volume inside the photobioreactor	[m ³ or L]
V_d	Dark volume inside the photobioreactor	[m ³ or L]
x	Length in rectangular coordinates	[m]

Greek letters

α	Linear scattering modulus	[dimensionless]
γ	Fraction for working illuminated volume in the photobioreactor	[dimensionless]
δ	Extinction coefficient for the two-flux method	[m ⁻¹]
$\delta(\theta - \theta_c)$	Delta Dirac function	[-]
θ, θ'	Polar angle	[rad]
ρ_M	Maximum energetic yield for photon conversion	[dimensionless]
τ	Hydraulic residence time	[h]
ϕ_r	Angle in a cylindrical frame of reference	[rad]

$\bar{\phi}$	Mean mass quantum yield for the Z-scheme of photosynthesis	$[\text{kg}_X \cdot \mu\text{mol}_{\text{hv}}^{-1}]$
Ω	Solid angle	[rad]
$\mathbf{\Omega}$	Unit directional vector	[dimensionless]

Subscripts

0	Relative to the input surface of a rectangular photobioreactor
c	Relative to the compensation point for photosynthesis
d	Relative to a dark zone in the photobioreactor
ℓ	Relative to an illuminated zone in the photobioreactor
max	Maximum value for a radiant power density $\mathcal{A}$ or a volumetric productivity r_X
opt	Relative to the optimal value for biomass concentration.

Superscripts

+	Relative to the positive hemisphere in defining the radiation field
-	Relative to the negative hemisphere in defining the radiation field.

Other

$\bar{X}$	Time averaging
$\langle X \rangle = \frac{1}{V} \iiint_V X \, dV$	Spatial averaging

Abbreviations

DM	Dry mass
PAR	Photosynthetically active radiation
PBR	Photobioreactor
PFD	Photon flux density
RTE	Radiative transfer equation

REFERENCES

1. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 2006; 101: 87-96.
2. Carvalho AP, Meireles LA, Malcata FX. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 2006; 22: 1490-1506.
3. Eriksen NT. The technology of microalgal culturing. *Biotechnol. Lett.* 2008; 30: 1525-1536.
4. Janssen M, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up and future prospects. *Biotechnol. Bioeng.* 2002; 81: 193-210.
5. Cornet J-F, Dussap CG. A simple and reliable formula for assessment of maximum volumetric productivities in photobioreactors. *Biotechnol. Prog.* 2009; 25: 424-435.
6. Cornet J-F, Dussap CG, Dubertret G. A structured model for simulations of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors – I. Coupling between light transfer and growth kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 1992; 40: 817-825.
7. Gonzalez de la Vara L, Gomez-Lojero C. Participation of plastoquinone, cytochrome c553 and ferredoxin-NADP⁺ oxido reductase in both photosynthesis and respiration in *Spirulina maxima*. *Photosynthesis Research.* 1986; 8: 65-78.
8. Pruvost J, Cornet J-F, Legrand J. Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: An energetically consistent analysis. *Chem. Eng. Sci.* 2008; 63: 3679-3694.
9. Cornet J-F, Favier L, Dussap CG. Modeling stability of photoheterotrophic continuous cultures in photobioreactors. *Biotechnol. Prog.* 2003; 19: 1216-1227.
10. Berberoglu H, Pilon L, Melis A. Radiation characteristics of *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 and its truncated chlorophyll antenna transformants *tla1*, *tlaX* and *tla1-CW⁺*. *J. Hydrogen Energy.* 2008; 33: 6467-6483.
11. Pottier L, Pruvost J, Deremetz J, Cornet J-F, Legrand J, Dussap CG. A fully predictive model for one-dimensional light attenuation by *Chlamydomonas reinhardtii* in a torus photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2005; 91: 569-582.
12. Cornet J-F, Marty A, Gros J-B. Revised technique for the determination of mean incident light fluxes on photobioreactors. *Biotechnol. Prog.* 1997; 13: 408-415.
13. Strickland JDH, Parsons TR. A practical handbook of seawater analysis: pigment analysis. Bull. Fish. Res. Board Canada, 1968; 167.
14. Van de Hulst HC. Light scattering by small particle (2nd ed.). New York: Dover publications Inc., 1981.
15. Cornet J-F. Procédés limités par le transfert de rayonnement en milieu hétérogène. Etude des couplages cinétiques et énergétiques dans les photobioréacteurs par une approche thermodynamique. Habilitation à Diriger des Recherches, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 2007, n° d'ordre 236.
16. Mishchenko MI, Travis LD. Capabilities and limitations of a current FORTRAN implementation of the T-matrix method for randomly oriented, rotationally symmetric scatterers. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.* 1998; 60: 309-324.
17. Schreiber U, Bilger W, Hormann H, Neubauer C. Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: Ragavendra AS (Ed.). Photosynthesis: a comprehensive treatise. Cambridge University Press, Cambridge, 1998: 320–336.
18. Cornet J-F, Dussap CG, Gros J-B. Conversion of radiant light energy in photobioreactors. *AIChE. J.* 1994; 40: 1055-1066.

19. Cornet J-F, Dussap CG, Gros J-B. Kinetics and energetics of photosynthetic microorganisms in photobioreactors. Application to *Spirulina* growth. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 1998; 59: 153-224.
20. Molina Grima E, Fernandez Sevilla JM, Sanchez Perez JA, Garcia Camacho F. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *J. Biotechnol.* 1996; 45: 59-69.
21. Luo H-P, Al-Dahhan MH. Analyzing and modeling of photobioreactors by combining first principles of physiology and hydrodynamics. *Biotechnol. Bioeng.* 2003; 85: 382-393.
22. Yun Y-S, Park JM. Kinetic modeling of the light-dependent photosynthetic activity of the green microalga *Chlorella vulgaris*. *Biotechnol. Bioeng.* 2003; 83: 303-311.
23. Beckmann J, Lehr F, Finazzi G, Hankamer B, Posten C, Wobbe L, Kruse O. Improvement of light to biomass conversion by de-regulation of light-harvesting protein translation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biotechnol.* (2009), doi:10.1016/j.jbiotec.2009.02.015
24. Mitra M, Melis A. Optical properties of microalgae for enhanced biofuels production. *Opt. Express.* 2008; 16: 21807-21820.
25. Richalet J, O'Donovan D. Predictive functional control, principles and industrial applications. Springer, 2009.
26. Chandrasekhar S. Radiative transfer. New York: Dover publications Inc., 1960.
27. Siegel R, Howell JR. Thermal radiation heat transfer (4th ed.). New York: Taylor and Francis, 2002.
28. Cornet J-F, Dussap CG, Gros J-B, Binois C, Lasseur C. A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors. *Chem. Eng. Sci.* 1995, 50: 1489-1500.

APPENDIX**The generalized two-flux method (in rectangular and curvilinear coordinates) for the irradiance of compensation G_C and the $\gamma = 1$ theoretical calculations.**

Even if it is not the case for any microorganism, the two-flux approximation for solving the one-dimensional radiative transfer equation (RTE) in a photobioreactor has been demonstrated to be relevant for *Chlamydomonas* turbid suspensions (Pottier *et al.*, 2005). We develop in this appendix a general method with a unified presentation of the one-dimensional RTE problem in Cartesian or cylindrical geometries as concerned in this article. Nevertheless, the demonstration will be restricted to the practical condition encountered in this work, i.e. a quasi-collimated field of radiation, even if our approach can be generalized to any other assumption by introducing the degree of collimation n as the n^{th} moment of the one-dimensional RTE (Cornet, 2007).

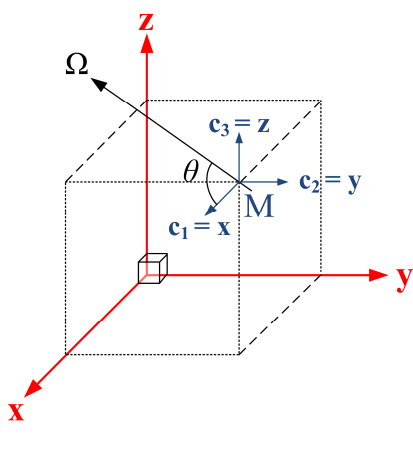
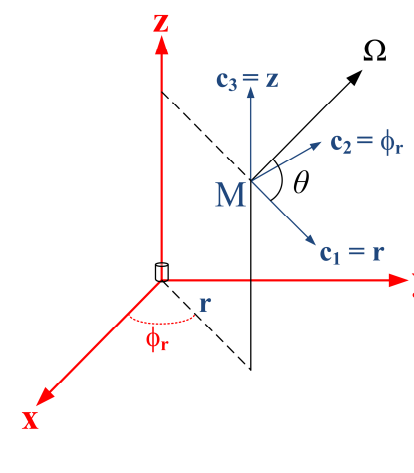
Defining properly a general frame of reference for any geometry (the demonstration can be extended to spherical coordinates), as can be seen on scheme 1, enables to write the one-dimensional operator of the RTE in the general form:

$$\nabla \cdot (\boldsymbol{\Omega} I) = \boldsymbol{\Omega} \cdot \nabla I = \frac{dI}{dc_1} \cos \theta \quad (\text{A1})$$

in which I is the spectrally averaged radiant intensity in the PAR and c_1 a general axis representing the length x in Cartesian coordinates, or the radius r in cylindrical coordinates. This immediately leads to the generalized one-dimensional form of the RTE (C_X being the biomass concentration in the considered medium):

$$\cos \theta \frac{dI}{dc_1} = -(Ea + Es)C_X I + \frac{EsC_X}{2} \int_0^\pi I p(\theta, \theta') \sin \theta' d\theta' \quad (\text{A2})$$

in which the so-called radiative properties of the microorganism appeared as entry parameters (the mass absorption Ea and scattering Es coefficients together with the phase function for scattering $p(\theta, \theta')$).

<i>Cartesian system</i>	<i>Cylindrical system</i>
	
$m = 0$	$m = 1$

Scheme 1: Definition of the moving frame of reference (point M) and of the associated unit vector Ω linked to the unified coordinate c_1 (representing x or r in any geometry) by a polar (or zenithal) angle θ (the problem is here independent of the azimuth). Note that the definition of θ in cylindrical coordinates is different from the conventional choice of ϕ_r but enables to define the one-dimensional RTE operator in the same manner for any system of coordinates. The parameter m corresponds to the number of angles involved in the moving frame of reference.

The two-flux method (Chandrasekhar, 1960; Siegel and Howell, 2002) then supposes to postulate an angular distribution of the radiant intensities $I^\pm$ (historically, the diffuse hypothesis renders these intensities independent of θ) on each hemisphere of the system (positive and negative values of $\cos\theta$). With the assumption of a quasi-collimated field of radiation used in this work, the respective intensities can be written, using the δ Dirac function:

$$\begin{aligned} I^+(\theta) &= I^+ \delta(\theta - \theta_c) \\ I^-(\theta) &= I^- \delta(\theta - \theta_c) \end{aligned} \quad (\text{A3})$$

enabling to write a system of two equations instead of eq. (A2), after averaging on each hemisphere and using the mathematical properties of the Dirac function (considering a normally illuminated medium with $\theta_c = 0$):

$$\begin{cases} \frac{dI^+}{dc_1} = -EaC_x I^+ - bEsC_x (I^+ - I^-) \\ \frac{dI^-}{dc_1} = EaC_x I^- - bEsC_x (I^+ - I^-) \end{cases} \quad (\text{A4})$$

in which the back-scattered fraction is defined by $b = \frac{1}{2} \int_{\pi/2}^{\pi} p(\theta, \theta') \sin \theta d\theta$. This pair of equations can be combined to give a first independent relation available over the total solid angle Ω :

$$\frac{d(I^+ + I^-)}{dc_1} = -(Ea + 2bEs)C_x(I^+ - I^-) \quad (A5)$$

Additionally, the solution intensities need to verify the local balance of radiant energy. From our description of the radiation field, one has respectively for the definitions of the irradiance G and the radiant flux density q :

$$\begin{aligned} G &= \iint_{4\pi} I \delta(\theta - \theta_c) d\Omega = I^+ + I^- \\ q &= \iint_{4\pi} I \delta(\theta - \theta_c) \cos \theta d\Omega = I^+ - I^- \end{aligned} \quad (A6)$$

leading to write for this balance on the photonic phase in any geometry:

$$\frac{d(I^+ - I^-)}{dc_1} + \frac{m}{c_1}(I^+ - I^-) = -EaC_x(I^+ + I^-) \quad (A7)$$

Equations (A5) and (A7) can then be solved easily by differentiating eq. (A5) and reporting in eq. (A7), leading to the master governing equation of the radiant light transfer problem in the general form:

$$\frac{d^2(I^+ + I^-)}{dc_1^2} + \frac{m}{c_1} \frac{d(I^+ + I^-)}{dc_1} - EaC_x(Ea + 2bEs)C_x(I^+ + I^-) = 0 \quad (A8)$$

Finally, the irradiance profiles can be found with integration of eq. (A8), postulating a concrete geometry and corresponding boundary conditions.

First, in case of a rectangular reactor ($m = 0$) illuminated by one side at $x = L$ with an incident homogeneous hemispherical and quasi-collimated PFD $I^- = I_L^- = q_\cap$ and considering a specular reflection by the stainless steel wall R_s at the rear ($x = 0$ in this case), one obtains the result:

$$\frac{G}{q_\cap} = 2 \frac{[(1 + \alpha) - R_s(1 - \alpha)] \exp(\delta x) + [R_s(1 + \alpha) - (1 - \alpha)] \exp(-\delta x)}{(1 + \alpha)^2 \exp(\delta L) - (1 - \alpha)^2 \exp(-\delta L) + R_s(1 - \alpha)^2 [\exp(-\delta L) - \exp(\delta L)]} \quad (A9)$$

with the definitions:

$$\alpha = \sqrt{Ea/(Ea + 2bEs)}$$

$$\delta = C_x \sqrt{Ea(Ea + 2bEs)}$$

Particular attention must be paid to the fact that the illumination enters the reactor by the $x = L$ wall (instead of the conventional choice at $x = 0$) in order to compare the profile with the cylindrical case having necessarily a boundary condition for the incident flux at the wall $r = R$.

In the case of a cylindrical reactor ($m = 1$) radially illuminated at $r = R$ with an incident homogeneous hemispherical and quasi-collimated PFD $I^- = I_R^- = q_\cap$, one has from integration of eq. (A8) for the irradiance profile:

$$\frac{G}{q_\cap} = 2 \frac{I_0(\delta r)}{I_0(\delta R) + \alpha I_1(\delta R)} \quad (\text{A10})$$

in which $I_0(r)$ and $I_1(r)$ are respectively the zero and one-order modified Bessel functions of first kind. Clearly, this result is different from the solution proposed by the authors a long time ago (28) which only appeared as an approximation of the present rigorous formula for high values of δ (i.e. high values of the biomass concentration).

Equations (A9) and (A10) can then be plotted for reduced abscissa x/L or r/R with given radiative properties of microorganisms (like *Chlamydomonas* in this study), enabling to compare the irradiance profiles in reactors of different geometries. In the case of maximal productivities, then the illuminated fraction $\gamma = 1$ and, according to the working illuminated fraction definition, the irradiance of compensation G_c is obtained at $x/L = 0$ for rectangular geometries or $r/R = 0$ for cylindrical geometries. Alternatively the hypothesis of optimal functioning can be confirmed by calculating the γ value for any geometry or biomass concentration, using optical properties and the value of G_c for a given strain. This work has been done on Figure (III.4) in the core of this paper for the practical case of a rectangular geometry ($L = 0.04$ m) and of a cylindrical geometry ($R = 0.08$ m) with an incident PFD of $500 \mu\text{mol}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

*Chapitre IV: Établissement d'un modèle cinétique de la croissance photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii* en photobioréacteurs*

Résumé:

*Dans cette partie qui constitue le cœur de ce mémoire, et après l'étude menée dans le chapitre précédent ciblée sur l'obtention de la productivité volumique maximale pour *Chlamydomonas reinhardtii*, nous essayerons d'étendre ici la formulation théorique proposée pour trouver une loi valable quels que soient les régimes de fonctionnement dans le photobioréacteur. La loi cinétique sera basée sur une approche TPI (Thermodynamique des Processus Irréversibles) appliquée ici dans le cas d'un micro-organisme eucaryote. La validation de cette loi pour différents régimes de fonctionnement (photolimitation, limitation physique stricte) démontrera au final la robustesse et la fiabilité d'une telle approche pour prédire la productivité des micro-organismes photosynthétiques en PBR.*

IV. Établissement d'un modèle cinétique de la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* en photobioréacteurs

IV.1. Introduction

La modélisation joue un rôle essentiel dans tout procédé, mais ceci est particulièrement vrai pour les bioprocédés tels que les PBR où le comportement du système est le résultat de l'interaction de plusieurs phénomènes difficiles à appréhender comme le transfert de rayonnement et la croissance photosynthétique.

Dans le chapitre précédent, nous avons utilisé une formule établie par Cornet et Dussap (2009) pour prédire la productivité volumique maximale dans deux géométries différentes de PBR en limitation physique stricte par la lumière. Cette observation est une conséquence de l'application du premier principe de la thermodynamique sur les phases photonique et matérielle du réacteur, impliquant que les performances maximales sont fixées par la vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie radiante photonique $\langle \mathcal{A} \rangle_{max}$ dans le réacteur et qui devient maximale dès que $\gamma = 1$ pour tout micro-organisme photo-autotrophe (Cornet et Dussap 2009).

Bien que la formule proposée par ces auteurs soit valable pour les procaryotes dans une gamme opératoire large (à condition d'avoir $\gamma \leq 1$ et de mener les cultures en milieu autotrophe), son utilisation est limitée dans le cas des eucaryotes. Dans ce dernier cas, elle ne concerne en effet que le cas de la photolimitation stricte ($\gamma=1$) dans la mesure où l'apparition d'une zone sombre provoque une baisse de productivité chez ces micro-organismes. Une extension de cette formule pour les organismes eucaryotes a donc été menée en vue de pouvoir prédire la croissance de la microalgue *C. reinhardtii* en lumière continue, pour les différentes conditions de fonctionnement en photolimitation ($\gamma \leq 1$).

IV.2.1. Modélisation de la croissance photosynthétique en PBR

L'établissement d'un modèle de connaissance prédictif des PBR passe inévitablement par la formulation des couplages cinétique et énergétique avec le champ de rayonnement au sein du réacteur (Cornet, 2007). La connaissance de la distribution de l'atténuation de l'énergie radiante en PBR, donnée par la résolution (simplifiée) de l'équation des transferts radiatifs (méthode à 2 flux, méthode différentielle des ordonnées discrètes), permet d'accéder au calcul des vitesses volumétriques locales de croissance de la

biomasse (VVLCB) nommée r_x . Ces vitesses peuvent être obtenues de façon entièrement prédictive en formulant le couplage entre le transfert de rayonnement, le rendement quantique de la photosynthèse (aspects énergétiques et cinétiques), et la stœchiométrie résultante de la synthèse des principaux constituants de la biomasse (approche stœchiométrique biochimiquement structurée).

La vitesse volumétrique moyenne de croissance de la biomasse (VVMCB) dans tout le réacteur (nommée $\langle r_x \rangle$) est alors obtenue par intégration sur le volume réactionnel, permettant au final la détermination robuste des performances cinétiques du procédé (productivité en particulier).

IV.3. Établissement du modèle cinétique pour *Chlamydomonas reinhardtii*

Considérons un PBR plan (rectangulaire) de volume réactionnel V_R , contenant une suspension microalgale de *C. reinhardtii* et éclairé d'un seul côté par une source lumineuse fournissant une densité de flux hémisphérique photonique q_ϕ . Ce PBR est représenté schématiquement par la figure (IV.1). Suivant le champ de radiation, le réacteur est divisé en deux volumes V_l et V_d séparés par le point de compensation G_C (voir chapitre I pour plus de détails).

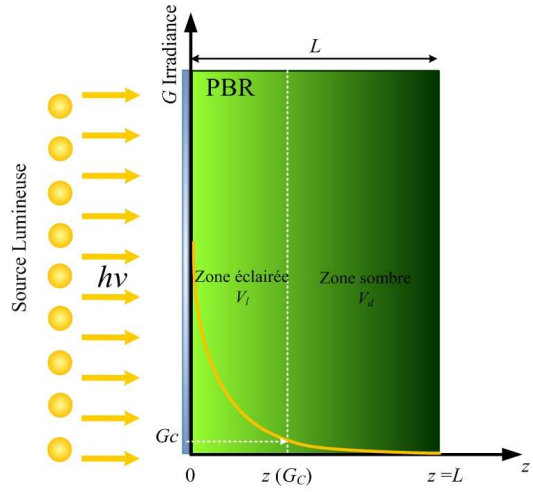


Figure IV.1 : Représentation schématique d'un photobioréacteur rectangulaire éclairé d'un seul côté.

D'un point de vue cinétique, la vitesse volumétrique moyenne dans le réacteur peut être formulée mathématiquement comme suit (Cornet, 2007):

$$\begin{aligned} \langle r_x \rangle &= \frac{1}{V_R} \iiint_{V_R} r_x dV = \gamma \frac{1}{V_l} \iiint_{V_l} r_{x,l} dV + (1-\gamma) \frac{1}{V_d} \iiint_{V_d} r_{x,d} dV \\ &= \frac{1}{V_R} \left[\iiint_{V_l} r_{x,l} dV + \iiint_{V_d} r_{x,d} dV \right] \end{aligned} \quad (IV.1)$$

avec r_x la vitesse volumétrique locale de la croissance de la biomasse.

Dans le cas d'une cyanobactérie, (comme *A. platensis*), ayant la même chaîne de transporteur d'électrons impliquée dans la photosynthèse et la respiration, et en prenant en considération le temps de relaxation nécessaire pour que le métabolisme cellulaire bascule

de la photosynthèse à la respiration (environ 1 minute) (Cornet, 1992), Cornet et Dussap (2009) ont pu considérer que $r_{X,d} = 0$ dans le volume sombre V_d (pas d'activité respiratoire ni photosynthèse). Cette hypothèse a été supposée comme valable même dans un réacteur partiellement éclairé avec une fraction volumique éclairée $\gamma < 1$. Par conséquent, la vitesse volumétrique maximale de croissance est atteinte (tout en restant constante) dès que $\gamma \leq 1$, ce qui correspond au cas classique de la limitation physique par la lumière (tous les photons sont captés à l'intérieur du réacteur et utilisés pour les réactions photosynthétiques).

Dans la mesure où les mécanismes photosynthétiques et respiratoires coexistent, cette supposition n'est guère valable dans le cas des eucaryotes, comme la microalgue *C. reinhardtii* pris comme micro-organisme modèle durant cette étude. La productivité maximale n'est alors atteinte que dans le seul cas où γ est strictement égale à 1. Ceci a été montré dans le chapitre précédent, pour deux PBR de géométries différentes.

La relation (IV.1), purement mathématique, ne précise rien sur les définitions de r_X , $r_{X,l}$ et de $r_{X,d}$, mais stipule simplement que le réacteur peut être divisé en deux zones cinétiques, à savoir les volumes éclairé V_l et sombre V_d , présentant éventuellement des lois cinétiques différentes. Si on définit $r_{X,p}$ comme une loi de couplage au champ de radiation uniquement valable dans le volume éclairé V_l (liée au chloroplaste), et de même $r_{X,r}$ comme une loi uniquement valable dans la zone sombre (liée à la mitochondrie), alors même si $V_R = V_l + V_d$, la relation (IV.1) ne prouve pas forcément que $r_X = r_{X,p} + r_{X,r}$.

En effet, pour vérifier que $r_X = r_{X,p} + r_{X,r}$, il faut que les trois conditions suivantes soient toujours vérifiées :

- $r_{X,p} = 0$ dans toute la zone sombre V_d ,
- $r_{X,r} = 0$ dans toute la zone éclairée V_l ,
- $r_{X,p} = r_{X,r} = 0$ à la frontière entre V_l et V_d .

Dans le cas d'une microalgue eucaryote, aucune de ces trois conditions ne peut être correcte, car cela entre en contradiction avec la définition d'un point de compensation qui définit la fraction volumique éclairée γ (à la frontière entre V_l et V_d) et qui est la résultante d'un équilibre à ce point entre la photosynthèse et la respiration, non nulle chacune dans les zones considérées V_d et V_l .

Le réacteur ne peut donc être divisé en deux zones indépendantes, pour rester compatible avec les évolutions continues des métabolismes photosynthétiques et respiratoires qui coexistent sur l'ensemble du PBR. Pour résoudre le problème d'une telle discontinuité, il faut donc chercher une loi de la vitesse volumétrique locale r_X continue et dérivable sur l'ensemble des volumes de cultures, éclairés et sombres. Ceci conduira à reformuler l'équation (V.1) d'une façon triviale :

$$\langle r_X \rangle = \frac{1}{V_R} \iiint_{V_R} r_X dV = \frac{1}{V} \left[\iiint_{V_l} r_X dV + \iiint_{V_d} r_X dV \right] \quad (\text{IV.2})$$

De façon évidente, cela ne signifie pas que les deux volumes V_l et V_d ne sont plus présents, et que le rôle de la fraction éclairée γ n'existe plus (bien au contraire, puisque la zone sombre dans le PBR aura un effet important sur la productivité obtenue avec un micro-organisme eucaryote).

IV.3.2. Formulation de la loi cinétique

La forme de la loi recherchée dans le cas de *C. reinhardtii* (ou éventuellement toute microalgue eucaryote) doit tenir compte des remarques du paragraphe précédent (loi continue sur V_R) et doit être compatible avec la notion du point de compensation. Cela a donc mené à une écriture de la vitesse locale de la croissance de la biomasse comme la somme de deux termes, l'un étant lié à la photosynthèse et l'autre à la respiration, suivant :

$$r_X = r_{X,p} + r_{X,r} \quad (\text{IV.3})$$

Comme déjà cité dans le chapitre précédent, Cornet et Dussap 2009 ont proposé une formulation de la vitesse volumétrique locale de la croissance de la biomasse $r_{X,p}$ pour la cyanobactérie *A. platensis*:

$$r_{X,p} = \rho \bar{\phi} \mathcal{A} = \rho \bar{\phi} Ea C_X G \quad (\text{IV.4})$$

avec :

- ρ et $\bar{\phi}$, respectivement le rendement énergétique et le rendement quantique stœchiométrique massique (ils seront détaillés dans les paragraphes suivants),
- Ea , le coefficient massique d'absorption
- C_X , la biomasse
- $\mathcal{A}$ la vitesse volumétrique locale d'absorption de l'énergie radiante (VVLAER), et G l'irradiance locale, données par :

$$\mathcal{A} = \int_{PAR} \int_{4\pi} E a_{\lambda} C_X G_{\lambda} d\lambda d\Omega \quad (IV.5)$$

$$G = \int_{400}^{700} G_{\lambda} d\lambda \quad (IV.6)$$

Dans la mesure où $r_{X,p}$ représente la contribution de la part photosynthétique de la croissance, la formulation donnée par l'équation VI.3 pour la croissance d'*A. platensis* a donc été reprise ici pour *C. reinhardtii*.

En ce qui concerne le terme $r_{X,r}$ de l'équation (IV.3), il doit prendre idéalement en compte l'évolution de la respiration vis-à-vis de la lumière (Gonzalez de la Vara et Gomez-Lojero, 1986). Une loi de type $(-\mu_s, C_X)$, qui apparaît dans la plupart des modèles cinétiques ne peut guère traduire l'inhibition de la respiration à la lumière. Une loi symétrique sur la partie respiration intégrant un terme $\frac{K_r}{K_r + G}$ a donc été proposée. Cela traduit que :

- la respiration est maximale à $G = 0$
- la respiration diminue dans la partie éclairée du réacteur ou l'irradiance n'est pas nulle.

