

Thèse de Doctorat

Aumaya TALEB

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes et de l'Université Libanaise
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale de Sciences pour l'ingénieur, Géosciences, Architecture
École doctorale Libanaise des Sciences et de Technologies

Discipline : *Sciences pour l'ingénieur*

Spécialité : *Génie des procédés*

Unité de recherche : *Laboratoire GEPEA, UMR-CNRS 6144*

Centre AZM pour la recherche en biotechnologie et ses applications

Soutenue le 26 mars 2015

Production de biodiesel à partir des microalgues : recherche des souches accumulatrices des lipides et optimisation des conditions de culture en photobioréacteurs

JURY

Président	: Jean-Claude CHARPENTIER, Professeur, Université de Lorraine
Rapporteurs	: Arnaud MULLER-FEUGA, Docteur HDR, Directeur scientifique à Microphyt Yonghua LI-BEISSON, Directrice de recherche, CEA Cadarache, Université Aix Marseille
Examineurs	: Jack LEGRAND, Professeur, Université de Nantes Jalal HALWANI, Professeur, Université Libanaise
Directeurs de Thèse	: Jérémy PRUVOST, Professeur, Université de Nantes Samir TAHA, Professeur, Université Libanaise
Co-directeur de Thèse	: Hosni TAKACHE, Docteur, Université Libanaise

Remerciements

En premier lieu, je voudrais remercier L'Agence Universitaire De La Francophonie (AUF) et le Conseil National De Recherches Scientifiques au Liban (CNRS Libanais) pour m'avoir accordé une bourse de mobilité d'études de trois ans au Liban et en France, qui m'a permis de réaliser la présente thèse en cotutelle entre l'École Doctorale Libanaise des Sciences et de Technologies (EDST) et l'Université de Nantes. Je remercie également les membres du projet ANR-DIESALG (ANR-12-BIME-0001-02), dont cette thèse fait partie.

Je tiens à remercier le professeur Jack Legrand, Directeur du laboratoire de Génie des Procédés-Environnement-Agroalimentaire (GEPEA) pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse en France et sur le site de Saint-Nazaire.

Je remercie également le professeur Mohamad KHALIL, directeur du Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications de l'École Doctorale Libanaise des Sciences et de Technologies (EDST), pour sa disponibilité et son soutien.

J'adresse mes sincères remerciements à mes encadrants de thèse pour la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral et pour m'avoir accompagné tout au long de ces trois années. Je souhaite tout particulièrement remercier mon directeur de thèse en France, le professeur Jérémie Pruvost, directeur de l'axe Bioprocédés et Séparation en Milieu Marin (BSMM) du GEPEA, pour l'aide compétente qu'il m'a apportée, sa grande responsabilité, ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité, son respect du travail, sa patience et son encouragement. Son œil critique m'a été très précieux pour structurer ce travail et pour améliorer la qualité des différentes sections. Ce travail ne serait pas aussi abouti sans ses conseils et sa disponibilité. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

J'exprime aussi ma gratitude pour mon directeur de thèse au Liban, le professeur Samir TAHA pour sa responsabilité et son soutien ainsi que ses précieux conseils.

Mes vifs remerciements vont également à mon co-encadrant de thèse au Liban et en France, le Docteur Hosni Takache, pour sa disponibilité, ses précieux conseils et son encouragement constant. Je n'oublierai jamais l'aide qui m'a accordé pour d'abord contacter le GEPEA et venir en France pour réaliser cette thèse. Je voudrais lui dire un grand merci pour le temps qu'il m'a consacré pour faire les papiers administratifs.

La réalisation de ce travail s'appuie également sur un environnement qui est essentiel. À ce titre, je voudrais remercier le GEPEA et son personnel, notamment l'équipe technique (Delphine Kucma, Candice perrier, Raphaëlle Touchard, Emmanuel Dechandol et Frank Judic) pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour l'aide qu'ils m'ont donnée à des moments clés de cette thèse. Une pensée particulière à Hélène Marec, technicienne en instrumentation et à Benjamin Le Gouic, ingénieur de recherche au GEPEA, qui sont à la base du succès expérimental en photobioréacteurs. Je les remercie pour leur aide et leur bonne humeur. Aussi, je souhaite remercier Delphine Kucma, Candice perrier, Raphaëlle Touchard pour le grand travail qu'elles ont effectué en ce qui concerne les analyses de lipides. J'avoue que le nombre d'échantillons à analyser était énorme, merci pour votre organisation et votre disponibilité.

J'aurais eu du mal à surmonter les moments difficiles ainsi que le stress pendant ces trois années sans le soutien moral de mes chers amis, Antoine Souliès, Antoinette Kazbar, Arnaud Artu, Astrid De Luca, Benjamin Moutel, Camille Lemasson, Kenza Saadaoui, Nour Ayache, Razmig Kandilian, Sergio Rios et Thomas Rinaldi. Je les remercie pour les moments inoubliables passés aussi bien au bureau, dans les laboratoires qu'à l'extérieur. J'aimerais leur dire qu'ils sont ma deuxième famille en France. Je les remercie du fond de mon cœur pour leur bonne humeur, leur humour, toute l'aide qu'ils m'ont apportée, la bonne ambiance et le climat sympathique qu'ils ont créés. Mes sincères remerciements s'adressent aussi à l'ensemble de mes collègues doctorants et stagiaires que j'ai rencontrés, Alexis Kotland, Benjamin Le-Gouic, Emilie Angles, Claire Mairot, Francois Le Borgne, Mbalo Ndiaye, Sébastien Jubeau et Valéria Montalesco. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacun m'ont beaucoup apporté. Je voudrais exprimer toute mon amitié à Jacqueline Duclou, Hassan Obeid, Lara Hawshar, Michel Nicolas, Valentina et Wissam Hajj Shhadeh pour leur gentillesse et leur humour.

Mention spéciale à Razmig Kandilian, qui m'a supporté et m'a permis de me lever motivée, le cœur léger et l'esprit tranquille pendant cette thèse. Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à lui pour son écoute, ses précieux conseils, son humour, sa joie, sa gentillesse... et la compréhension dont il a toujours fait preuve à mon égard. Je voudrais te remercier de te trouver toujours à côté de moi aussi bien dans les moments difficiles que dans le bonheur.

J'exprime mes grands remerciements à ma famille et en particulier mes frères pour m'avoir fait partager leur joie de vivre et m'avoir ainsi soutenu dans mes efforts.

Enfin, je voudrais dédier ce travail à mes parents, le symbole de l'amour et de la tendresse. Tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Malgré mon éloignement, leur intelligence, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Merci à toute et à tous!

À Saint Nazaire, le 26 Mars 2015

Aumaya Taleb

Liste des communications

Publications internationales

- 1 Taleb, A., Pruvost, J., Legrand, J., Marec, H., Le-Gouic, B., Mirabella, B., Legeret, B., Bouvet, S., Peltier, G., Li-Beisson, Y., Taha, S., Takache, H., 2015. Development and validation of a screening procedure of microalgae for biodiesel production: Application to the genus of marine microalgae *Nannochloropsis*. *Bioresource Technology*. 177, 224–232.

Articles à rédiger

- 1 Taleb, A., Pruvost, J., Legrand, J., Marec, H., Le-Gouic, B., Taha, S., Takache, H., 2015. Screening of freshwater strains of microalgae for biodiesel production.
- 2 Taleb, A., Pruvost, J., Legrand, J., Taha, S., Takache, H., 2015. Optimization of biomass and triglycerides production by *Parachlorella kessleri* in continuous Photobioreactors.
- 3 Taleb, A., Pruvost, J., Legrand, J., Taha, S., Takache, H., 2015. Optimization of triglycerides production by *Parachlorella kessleri* under nitrogen starvation for biodiesel application.
- 4 Taleb, A., Pruvost, J., Legrand, J., Taha, S., Takache, H., 2015. Investigation of triglycerides production by *Parachlorella kessleri* under continuous illumination and Light/Dark cycles.

Communications orales à des congrès internationaux

- 1 “Development of a Screening Methodology of Microalgae Strains for Biodiesel Production: Application to the Marine Microalgae *Nannochloropsis*.” ESBES-IFIBIOP 2014 (10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and 6th International Forum on Industrial Bioprocesses), Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. Lille, France (Septembre 2014).
- 2 “Development and validation of a screening methodology of microalgae strains for biodiesel application (application to 15 strains of interest).” Young Algaeneers Symposium, Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. H. Narbonne, France (Avril 2014).
- 3 “Down-scaled photobioreactors for the screening of microalgae for biodiesel production: application to the marine microalga *Nannochloropsis*”. 9ème Congrès Francophone de Génie des Procédés (CFGP2014), Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. H. Agadir, Maroc (Avril 2014).

Communications Poster à des congrès internationaux

- 1 “Development of rapid pre-screening methodology of microalgae strains in photobioreactors for biodiesel production: Application to the marine microalgae *Nannochloropsis*”. 20th LAAS International Science Conference (Advanced Research for Better Tomorrow), Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. H. Hadath, Liban (Mars 2014).
- 2 “Development and validation of a screening procedure of microalgae strains in photobioreactors for biodiesel production. Alg’n’ Chem 2014, Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. H. Montpellier, France (Mars 2014).

Communications Poster à des congrès nationaux

- 1 “Development of a screening procedure of microalgae strains in photobioreactors for biodiesel production”. Congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP2013), Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. H. Lyon, France (Octobre 2013).

Séminaires et présentations divers

- 1 “Optimisation de la Production des Lipides de *Parachlorella kessleri* UTEX2229”. Réunion du programme Diesalg, Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. H. Cadarache, France (Septembre 2014).
- 2 «Méthodologie de criblage de souches de microalgues pour la production de biodiesel”. Séminaire des Doctorants de 2ème année à Polytech Nantes, Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. H. Nantes, France (Avril 2013).
- 3 «Méthodologie de criblage des souches de microalgues pour la production de biodiesel”. Réunion du programme Diesalg, Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. H. Grenoble, France (Janvier 2013).
- 4 «Production de biodiesel à partir des microalgues: recherche de souches accumulatrices de lipides et optimisation des conditions de culture en photobioréacteurs”. Séminaire au centre AZM pour la recherche en biotechnologie et ses applications à l’École doctorale Libanaise des sciences et technologies (EDST), Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. H. Tripoli, Liban (Décembre 2012).
- 5 «Production de biodiesel à partir des microalgues : recherche des souches accumulatrices de lipides et optimisation des conditions de culture en photobioréacteurs”. Réunion du programme Diesalg, Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. H. Saint-Nazaire, France (Juin 2012).

Communications Poster diverses

1. "Development and validation of a screening procedure of microalgae strains in photobioreactors for biodiesel production". 3ème Forum Doctoral-EDST-UL, Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. H. Hadath, Liban (Juin 2013).
2. «Production de biodiesel à partir des microalgues: recherche des souches accumulatrices de lipides et optimisation des conditions de culture en photobioréacteurs». 2ème Forum Doctoral-EDST-UL, Taleb. A, Pruvost. J, Legrand. J, TAHA. S, Takache. H. Hadath, Liban (Juillet 2012).

SOMMAIRE

SOMMAIRE	VIII
LISTES DES FIGURES.....	XI
LISTES DES TABLEAUX	XV
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE I: CULTURE DES MICROALGUES ET APPLICATION A LA PRODUCTION DE BIODIESEL	4
1 GENERALITES SUR LES MICROALGUES.....	5
2 CLASSIFICATION DES MICROALGUES.....	6
3 LA PHOTOSYNTHESE.....	8
3.1- Phase claire.....	10
3.2- Phase sombre (métabolisme intrinsèque du chloroplaste).....	14
4 PHOTO-RESPIRATION.....	16
5 LA RESPIRATION (METABOLISME INTRINSEQUE DES MITOCHONDRIES).....	17
6 LIPOGENESE ET ACCUMULATION DES TRIGLYCERIDES.....	20
6.1- Biosynthèse des acides gras.....	20
6.2- Biosynthèse des triglycérides.....	22
6.3- Facteurs stimulant la production des lipides et l'accumulation des triglycérides.....	23
6.4- Mécanisme et rôle physiologique de l'accumulation des triglycérides.....	24
7 CULTURE DES MICROALGUES	25
7.1- Exigences de culture.....	25
7.2- Technologies des systèmes de culture	36
7.3- Les géométries des photobioréacteurs et les paramètres principaux d'ingénierie	39
7.4- Modes de culture dans les photobioréacteurs.....	45
8 DOMAINES D'APPLICATION DES MICROALGUES	49
8.1- Alimentation humaine.....	49
8.2- Aquaculture et alimentation animale.....	50
8.3- Production d'extraits de microalgues	50
8.4- Applications dans le domaine de l'environnement.....	51
8.5- Applications énergétiques.....	52
9 PRODUCTION DE BIODIESEL (POTENTIEL ET DEFIS).....	52
9.1- Historique.....	52
9.2- Potentiel des microalgues pour la production de biodiesel.....	54
9.1- Défis et verrous de la production de biodiesel par microalgues.....	57
CHAPITRE II: MISE EN PLACE D'UNE METHODOLOGIE DE CRIBLAGE DES SOUCHES DE MICROALGUES POUR LA PRODUCTION DE BIODIESEL.....	61
1 INTRODUCTION	62
2 APERÇU DE LA PROCEDURE DE CRIBLAGE.....	63
2.1- Étape 1: Pré-criblage rapide dans des bacs de criblage spécifiques (Fast screening).....	63
2.2- Étape 2: Criblage approfondie dans des PBR air-lift (1L) et validation finale (final validation)	65
3 SOUCHES D'ETUDE	68
3.1- Le genre <i>Neochloris</i>	69
3.2- Le genre <i>Scenedesmus</i>	71
3.3- La famille «Chlorellaceae»: genres <i>Chlorella</i> et <i>Parachlorella</i>	73
3.4- Le genre <i>Nannochloropsis</i>	77
4 CULTURE DES SOUCHES EN CONDITIONS AXENIQUES.....	78

4.1-	Élaboration des milieux de culture.....	78
4.2-	Préculture et entretien des souches	80
4.3-	Culture des souches en conditions contrôlées et description des PBR.....	81
5	PROTOCOLES D'ANALYSE ET DETERMINATION DES GRANDEURS DES SOUCHES	86
5.1-	Dénombrement cellulaire.....	86
5.2-	Mesure de la matière sèche et détermination des productivités des souches.....	87
5.3-	Détermination de la concentration et la composition des pigments	89
6	ANALYSE DES LIPIDES ET DETERMINATION DES PRODUCTIVITES DES TAG	90
6.1-	Extraction des lipides totaux	90
6.2-	Séparation des TAG par microcolonnes SPE.....	92
6.3-	Quantification et qualification par GC-FID	92
7	DESTRUCTION DES CULTURES ET DETERMINATION DE LA FRAGILITE CELLULAIRE DES SOUCHES	95

CHAPITRE III: CRIBLAGE ET SELECTION DES SOUCHES DE MICROALGUES EN VUE D'UNE APPLICATION AU BIODIESEL.....98

1	PRE-CRIBLAGE DES SOUCHES DANS LE PBR «EOSS» ET SELECTION DE SOUCHES D'INTERETS	99
1.1-	Introduction.....	99
1.2-	Phase de sélection liée aux critères de croissance	99
1.3-	Phase de sélection liée à la production des triglycérides.....	106
1.4-	Phase de sélection liée au critère de fragilité cellulaire.....	110
1.5-	Bilan final sur l'étape de pré-criblage.....	112
2	CRIBLAGE APPROFONDI ET CHOIX FINAL DES SOUCHES D'INTERET.....	114
2.1-	Introduction.....	114
2.2-	Validation des performances en croissance des souches dans des conditions de culture optimales (+N) et défavorables (-N).....	115
2.3-	Validation des performances en production de TAG	119
2.4-	Évaluation de la qualité des huiles produites.....	124
2.5-	Validation de la fragilité cellulaire des souches	128
2.6-	Sélection finale de la souche la plus intéressante	129
3	CONCLUSION GENERALE	130

CHAPITRE IV: OPTIMISATION DE LA CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION DE TAG PAR PARACHLORELLA KESSLERI UTEX2229 EN PBR SOUS LUMIERE CONTINUE.....135

1	INTRODUCTION	136
2	DETERMINATION DES PERFORMANCES MAXIMALES EN BIOMASSE DE PARACHLORELLA KESSLERII UTEX2229 CULTIVEE EN PBR SOUS LUMIERE CONTINUE.....	136
2.1-	Introduction.....	136
2.2-	Étude de la croissance photo-limitée de P. kessleri UTEX2229 sous différents flux incidents	137
2.3-	Optimisation de la productivité volumique en biomasse sèche pour un flux incident donné.....	140
2.4-	Conclusion	145
3	OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE LIPIDES (TAG)	145
3.1-	Introduction.....	145
3.2-	Étude de la production de TAG sous carence soudaine en azote (mode batch)	146
3.3-	Étude de la production en TAG sous des conditions de carence progressive en azote (mode batch).....	160
3.4-	Étude de la production de TAG en culture continue de P. kessleri UTEX2229 limitée en azote	173
4	CONCLUSION	181

CHAPITRE V: ÉTUDE DE LA CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION DE LIPIDES (TAG) DE CULTURES BATCH DE P. KESSLERI UTEX2229 CARENCEES EN AZOTE EN CYCLES JOUR/NUIT184

1	INTRODUCTION	185
2	EFFETS DES CYCLES JOUR/NUIT SUR L'EVOLUTION DE LA CROISSANCE	188
2.1-	Influences sur l'évolution des pigments	188
2.2-	Influence sur l'évolution de la concentration et de la productivité de biomasse sèche	190
3	EFFETS DES CYCLES JOUR/NUIT SUR LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE	194

4	EFFETS DES CYCLES JOUR/NUIT SUR LA CINETIQUE D'ACCUMULATION ET DE PRODUCTION DE TAG.....	197
5	CONCLUSION.....	200
CONCLUSION GÉNÉRALE		201
BIBLIOGRAPHIE.....		211

LISTES DES FIGURES

FIGURE I-1 VUE SCHEMATIQUE DU PROCESSUS GLOBALE DE LA PHOTOSYNTHESE.....	10
FIGURE I-2 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CHAÎNE PHOTOSYNTHETIQUE DES MEMBRANES THYLACOÏDALES (DEGRENNÉ, 2009) .	10
FIGURE I-3 TRANSFERT CYCLIQUE ET ACYCLIQUE DES ELECTONS LE LONG DE LA CHAÎNE PHOTOSYNTHETIQUE (ORRAND GOVINDJEE, 2013).....	14
FIGURE I-4 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES REACTIONS DU CYCLE DE CALVIN (HTTP://WWW.COORS-PHARMACIE.COM/BIOLOGIE-VEGETALE/LA-PHOTOSYNTHESE.HTML)	15
FIGURE I-5 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CHAÎNE RESPIROTOIRE DES MITOCHONDRIES (DEGRENNÉ, 2009)	18
FIGURE I-6 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU METABOLISME DES MITOCHONDRIES LORS DE LA RESPIRATION.....	19
FIGURE I-7 BIOSYNTHESE DES ACIDES GRAS ET DES TRIGLYCERIDES (BERGER <i>ET AL.</i> , 2010)	21
FIGURE I-8 ÉVOLUTION DES DIFFÉRENTES ESPÈCES CARBONÉES DISSOUTES EN FONCTION DU PH DU MILIEU (LE GOUIC, 2013)	26
FIGURE I-9 COURBE TYPIQUE DE L'ÉVOLUTION DE LA PRODUCTION D'OXYGÈNE EN FONCTION DE L'IRRADIANCE G POUR UNE MICROALGUE	29
FIGURE I-10 ATTÉNUATION DE LA LUMIÈRE DANS LE SENS DE LA PROFONDEUR DE LA CULTURE (PRUVOST ET CORNET 2012)	30
FIGURE I-11 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ATTÉNUATION DE LA LUMIÈRE ET L'APPARITION DES ZONES SOMBRES (PRUVOST ET CORNET 2012)	31
FIGURE I-12 SCHEMATISATION DES TROIS RÉGIMES DE FONCTIONNEMENT DES SYSTÈMES DE CULTURE DES MICROALGUES (PRUVOST ET CORNET 2012). MISE EN EVIDENCE DU RÔLE DE L'ATTÉNUATION DE LA LUMIÈRE, ICI MODIFIÉE PAR LA CONCENTRATION EN BIOMASSE (CAS D'UNE CULTURE CONTINUE) AVEC APPLICATION DES DIFFÉRENTS TEMPS DE RESIDENCE τ	33
FIGURE I-13 ÉVOLUTION DE LA PRODUCTIVITÉ SURFACIQUE DES TRIGLYCERIDES EN FONCTION DE LA VITESSE VOLUMÉTRIQUE D'ABSORPTION DES PHOTONS $\langle \mathcal{S} \rangle$ (INFLUENCE DE L'ATTÉNUATION DE LA LUMIÈRE) (KANDILIAN <i>ET AL.</i> , 2014).....	34
FIGURE I-14 INFLUENCE DE LA VITESSE VOLUMÉTRIQUE INITIALE D'ABSORPTION DES PHOTONS $\langle \mathcal{S}_0 \rangle$ SUR L'ACCUMULATION DES TRIGLYCERIDES (KANDILIAN <i>ET AL.</i> , 2014)	34
FIGURE I-15 EXEMPLES DE SYSTÈMES OUVERTS	38
FIGURE I-16 PHOTOS DES SYSTÈMES CLOS (PBR).....	41
FIGURE I-17 LES DEUX FORMES GÉOMÉTRIQUES USUELLEMENT RENCONTRÉES DES PBR (À GAUCHE PBR CYLINDRIQUE, À DROITE PBR PLAT).....	44
FIGURE I-18 REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN PBR FONCTIONNANT EN MODE CONTINU, (A: CHEMOSTAT, B: TURBIDOSTAT) (TAKACHE, 2010).....	46
FIGURE I-19 ÉVOLUTION DE LA PRODUCTIVITÉ VOLUMÉTRIQUE EN FONCTION DU TAUX DE DILUTION EN MODE CONTINU	48
FIGURE I-20 TRANS-ESTÉRIFICATION DES TRIGLYCERIDES EN BIODIESEL (CHISTI, 2007)	54
FIGURE I-21 PROCESSUS GLOBAL DE LA PRODUCTION DE BIODIESEL À PARTIR DES MICROALGUES	58
FIGURE II-1 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PROCÉDURE GLOBALE DE CIBLAGE DÉVELOPPÉE DANS CETTE ÉTUDE	67
FIGURE II-2 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE PROTOCOLE DE CARENCE SOUDAINE EN AZOTE EN DEUX ÉTAGES	68
FIGURE II-3 PHOTO D'UNE CÉNOBIE FORMÉE DE HUIT CELLULES DE LA MICROALGUE <i>SCENEDESMUS OBLIQUUS</i> (D'APRÈS QIN <i>ET AL.</i> , 2008)	72
FIGURE II-4 SCHEMA ULTRASTRUCTURE DE <i>C. VULGARIS</i> REPRESENTANT LES DIFFÉRENTES ORGANELLES DE LA CELLULE (SAFI <i>ET AL.</i> , 2014)	74
FIGURE II-5 PHOTO DE LA SOUCHE <i>PARACHLORELLA KESSLERI</i> UTEX 2229	77
FIGURE II-6 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES EOSS-PBR.....	83