Si de plus, on cherche à se doter d'outils prédictifs sur la mitochondrie équivalents à ceux développés sur la partie chloroplaste, on cherchera à écrire le couplage cinétique de la zone sombre à partir de la vitesse spécifique de régénération des cofacteurs sur la chaîne respiratoire J_{NADH_2} (en connexion directe avec le rapport P/O), du paramètre d'inhibition de la respiration à la lumière K_r et du coefficient stœchiométrique de régénération des cofacteurs sur la chaîne respiratoire ν_{NADH_2-X} . Cela nous permet au final d'écrire le terme $r_{X,r}$:

$$r_{X,r} = \frac{J_{NADH_2} M_X}{\nu_{NADH_2-X}} \frac{K_r}{K_r + G} \quad (IV.7)$$

Finalement, la loi cinétique recherchée est donc du type :

$$r_X = \left[\rho_M \frac{K}{K + G} \bar{\phi} E a G - \frac{J_{NADH_2} M_X}{\nu_{NADH_2-X}} \frac{K_r}{K_r + G} \right] C_X \quad (IV.8)$$

La loi étant continue, la vitesse moyenne sera obtenue par une simple intégration sur l'ensemble du volume V_R du PBR (indépendamment des zones éclairées et sombres).

$$\text{et } \langle r_X \rangle = \frac{1}{V_R} \iiint_{V_R} r_X dV \quad (IV.9)$$

Quelques remarques doivent être soulignées concernant l'équation (IV.8) de la loi cinétique:

- Le premier terme $\left(\rho_M \frac{K}{K+G} \bar{\phi} Ea G \right)$ sera largement majoritaire dans la zone éclairée V_l ,

et le deuxième terme $\left(\frac{J_{NADH_2} M_X}{v_{NADH_2-X}} \frac{K_r}{K_r + G} \right)$ sera prépondérant dans la zone sombre V_d .

- Les deux termes se compensent au point de compensation G_C .

- Les valeurs de J_{NADH_2} et P/O sont susceptibles de varier avec le temps de séjour à l'obscurité. Les valeurs seront différentes entre un passage rapide en zone sombre d'un PBR éclairé en continu et lors de séjours prolongés à l'obscurité (cycle jour/nuit par exemple). Ce point constitue donc un possible couplage entre la réponse photosynthétique et l'hydrodynamique.

IV.3.4. Données stœchiométriques

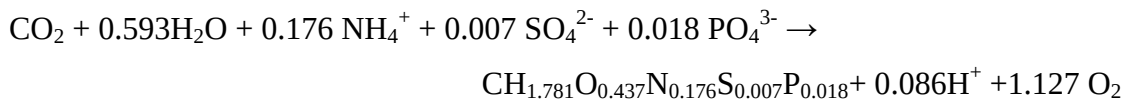
Lors de l'utilisation de la TPI, le calcul du rendement quantique repose sur une analyse phénoménologique du schéma en Z. L'écriture de la loi cinétique est bien sûr indissociable de l'écriture des équations stœchiométriques qui règlent la composition (donc la formule brute, le quotient photosynthétique Q_p , le quotient respiratoire Q_R etc...) de la biomasse produite.

Cornet (2007) a montré que, pour la cyanobactérie *A. platensis*, il était possible de travailler avec deux équations stœchiométriques dont les vitesses relatives dépendent des conditions de limitation par le transfert de rayonnement, en relation avec la variation du rapport $P/2e^-$ (défini dans le chapitre I). Dans le cas d'un micro-organisme eucaryote tel que *Chlamydomonas reinhardtii*, 4 équations seront *a priori* nécessaires:

- Une première équation structurée pour la synthèse des protéines, acides nucléiques et carbohydrates de structure du type de celle employé pour *A. platensis*. L'écriture de cette première équation est possible en se servant des compositions de macromolécules de *C. reinhardtii*, voire de son réseau métabolique faisant intervenir les voies métaboliques principales (ce travail est réalisé actuellement par Guillaume Cogne, chercheur au laboratoire GEPEA).
- Une deuxième équation structurée pour les carbohydrates de réserve (l'amidon principalement voire le phytoglycogène chez certains mutants) et dont la teneur est connue comme très variable. Cette équation va servir à ajuster un premier degré de liberté fixé par le rapport $P/2e^-$.

- Une troisième équation structurée pour les lipides, composés au plus bas $P / 2e^-$, qui vont ajuster le deuxième degré de liberté correspondant au couplage photosynthèse/respiration.
- Les trois équations précédentes étant valables en phase éclairée (γ), une quatrième équation structurée sera nécessaire pour représenter «l'auto-respiration» de la biomasse dans la phase sombre. Celle-ci pourra être déduite de la formule brute et des trois équations précédentes.

L'écriture de ces 4 équations n'est pas triviale et n'était pas un objectif de ce travail, centré sur la biomasse globale. Elle sera certainement réalisée par la suite au laboratoire. On se contentera donc ici de l'équation stœchiométrique de la synthèse de la biomasse. Celle-ci a été établie au chapitre II (voir le paragraphe II.6.6.1 pour les conditions opératoires appliqués en PBR lors des prélèvements pour les analyses élémentaires):



IV.3.5. Paramètres de la loi et méthodes de détermination

La loi cinétique présentée dans l'équation (IV.8) comporte des paramètres qui peuvent être divisés en deux groupes :

1. le premier groupe comporte les paramètres pouvant être déterminés de façon totalement prédictive dans ce travail : ρ_M , $\bar{\phi}$, Ea , M_X , v_{NADH_2-X} .
2. Le deuxième regroupe les paramètres pour lesquels la détermination prédictive n'a pas été menée, et qui impliquent donc une identification :
 - J_{NADH_2} (vitesse spécifique de régénération des cofacteurs par la respiration).
 - K (constante de saturation des centres réactionnels)
 - K_r (paramètre d'inhibition de la respiration)

À noter que la relation $r_X = 0$ à G_C permet de fixer l'un de ces paramètres (si G_C est connu). Les expérimentations en limitation physique stricte qui ont permis une détermination rigoureuse du point de compensation G_C , ont donc été utilisées dans ce cas pour calculer K_r .

La constante de saturation des centres K a été déterminée de plus par des expérimentations spécifiques indépendamment des cultures en PBR (ce point sera détaillé dans les paragraphes suivants).

IV.3.5.1. Rendements quantiques et énergétiques

Comme on a vu dans le chapitre I (paragraphe I.1.3), la photosynthèse est un phénomène énergétique avec des mécanismes primaires où les photons sont absorbés par les antennes collectrices, conduisant à la synthèse d'ATP et de pouvoir réducteur NADPH, H⁺. Ces mécanismes primaires regroupent deux types de processus :

- Le premier concerne l'absorption d'un quanta donnant lieu à des transferts d'excitations par résonnance dans les antennes des photosystèmes jusqu'au centre réactionnel. C'est donc un processus au cours duquel les photons ne sont pas conservés. Ce processus possède son propre rendement, dépendant fortement de l'irradiance, et qui est donc une grandeur intrinsèquement locale au sein du PBR. Cornet (2007) l'a appelé le rendement photochimique primaire: il représente la partie dissipative de l'énergie photonique, et est donné par la relation (IV.10) qui prend en compte la perte d'efficacité des transferts d'excitations dans les antennes en fonction de l'irradiance à partir de deux paramètres, le rendement photochimique maximum ρ_M , et la constante de saturation des centres réactionnels K (Cornet et al., 2003) :

$$\rho \cong \rho_M \frac{1}{1 + \frac{G}{K}} = \rho_M \frac{K}{K + G} \quad (\text{IV.10})$$

Le rendement photochimique maximum ρ_M est obtenu lorsque le système fonctionne dans les conditions thermodynamiques optimales (à l'irradiance de compensation G_C), où la perte du transfert de l'excitation de l'antenne vers le centre réactionnel est minimale.

Pour le calcul de l'efficacité maximale du processus de la conversion de l'énergie radiative, Cornet (2007) a utilisé une approche qui est une extension d'une formulation du rendement de Carnot appliquée ici pour la conversion maximale du rayonnement:

$$\rho_M = 1 - \frac{T}{T_R} \quad (\text{IV.11})$$

où T_R est la température de rayonnement du corps noir (pris comme référence idéale) donnée par la formule de Planck, en choisissant pour l'intensité spectrique la valeur du point de compensation (les conditions thermodynamiques optimales) à la longueur d'onde moyenne considérée (par intégration du spectre d'énergie) $I_{C,\bar{\lambda}}$:

$$T_R = \frac{h n_m c}{k \bar{\lambda} \ln \left[1 + \frac{2 h n_m^2 c^2}{I_{C, \bar{\lambda}} \bar{\lambda}^5} \right]} \quad (\text{IV.12})$$

Dans cette formule :

- h est la constante de Planck; $h = 6.626 \times 10^{-34}$ J.s
- k est la constante de Boltzman, $k = 1.381 \times 10^{-23}$ J.K⁻¹
- n_m est l'indice de réfraction du milieu; $n_m = 1.334$
- c est la vitesse de la lumière dans le vide; $c = 299792459$ m.s⁻¹
- $\bar{\lambda}$ est la longueur d'onde moyenne sur le PAR; $\bar{\lambda} = 550$ nm
- $I_{C, \bar{\lambda}}$ est l'intensité spectrique obtenue à partir de l'irradiance G_C .

Dans le cas de *Chlamydomonas reinhardtii* cultivée dans un PBR à une température optimale de 298 K et en prenant une valeur de $I_C = 2.12$ W.m⁻².sr⁻¹ (correspondant à $G_C = 10$ μmol.m⁻².s⁻¹), on obtient une valeur de $\rho_M = 0.8$.

- Le second processus concerne le transfert de l'excitation de l'antenne collectrice au centre réactionnel. Cela mène à une séparation de charge, impliquant un donneur d'électrons, et dans laquelle les électrons sont transférés au pouvoir réducteur (NADP⁺) à travers une succession de réactions d'oxydoréduction permettant de générer un gradient de protons transmembranaire responsable de la synthèse d'ATP. Ce processus est parfaitement stœchiométrique et conservatif en terme de photons, de même que la suite des étapes aboutissant à la synthèse de biomasse. Dans ce cas, le rendement global $\bar{\phi}$ est défini comme étant le rendement quantique stœchiométrique molaire pour lequel la barre représente une moyenne temporelle sur une échelle de temps correspondant à l'hypothèse d'un état pseudo-permanent pour les produits de la photosynthèse tels l'ATP et le NADPH₂ (échelle de l'ordre d'une à quelques minutes).

Le rendement quantique stœchiométrique massique $\bar{\phi}$ est obtenu à partir de $\bar{\phi}'$ et la masse C-molaire moyenne de la biomasse M_X produite dans le PBR:

$$\bar{\phi} = \bar{\phi}' \times M_X \quad (\text{IV.13})$$

Le rendement quantique molaire réel $\bar{\phi}'$ est déterminé à partir d'une analyse stœchiométrique du schéma en Z de la photosynthèse, par établissement de la stœchiométrie de la biomasse active sous forme structurée (paragraphe IV.3.4.).

Finalement, le calcul du rendement quantique molaire réel $\bar{\phi}'$ du schéma en Z, correspondant à la partie conservative de la conversion énergétique photonique, est seulement dépendant du rapport $P / 2e^-$ suivant la relation:

$$\bar{\phi}' = \frac{1}{2 v_{NADPH_2-X} (1 + P / 2e^-)} \quad (IV.14)$$

D'un point de vue analytique, l'équation (IV.14) semble liée à la composition macromoléculaire du micro-organisme photosynthétique avec des restrictions sur les conditions d'éclairement, le rapport $P / 2e^-$ pouvant varier significativement avec la densité de flux hémisphérique incidente q_Ω (Cornet 2007, Cornet et al., 1998). D'après une analyse théorique détaillée du fonctionnement du schéma en Z de la photosynthèse, et en utilisant la thermodynamique linéaire des processus irréversibles, Cornet (2007) a montré que pour *A. platensis* la valeur numérique de $\bar{\phi}'$ donnée par l'équation (IV.14) demeure quasi-constante pour une large gamme de densité de flux hémisphérique incidente arrivant à la surface du PBR. L'auteur a ainsi prouvé que l'augmentation de la valeur du rapport $P / 2e^-$ avec la densité du flux incident est contrebalancée par la diminution de coefficient stœchiométrique v_{NADPH,H^+-X} reliée à la formule globale de la qualité de la biomasse produite. Cette approche théorique étant générale (car menée au niveau du thylacoïde), elle apparaît indépendante du micro-organisme photosynthétique étudié, sous réserve que ce dernier soit cultivé dans les conditions de croissance optimales (pH, température) et qu'aucune limitation minérale ne soit observée dans le PBR. Ce rendement dépend alors seulement de la source d'azote disponible dans le milieu (NO_3^- , NH_4^+), avec une augmentation jusqu'à 25% de l'efficacité photosynthétique dans le cas où l'ammonium NH_4^+ est utilisé comme source d'azote au lieu du nitrate NO_3^- . L'azote étant utilisé par la cellule sous forme de NH_4^+ , un apport énergétique supplémentaire est en effet nécessaire pour utiliser des nitrates, impliquant alors de réduction des ions NO_3^- en NO_2^- puis en NH_4^+ afin d'être assimilés finalement sous cette forme.

Les valeurs de $P / 2e^-$ et de v_{NADPH_2-X} ont été estimées à partir de la composition élémentaire de *C. reinhardtii* et par analogie avec le travail mené par Cornet (2007) sur *A. Platensis*, menant aux valeurs suivantes :

$$\begin{aligned} P / 2e^- &= 1.23 \\ v_{NADPH_2-X} &= 2.1 - 2.3 \end{aligned} \quad (IV.15)$$

On notera que ces valeurs sont des estimations et devront certainement être revues lorsqu'une meilleure compréhension du métabolisme de *C. reinhardtii* sera obtenue (travaux en cours de G. Cogne). Toutefois, les résultats de Cornet et Dussap (2009) ont montré que ces grandeurs évoluaient peu.

L'équation stœchiométrique de la synthèse de la biomasse pour *C. reinhardtii* donne une la masse C-molaire de la biomasse produite $M_X = 0.024 \text{ kg}_X \cdot \text{mol}^{-1}$.

On obtient finalement les valeurs suivantes de $\bar{\phi}$ et $\bar{\phi}'$:

$$\begin{aligned} \bar{\phi}' &\cong 1.10^{-7} \text{ mol}_X \cdot \mu\text{mol}_{hv} \\ \bar{\phi} &= (2.4 - 2.5) \cdot 10^{-9} \text{ kg}_X \cdot \mu\text{mol}_{hv} \end{aligned} \quad (IV.16)$$

IV.3.5.2. Constante de saturation K

La constante de saturation des centres K , qui apparaît dans l'équation semi empirique (IV.10), est une constante spécifique pour chaque micro-organisme photosynthétique. Pour le moment, il n'existe pas de méthode prédictive permettant de donner une valeur théorique de K comme fonction de l'architecture moléculaire de l'antenne photosynthétique (Cornet et Dussap 2009). Néanmoins, cette constante peut être déterminée sur des expériences indépendantes, telles que les mesures de dégagement d'oxygène ou de fluorimétrie obtenues pour plusieurs valeurs d'irradiance. Ces deux dernières méthodes ont été comparées ci-après.

IV.3.5.2.1. Évolution du dégagement photosynthétique d' O_2 en fonction du flux lumineux

On dispose des résultats expérimentaux sur l'évolution de l'oxygène photosynthétique de *C. reinhardtii* 137AH pour différents flux lumineux incidents. Ces expériences ont été effectuées indépendamment des cultures en PBR, au cours des travaux de recherche du laboratoire GEPEA portant sur la modélisation de la croissance de cette microalgue (thèse de L. Pottier soutenue en 2005). Ces mesures ont été réalisées à l'Institut de Biotechnologie des Plantes (Université Paris Sud-Orsay), à l'aide d'une électrode ampérométrique de type Clark (mesure du dioxygène dissous). Dans les mesures réalisées, la concentration pigmentaire de la suspension microalgale de *C. reinhardtii* a été maintenue faible (inférieur à $4 \mu\text{g}$ of chlorophylle a / mL de culture) de façon à pouvoir négliger

l'atténuation lumineuse au cours des mesures (permettant d'assimiler le flux incident à l'irradiance reçue par les cellules).

Ces résultats expérimentaux ont été réexploités ici pour déterminer la constante K (figure IV.2). Les vitesses de dégagement d'oxygène ont été normalisées et la valeur de l'irradiance, considérée comme homogène dans tout le volume de la cellule, a été prise égale à $(G - G_C)$ avec $G_C \cong 23-25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, pour s'affranchir de la détermination de l'irradiance de compensation (cette valeur de G_C correspond à celle obtenue par Pottier 2005).

Pour obtenir K , une linéarisation a été effectuée. On a en effet la vitesse de dégagement d'oxygène (ou la croissance) qui augmente avec l'irradiance avec une saturation progressive représentée par K selon:

$$\frac{r_X}{r_{X_{\max}}} \equiv \frac{G}{K + G} \equiv \frac{r_{O_2}}{r_{O_2_{\max}}} \text{ avec } \frac{r_{O_2}}{r_{O_2_{\max}}} = r_{O_2_{\text{norm}}}$$

On obtient donc :

$$\frac{1}{r_{O_2_{\text{norm}}}} \equiv K \cdot \frac{1}{G} + 1 \quad \text{avec } K \text{ le coefficient directeur de la droite obtenue par le tracé de}$$

$1/r_{O_2_{\text{norm}}}$ en fonction de $1/G$.

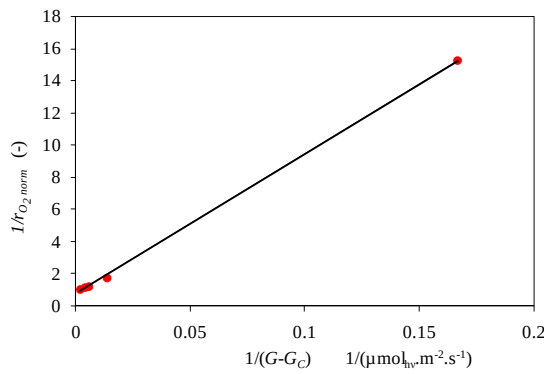


Figure IV.2: Tracé de l'inverse de la vitesse normalisée de dégagement d'oxygène ($1/r_{O_2_{\text{norm}}}$) chez *Chlamydomonas reinhardtii* 137AH en fonction de l'inverse de l'irradiance $[1/(G-G_C)]$.

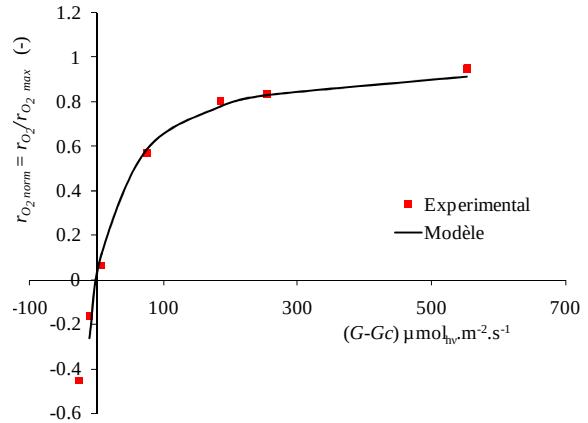


Figure IV.3: Tracé de la vitesse normalisée de dégagement d'oxygène chez *C. reinhardtii* 137AH mesurée par une électrode de Clark (Pottier, 2005). Les données représentées par les carrés (■) correspondent aux valeurs expérimentales qui ont été normalisées et ensuite comparées aux valeurs modélisées par l'équation $\frac{G}{K+G}$ (—).

La figure (IV.2) présente le tracé de l'inverse de la vitesse normalisée de dégagement d'oxygène ($1/r_{O_2_{\text{norm}}}$) en fonction de l'inverse de l'irradiance $1/(G-G_C)$. Un ajustement linéaire par la méthode des moindres carrés a été fait en utilisant la fonction «LINEST»

sous Excel afin de déterminer le coefficient directeur de la droite sous la forme $(\frac{1}{r_{O_2, norm}} \equiv K \cdot \frac{1}{G} + 1)$. La valeur de la constante de saturation obtenue est $K = 110 \pm 20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. La comparaison entre les points expérimentaux et les simulations est représentée dans la figure (IV.3).

IV.3.5.2.2. Évolution du rendement photosynthétique en fonction de l'irradiance

Les paramètres caractéristiques de la fluorescence (F_0, F_m, F'_0, F', F'_m) ont été mesurés à température ambiante en utilisant un fluorimètre WaterPAM (Walz, Germany) par la méthode du pulse saturant (Maxwell et Johnson, 2000). Le rendement photosynthétique $\Phi_{PSII} = \frac{(F'_m - F')}{F'_m} = \frac{\Delta F}{F'_m}$ comme défini par Genty et al., 1989, a été suivi chez *C. reinhardtii* pour différentes irradiances.

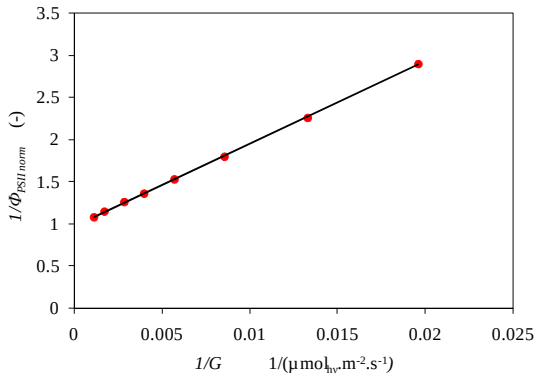


Figure IV.4 : Tracé de $(1/\Phi_{PSII, norm})$ l'inverse du rendement photochimique normalisée chez *C.reinhardtii* 137AH en fonction de l'inverse de l'irradiance ($1/G$). Une comparaison avec l'équation $\frac{G}{K+G}$ est également ajoutée.

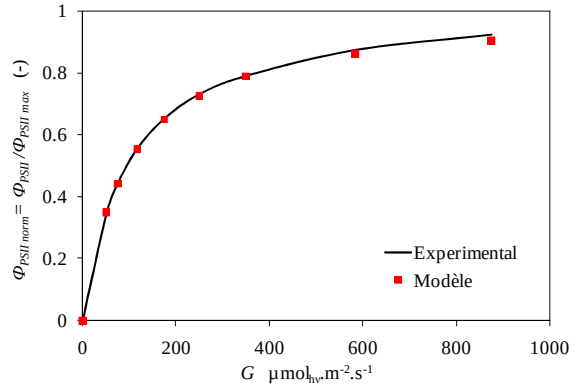


Figure IV.5: Tracé du rendement photochimique normalisé ($\Phi_{PSII, norm}$) chez *C.reinhardtii* 137AH mesuré par un fluorimètre WaterPAM (Walz, Germany). Les données représentées par les carrés (■) correspondent aux valeurs expérimentales qui ont été normalisées et ensuite comparées aux valeurs modélisées (—).

La même démarche, que celle présentée dans le paragraphe précédent pour obtenir la constante de saturation K , a été suivie pour le rendement photosynthétique Φ_{PSII} , celui-ci étant également lié à la saturation progressive de l'activité photosynthétique avec la lumière. La figure (IV.4) représente le tracé de l'inverse du rendement photochimique du PSII normalisé ($1/\Phi_{PSII, norm}$), en fonction de l'inverse de l'irradiance reçue dans la cuvette du fluorimètre.

L'analyse du tracé de la figure (IV.4) nous donne une valeur de la constante $K = 100 \pm 2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Une comparaison entre les points expérimentaux et les simulations est présentée dans la figure (IV.5).

IV.3.5.2.2. Comparaison des différentes estimations de K

Les méthodes basées sur le dégagement d'oxygène et la mesure de fluorescence induite permettent d'obtenir une estimation de la constante de saturation K , dans la mesure où ces grandeurs sont liées à la saturation progressive de l'activité photosynthétique avec l'irradiance. Elles ne permettent pas cependant une détermination exacte, de par l'incertitude sur les mesures expérimentales, et par la relation qui n'est pas forcément directe avec la saturation des centres. L'oxygène dégagé est ainsi un résultat plus global (il inclut notamment l'activité respiratoire), tandis que la fluorescence, par son principe même, est une mesure indirecte de l'activité photosynthétique. Les valeurs obtenues de K ($110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ par la mesure d'oxygène dégagé, et $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour la fluorescence) ont donc été utilisées comme estimation, avec une incertitude d'environ $\pm 20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. L'ajustement final a été réalisé sur les valeurs expérimentales de productivité $\langle r_X \rangle$. Une valeur de $120 \pm 10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a ainsi été retenue.

IV.3.6. Détermination du paramètre K_r

Une fois le point de compensation déterminé par des expérimentations en limitation physique stricte (voir chapitre III), le paramètre K_r peut être calculé analytiquement à partir de l'équation (IV.8). Au point de compensation, la vitesse volumétrique locale de croissance de la biomasse (VVLCB) r_X est en effet nulle, ce qui nous permet d'écrire:

pour $G = G_C$ avec $r_X = 0$:

$$K_r = \frac{G_C}{\frac{J_{\text{NADH}_2}}{v_{\text{NADH}_2-X} \rho_M \phi' Ea} \left[\frac{1}{G_C} + \frac{1}{K} \right] - 1} \quad (\text{IV.17})$$

La majorité des paramètres figurant dans l'équation donnant K_r sont quasi-constants. *A priori* seul Ea , le coefficient massique d'absorption, s'est révélé varier avec les conditions d'éclairement (voir chapitre III) et en particulier avec la densité de flux incidente q_γ . Une étude de sensibilité de l'équation (IV.17) a montré que la valeur de K_r était très sensible à une évolution du coefficient massique d'absorption Ea . Un facteur trois a ainsi été obtenu

sur l'évolution de K_r pour la gamme de Ea rencontrée lors des expérimentations dans le chapitre III. Ceci met en évidence que de nombreux phénomènes vont être régis par Ea (directement lié à la teneur en pigments), qui fixe logiquement le champ de radiation avec la densité de flux hémisphérique incidente q_Ω , mais également influence la loi cinétique. Il est donc nécessaire ici d'établir une équation «de fermeture » traduisant la relation existante entre Ea et la densité de flux incidente q_Ω qui l'affecte directement. Cette équation est détaillée dans le paragraphe suivant.

IV.4. Évolution de la composition pigmentaire en fonction de la densité de flux hémisphérique incidente

Les micro-organismes photosynthétiques ont la capacité de s'adapter aux changements prolongés de lumière reçue. Cela peut consister en des changements d'intensité et de nature du spectre de la source lumineuse provoquant un stress qui se traduit par un changement au niveau de la composition pigmentaire. Ce phénomène s'appelle la photoadaptation, qui peut être réversible si les conditions de stress disparaissent.

Dans les conditions d'un fort éclairage, une réduction de la teneur en pigments (chlorophylles et caroténoïdes) a été observée, réduisant l'efficacité d'absorption et protégeant ainsi les cellules d'un excès de photons. Falkowski et LaRoche (1991) et Richmond (2004) ont mentionné ce phénomène. Grobellar et al. (1996) ont conclu que le facteur le plus important dans la croissance photosynthétique des microalgues est la photoadaptation aux faibles ou aux fortes intensités lumineuses. Cela a également été observé chez *C. reinhardtii*. Janssen et al. (1999) ont montré que les cellules contiennent plus de pigments à faible intensité, tandis que cette teneur pigmentaire diminue avec l'augmentation de la densité du flux incidente. Bohne et Linden (2002) ont également montré chez différentes souches sauvages de *C. reinhardtii* cultivées en milieu hétérotrophe que la composition pigmentaire (chlorophylles et caroténoïdes) diminue en passant d'un faible éclairage à un autre plus fort. Degrenne (2009) a confirmé cette tendance chez la même souche que celle utilisée au cours de cette étude. L'ensemble de ces constations a été confirmé ici. La figure (IV.6) illustre la tendance de l'évolution pigmentaire chez *C.reinhardtii* en fonction de la densité du flux incidente q_Ω (mesures présentées dans le chapitre III et obtenues en limitation physique stricte $\gamma=1$). De plus, ces résultats montrent

une répartition constante entre les trois pigments (*Chl a*, *Chl b* et *PPC*) pour les différentes densités de flux incidentes étudiées:

Chl a = 59%;

Chl b = 23,5%;

PPC = 17,5%

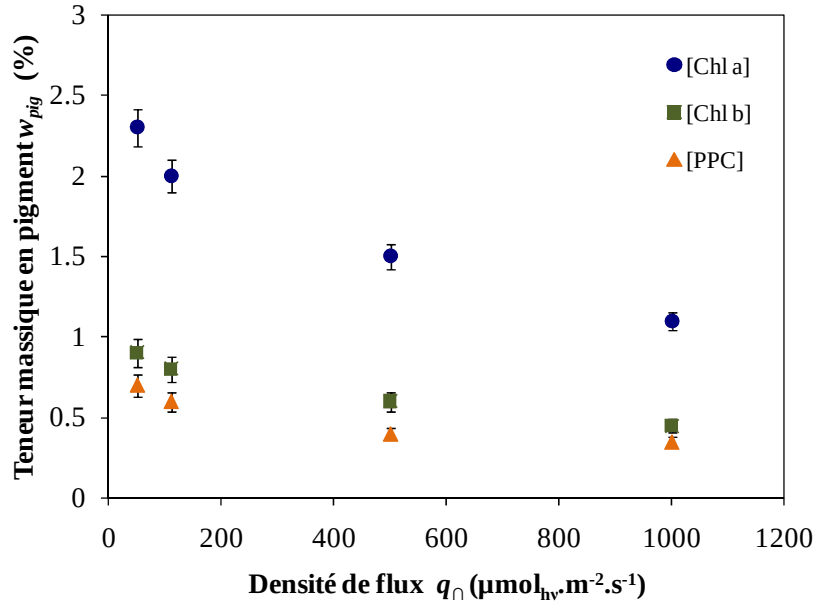


Figure IV.6 : Résultats expérimentaux de l'évolution de la teneur pigmentaire massique en Chlorophylle a (*Chl a*, ●), Chlorophylle b (*Chl b*, ■) et Caroténoïdes de Protection (*PPC*, ▲) chez *C. reinhardtii* 137AH pour différentes valeurs de la densité de flux incidente et pour $\gamma=1$ (limitation physique stricte par la lumière).

À ce jour, il n'existe pas dans la littérature de base théorique permettant d'établir une équation qui donne de façon prédictive l'accès à l'évolution pigmentaire en fonction des conditions d'éclairement, et qui représenterait donc la photo-adaptation (un début de raisonnement basé sur la TPI est donné dans l'annexe A.VI).

Il a donc été retenu d'utiliser une relation empirique déduite de la courbe expérimentale d'évolution des pigments en fonction de q_0 (Figure IV.7). Cette équation est donnée sous la forme :

$$w_{PIG} = 9.378 \times q_0^{-0.21} \quad (\text{IV.18})$$

Cette formule empirique sera utilisée par la suite dans la prédiction de la teneur en pigments chez *C. reinhardtii* cultivée en milieu autotrophe (la teneur dans les différents pigments *Chl a*, *Chl b* et *PPC* est ensuite calculée simplement grâce à la répartition donnée précédemment, qui sera donc supposée constante). On notera qu'elle est rigoureusement valable pour la condition $\gamma=1$. La présence d'une zone sombre ($\gamma=0.5$) modifie en effet légèrement les teneurs en pigments (voir tableau (III.2)). Toutefois, cette variation a été considéré négligeable ici.

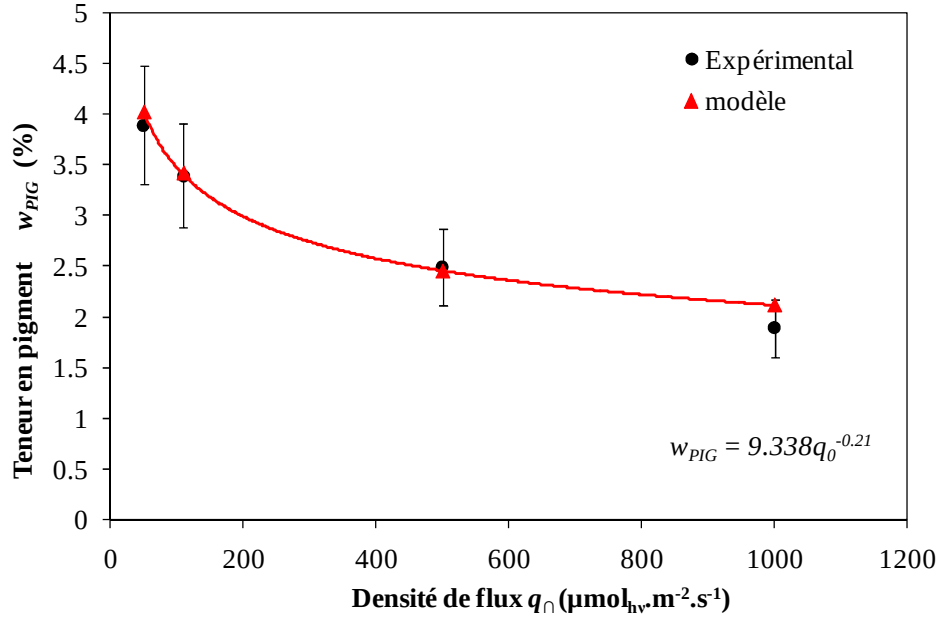


Figure IV.7 : Résultats expérimentaux (●) de l'évolution de la teneur totale en pigment chez *C. reinhardtii* 137AH comparées aux valeurs calculées par l'équation (IV.19) (▲) pour différentes valeurs de la densité de flux incidente et pour $\gamma=1$ (limitation physique par la lumière).

IV.5. Identification et calcul des paramètres

Compte-tenu de la relation (IV.17) donnée par la définition du point de compensation ($r_X(G_C) = 0$), seul l'un des deux paramètres J_{NADH_2} et K_r doit être précisé. A ce stade du raisonnement, il reste donc à déterminer l'un des deux. Il a donc été choisi de déterminer J_{NADH_2} . Ce paramètre est lié au terme de respiration $\left(\frac{J_{\text{NADH}_2} M_X}{v_{\text{NADH}_2-X}} \frac{K_r}{K_r + G} \right)$ de la loi cinétique proposée dans le paragraphe (IV.3.2). Les expérimentations en photolimitation ($\gamma < 1$) où la respiration est non négligeable ont donc été privilégiées pour sa détermination.

Les cultures continues de *C. reinhardtii* en photolimitation ($\gamma < 1$) ont été réalisées pour une large gamme de densité de flux incidente (110, 700 et 1000 $\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). La comparaison des productivités simulées et mesurées a permis d'identifier J_{NADH_2} par une régression monoparamétrique, puis d'en déduire et de calculer analytiquement K_r par la relation (IV.17) déduite de la connaissance du point de compensation. Il a ainsi été obtenu :

$$J_{\text{NADH}_2} \cong 2.39 \text{ mol.kg}_X^{-1}.\text{h}^{-1} \quad K_r \cong 6\sim 3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$$

IV.6. Validation du modèle cinétique

IV.6.1. Introduction

Après l'identification de J_{NADH_2} et le calcul analytique de K_r en utilisant l'équation (IV.17), l'ensemble des paramètres du modèle est connu. Il est récapitulé dans le tableau (IV.1). La loi cinétique a donc ensuite été validée dans un premier temps sur les cultures continues en photolimitation ($\gamma=0.5$) et en limitation physique stricte ($\gamma \cong 1$). La loi a également été appliquée sur des cultures diluées (données reprises de la littérature) afin de montrer que le phénomène de « photoinhibition » souvent cité dans la littérature pour représenter l'inhibition de la croissance photosynthétique à fortes irradiances, peut en grande partie être expliqué par un simple couplage du champ de radiation avec l'évolution de la teneur en pigments. Enfin, le modèle a été testé dans le cas des cultures discontinues.

Paramètres	valeurs	unité
ρ_M	0.8	-
$P / 2e^-$	1.23	-
$\bar{\phi}'$	1×10^{-7}	$\text{mol}_X \cdot \mu\text{mol}_{hv}$
$\bar{\phi}$	2.4×10^{-9}	$\text{kg}_X \cdot \mu\text{mol}_{hv}$
M_X	0.024	$\text{kg}_X \cdot \text{mol}^{-1}$
v_{NADH_2-X}	2.1-2.3	-
K	120 ± 10	$\mu\text{mol}_{hv} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Tableau IV.1. : Tableau récapitulatif des valeurs des paramètres du modèle cinétique établi pour la microalgue *C. reinhardtii* 137 AH.

Les valeurs expérimentales des productivités volumiques en biomasse ont été calculées en utilisant l'équation (III.3) à partir de la concentration en biomasse C_X et du taux de dilution D mesurés tous les deux expérimentalement. Comme déjà évoqué au chapitre III, le modèle à deux flux donne des résultats très satisfaisants pour les cultures de micro-organismes photosynthétiques (Cornet et al., 1995) et pour le cas de *C. reinhardtii* (Pottier et al., 2005). L'hypothèse d'une atténuation monodimensionnelle permet de calculer les irradiances locales $G(z)$ en fonction de la profondeur z de la culture pour les différentes densités de flux incidente étudiées (voir chapitre III). Ensuite, le couplage à la loi cinétique (équation IV.8) donne r_X , la vitesse volumétrique locale de la croissance en biomasse (VVLBCB). La productivité théorique prédite par la loi est ensuite calculée par intégration de r_X sur tout le volume de réacteur (équation IV.9) pour trouver $\langle r_X \rangle$, la vitesse volumétrique moyenne de la croissance en biomasse VVMCB, égale à la productivité volumique du PBR en culture continue stabilisée (voir paragraphe I.4 du chapitre I et équation III.3 du chapitre III).

La figure (IV.8) illustre un exemple didactique présentant le profil d'irradiance locales $G(z)$ et la VVLCB r_X en fonction de la profondeur z de la culture en PBR pour une densité de flux incidente $q_\odot = 110 \mu\text{mol}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour deux cultures à différents régimes de fonctionnement. Le graphe à gauche est donné pour une culture en photolimitation avec une concentration en biomasse $C_X = 0.6 \text{ g.L}^{-1}$ et une fraction volumique éclairée γ qui vaut 0.49. Le graphe à droite est pour une culture en limitation physique stricte ($\gamma \cong 1$) avec une concentration en biomasse de $C_X = 0.35 \text{ g.L}^{-1}$. La localisation du point de compensation (et donc la détermination de γ) peut être obtenue par le modèle radiatif seul ($z(G = G_C)$) ou par le calcul de la vitesse volumétrique locale r_X donnée par la loi cinétique (tel que $r_X(G_C) = 0$). Le modèle proposé, de par sa formulation, permet de réconcilier les approches. Comme illustré sur la figure, la vitesse volumétrique locale au point de compensation $r_X(G_C)$ est ainsi égale à zéro (d'après la définition du point de compensation).

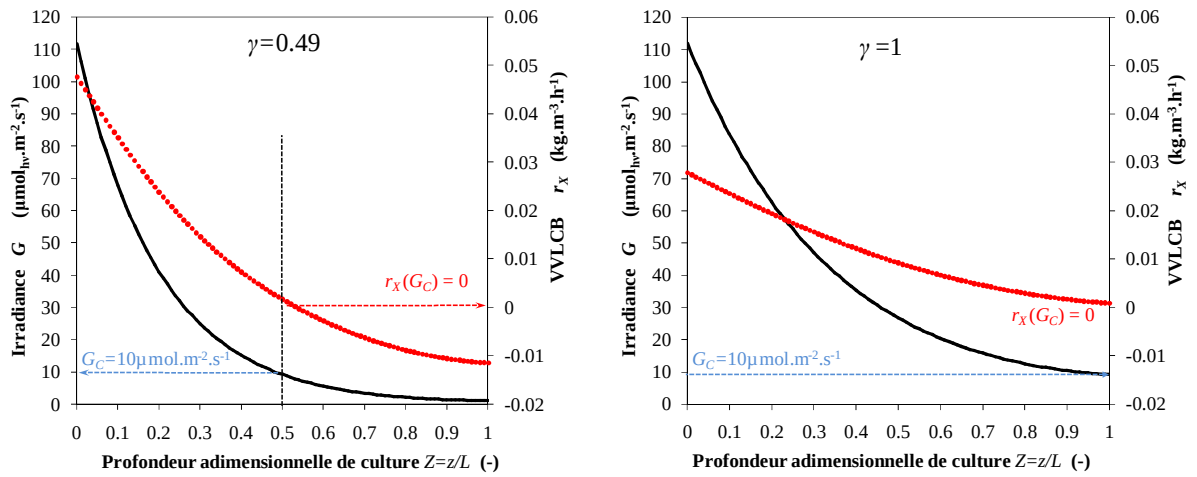


Figure IV.8 : Profil d'irradiance G (trait continu) et vitesse volumétrique locale de croissance en biomasse (VVLCB) (•) en fonction de la profondeur de la culture dans le PBR torique-plan pour une densité de flux incidente $q_\odot = 110 \mu\text{mol}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Le graphe à gauche est relatif à une culture photolimitée à $\gamma = 0.49$ avec une concentration en biomasse de 0.6 g.L^{-1} . Le graphe à droite est relatif à une culture en limitation physique stricte à $\gamma = 1$ avec une concentration en biomasse de 0.35 g.L^{-1} .

IV.6.2. Validation en mode continu et en limitation physique

En prenant le point de compensation $G_C = 10 \pm 3 \mu\text{mol}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (déjà déterminé dans le chapitre III), la fraction volumique éclairée γ a été ainsi recalculée pour les expérimentations en photolimitation pour toutes les densités de flux incidentes $q_\odot$ (tableau IV.2). Cela confirme que les expérimentations en photolimitation ont bien été obtenues pour une fraction éclairée proche de $\gamma = 0.5$. Le modèle proposé permet de prédire

correctement les productivités alors atteintes, et ce pour une gamme de flux incident entre 110 et 1000 $\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (écart inférieur à 10%).

Densité de flux incidente $q_{\cap}$ ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	110	700	1000
Concentration en biomasse C_X ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	0.60	1.36	1.47
Taux de dilution D ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	0.012	0.017	0.020
Productivité expérimentale observée ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	$(0.72\pm 0.03)\times 10^{-2}$	$(2.32\pm 0.07)\times 10^{-2}$	$(2.94\pm 0.09)\times 10^{-2}$
Productivité prédite par le modèle ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.73×10^{-2}	2.45×10^{-2}	3.13×10^{-2}
Écart (%)	+ 1	+ 6	+ 7
Fraction volumique éclairée γ	0.49 ± 0.1	0.51 ± 0.1	0.55 ± 0.1

Tableau IV.2. : Tableau résumant les points expérimentaux obtenus en PBR torique cultivant la microalgue *C. reinhardtii* en photolimitation ($\gamma < 1$) pour différentes valeurs de la densité de flux incidente $q_{\cap}$. La fraction volumique éclairée γ a été recalculée pour les différents cas étudiés d'après le modèle final proposé.

Le modèle a également été confronté aux résultats expérimentaux obtenus en limitation physique stricte ($\gamma \cong 1$) où les productivités expérimentales et théoriques sont présentées dans le tableau (IV.3). Comme pour le cas précédent, on peut constater que pour l'ensemble des résultats présentés, l'écart moyen avec le modèle est inférieur à 10%, ce qui reste dans le domaine d'incertitude expérimentale.

$q_{\cap}$ ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	110	200	300	400	500	600	1000
Taux de dilution D (h^{-1})	0.032	0.041	0.054	0.057	0.058	0.061	0.039
Concentration en biomasse expérimentale (C_X) _{opt} ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	0.35	0.41	0.47	0.51	0.57	0.60	1.1
Concentration en biomasse théorique (prédite par le modèle) (C_X) _{theo} ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	0.32	0.40	0.42	0.45	0.51	0.48	0.98
Coefficient massique d'absorption E_a (m^2/kg)	200	186	176	170	160	150	130
Coefficient massique de diffusion E_s (m^2/kg)	850	860	870	877	890	895	910
fraction rétrodiffusée b (adimensionnel)	0.008	0.008	0.008	0.008	0.0077	0.008	0.008
Productivité Expérimentale < r_X > ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	1.12×10^{-2}	1.67×10^{-2}	2.54×10^{-2}	2.93×10^{-2}	3.32×10^{-2}	3.65×10^{-2}	4.29×10^{-2}
Productivité Théorique < r_X > ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	1.10×10^{-2}	1.78×10^{-2}	2.30×10^{-2}	2.72×10^{-2}	3.06×10^{-2}	3.33×10^{-2}	3.91×10^{-2}
Écart (%)	<1	7	-9	-6	-7	-8	-7
Fraction éclairée calculée γ (adimensionnel)	1.0	1.0	1.08	1.08	1.0	1.15	0.79

Tableau IV.3. : Comparaison entre les productivités expérimentales et théoriques obtenues en limitation physique stricte dans le PBR torique cultivant la microalgue *C. reinhardtii* pour différentes valeurs de densité de flux incidente $q_{\cap}$.

Les résultats présentés dans les deux tableaux IV.2 et IV.3 confirment, en prenant en compte les déviations standards, que la loi cinétique présentée par l'équation IV.8 prédit correctement la productivité obtenue, quel que soit le régime de fonctionnement du PBR (photolimitation et limitation physique stricte) et cela pour une large gamme de densité de flux incidente (de 110 à 1000 $\mu\text{mol}_{\text{h\nu}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

IV.7. Le couplage cinétique en photobioréacteurs pour expliquer le phénomène de photoinhibition

La perte de performances d'un PBR à fort flux incident est souvent imputée au phénomène de photoinhibition de l'appareil photosynthétique. On démontrera dans cette partie qu'un simple couplage entre le champ de radiation et la teneur en pigment variable peut également mener à cette baisse de performances, montrant de par là même que le phénomène de photoinhibition au sens strict est peu ou pas présent.

Ceci a été réalisé grâce à des résultats repris de la littérature : une partie des résultats expérimentaux provient des travaux de recherche effectués pendant la thèse de L. Pottier 2005 au sein du Laboratoire GEPEA et l'autre provient de ceux effectués au cours des travaux de thèse de M. Janssen 2003 (de l'équipe « Bioprocess Engineering Group » de l'Université de Wageningen). Dans les travaux de Pottier 2005, la microalgue *C. reinhardtii* 137AH a été cultivée en réacteur torique en milieu autotrophe et à très faible concentration (culture diluée). Janssen (2003) a cultivé la même microalgue dans différents PBR (air-lift en U, rectangulaire) à très faible concentration en biomasse. Dans tous les cas, les réacteurs fonctionnaient en régime cinétique (pas de zone sombre dans le réacteur et transmission d'une grande partie du flux). Les résultats étant présentés sous forme de taux spécifique de croissance μ , sans biomasse C_X pour le calcul des productivités, nous avons

utilisé le rapport $\frac{\langle r_X \rangle}{C_X}$ qui permet de s'affranchir de la connaissance préliminaire de la biomasse pour déterminer la productivité expérimentale. Le tableau (IV.4) récapitule les résultats expérimentaux, obtenus par ces deux auteurs pour des cultures très diluées de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Les propriétés optiques (E_a , E_s et b) des cultures très diluées ont été calculées pour chaque flux incident q_{in} à partir de la teneur en pigment théorique w_{pig} donnée par l'équation (IV.18). L'évolution du coefficient massique d'absorption E_a est représentée dans la figure (IV.9).

Réacteur		q_0	$\langle \mu \rangle = \langle r_X \rangle / C_X$	STD (n)
		($\mu\text{mol}_{\text{hv}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	h^{-1}	
Torique/plan L=4 cm		35	0.0205	- (1)
		50	0.0425	0.003 (3)
		65	0.065	0.002 (3)
		95	0.085	0.004 (3)
		110	0.0975	0.010 (3)
		125	0.109	0.004 (3)
		228	0.125	0.002 (4)
		284	0.136	0.003 (4)
	379	0.122	0.004 (3)	
Rectangulaire	L=3 cm	650	0.11	0.020 (6)
Rectangulaire	L=1.45 cm	1153	0.116	0.006 (3)

Tableau IV.4. : Tableau récapitulant les différents résultats expérimentaux collectés des travaux de Pottier 2005 et Janssen 2003. Le terme $\langle \mu \rangle$ représente le taux spécifique de croissance et STD représente l'estimation de la déviation standard pour (n) valeurs de $\langle \mu \rangle$.

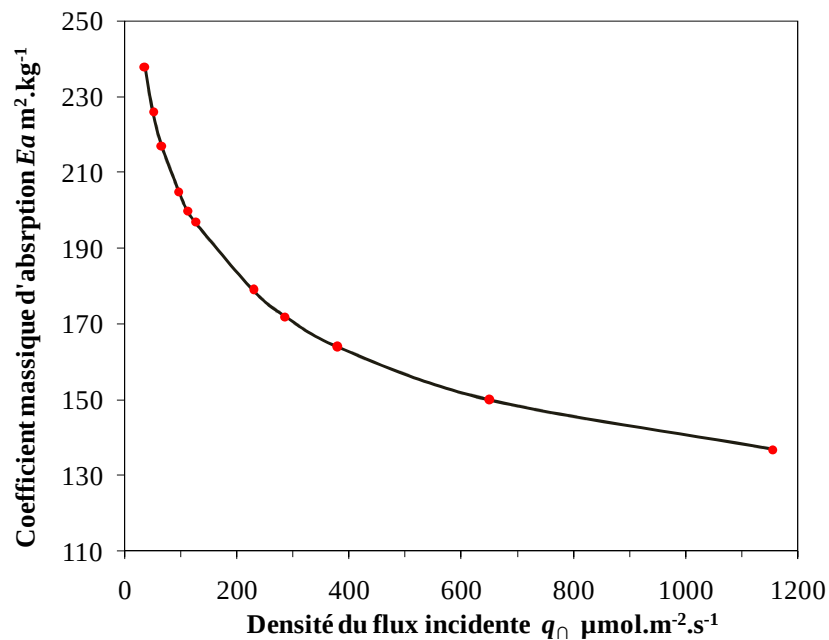


Figure IV.9 : Évolution du coefficient massique d'absorption Ea en fonction de la densité de flux incidente q_0 . Le coefficient massique a été estimé en prenant une pigmentation dépendante de la densité de flux incidente et recalculé théoriquement à partir de l'équation IV.18.

Les vitesses volumétriques moyennes de la croissance en biomasse VVMCB ont été déterminées théoriquement en utilisant la loi cinétique (équation (IV.8)) validée

préalablement sur des cultures en en photolimitation. Les ratios $(\langle r_X \rangle / C_X)_{exp}$ et $(\langle r_X \rangle / C_X)_{theo}$ sont présentés dans la figure (IV.10).

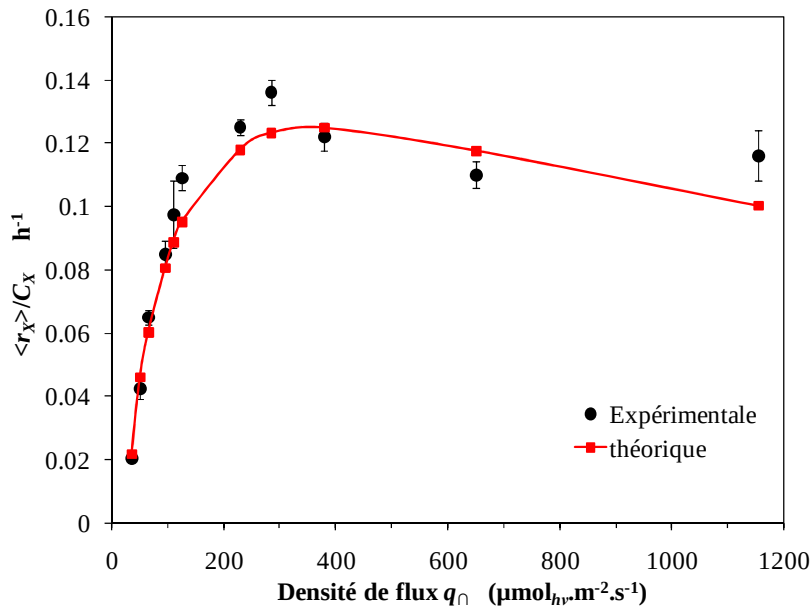


Figure IV.10 : Résultats expérimentaux repris des travaux de (Pottier, 2005) et (Janssen 2003) dans lesquels la microalgue *C.reinhardtii* a été cultivée dans différents PBR, torique/plan d'épaisseur 4 cm (Pottier 2005), rectangulaires à 3 et 1.45 cm d'épaisseur (Janssen 2003) fonctionnant en régime cinétique (transmission d'une partie de rayonnement). Les résultats sont représentés sous forme d'un ratio $(\langle r_X \rangle / C_X)_{exp}$ (●) en fonction de la densité de flux incidente. Le ratio $(\langle r_X \rangle / C_X)_{theo}$ (■) calculé théoriquement en utilisant le modèle de connaissance est comparé avec le ratio réel. La barre d'erreur du ratio réel représente la déviation standard des mesures expérimentales.

Les résultats montrent que, même dans des cas extrêmement délicats (régime cinétique) où la réponse photosynthétique des microalgues est particulière, le modèle donne des prédictions correctes.

De façon plus intéressante, on observe que le modèle prédit la perte de performances observée pour les forts flux incidents ($>350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Cette diminution est classiquement imputée à la photoinhibition alors que le modèle ne prend pas en compte ce phénomène. D'après la loi cinétique, cela apparaît juste comme un couplage entre le champ de radiation et la teneur en pigment qui diminue avec l'augmentation du flux. Cela induit une baisse du rapport $(\langle r_X \rangle / C_X)$ (l'équivalent du taux spécifique de croissance) en accord avec les expérimentaux à fort flux.

IV.8. Analyse pour des cultures en mode discontinu (*batch*)

IV.8. 1. Introduction

Les expérimentations présentées précédemment ont été menées en mode continu pour des cultures en photolimitation et en limitation physique stricte. Le modèle cinétique a également été testé pour des cultures en mode discontinu. Ce mode est en effet couramment rencontré dans la culture des microalgues photosynthétiques pour la production de biomasse (Richmond 2004), mais également quand il y a mise en carence (carence en azote, soufre, etc...) pour induire des réponses spécifiques (production d'hydrogène, accumulation des lipides etc...).

Enfin, dans un cadre plus général, la conduite des cultures en *batch* peut être optimisée vis-à-vis des conditions d'absorption de la lumière qui évoluent par principe au cours d'une culture discontinue. Ceci sera illustré ici par la mise en évidence de l'effet des conditions appliquées en début de culture discontinue sur la croissance de la microalgue *C. reinhardtii*.

IV.8. 2. Culture de *C. reinhardtii* en *batch*

Les précultures de *C. reinhardtii* 137AH, utilisées pour l'ensemencement du réacteur, sont usuellement cultivées en fiole Erlenmeyers dans du milieu TAP (Tris-Acétate-Phosphate) (Harris 1989). La préparation des précultures en milieu autotrophe (sans régulation de pH) conduit en effet à une dérive rapide du pH d'où la nécessité de les cultiver sur du milieu hétérotrophe tamponné. Par conséquent, un temps d'adaptation est nécessaire lors du passage aux conditions autotrophes. Il a donc été choisi de lancer le mode *batch* après la stabilisation d'une culture en continu dans le PBR, l'ensemble étant réalisé en autotrophie. Dans ce cas, la production *batch* commence (à l'instant $t = t_0$) avec une biomasse ayant une qualité biologique stable et adaptée à la croissance sur milieu autotrophe. Il reste néanmoins une étape critique durant le lancement d'un mode *batch*. Les PBR, en démarrage des cultures *batch*, sont en effet souvent en régime cinétique (transmission d'une partie de la lumière). Ceci peut induire une réponse biologique non maîtrisée (voir paragraphe III.I.2.2). Dans ce cas, soit la culture est trop éclairée (la densité de flux incidente q_γ est trop élevée), soit elle est alors trop diluée (concentration en biomasse C_X faible). Il est donc préférable de choisir un couple (C_X / q_γ) garantissant une culture photolimitée ($\gamma \leq 1$). Si on cherche de plus une croissance maximisée pour un organisme eucaryote, il faudra alors chercher à se rapprocher de la limitation physique

stricte ($\gamma \cong 1$) où la productivité volumique en biomasse (et donc la croissance) sera maximale.