FIGURE II-7 REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN PBR AIR-LIFT (1L).....	85
FIGURE II-8 PHOTO D'UNE CELLULE DE MALASSEZ	87
FIGURE II-9 VUE D'UNE COUPE ET DE LA GRAVURE D'UNE CELLULE DE MALASSEZ	87
FIGURE III-1 COURBES DE CROISSANCE DES SOUCHES CULTIVEES EN «EOSS-PBR» SOUS DES CONDITIONS NORMALES DE CROISSANCE (+N)	103
FIGURE III-2 AUGMENTATION DE LA TENEUR DES SOUCHES EN LIPIDES TOTAUX APRES 11 JOURS DE LEUR CULTURE EN «PBR-EOSS» SOUS DES CONDITIONS DE CARENCE BRUSQUE EN AZOTE	107
FIGURE III-3 AUGMENTATION DE LA TENEUR DES SOUCHES EN TRIGLYCERIDES APRES 11 JOURS DE LEUR CULTURE EN «PBR-EOSS» SOUS DES CONDITIONS DE CARENCE BRUSQUE EN AZOTE	107
FIGURE III-4 CARACTERISATION DE LA FRAGILITE CELLULAIRE DES SOUCHES PRODUCTRICES DE TAG, CULTIVEES DANS DES CONDITIONS NORMALES DE CROISSANCE (+N).....	112
FIGURE III-5 EVOLUTION TEMPORELLE DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE SECHE DES SOUCHES CULTIVEES EN MODE CONTINU (CONDITIONS DE CROISSANCE NORMALES (+N)).....	117
FIGURE III-6 CARACTERISATION DE LA CROISSANCE DES SOUCHES CULTIVEES DANS DES CONDITIONS DE CULTURE EN CARENCE AZOTEE (-N)	119
FIGURE III-7 ACCUMULATION DES LIPIDES TOTAUX DES SOUCHES CULTIVEES EN BATCH DANS DES PBR AIR-LIFT (1L) SOUS CARENCE AZOTEE (-N)	121
FIGURE III-8 ACCUMULATION DES TAG DES SOUCHES CULTIVEES EN BATCH DANS DES PBR AIR-LIFT (1L) SOUS CARENCE AZOTEE (-N) ..	122
FIGURE III-9 CARACTERISATION DE LA CINETIQUE DE PRODUCTION DES TAG DES SOUCHES CULTIVEES EN BATCH DANS DES PBR AIR-LIFT (1L) EN CARENCE AZOTEE (-N)	124
FIGURE III-10 VARIATION DE LA COMPOSITION DES ACIDES GRAS DES TAG DANS DES CONDITIONS DE CULTURE NORMALES (+N) ET DE CARENCE BRUSQUE EN AZOTE (-N). (A): <i>PARACHLORELLA KESSLERI</i> UTEX2229; (B): <i>SCENEDESMUS OBLIQUUS</i> UTEX393; (C): <i>NANNOCHLOROPSIS SALINA</i> CCMP537; ET (D): <i>NANNOCHLOROPSIS GADITANA</i> CCMP527.	127
FIGURE III-11 CARACTERISATION DE LA FRAGILITE CELLULAIRE DES SOUCHES PRODUCTRICES DE TAG CULTIVEES DANS DES PBR AIR-LIFT (1L) SOUS DES CONDITIONS DE CROISSANCE NORMALES (+N) ET DEFAVORABLES (-N)	129
FIGURE IV-1 INFLUENCE DE L'INTENSITE LUMINEUSE SUR LA CONCENTRATION DE BIOMASSE SECHE OBTENUE A L'ETAT STATIONNAIRE DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 CULTIVEE EN MODE CONTINU ($\tau P = 100$ H; $D = 0.01$ H ⁻¹)	139
FIGURE IV-2 EVOLUTION EXPERIMENTALE DE LA CONCENTRATION ET DE LA PRODUCTIVITE DE BIOMASSE SECHE AVEC LE TEMPS DE RESIDENCE τ (H) SOUS UNE DENSITE DE FLUX LUMINEUX INCIDENT $q_0 = 430$ μ MOL.M ⁻² .S ⁻¹	142
FIGURE IV-3 EVOLUTION DE LA CONCENTRATION DES PIGMENTS TOTAUX AVEC LE TEMPS DE RESIDENCE τ (H) SOUS UNE DENSITE DE FLUX INCIDENT $q_0 = 430$ μ MOL.M ⁻² .S ⁻¹ . NOTE: CHAQUE VALEUR DE LA CONCENTRATION RAPPORTEE DANS CE GRAPHE REPRESENT LA MOYENNE DE 3 MESURES OBTENUES A L'ETAT STATIONNAIRE, ATTEINT ICI POUR CHAQUE TEMPS DE RESIDENCE τ APPLIQUE.....	144
FIGURE IV-4 EVOLUTION TEMPORELLE DE LA CONCENTRATION DES PIGMENTS TOTAUX DES CULTURES BATCH DE <i>P.KESSLERI</i> UTEX2229 CULTIVEE DANS UN PBR AIR-LIFT (1L) EXPOSE A 250 μ MOL.M ⁻² .S ⁻¹ PENDANT DEUX SEMAINES DE CARENCE BRUSQUE EN AZOTE POUR DEUX DIFFERENTES CONCENTRATIONS INITIALES DE BIOMASSE SECHE ($CX_0 = 0.2$ ET 0.76 KG.M ⁻³)	149
FIGURE IV-5 EVOLUTION TEMPORELLE DE LA CONCENTRATION DE CHLOROPHYLLE A (<i>CHL A</i>), DE CAROTENOÏDES (<i>PPC</i>) ET DE L'INDICE DE STRESS (<i>IS</i>) DES CULTURES BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 CULTIVEE DANS UN PBR AIR-LIFT (1L) EXPOSE A 250 μ MOL.M ⁻² .S ⁻¹ PENDANT DEUX SEMAINES DE CARENCE BRUSQUE EN AZOTE. A) $CX_0 = 0.2$ KG.M ⁻³ , B) $CX_0 = 0.76$ KG.M ⁻³	149
FIGURE IV-6 EVOLUTION TEMPORELLE DE LA CONCENTRATION DE BIOMASSE SECHE DES CULTURES BATCH DE <i>P.KESSLERI</i> UTEX2229 CULTIVEE DANS UN PBR AIR-LIFT (1L) EXPOSE A 250 μ MOL.M ⁻² .S ⁻¹ PENDANT DEUX SEMAINES DE CARENCE BRUSQUE EN AZOTE, ET AVEC DEUX CONCENTRATIONS INITIALES EN BIOMASSE SECHE DIFFERENTES ($CX_0 = 0.76$ ET 0.2 KG.M ⁻³).....	151
FIGURE IV-7 EVOLUTION TEMPORELLE DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES CULTURES BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 DANS DES CONDITIONS DE CARENCE SOUDAIN EN AZOTE. A) $CX_0 = 0.2$ KG.M ⁻³ , B) $CX_0 = 0.76$ KG.M ⁻³	154
FIGURE IV-8 EVOLUTION TEMPORELLE DE LA CONCENTRATION DES SUCRES TOTAUX, DES PROTEINES, ET DES LIPIDES TOTAUX DES CULTURES BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 DANS DES CONDITIONS DE CARENCE SOUDAIN EN AZOTE. A) $CX_0 = 0.2$ KG.M ⁻³ , B) $CX_0 = 0.76$ KG.M ⁻³	155

FIGURE IV-9 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION INITIALE EN BIOMASSE SECHE SUR LA CINETIQUE D'ACCUMULATION DES TRIGLYCERIDES DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 DEPOURVUE D'AZOTE	158
FIGURE IV-10 ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA PRODUCTIVITE SURFACIQUE DES TAG DES CULTURES BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 CULTIVEES EN PBR AIR-LIFT (1L) SOUS DES CONDITIONS DE CARENCE BRUSQUE EN AZOTE POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS INITIALES EN BIOMASSE SECHE ($CX_0 = 0.2$ ET 0.76 kg.M^{-3}).....	160
FIGURE IV-11 ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA CONCENTRATION DES PIGMENTS TOTAUX DES CULTURES BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 LIMITEES PROGRESSIVEMENT EN AZOTE ($[N]_0 = 2.3 \text{ mM}$) ET EXPOSEES A DEUX DENSITES DIFFERENTES DE FLUX LUMINEUX INCIDENT ($q_0 = 250$ ET $160 \mu\text{MOL.M}^{-2}.\text{s}^{-1}$).....	161
FIGURE IV-12 ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION DES DIFFERENTS PIGMENTS DE LA CHAÎNE PHOTOSYNTHETIQUES DES CELLULES LIMITEE EN AZOTE (CARENCE PROGRESSIVE ($[N]_0 = 2.3 \text{ mM}$) CULTIVEES EN BATCH SOUS DEUX CONDITIONS DIFFERENTES D'ILLUMINATION. A) $q_0 = 160$, B) $q_0 = 250 \mu\text{MOL.M}^{-2}.\text{s}^{-1}$	162
FIGURE IV-13 CONSOMMATION DES NITRATES AU COURS DES EXPERIENCES DE CARENCE PROGRESSIVE EN AZOTE ($[N]_0 = 2.3 \text{ mM}$).....	163
FIGURE IV-14 ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA CROISSANCE DES CULTURES BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 LIMITEES PROGRESSIVEMENT EN AZOTE ($[N]_0 = 2.3 \text{ mM}$) ET EXPOSEES A DEUX DENSITES DIFFERENTES DE FLUX LUMINEUX INCIDENT ($q_0 = 250$ ET $160 \mu\text{MOL.M}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A) CONCENTRATION DE BIOMASSE SECHE B) CONCENTRATION DES CELLULES.....	165
FIGURE IV-15 ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES CULTURES BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 DANS DES CONDITIONS DE CARENCE PROGRESSIVE EN AZOTE $[N]_0 = 2.3 \text{ mM}$. A) $q_0 = 250 \mu\text{MOL.M}^{-2}.\text{s}^{-1}$ B) $q_0 = 160 \mu\text{MOL.M}^{-2}.\text{s}^{-1}$	168
FIGURE IV-16 ÉVOLUTION TEMPORELLE DE L'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE DES TRIGLYCERIDES DES CULTURES BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 CULTIVEES EN PBR AIR-LIFT (1L) SOUS DES CONDITIONS DE CARENCE PROGRESSIVE EN AZOTE ($[N]_0 = 2.3 \text{ mM}$) ET EXPOSEES A DEUX INTENSITES LUMINEUSES DIFFERENTES ($q_0 = 250$ ET $160 \mu\text{MOL.M}^{-2}.\text{s}^{-1}$).....	170
FIGURE IV-17 ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA PRODUCTIVITE SURFACIQUE DES TAG DES CULTURES BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 CULTIVEES EN PBR AIR-LIFT (1L) SOUS DES CONDITIONS DE CARENCE PROGRESSIVE EN AZOTE ($[N]_0 = 2.3 \text{ mM}$) ET EXPOSEES A DEUX INTENSITES LUMINEUSES DIFFERENTES ($q_0 = 250$ ET $160 \mu\text{MOL.M}^{-2}.\text{s}^{-1}$).....	172
FIGURE IV-18 ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA CONCENTRATION DES PIGMENTS ET DE BIOMASSE SECHE DES CULTURES CONTINUES DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 LIMITEES EN AZOTE.....	176
FIGURE IV-19 DETERMINATION DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES CULTURES CONTINUES DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 EXPOSEE A $q_0 = 250 \mu\text{MOL.M}^{-2}.\text{s}^{-1}$ SOUS DES CONDITIONS DE CROISSANCE OPTIMALES ET DE LIMITATION EN AZOTE. A NOTER QUE LE CONTENU DES DIFFERENTS CONSTITUANTS CELLULAIRES EST DETERMINE EN REGIME STATIONNAIRE POUR CHAQUE CONCENTRATION D'AZOTE TESTEE.	178
FIGURE IV-20 ÉVOLUTION DU CONTENU ET DE LA PRODUCTIVITE SURFACIQUE DES TAG DES CULTURES CONTINUES ET STABLES DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 AVEC LA REDUCTION DE LA CONCENTRATION D'AZOTE DANS LE MILIEU DE CULTURE (LIMITATION EN AZOTE).....	180
FIGURE V-1 PROFIL D'IRRADIATION MOYENNE POUR UNE JOURNEE TYPE ANNUELLE A SAINT-NAZAIRE (DETERMINE GRACE AU LOGICIEL «METEONORM»)	187
FIGURE V-2 ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA CONCENTRATION DES PIGMENTS TOTAUX DE LA CULTURE BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 CARENCEE EN AZOTE SOUS DES CYCLES JOUR/NUIT (16:8 H)	189
FIGURE V-3 COMPARAISON DE L'ÉVOLUTION DES PIGMENTS TOTAUX DE LA CULTURE CARENCEE EN AZOTE DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 SOUS DES CONDITIONS D'ILLUMINATION CONTINUE ET SOUS DES CYCLES JOUR/NUIT (16:8 H).....	189
FIGURE V-4 ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA CONCENTRATION DE BIOMASSE SECHE DE LA CULTURE BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 CARENCEE EN AZOTE SOUS DES CYCLES JOUR/NUIT (16:8 H)	191
FIGURE V-5 ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE DE LA CULTURE BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 CARENCEE EN AZOTE SOUS DES CYCLES JOUR/NUIT (16:8 H)	191
FIGURE V-6 COMPARAISON DE L'ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE BIOMASSE SECHE DE LA CULTURE CARENCEE EN AZOTE DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 SOUS DES CONDITIONS D'ILLUMINATION CONTINUE ET SOUS DES CYCLES JOUR/NUIT (16:8 H)	193
FIGURE V-7 ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA CONCENTRATION DES PROTEINES, DES CARBOHYDRATES ET DES LIPIDES TOTAUX DE LA CULTURE BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 CARENCEE EN AZOTE SOUS DES CYCLES JOURS/NUITS (16:8 H)	196

LISTE DES FIGURES

FIGURE V-8 ÉVOLUTION DYNAMIQUE DES CONSTITUANTS CELLULAIRES EN CYCLES JOUR/NUIT D'UNE CULTURE BATCH DE <i>P. KESSLERI</i> CARENCEE EN AZOTE	197
FIGURE V-9 COMPARAISON DE LA CINETIQUE D'ACCUMULATION (A) ET DE PRODUCTION DES TAG (B) DE LA CULTURE CARENCEE EN AZOTE DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 SOUS DES CONDITIONS D'ILLUMINATION CONTINUE ET SOUS DES CYCLES JOUR/NUIT (16:8 H)	199

LISTES DES TABLEAUX

TABLEAU I-1 TENEUR ET PRODUCTIVITES EN LIPIDES DES DIFFERENTES ESPECES DES MICROALGUES (D'APRES MATA <i>ET AL.</i> , 2010).....	56
TABLEAU I-2 COMPARAISON ENTRE LE POTENTIEL DES MICROALGUES ET LES AUTRES MATIERES PREMIERES DE BIODIESEL (MATA <i>ET AL.</i> , 2010)	57
TABLEAU II-1 CLASSIFICATION TAXONOMIQUE DES GENRES DE MICROALGUES TESTES DANS CETTE ETUDE	69
TABLEAU II-2 NOM, ESPECE, ENVIRONNEMENT ET ORIGINE DE LA COLLECTION DE CULTURE DES SOUCHES CRIBLEES DANS CETTE ETUDE	70
TABLEAU II-3 COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE DES SOUCHES MARINES	79
TABLEAU II-4 COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE DES SOUCHES D'EAU DOUCE (GVV-Neo)	80
TABLEAU III-1 CONCENTRATIONS ET PRODUCTIVITES EN MATIERE SECHE A L'ETAT STATIONNAIRE DES SOUCHES CULTIVEES EN «EOSS-PBR»	105
TABLEAU III-2 COMPOSITION DES LIPIDES TOTAUX EN TAG EN CONDITIONS DE CARENCE EN AZOTE.....	108
TABLEAU III-3 PRODUCTIVITE VOLUMIQUE EN MATIERE SECHE ET EN TAG PENDANT UNE PERIODE DE 11 JOURS DE CULTURE DES SOUCHES EN CONDITIONS DE FAMINE AZOTEE (MODE BATCH)	110
TABLEAU III-4 PRODUCTIVITE VOLUMIQUE ET SURFACIQUE EN MATIERE SECHE DES SOUCHES EN REGIME STABLE.....	117
TABLEAU IV-1 PRODUCTIVITE VOLUMIQUE ET SURFACIQUE EN BIOMASSE SECHE DETERMINEES A L'ETAT STATIONNAIRE DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 CULTIVEE EN MODE CONTINU ($\tau P = 100$ h; $D = 0.01$ h ⁻¹) SOUS DIFFERENTES INTENSITES LUMINEUSES.....	139
TABLEAU IV-2 DETERMINATION DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES CULTURES STABLES DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 CULTIVEE EN MODE CONTINU ($\tau P = 100$ h; $D = 0.01$ h ⁻¹) SOUS DIFFERENTES INTENSITES LUMINEUSES. (NOTE: LA TENEUR DES DIFFERENTS COMPOSES EST EXPRIMEE EN POURCENTAGE PAR RAPPORT A LA BIOMASSE SECHE OBTENUE EN REGIME STATIONNAIRE)	140
TABLEAU IV-3 DETERMINATION DE LA TENEUR EN PIGMENTS DES CULTURES STABLES DE <i>P. KESSLERI</i> UTEX2229 CULTIVEE EN MODE CONTINU SOUS UNE INTENSITE LUMINEUSE ($q_0 = 430$ μ MOL.M ⁻² .S ⁻¹) ET SOUS DIFFERENTS TEMPS DE RESIDENCE τ (h) (NOTE: LA TENEUR EST EXPRIMEE EN POURCENTAGE PAR RAPPORT A LA BIOMASSE SECHE OBTENUE A L'ETAT STATIONNAIRE).....	144
TABLEAU IV-4 DETERMINATION DE LA PRODUCTIVITE VOLUMIQUE MOYENNE DE BIOMASSE SECHE ET LA TENEUR DES PIGMENTS EN REGIME STATIONNAIRE STABLE ATTEINT POUR CHAQUE CONCENTRATION D'AZOTE EXAMINEE	176

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Actuellement, le problème du réchauffement climatique ainsi que les craintes de l'épuisement des ressources pétrolières sont des préoccupations majeures mondiales. Le changement climatique est en partie attribué à l'accumulation des gaz à effet de serre due principalement aux émissions de gaz comme le gaz carbonique (CO_2), associées à l'utilisation des combustibles fossiles qui représentent aujourd'hui 88% de la consommation énergétique mondiale. Selon de nombreux analystes, en raison de la consommation actuelle élevée, les réserves mondiales en pétrole dont les combustibles fossiles sont dérivés (essence, diesel) seront fortement diminuées dans 50 à 100 ans (Rodolfi *et al.*, 2009) aboutissant à une augmentation des prix de combustibles fossiles. Face à cet avenir annoncé et à la dépendance de la société actuelle aux combustibles fossiles, en particulier dans le secteur du transport qui représente 50 % à 70% de la consommation de carburants liquides, des efforts de recherches ont été lancés dans le domaine des énergies renouvelables afin notamment de développer des biocarburants alternatifs et renouvelables ayant le potentiel de remplacer tout ou partie les combustibles fossiles. Initialement, il a été envisagé de produire des biocombustibles (bioéthanol et dérivés chimiques des huiles) à partir de ressources agricoles. Toutefois, l'application au domaine de l'énergie amène à une production massive au détriment de l'alimentation humaine. Ceci a mené à lancer des recherches pour développer des carburants dits de deuxième génération (biomasse ligno-cellulosique) et de troisième génération faisant appel à l'usage des microalgues.

Les microalgues apparaissent en effet comme une source végétale prometteuse pour la production de biocarburants et notamment de biodiesel (Chisti, 2007; Hu *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2010a; Elsey *et al.*, 2007 et Li *et al.*, 2008c). Certaines espèces ont en effet le potentiel d'accumuler des concentrations élevées en lipides et notamment sous formes de triglycérides (Mata *et al.*, 2010) qui constituent la matière première adaptée à la réalisation de biodiesel. Du fait de rendements à l'hectare en théorie élevés, les microalgues s'affichent également comme une ressource renouvelable pouvant répondre aux besoins mondiaux. Le biodiesel étant dérivé de la biomasse microalgale obtenue par photosynthèse, il est de plus quasi-neutre en carbone (Brennan and Owende, 2010). Enfin, du fait de leur plasticité métabolique importante, il est également possible de stimuler chez les microalgues l'accumulation intracellulaire des triglycérides en changeant les conditions de cultures, en appliquant par exemple un simple stress nutritif, comme la carence en azote qui est le plus connu (Hu *et al.*, 2008).

Le biodiesel issu des microalgues apparaît donc comme une alternative pertinente, car durable aux combustibles fossiles. Cependant, cette technologie doit encore surmonter un certain nombre d'obstacles (Hannon *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Rawat *et al.*, 2013; et Chisti, 2013) avant d'être déployée à grande échelle pour rivaliser sur le marché du carburant. Le principal défi est en effet l'exploitation commerciale de biodiesel microalgal (Chisti, 2008; Hannon *et al.*, 2010 et Chisti, 2013). Selon des estimations de coûts en 2009, un baril de biocarburants à base d'huile microalgale coûte entre 300-2600 \$ (US) en utilisant la technologie actuelle alors qu'un baril de pétrole coûte 40-80 \$ (Alabi *et al.*, 2009). Des améliorations voire ruptures sont donc nécessaires, et ce à chaque étape de la chaîne de production de biodiesel, ce qui inclue la sélection de souches performantes, l'optimisation des conditions de culture pour la production de lipides d'intérêts, et les différents procédés allant de la culture à l'extraction des lipides et leur conversion en biodiesel.

Le présent travail s'intègre dans cette démarche globale, en se focalisant sur la première étape dans le développement du processus de production de biodiesel, à savoir l'augmentation de la production en triglycérides, par notamment deux étapes clés: la sélection d'une souche performante et l'optimisation des conditions de cultures. Ce manuscrit s'articule pour cela en cinq chapitres qui aborderont successivement la recherche et la caractérisation de souches d'intérêts pour la production de biodiesel, puis l'optimisation de la croissance et de la production des lipides d'intérêts en photobioréacteurs.

Le premier chapitre est une étude bibliographique qui traitera le potentiel ainsi que les défis de la production de biodiesel à partir des microalgues. Il donnera une vue globale du métabolisme cellulaire et une description détaillée du métabolisme lipidique. Plusieurs systèmes et modes de cultures employés dans le domaine des microalgues seront présentés. Cela amènera à introduire les problématiques de recherche qui feront l'objet des études des chapitres suivants.

Le deuxième chapitre porte sur le développement et la mise en place d'une méthodologie robuste de criblage de souches de microalgues pour la production de biodiesel, afin de sélectionner les souches les plus intéressantes. Les différentes souches examinées dans cette étude avec leurs milieux de culture appropriés ainsi que les différents photobioréacteurs utilisés pour les cultiver seront décrits dans ce chapitre. Les différentes méthodes et protocoles adoptés pour suivre la culture et caractériser les souches (croissance, productivité en biomasse, productivité en lipides (TAG), profil des acides gras, fragilité cellulaire,...) seront aussi détaillés.

Ensuite, le troisième chapitre est consacré à la sélection et la caractérisation des souches. Dans ce chapitre, une souche particulièrement intéressante sera sélectionnée parmi les différentes souches prometteuses criblées.

Le quatrième chapitre de ce mémoire est dédié à optimiser la croissance ainsi que la production des lipides (TAG) en photobioréacteurs pour la souche sélectionnée dans le chapitre III. Cela se réalise dans un premier temps sous des conditions d'illumination continue.

Enfin, le dernier chapitre de ce manuscrit vise à examiner le comportement physiologique de la souche sélectionnée pendant des cycles jour/nuit, sous des conditions de carence soudaine en azote afin de mener à l'accumulation de lipides d'intérêts dans des conditions proches des conditions réelles de production solaire.

Chapitre I : Culture des microalgues et application à la production de biodiesel

Résumé:

Ce chapitre introduit la problématique générale associée à la production de biodiesel à partir des microalgues. Il présentera une vue globale du métabolisme cellulaire et une description détaillée du métabolisme lipidique. Plusieurs systèmes et modes de cultures utilisés dans le domaine des microalgues seront présentés. De plus, les facteurs jouant sur l'accumulation intracellulaire des lipides seront aussi discutés.

1 Généralités sur les microalgues

Comme son nom l'indique, les microalgues sont des organismes microscopiques, non visibles à l'œil nu. Leur taille est de l'ordre de quelques micromètres. Leur existence est révélée lors de leurs proliférations massives (blooms) dues à des conditions favorables formant parfois des " eaux colorées " en rouge, brun ou vert.

Une microalgue est un organisme unicellulaire et eucaryote délimitée par une membrane plasmique, qui contient au sein de son cytoplasme de nombreux organites nécessaires à son fonctionnement et à son métabolisme: chloroplastes, amyloplastes, oléoplastes, mitochondries et un noyau entouré de son enveloppe.

C'est un microorganisme photosynthétique, sa croissance se faisant grâce au phénomène de la photosynthèse. Les microalgues sont dépourvues de racines, de tige et de feuilles, mais elles possèdent de la chlorophylle ainsi que d'autres pigments accessoires pour réaliser la photosynthèse. Elles se caractérisent donc par leur capacité à utiliser la lumière du soleil comme source d'énergie pour fixer le dioxyde de carbone. Par ce processus, elles convertissent l'énergie solaire, l'eau ainsi que le dioxyde de carbone en biomasse. Du fait de leur activité photosynthétique intéressante, les microalgues sont aujourd'hui décrites comme des usines cellulaires qui utilisent comme matières premières l'énergie solaire et le carbone minéral pour produire des biocarburants potentiels, des aliments et des molécules bioactives à haute valeur ajoutée (Chisti, 2007).

Dans la nature, il existe une biodiversité très vaste des microalgues. On estime entre 200000 et plusieurs millions le nombre d'espèces existantes, ce qui est très supérieur aux 250000 espèces de plantes supérieures recensées. Une telle diversité non exploitée constitue un réel potentiel pour la recherche et l'industrie.

Les microalgues constituent avec les cyanobactéries, le phytoplancton aquatique et marin. Au cours de leur évolution, celles-ci se sont habituées à des conditions environnementales variées (océans, eaux douces, eaux saumâtres) et elles colonisent aujourd'hui la quasi-totalité de la surface terrestre puisqu'on en trouve même dans des environnements hostiles à la vie tels que les déserts ou les glaciers.

En réalité, les microalgues sont des micro-organismes composés d'une seule cellule contenant deux « centrales énergétiques » essentielles à leur croissance: le chloroplaste qui est le siège de la photosynthèse et les mitochondries qui sont les sièges de la respiration. Chacun de ces deux processus sera détaillé dans l'ensemble des paragraphes suivants afin de bien élucider le métabolisme entier des microalgues.

2 Classification des microalgues

Les microalgues constituent un groupe extrêmement diversifié, estimé à environ 300 000 espèces dont 40000 ont été déjà identifiées (Hu *et al.*, 2008). Elles ne sont pas regroupées en fonction de leur métabolisme énergétique ou encore en fonction de leur habileté à synthétiser les métabolites nécessaires, mais plutôt en fonction de leurs propriétés morphologiques, biochimiques et génétiques. Il existe donc différentes classes taxonomiques dont les principales sont: les bacillariophycées (diatomées), les dinophycées (dinoflagellées), les prymnésiohycées, les xanthophycées (microalgues vert-jaune), les rhodophycées (microalgues rouges), les chlorophycées (microalgues vertes), les chrysophycées (microalgues d'or), les phaeophycées (microalgues brunes) et les Eustigmatophycées (pico-plancton).

- Les bacillariophycées (diatomées)

Les diatomées sont considérées comme majoritaires, car elles représentent souvent le groupe dominant parmi les populations de phytoplancton et sont extrêmement répandues dans tous les types d'habitat. Elles se distinguent des autres groupes par leur carapace de silicium et leur diploïdie. Comme toutes les microalgues, les diatomées sont unicellulaires. Elles mesurent de 2 μm à 1 mm. Elles emmagasinent leurs réserves sous forme de chrysolaminarine, un polysaccharide, ainsi que sous forme d'huiles. Elles sont d'ailleurs reconnues pour leur contenu en acides gras et pendant plusieurs années, les scientifiques ont cru que les lipides représentaient le seul composé de réserve. Elles sont responsables de 20 % de la production carbonée océanique (Kroth *et al.*, 2008).

- Les dinophycées (dinoflagellées)

Les dinoflagellés sont des microalgues unicellulaires de couleur rouge-orangé et de taille moyenne ou petite, entre 3 et 50 microns. Leurs deux flagelles leur permettent d'effectuer des déplacements tournoyants et des migrations verticales. Dans le cas des dinoflagellés de métabolisme hétérotrophe, les flagelles deviennent alors un moyen leur permettant de capturer les matières organiques qui se trouvent dans leur environnement. Cette classe regroupe beaucoup de microalgues toxiques. Ainsi, trois espèces principales de dinoflagellés sont redoutées: *Dinophysis* (50 microns) qui contient des toxines (DSP: *Diarrhetic Shellfish Poison*) responsables des troubles gastro-intestinaux chez l'homme, *Alexandrium* (de 20 à 25 microns) qui produit des toxines paralysantes (PSP: *Paralytic*

Shellfish Poison) et *Gymnodinium* (entre 20 et 25 microns) qui libère des toxines ayant une influence directe sur la faune marine, comme une perte d'appétit.

- Les prymnésiophycées (les haptophycées)

Les microalgues de ce groupe sont caractérisées par la présence d'un appendice filamenteux nommé l'haptonème entre deux flagelles lisses. Ce dernier contient des microtubules, dont la taille varie selon l'espèce, et qui permettrait l'adhésion à un substrat, le déplacement voire la capture de proies. Parmi les genres appartenant à cette famille on peut citer *Chrysochromulina*.

- Les rhodophycées (microalgues rouges)

Les rhodophycées se distinguent par leurs plastes appelés «rhodoplastes» colorés en rouge par les phycobiliprotéines (pigments surnuméraires), la présence des synapses entre les cellules et d'amidon floridéen. Ces algues sont retrouvées plutôt dans les eaux salées (ex., *Porphyridium*) et très rarement dans les eaux douces. Cette classe ne comprend aucune algue de métabolisme hétérotrophe et la plupart d'entre elles sont photoautotrophes ou photoorganotrophes. Bien que certaines espèces contiennent des acides gras, leur utilisation pour produire du biodiesel en absence de lumière ne semble pas envisageable.

- Les chlorophycées (microalgues vertes)

Les chlorophycées sont retrouvées dans tous les types d'habitat. L'amidon et l'huile constituent leurs principales réserves énergétiques. Parmi ce groupe, plusieurs microalgues possèdent un métabolisme photoautotrophe, photohétérotrophe et chemohétérotrophe. Une des espèces les plus répandues est *Chlorella vulgaris*. Cette espèce est très intéressante pour la production de biodiesel en raison de son contenu intéressant en acides gras. On trouve également *Chlamydomonas reinhardtii* qui est une espèce modèle dans de nombreuses études de laboratoire.

- Les Eustigmatophyceae

Ce groupe constitue une petite division des microalgues, considérée comme une lignée distincte (Patterson *et al.*, 1994 ; Adl *et al.*, 2005). Ces microalgues se distinguent par leur coloration vert-jaunâtre due à leur composition spécifique en pigments. En effet, elles contiennent des chlorophylles de type a, sans chlorophylle b et c, et des principaux pigments accessoires comme les violaxanthine et vaucheriaxanthin.

Le nombre d'espèces appartenant à cette classe diffère selon les sources d'information. Selon Přibyl *et al.*, (2012), la classe comporte environ 20 espèces regroupées dans 11 genres. Tous les membres sont des microalgues unicellulaires avec un ou plusieurs plastes pariétaux de couleur vert-jaunâtre, vivant individuellement ou en colonies.

Leur environnement d'origine est le sol et l'eau douce. Seul le genre *Nannochloropsis* renferme des espèces marines caractérisées par leurs petites tailles (2-4 μm). La plupart des cellules des eustigmatophytes ont une forme coccoïde. C'est le cas de *Nannochloropsis*. Par contre, il existe également d'autres morphologies cellulaires (ex. ovale, ellipsoïdale ou irrégulière).

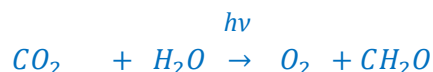
3 La photosynthèse

Le terme photosynthèse signifie littéralement « synthèse réalisée à l'aide de l'énergie lumineuse ». On désigne donc par ce terme la capacité de certains organismes à assimiler le carbone inorganique (comme le dioxyde de carbone atmosphérique, ou ses différentes formes dissoutes pour les organismes aquatiques) à la lumière pour le convertir en matière organique tout en dégageant de l'oxygène.

Les microalgues sont des cellules végétales. Leur croissance est ainsi basée sur le même principe que la photosynthèse des plantes supérieures. Elles ont donc la capacité de se développer sur milieu entièrement minéral. En milieu aqueux, la lumière leur permet alors de croître par absorption des minéraux nécessaires (nitrates, phosphates notamment) et du carbone inorganique environnant (les différentes formes de carbone dissous).

Chez ces microorganismes, la photosynthèse a lieu dans les chloroplastes, plus spécifiquement au niveau des membranes des thylacoïdes à l'interface du lumen et du stroma où se trouvent les complexes pigmentaires qui sont à la base du processus photosynthétique. En effet, l'énergie lumineuse est captée par ces pigments et transférée par la suite aux photosystèmes II (PSII) et I (PSI) et qui transforment à leur tour l'énergie lumineuse reçue en potentiel d'oxydoréduction permettant la synthèse des molécules

énergétiques comme le pouvoir réducteur NADPH,H⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) et l'ATP (Adénosine Tri Phosphate) qui constituent l'énergie chimique utilisée par la cellule photosynthétique pour fixer le carbone inorganique (dioxyde de carbone, CO₂) et le convertir en molécules carbonées de type glucide. Le processus global de la photosynthèse peut être représenté de façon simplifiée par l'équation suivante (Équation I-1):



Équation I-1

Cette équation globalise en réalité beaucoup de phénomènes. Le processus global est en effet un ensemble de nombreuses réactions biochimiques liées. En fonction de leur dépendance de la lumière, on divise usuellement la photosynthèse en deux phases (Figure I.1) qui se déroulent entièrement dans les chloroplastes chez les microalgues (Iverson, 2006). La première phase est dite claire, car dépendante de la lumière. Au cours de cette phase, des électrons issus de la photolyse de l'eau sont transportés dans la chaîne photosynthétique pour produire de l'ATP et du pouvoir réducteur sous forme de NADPH, H⁺. Pendant cette phase, les réactions ont lieu dans la membrane des thylacoïdes. C'est pendant cette phase que l'énergie lumineuse captée est convertie en énergie chimique utilisée ensuite par la cellule au cours des réactions sombres pour synthétiser ses composants biochimiques. Plus de détails et d'informations sont disponibles dans les travaux d'Allen *et al* 2010 (Allen *et al.*, 2011). La phase sombre est entièrement enzymatique (indépendante de la lumière). L'ATP et le NADPH, H⁺, déjà produits pendant la phase claire sont ainsi utilisés pour la conversion de dioxyde de carbone (CO₂) et de l'eau (H₂O) en glucides. Les réactions de chaque phase de ce processus, sont détaillées ci-après.

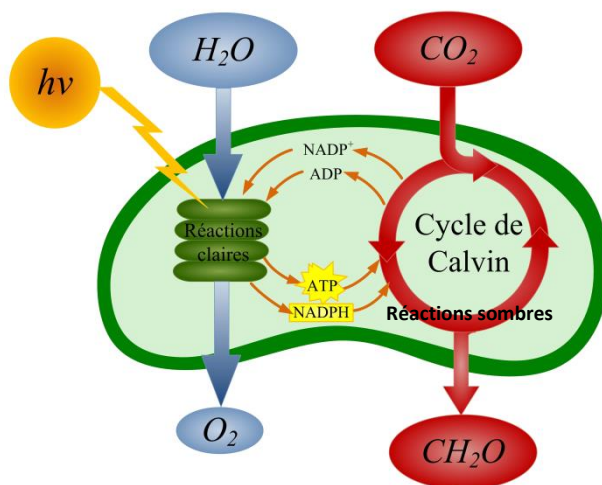


Figure I-1 Vue Schématique du processus global de la photosynthèse

3.1- Phase claire

Comme déjà cité, les réactions de cette phase ont lieu au niveau de la membrane interne des thylacoïdes où se trouve l'appareil photosynthétique qui constitue ce qu'on appelle «la chaîne photosynthétique» schématisée dans la Figure I-2.

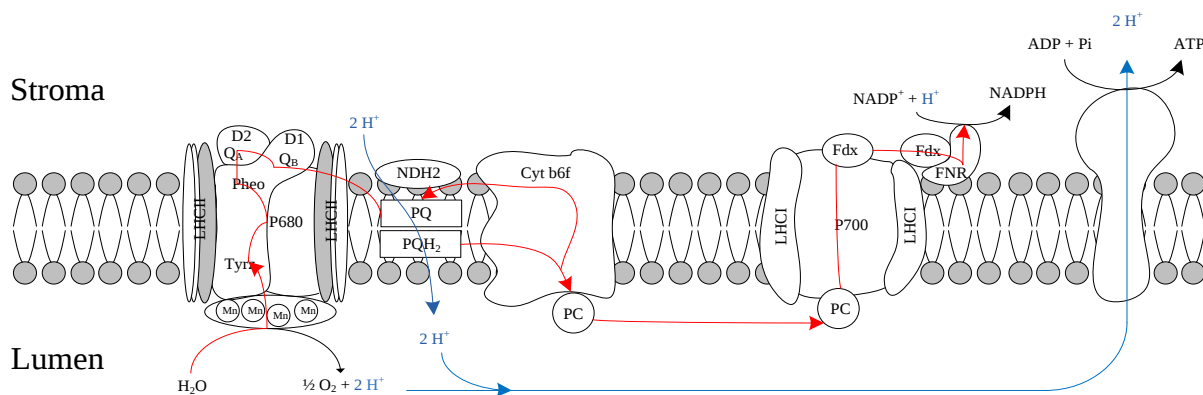


Figure I-2 Représentation schématique de la chaîne photosynthétique des membranes thylacoïdales (Degreen, 2009)

3.1-A. Description de l'appareil photosynthétique

Comme le montre la Figure I-2, la chaîne photosynthétique est constituée d'un réseau de complexes protéiques (photosystèmes I et II, cytochrome b_6f , et NADH déshydrogénase de type 2) permettant à un réseau d'accepteurs et de donneurs d'électrons de transférer l'énergie chimique créée au niveau du photosystème II (PSII) à un accepteur final d'électrons, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH, H^+ ou pouvoir réducteur). Chaque complexe a son rôle approprié et spécifique. Ainsi, le siège de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique est le photosystème II de la chaîne photosynthétique. Il est constitué d'une antenne collectrice de lumière appelée LHCII (*Light Harvesting Complex II*) qui est composée de pigments (chlorophylle a et b, et caroténoïdes de protection (*PPC, Photo-Protective caroténoïdes*)) qui captent l'énergie lumineuse dans le domaine du visible, également appelées *Photosynthetically Active Radiations* (PAR, $400\text{nm} < \lambda < 700\text{ nm}$). Le cœur du photosystème est relié à deux protéines D1 et D2 auxquelles est lié le donneur primaire d'électrons appelé P680 (centre réactionnel responsable de « l'acte photochimique »).