IV.8. 3. Procédure expérimentale

À l'instant $t = 0$ (ensemencement du PBR), la concentration en biomasse correspondante $(C_X)_0$ est très faible. Dans le but d'éviter un régime cinétique en début de culture, le PBR est soumis à faible éclairage (densité de flux incidente $q_{\cap,0}$) comme le montre la figure (IV.11).

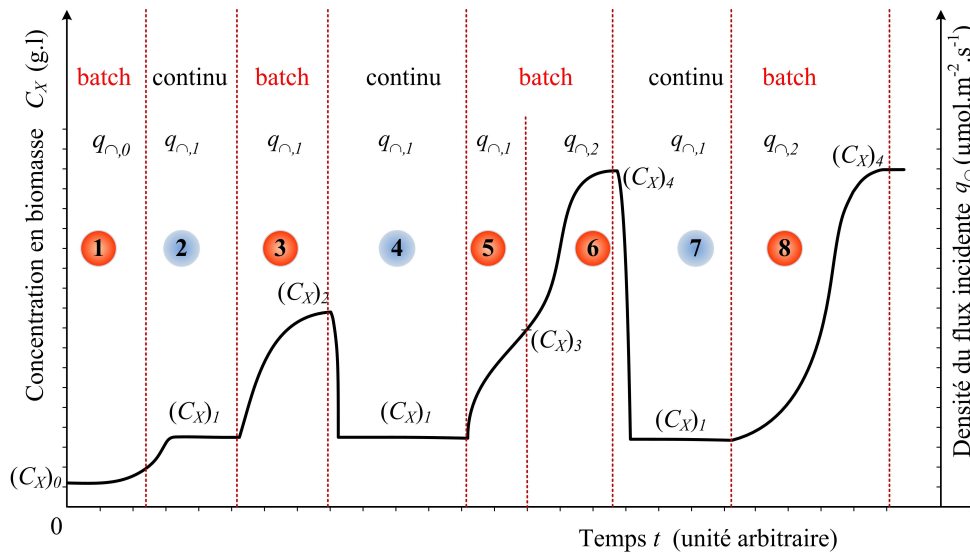


Figure IV.11 : Représentation schématique des expérimentations discontinues réalisées avec *C. reinhardtii*.

Après une phase de latence (phase 1 dans la figure (IV.11)) de 24 à 48 heures, le PBR est ensuite mis en mode continu avec un éclairage $q_{\cap,1} = 110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (phase 2). Après l'obtention d'un régime permanent (PBR en équilibre) à l'instant $t=t_0$, une production *batch* est lancée avec des conditions initiales de biomasse $(C_X)_1$ et de densité de flux incidente $q_{\cap,1} = 110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ correspondant à une limitation physique stricte (à $\gamma \cong 1$). Pendant la phase 3, la concentration augmente jusqu'à atteindre une valeur limite $(C_X)_2$ due à une limitation totale par la lumière. La phase 3 correspond donc à un *batch* durant lequel la culture est démarrée après stabilisation du PBR sans jamais être soumise à un régime cinétique. Durant la phase 4, la culture est de nouveau en mode continu jusqu'à atteindre un régime permanent semblable à la fin de la phase 2. Les deux cultures en *batch* qui suivent (phase 5-6 et phase 8) ont été choisies pour montrer l'effet d'un régime cinétique (phase 8) ou non (phase 5-6) sur la croissance de *C.reinhardtii* pour une même valeur de densité de flux incidente $q_{\cap,2} = 700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

IV.8. 4. Résultats et discussion

IV.8. 4.2. Effet d'un régime cinétique sur la vitesse de croissance

La figure (IV.12) représente une comparaison entre deux cultures discontinues effectuées à la même densité de flux incidente $q_{\gamma} = 700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La première suspension (courbe 1 dans la figure (V.12)), ayant une concentration initiale en biomasse $C_X = 0.77 \text{ g.l}^{-1}$, est en photolimitation avec une fraction volumique éclairée proche de 1 ($\gamma=0.93$) à l'instant $t=0$. Par contre, la deuxième culture discontinue (courbe 2 dans la figure (V.12)) se trouve en régime cinétique ($\gamma>1$) avec une faible concentration $C_X = 0.42 \text{ g.l}^{-1}$. Les deux cultures discontinues 1 et 2 atteignent respectivement une concentration maximale après 10 et 14 jours. On observe cependant qu'un jour a été suffisant pour que la culture discontinue 2 passe d'un régime cinétique de fonctionnement au régime de photolimitation caractérisant l'instant initial de la culture discontinu 1. Ce décalage de 4 jours obtenu en fin de culture est donc certainement expliqué par une influence du passage en régime cinétique sur la vitesse de croissance. Ce résultat illustre l'importance de contrôler le régime de fonctionnement du PBR. Cela ayant déjà été observé en culture continue, mais se révèle important également lors de la phase de démarrage d'une culture où un régime cinétique peut engendrer des réponses biologiques non maîtrisées, avec une influence directe sur la cinétique globale de la croissance en PBR.

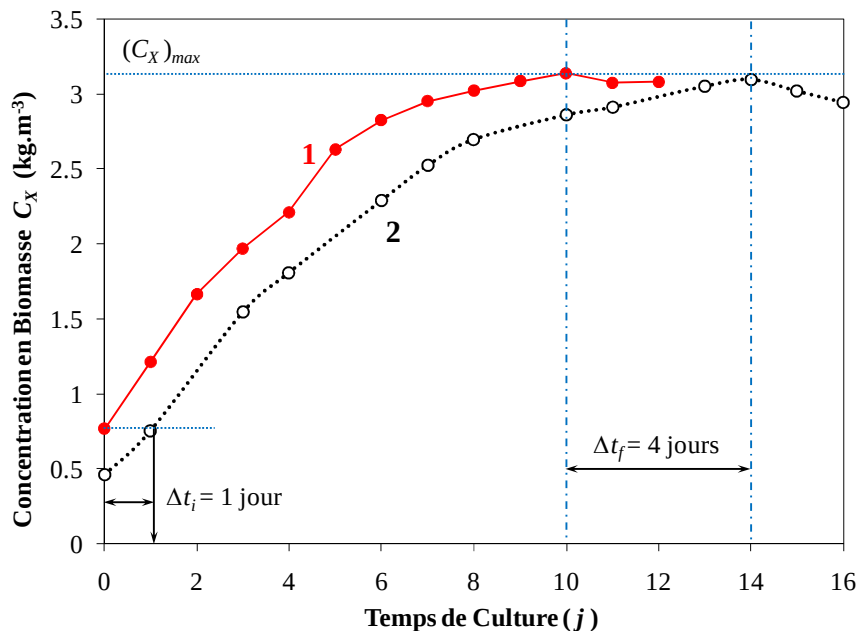


Figure IV.12 : Évolution de la concentration en biomasse en fonction de temps pour deux suspensions de *C. reinhardtii* cultivée en mode discontinue à $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sous lumière continue. En rond plein (●) et ligne continue (courbe 1), la culture ayant démarré à $\gamma=0.93$ sans jamais être en régime cinétique. Par contre, le tracé en rond blanc et ligne pointillée (courbe 2) est celui d'une culture en *batch* en régime cinétique ($\gamma>1$) à l'instant $t = 0$ (début de la culture discontinue).

IV.8. 4.2. Résultats expérimentaux et comparaison aux simulations

À tout instant, le bilan matière sur la biomasse nous permet d'écrire :

$$\frac{dC_X}{dt} = r_X - \frac{C_X}{\tau} \quad (\text{IV.19})$$

Dans les cultures en *batch*, le taux de dilution est égale à zéro et par suite le temps de présence τ est infini ($\tau = \infty$). L'équation (IV.19) s'écrit alors:

$$\frac{dC_X}{dt} = r_X \quad (\text{IV.20})$$

La résolution de cette équation différentielle donne l'évolution de la biomasse au cours de la culture pour les deux *batch* à 110 et 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les résultats sont présentés dans les figure IV.13 et IV.14.

Pour les deux cultures discontinues à 110 et 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, les simulations ont montré qu'en prenant les paramètres de la loi tels que validés en culture continue, la cinétique de la croissance est correctement prédite les 4 premiers jours. Ensuite, une divergence nette est observée (la courbe en trait pointillé donnée dans les figure (IV.14) et (IV.13) représente les simulations obtenues en conservant tout au long de la culture les mêmes paramètres). On observe après 4 à 5 jours du début du *batch* que la fraction éclairée γ diminue et atteint la valeur 0.3. À partir de cette fraction éclairée les simulations et les points expérimentaux divergent, quel que soit le flux incident considéré. Il a donc été choisi d'ajuster à ce stade les paramètres du modèle cinétique, en particulier au niveau du terme

$\left(\frac{J_{\text{NADH}_2} M_X}{v_{\text{NADH}_2-X}} \frac{K_r}{K_r + G} \right)$ qui est prédominant dans la zone sombre et donc particulièrement

influent pour des valeurs faibles de la fraction volumique éclairée. La vitesse spécifique de régénération des cofacteurs par la respiration J_{NADH_2} a en effet été identifiée sur des cultures continues pour des valeurs de la fraction éclairée comprise entre 0.5 et 1 (pour $0.5 \leq \gamma \leq 1$ on a $J_{\text{NADH}_2} = 2.39 \text{ mol.kg}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$), alors que dans le cas des *batches*, la fraction éclairée devient inférieure à 0.3 ($\gamma \leq 0.3$). Les nouvelles valeurs obtenues de J_{NADH_2} pour les deux flux étudiés 110 et 700 sont respectivement 1.45 et 1.82 $\text{mol.kg}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Cette variation de J_{NADH_2} illustre très certainement que le métabolisme énergétique de *C. reinhardtii* évolue, avec une « perte » caractérisée par la respiration qui apparemment diminue pour des valeurs de la fraction éclairée telles qu'atteintes en *batch*.

Dans ces cas extrêmes, la microalgue eucaryote a tendance à se rapprocher d'un comportement d'un micro-organisme procaryote, la respiration devenant alors très faible.

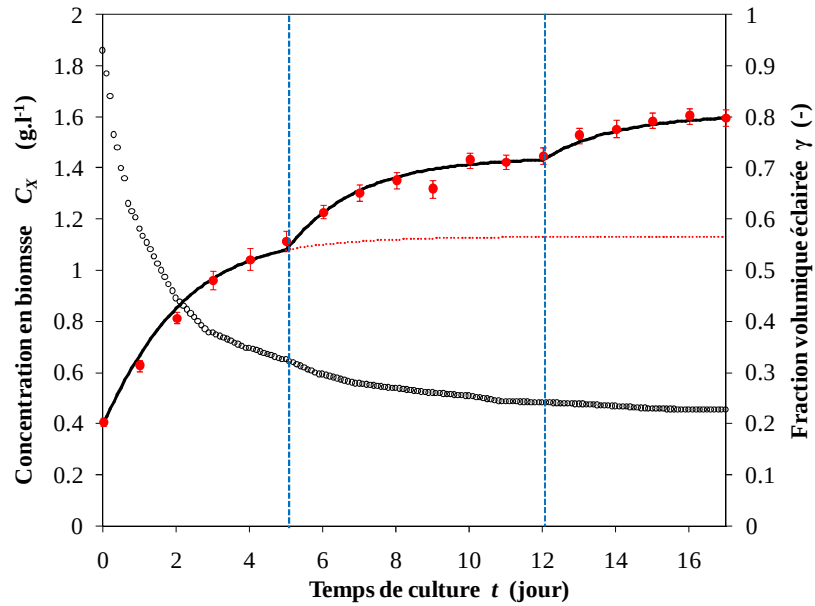


Figure IV.13 : Valeurs expérimentales (●) de la concentration en biomasse en fonction de temps pour une suspension de *C. reinhardtii* cultivée en *batch* à $110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sous lumière continue. Les points expérimentaux sont comparés aux simulations (trait continu) prédites par la résolution de l'équation cinétiques. En rond blanc (○) est représentée l'évolution de la fraction éclairée expérimentale γ_{exp} au cours de la culture.

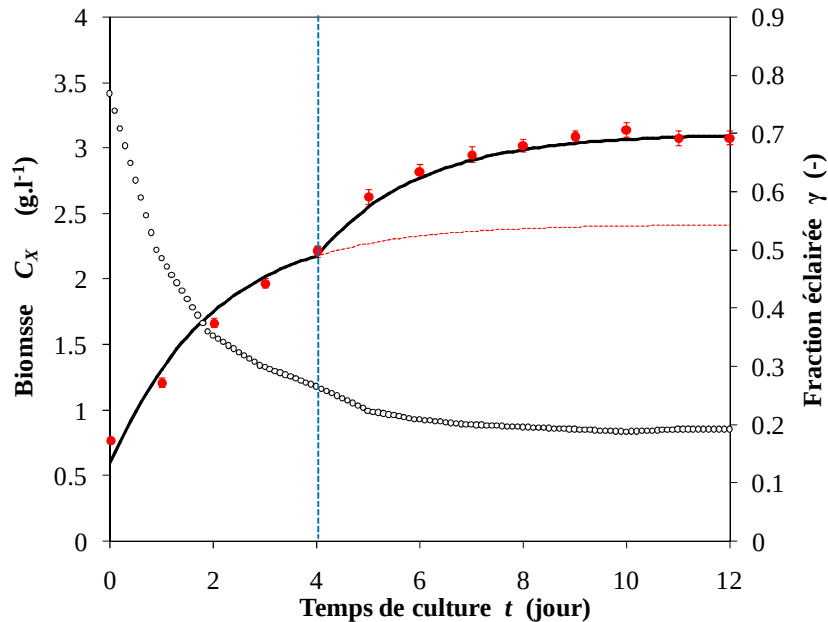


Figure IV.14 : Valeurs expérimentales (●) de la concentration en biomasse en fonction de temps pour une suspension de *C. reinhardtii* cultivée en *batch* à $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sous lumière continue. Les points expérimentaux sont comparés aux simulations (trait continu) prédites par la résolution de l'équation cinétiques. En rond blanc (○) est représentée l'évolution de la fraction éclairée expérimentale γ_{exp} au cours de la culture.

IV.9. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons établi un modèle cinétique de croissance photosynthétique pour la microalgue *C. reinhardtii*. Ce modèle de connaissance a été basé sur une approche déjà proposée pour une cyanobactérie (Cornet 2007a, 2009b). Cette loi prend en compte la contribution des deux métabolismes coexistants en même temps dans le cas d'une microalgue eucaryote, à savoir la photosynthèse et la respiration. Ces deux métabolismes qui se déroulent dans deux organites séparés (le chloroplaste et les mitochondries) sont ainsi pris en compte dans la représentation actuelle du modèle proposé. Le couplage de ce modèle avec le modèle de transfert radiatif (à deux flux) a permis de prédire le comportement cinétique de *C. reinhardtii* cultivée en PBR en lumière continue et de déterminer les performances du PBR. Le modèle cinétique a été validé pour de cultures continues ($0.5 \leq \gamma \leq 1$) et pour différent régimes de fonctionnement (limitation physique stricte photolimitation et également régime cinétique).

La comparaison entre les simulations et les résultats expérimentaux montre la robustesse de la loi proposée (<10% d'erreur). La nature des paramètres y figurant lui donne un caractère prédictif, la majorité des paramètres étant prédits théoriquement avec seulement deux paramètres identifiés. Le premier paramètre K a été identifié sur des expérimentations indépendantes assez simples à mettre en œuvre. Le deuxième paramètre K_r a été calculé analytiquement grâce à la connaissance de l'irradiance de compensation de compensation G_C calculée au chapitre III.

Ce modèle a été présenté comme un outil de prédiction de la productivité volumique quel que soit le régime de fonctionnement du PBR (culture photolimitée et culture en régime cinétique). Malgré la robustesse du modèle dans la prédiction de la productivité volumique des cultures continues jusqu'à une fraction volumique éclairée $\gamma=0.5$, une divergence a été observée pour les faibles fractions éclairées obtenues en culture batch ($\gamma=0.3$).

*Chapitre V: Étude des effets des cycles de lumière/obscurité sur la productivité volumique de *Chlamydomonas reinhardtii**

Résumé:

*Dans ce dernier chapitre, la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* sera cultivée en continu sous éclairage intermittent. Durant les expérimentations, des cycles de différentes fréquences seront testés et les productivités volumiques seront mesurées. En se basant sur le modèle cinétique présenté dans le chapitre précédent et sur les résultats expérimentaux obtenus dans ce chapitre, l'effet de ces cycles sur les performances cinétiques de *C. reinhardtii* sera montré, mettant en évidence par la même le couplage possible pouvant exister en PBR entre l'hydrodynamique et la conversion photosynthétique.*

V. Étude des effets des cycles de lumière/obscurité sur la productivité volumique de *Chlamydomonas reinhardtii* en photobioréacteur

V.1. Introduction

L'efficacité d'utilisation de la lumière est un facteur essentiel dans la mesure où la lumière est le substrat limitant principal de la croissance des micro-organismes photosynthétiques. Dans un PBR, le régime de lumière est déterminé par le déplacement des cellules en suspension dans le champ de rayonnement hétérogène (Richmond, 2000). Ceci est fonction du transfert de rayonnement, mais également de l'hydrodynamique s'il s'avère que les cycles d'éclairement alors générés influent sur la conversion photosynthétique.

De nombreux travaux sur les effets possibles des cycles intermittents de lumière sont disponibles. Burlew (1953) l'a ainsi étudié pour le cas de fortes intensités lumineuses en appliquant des cycles intermittents de lumière afin de diminuer leurs effets sur la «photoinhibition». Il a été ensuite montré que des alternances rapides entre des périodes à fortes intensités lumineuses et des périodes sombres (de moins de 40 μ s à 1 seconde) peuvent améliorer fortement l'efficacité photosynthétique (Phillips et Myers, 1954; Terry, 1986; Matthijs et al., 1996), notamment pour les cycles les plus courts (< 40 μ s) avec des périodes sombres pouvant être largement supérieures aux périodes éclairées. Cette amélioration de la conversion photosynthétique par ces cycles de lumière/obscurité rapides est souvent connue dans la littérature sous le nom de « *flashing light effect* » (Kok, 1953; Kok, 1956; Terry, 1986). Ce phénomène a été mis en évidence par Kok (1953) qui a observé une croissance équivalente des micro-organismes photosynthétiques en les soumettant à une lumière continue, et à des flashes rapides de lumière synchronisés sur les temps caractéristiques de la chaîne photosynthétique (flash d'une milliseconde, suivi de périodes sombres 5 à 40 fois plus longues). Ce raisonnement est ici basé sur le fait qu'une fois qu'un photon a été absorbé au niveau des pigments, son exploitation par la chaîne photosynthétique pour créer des équivalents énergétiques (schéma en Z) nécessite un certain temps pendant lequel la chaîne est réduite et ne peut exploiter efficacement d'autres

photons. L'idée générale est donc que si la synchronisation est parfaite entre la fréquence d'arrivée des photons sur les photosystèmes, et la fréquence caractéristique de la réponse de la chaîne photosynthétique, chaque photon capté par la cellule sera utilisé efficacement pour la croissance, dans la mesure où la chaîne sera en état oxydé à chaque nouvelle arrivée de photons (Matthijs et al., 1996) (voir également le paragraphe I.5.3. du premier chapitre pour plus de détails).

Dans la mesure où l'absorption au niveau des pigments est quasi-instantanée (de l'ordre de 10^{-11} secondes, Vonshak (1997)), la fréquence visée par le «*flashing light effect*» est celle donnée par le temps caractéristique de réponse de la chaîne photosynthétique (qui correspond donc à réalisation du schéma en Z). Un transfert d'électrons s'effectue en moins d'une milliseconde (ms) (Lodish et al., 2005) ce qui mène à des fréquences élevées (1000 Hz environ). Pour des fréquences plus basses (correspondant à des périodes de quelques secondes, usuellement rencontrées en PBR comme discuté par la suite), les effets sont toutefois différents et apparaissent dépendants notamment de l'intensité de la lumière incidente et des espèces cultivées. Il a ainsi été suggéré que certaines microalgues sont capables de maintenir un taux de croissance maximal pour des périodes sombres aux alentours de 10 secondes (Lee et Pirt 1981 ; Merchuk et al., 1998). Dans les travaux de Janssen et al. (1999 & 2000), différentes espèces de microalgues (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana* et *Dunaliella tertiolecta*) ont été cultivées en lumière intermittente avec des durées moyennes des cycles des lumière/obscurité (13-87 s ; 6-25 s et 15 s) et des courtes durées (0.19-6 s). Au contraire d'un effet bénéfique comme observé lors de l'application des flashes de lumière avec des périodes sombres et éclairées adéquates, les expérimentations réalisées par Janssen (1999; 2000a; 2000b) ont montré qu'un régime fluctuant d'éclairement conduit à une altération de la conversion photosynthétique par rapport à un éclairage continu. Grobbelaar et al. (1996) ont ainsi supposé qu'une amélioration est observée seulement lorsque les cycles appliqués sont de fréquences supérieures à 1 Hz. Ces auteurs ont conclu également que le taux de croissance augmente exponentiellement avec les fréquences des cycles de lumière/obscurité. Ils ont observé que l'augmentation de la période sombre par rapport à la période éclairée conduit à une augmentation de « l'efficacité photosynthétique » mais non pas l'inverse. Les effets de la photoadaptation sont finalement discutés, une pigmentation plus importante étant obtenue pour des cycles à basses fréquences, avec un effet moins prononcé pour des cycles à hautes fréquences.

Il ressort de cette analyse de la littérature que, même s'il est constaté que les régimes d'éclairement ont un effet sur la croissance, leur quantification exacte reste à réaliser notamment pour une transposition en PBR. Il apparaît en effet que le terme « *Light/Dark cycles effect* » englobe plusieurs mécanismes pouvant se superposer ou pas selon les cycles appliqués ou les espèces considérées, avec parfois une confusion entre les effets obtenus à hautes fréquences (« *flashing light effect* ») et ceux à basses fréquences (cycles de plusieurs secondes). Selon les auteurs, et les conditions étudiées, un gain ou une perte sont à attendre. L'objet de ce chapitre sera de clarifier ce point, en l'étudiant en conditions qui se voudront les mieux contrôlées possibles, et surtout représentatives de ce qui pourrait être rencontré en PBR.

V.2. Étude de l'effet des cycles de lumière/obscurité en photobioréacteurs

V.2.1. Génération des cycles de Lumière/obscurité

Le régime fluctuant de lumière induit par l'hydrodynamique en PBR et donc subi par les cellules en circulation peut être simulé ou générer artificiellement en se basant sur deux approches distinctes :

- La première implique une utilisation d'une source de lumière ou d'un système permettant de générer une lumière intermittente. Dans la mesure où cela mène inévitablement à une diminution de l'énergie fournie à la culture, cette approche est difficilement exploitable dans le cas des cultures en masse où l'on cherche à atteindre des hautes productivités et donc des hautes concentrations (Richmond, 2004). Elle reste toutefois utile dans un but académique, et elle a été employée durant notre étude.
- L'autre approche consiste à utiliser une source de lumière continue en ayant une partie du PBR cachée. Concrètement, les cellules sont alors mises en circulation en passant du volume éclairé au volume sombre, et seront donc soumises à un régime fluctuant de lumière (Wu et Merchuk 2001).

V.2.2. Caractérisation des périodes éclairées et sombres en PBR

V.2.2.1. Caractérisation hydrodynamique du PBR torique

L'optimisation de la croissance des micro-organismes photosynthétiques demande une bonne compréhension du couplage entre la réponse biologique et les conditions environnementales. C'est dans cette optique que le réacteur torique a été conçu afin de permettre un contrôle poussé des différents paramètres de culture (notamment la lumière), tout en maintenant des conditions de mélanges efficaces, en particulier le long du gradient

de lumière (Pruvost et al., 2006). La caractérisation hydrodynamique du PBR torique a été réalisée en se servant d'un code de calcul de mécanique des fluides numérique ou CFD (pour *Computational Fluid Dynamics*), à savoir le logiciel commercial Fluent (Ansys Inc.). Cette étude théorique a été validée par comparaison à des mesures hydrodynamiques obtenues expérimentalement par la vélocimétrie par images de particules (PIV) (Pottier 2005). Les caractéristiques hydrodynamiques du PBR torique étant connues, les auteurs se sont intéressés en particulier à la détermination des trajectoires suivies par les cellules en fonction de la vitesse de rotation du mobile d'agitation, en utilisant une méthode Lagrangienne de calcul (Pruvost et al., 2006 & 2008). Des exemples de résultats de simulations de trajectoires de microalgues sont donnés dans la figure (V.1).

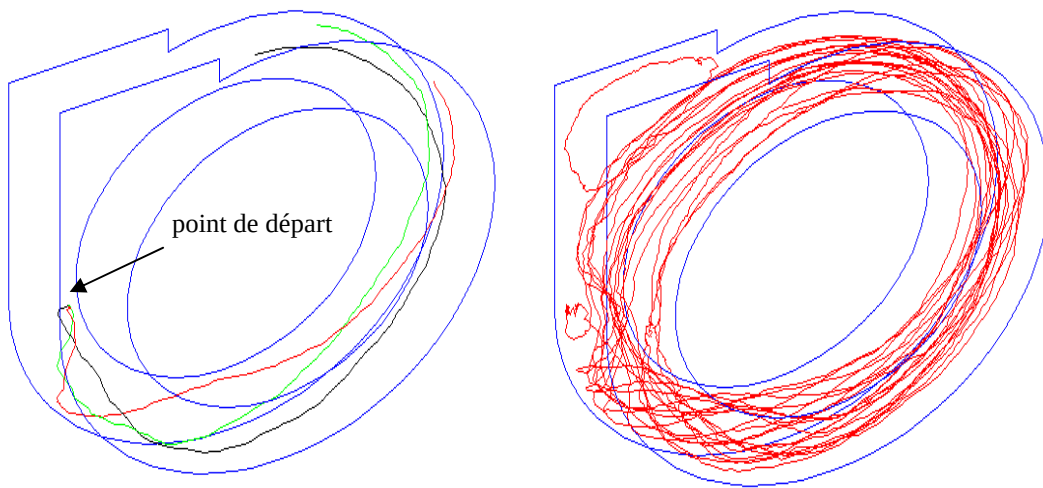


Figure V.1 : Exemples de trajectoires suivies par les micro-organismes dans le photobioréacteur torique. À droite: nombre de micro-organismes = 3, temps simulé = 4 s, $N = 300$ tr/min. À gauche, nombre de micro-organismes = 1, temps simulé = 150 s, $N = 300$ tr/min. (Données Pruvost et al., 2006).

V.2.2.2. Caractérisation du régime fluctuant de lumière rencontré en PBR torique

Les trajectoires suivies par les cellules étant connues, elles ont été associées à un modèle de transfert de rayonnement (modèle à deux flux) afin de caractériser le régime d'éclairement subi par les cellules en circulation (Pruvost et al., 2006&2008). La figure (V.2) reprend le régime d'éclairement subi lors du déplacement des cellules suivant la profondeur du réacteur et donc le gradient de lumière.

A partir de ces résultats, le régime fluctuant de lumière rencontré dans le PBR torique a donc pu être au final caractérisé. L'approche Lagrangienne a ainsi permis de déterminer les caractéristiques des cycles phases éclairées/phases sombres pour différentes conditions de fonctionnement (Pottier 2005).

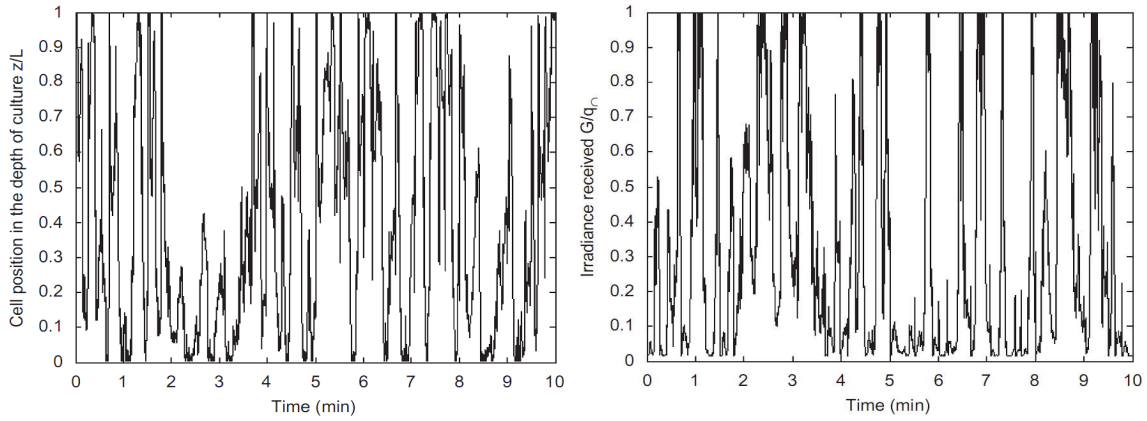


Figure V.2 : Exemple du déplacement des cellules à travers le gradient de lumière (figure à droite) et le régime d'éclairement subi dans le PBR torique. ($N = 300$ tours/min, $q_0 = 200 \mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $C_X = 1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) ; N étant la vitesse de rotation de l'hélice ; q_0 la densité de flux incidente et C_X la biomasse (d'après Pruvost et al., 2006).

Un exemple est donné sur la figure (V.3), où est représentée la distribution des valeurs caractéristiques du régime fluctuant de lumière rencontré dans le PBR torique cultivant la microalgue *C. reinhardtii* pour une concentration en biomasse $C_X = 1,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, une vitesse de rotation $N = 200$ tours/min, et une densité de flux incidente $q_0 = 200 \mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Il est ainsi observé que des temps de quelques secondes à plusieurs dizaines secondes sont rencontrés, et ce malgré les bonnes performances en terme de mélange du PBR torique. Ces résultats montrent qu'il apparaît difficile d'induire les phénomènes liés aux flashes de lumière (*flashing light effect*) en PBR (sauf peut-être pour des cas particuliers de conception ou d'utilisation). Cela avait déjà été remarqué par divers auteurs (Powell et al., 1965; Janssen, 2003, Pruvost et al., 2008).

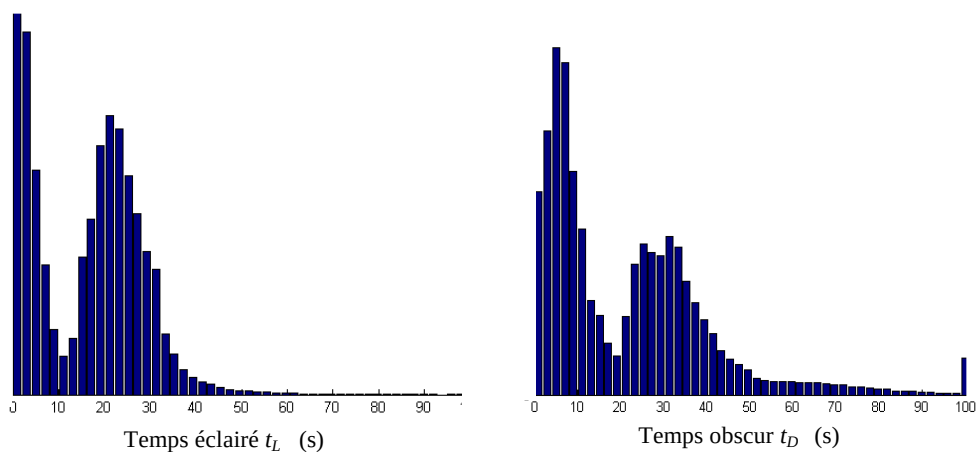


Figure V.3 : Distribution des valeurs caractéristiques du régime fluctuant de lumière rencontré dans le PBR torique (à gauche : temps éclairé t_L ; à droite : temps obscur t_D) avec $C_X = 1,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, $N = 200$ tours/min, $q_0 = 200 \mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (d'après Pottier 2005).

V.2.3. Procédure expérimentale pour l'étude des cycles de lumière/obscurité

Comme il a été déjà dit, l'objet de ce travail n'est pas de chercher les conditions adéquates de mélange qui favorisent une meilleure exploitation de la lumière reçue par les cellules. L'objectif est de montrer si un couplage hydrodynamique/conversion photosynthétique existe chez *C. reinhardtii*, et si oui, s'il peut être quantifié précisément (en vue à terme de disposer d'outils permettant d'optimiser l'hydrodynamique en PBR). Les cycles de lumière/obscurité seront donc simulés avec une source de lumière intermittente (panneau de DEL). Dans le deuxième chapitre (Matériel et Méthodes), il a été démontré que les cycles générés par le panneau de DEL équipant le réacteur torique sont maîtrisés en termes d'intensités et de fréquences. Cela a donc permis de tester l'influence sur la croissance de *C. reinhardtii* de divers paramètres définissant ces cycles, comme le flux incident $q_{\cap,L}$, la durée des cycles t_C et la fraction éclairée $\varepsilon = t_L / t_C$.

Compte-tenu des résultats obtenus aux deux chapitres précédents ayant montré l'importance des conditions de transfert de rayonnement au sein de la culture, les diverses expérimentations seront effectuées en contrôlant rigoureusement la fraction volumique éclairée $\gamma = V_l / V_R$. L'objectif étant de simuler des passages entre les zones sombres et éclairées d'un PBR, il a été choisi d'éviter la présence d'un volume sombre pendant la période éclairée t_L représentant donc le séjour de la culture dans la zone éclairée. De plus, comme un fonctionnement en régime cinétique peut induire des réponses biologiques non représentatives des conditions réelles d'un PBR utilisé en photolimitation (voir le chapitre précédent), il a été choisi d'éviter cela en maintenant la condition $\gamma \cong 1$ pendant les périodes éclairées. Il est à noter que, bien que cela paraisse ici évident compte-tenu des résultats obtenus en éclairage continu, cette contrainte est rarement considérée dans la littérature, la plupart des expérimentations ayant lieu en conditions de culture diluée (et donc en régime cinétique). Cela permet de négliger la distribution de lumière dans la culture (en première approximation), et donc de supposer un comportement quasi-homogène de la culture. Néanmoins, comme il a été montré, bien que cela apparaisse séduisant pour l'interprétation des résultats, cela peut induire des phénomènes particuliers comme la « photoinhibition » qui ne seraient pas (ou très peu) rencontrés en conditions normales de photolimitation.

Pour assurer un contrôle rigoureux de la fraction $\gamma \cong 1$ pendant la période éclairée, les expérimentations ont donc été menées dans le PBR torique en gardant la biomasse constante au moyen de la sonde turbidité équipant le PBR torique. Lorsque la culture atteint

le régime permanent (hypothèse de l'état pseudo-stationnaire), la culture a été analysée (concentration en biomasse et en pigments). En connaissant le taux de dilution D et la concentration en biomasse, la productivité volumique expérimentale est alors donnée par l'équation (III.3).

V.3. Considérations théoriques dans la représentation de la croissance des microalgues en lumière intermittente

Les cycles de lumière /obscurité artificiels que subissent les microalgues en PBR sont caractérisés par leur fréquence (temps de cycles t_C et fraction éclairée $\varepsilon = t_L / t_C$) et par l'intensité de lumière ($q_{\cap,L}$) pendant la période éclairée. Comme déjà cité dans le premier chapitre, deux types de réponses caractéristiques peuvent être considérées dans le cas des cultures en lumière intermittente, la première étant une réponse sans intégration et la deuxième avec intégration totale (Terry 1986). Ces deux types de réponses idéales peuvent être exprimés en termes de productivités volumiques en se basant sur les hypothèses de Terry (1986).

Pour une réponse avec intégration totale (*full integration*), les cellules ne sont pas sensibles aux fluctuations de lumière. Dans ce cas, la culture perçoit une quantité moyenne de lumière valant $\varepsilon.q_{\cap,L}$, conduisant ainsi à la productivité volumique suivante:

$$\langle r_X \rangle_{fi} = \langle r_X(\varepsilon.q_{\cap,L}) \rangle_{cl} \quad (V.1)$$

où $\langle r_X \rangle_{cl}$ représente la VVMCB obtenue en lumière continue (*continuous light*) pour un flux incident valant $(\varepsilon.q_{\cap,L})$. Pourtant, l'existence d'une réponse avec intégration totale reste à discuter d'un point de vu énergétique.

Pour une réponse sans intégration (*without integration*), la culture perçoit au contraire toutes les variations de lumière. La croissance résultante est donc la moyenne des croissances obtenues pour chaque intensité de lumière subie. D'une façon générale, on obtient donc :

$$\langle r_X \rangle_{wi} = \varepsilon . \langle r_X(q_{\cap,L}) \rangle_{cl} + (1 - \varepsilon) . \langle r_X(q_{\cap,D}) \rangle_{cl} \quad (V.2)$$

Si le régime de lumière est composé de périodes éclairées et obscures ($q_{\cap,d}=0$), on obtient donc :

$$\langle r_X \rangle_{wi} = \varepsilon . \langle r_X(q_{\cap,L}) \rangle_{cl} + (1 - \varepsilon) . \langle r_{X,D} \rangle_{cl} \quad (V.3)$$

où $\langle r_{X,D} \rangle_{cl}$ représente la valeur obtenue à l'obscurité totale (perte dans la croissance pendant la période sombre). La VVMCB est donc la somme d'un gain dans la VVMCB pendant la période éclairée et d'une perte de VVMCB pendant la période sombre (avec $\langle r_{X,D} \rangle_{cl}$ négative). A noter que $\langle r_X \rangle_{cl}$ représente la VVMCB obtenue en lumière continue pour une densité de flux incidente ($q_{\odot,L}$), dans la mesure où il n'y a pas d'intégration, la réponse du micro-organisme étant donc instantanée.

Que ce soit pour l'une ou l'autre des réponses types, la valeur résultante de la VVMCB peut être calculée connaissant les valeurs obtenues en éclairement continu. Néanmoins, même si la réponse réelle d'une microalgue peut correspondre à une réponse idéale, elle peut être également intermédiaire. On parlera alors d'intégration partielle de la lumière. Une première étude utilisant les données de la littérature (notamment de Janssen et al., 2000), a montré que *C. reinhardtii* présentait *a priori* une réponse intermédiaire (Pruvost 2005). Pour pouvoir représenter ce cas où il y a donc influence entre les fréquences de cycles imposées et la réponse en croissance de l'algue, il est nécessaire d'introduire la dynamique liée à cette réponse. Pruvost (2005) a ainsi proposé de représenter cette réponse intermédiaire par une activation (lors de l'éclairement) et désactivation progressives (lors du passage à l'obscurité) de la chaîne photosynthétique, en introduisant des temps d'activation τ_a et de désactivation τ_d de la photosynthèse. La VVMCB est alors formulée de façon temporelle suivant l'équation différentielle :

$$\frac{dr_X}{dt} = k(r_{X_{perm}} - r_X(t)) \quad (V.4)$$

avec $k = \frac{1}{\tau_a}$ pour la phase d'activation (de l'obscurité à l'éclairement) et $k = \frac{1}{\tau_d}$ pour la phase désactivation (de l'éclairement à l'obscurité), et $r_{X_{perm}}$ représente la VVMCB obtenue en lumière continue.

Si les constantes τ_a et τ_d sont connues, ce type de modèle peut être utilisé pour déduire l'influence de régimes de lumière donnés sur la VVMCB. Il pourrait alors être utilisé pour optimiser ces régimes en PBR, par optimisation conjointe des conditions hydrodynamiques et de transfert de rayonnement. Comme il a été dit auparavant, cela ne constitue pas l'objectif de ce travail.

Pour conclure sur cette présentation des effets possibles des régimes d'éclairement sur la réponse en croissance des algues, la figure (V.4) représente les différentes réponses possibles à un régime de lumière composé d'une succession en créneaux de périodes éclairées et obscures. La réponse idéale sans intégration suit parfaitement ces créneaux, alors que la réponse avec intégration totale, au contraire, est constante et est fixée par la lumière reçue en moyenne. Un exemple de réponse intermédiaire avec intégration partielle est également donné. Pour cela, des temps de réponse non nuls sont ajoutés à la réponse sans intégration. Cela permet d'introduire des réponses transitoires lors des passages entre les différentes phases d'éclairement. Un temps d'activation de la réponse photosynthétique (lié à τ_a) est ainsi obtenu lors du passage entre phases obscures et éclairées, avec un temps de désactivation (lié à τ_d) lors du passage entre phases éclairée et obscures. A noter que l'introduction d'une formulation dynamique de la réponse photosynthétique implique une résolution temporelle non directe. Pour plus de renseignements, on pourra se référer à Pruvost et al. (2008) ou Pruvost (2005).

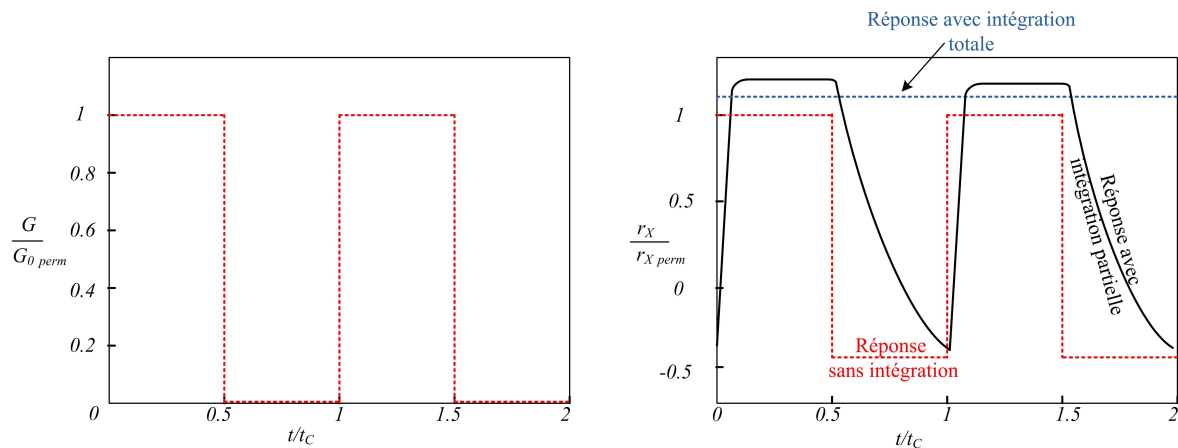


Figure V.4 : Représentation des réponses types de la croissance par photosynthèse et de la réponse intermédiaire à un éclairage intermittent (gauche : éclairage imposé - droite: réponse avec et sans intégration de la lumière reçue) (adapté d'après Pruvost 2005).

V.4. Choix du micro-organisme photosynthétique pour étudier l'effet des L/D cycles

Comme déjà cité au premier chapitre, le couplage hydrodynamique/conversion photosynthétique, s'il existe, sera *a priori* très faible pour une cyanobactérie (procaryote) ayant la même chaîne de transporteurs d'électrons pour la photosynthèse et la respiration. En effet, le temps de résidence des cellules dans la zone sombre est souvent inférieur à une minute, durée approximative pour que la respiration se mette en place (Cornet, 1992). Une culture de cyanobactéries se verra donc rester dans un métabolisme photosynthétique, sans

« bascule » sur un métabolisme respiratoire. Or, l'analyse des temps caractéristiques (voir paragraphe I.5.6) montre que les effets liés aux cycles longs imposés par l'hydrodynamique font plutôt intervenir des phénomènes liant les deux processus de photosynthèse et de respiration. En ce sens, une cyanobactérie serait ainsi *a priori* plus sensible aux « *flashing light effect* » intervenant au niveau du schéma en Z seul. Pour des cycles plus longs sa réponse serait donc sans intégration (cela reste à vérifier néanmoins). Quoi qu'il en soit, il paraît plus judicieux de réaliser l'étude de l'effet du régime fluctuant de lumière sur la conversion photosynthétique en cultivant une microalgue eucaryote qui sera *a priori* plus sensible aux fluctuations de lumière induites par l'hydrodynamique, comme *C. reinhardtii*. Il reste cependant à vérifier le type de réponse obtenue. Si la réponse est idéale (avec intégration totale ou sans intégration), un modèle cinétique « classique » obtenu en lumière continue pourra être utilisé pour en déduire ensuite la réponse moyenne sur le réacteur. Une approche Lagrangienne pourra être utilisée pour calculer les régimes de lumière subis, mais l'intérêt sera limité dans la mesure où il n'y aura pas d'interaction dynamique susceptible de faire intervenir un couplage non linéaire à la réponse photosynthétique.

V.5. Résultats expérimentaux

V.5.1. Introduction

Pour montrer qu'un potentiel effet de l'hydrodynamique peut avoir lieu dans le cas des cultures en lumière continue (avec donc une réponse non idéale), il suffit de montrer que la VVMCB obtenue pour des cultures en lumière intermittente est influencée par les durées de cycles t_L et t_C pour une fraction éclairée ε donnée. En effet, comme il a été montré dans le paragraphe précédent, lorsque des cycles sont appliqués, les deux comportements idéaux amènent à une formulation de la VVMCB uniquement fonction de la fraction éclairée ε . Cela ne signifie pas cependant que si un effet hydrodynamique existe, la fraction éclairée n'aura pas d'influence. Comme il a été dit auparavant, certains travaux tendent en effet à montrer qu'une période éclairée plus courte que la période sombre aura un effet bénéfique. L'application de fractions éclairées ε différentes permettra donc également de mettre cela en évidence, dans la mesure où cette grandeur est liée au rapport entre les durées des phases obscures et éclairées.

Les expérimentations réalisées en lumière intermittente ont donc été divisées en deux groupes. La première série a été effectuée à fraction éclairée constante ($\varepsilon=0.5$) pour des cycles allant de 720 secondes à 1 seconde avec une densité de flux incidente pendant la

période éclairée $q_{\cap,L} = 220 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et une obscurité totale pendant la période sombre ($q_{\cap,D}=0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). La deuxième série a été réalisée à fraction éclairée variable ($\varepsilon=0.5-0.7-0.85$) en prenant une période éclairée constante ($t_L=3$ secondes) avec les mêmes intensités de lumière pour les périodes éclairées et sombres que la première série. Dans toutes les expérimentations, la concentration en biomasse a été fixée de façon à ne pas avoir de zone sombre dans le PBR pendant la période éclairée ($G(z=L) \equiv G_C$).

V.5.2.Utilisation des expérimentations en cycles intermittents de lumière pour caractériser les cinétiques associées au comportement à l'obscurité

Les expérimentations en cycles intermittents de lumière permettent de caractériser une grandeur importante, à savoir la VVMCB obtenue à l'obscurité. En effet, ce type de donnée est difficile à mesurer directement. Une estimation peut être obtenue par mesure de la perte en biomasse à l'obscurité. Il s'avère néanmoins que pour avoir une précision suffisante, le temps de mesure doit être long pour observer une décroissance suffisante de la biomasse (typiquement plusieurs heures). Or, rien ne garantit que les mécanismes impliqués seront alors équivalents à ceux rencontrés lorsqu'une cellule traverse une zone sombre d'un PBR pendant quelques secondes ou quelques dizaines de secondes. Même s'il est impossible de faire un parallèle direct avec les microalgues, c'est le cas notamment des cyanobactéries où il faut une à plusieurs minutes avant que la respiration ne soit active. Les mesures en cycles intermittents de lumière apparaissent en ce sens comme une méthode originale d'accéder à ce type de mesure. En effet, si on considère une réponse idéale sans intégration, l'équation (V.2) donne la VVMCB à l'obscurité $\langle r_{X,D} \rangle_{cl}$ en fonction de ε (imposé) et $\langle r_X \rangle_{cl}$ qui représente la VVMCB obtenue en lumière continue à $q_{\cap,L}$ et $\gamma=1$, deux grandeurs qui peuvent être mesurées indépendamment (comme cela a été réalisé dans le chapitre III). L'obtention de la VVMCB $\langle r_X \rangle$ obtenue par mesure directe pour un cycle d'éclairement donné permettra donc d'en déduire $\langle r_{X,D} \rangle$:

$$\langle r_{X,D} \rangle = \frac{\varepsilon \cdot \langle r_X \rangle_{cl} - \langle r_X \rangle}{(1 - \varepsilon)} \quad (\text{V.5})$$

Ce raisonnement impose néanmoins que la réponse puisse être considérée comme idéale et sans intégration. Cela nécessite également d'appliquer des cycles où les effets d'intégration seront négligeables. Si on considère que ces effets d'intégration sont représentés par les

constantes d'activation τ_a et de désactivation τ_d , cela impose de respecter les conditions suivantes :

$$t_L \gg \tau_a \quad \text{et} \quad t_D \gg \tau_d \quad (\text{V.6})$$

Dans ce cas, les effets d'intégration seront négligeables, et la réponse pourra être considérée comme idéale et sans intégration. L'équation (V.5) pourra donc être utilisée pour en déduire $\langle r_{X,D} \rangle$.

V.5.3. Résultats expérimentaux pour un temps de cycle variable et une fraction éclairée constant ($\varepsilon=0.5$)

Les temps des cycles ont été choisis pour couvrir une large gamme susceptible d'être rencontrée en PBR, avec donc des cycles de 720 à 1 seconde ($\varepsilon=0.5$). Le tableau V.1 regroupe les résultats expérimentaux obtenus pour des cultures continues de *C. reinhardtii* soumises à des cycles d'éclairement dans le PBR torique. Comme il est montré dans le tableau, il a été observé que le passage en lumière intermittente provoquait une évolution de la pigmentation avec une augmentation de 20 à 30%. Cela avait déjà été observé par Janssen et al. (1999) qui avait obtenu une augmentation jusqu'à 50% en chlorophylle a par comparaison à des cultures en lumière continue (à noter que cela constitue un premier effet de l'application de régimes fluctuants). Du fait de cette augmentation dans la pigmentation, les propriétés optiques de la suspension sont donc modifiées. Les fractions volumiques éclairées (γ) ont donc été re-calculées à chaque essai afin d'ajuster les conditions (concentration en biomasse dans le cas présent) pour garantir l'absence d'une zone sombre dans le PBR pendant la période éclairée (t_L). Les valeurs obtenues au final sont reportées dans le tableau (V.1) et montrent que, aux incertitudes près, tout le PBR est en limitation physique stricte ($\gamma \cong 1$) pendant la période éclairée. Les résultats obtenus sont présentés également sous forme graphique dans la figure (V.5).

On remarque ainsi que pour des temps de cycles inférieurs à 12 s, une augmentation de la VVMCB est observée (40% environ). Un effet des régimes fluctuants est donc obtenu. Ce résultat sera discuté plus en détails par la suite.

$q_{\cap,L}$ ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	220	220	220	220	220	220	220	220
$q_{\cap,D}$ ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	0	0	0	0	0	0	0	0
t_L (s)	360	180	60	20	6	3	1	0.5
t_C	720	360	120	40	12	6	2	1
fréquence (Hz)	0.00138	0.0027	0.0083	0.025	0.083	0.167	0.5	1
La fraction éclairée ε (-)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Concentration en biomasse C_X ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	0.412	0.408	0.406	0.394	0.408	0.405	0.429	0.410
Taux de dilution D (h^{-1})	0.0086	0.0085	0.0082	0.0084	0.011	0.011	0.011	0.011
Teneurs en pigments (% biomasse sèche)	<i>Chl a</i>	2.223	2.2677	2.213	2.524	2.23	2.219	2.089
	<i>Chl b</i>	0.898	0.878	0.878	0.961	0.868	0.869	0.801
	<i>PPC</i>	0.752	0.751	0.722	0.831	0.737	0.734	0.681
Productivité volumique ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	3.55×10^{-3}	3.47×10^{-3}	3.33×10^{-3}	3.33×10^{-3}	4.51×10^{-3}	4.46×10^{-3}	4.78×10^{-3}	4.53×10^{-3}
Fraction volumique éclairée γ pendant t_L	0.94	0.94	0.98	0.89	0.95	0.98	0.93	1.03

Tableau V.1 : Tableaux résumant les points expérimentaux obtenus en cultivant la microalgue *C. reinhardtii* dans le PBR torique en lumière intermittente pour différentes temps de cycles à fraction éclairée constante ($\varepsilon=0.5$). Les densités de flux incidente pendant les phases éclairée et sombre sont respectivement $q_{\cap,L}$ et $q_{\cap,D}$.

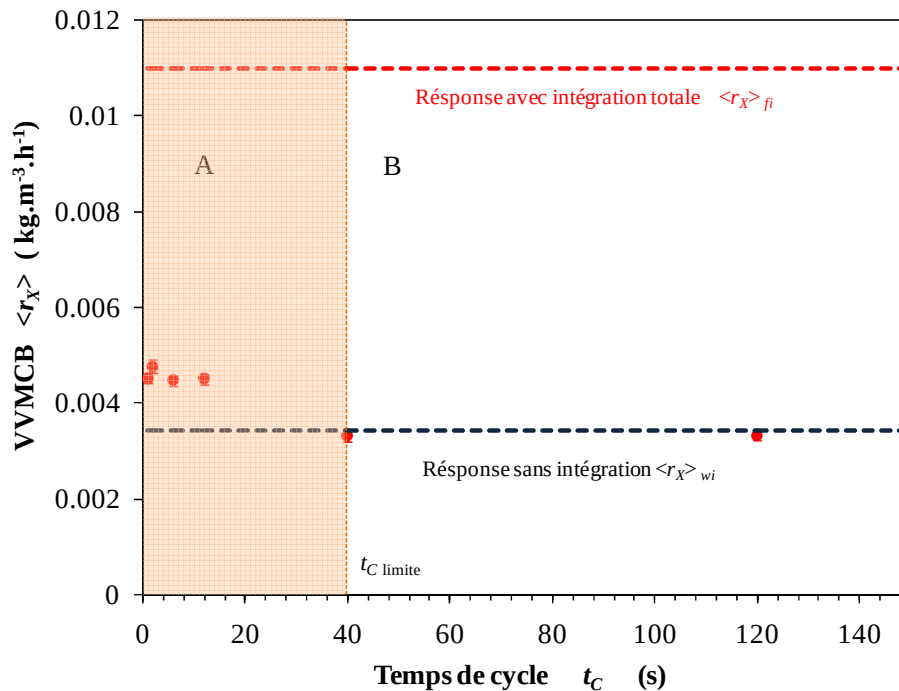


Figure V.5 : Évolution de la vitesse volumétrique moyenne de la croissance en biomasse (VVMCB) en éclairage intermittent pour des périodes de cycles allant de 120 à 1 seconde à fraction éclairée constante ($\varepsilon=0.5$). Les conditions d'éclairage sont : $q_{\cap,L}=220 \mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pendant la période éclairée et l'obscurité totale pendant la période sombre ($q_{\cap,D}=0$). Les zones indiquées sur le schéma sont : A, zone où la durée des temps des cycles a un effet sur la VVMCB ; B, zone où les périodes des cycles n'influencent pas la VVMCB.

Pour mener à bien le raisonnement, il est intéressant de calculer les VVMCB qui seraient obtenues pour les deux réponses idéales. La réponse avec intégration totale est donnée par :

$$\langle r_X \rangle_{fi} = \langle r_X \rangle_{cl} (\varepsilon \cdot q_{\cap,L})$$

Dans ce cas, $\langle r_X \rangle_{cl}$ est la VVMCB obtenue pour un éclairage continu ayant une densité de flux incidente $q_{\cap} = \varepsilon \cdot q_{\cap,L} = 110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ceci a été obtenu au chapitre III et on a donc $\langle r_X \rangle_{fi} = \langle r_X \rangle_{cl}$ à $\gamma=1$ soit $\langle r_X \rangle_{fi} = 11.10^{-3} \text{kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$.