3.1-B. Conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique

Le premier acte photochimique s'effectue au niveau du photosystème II. Tout d'abord, la capture de la lumière au niveau de l'antenne collectrice va entraîner l'excitation des molécules pigmentaires. L'état énergétique excité d'une molécule pigmentaire est appelé « exciton » par opposition à une molécule non excitée qui reste à son état énergétique dit « fondamental ». Ce changement d'état intervient au niveau du système d'électrons π présent dans les cycles aromatiques des molécules pigmentaires lorsqu'elles sont soumises à une radiation. L'exciton est alors transféré, dans l'ensemble des molécules pigmentaires de l'antenne, d'un pigment à l'état excité à un autre à l'état fondamental. En effet, le centre réactionnel du PSII « P680 » renferme deux molécules de chlorophylles. Ce centre a la propriété d'expulser un électron à un accepteur. Cette expulsion ne peut se faire que si préalablement il a été soumis à une radiation lumineuse d'énergie équivalente à 680nm ($E=hc/\lambda$). Il en résulte qu'un photon absorbé de plus forte énergie (autrement dit de longueur d'onde inférieure) ne verra qu'une part de son énergie effectivement utilisée. L'énergie excédentaire sera alors dissipée sous forme de chaleur ou de fluorescence par l'antenne collectrice. Une fois transmis à la chaîne photosynthétique, un photon absorbé initialement à une longueur d'onde de 400nm (bleu) aura donc la même efficacité d'utilisation qu'un photon absorbé initialement à 680nm (rouge). Ceci explique pourquoi la notion de quanta (ou quantité de photons) est la donnée importante dans le processus de la

photosynthèse, d'où l'utilisation d'unités telles que la densité de flux de photons noté PFD (*photons flux density*) exprimée en $\mu\text{mol}_{hv} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.1-C. Transfert d'électrons et schéma en Z

L'énergie équivalente à un photon émis à 680nm (*PSII*) ou 700 nm (*PSI*) est transmise aux centres réactionnels (appelés P680 et P700, donneurs primaires d'électrons) par les protéines D1 et D2. Le centre réactionnel va être réduit par l'oxydation du complexe Z qui lui-même va entraîner l'oxydation d'une molécule d'eau. Théoriquement, il faut 8 photons pour oxyder deux molécules d'eau qui vont générer 4 protons, la libération d'une molécule d'oxygène et le transfert de quatre électrons au sein de la chaîne photosynthétique (Takache *et al.*, 2010). Le transfert d'électrons dans la chaîne photosynthétique se fait alors par un réseau d'accepteurs et de donneurs d'électrons via un mécanisme d'oxydoréduction. Le premier accepteur d'électron est la phéophytine (Pheo) qui après réduction cède un électron à une quinone A (Q_A) située sur la protéine D2 puis à une quinone B (Q_B) située sur la protéine D1. Les électrons sont ainsi transférés dans la chaîne photosynthétique par une série des réactions d'oxydoréductions suivant les potentiels croissants des différents accepteurs et donneurs (phéophytine, Q_A , Q_B , PQ, Cyt b_6/f , PC).

Lors de ce processus, la plastocyanine (PC) joue le rôle de donneur d'électrons pour le PSI (centre réactionnel nommé P700 car le transfert d'électrons s'effectue pour un état excité recevant une énergie équivalente d'une radiation de 700nm), dont l'excitation permet la réduction du centre réactionnel du PSI, qui catalyse à son tour la réduction de la ferrédoxine. Ce polypeptide cède les électrons à un intermédiaire, la Ferrédoxine NADP réductase (FNR), qui elle-même va céder ces électrons à l'accepteur final qui est le NADP^+ pour former le pouvoir réducteur $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Parallèlement, les protons générés par la photolyse de l'eau et la réduction du pool de plastoquinones vont entraîner l'apparition d'un gradient de protons entre le stroma (Chloroplaste) et le lumen (intérieur du thylacoïde). Cette force proton motrice va fournir l'énergie nécessaire à la synthèse de l'adénosine tri phosphate (ATP).

Il faut remarquer que dans ce processus, les deux photosystèmes servent à diminuer le potentiel d'oxydoréduction des centres réactionnels et ainsi permettent le transport des électrons par oxydoréductions successives. L'ensemble de ces réactions de transfert d'électrons peuvent être reportées sur un graphique représentant les différents couples rédox actifs lors du transport acyclique, appelé schéma en Z (Figure I-3). Comme le montre cette figure, il existe un autre type de transfert d'électrons au sein de la chaîne photosynthétique nommé le transfert cyclique.

Contrairement au transfert acyclique (schéma en Z) qui correspond au transfert des électrons entre l'eau et le NADP^+ tout en menant à la synthèse d'ATP et de NADPH, le transfert cyclique des électrons correspond à la remobilisation des électrons acceptés par la ferrédoxine sur le complexe cytochrome b_6/f . Les électrons sont ainsi redirigés vers le réservoir de plastoquinones au cours d'un processus qui met en jeu le cytochrome b_6/f via un cytochrome qui n'intervient que dans le transport cyclique des électrons. Cela permet d'augmenter au détriment de la synthèse de NADPH, H^+ , la force proton-motrice qui va engendrer la synthèse d'ATP au niveau du canal à protons. En effet, la réduction des plastoquinones (PQ) entraîne le transfert de protons à travers la membrane et alimente le canal à protons. Ce transfert cyclique amène au final à la synthèse d'ATP sans pour autant créer de pouvoir réducteur. Ce mécanisme permet notamment à la cellule d'ajuster les quantités relatives d'ATP et de NADPH, H^+ synthétisées lors de la photosynthèse en fonction de ses besoins physiologiques.

Les deux molécules énergétiques (l'ATP et le NADPH, H^+) sont ensuite utilisées pour la synthèse des molécules organiques comme les sucres, les lipides et les protéines grâce aux réactions sombres de la photosynthèse. Ces réactions métaboliques seront détaillées dans le paragraphe suivant. A noter que les vitesses spécifiques de production de ces deux molécules énergétiques affectent fortement le métabolisme et la croissance cellulaire.

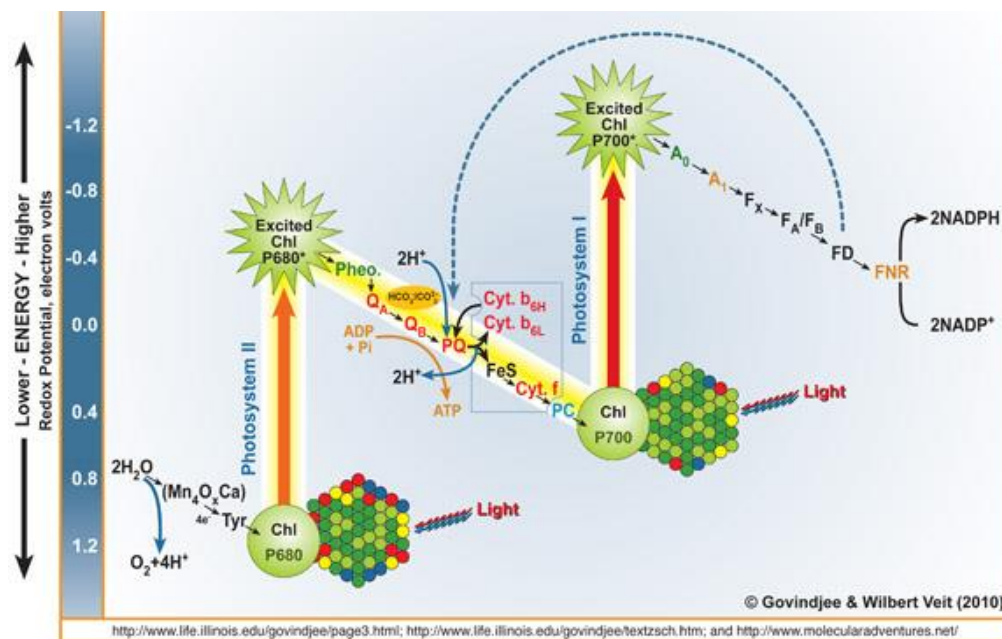


Figure I-3 Transfert des électrons le long de la chaîne photosynthétique (Schéma en Z et transfert cyclique) (Orrand Govindjee, 2013)

3.2- Phase sombre (métabolisme intrinsèque du chloroplaste)

3.2-A. Cycle de Calvin

Le cycle de Calvin (phase sombre) se déroule au niveau du stroma des chloroplastes et comprend 13 réactions catalysées par 11 enzymes. Cette phase est entièrement enzymatique et indépendante de la lumière. Au cours de celle-ci, l'ATP et le NADPH, H^+ sont utilisées pour la conversion du dioxyde de carbone et de l'eau en molécules utilisées par la cellule pour la synthèse de nouveaux composés ou comme réserves (Falkowski et Raven, 2007). C'est la phase d'assimilation du gaz carbonique.

Du fait de la nature très réduite du CO_2 , les réactions sombres du cycle de Calvin consomment environ 95% du NADPH, H^+ et plus de 60% de l'ATP synthétisées lors des réactions photochimiques (Falkowski et Raven, 2007). L'énergie de ces transporteurs à courte vie est donc principalement utilisée pour transformer le dioxyde de carbone en composés organiques qui peuvent être ensuite utilisés par l'organisme. Cet ensemble de

réactions est aussi nommé « fixation du carbone ». L'ensemble des réactions de cycle de Calvin est représenté par la Figure I-4.

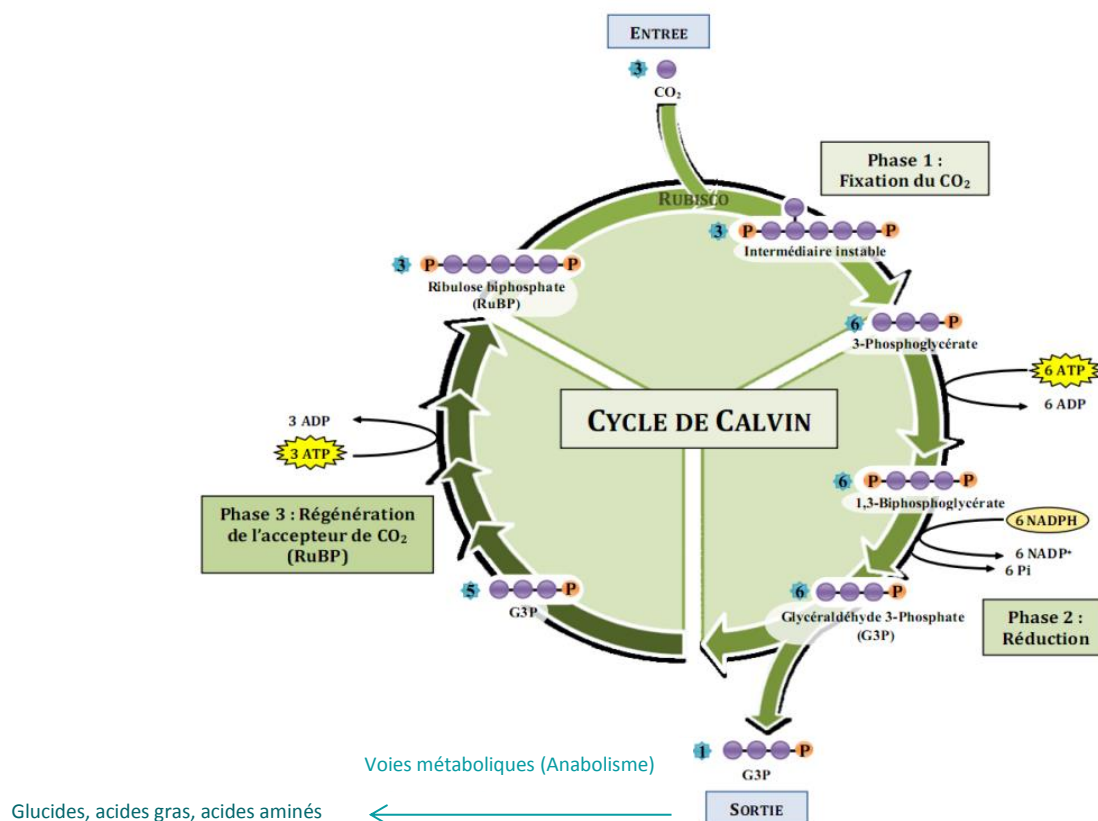
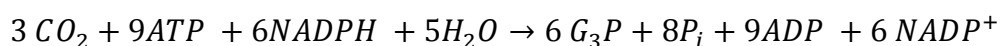


Figure I-4 Représentation schématique des réactions du cycle de Calvin (<http://www.cours-pharmacie.com/biologie-vegetale/la-photosynthese.html>)

Comme le montre le schéma de la Figure I-4, l'assimilation du gaz carbonique se fait en trois phases. La première est dédiée à la fixation du carbone inorganique, durant laquelle le CO_2 se fixe sur le ribulose-biphosphate (RuBP), une molécule de 5 carbones, grâce à une enzyme clé nommée Ribulose biphosphate Carboxylase/Oxygénase (Rubisco) conduisant à la formation d'une molécule instable à 6 atomes de carbones qui donnera rapidement deux molécules de 3-phosphoglycérate. Ensuite, la deuxième phase est une réduction du carbone fixé. Elle correspond à la réduction du 3-phosphoglycérate qui sera tout d'abord phosphorylé par l'ATP pour donner l'acide biphospho-glycérique qui sera lui-même réduit par le NADPH, H^+ pour former le 3-phosphoglycéraldéhyde (G3P). En effet, le G3P est un sucre constitué de 3 atomes de carbones et il est à l'origine de la synthèse des acides gras

(Lipides), acides aminés (protéines) et glucides et à la régénération de l'accepteur de CO₂ (ribulose 5-phosphate). La troisième phase est celle de la régénération de l'accepteur de CO₂. Au final, un sixième de G3P formé sera exporté vers le cytoplasme de la cellule, où il servira comme un composant de base pour la synthèse des glucides en proportion élevée, aussi bien que pour la synthèse des acides gras et acides aminés mais en plus faible proportion. Les cinq sixièmes restant seront utilisés pour poursuivre le cycle. A noter que la reformation du RuBP, qui sera utilisée pour fixer le CO₂, se fera en plusieurs étapes et nécessitera l'utilisation d'ATP. L'ensemble de ces réactions peut être présenté par l'équation bilan suivante:



Équation I-2

Comme le montre cette équation (Équation I-2), la fixation d'une molécule de CO₂ nécessite la consommation de deux molécules de NADPH, H⁺ et trois molécules d'ATP pour produire deux molécules de 3-phosphoglycérate.

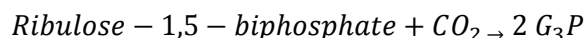
3.2-B. β -Carboxylation

En plus du cycle de Calvin, il existe une autre voie qui fixe le carbone inorganique chez les microalgues, c'est la voie de « β -Carboxylation». Cette voie est indépendante de la lumière et ne fixe qu'un faible pourcentage du carbone. Comme son nom suggère, il s'agit d'une carboxylation d'un carbone en position β d'une molécule de 3 atomes de carbone. L'intérêt de cette voie pour le métabolisme cellulaire se manifeste par la synthèse des intermédiaires essentiels à la croissance cellulaire qui ne sont pas produits par le Cycle de Calvin, comme les acides aminés essentiels, purines, pyrimidine et tétrapyrroles (Yang *et al.*, 2000).

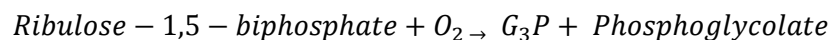
4 Photo-respiration

La Ribulose biphosphate Carboxylase/Oxygénase (Rubisco) est l'enzyme-clé des réactions du cycle de Calvin en catalysant la fixation de carbone inorganique. Cependant, cette enzyme possède deux activités différentes, et elle est capable tout en dépendant des

conditions de culture de catalyser la carboxylation (Équation I-3) ainsi que l'oxygénation de la molécule Ribulose-1.5-biphosphate (Équation I-4) via les équations suivantes :



Équation I-3



Équation I-4

L'existence de ce phénomène chez les microalgues s'explique par la faible affinité du site actif de l'enzyme Rubisco pour les molécules de CO₂. La photorespiration sera donc inhibée en présence d'une forte quantité de CO₂ ainsi d'une activité photosynthétique soutenue. Ainsi, la photorespiration sera négligée pour des concentrations de CO₂ supérieures à 5% (CO₂/Air) dans le milieu (Yang *et al.*, 2000). En général, on considère donc que ce phénomène n'est pas dominant même en quantité modérée de CO₂ dans le milieu de culture du fait de la capacité de la cellule à stocker et accumuler le carbone (Falkowski et Raven, 2007).

5 La Respiration (métabolisme intrinsèque des mitochondries)

Les microalgues ont une activité respiratoire qui a lieu dans les mitochondries. Pendant la respiration, la cellule catabolise les matières organiques (glucides, lipides, acides aminés) pour synthétiser de l'énergie nécessaire au maintien de la croissance. Contrairement à ce qui se passe durant la photosynthèse, à ce stade, la cellule consomme du dioxygène et libère du CO₂. Il s'agit donc de «phosphorylation oxydative» qui est génératrice d'énergie sous forme d'ATP, et du «cycle de Krebs» qui libère du dioxyde de carbone.

La phosphorylation oxydative s'effectue au niveau de la membrane interne des mitochondries, où se trouve la chaîne de transport des électrons qu'on appelle «chaîne respiratoire» représentée par la Figure I-5. Cette dernière a pour fonction principale la synthèse d'ATP à partir de l'oxydation de pouvoir réducteur (NADPH, H⁺) ou de succinate qui fournissent les électrons nécessaires à la chaîne de transporteurs d'électrons.

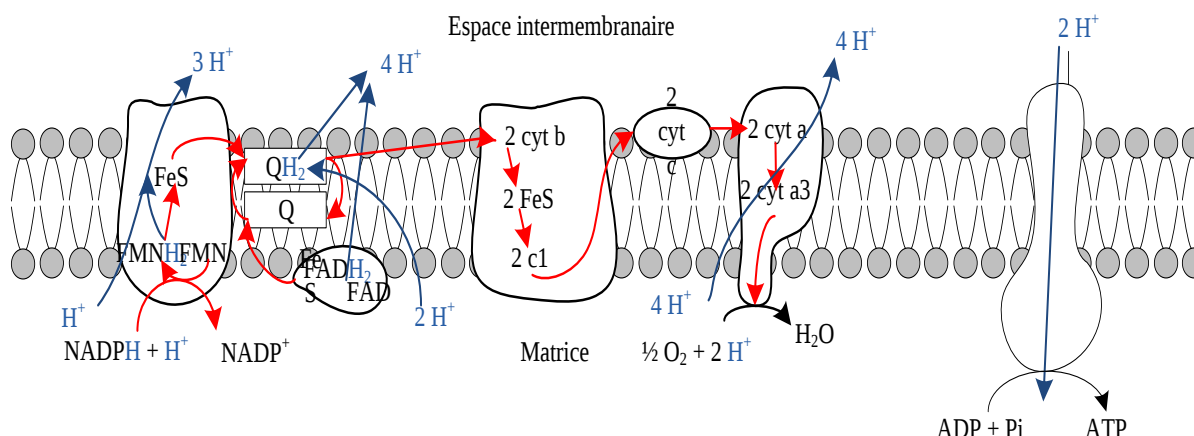


Figure I-5 Représentation schématique de la chaîne respiratoire des mitochondries (Degrenne, 2009)

Comme le montre la Figure I-5, la chaîne de transport des électrons qui existe au niveau des crêtes des membranes mitochondriales, est constituée de quatre complexes protéiques: le complexe (I) NADH-coenzyme Q oxydoréductase, le complexe (II) succinate-coenzyme Q oxydoréductase, le complexe (III) coenzyme Q-cytochrome C oxydoréductase et le complexe (IV) cytochrome C oxydase. À noter que les deux donneurs d'électrons sont le pouvoir réducteur NADPH qui sera oxydé par le complexe (I) et le FADH₂ qui sera oxydé par le complexe (II) (figure I-6). Le complexe (II) joue un rôle important puisque c'est par lui qu'entrent les électrons du FADH₂ issu du cycle de Krebs. Il ne contribue cependant pas à l'expulsion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire du fait d'une faible différence de potentiel de réduction entre les donneurs et les accepteurs d'électrons. Le coenzyme Q sous sa forme réduite, cède ses électrons à travers le complexe (III) au cytochrome c (un autre transporteur mobile de la chaîne respiratoire) tout en provoquant l'exportation d'un proton de la matrice vers l'espace intermembranaire. À son tour le cytochrome c amène ces électrons au complexe (IV) qui catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Parallèlement, le complexe IV expulse 2 protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Cette ré-oxydation s'accompagne donc de la création d'un gradient transmembranaire de protons. Ce gradient est une forme de stockage de l'énergie contenue dans les coenzymes, qui dérive elle-même de l'énergie contenue dans les molécules dégradées au cours du catabolisme (glycolyse, oxydation des acides gras). Le gradient de proton va servir à fabriquer de l'ATP, molécule énergétique universellement utilisable, au niveau de l'ATP synthase qui est aussi une protéine membranaire mitochondriale.

Comme montre la figure I-6, plusieurs mécanismes cellulaires sont couplés et interdépendants pendant la phase de respiration. Ainsi, la glycolyse, qui constitue le

métabolisme primaire du cytoplasme, est génératrice des molécules de pyruvate qui peuvent se transformer en acétyl-CoA, cette molécule qui est le substrat du cycle de krebs, vient aussi de la voie de β -oxydation des acides gras (dégradation des lipides). D'autre part, le catabolisme des protéines génère des glutamates qui seront transformées en α -cétoglutarate, un autre intermédiaire du cycle de Krebs. À son tour, le cycle de Krebs dégrade l'acétyl-CoA et α -cétoglutarate à l'intérieur des mitochondries, tout en produisant du CO_2 et des coenzymes réduits (NADPH , H^+ et CoQH_2) qui seront ré-oxydés par la chaîne respiratoire (en aérobiose) au niveau des crêtes de la membrane interne mitochondriale.

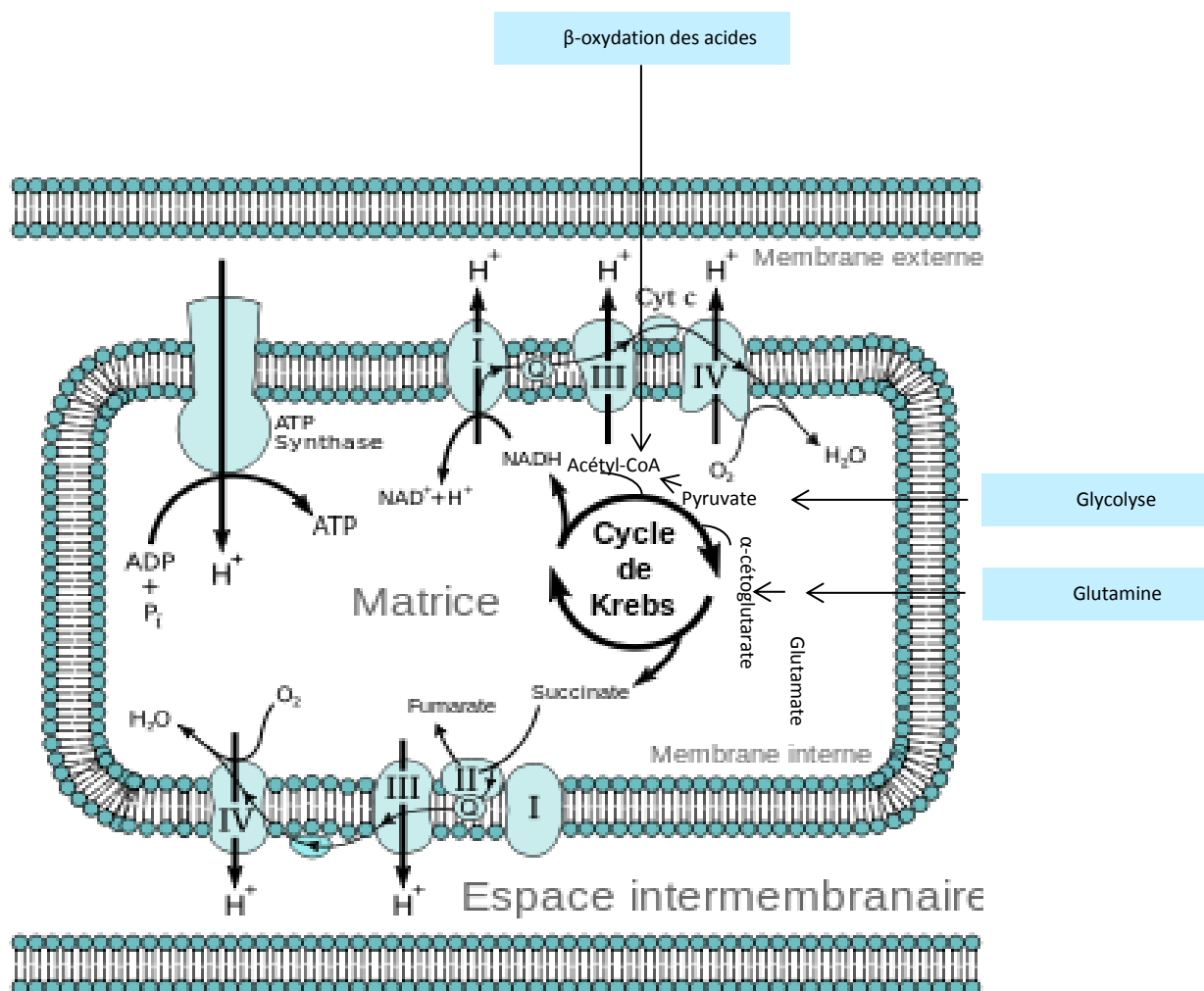


Figure I-6 Représentation schématique du métabolisme des mitochondries lors de la respiration

6 Lipogenèse et accumulation des triglycérides

La lipogenèse désigne l'ensemble des processus biochimiques permettant la synthèse des lipides en général et des acides gras en particulier.

Les lipides constituent un groupe très hétérogène de composés. Cette hétérogénéité n'est pas seulement basée sur la structure, mais plutôt sur la polarité des différents composés. Donc, en se basant sur la polarité des lipides, on peut les classer en deux groupes : lipides polaires et lipides neutres (non polaires) (Huang *et al.*, 2010). En général, les lipides polaires sont essentiellement constitués des glycolipides et des phospholipides qui sont des constituants structuraux et fonctionnels des membranes cellulaires (paroi de la cellule entière) et des membranes des organelles intracellulaires (ex, chloroplaste et mitochondries). Les lipides neutres, ou autrement dit les lipides non polaires, ne renferment aucune partie hydrophile. Ils sont majoritairement constitués des triglycérides, qui sont des lipides intracellulaires. Contrairement aux lipides polaires, les triglycérides ne remplissent pas un rôle structural mais servent principalement pour le stockage d'énergie et de carbone par la cellule.

En comparaison avec les plantes supérieures, le métabolisme des lipides, et en particulier les voies de biosynthèse des acides gras et des triglycérides, ont été peu étudiées chez les microalgues (Hu *et al.*, 2008). Mais, en se basant sur l'homologie des séquences des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique isolés des algues et des plantes supérieures, il est en général admis que les voies de base de la biosynthèse des acides gras et des triglycérides chez les microalgues sont très proches de celles mises en évidence chez les plantes supérieures. Les parties suivantes viennent donc essentiellement de la littérature issue des plantes supérieures.

6.1- Biosynthèse des acides gras

La cellule fabrique ses acides gras pour répondre à ses besoins de synthétiser les lipides de structure et ceux de réserve (stockage d'énergie). Pour synthétiser ces acides gras, la cellule a besoin de l'énergie apportée sous forme d'ATP et de pouvoir réducteur (NADPH, H^+) provenant essentiellement du fonctionnement de la voie des pentoses phosphates et de l'acétyl-CoA qui est le seul précurseur de la synthèse des acides gras. Ce précurseur provient de la β -oxydation des acides gras (intra-mitochondriale), de l'oxydation du pyruvate (mitochondriale) (Huang *et al.*, 2010) et de la dégradation oxydative des acides aminés dite cétogène. Après sa formation dans la mitochondrie,

l'acétyl-CoA est exporté de la matrice mitochondriale vers le cytosol pour la synthèse des acides gras.

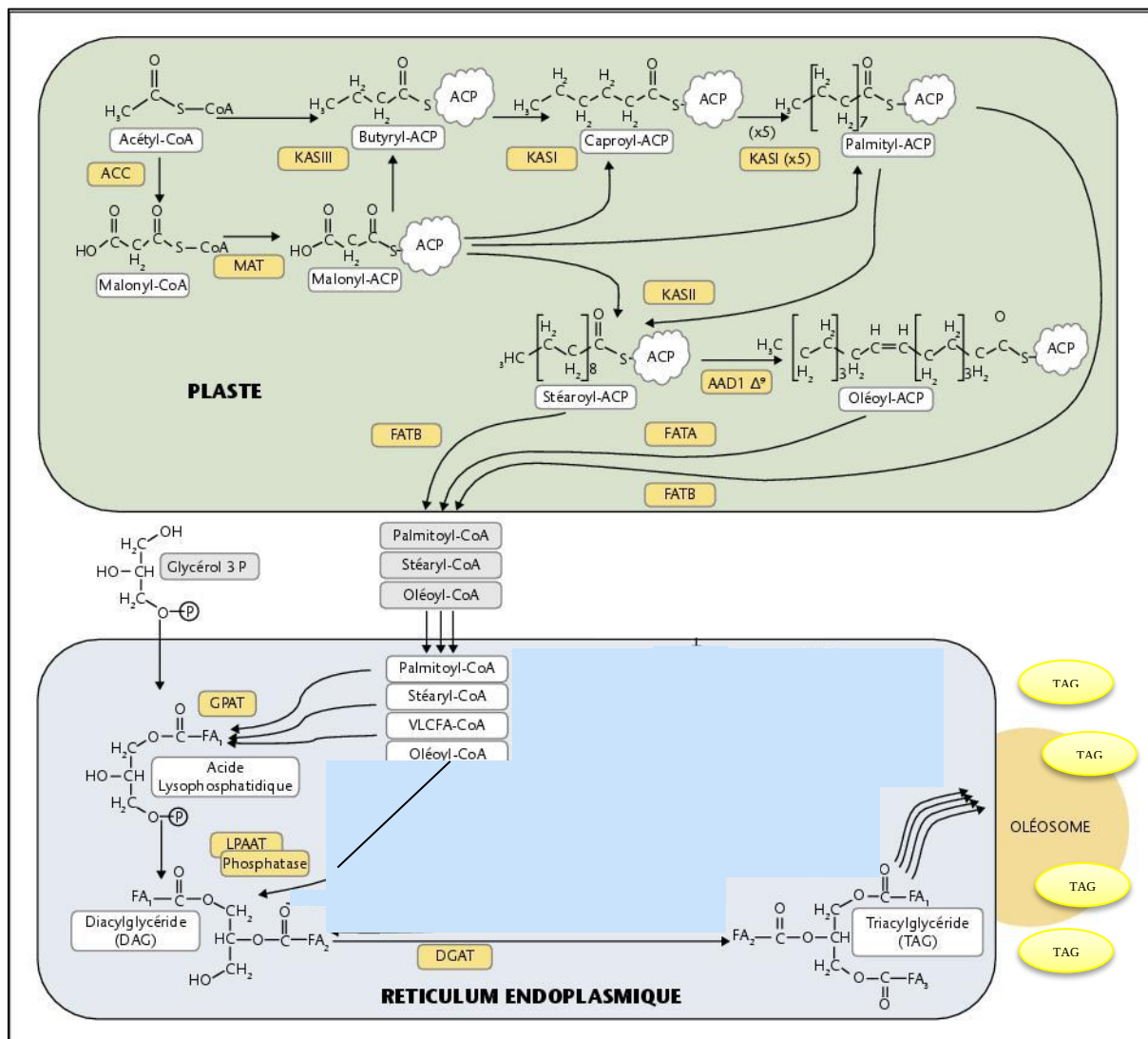


Figure I-7 Biosynthèse des acides gras et des triglycérides (Berger *et al.*, 2010)

AAC : acétyl-CoA carboxylase ; **ACP** : acyl carrier protein (transporteur d'acides gras) ; **MAT** : malonyl-CoA-ACP acyl transferase ; **KAS (I, II, III)** : kétoacyl-ACP synthases ; **AAD1** : acido acyl desaturase delta 9 ; **FAT** : fatty acid thioesterases **A** pour les acides gras insaturés et **B** pour les acides gras saturés ; **GPAT** : glycérol phosphate acyl transférase ; **LPAAT** : lysophosphatidic acid acyl transferase ; **DGAT** : diacyldglycéride acyl transférase

Comme le montre la figure I-7, la formation des acides gras saturés et insaturés chez les microalgues s'effectue principalement dans les chloroplastes. Cette biosynthèse est catalysée essentiellement par l'acide gras synthase et repose sur des condensations de type Claisen des amorces des acétyl-CoA. Ces réactions de condensation mettent en jeu des enzymes et une protéine porteuse des groupes acyles, nommée ACP (*acyl carrier protein*) qui est une protéine déterminante dans la biosynthèse des acides gras qui sont alors liés par covalence via une liaison thioester. Cette protéine participe donc à l'allongement des acides gras.

Le processus de l'élongation de la chaîne carbonée des acides gras nécessite la coopération de malonyl-CoA, une molécule sur laquelle agissent deux enzymes essentielles (acétyl-ACP et malonyl-CoA) (Huang *et al.*, 2010). En effet, la première étape dans ce processus est la formation de malonyl-CoA, suite à la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA grâce à l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (ACC). Après 4 réactions successives, les acides gras saturés et insaturés de longueur de chaîne de 16 et 18 carbones, quittent le chloroplaste vers le cytosol, après la rupture de leur liaison avec les protéines ACP. Dans le cytosol, les acides gras sont disponibles sous forme d'acyl-CoA. Ensuite ils sont exportés vers le réticulum endoplasmique (Figure I-7) pour participer à la voie de biosynthèse des triglycérides. Plus de détails de ce mécanisme se trouvent dans les travaux de Hu *et al.*, (2008).

6.2- Biosynthèse des triglycérides

Pour que la cellule puisse synthétiser les triglycérides, elle fait appel aux molécules d'acyl-CoA provenant de la voie de biosynthèse des acides gras et à un autre précurseur qui est le glycérol-3-phosphate. Ce dernier provient de la réduction de la 3-phosphodihydroxyacétone formée au cours de la glycolyse. Comme ceci est schématisé dans la figure I-7, la synthèse des triglycérides se fait en 3 étapes: 1) formation de l'acide phosphatidique, 2) déphosphorylation de ce dernier en diglycéride et 3) estérification de la dernière fonction alcool du glycérol et formation des triglycérides. Tout d'abord, deux acides gras sont transférés séquentiellement du coenzyme A aux positions 1 et 2 du glycérol-3-phosphate, ce qui forme l'acide phosphatidique (le centrale métabolique). Cette étape est catalysée par l'enzyme acyl-transférase. Ensuite, grâce à l'action d'une enzyme spécifique, le diacylglycérol phosphatase, l'acide phosphatique perd son groupement phosphate et ainsi une molécule de diacylglycérol (DAG) se forme. Enfin, un troisième acide gras est transféré à la position 3 du DAG ce qui forme au final les triacylglycérol. Cette réaction est catalysée par la diacylglycérol acyltransférase, une réaction enzymatique qui est unique à la biosynthèse de TAG.

À noter que les acides phosphatidiques ainsi que les DAG peuvent également être utilisés en tant que substrat pour la synthèse des lipides polaires, tels que les phosphatidylcholine (PC) et les galactolipides (Hu *et al.*, 2008). Il faut noter aussi que l'enzyme acyltransférase joue un rôle important dans la détermination de la composition finale des acides gras des triglycérides, du fait qu'elle présente des préférences pour des molécules spécifiques d'acyl-CoA. Par exemple, l'acyl transférase qui intervient dans le transfert d'un acyle sur la position 3 du DAG préfère l'acide oléique 18:1-CoA sur l'acide palmitique 16:0-CoA (Roessler *et al.*, 1994).

Ensuite, après leur synthèse, ces lipides composés essentiellement d'acides gras saturés et monoinsaturés, sont déposés dans des corps lipidiques nommés «oléoplastes», organites situés dans le cytoplasme de la cellule ou dans la lumière du réticulum endoplasmique (Figure I-7). La formation et l'accumulation de ces corps peuvent avoir lieu dans l'espace inter-thylacoïdal du chloroplaste chez certaines microalgues vertes (Hu *et al.*, 2008) comme *Scenedesmus obliquus*. Dans ce cas, les corps lipidiques sont appelés plastoglobules.

6.3- Facteurs stimulant la production des lipides et l'accumulation des triglycérides

Sous des conditions de croissance optimales, les microalgues absorbent et utilisent le carbone en conditions de prolifération cellulaire et produisent des petites quantités de lipides. Ceux-ci sont essentiellement constitués de phospholipides et de glycolipides, constituants structuraux et fonctionnels des membranes cellulaires. Le taux de triglycérides qui ont un rôle principal de réserve est alors très faible.

Les microalgues peuvent être soumises à des conditions de stress sous forme de stimuli environnementaux physiques (intensité lumineuse, température) ou chimiques (pH, salinité, limitation en nutriments: azote, phosphate, sulfate ainsi que la silice pour les diatomées), ou plus simplement en phase de vieillissement de culture (Hu *et al.*, 2008; Van Vooren *et al.*, 2012; Chisti, 2007). Dans ce cas, il est généralement observé une accumulation de réserves carbonées de type de carbohydrates, ou de lipides s'il s'agit de microalgues oléagineuses. Cependant, ces conditions spécifiques ont un impact négatif sur le développement photosynthétique. La limitation en azote est ainsi le facteur nutritionnel limitant le plus fréquemment rapporté pour mener à une accumulation majeure des lipides intracellulaires. Il s'en suit une modification importante du contenu en lipides, en qualité et quantité, en déplaçant le métabolisme lipidique vers la formation et l'accumulation de lipides surtout sous la forme de triglycérides qui peuvent représenter jusqu'à plus de 80% des lipides totaux. De nombreuses études sont disponibles sur le sujet (Chisti, 2007; Hu *et al.*, 2008; Pruvost *et al.*, 2011; Pruvost *et al.*, 2009; Breuer *et al.*, 2012a; Rodolfi *et al.*, 2009).

6.4- Mécanisme et rôle physiologique de l'accumulation des triglycérides

Il est communément admis que l'augmentation de la teneur lipidique par une carence azotée par exemple, est principalement obtenue au détriment des autres composants cellulaires et de la division cellulaire. Il en résulte donc une induction de nombreux changements physiologiques dans les microalgues concomitants avec l'accumulation progressive de lipides. Il y a ainsi une augmentation soudaine du contenu en sucre qui diminue puis demeure constant durant le reste de la culture, et une chute significative de la teneur en protéines (Pruvost *et al.*, 2011; Breuer *et al.*, 2012). En cas de suffisance en azote, le taux de fixation du carbone photosynthétique est de sept à dix fois celui de l'assimilation de l'azote. Sous une limitation en azote, la photosynthèse se poursuit à un taux réduit. En effet, dans les phases initiales d'une telle carence, avant que la capacité photosynthétique ne soit significativement diminuée, la fixation de carbone est en déséquilibre par rapport à l'assimilation limitée de l'azote pourtant nécessaire à la croissance des microalgues. L'excès de carbone qui en est issu est détourné de la synthèse des protéines dans des composés de stockage tels que les glucides ou les lipides pour les microalgues oléagineuses.

Cette accumulation a pour conséquence un stockage du carbone sous forme de triglycérides en réponse au stress qui a également un rôle régulateur au niveau de l'énergétique cellulaire. En effet, en conditions de stress, il y a un excès des électrons qui s'accumulent au niveau de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons ce qui emmène à une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, qui peuvent provoquer une inhibition de la photosynthèse et des dommages aux lipides membranaires, aux protéines et à d'autres macromolécules. Dans ces conditions, l'induction de la formation des acides gras C18 qui est hautement consommatrice de NADPH, H^+ régule la chaîne de transport d'électrons.

Il est à noter que cette voie de biosynthèse de triglycérides est généralement coordonnée avec la synthèse des caroténoïdes secondaires dans les microalgues. Ces caroténoïdes (β -carotène, lutéine et l'astaxanthine) sont estérifiés avec les TAG et séquestrées dans les corps lipidiques cytosoliques. Ils ont un rôle protecteur en réduisant l'excès de lumière frappant le chloroplaste. De plus, cette voie constitue un réservoir de galactolipides et d'acides gras toxiques alors exclus de la membrane en les maintenant sous forme de TAG (Hu *et al.*, 2008).

7 Culture des microalgues

La production industrielle de microalgues est en forte augmentation à travers le monde. Quelle que soit l'application envisagée, les microalgues requièrent des techniques spécifiques pour la culture, la récolte et l'extraction des composés d'intérêt. Cette partie est consacrée à expliquer les différents paramètres opératoires influant la croissance des microorganismes photosynthétiques et les différentes technologies de culture existantes.

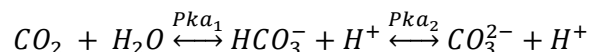
7.1- Exigences de culture

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques qui ont besoin pour croître d'une source lumineuse, d'une source de carbone inorganique (métabolisme photoautotrophe) et des minéraux essentiels à leur croissance. On peut associer également à leur culture pour une meilleure croissance un contrôle de pH et de température. La plupart des espèces se développent en suspension. Il y a alors besoin d'une bonne agitation du milieu. La production optimisée de microalgues nécessite au final une bonne gestion de tous ces paramètres opératoires.

7.1-A. Les nutriments

Pour une croissance optimale, les microalgues exigent un milieu de culture riche en carbone inorganique, en macronutriments (N, S, P) et micronutriments (K, Mg, Ca, Mn, Cu, Fe,...).

En effet, le carbone est essentiel à la synthèse de toutes les composantes organiques nécessaires à la croissance. Dans le cas des microalgues de métabolisme photoautotrophique, la source du carbone est le carbone dissous. Le CO_2 gazeux n'est en effet pas assimilé par les microalgues. Il doit être injecté dans le milieu de culture pour dissolution. La réaction de dissolution forme différentes espèces carbonées (Équation 1-5) qui dépendent du pH comme le montre la Figure 1-8. Plusieurs espèces peuvent donc se retrouver dans le milieu (CO_2 dissous, anions bicarbonates HCO_3^- et anions carbonate CO_3^{2-}). Quelle que soit l'espèce transportée à l'intérieur de la cellule via la membrane cellulaire, elle se retransforme naturellement en CO_2 afin d'être fixée par le cycle de Calvin.



Équation I-5

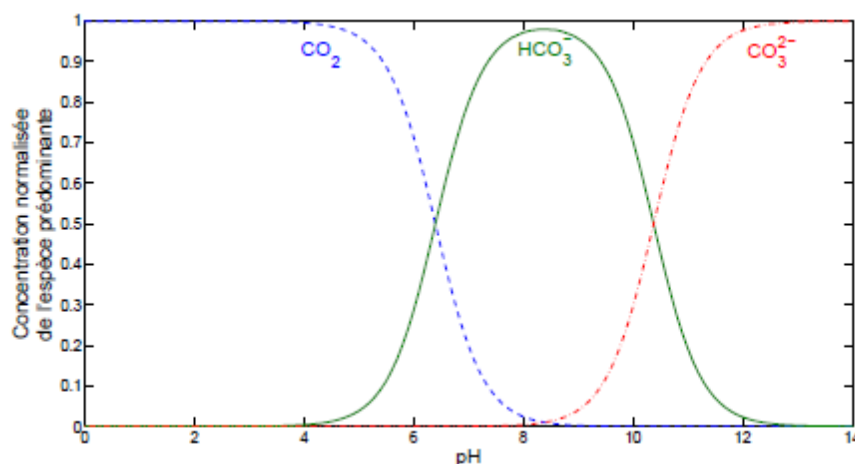


Figure I-8 Évolution des différentes espèces carbonées dissoutes en fonction du pH du milieu (Le Gouic, 2013)

Un autre élément important, présentant une grande influence sur la croissance ainsi que le métabolisme biochimique des microalgues est l'azote (N).