La réponse sans intégration est donnée par :

$$\langle r_X \rangle_{wi} = \varepsilon \cdot \langle r_X \rangle_{cl} + (1 - \varepsilon) \cdot \langle r_X \rangle_D$$

$\langle r_X \rangle_{cl}$ correspond à la VVMCB à $q_{\cap,L} = 220 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et $\langle r_X \rangle_D$ à la VVMCB à l'obscurité. Comme il a été dit auparavant, cette valeur peut être obtenue à partir des mesures en cycles intermittents, sous réserve que $t_L \gg \tau_a$ et $t_D \gg \tau_d$. Cela impose des cycles longs mais les constantes τ_a et τ_d n'étant pas connues *a priori*, il n'est pas possible d'en définir les valeurs exactes. Toutefois, si cette condition est vérifiée, par définition, on aura la VVMCB qui sera alors indépendante des durées de cycles appliqués (réponse idéale sans intégration). C'est ici le cas pour les cycles supérieurs à 40s, une faible variation étant alors observée pour des cycles allant jusque 720s. Il a donc été retenu d'utiliser les résultats obtenus dans cette gamme pour en déduire $\langle r_X \rangle_D$ selon l'équation (V.5).

En prenant une valeur moyenne pour $\langle r_X \rangle$ de $3.4 \times 10^{-3} \text{kg.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$, on obtient ainsi $\langle r_X \rangle_D = -11 \times 10^{-3} \text{kg.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$

Cette valeur peut être comparée à celle prédite par le modèle cinétique présenté au

$$\text{chapitre IV : } \langle r_X \rangle = \iiint_{V_R} \left(\rho_M \frac{K}{K+G} \bar{\phi} E_a G - \frac{J_{NADH_2} M_X}{v_{NADH_2-X}} \frac{K_r}{K_r + G} \right) C_X . dV$$

Comme dans ce cas, l'irradiance est nulle, on a directement :

$$\langle r_{X,D} \rangle = - \frac{J_{NADH_2} M_X}{v_{NADH_2-X}} . C_X = -10 \times 10^{-3} \text{kg.m}^{-3}.\text{s}^{-1} \text{ (Car } q_{\cap,D} = 0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1} \text{ et par suite}$$

l'irradiance G est égale à zéro dans tout le PBR), et en prenant, $J_{NADH_2} = 2.39 \text{mol.kg}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$,

$M_X = 0.024 \text{kg}_X . \text{mol}^{-1}$, $v_{NADH_2-X} \approx 2.3$ et $C_X \approx 0.4 \text{g.l.}$

On constate que la valeur calculée de $\langle r_X \rangle_D$ à partir des expérimentations en lumière intermittente est très proche de celle obtenue théoriquement par la loi cinétique proposée dans le chapitre IV. Une légère différence est observée peut être justifiée ici par les conditions différentes appliquées. Le modèle représente en effet la contribution de la respiration en conditions de photolimitation, avec donc une obscurité partielle, une obscurité totale étant appliquée avec les cycles. De plus, les mesures ayant servi à l'établissement du modèle ont été obtenues en PBR, avec une zone sombre (pour les expérimentations à $\gamma=0.5$). Un effet potentiel de l'hydrodynamique peut donc exister (il serait alors « intégré » dans les constantes du modèle cinétique). En effet, les temps de cycles considérés ($>40s$) sont différents (le PBR torique présentant une distribution large de temps de résidence en zone sombre). L'effet de longues périodes sombres (comme pour les cycles utilisés dans le calcul de $\langle r_{X,D} \rangle$) qui est en général négatif sur la croissance, pourrait donc amener à une valeur de VVMCB plus faible (et donc une valeur de $\langle r_{X,D} \rangle$ plus élevée). Ceci est donc cohérent avec les résultats obtenus.

Pour pouvoir calculer la réponse idéale sans intégration, il est nécessaire également de connaître $\langle r_X \rangle_{cl}$. De la même façon, la loi cinétique peut être utilisée.

Tout calcul fait (voir le chapitre IV pour la méthode détaillée), on obtient pour $q_{\cap,L}=220\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et $\gamma=1$:

$$\langle r_X \rangle_{cl}=18\times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$$

Au final, en prenant $\varepsilon=0.5$, la réponse idéale sans intégration donne pour $q_{\cap,L}=220\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $q_{\cap,D}=0\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et $C_X \approx 0.4 \text{ g.l}^{-1}$:

$$\langle r_X \rangle_{wi}=3.4\times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$$

V.5.4. Effet de la fraction éclairée pour un période éclairée constante

Afin de mieux comprendre les effets des cycles d'éclairement, l'influence de la fraction éclairée a été considérée, en gardant constante la durée de la période éclairée, et en faisant varier la durée de la phase obscure, celle-ci étant d'après la littérature reconnue comme particulièrement influente. La valeur de t_L correspondante a été prise dans la gamme où une intégration partielle avait été observée ($t_L = 3s$) et les résultats sont donnés dans le tableau (V.2).

$q_{\cap,L}$ ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	220	220	220
$q_{\cap,D}$ ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	0	0	0
t_L (ms)	3000	3000	3000
t_C (ms)	6000	4285.71	3529.4
fréquence (Hz)	2	1.429	1.176
La fraction éclairée ε (-)	0.5	0.7	0.85
Concentration en biomasse C_X ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	0.41	0.41	0.39
Taux de dilution D (h^{-1})	0.011	0.022	0.031
Teneurs en pigments (% biomasse sèche)	<i>Chl a</i>	2.22	2.10
	<i>Chl b</i>	0.87	0.84
	<i>PPC</i>	0.73	0.69
Productivité volumique ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	4.51×10^{-3}	9.02×10^{-3}	12.2×10^{-3}

Tableau V.2 : Tableaux résumant les points expérimentaux obtenus en cultivant la microalgue *C. reinhardtii* dans le PBR torique en lumière intermittente pour différentes fraction éclairée ($\varepsilon=0.5-0.7-0.85$) pour une période éclairée constante $t_L=3\text{s}$. Les densité de flux incidente pendant les phases éclairée et sombre sont respectivement $q_{\cap,L}$ et $q_{\cap,D}$.

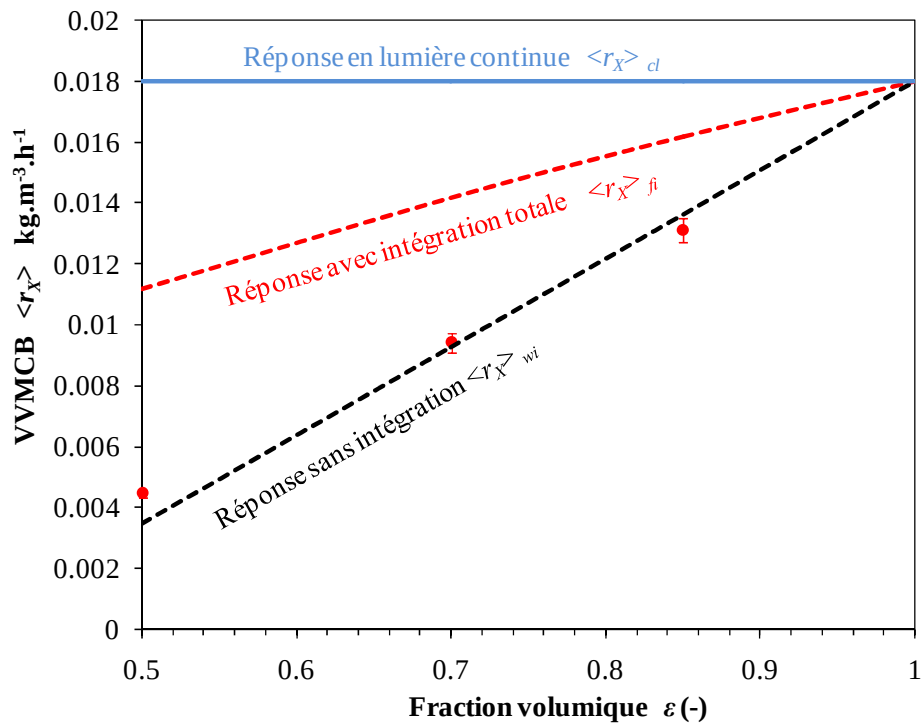


Figure V.6 : Évolution de la vitesse volumétrique moyenne de la croissance en biomasse (VVMCB) en éclairage intermittent pour une fraction éclairée (0.5-0.7-0.85). La valeur de la VVMCB correspondante à $\varepsilon=1$ (en lumière continue) a été calculée en utilisant le modèle cinétique en lumière continu déjà validé dans le chapitre IV.

Une nouvelle fois, il est intéressant de comparer ces résultats aux réponses types. Dans la mesure où celles-ci sont définies par rapport à ε , ce calcul est trivial et la même méthode que celle décrite dans le paragraphe précédent a donc été utilisée. Les données ont été

ajoutées sur la Figure V.6. Les résultats présentés dans le graphe montrent que la diminution des temps de la période sombre jusqu'à une valeur de 500 ms augmente la productivité, sans induire de phénomènes d'intégration. Ceci est en désaccord avec la littérature, qui indique qu'une période sombre plus longue est souvent bénéfique à ce titre (Grobbelaar et al., 1996), permettant de maintenir une croissance équivalente voire supérieure à celle atteinte en lumière continue (cette dernière correspond à la productivité mesurée pour $\varepsilon=1$, soit sans période sombre, telle que représentée sur la figure (V.6). On notera que cette productivité est équivalente à une productivité maximale atteinte à $\gamma=1$). Dans le cas présent, les effets d'intégration sont négligeables. Quelle que soit la durée de la période sombre appliquée ici, celle-ci se révèle avoir un effet particulièrement négatif avec une réponse observée très proche de celle sans intégration. Ceci avait été également observé par Janssen et al. (1999, 2000a ; 2000b) où l'application de cycles de quelques secondes s'était révélé mener à une diminution importante de la croissance, loin des effets positifs des hautes fréquences et du « *flashing light effect* ». On notera cependant que ces résultats peuvent également dépendre directement de t_C et q_{γ} . Merchuk et al. (1998) ont par exemple montré que pour des densités de flux incidentes q_{γ} élevées, l'introduction de périodes sombres menait à une productivité supérieure à celle sans intégration. Ces paramètres n'ont cependant pas été étudiés ici et feront l'objet de prochaines expérimentations au laboratoire.

V.5.5. Analyse des résultats et mise en évidence du couplage non linéaire avec la réponse photosynthétique

L'objectif principal des expérimentations menées avec une fraction éclairée ε constante était de mettre en évidence si un couplage non linéaire existe entre les cycles appliqués et la conversion photosynthétique. Comme indiqué auparavant, d'après l'équation (V.2), si un changement des temps de cycles éclairés/sombres (t_L et t_D) pour la même fraction éclairée aboutit à un changement dans la VVMCB, cela impliquera en effet un couplage non linéaire à la réponse photosynthétique de la microalgue étudiée.

Il a été montré (figure V.5) que ce couplage non linéaire existe, avec un effet constaté à partir d'un temps de cycle $t_C < 12$ secondes. La VVMCB augmente alors avec la diminution des cycles appliqués, en parfait accord avec la littérature montrant un effet globalement positif de l'augmentation de la fréquence des cycles (ou de la diminution des temps de cycles). La comparaison aux valeurs obtenues pour les réponses idéales avec et sans

intégration est cependant intéressante. Celles-ci permettent en effet de fixer les VVMCB qui pourraient être obtenues pour ces deux cas extrêmes de comportement (soit $\langle r_X \rangle_{wi} = 3.4 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ pour la réponse sans intégration, et $11.10^{-3} \text{ kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ pour la réponse avec intégration complète soit donc environ un rapport 3 entre les deux VVMCB). Dans notre cas, il a bien été observé une intégration partielle aux cycles appliqués, la VVMCB mesurée se situant entre les valeurs des VVMCB des réponses types. Toutefois, les effets escomptés qui viseraient à atteindre la réponse avec intégration totale (plus favorable) ont été loin d'être obtenus. Pour les cycles longs ($t_C > 40$), les VVMCB mesurées sont égales à celle sans intégration. Pour les cycles courts ($t_C < 12$ secondes), une augmentation de la VVMCB a été observée jusqu'à 40% de la VVMCB de la réponse sans intégration. Ceci a été obtenu pour la fréquence la plus faible appliquée ($t_C = 2\text{s}$ soit 0.5Hz , avec $\varepsilon = 0.5$), mais représente cependant moins de la moitié de la VVMCB qui pourrait être obtenue si on supposait une intégration totale. Cela permet de nuancer également certaines conclusions de la littérature qui tendent à dire que le mélange hydrodynamique induit un effet « *flashing light* » positif sur la productivité. Un gain est observé par rapport à une réponse sans intégration, mais le « *flashing light effect* » permet de surcroît de dépasser en théorie la valeur avec intégration totale, dans la mesure où les fréquences appliquées sont telles qu'une synchronisation est obtenue avec l'appareil photosynthétique, améliorant l'exploitation par le métabolisme des photons captés (qui mène au mieux à une réponse avec intégration totale) mais également le transfert dans les antennes (qui apporterait donc à un gain supplémentaire, en améliorant le rendement photochimique primaire ρ). Selon la littérature, une productivité supérieure à celle atteinte en lumière continue peut alors être obtenue. Cela reviendrait à dépasser la productivité maximale à $q_\gamma = 220 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et $\gamma = 1$, soit $\langle r_X \rangle_{wi} = 18 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ (ce qui représente 5 fois la VVMCB obtenue sans effet d'intégration). Ceci est loin d'être le cas ici, même si des cycles plus courts tendraient à une augmentation supplémentaire de la VVMCB. Il est à noter également que l'étude spécifique menée ici sur la durée des périodes sombres n'a pas apporté la conclusion que celle-ci jouait un rôle important dans la réponse biologique, comme il est souvent cité (Grobbelaar et al., 1996). Cependant, les conditions étudiées ici ne permettent pas d'avoir de conclusion définitive à ce sujet, l'effet de périodes sombres étant selon la littérature plus prononcé pour des éclaircissements élevés, ce qui n'a pas été testé ici.

V.6. Conclusion

Les expérimentations menées dans ce chapitre nous ont permis d'étudier l'effet des cycles de lumière/obscurité générés par un panneau de LED sur la croissance photosynthétique de la microalgue *C. reinhardtii*. Les productivités expérimentales obtenues en éclairage intermittent ont été comparées aux deux types de réponses idéales sans et avec intégration totale de la lumière. Cela a permis de montrer que, dans les conditions testées ($\varepsilon=0.5$, $q_{\cap,L} = 220\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $q_{\cap,D} = 0\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), *C. reinhardtii* présente une réponse pouvant être assimilée à une réponse sans intégration pour des cycles de durées supérieures à 40s. En-dessous, un couplage non-linéaire apparaît, montrant l'existence d'effets partiels d'intégration, sans toutefois atteindre la réponse avec intégration complète. Quelles que soient les conditions étudiées ici, la VVCMB obtenue est restée éloignée de celle-ci, qui suppose que l'organisme ne réagit pas aux fluctuations vues, mais a une réponse donnée par la moyenne de ces fluctuations. Il est à noter qu'une réduction supplémentaire de ces cycles pourrait permettre de tendre vers cette réponse, et donc d'atteindre des VVCMB encore plus élevées, même si le mécanisme appelé « *flashing light effect* » semble difficile à atteindre.

Globalement, si on considère qu'idéalement, le micro-organisme cultivé devrait présenter une réponse avec intégration totale (donnant alors la VVCMB la plus élevée), il en ressort que les cycles d'éclairement ici étudiés ont donc un effet négatif sur *C. reinhardtii*. Autrement dit, l'hydrodynamique générant de tels cycles ne permet pas d'atteindre des temps de cycles suffisamment courts pour que la culture ne « perçoive » qu'une lumière moyenne. Une réponse plus proche de celle sans intégration est au contraire obtenue, bien que cette réponse représentant la moyenne des réponses obtenues instantanément soit la moins efficace en terme de productivité résultante (un facteur 3 existant entre les deux réponses types calculées pour ces conditions). Au final, il ressort néanmoins de ces études qu'un couplage non linéaire à la réponse photosynthétique peut donc exister, avec des cycles qui peuvent influencer les performances d'un PBR. Si on prend la réponse avec intégration totale comme référence (ce qui semble plus logique à la vue des résultats obtenus ici), une amélioration de 40% a ainsi été au mieux observée. L'étude reste cependant à compléter. Il a ainsi été montré que la durée des périodes sombres jouait peu sur la VVMCB (contrairement à ce qui était supposé dans la littérature). Mais d'autres facteurs restent à considérer, comme la durée des périodes éclairées (constante ici) et surtout la densité de flux incidente qui, si elle est élevée (comme en conditions solaires), est

susceptible de mener à des effets plus marqués des régimes fluctuants (interaction supplémentaire avec les mécanismes de photoinhibition). Si on considère que la réponse avec intégration totale est atteignable, des effets majeurs peuvent en effet être attendus sur la productivité finale.

Indépendamment de cette recherche de régimes fluctuants optimums, de façon évidente, les conditions hydrodynamiques rencontrées dans un PBR pourront influencer la productivité à la condition que si celui-ci présente une zone sombre. A ce titre, il apparaît possible que les résultats de productivité présentés au chapitre III pour le cas de la photolimitation ($\gamma=0.5$) intègrent un potentiel effet des régimes fluctuants alors générés. Si c'est le cas, cela est également pris en compte dans le modèle cinétique présenté dans le chapitre IV, dans la mesure où c'est justement ces données qui ont servi à déterminer la valeur de l'un de ces paramètres J_{NADH_2} (voir partie IV.5). Le modèle ainsi obtenu s'est révélé cependant totalement pertinent dans la prédiction des productivités pour différents fonctionnements du PBR opéré en continu. Cela peut s'expliquer par un effet négligeable des régimes fluctuants dans les conditions étudiées (ou du moins quasi-constant). Comme il a été montré dans le chapitre précédent, de moins bons résultats ont été obtenus dans le cas des cultures *batch*, quand la fraction volumique éclairée était très faible (fin de *batch*). Des régimes spécifiques de lumière peuvent alors être générés (périodes obscures plus longues) susceptibles d'influencer plus significativement la croissance, expliquant donc peut-être ici la différence obtenue avec le modèle. Quoi qu'il en soit, le fonctionnement en photolimitation, et plus particulièrement le comportement cinétique dans la zone sombre, mériterait à terme d'être considéré plus en détails en cherchant, par exemple, à déterminer les constantes (non issues d'une démarche prédictive) du modèle cinétique par des expérimentations n'induisant pas le biais possible des régimes fluctuants imposés par l'hydrodynamique et les conditions de transfert de rayonnement. Comme il a été montré dans ce chapitre, cela peut être obtenu par les expérimentations en lumière intermittente. Pour certains régimes (cycles longs) où les effets d'intégration partielle sont négligeables, il est également possible de dissocier la contribution d'une période éclairée et sombre, et donc de dissocier les réponses à la lumière et à l'obscurité, tout en conservant une réponse biologique facilement modélisable. Cela permet de simuler le fonctionnement d'un PBR en photolimitation, avec donc une zone éclairée et une zone sombre. Ce type d'analogie apparaît comme particulièrement pertinent, dans la mesure où il est alors possible de découpler l'importance relative de ces zones (donnée par ε en temporel et γ en spatial) et leur influence respective (en réduisant durée

de chaque période). Au final, si l'effet hydrodynamique est bien pris en compte dans un PBR éclairé en continu, les deux approches doivent pouvoir se réconcilier.

Pour pouvoir relier à terme ces conditions hydrodynamiques à la croissance résultante, en plus de la prédiction des régimes de lumière subis, un modèle cinétique apte à prendre en compte les différentes réponses rencontrées sera nécessaire. Il a été vu que les réponses avec intégration complète et sans intégration (ces dernières étant *a priori* plus couramment rencontrées) pouvaient être prédites aisément, en se basant sur le modèle cinétique proposé dans le chapitre précédent, et établi en lumière continue. Si les cycles sont dans la gamme où un couplage non linéaire apparaît, une formulation dynamique sera nécessaire, la réponse ne pouvant être prédite directement. Un exemple d'un modèle introduisant des temps de réponse dans la conversion photosynthétique a été présenté dans ce chapitre. L'établissement d'un tel modèle nécessitera cependant des expérimentations complémentaires, en élargissant la gamme de flux et de fraction éclairée rencontrée. Elles seront réalisées au Laboratoire GEPEA (Université de Nantes, Saint Nazaire, France) mais également en collaboration avec le groupe de recherche Bioprocess Engineering de l'Université de Wageningen (Wageningen, Les Pays-Bas). Ce dernier laboratoire dispose en effet d'un montage permettant d'étudier les cycles rapides (jusque 100Hz environ). Comme il a été montré dans ce chapitre, le montage conçu au GEPEA pourra être utilisé dans le but d'étudier plus en détails les réponses aux cycles de lumière. Il permettra de rechercher les conditions où les régimes fluctuants auront une influence encore plus marquée, et également de valider le modèle proposé, en appliquant par exemple des cycles de lumière asymétriques (avec une fraction éclairée variable dans le temps). Ceci permettra de simuler les cycles réels rencontrés dans un PBR. Au final, le dispositif expérimental servira donc de base à l'établissement d'outils pour l'optimisation hydrodynamique en PBR vis à vis des régimes de lumière générés.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Ce mémoire a concerné l'étude de la croissance photosynthétique de la microalgue *C. reinhardtii* en PBR. Une caractérisation poussée a d'abord été menée en lumière continue. Les expérimentations en limitation physique stricte et en photolimitation ont permis d'une part de définir les paramètres gouvernant la productivité volumique maximale en PBR et d'autre part, d'établir un modèle cinétique de la croissance de *C. reinhardtii* en lumière continue. Les paramètres gouvernant la productivité volumique maximale ont été mis en évidence en comparant les résultats de productivité volumique en biomasse obtenus dans deux géométries différentes de PBR (torique et cylindrique). Ainsi trois paramètres essentiels ont été définis : la densité de flux incidente (PFD), la surface spécifique éclairée (a_{light}) et la fraction volumique éclairée (γ). La productivité volumique maximale a ainsi été obtenue quel que soit le PBR pour une fraction volumique éclairée γ strictement égale à 1, définissant le régime dit de limitation physique stricte par la lumière. Si cette condition est vérifiée, et si les autres paramètres sont identiques (PFD , a_{light}), la productivité volumique maximale s'est révélée être alors indépendante du type de PBR employé (torique, cylindrique, tubulaire...), clarifiant par la même occasion les règles régissant l'ingénierie des PBR.

L'étude a ensuite été étendue aux autres régimes de fonctionnement d'un PBR, et en particulier au cas de la photolimitation où une zone sombre est présente dans le volume de culture ($\gamma < 1$). Ce régime de fonctionnement est en effet souvent rencontré en PBR, sachant toutefois que, pour un micro-organisme photosynthétique eucaryote comme une microalgue qui présente une respiration à la lumière, cela mène à une perte de productivité volumique du fait de la présence de la zone sombre. Un modèle cinétique décrivant la croissance photosynthétique locale d'un micro-organisme eucaryote (microalgue) a ainsi été proposé. Celui-ci est basé sur une approche prédictive reposant sur la Thermodynamique des Processus Irréversibles (TPI), et introduit les contributions respectives de la croissance photosynthétique et de la respiration à la lumière sur la cinétique globale résultante. Ce modèle a ensuite été testé pour déterminer les productivités obtenues pour différents modes de culture (continu et discontinu) et pour différents régimes de fonctionnement de PBR (limitation physique stricte, photolimitation, régime cinétique). Les résultats ont confirmé l'influence importante de la présence d'une zone sombre dans le volume de culture, ayant donc tendance à faire diminuer la productivité. Il a également été montré la robustesse de l'approche théorique de modélisation, apte à représenter avec précision les différents modes de fonctionnement du PBR. Il a néanmoins été observé que, dans le cas d'une culture discontinue (*batch*) menant à des concentrations élevées en biomasse, le modèle

ne pouvait représenter correctement les évolutions obtenues que si une décroissance importante de la respiration à la lumière était supposée. Ce point, qui apparaît comme essentiel dans l'établissement d'un modèle cinétique d'un micro-organisme photosynthétique eucaryote, sera certainement à approfondir par la suite. Ce résultat illustre en effet une particularité importante de ces organismes, à savoir leur capacité à moduler selon les conditions leur métabolisme bioénergétique, ce qui se traduit macroscopiquement par une modulation des activités photosynthétiques et respiratoires. Il est donc important de les représenter correctement afin d'améliorer la représentativité du modèle employé. Des travaux sont d'ores et déjà engagés en ce sens au laboratoire GEPEA (travaux de G. Cogne notamment).

La dernière partie de ce mémoire a concerné les expérimentations réalisées en lumière intermittente. En effet, dans la plupart des cas de production en PBR, une agitation des cellules photosynthétiques en milieu aqueux est appliquée afin d'éviter la décantation des cellules et favoriser les transferts massiques et thermiques entre les cellules et leur environnement contenant les nutriments nécessaires à leur croissance. Les micro-organismes photosynthétiques peuvent alors être soumis à un régime d'éclairement résultant du gradient de lumière omniprésent dans tout PBR et du déplacement des cellules suivant le champ de rayonnement hétérogène. Ce régime fluctuant de lumière est susceptible d'avoir un effet sur la conversion photosynthétique, cette dernière reposant sur un processus dynamique. Il a donc été choisi de cultiver *C. reinhardtii* dans un PBR soumis à des cycles artificiels de lumière/obscurité simulant des cycles rencontrés en PBR. Un panneau de Diodes ÉlectroLuminescentes (DEL) a été utilisé pour générer des créneaux de lumière contrôlés en fréquence et en intensité. Les expérimentations réalisées ont reposé sur un contrôle rigoureux des conditions de transfert de rayonnement, cela s'étant révélé un point essentiel lors des études menées en lumière continue. Alors que dans ce type d'étude, une faible concentration en biomasse est en général recherchée (menant donc à un régime cinétique pendant les périodes éclairées), une limitation physique stricte a été ici appliquée pendant la période éclairée, afin d'être représentatif de conditions opératoires de PBR. L'application de différents régimes d'éclairement a permis ensuite de caractériser la réponse de la microalgue étudiée. Des cycles longs (>40s) se sont révélés avoir un effet particulièrement négatif sur la croissance, avec une réponse dite sans intégration menant à une réduction importante de la vitesse volumétrique de production. Pour des cycles plus courts (<12s), un couplage non linéaire a été observé entre les cycles imposés et la réponse en croissance, avec une augmentation progressive de cette dernière avec la diminution des cycles, montrant ainsi une interaction avec les temps caractéristiques de réponse du métabolisme du micro-organisme. La fraction éclairée ε s'est révélée également jouer sur cette réponse, montrant une influence différente des périodes éclairées et sombres, ces dernières

pouvant avoir un effet particulièrement négatif. Néanmoins, même dans le meilleur des cas (cycles de 1s correspondant aux cycles les plus courts appliqués dans cette étude), la vitesse volumétrique de production est restée inférieure à celle supposant une réponse avec intégration totale de la lumière reçue. Des cycles plus rapides pourraient tendre, voire atteindre, cette réponse limite correspondant également à une conversion optimisée des photons reçus.

Dans la mesure où la réponse avec intégration totale n'a pas été atteinte, alors que seule cette réponse suppose que la cellule n'est pas sensible aux fluctuations du régime de lumière, il s'avère au final que les cycles d'éclairement, tels qu'ils pourraient être générés par l'hydrodynamique en PBR, sont susceptibles d'influencer très certainement les vitesses de production, et donc les productivités d'un PBR cultivant *C. reinhardtii*. C'est très certainement le cas pour le PBR torique et quand un volume sombre est obtenu où les régimes d'éclairement ont déjà été caractérisés et sont dans la gamme de ceux étudiés dans ce mémoire. Il s'en suit donc que les mesures actuellement effectuées sur ce réacteur (comme certainement beaucoup d'autres) sont le résultat (en partie) de l'effet de cycles imposés par l'hydrodynamique. Ceci sera *a priori* d'autant plus vrai que la fraction éclairée sera faible (culture continue en photolimitation et fin de *batch* par exemple), de par l'augmentation des périodes sombres qui se sont révélées avoir une influence particulièrement négative ici. Aujourd'hui, il est cependant difficile de dire dans quelle mesure les régimes d'éclairements influencent le procédé. L'établissement d'un modèle adéquat qui prendra en compte l'influence des dynamiques imposées par les régimes fluctuants devrait permettre à terme de répondre à cette question. Dans ce contexte, le modèle cinétique capable de représenter l'influence de régimes fluctuants de lumière apparaît de façon évidente comme une perspective majeure du travail présenté dans ce mémoire. Cela permettra de prédire la croissance d'un micro-organisme photosynthétique soumis à ces régimes, et donc la productivité résultante du PBR. Le dispositif expérimental mis en place et la méthodologie d'étude associée permettront d'analyser plus en détails les phénomènes impliqués, d'établir le modèle cinétique adéquat, et de valider l'ensemble de la démarche par application par exemple de cycles simulant des régimes fluctuants proches de ceux rencontrés en PBR. L'approche Lagrangienne développée au laboratoire GEPEA (Université de Nantes) sera en ce sens fortement utile. Au final, le modèle ainsi développé devra permettre d'améliorer la compréhension du comportement des microalgues cultivées en PBR, et, dans une perspective plus appliquée, d'optimiser les conditions hydrodynamiques pour une espèce donnée afin d'améliorer la conversion photosynthétique, en limitant par exemple les effets particulièrement négatifs qui ont pu être observés dans ce mémoire sur *C. reinhardtii* pour certains cycles longs.

NOMENCLATURE

a_{light}	Surface spécifique éclairée du photobioréacteur	[m ⁻¹]
$\mathcal{A}_0$	Vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie radiante	[μmol.s ⁻¹ .m ⁻³]
b	Fraction rétro diffusée pour le rayonnement	[adimensionnel]
C_X	Concentration en Biomasse	[kg.m ⁻³ or g.L ⁻¹]
C_B	concentration en ions thiocyanate	[mol.l ⁻¹]
C_A	concentration en en sel de Reinecke	[mol.l ⁻¹]
Da_I	Premier nombre de Damköhler	[-]
D	Taux de dilution	[m]
E_a	Coefficient massique d'absorption du rayonnement	[m ² .kg ⁻¹]
E_s	Coefficient massique de diffusion du rayonnement	[m ² .kg ⁻¹]
f_λ	fraction de densité photonique incidente	[nm ⁻¹]
G	Irradiance locale	[μmol.s ⁻¹ .m ⁻²]
I	Intensité spécifique d'énergie radiante	[W.m ² .sr ⁻¹]
L	Profondeur du réacteur rectangulaire	[m]
n	indice de réfraction du milieu	[adimensionnel]
n	degré de collimation du rayonnement	[adimensionnel]
P_{2e}^-	Rapport des vitesses spécifiques $\bar{J}_{ATP} / \bar{J}_{COF}$ pour le schéma en Z de la photosynthèse	[adimensionnel]
P_{O_2}	Taux spécifique de production d'oxygène	[μmol O ₂ .h ⁻¹ .mg Ch l ⁻¹]
Q_e	Débit d'entrée d'injection du milieu neuf	[m ³ .h ⁻¹]
Q_s	Débit de sortie de soutirage de la récolte	[m ³ .h ⁻¹]
Q_P	Quotient photosynthétique	[adimensionnel]
Q_R	Quotient respiratoire	[adimensionnel]
$q_\cap$	Densité de flux incidente hémisphérique	[μmol.s ⁻¹ .m ⁻²]
$\mathfrak{R}$	Coefficient de correction des photons absorbés	[adimensionnel]
r_X	productivité volumique en biomasse	[kg.m ⁻³ .h ⁻¹]
$< r_B >$	vitesse volumétrique moyenne de réaction	[mol.l ⁻¹ .s ⁻¹]
S_{light}	surface éclairée du photobioréacteur	[m ²]
T	Température	[K]
t_L	période éclairée pendant un éclairage intermittent	[s]
t_D	période sombre pendant un éclairage intermittent	[s]
t_C	période d'un cycle d'éclairage intermittent	[s]
V_R	Volume du photobioréacteur	[m ³ or L]
V_d	Volume sombre dans le photobioréacteur	[m ³ or L]
V_l	Volume éclairé dans le photobioréacteur	[m ³ or L]
z	Profondeur de la culture en coordonnées rectangulaires	[m]

Lettres Grecques

α	Module de diffusion linéaire	[adimensionnel]
γ	Fraction volumique éclairée en photobioréacteur	[adimensionnel]
δ	Coefficient d'extinction pour la méthode à 2 flux	[m ⁻¹]
ε	La fraction éclairée	[adimensionnel]
η_{th}	Efficacité thermodynamique du réacteur	[adimensionnel]
μ	Le taux de croissance spécifique	[h ⁻¹]
$\bar{\phi}$	Rendement stœchiométrique quantique massique	[kg _X ·μmol _{hv} ⁻¹]
$\bar{\phi}'$	Rendement stœchiométrique quantique molaire	[C mol _X ·μmol _{hv} ⁻¹]
ρ	Rendement photochimique primaire	[adimensionnel]
ρ_M	Rendement photochimique primaire maximum	[adimensionnel]
ρ	Coefficient de réflexion	[adimensionnel]
λ	Longueur d'onde	[nm]
Ξ	rendement quantique de la réaction d'actinométrie	[mol A / mol de photon]
κ	indice optique d'extinction du milieu	[adimensionnel]
τ	Temps de résidence	[h]

indices

<i>app</i>	Relatif à la densité de flux incidente apparente
<i>ATP</i>	Relatif à l'adénosine tri-phosphate
<i>c</i>	Relatif au point de compensation de la photosynthèse
<i>cl</i>	Relatif à la lumière continue
<i>COF</i>	Relatif au couple redox NADP ⁺ /NADPH, H ⁺
<i>d</i>	Relatif à un volume sombre du photobioréacteur
<i>D</i>	Relatif à une période sombre en lumière intermittente
<i>inox</i>	Relatif à la grandeur mesurée pour l'inox
<i>ℓ</i>	Relatif à un volume éclairé du photobioréacteur
<i>L</i>	Relatif à une période éclairée en lumière intermittente
<i>max</i>	Relatif la valeur maximale de la productivité volumique r_X
<i>noir</i>	Relatif à la grandeur mesurée en couvrant l'inox par du noir
<i>opt</i>	Relatif à la valeur optimale de la concentration en biomasse
<i>réel</i>	Relatif à la densité de flux incidente réel
<i>sat</i>	Relatif à la valeur de saturation de dégagement d'O ₂
<i>X</i>	Relatif à la Biomasse
<i>0</i>	Relatif à la surface d'entrée d'un réacteur rectangulaire
<i>⌢</i>	Grandeur hémisphérique

Exposants

- + Dans le sens de l'axe
- Dans le sens opposé à l'axe

Autres

$$\langle X \rangle = \frac{1}{V} \iiint_V X \, dV$$

Moyenne spatiale

$$\bar{X}$$

Moyenne temporelle

Abréviations

ADP	Adénosine Di-Phosphate
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
CFD	Computational fluid dynamics
Cyt b ₆ f	Cytochrome b ₆ f
DEL	Diodes Électroluminescentes
DO	Densité optique
ETR	Équation des transferts radiatifs
FAD	Flavine adénine dinucléotide (forme oxydée)
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide (forme réduite)
Fd	Ferrédoxine
FNR	Ferrédoxine NADP réductase
L/D cycles	Relatif aux cycles de lumière/obscurité
NAD ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée)
NADH,H ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme réduite)
NADP ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide phosphate (forme oxydée)
NADPH,H ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide phosphate (forme réduite)
NG	Niveau de gris
P680	Centre réactionnel du photosystème I
P700	Centre réactionnel du photosystème II
PAR	Radiations photosynthétiquement active
PAR	Radiations photosynthétiquement active
PBR	Photobioréacteur
PBR	Photobioréacteur
PBR	Photobioréacteur
PC	Plastocyanine
PFD	Densité de flux incidente
Pi	Phosphate inorganique = H ₃ PO ₄ = H ₃ PO ₃ + H ₂ O
PQ	Plastoquinone
PS I	Photosystème I

PS II	Photosystème II
RubisCO	Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase
VVLAER	Vitesse volumétrique locale d'absorption de l'énergie radiante
VVLCB	Vitesse volumétrique locale de croissance de la biomasse
VVMAER	Vitesse volumétrique moyenne d'absorption de l'énergie radiante (spatiale)
VVMCB	Vitesse volumétrique moyenne de croissance de la biomasse (spatiale)

Références Bibliographiques

Références Bibliographique

Acien Fernandez F.G., Garcia Camacho F., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Molina Grima E. (1997): A model for light distribution and averaged solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 55 : 701-714.

Aiba S. (1982) : Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. *Adv. Bioch Eng.*, 23 : 85-156.

Arthur C. Ley. Relationships among cell chlorophyll content, photosystem II light-harvesting and the quantum yield for oxygen production in *Chlorella*. *Photosynth. Res.*, 1986; 10: 189-196.

Barbosa MJ, Albrecht M, Wijffels RH. Hydrodynamic stress and lethal events in sparged microalgae cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003;83:9.

Barbosa, M.J., Hadiyanto, Wijffels, R.H., 2004. Overcoming shear stress of microalgae cultures in sparged photobioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 85 (1), 78–85.

Bejan A. Advanced engineering thermodynamics. 1988;Wiley, New york.

Bejan A. Unification of three different theories concerning the ideal conversion of enclosed radiation. *J. Sol. Energy Engng.* 1987; 109: 46–51.

Berberoglu H, Pilon L, Melis A. Radiation characteristics of *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 and its truncated chlorophyll antenna transformants *tla1*, *tlaX* and *tla1-CW⁺*. *J. Hydrogen Energy*. 2008; 33: 6467-6483.

Bohne F, Linden H. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta*. 2002 :1579 ; 26-34.

Carvalho AP, Meireles LA, Malcata FX. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol Prog.* 2006; 22:1490-1506.

Carvalho AP, Meireles LA, Malcata FX. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 2006; 22: 1490-1506.

Chandrasekhar S. Radiative transfer. New York: Dover publications Inc., 1960.

Cogne G. : Conception, mise en œuvre et modélisation d'un photobioréacteur à membrane pour l'étude du comportement de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* en microgravité. 218 p. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal. Clermont-Ferrand, 2003.

Cogne G., Lehmann B., Dussap C.G., Gros J-B. (2003b) : Uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis* PCC 8005) under photoautotrophic conditions: culture medium optimization. *Biotechnol. Bioeng.*, 81 : 588-593.

Cornet J-F., Favier L., Dussap CG. Modeling stability of Photoheterotrophic continuous cultures in photobioreactors. *Biotechnol. Prog.* 2003; 19: 1216-1227

Cornet J-F, Dussap CG, Dubertret G, A structured model for simulations of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors – I. Coupling between light transfer and growth kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 1992; 40: 817-825.

Cornet J-F, Dussap CG, Gros J-B. Conversion of radiant light energy in photobioreactors. *AIChE. J.* 1994; 40: 1055-1066.

Cornet J-F, Dussap CG. A simple and reliable formula for assessment of maximum volumetric productivities in photobioreactors. *Biotechnol. Prog.* 2009; 25: 424-435.

Cornet J-F, Dussap CG. Gros J-B. Kinetics and energetics of photosynthetic microorganisms in photobioreactors. Application to *Spirulina* growth. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 1998; 59: 153-224.

Cornet J-F, Dussap CG. Modèles de Connaissance réifiés pour la simulation, la conception et la régulation prédictive des photobioréacteurs. Récents Progrès en génie des Procédés. ED Lavoisier, Paris, France, 2005 ; N° 92, (8 p). ISBN 20-910239-66-7,

Cornet J-F, Favier L, Dussap CG. Modeling stability of photoheterotrophic continuous cultures in photobioreactors. *Biotechnol. Prog.* 2003; 19: 1216-1227.

Cornet J-F, Marty A, Gros J-B. Revised technique for the determination of mean incident light fluxes on photobioreactors. *Biotechnol. Prog.* 1997; 13: 408-415.

Cornet J-F. Étude cinétique et énergétique d'un photobioréacteur. Établissement d'un modèle structuré. Applications à un écosystème clos artificiel. 355p. Thèse de doctorat. Université de Paris-Sud Centre d'Orsay, 1992.

Cornet J-F. Procédés limités par le transfert de rayonnement en milieu hétérogène. Etude des couplages cinétiques et énergétiques dans les photobioréacteurs par une approche thermodynamique. Habilitation à Diriger des Recherches, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 2007, n° d'ordre 236.

Cornet, J-F. Calculation of optimal design and ideal productivities of volumetrically lightened photobioreactors using the constructal approach. *Chemical Engineering Science*. 2009, doi:10.1016/j.ces.2009.09.052.

Degerenne B. Production d'hydrogène par *chlamydomonas reinhardtii* en photobioréacteur : Analyse des conditions de culture et mise en place d'un protocole autotrophe. 213 p. Thèse de doctorat. Nantes, 2009.

Dussap C. G. (1988) : Étude thermodynamique et cinétique de la production de polysaccharides microbiens par fermentation en limitation par le transfert d'oxygène : Modèle structuré de la production de xanthane. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.

Emerson, R., and W. Arnold. The photochemical reaction in photosynthesis. *Jour. Gen. Physiol.* 1932; 16: 191-205.

Eriksen NT. The technology of microalgal culturing. *Biotechnol. Lett.* 2008; 30: 1525-1536.

Falkowski P.G. and LaRoche, J. Minireview: acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 1991; 27 : 8 -14.

Genty B, Briantais J-M and Baker NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta.* 1989 ; 990: 87-92.

Grobbelaar, J.U., Nedbal, L. and Tichý, V. Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. *J. Appl. Phycol.* 1996; **8** : pp. 335-343.

LODISH Harvey, BERK Arnold, MATSUDAIRA Paul, KAISER Chris A., KRIEGER Monty, Scott Matthew P., S. ZIPURSKY Laurence et DARNELL James. Biologie moléculaire de la cellule (5^e édition). Bruxelles: De Boeck Université 2005, 1096p.

J. E.W. Polle, S. Kanakagiri, E. Jin, T. Masuda, A. Melis. Truncated chlorophyll antenna size of the photosystems-a practical method to improve microalgal productivity and hydrogen production in mass culture. *Int. J. Hydrogen Energy.* 2002; 27: 1257-1264.

J. Neal Phillips, Jr. and Jack Myers Growth Rate of Chlorella in Flashing Light. *Plant Physiol.* 1954; 29(2): 152-161.

Jacco C. Kromkamp, André Domin, Zvy Dubinsky, Claudia Lehmann and Ferdinand Schanz. Changes in photosynthetic properties measured by oxygen evolution and variable chlorophyll fluorescence in a simulated entrainment experiment with the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Aquat. Sci.*. 2001; 63: 363-382.

Janssen M, Kuijpers TC, Veldhoen B., Ternbach MB, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light/dark cycles: 13–87 s. *J. Biotechnol.* 1999; 70: 323–333.

Janssen M, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up and future prospects. *Biotechnol. Bioeng.* 2002; 81: 193-210.

John R. Benemann, David M. Tillett, Joseph C. Weissman. Microalgae biotechnology, *Trends Biotechnol.* 1987; Volume 5, Issue 2 , Pages 47-53.

Kate Maxwell and Giles N. Johnson. Chlorophyll fluorescence -a practical guide *J. Exp. Bot.* 2000; 51 345: 659-668.

Kok B. (1953) Experiments on photosynthesis by *Chlorella* in flashing light. In: Burlew B (ed) *Algal cultures from laboratory to pilot plant*. Washington DC, Carnegie Institution of Washington Publication 600, pp 63-158.

Kok B. Photosynthesis in flashing light. *Biochim. Biophys. Acta.* 1956; 21 : 245-258.

Lee, Y.K. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim.

Lee, Y.K. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. 1997 *J. Appl. Phycol.* 1997. ; 9 : 403-411.

Lehr F, Posten C. Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production, *Curr Opin Biotechnol* (2009), doi:10.1016/j.copbio.2009.04.004

Ley AC, DC Mauzerall. Absolute absorption cross-sections for photosystem II and the minimum quantum requirement of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982 ; 680: 95-106.

Luo H-P, Al-Dahhan MH. Analyzing and modeling of photobioreactors by combining first principles of physiology and hydrodynamics. *Biotechnol. Bioeng.* 2003; 85: 382-393.

M.J. Rubel, G. De Temmerman, J.P. Coad, J. Vince, F. Le Guern, A. Murari, R.A. Pitts, C. Walker⁷ and JET EFDA contributors. Mirror Test for ITER at the JET Tokamak: An Overview of the Programme. 20th IAEA Fusion Energy Conference, Vilamoura, Portugal (2004). EFDA-JET-PR(05)47.

Marcel Gerard Jozef Janssen (2002): Cultivation of microalgae: effect of light/dark cycles on biomass yield. Thèse de doctorat, Université de Wageningen, Wageningen, Netherlands, 183 p.

Marcel Janssen, Matthias Janssen, Marcel de Winter, Johannes Tramper, Luuc R. Mur, Jan Snel, René H. Wijffels. Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium-duration light/dark cycles. *J. Biotechnol.* 2000; 78: 123-137.

Marcel Janssen, Peter Slenders, Johannes Tramper, Luuc R. Mur, René H. Wijffels. Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme Microb. Technol.* 2001; 29: 298–305.

Marcel Janssen, Lucas de Bresser, Teun Baijens, Johannes Tramper, Luuc R. Mur, Jan F.H. Snel and René H. Wijffels. Scale-up aspects of photobioreactors: effects of mixing-induced light/dark cycles. *J. Appl. Phycol.* 2000; 12: 225-237.

Matthijs HCP, Balke H, Hes van HM, Kroon BMA, Mur LR, Binot RH. 1996. Application of lightemitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). *Biotech and Bioeng.* 1996; 50: 98-107.

Mishchenko MI, Travis LD. Capabilities and limitations of a current FORTRAN implementation of the T-matrix method for randomly oriented, rotationally symmetric scatterers. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.* 1998; 60: 309-324.

Mitra M, Melis A. Optical properties of microalgae for enhanced biofuels production. *Opt. Express.* 2008; Vol.16: No. 26.

Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Cambridge Phil Soc.* 41:445-502, 1966.

Molina Grima E, Fernandez Sevilla JM, Sanchez Perez JA, Garcia Camacho F. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *J. Biotechnol.* 1996; 45: 59-69.

Muller-Feuga A. Growth as a function of rationing: a model applicable to fish and microalgae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1999; 236 : 1-13.

Myers, J. In: Algal culture: from laboratory to pilot plant. J. S. Burlew, Editor. Carnegie Institution of Washington Publ. 600. Chapt. 3, pp. 37-54. 1953.

Nedbal L, Tichy V, Xiong F, Grobbelaar JU. Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light. *J. Appl. Phycol.* 1996; 8:325-333.

Ph. Demont, H. Tran Nguyen et J.F. Sacadura. Influence de l'oxydation et de la rugosité sur les caractéristiques radiatives des aciers inoxydables. janvier 1981 ; Journal de physique Colloque Cl, supplément au n°1, Tome 42.

Pottier L, Pruvost J, Deremetz J, Cornet J-F, Legrand J, Dussap CG. A fully predictive model for one-dimensional light attenuation by *Chlamydomonas reinhardtii* in a torus photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2005; 91: 569-582.

Powell, J.B. Chaddock and J.R. Dixon, The motion of algae in turbulent flow. *Biotechnol. Bioeng.* 1965; 7: 295-308.

Pruvost J, Cornet J-F, Legrand J. Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: An energetically consistent analysis. *Chem. Eng. Sci.* 2008; 63: 3679-3694.

Pruvost J, Cornet JF, Legrand J: Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: an energetically consistent analysis. *Chem Eng Sci* 2008, 63:3679-3694.

Pruvost J. Modélisation et développement de photobioréacteurs pour la valorisation des microorganismes photosynthétiques. Habilitation à Diriger des Recherches, Université de Nantes, 2005.

Pruvost J., Pottier L. and Legrand J., Numerical investigation of hydrodynamic and mixing conditions in a torus photobioreactor, *Chem. Eng. Sci.* 2006; 61 :4476-4489.

Pruvost J. Photobioréacteurs. 95 p. Cours en Master Master 2 GPEA "Génie des Procédés-Environnement-Agroalimentaire » , Université de Nantes, 2009..

Pultz O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;57:287–293.

Pulz O., Scheibenbogen K. (1998) : Photobioreactors : design and performance with respect to light energy input: Bioprocess and algae reactor technology, apoptosis. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, Scheper T.(ed.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, vol. 59, 124-148.

Pulz, O. and Scheibenbogen, K. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 1998, 38,123-152.

R.J. RITCHIE. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.* 2006; 89: 27-41.

R.J. RITCHIE. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica* 2008; 46: 115-126.

Richmond A.. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Sciences Ltd., Oxford: Amos Richmond 2004, 566 p

Rieke, F. F., and H. Gaffron Flash saturation and reaction periods in photosynthesis Jour. Phys. Chem. 1942; 47: 299-308.

Roels, J.A.. Energetics and Kinetics in Biotechnology. Elsevier Biomedical Press. 1983. Amsterdam.

S. Fouchard, J. Pruvost, B. Degrenne, M. Titica, J. Legrand. Kinetic Modeling of Light Limitation and Sulfur Deprivation Effects in the Induction of Hydrogen Production with *Chlamydomonas reinhardtii*: Part I. Model Development and Parameter Identification. *Biotech and Bioeng.* 2009; 102, 1.61 (14), 4476-4489.

Sanchez Miron, A., Ceron Garcia, M.C., Contreras Gomez, A., Garcia Camacho, F., Molina Grima, E., Chisti, Y., 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 16 (3), 287–297.

Sanchez Miron, A., Ceron Garcia, M.C., Contreras Gomez, A., Garcia Camacho, F., Molina Grima, E., Chisti, Y., 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem. Eng. J.* 16 (3), 287–297.

Schreiber U, Bilger W, Hormann H, Neubauer C. Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: Ragavendra AS (Ed.). *Photosynthesis: a comprehensive treatise*. Cambridge University Press, Cambridge, 1998: 320–336.

Siegel R, Howell JR. Thermal radiation heat transfer (4th ed.). New York: Taylor and Francis, 2002.

Skulberg OM. Microalgae as a source of bioactive molecules - experience from cyanophyte research. *J. Appl. Phycol.* 2000; 12: 341-348.

Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 2006; 101: 87-96.

Strickland JDH, Parsons TR. A practical handbook of seawater analysis: pigment analysis. *Bull. Fish. Res. Board Canada*, 1968; 167.

Tamiya, H., and Y. Chiba. Analysis of photosynthetic mechanism by the method of intermittent illumination. *Stud. Tokugawa Inst.* 1949; 6: 1-129.

Terry KL. Photosynthesis in modulated light: Quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnol. Bioeng.* 1986; 28: 988-995.

V.S. Voitsenya, Ch. Gil , V.G. Konovalov, A. Litnovsky, M. Lipa , M. Rubel, A. Sagara, A. Sakasai, B. Schunke , T. Sugie, G. De Temmerman, K.Yu Vukolov, S.N. Zvonkov, P. Wienhold. The environment effect on operation of in-vessel mirrors for plasma diagnostics in fusion devices. Last revised 16 Nov 2004; arXiv:physics/0411093v2.

Van de Hulst HC. Light scattering by small particle (2nd ed.). New York: Dover publications Inc., 1981.

Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology. London : Taylor and Francis.

Weller, S., and J. Franck. Photosynthesis in flashing light. *Jour. Phys. Chem.* 1941;45: 1359-1373.

Wu X., Merchuk J. C. (2001) : A model integrating fluid dynamics in photosynthesis and photoinhibition process. *Chem. Eng. Sci.*, 56 : 3527-3538.

YUAN-KUN LEE and S. JOHN PIRT Energetics of Photosynthetic Algal Growth: Influence of Intermittent Illumination in Short (40 s) Cycles. *J. Gen. Microbiol.*. 1981; 124: 43-52.

Yun Y-S, Park JM. Kinetic modeling of the light-dependent photosynthetic activity of the green microalga *Chlorella vulgaris*. *Biotechnol. Bioeng.* 2003; 83: 303-311.

Annexes

*Cette partie comporte des explications nécessaires et complémentaires à la compréhension des différents chapitres de ce mémoire et contient quelques schémas et diagrammes montrant le contrôle de la culture en photobioréacteur. Finalement, cette partie contient également deux protocoles expérimentaux détaillés concernant le dosage des pigments et des sucres totaux chez l'espèce étudiée *Chlamydomonas reinhardtii*. A noter que ces protocoles ont fait partie d'un travail qui a été initié au laboratoire GEPEA afin de définir et standardiser des protocoles expérimentaux nécessaires pour une analyse appropriée et une bonne caractérisation de la biomasse et du milieu de culture.*

A.I : Protocoles de dosage des pigments (chlorophylles et caroténoïdes totaux) par extraction à l'acétone 90%

I- Appareils utilisés :	Centrifugeuse MIKRO 22 R ® Vortex Spectrophotomètre Jenway®
II- Matériels utilisés :	Tube Eppendorf ® (3 tubes). Portoir pour tube Eppendorf®. Pipette Pasteur en verre avec tétine en caoutchouc. µpipette (100-1000µl) et pointes Cuve en Quartz
III- Réactifs :	Acétone 90%

Le volume de la suspension µalgale à prendre dépend de la biomasse :

Biomasse C_X en g/L	Volume de culture de µalgues en mL
$C_X < 0.5$	2
$0.5 < C_X < 1$	1
$1 < C_X < 1.5$	0.5
$1.5 < C_X < 2$	0.25
$2 < C_X < 2.5$	0.2
$2.5 < C_X < 3$	0.1

1. Prelever le volume V de la suspension µalgale, le mettre dans un tube Eppendorf®, et compléter avec de l'eau osmosée (3 ‰ NaCl) pour avoir un volume final de 2 ml (préparer ainsi 3 échantillons).
2. Centrifuger pendant 5 minutes à 13000 rpm (utiliser la centrifugeuse Mikro 22 R avec le rotor 1189 L)..
3. Eliminer complètement le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur en verre munie d'une tétine.
4. Introduire 2 mL d'acétone 90% dans le tube, le culot ainsi resuspendu.
5. Mélanger le culot et l'acétone à l'aide d'un vortex (3000 rpm pendant quelques secondes).
6. Incuber les 3 échantillons pendant à l'abri de la lumière à 4°C pendant 24 heures.
7. Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm, (vérifier que le culot est blanc ce qui signifie une extraction complète des pigments).
8. Récupérer le surnageant avec une pipette Pasteur en verre (propre) et transvaser-le dans des nouveaux tubes Eppendorf®. l'échantillon est alors prêt pour le passer au spectrophotomètre.