L'azote joue un rôle essentiel dans la synthèse de la matière vivante (protéines, chlorophylle, enzymes,...). Il est un des constituants de la chlorophylle qui commande l'opération fondamentale de la photosynthèse. En fonction du bagage enzymatique de l'algue, l'azote est assimilé sous formes d'ammonium NH_4^+ , nitrates NO_3^- voire aussi nitrites NO_2^- . L'assimilation des ions nitrates est un processus qui nécessite un apport d'énergie sous forme de pouvoir réducteur.

Le phosphore et le soufre ont aussi des rôles importants. En plus d'être un élément important pour les protéines, le phosphore est un élément essentiel pour la division cellulaire et donc un élément de base nécessaire à la croissance des microalgues. En outre, le soufre est un élément constitutif de beaucoup de protéines, puisqu'il entre dans la composition des acides aminés essentiels (la méthionine et la cystéine), qui sont responsables de la structure tridimensionnelle des protéines grâce aux liaisons dites «ponts disulfure» qu'ils provoquent.

Par ailleurs, les micronutriments (K, Mg, Ca, Mn, Cu, Fe), sont également indispensables à la croissance des microalgues. Certains d'entre eux interviennent au niveau des réactions biochimiques au sein de la cellule tout en remplissant des rôles de cofacteurs enzymatiques. À titre d'exemple, le fer est un élément indispensable à la synthèse du pigment chlorophyllien assurant la photosynthèse. De la même manière, le magnésium est un constituant des chlorophylles et tout manque de ces deux éléments, affecte directement l'activité photosynthétique de la cellule. Le calcium est quant à lui un élément constitutif de la paroi cellulaire.

Au final, pour garantir une croissance normale et optimale des microalgues, il faut définir la composition des milieux de culture afin d'éviter toute limitation des minéraux cités ci-dessus.

7.1-B. La lumière

En dehors de toute limitation minérale, la lumière reste le facteur limitant principal pour la culture des microalgues. Au sein d'une culture, ce substrat n'est jamais homogène du fait de l'absorption de lumière par les cellules. Dans les paragraphes suivants, la notion d'hétérogénéité de la lumière dans les systèmes de culture est détaillée. La grande influence de la lumière sur la croissance photosynthétique ainsi que le métabolisme intrinsèque des microalgues (le métabolisme lipidique en particulier) seront expliqués en détails.

1.7.1.B.1 Réponse photosynthétique des microalgues et mécanismes d'adaptation à la lumière

La lumière affecte fortement la croissance des microalgues puisque les réactions photosynthétiques sont hautement dépendantes de l'énergie lumineuse reçue par la cellule photosynthétique. L'évolution de la réponse photosynthétique (croissance) avec la lumière peut être suivie en mesurant expérimentalement la production d'oxygène (Richmond, 2004; Richmond, 2008). La figure I-9 montre une courbe type de l'évolution de la croissance de la microalgue en fonction de l'irradiance G qui caractérise la lumière disponible au sein de la suspension microalgale. Cette dernière montre que la réponse en croissance à la lumière n'est pas linéaire, et que la courbe de croissance de la microalgue exprimée en fonction de l'irradiance G est constituée de trois parties distinctes. Ces parties correspondent à des mécanismes photosynthétiques différents.

Tout d'abord, il faut définir une notion très importante propre à chaque souche: l'irradiance de compensation G_c qui définit 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. Ainsi, pour une irradiance inférieure à celle de compensation ($0 < G < G_c$), les centres réactionnels de la chaîne photosynthétique ne reçoivent pas suffisamment de photons, et dans ce cas la respiration mitochondriale domine les réactions photosynthétiques minoritaires dans ces conditions d'irradiance. Comme le montre la figure I-9, pour une telle valeur d'irradiance, le taux d'oxygène consommé par la respiration sera supérieur à la production d'oxygène par photosynthèse (Phase 1). C'est ce qu'on appelle «l'effet Kok». En effet, Kok a observé cet effet chez *Chlorella* (Kok, 1948).

Pour des valeurs d'irradiance supérieures à G_c ($G > G_c$), le taux spécifique de production d'oxygène P_{O_2} croît avec l'augmentation de l'irradiance jusqu'à atteindre une valeur maximale, notée $P_{O_2 sat}$ pour une valeur d'irradiance appelée G_s : irradiance de saturation. C'est la partie de la croissance dite photolimitée (phase 2).

La troisième partie de la courbe est dite de photoinhibition, obtenue aux valeurs d'irradiances supérieures à celle de G_s ($G > G_s$). Dans cette phase, la réponse photosynthétique qui se traduit par le taux spécifique de production d'oxygène P_{O_2} diminue, du fait d'effets négatifs sur le métabolisme dû à l'excès de lumière. Cela se traduit de différentes façons. Il y a par exemple une diminution des chlorophylles. Dans ce cas, le taux des pigments protecteurs (caroténoïdes) augmente pour réduire les effets d'excès de lumière frappant le chloroplaste menant à une dissipation plus forte de l'énergie captée.

D'une façon globale, la réponse des microalgues à la lumière est le résultat complexe de phénomènes de régulation et d'adaptation de la chaîne photosynthétique aux flux lumineux captés, eux-mêmes liés au métabolisme de conversion. La durée d'adaptation dépend de la souche et de l'espèce. Généralement, elle varie de quelques heures à quelques jours (~ 7 jours). La cellule s'adapte ainsi aux changements du flux lumineux en changeant par exemple la composition et la concentration des pigments de sa chaîne photosynthétique dans le but d'ajuster l'absorption de la lumière et la conversion de cette dernière pour la synthèse des molécules énergétiques (ATP et NADPH, H^+) nécessaires à son métabolisme intrinsèque.

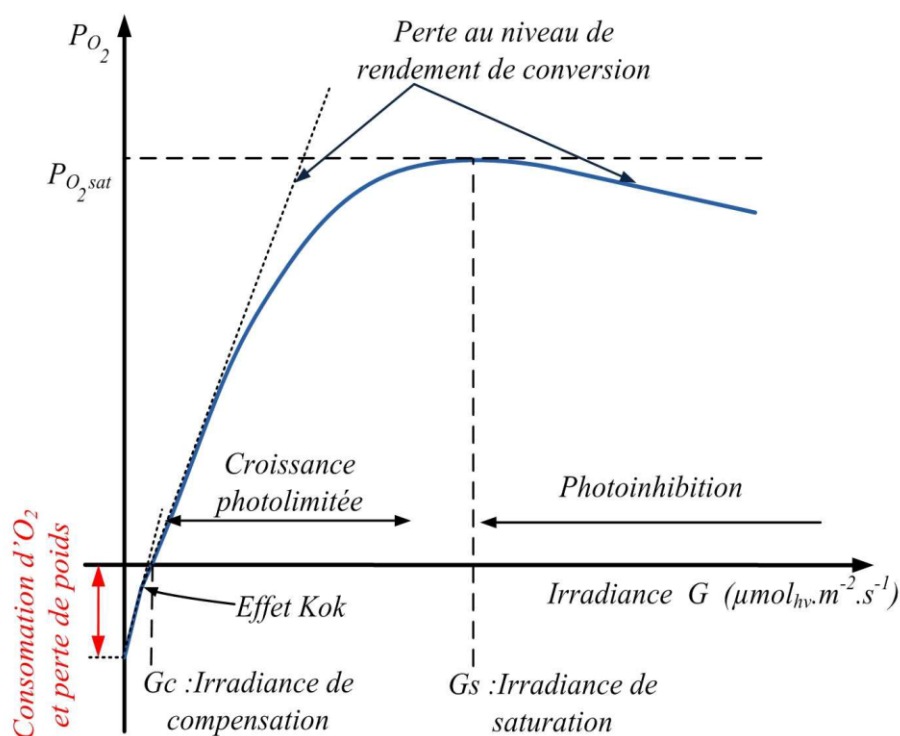


Figure I-9 Courbe typique de l'évolution de la production d'oxygène en fonction de l'irradiance G pour une microalgue

I.7.1.B.2 Atténuation de la lumière

Quel que soit le procédé utilisé pour cultiver les microalgues, la lumière sera répartie de façon hétérogène dans le milieu. Cette hétérogénéité signifie que dans une enceinte de culture de microalgues, les cellules ne reçoivent pas la même quantité de la lumière suivant leur position dans le réacteur. Cela est dû à l'absorption et la diffusion de la lumière au sein de la suspension. Par conséquent, la culture est sujette à la présence d'un gradient de lumière au sein de la suspension microalgale.

Dans le domaine des cultures de microalgues, où on cherche des concentrations élevées de microalgues, il est non seulement impossible d'éviter ce gradient, mais celui sera en général très marqué. Par conséquent, il est nécessaire de tenir compte du phénomène d'atténuation de la lumière qui dépend de plusieurs facteurs, tels que la géométrie du réacteur et en particulier son épaisseur, la position de la source lumineuse, les caractéristiques du flux capté, les propriétés optiques du milieu et de la biomasse qui sont fonction de la concentration, de la pigmentation, de la taille et de la forme des cellules.

Ce phénomène d'atténuation est schématisé dans les figures I.10 et I.11. Comme le montre la Figure I-10, la lumière s'atténue avec la profondeur de la culture (Figure I-10). Elle peut être représentée par une évolution exponentielle décroissante et peut être modélisée (Pottier *et al.*, 2005) afin de connaître l'irradiance locale $G(z)$ ($\mu\text{mol}_{\text{hv}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) en fonction de la profondeur de culture Z (m). Si l'atténuation est forte, une zone dite sombre va se créer dans le réacteur. Celle-ci sera obtenue lorsque l'irradiance locale sera inférieure à l'irradiance de compensation G_C .

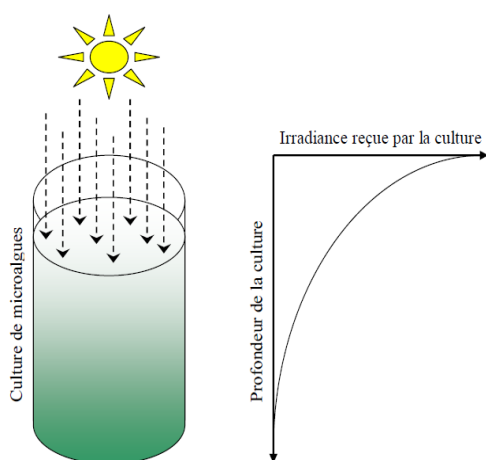


Figure I-10 Atténuation de la lumière dans le sens de la profondeur de la culture (Pruvost et Cornet 2012)

Par conséquent, comme le montre la Figure I-11, un réacteur de volume réactionnel V_R pourra être divisé en un volume éclairé V_l et un volume sombre V_d .

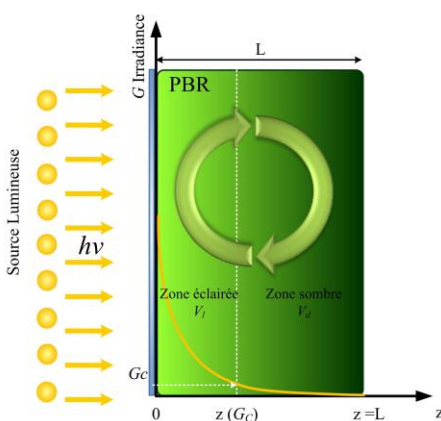


Figure I-11 Représentation schématisée de l'atténuation de la lumière et l'apparition des zones sombres (Pruvost et Cornet 2012)

Dans ce contexte, il est usuel de définir la notion de fraction volumique éclairée notée (γ). Cette notion est l'un des paramètres importants décrivant le phénomène physique de limitation de la croissance par le transfert de la lumière dans les systèmes de cultures de microalgues, puisqu'elle prend en considération le phénomène d'atténuation de la lumière et le point de compensation des microalgues.

La fraction volumique éclairée γ est alors définie comme étant le rapport du volume éclairé sur le volume total réactionnel du réacteur (Équation I-6):

$$\gamma = \frac{V_l}{V_R}$$

Équation I-6

En fonction des valeurs obtenues de cette grandeur γ , trois régimes de fonctionnement du photobioréacteur peuvent être rencontrés (Figure I-12):

1. Culture photolimitée ($\gamma < 1$): La culture est en photolimitation (limitation physique). Il y a apparition de zones sombres où la respiration prédomine sur la photosynthèse, ce qui engendre une perte de productivité.
2. Régime cinétique ($\gamma > 1$): Dans ce cas, il n'y a pas de zones sombres, toute la culture est éclairée, l'irradiance dans toute la culture est supérieure à G_c . La concentration

en biomasse est cependant insuffisante pour absorber toute la lumière. Une perte de productivité est donc observée due à la transmission d'une partie de l'énergie lumineuse.

3. Régime dit de luminostat ($\gamma = 1$): Dans ce cas il n'y a pas de zones sombres, mais la concentration en biomasse est suffisante pour absorber tout le flux lumineux. Par conséquent, la productivité en biomasse est maximale.

I.7.1.B.3 Limitation de la synthèse des TAG par la lumière

En plus de cette forte influence sur la croissance photosynthétique, ce phénomène affecte également le métabolisme cellulaire, et notamment la cinétique de production des triglycérides (Van Vooren *et al.*, 2012; Kandilian *et al.*, 2014). Van Vooren *et al.* (2012) a ainsi montré que la productivité des lipides diminue avec l'augmentation de concentration de la biomasse initiale dans les PBR en carence azotée, et donc avec l'augmentation de l'atténuation de la lumière.

Récemment, en poursuite à ces observations, une relation a été proposée entre les conditions d'atténuation de la lumière dans les PBR, et l'accumulation des lipides (TAG) à l'intérieur de la cellule (Kandilian *et al.*, 2014). Cette relation indique que la cinétique de la biosynthèse des lipides (TAG) est limitée par la vitesse volumétrique d'absorption des photons, MVREA (*mean volumetric rate of energy absorption*) notée $\langle \mathcal{H} \rangle$ exprimée en $\mu\text{mol}_{hv}/g.s$. Comme le montre la Figure I-13, la productivité surfacique quotidienne des triglycérides augmente aussi avec la vitesse volumétrique d'absorption des photons jusqu'à atteindre une productivité maximale qui correspond à une valeur optimale de $\langle \mathcal{H} \rangle$. Au-delà de cette valeur, la productivité descend progressivement. Il a également été montré qu'une valeur minimale de $\langle \mathcal{H} \rangle$ était nécessaire pour provoquer l'accumulation de TAG en carence. Comme le montre la Figure I-14, une valeur de $\langle \mathcal{H} \rangle$ supérieure à $13 \mu\text{mol}_{hv}/g.s$ est donc nécessaire pour déclencher une accumulation des TAG et par la suite une productivité en TAG élevée.

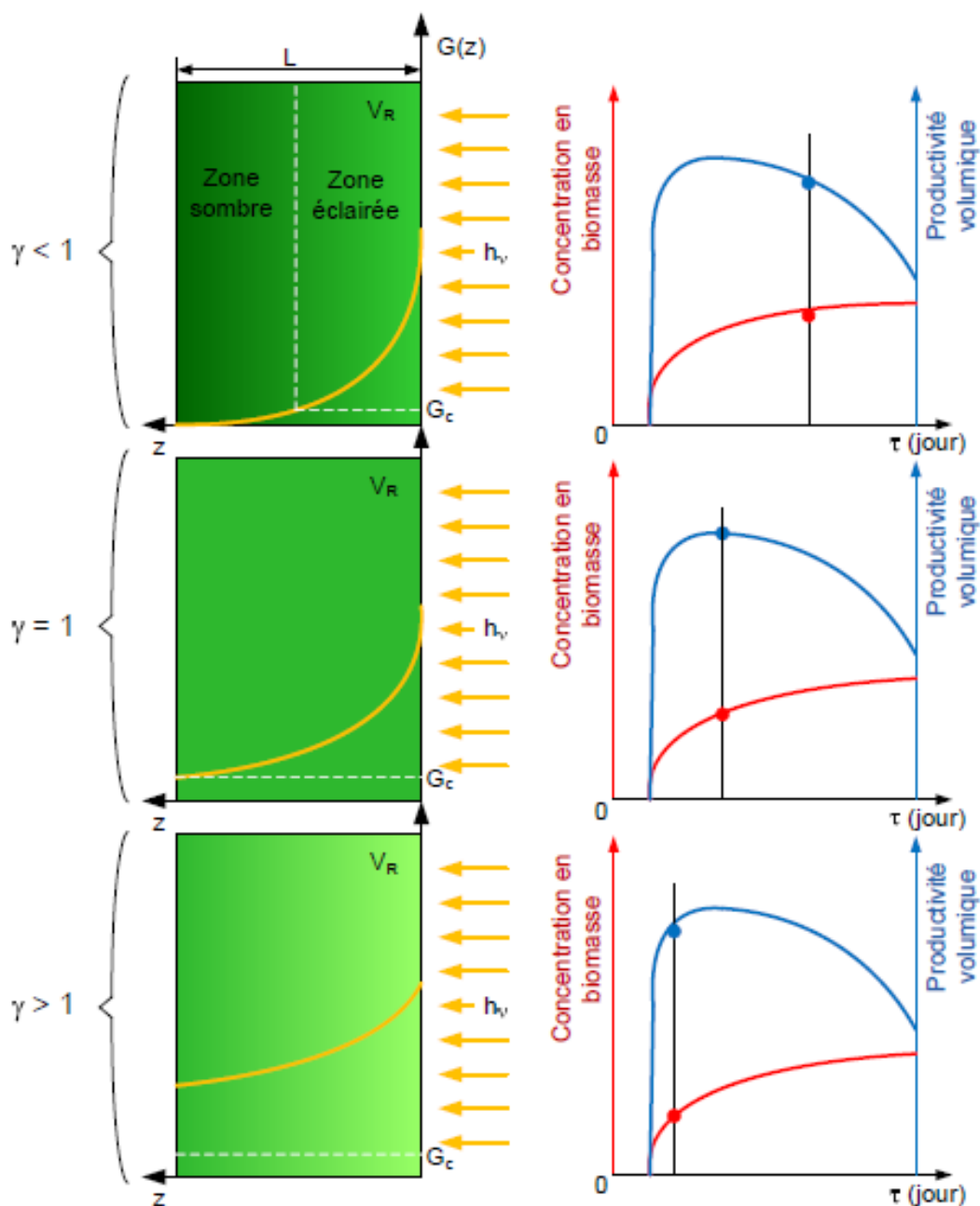


Figure I-12 Schématisation des trois régimes de fonctionnement des systèmes de culture des microalgues (Pruvost et Cornet 2012). Mise en évidence du rôle de l'atténuation de la lumière, ici modifiée par la concentration en biomasse (cas d'une culture continue) avec application des différents temps de résidence τ .