9. Utiliser le spectrophotomètre en plaçant les échantillons dans des cuve **en quartz**.
10. Faire une ligne de base (calibrage) avec de l'acétone 90 %.
11. Faire un Spectre entre 450 et 750 nm pour les 3 échantillons.
12. Relever les densités optiques (DO) à 480, 630, 645, 665 et 750 nm (la DO à 750 nm indique la présence des débris cellulaires restants. Elle doit être inférieure à 0.008 ; si ce n'est pas le cas, il faut recentrifuger l'échantillon (retour Etape 7).
13. Organiser les résultats dans un tableau comme suit :

λ	480	630	645	665	750
DO					
DO₁					
DO₂					
DO₃					
DO_{mov}					
Ecart type					

14. Les teneurs en chlorophylle a (Chl a), chlorophylle b (Chl b) et caroténoides de protection (PPC) sont déterminés en utilisant les relations suivantes (Strickland et Parsons, 1968) :

$$C_{Chl-a} = \{11.6 (DO_{665} - DO_{750}) - 1.31 (DO_{645} - DO_{750}) - 0.14 (DO_{630} - DO_{750})\} V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

$$C_{Chl-b} = \{20.7 (DO_{645} - DO_{750}) - 4.34 (DO_{665} - DO_{750}) - 4.42 (DO_{630} - DO_{750})\} V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

$$C_{PPC} = \{4.0 (DO_{480} - DO_{750})\} V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

avec:

C_{Chl-a}	concentration chlorophylle a	[mg/L]
C_{Chl-b}	concentration chlorophylle b	[mg/L]
C_{PPC}	concentration caroténoids de protection	[mg/L]
V_2	volume d'acétone	[ml]
l	profondeur optique de la cuvette	[cm]
V_1	volume de la suspension algale	[ml]

15. Calculer les incertitudes absolues.
16. Calculer le pourcentage de pigments par rapport à la matière sèche totale.

A.II : Dosage des Sucres Totaux

I- Appareils utilisés :	Centrifugeuse MIKRO 22 R [®] Vortex Bain marie Spectrophotomètre Jenway [®]
II- Matériels utilisés :	Tube Centri 15 mL autoclavable en PP (19 tubes). Tube Centri 15 mL autoclavable en PP (2 tubes). Portoir pour tube 15 mL Pipette Pasteur en verre avec tétine en caoutchouc. μ pipette (100-1000 μ L) et pointes μ pipette (1-10)mL et pointes Chronomètre Cuve jetable en PS
III- Réactifs :	Acide sulfurique concentré 98% Solution phénol 50g/L Glucose

Le volume de la suspension μ algale à prendre dépend de la biomasse:

Biomasse C_X en g/L	Volume de culture de μ algues mL
$C_X < 0.5$	10
$0.5 < C_X < 1$	5
$1 < C_X < 2$	2.5
$2 < C_X < 3$	1.5

1. Fixer la température du bain marie à 35 °C.
2. Préparer dans une fiole jaugée une solution mère de glucose à 0.1g/L. puis des solutions filles pour la courbe d'étalonnage avec les concentrations suivantes : 0.02-0.04-0.06-0.08 et 0.1 g/L.
3. Prélever le volume V de la suspension μ algale, le mettre dans un tube Centri 15 mL, et compléter avec de l'eau osmosée (3 ‰ NaCl) pour avoir un volume final de 10 mL.
4. Centrifuger pendant 5 minutes à 6000 rpm (utiliser la centrifugeuse Mikro 22 R[®] avec le rotor 1016).
5. Eliminer complètement le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur en verre munie d'une tétine.
6. Introduire 10 mL de l'eau osmosée (3 ‰ NaCl), dans le culot restant afin de laver la biomasse.

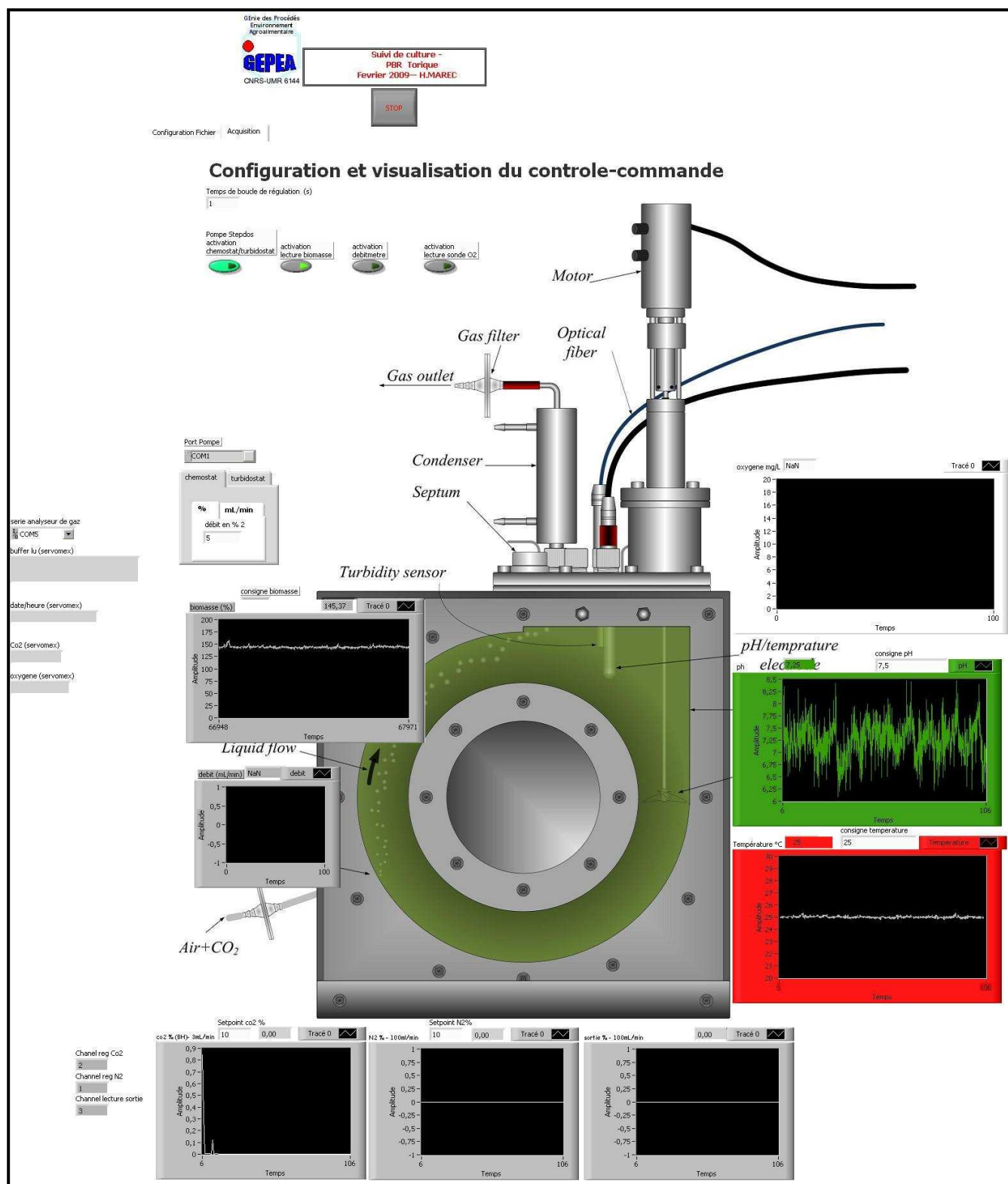
7. Mélanger le culot et l'eau à l'aide d'un vortex à 3000 rpm (quelques secondes).
8. Centrifuger de nouveau 5 minutes à 6000 rpm.
9. Éliminer complètement le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur en verre munie d'une tétine.
10. Introduire de nouveau un volume 10 mL d'eau osmosée afin de resuspendre le culot lavé. L'échantillon ainsi est prêt pour le dosage des sucres totaux.
11. Placer sur le portoir 19 tubes (3 pour l'échantillon et 16 pour la série d'étalonnage) et numéroter les de 1 à 19.
12. Ajouter 0.5 ml de la suspension précédemment préparée dessus dans chacun des 3 tubes de l'échantillon E_1 , E_2 et E_3 puis ajouter 0.5 ml de chacune des solutions de la série d'étalonnage préparée dans chacun des 3 tubes de chaque concentration de la série d'étalonnage.
13. Ajouter 0.5 mL du phénol (50g/L) dans chacun des 19 tubes.
14. Ajouter 2.5 mL de H_2SO_4 98% (doucelement sans en déposer sur les parois) dans le premier tube numéroté 1, et chronométrer 10 minutes exactes, puis vortexer à 3000 rpm pendant 10 secondes exactes. (pour gagner de temps, attendre 30 secondes entre chaque deux tubes, et tous les tubes seront traités de la même façon que le premier tube).
15. Mettre les tubes au bain marie chauffer au préalable à 35°C pendant 30 minutes, et la coloration jaunâtre ainsi obtenu est stable pour quelques heures.
16. Utiliser le spectrophotomètre avec des cuves jetables en PS.
17. La DO des échantillons et ainsi que de la série d'étalonnage est lue à 483 nm.
18. Faire une ligne de base (calibrage) avec le blanc de la série d'étalonnage préparée.
19. Organiser les résultats dans un tableau comme suit :

DO	λ	Échantillon E_1, E_2, E_3	0 g/L	0.02 g/L	0.04 g/L	0.06 g/L	0.08 g/L	0.1 g/L
DO ₁								
DO ₂								
DO ₃								
DO _{moy}								
Ecart type								

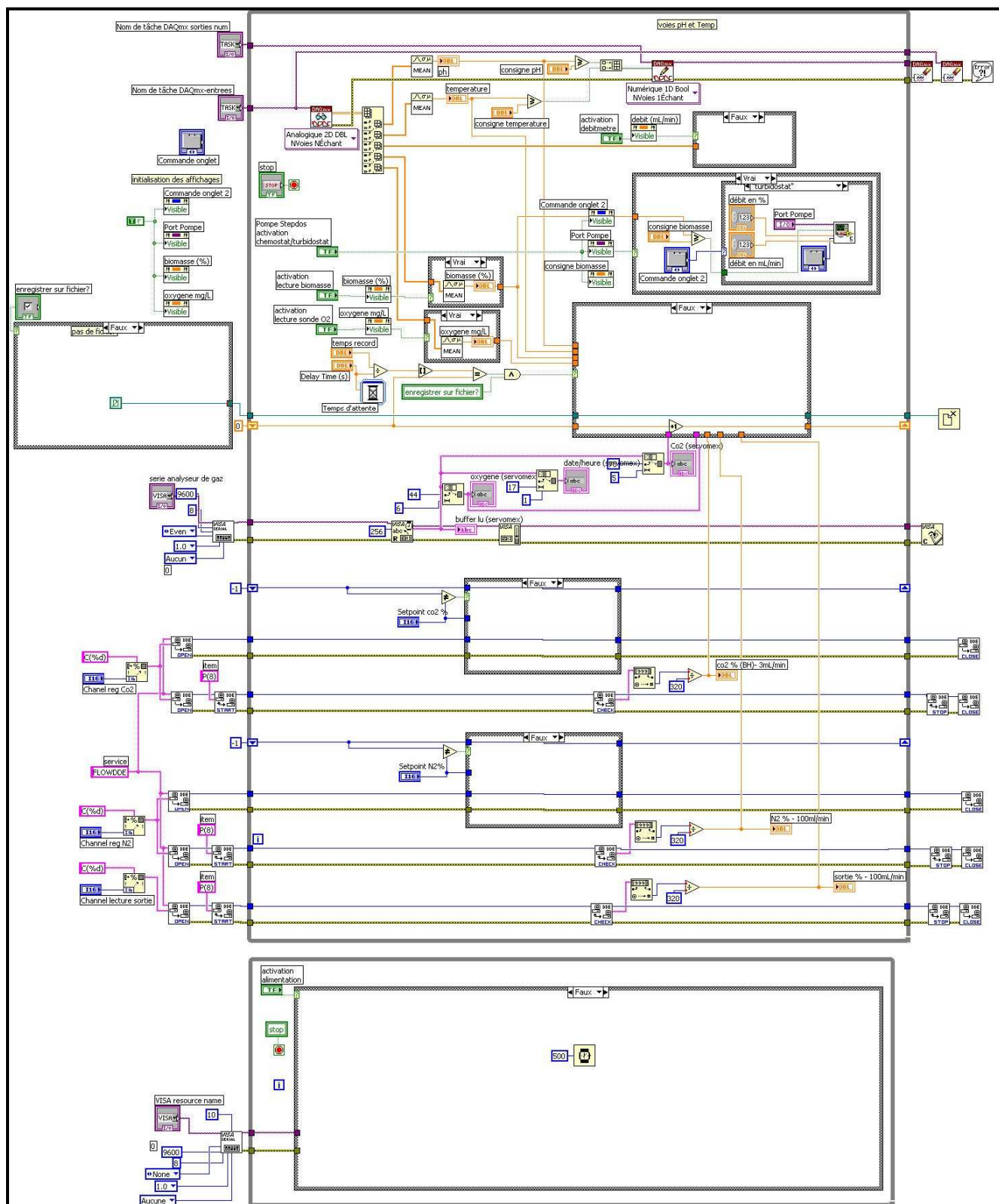
20. Tracer la courbe représentant la concentration en g/L en fonction de ma DO ; qui doit être linéaire sous la forme $y=a.x$ qui passe par l'origine, et la concentration des ST est donnée alors par : $[S.T]= a \times DO$
21. Calculer la concentration des S.T dans l'échantillon d'après la valeur moyenne des DO de l'échantillon et en utilisant l'équation de la droite déjà calculée.
22. Calculer les incertitudes absolues.
23. Calculer le pourcentage des sucres totaux en % matière sèche.

A.III : Programme de contrôle/ commande du photobioréacteur torique

A.III.1 . L'interface d'utilisateur



A.III.2 . Le Diagramme de programmation



A.IV. Détermination de la distribution de taille par analyse d'image

Pour réussir une analyse d'image, il est nécessaire de suivre les étapes suivantes :

1. L'acquisition des images.
2. Le prétraitement des images.
3. L'analyse des images traitées.
4. L'interprétation des résultats obtenus.

A. IV.1. Microscopie

Les cellules sont examinées sous un microscope Zeiss Axioplan équipés d'un objectif plan apochromatique (x100) en immersion et d'une lampe halogène de 20w.

A. IV.2. Photographie

Un appareil photo numérique Cooplix 4500 (Nikon, Japon) monté sur le microscope est utilisé pour capter les photos. Les images sont stockés en format JPEG (résolution 300x300 pixels, et de dimensions de 2272x1704 pixels).

A. IV.3. Analyse d'images

La taille des cellules est ensuite déterminée à l'aide du logiciel Optimas 6.5 (Media Cybernetics, Inc.). La distribution de taille est réalisée sur un échantillon de 300 organismes afin d'obtenir des valeurs représentant la population des cellules.

Le logiciel Optimas 6.5 nous permet de calculer plusieurs paramètres, dont les plus intéressants dans le calcul de distribution de taille, sont les suivants :

- ArPerimeter : donne la longueur de la frontière qui s'épare la cellule de l'arrière plan.
- ArArea : pour calculer l'aire de la surface occupée par la cellule dans la zone choisie.
- ArFeretDiameter : donne le diamètre entre deux tangentes à la surface limitée par la cellule de deux cotés opposants.

Autres matériels utilisés :

- Microsphères en Latex pour calibration (diamètre de 2.02 μ m).
- Colorant : Lugol
- Lame et lamelle très propres et bien séchés.

Le traitement des images acquises se fait suivant la démarche suivante :

1. La première étape consiste à reproduire à partir de l'image originale une copie qui sera convertie en noir et blanc (8 bit grey) afin d'être traitée.
2. Le traitement se poursuit par un seuillage automatique de l'image.

3. une fois la première étape terminée, on fait une retouche (éroder, dilater) si c'est nécessaire pour avoir un arrière plan noir dans lequel les cellules blanches vidées de l'intérieur auront des bords non déformés.
4. Après cette étape, et afin de vérifier l'exactitude du traitement, l'image traitée est comparée à l'image sans traitement en traçant un diamètre vertical et un autre horizontal de la même cellule dans les deux images, puis comparé la longueur des diamètres tracés.
5. Le traitement se poursuit en choisissant une zone d'intérêt dans l'image, et puis une analyse des cellules dans la zone choisie sera faite.

A. IV.4. Interprétations des résultats obtenus

L'analyse doit être faite sur une population de N cellules pour que ça soit représentatif des cellules présentes dans le réacteur. Pour le vérifier, il faut tracer le nombre des cellules dans les images traitées en fonction de l'écart type du diamètre de ces cellules. Cela doit être fait au fur et à mesure du traitement pour atteindre un écart type stable pour lequel le nombre de cellules dans les images traitées est fiable représentant toute la population.

A. IV.5. Particule de Tchebychev

Une particule de Tchebychev $T_n(\varepsilon)$ est obtenue en déformant une sphère de rayon a au moyen d'un polynôme de Tchebychev d'ordre n . Le rayon de la particule en coordonnées sphériques est donc donné par :

$$r(\theta, \varphi) = a [1 + \varepsilon T_n(\cos \theta)], \quad |\varepsilon| < 1 \quad (\text{II.10})$$

- n est l'ordre du polynôme de Tchebychev (obligatoirement pair) appelé aussi paramètre d'ondulation (dans le cas de *C. reinhardtii* $T_n = 2$)

- ε est le paramètre de déformation dont le signe définit l'orientation de la particule par rapport à l'axe de symétrie de révolution.

Le calcul de ε se fait pour chaque cellule, alors on peut écrire :

$$\varepsilon_i = \frac{R_i - 1}{R_i + 1} \quad \text{Sachant que } R_i = \frac{D_{i \text{ Feret max}}}{D_{i \text{ Feret min}}}$$

$$\text{Et comme valeur moyenne on obtient : } \bar{\varepsilon} = \sum_{i=1}^N \frac{\varepsilon_i}{N_i} \quad \bar{R} = \sum_{i=1}^N \frac{R_i}{N_i}.$$

Une telle particule possède un volume et un rayon en volume égaux à :

$$V = \frac{4}{3} \pi a^3 T_V, \quad r_v = a \sqrt[3]{T_V} \quad (\text{ou } r_v \text{ est le rayon équivalent})$$

$$T_v = 1 + \varepsilon \times \frac{2 \times \varepsilon \times n^4 - 3 \times \varepsilon \times n^2 + \varepsilon - 8 \times n^2 + 2}{1 - 5 \times n^2 + 4 \times n^4} ; \text{ où } \lim_{n \rightarrow \infty} [T_v] = 1 + \frac{\varepsilon}{20}$$

le rayon a_0 est donné par :

$$\left. \begin{array}{l} 2a_{0i} \times (1 + \varepsilon_i) = D_{Feret \text{ maxi}} \\ 2a_{0i} \times (1 - \varepsilon_i) = D_{Feret \text{ mini}} \end{array} \right\}$$

$$\Leftrightarrow a_{0i} = \frac{D_{Feret \text{ maxi}} + D_{Feret \text{ mini}}}{4}$$

A.V. Modélisation de la teneur en pigment par une approche TPI

En utilisant une approche TPI (Cornet 2007), l'équation donnant l'évolution de la teneur en pigments w_{PIG} d'une façon quasi-prédictive est donnée par la relation suivante :

$$w_{PIG} = 0.08 \times (1 - \bar{\beta}) \times \eta_{hv} \quad (A.V.1)$$

avec $w_{PIG} = w_{Chla} + w_{Chlb} + w_{PPC}$ le pourcentage de la teneur massique totale en pigments. La valeur maximale limite 0.08 est spécifique au micro-organisme (elle correspond à la pigmentation maximale théorique), et $\bar{\beta}$ est définie par Cornet (2007) comme étant une fonction de caractérisation de la contrainte physique liée au transfert de rayonnement. Elle est fonction de l'irradiance locale et elle comprise entre 0 et 1 et traduit l'intensité de la limitation physique. L'auteur suppose que cette fonction est obligatoirement une moyenne temporelle qui regroupe le seul terme variable mettant en jeu le champ de radiation pour le calcul des vitesses locales dans le réacteur. Elle est définie sous la forme suivante :

$$\bar{\beta} = \frac{1}{V_l} \iiint_{V_l} \frac{G(\vec{r})}{K + G(\vec{r})} dV \quad (A.V.2)$$

En limitation physique, avec un volume V_l définit par le point de compensation de la photosynthèse, la valeur de $\bar{\beta}$ est donnée par (Cornet 2007) :

$$\bar{\beta} = \frac{\ln \left[\left(1 + \frac{n+2}{n+1} \frac{q_\odot}{K} \right) / \left(1 + \frac{G_C}{K} \right) \right]}{\ln \left(\frac{\frac{n+2}{n+1} q_\odot}{G_C} \right)} \quad (A.V.3)$$

où n est le degré de collimation, avec $n=1$ pour un champ de radiation diffus isotrope, et $n = \infty$ pour un champ collimaté.

Dans le cas des diodes électroluminescentes utilisées dans cette étude, la densité de flux hémisphérique incidente photonique quasi-collimaté ($n = \infty$), la valeur de $\bar{\beta}$ devient alors :

$$\bar{\beta} = \frac{\ln \left[\left(1 + \frac{q_\odot}{K} \right) / \left(1 + \frac{G_C}{K} \right) \right]}{\ln(q_\odot / G_C)} \quad (A.V.4)$$

$\bar{\beta}$ prend une valeur constante qui ne dépend que de la densité de flux incidente $q_\odot$ et des deux paramètres caractérisant le micro-organismes G_C et K .

Dans l'équation (A.V.1), η_{hv} représente l'efficacité thermodynamique d'utilisation des photons pour le schéma en Z . Elle est définie par l'équation (A.V.5) comme étant le ratio

des énergies des photons efficaces $h\nu_{eff}$ sur l'énergie libre maximale théorique $h\nu_{th}$ pour le schéma en Z (l'évolution de η_{hv} en fonction de $q_{\cap}$ est représentée dans la figure (A.V.1)).

$$\eta_{hv} = \frac{h\nu_{eff}}{h\nu_{th}} \quad (\text{A.V.5})$$

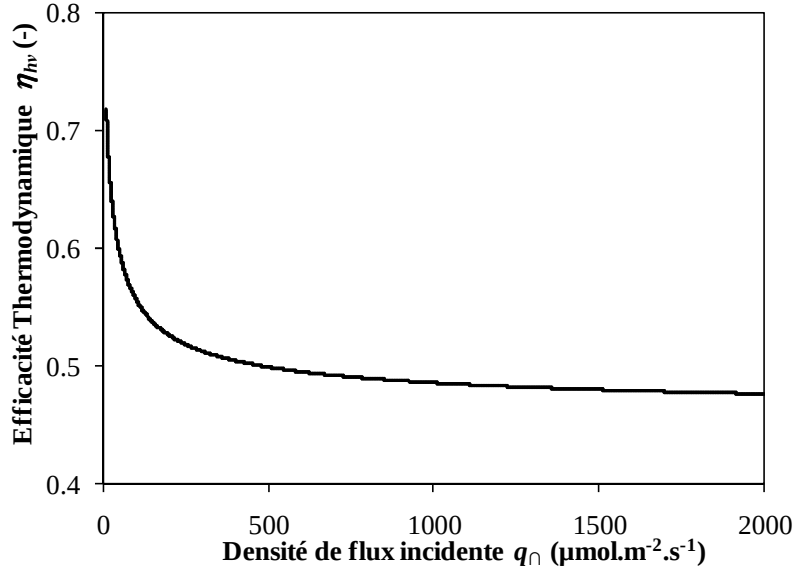


Figure A.V.1 : Représentation de l'évolution de l'efficacité thermodynamique de conversion des photons η_{hv} en fonction de la densité de flux incidente $q_{\cap}$ pour un PBR rectangulaire (cas du PBR torique utilisé dans cette étude) en limitation physique stricte par la lumière ($\gamma=1$).

La relation (A.V.1) qui décrit l'évolution de la teneur en pigment en fonction de $\bar{\beta}$ et η_{hv} semble gouvernée par l'énergétique du schéma en Z et non pas par le rapport $P / 2e^-$.

Les résultats expérimentaux de la teneur pigmentaire chez *C. reinhardtii* sont présentés dans le tableau (A.VI.1). Ils sont comparés à ceux calculés par l'équation (A.V.1) pour différentes valeurs de la densité de flux incidente $q_{\cap}$. Le tableau (A.V.1) contient également les différentes valeurs de η_{hv} et $\bar{\beta}$ calculés à partir des équations (A.V.3) et (A.V.4), en prenant une valeur de la constante de demi saturation $K = 120 \pm 10 \mu\text{mol}_{hv} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, et une valeur du point de compensation $G_C = 10 \pm 3 \mu\text{mol}_{hv} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Les données sont présentées pour les deux PBR étudiées au chapitre III et montre la pertinence d'une approche TPI dans la prédiction quantitative de la pigmentation de *C. reinhardtii* en condition de limitation physique stricte par la lumière.

Densité de flux incidente $q_{\odot}$ ($\mu\text{mol}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)			50	110	500	1000
w_{PIG} expérimentale (%)			3.9	3.4	2.5	1.9
β	(-)	PBR torique	0.1562	0.2248	0.3845	0.4535
		PBR Cylindrique	0.1697	0.2497	0.4582	0.5000
η_{hv}	(-)	PBR torique	0.5962	0.5517	0.4993	0.4859
		PBR Cylindrique	0.5962	0.5517	0.4993	0.4859
w_{PIG} théorique (%)		PBR torique	4.02	3.42	2.46	2.12
		PBR Cylindrique	3.96	3.31	2.16	1.94
Écart (%)		PBR torique	3	1	-2	12
		PBR Cylindrique	2	-3	-13	2

Tableau A.V.5. : Comparaison entre les teneurs en pigment chez *C. reinhardtii* obtenues expérimentalement et celles calculées par l'équation (IV.19) pour deux PBR de géométrie différentes torique-plan et cylindrique pour des cultures en limitation physique stricte.

Résumé

Cette thèse porte sur l'étude de la croissance photosynthétique de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* en photobioréacteur. Les travaux ont porté en première étape sur la caractérisation de la réponse en lumière continue. Ensuite, l'étude s'est poursuivie en caractérisant les effets des cycles de lumière/obscurité générés par un panneau de diodes électroluminescentes (DEL) sur la productivité volumique en biomasse afin d'étudier l'effet de l'hydrodynamique sur la conversion photosynthétique (*light/dark cycles effect*).

Les expérimentations en limitation physique stricte et en photolimitation ont permis d'une part de définir les paramètres gouvernant la productivité volumique maximale en PBR, à savoir: la densité de flux incidente (PFD), la surface spécifique éclairée (a_{light}) et la fraction volumique éclairée (γ). Il a été également possible d'établir un modèle cinétique de la croissance de *C. reinhardtii* en lumière continue. Ce modèle est basé sur une approche prédictive reposant sur la Thermodynamique des Processus Irréversibles (TPI), et prenant en compte les contributions respectives de la croissance photosynthétique et de la respiration à la lumière sur la cinétique globale.

La dernière partie de ce mémoire concerne les expérimentations réalisées en lumière intermittente où différents régimes d'éclairement ont été testés. Des cycles longs (>40s) se sont révélés avoir un effet négatif sur la croissance. Pour des cycles plus courts (<12s), un couplage non linéaire a été observé entre les cycles imposés et la réponse en croissance, montrant une interaction avec les temps caractéristiques de réponse du métabolisme du micro-organisme.

Mots-clés : *Chlamydomonas reinhardtii*, photobioréacteur, hydrodynamique, conversion photosynthétique, photolimitation, productivité, lumière intermittente.

Characterization and modeling of the photosynthetic growth of Chlamydomonas reinhardtii in photobioreactor. Effect of L/D cycles on the volumetric biomass productivity

Abstract

This thesis concerns the characterisation and the modeling of the photosynthetic growth of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* in photobioreactor. The hydrodynamic effect on the photosynthetic conversion in PBR was also emphasized. This work has been performed in two steps: in the first one, the photosynthetic response at continuous light was characterized. In a second one, a light emitting diodes panel (LED) was used in the investigation on the effect of intermittent light on the volumetric biomass productivity, so as to simulate hydrodynamics influence on photosynthetic conversion (*light/dark cycles effect*).

Experiments in physical limitation by light and light-limited culture allowed to define parameters governing the maximum volumetric biomass productivity in PBR: the incident photon flux density (PFD), the specific illuminated area (a_{light}) and the working illuminated volume fraction (γ). A kinetic model for the photosynthetic growth of *C. reinhardtii* in continuous light was also established. The proposed model relies on a predictive approach based on the Thermodynamics of Irreversible Processes (TPI), taking into account the respective contributions of photosynthesis and respiration at light in the global kinetic.

In the last part of this thesis, experiments were performed at intermittent light. Different frequencies for the intermittent illumination were investigated in order to characterize their effect on *C. reinhardtii*. For long cycles (> 40s), a negative effect on the mean volumetric growth rate has been observed. Shorter cycles (<12s) showed a non-linear coupling between cycles frequencies and the photosynthetic growth, emphasizing on interaction with dynamic response of the microorganism metabolism.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, photobioreactor, hydrodynamic, photosynthetic conversion, light-limited culture, productivity, L/D cycles.

Discipline: Génie des Procédés