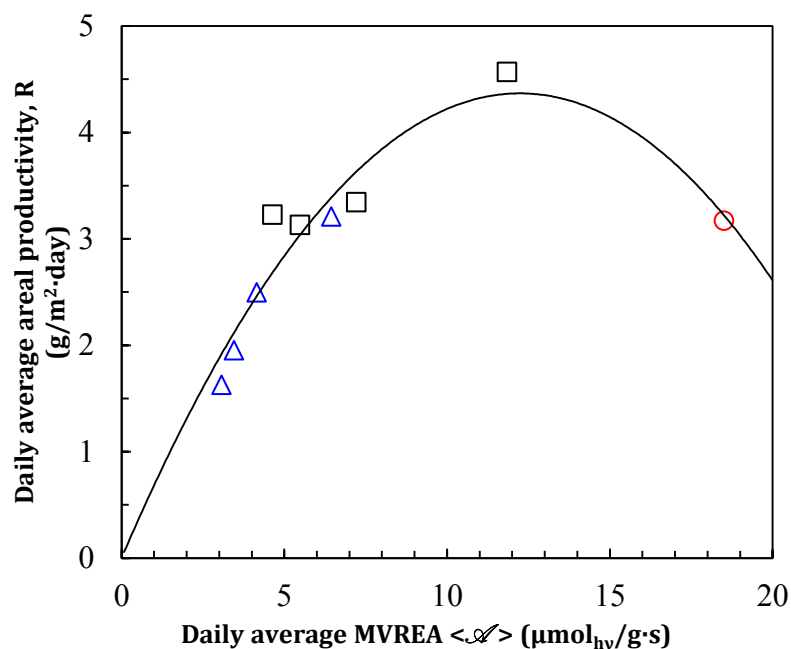


Figure I-13 Évolution de la productivité surfacique des triglycérides en fonction de la vitesse volumétrique d'absorption des photons $\langle \mathcal{A} \rangle$ (Influence de l'atténuation de la lumière) (Kandilian et al., 2014)

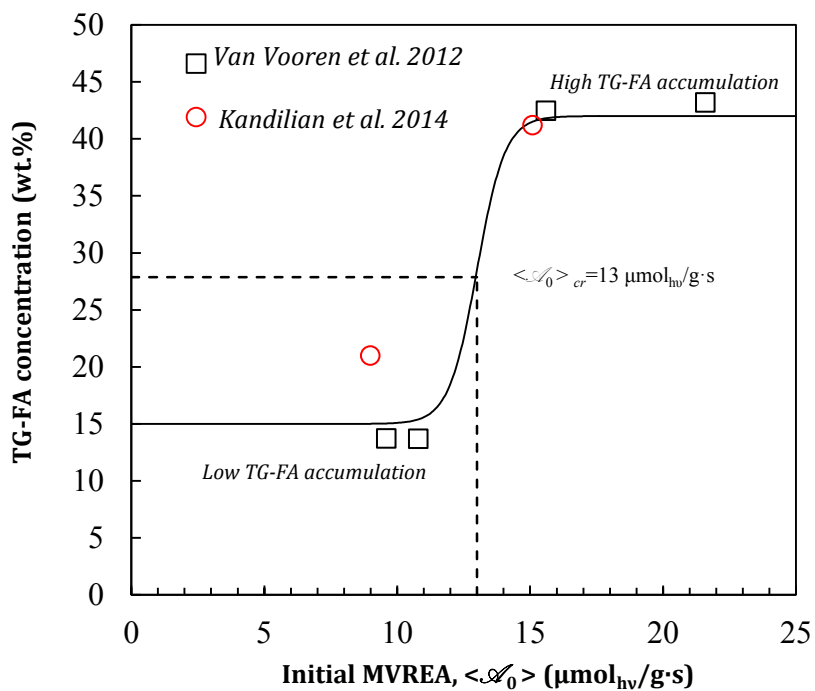


Figure I-14 Influence de la vitesse volumétrique initiale d'absorption des photons $\langle \mathcal{A}_0 \rangle$ sur l'accumulation des triglycérides (Kandilian et al., 2014)

I.7.1.B.4 Le pH

Le pH est un paramètre essentiel qu'on ne peut pas ignorer lors de la culture des microalgues. Les réactions biochimiques ainsi que les échanges des substrats entre l'intérieur de la cellule et le milieu environnant sont hautement dépendants de la valeur du pH (Breuer et al., 2013). A noter que le pH optimal de la plupart des espèces microalgales est compris entre 7 et 9 (Wang *et al.*, 2012). Le pH joue également sur la dissolution du CO₂ dans le milieu.

I.7.1.B.5 La température

La température du milieu environnant des microalgues est également un paramètre qui présente une grande influence sur la croissance de ces dernières. En plus de son influence sur les réactions biochimiques intracellulaires (Breuer et al., 2013a; Converti *et al.*, 2009), la température affecte l'état physiologique de la cellule ainsi que le transfert du CO₂ entre les phases gaz/liquide. Chaque souche a une température optimale de croissance.

Chez certaines souches, la température affecte le métabolisme lipidique intracellulaire. À titre d'exemple, pour *Chlorella vulgaris* et *Nannochloropsis oculata*, une température appartenant à l'intervalle de 20 à 25°C semble meilleure pour une accumulation des lipides (Converti *et al.*, 2009).

I.7.1.B.6 L'agitation

L'agitation permet de mettre en mouvement les cellules dans le milieu de culture. Ce mouvement est nécessaire afin de favoriser l'accès à la lumière, les transferts liquide-liquide et gaz-liquide, et d'éviter l'encrassement des parois (biofilm). Au final, une bonne agitation de la culture évite la sédimentation des cellules ainsi que la formation des biofilms et améliore le transfert de la chaleur et l'échange gazeux entre le milieu de culture et la phase gazeuse (Wang *et al.*, 2012). Néanmoins l'agitation (turbulence, bulles, cisaillement...) est un facteur potentiellement stressant pour la croissance des cellules. Ainsi, une trop forte agitation peut perturber voire modifier l'état physiologique cellulaire au-delà d'un certain seuil et/ou d'une certaine fréquence. Cela peut se traduire par l'excrétion de polysaccharides (Morineau-Thomas *et al.*, 2002) ou par l'altération physique de la cellule pouvant aller jusqu'à la destruction cellulaire (Vandanjon *et al.*, 1999).

Il est au final primordial d'optimiser ce paramètre afin d'obtenir une bonne circulation qui fournit à toute la culture un accès à la lumière et aux nutriments suffisant tout en évitant de fragiliser le matériel biologique cultivé.

7.2- Technologies des systèmes de culture

En fonction du contact physique avec le milieu extérieur, il existe deux systèmes principaux de culture des microalgues: «les systèmes ouverts» et les «systèmes clos». Le choix dépend de la souche cultivée ainsi que de l'application visée.

7.2-A. Les systèmes ouverts

On désigne par ce terme les systèmes dans lesquels la culture n'est pas séparée physiquement du milieu extérieur. Ce sont les systèmes les moins chers qui peuvent être facilement déployés aujourd'hui à une grande échelle. Actuellement, ces technologies sont matures industriellement, et une grande partie de la production mondiale de biomasse microalgale vient de ces systèmes. Du fait de leur grande taille, la majorité de ces systèmes utilisent l'énergie solaire comme source de lumière.

Les deux principaux groupes de systèmes ouverts sont les bassins ouverts rudimentaires (lagunes) (Figure I-15, A et B) et les «raceways» (Figure I-15, C). La principale différence est le régime de mélange. Contrairement aux systèmes rudimentaires (lagunes) où les cultures ne sont mélangées que par le vent, dans les raceways, des roues à aubes sont utilisées pour faire circuler la culture dans une configuration en boucle.

Bien que ces systèmes ouverts constituent les technologies de culture des microalgues matures à l'échelle industrielle, on ne peut pas négliger leurs limites qui sont inhérentes à leur principe de fonctionnement. À cause du contact direct avec le milieu environnant, ces systèmes souffrent en effet de risques de contamination biologique soit par des espèces locales qui y trouvent les conditions idéales pour se développer et finalement supplanter l'espèce cultivée, soit par des prédateurs (bactéries, virus, daphnies, copépodes, paramécies ...) qui broutent la biomasse microalgale.

En pratique, l'utilisation de ces systèmes est donc restreinte pour les cultures d'espèces dominantes, robustes ou extrémophiles afin d'éviter au maximum les risques de contaminations extérieures. Parmi ces espèces, on peut citer la Spiruline (*Arthrospira*

platensis) du fait de sa capacité à pousser dans des milieux très alcalins, et *Dunaliella salina* qui résiste aux conditions d'hyper-salinité des milieux.

Une autre limite des systèmes ouverts réside dans la grande interface entre la culture et l'atmosphère. L'équilibre gaz-liquide avec la faible teneur de CO₂ atmosphérique se traduit généralement par une concentration faible en carbone dissous dans le milieu, insuffisant souvent pour répondre aux besoins des micro-organismes photosynthétiques pour une croissance non limitée. Il faut ajouter à cela les problèmes d'évaporation du milieu.

En conclusion, ces limites et en particulier l'absence quasi-totale de contrôle en pratique sur les systèmes à grande échelle (pH, température,...), limitent l'utilisation des systèmes ouverts pour des applications industrielles cherchant les productivités élevées. Malgré cela, ces systèmes sont largement répandus du fait de leur facilité d'extrapolation à faible coût.

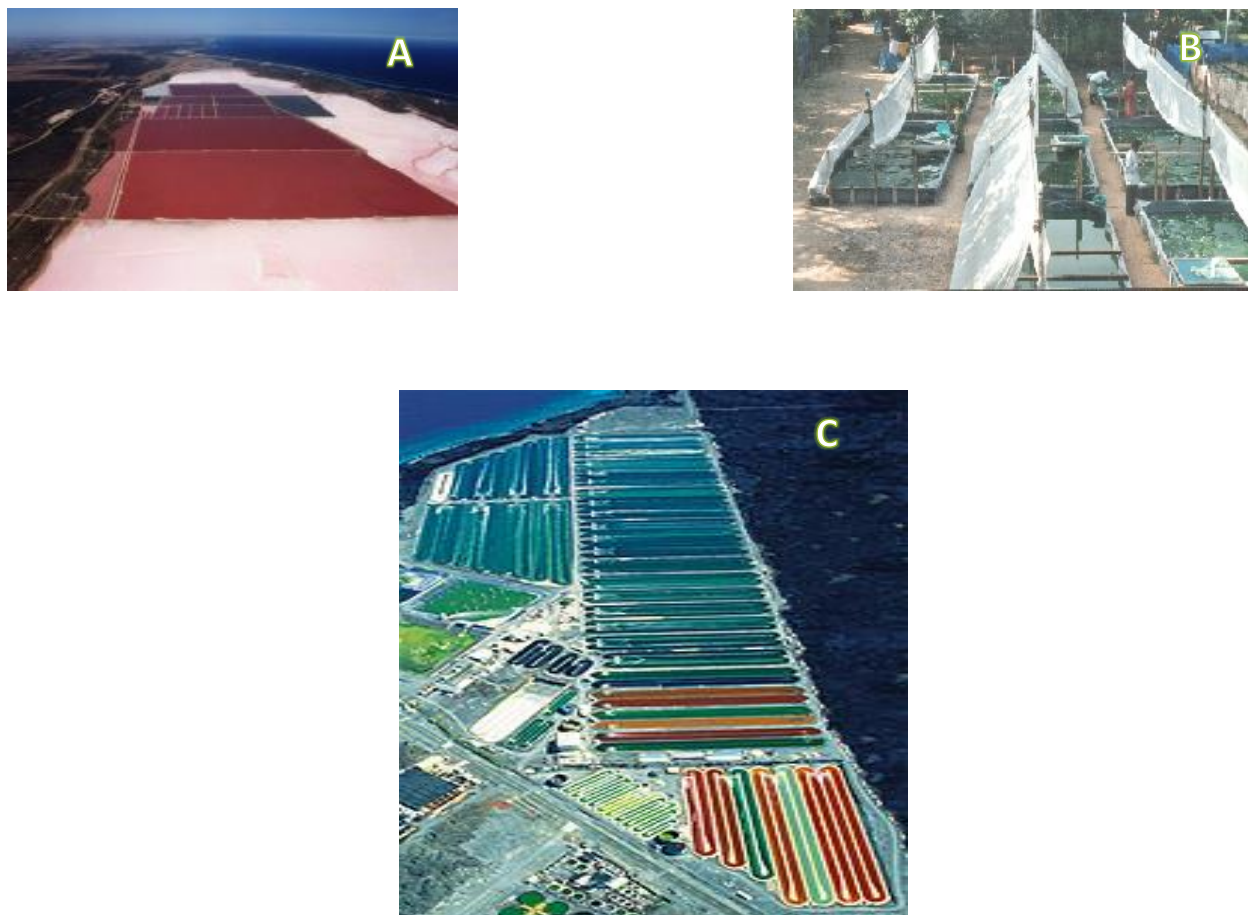


Figure I-15 Exemples de systèmes ouverts

A: Bassin de culture de *Dunaliella salina*, Hutt Lagoon (Australie)

B: Culture d'*Arthrospira platensis* en bassins ouverts (Inde)

C: Culture d'*Arthrospira platensis* et *Haematococcus pluvialis*, Hawaï, USA (Raceway)

7.2-B. Les systèmes clos (Photobioréacteurs: « PBR »)

Ces systèmes consistent à cultiver les microalgues dans un milieu totalement séparé du milieu environnant. On parle alors de «photobioréacteurs» (Chisti, 2007).

Un photobioréacteur (PBR) est donc un système clos à l'intérieur duquel se déroulent, en présence d'énergie lumineuse, des interactions biologiques que l'on cherche à contrôler en maîtrisant les conditions de culture. En sein du PBR, une réaction biochimique de

photosynthèse aura donc lieu menant à la production de biomasse végétale à partir des minéraux et de lumière.

Par rapport aux systèmes ouverts, l'utilisation de PBR permet de résoudre les risques de contamination et par conséquent, de cultiver une seule espèce des microalgues, en environnement hautement stérile et contrôlé. L'apport des nutriments, le pH, les échanges gazeux ainsi que la température peuvent être également maîtrisés. De ce fait, les PBR peuvent compenser un coût plus élevé en investissement et en exploitation par obtention d'une productivité optimisée.

Cependant, ces procédés souffrent aussi de limitations. On peut citer notamment le risque de formation de biofilm, l'accumulation d'oxygène qui peut avoir des effets toxiques sur les microalgues, et l'échauffement (en particulier dans des conditions solaires à cause de la grande quantité de la lumière infrarouge recueillie). Toutefois, une conception adéquate peut résoudre tout ou partie de ces limitations. À titre d'exemple, le réchauffement de la culture peut être géré par l'utilisation de refroidissement par eau, ou les biofilms peuvent être évités par application des conditions hydrodynamiques adéquates.

7.3- Les géométries des photobioréacteurs et les paramètres principaux d'ingénierie

La géométrie des PBR a un rôle crucial, celle-ci affecte directement le phénomène d'atténuation de la lumière au sein de la culture (transfert de la lumière), ainsi que d'autres paramètres comme l'hydrodynamique ou le transfert de gaz. Le développement des géométries des PBR doit d'une façon générale répondre aux besoins spécifiques et aux applications diverses des microalgues.

Au regard de la littérature, deux catégories principales de photobioréacteurs se dégagent de point de vue géométrique: les photobioréacteurs plats (géométrie plane) et les photobioréacteurs tubulaires (géométrie cylindrique).

Il faut noter également qu'en fonction de la source de l'énergie lumineuse, il existe deux catégories différentes de PBR; les PBR solaires (Figure I-16, A, B, et C) et les PBR à lumière artificielle (Figure I-16, D et E).

La plupart des usages de microalgues résultent des travaux de recherche récents menés à l'échelle laboratoire afin de développer la culture et de produire de la biomasse à des fins d'études. Les conditions contrôlées dans un PBR ont permis dans ce cadre d'étudier l'influence des paramètres de culture sur les productivités. Toutefois, l'application industrielle nécessite d'augmenter la taille des systèmes utilisés, ce qui engendre des

problématiques spécifiques et un coût souvent très élevé. La production en photobioréacteur à grande échelle est donc moins répandue que la culture en bassins ouverts. Néanmoins, ces dernières années ont vu l'apparition d'installations nouvelles basées sur la culture en PBR à grande échelle, comme celle de la société Roquette Frères (Allemagne), CleanAlgae (Espagne), Necton (Portugal) et Algatech (Israël).

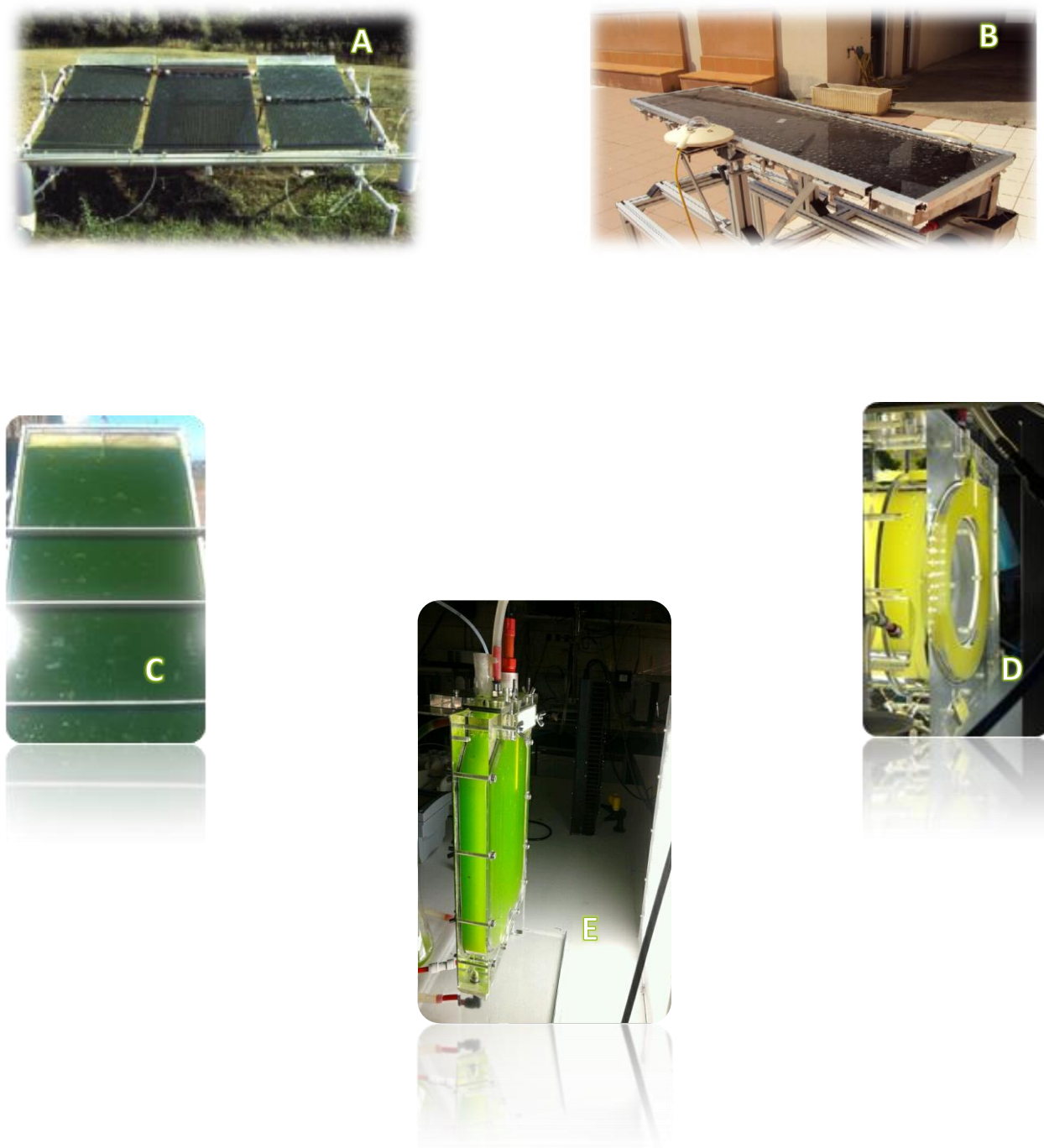


Figure I-16 Photos des systèmes clos (PBR)

A: PBR solaire développé en Italie

B, C: PBR solaire développés au GEPEA, Saint Nazaire, France

D, E: PBR à lumière artificielle développé au GEPEA, Saint Nazaire, France

7.3-A. Les photobioréacteurs plats

Un photobioréacteur plat offre une surface plane et transparente à la lumière (Figure I-17, B). Il contient une couche de culture d'une profondeur (épaisseur) de quelques centimètres (1 à 10 cm). Dans ce type de géométrie, l'atténuation de la lumière est monodirectionnelle, suivant une direction perpendiculaire à la surface éclairée (notée z).

7.3-B. Les photobioréacteurs cylindriques

Un photobioréacteur cylindrique se compose d'un ou plusieurs tubes transparents, de diamètres et longueurs variables, de configurations diverses et au sein desquels circule la culture (Figure I-17, A et C). Pour ce type de géométrie, il existe une large gamme de configurations. Les photobioréacteurs cylindriques sont largement répandus car leur conception est simple et facile à redimensionner vers des volumes importants de plusieurs centaines de litres. Ainsi, en conditions solaires, les PBR tubulaires sont couramment employés (Olaizola, 2000; Tredici, 2004). Il faut cependant noter, que dans ce cas, les cultures sont exposées à la lumière d'un seul côté. Cela conduit à une répartition plus complexe de la lumière, du fait de l'absence de symétrie cylindrique et du dioptré optique formé par la paroi optique (Lee et al., 2014)

7.3-C. Définition de la surface spécifique éclairée

Chaque PBR est caractérisé par sa surface spécifique éclairée notée a_s , dépendante de la géométrie du PBR. Ce paramètre est défini comme étant le rapport entre la surface éclairée et le volume de la culture (Équation I-7). La surface spécifique éclairée est exprimée en m^{-1} (m^2/m^3).

$$a_s = \frac{S}{V}$$

Équation I-7

Ce paramètre est important car il relie deux notions essentielles, à savoir la surface éclairée qui est liée donc à l'apport d'énergie lumineuse à la culture, et le volume de culture dans lequel cette lumière s'atténue.

Dans le cas des systèmes plats, la surface spécifique éclairée sera inversement proportionnelle à l'épaisseur de la culture (L), comme donné par l'Équation I-8

$$a_s = \frac{1}{L}$$

Équation I-8

De même, pour les systèmes de géométries cylindriques et éclairés d'un seul côté, cette grandeur sera inversement proportionnelle au rayon du cylindre, comme exprimée dans l'Équation I-9

$$a_s = \frac{2}{D}$$

Équation I-9

Ces deux équations montrent clairement que plus l'épaisseur de la culture est faible, plus la surface spécifique éclairée est importante.

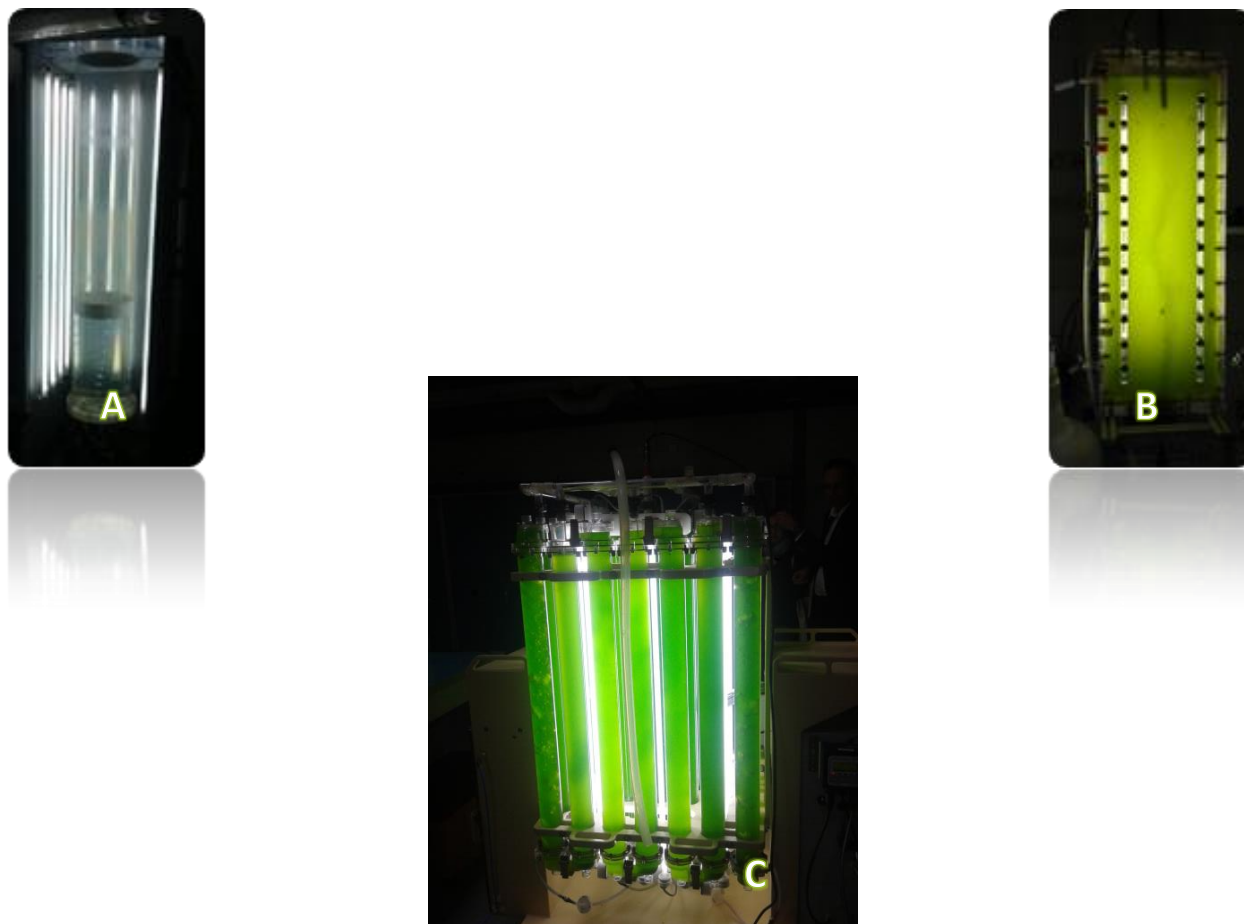


Figure I-17 Les deux formes géométriques usuellement rencontrées des PBR (à gauche PBR cylindrique, à droite PBR plat)

A: PBR cylindriques (GEPEA)

B: PBR plat (GEPEA)

C : PBR cylindriques (Algosource, JSP)

7.4- Modes de culture dans les photobioréacteurs

Quel que soit le système de culture, celui-ci peut être opéré selon plusieurs modes distincts, en mode continu, discontinu (*Batch*) et semi-continu (*Fed-Batch*).

7.4-A. Mode continu

Lorsque le réacteur fonctionne en mode continu, il est alimenté en permanence via une pompe d'alimentation par un milieu de culture neuf qui contient les nutriments. L'injection du milieu de culture est corélée avec le soutirage de la biomasse pour garder un volume réactionnel constant (Débit d'entrée Q_e = débit de sortie Q_s).

Comme montre la Figure I-18, un procédé fonctionnant en continu peut être utilisé de deux façons. En mode *Chemostat* (Figure I-18, A), le débit d'entrée est fixe et imposé par la pompe d'alimentation. En mode *turbidostat* (Figure I-18, B), le débit d'entrée est variable et dépend de la concentration en biomasse. Cela implique une mesure de biomasse, estimée par exemple à l'aide d'une sonde de turbidité émergée dans la culture.

Le mode continu est intéressant du point de vue industriel, puisqu'il demande moins de main d'oeuvre (ensemencement, nettoyage, stérilisation etc...), et il mène 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. Car dans ce cas, l'effet de la modification du celui-ci est directement visible sur la culture.

Pour mieux comprendre le fonctionnement du mode continu, il faut définir les paramètres qui le gèrent :

Q_e : Débit d'alimentation du milieu neuf (débit d'entrée) exprimé en unité de volume/unité de temps (ml/min ou L/h)

Q_s : Débit de soutirage de la biomasse ($Q_e = Q_s$)

V_R : Volume réactionnel du réacteur, exprimé par (L ou m^3)

C_X : Concentration en matière sèche (biomasse), (en régime stable, $C_X = \text{Constante}$) exprimée en ($g.l^{-1}$ ou $Kg.m^{-3}$)

D : Taux de dilution, exprimée par unité de temps (h^{-1})

τ : Taux de résidence du milieu dans le réacteur, exprimé en(h)

Ces différents paramètres sont liés vis-à-vis des équations suivantes :

$$D = \frac{Q_e}{V_R}$$

Équation I-10

$$\tau = \frac{Q_e}{V_R} = \frac{1}{D}$$

Équation I-11

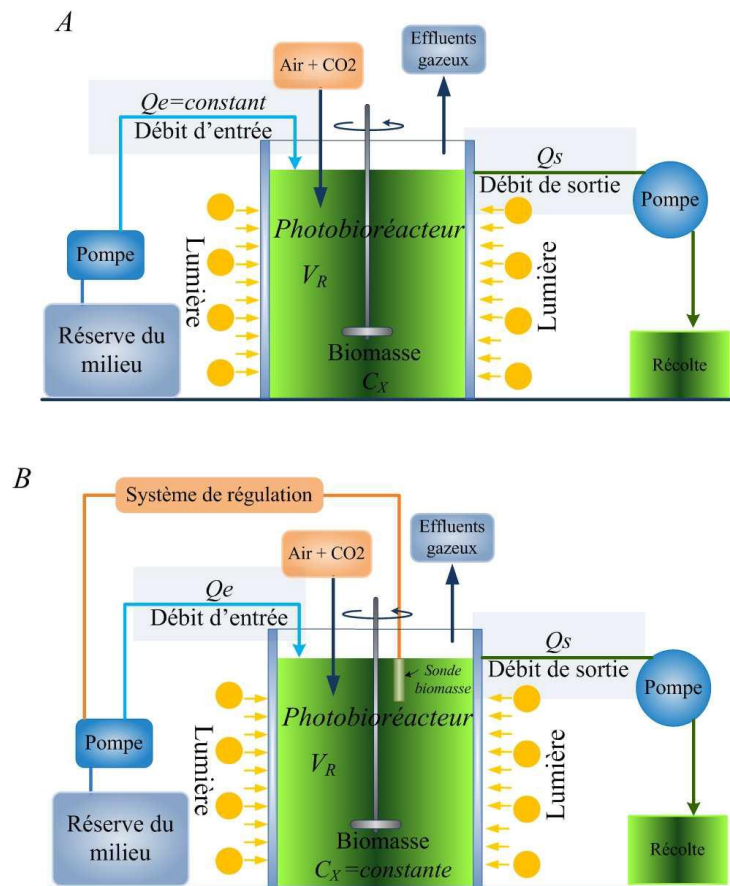


Figure I-18 Représentation schématique d'un PBR fonctionnant en mode continu, (A: Chemostat, B: Turbidostat) (Takache, 2010)

Le taux de dilution D est un paramètre clé dans ce mode de fonctionnement. Il affecte directement le renouvellement du volume de culture et donc la croissance dans la culture, et par conséquent la concentration de la biomasse au régime stable (à l'équilibre). De plus, en jouant sur la fraction volumique éclairée décrite précédemment (Figure I-12), il influe sur la productivité volumique. L'effet direct sur la concentration C_X dans le réacteur est donné par l'Équation I-12, (Pruvost *et al.*, 2009; Cornet *et al.*, 2003)

$$\frac{dC_X}{dt} = \langle r_X \rangle - \frac{C_X}{\tau}$$

Équation I-12

Le terme $\langle r_X \rangle$ représente ici la vitesse volumique de croissance en biomasse ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$). En régime stable, la concentration en biomasse est constante ce qui donne:

$$\langle r_X \rangle = D \cdot C_X = \frac{C_X}{\tau}$$

Équation I-13

La vitesse volumique de croissance est donc égale à la productivité volumique P_X du système, celle-ci était égale à:

$$\langle P_X \rangle = D \cdot C_X = \frac{C_X}{\tau}$$

Équation I-14

Pour un flux lumineux donné, la productivité volumique augmente avec le taux de dilution, et atteint une valeur maximale pour un taux de dilution optimale noté D_{opt} . Au-delà de cette valeur la productivité diminue. Pour des valeurs élevées de taux de dilution, la microalgue ne trouve pas le temps suffisant pour se dédoubler, ce qui entraîne avec le temps une perte progressive de biomasse, et par la suite le lessivage du PBR (Figure I-19).

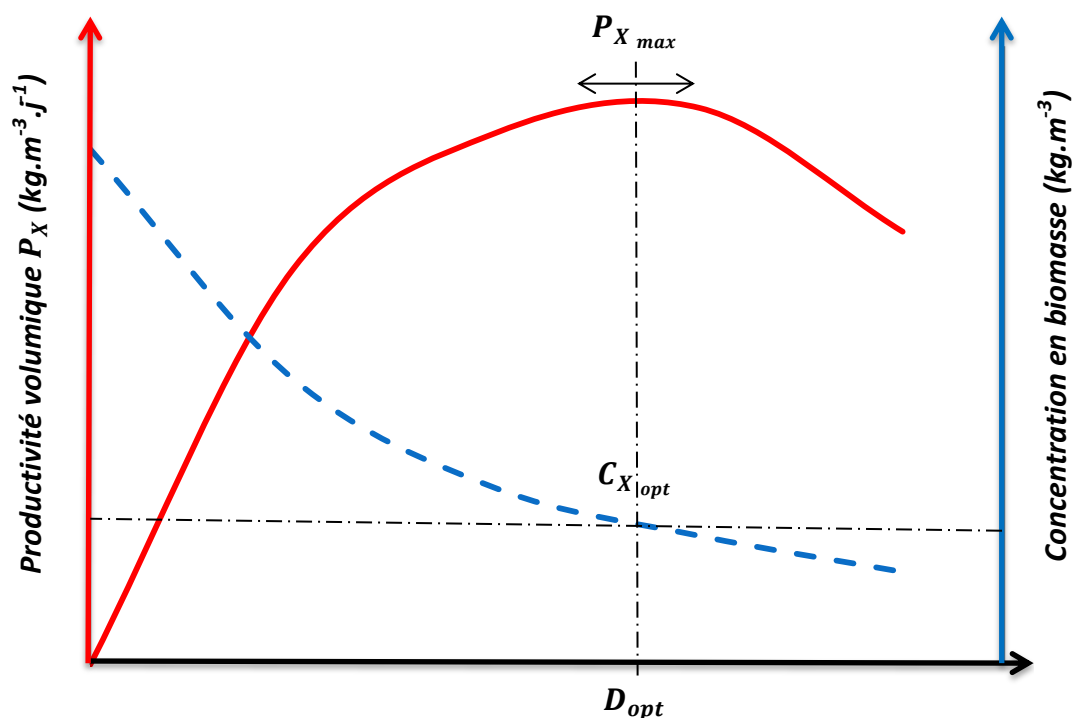


Figure I-19 Évolution de la productivité volumétrique en fonction du taux de dilution en mode continu

7.4-B. Mode discontinue (Batch)

Lorsque le réacteur fonctionne en mode discontinu, aucun apport de nutriments (milieu de culture neuf) est amené à la culture après le lancement du réacteur. C'est le mode le plus courant dans la culture des microalgues (Richmond, 2004), du fait de la facilité de son mode opératoire et la simplicité des systèmes de cultures nécessaires (pas d'alimentation ni de soutirage).

Après l'inoculation des microalgues dans une enceinte contenant un milieu de culture bien défini, la concentration en biomasse augmente avec l'assimilation des nutriments, jusqu'à atteindre une phase dite stationnaire. Ainsi, à ce stade il y a l'apparition d'un facteur limitant. A noter que dans le cas des microalgues, la phase stationnaire est obtenue par consommation des nutriments comme les nitrates, mais également quand l'atténuation de lumière est trop forte pour garantir une croissance positive.

7.4-C. Mode semi-continu (Fed-Batch)

En mode semi-continu, 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 culture représente un compromis entre la culture continue et batch. Il est régulièrement utilisé dans l'industrie des microalgues du fait de la croissance lente de ces microorganismes qui amène souvent à faire des récoltes quotidiennes partielles avec ajout ensuite de milieu neuf.

8 Domaines d'application des microalgues

Les microalgues ont été exploitées depuis les années 1950 tout d'abord en Allemagne, puis ensuite rapidement dans de nombreux pays dont les Etats-Unis, l'Australie, le Japon, Israël, l'Italie et la France. Pendant les années soixante-dix, leur utilisation dans les industries a surtout concerné la production de biomasse. Avec le début des années quatre-vingt, les recherches ont commencé à se développer dans le domaine de la production de molécules spécifiques. Actuellement seule une cinquantaine d'espèces sont réellement exploitées au niveau industriel.

8.1- Alimentation humaine

En raison de leur richesse en vitamines, en protéines, en carbohydrates, et en acides gras poly-insaturés, il est possible d'exploiter les microalgues pour l'alimentation humaine. Cependant, en pratique, la consommation humaine de biomasse de microalgues est limitée à très peu d'espèces, en raison des règles strictes de sécurité alimentaire (Pulz and Gross, 2004), des facteurs commerciaux, de la demande faible du marché et de la nécessité de préparations spécifiques. À titre d'exemple, on peut citer *Arthrospira platensis* (Spiruline), qui se caractérise par ses qualités nutritionnelles élevées avec une composition riche en protéines (jusqu'à 65 % de son poids sec). Elle comporte également tous les acides aminés principaux ainsi que des acides gras polyinsaturés et des provitamines A et B₁₂ (Richmond, 2004). Cette espèce a constitué une nourriture traditionnelle pour les Aztèques du Mexique (les premiers écrits relatant sa consommation sous forme de galettes séchées datent du XV^{ème} siècle). Dans les pays développés, la Spiruline est commercialisée sous forme de compléments alimentaires pour ses teneurs élevées en protéines et vitamines (Richmond, 2004).

8.2- Aquaculture et alimentation animale

Les microalgues et les cyanobactéries étant le premier maillon de la chaîne trophique. Ces microalgues jouent un rôle crucial en étant source de nourriture naturelle pour un grand nombre d'espèces de l'aquaculture comme les mollusques, les crevettes, les poissons (Spolaore *et al.*, 2006), les larves et les juvéniles des bivalves en éclosier ainsi que des petits animaux (porcelets et volailles). D'autre part, les microalgues interviennent dans la coloration des salmonidés d'élevage et du jaune d'oeuf de la poule grâce aux caroténoïdes et pigments accessoires. Elles peuvent aussi produire des coproduits valorisables pouvant être employés comme aliments pour les animaux (feed) ou fertilisants (Spolaore *et al.*, 2006).

8.3- Production d'extraits de microalgues

La biomasse microalgale après traitement (bioraffinage) permet d'accéder à un large ensemble de molécules intéressantes dans les secteurs alimentaire, médical, pharmaceutique et cosmétique.

- **Les pigments:** Ces composés sont utilisés en tant que colorants alimentaires naturels (phycobiliprotéines), marqueurs immunofluorescents (phycoérythrine), antioxydants (caroténoïdes).
- **Les carbohydrates:** cette voie de production demeure encore à explorer en grande partie. Les polymères hydrosolubles (exopolysaccharides) hautement digestibles sont utilisables dans l'alimentaire et la cosmétique en tant que gélifiant pour certains liquides et épaississant de crèmes.
- **Les lipides:** Certaines espèces de microalgues sont riches en lipides. Parmi ces lipides, les AGPI de type oméga-3, acides docosahexaénoïques (DHA, 22:6n-3) et acides eicosapentaénoïques (EPA, 20:5n-3), extraits à partir des microalgues (*N. oculata*, *Pavlova lutheri*), sont reconnus pour leurs applications nutraceutiques et pharmaceutiques dans la prévention des maladies cérébrales et cardiovasculaires (Tonon *et al.*, 2002).
- **Les composés bioactifs et les vitamines:** La découverte de particularités antibiotiques, antivirales, antioxydantes et antitumorales ainsi que des vitamines (B12, B6, B1, biotine, C, E, K) chez quelques espèces microalgales est attrayante. À titre d'exemple, en cosmétologie,

des extraits d'*Arthrospira*, *Chlorella* et plus récemment *Nannochloropsis oculata* se sont révélés d'intérêt dans le marché de soin de la peau et du visage pour leur action d'antivieillesse, antirides et de rafraîchissement, ainsi que pour le soin des cheveux (Spolaore et al., 2006).

- **Les protéines et les acides aminés essentiels:** La forte teneur en protéines des différentes microalgues et leur capacité de synthèse de tous les acides aminés sont l'une des principales raisons de les considérer en tant que complément alimentaire pour la nutraceutique.

8.4- Applications dans le domaine de l'environnement

8.4-A. Bio-atténuation des émissions de CO₂

Sous les conditions normales de croissance, les microalgues biofixent le CO₂ provenant soit de l'atmosphère, soit issus de fumées industrielles (Wang *et al.*, 2008). 1 kg de biomasse algale sèche utilise environ 1,8 kg de CO₂ (Chisti, 2007). Ceci combiné à la forte productivité des microalgues permet d'associer leur culture à la valorisation de CO₂ industriel, et de diminuer les émissions de ce principal gaz à effet de serre qui induit le réchauffement climatique. En cas d'utilisation en tant que biocarburant, le CO₂ libéré lors de la combustion du biodiesel sera identique à celui fixé lors de la photosynthèse et de la croissance des algues (Mata *et al.*, 2010a). L'opération est donc neutre.

8.4-B. Traitement des eaux usées

Les eaux usées (par exemple, le ruissellement agricole, les rejets d'élevage et les eaux usées industrielles et municipales) sont riches en éléments nutritifs pour la croissance des microalgues. Cela concerne notamment l'azote et le phosphore. L'élimination de ces composés organiques de l'environnement aquatique permet d'y réduire l'eutrophisation. C'est également une voie potentielle de bioremédiation, de recyclage de l'eau et d'élimination des contaminants chimiques et biologiques, des métaux lourds et des agents pathogènes (Muñoz and Guieysse, 2006).

8.5- Applications énergétiques

Actuellement, les microalgues suscitent un vif engouement en se présentant comme une «alternative» pour la production de biocarburants. Ces derniers sont l'ensemble des énergies dérivées de la conversion de l'énergie solaire en biomasse par des processus biologiques, autrement dit par la photosynthèse. En réalité, l'intérêt d'utiliser les microalgues pour la production des énergies renouvelables n'est pas nouveau, il a augmenté dans les années 1970 lors de la première crise pétrolière. Ces microorganismes constituent aujourd'hui ce qu'on considère comme la troisième génération de biocarburants faisant suite à ceux de la première génération (culture de soja, palme, maïs ou cannes à sucre) et de la deuxième génération se fondant sur l'usage de la biomasse ligno-cellulosique. Cette application était l'objet de cette thèse, elle est détaillée ci-après.

9 Production de biodiesel (potentiel et défis)

9.1- Historique

Le développement durable est un principe-clé de la gestion des ressources naturelles, ce qui implique indépendamment, une efficacité opérationnelle, une minimisation de l'impact sur l'environnement et des considérations socio-économiques. La première idée fut de produire des biocombustibles (bioéthanol et dérivés chimiques des huiles) à partir de l'agriculture. Toutefois, leur production massive s'est révélée au détriment de l'alimentation et leur rendement énergétique faible a rapidement imposé des recherches pour développer des carburants dits de deuxième génération basés sur les parties non comestibles des plantes comme la biomasse ligno-cellulosique. Les microalgues apparaissent en tant que biocarburant de 3^{ème} génération, car elles se dissocient de l'utilisation des végétaux supérieurs.

Dans le cas des biocarburants de première génération, des produits alimentaires comme le maïs, la canne à sucre, la betterave sucrière et les huiles végétales (huiles de palme, de soya et d'arachide) en constituent la matière première. En effet, les deux principaux carburants de cette génération utilisés dans le monde sont le bioéthanol obtenu par fermentation de plantes riches en sucres et en amidon, et le biodiesel qui est produit grâce à une réaction de transestérification des huiles végétales via un alcool (méthanol ou éthanol). Il faut noter que le bioéthanol représente 85% du marché mondial dont les États-Unis et le Brésil sont responsables de 91% de cette production. Ce biocarburant peut être ajouté à l'essence jusqu'à des proportions de 20% sans la nécessité de modifier le moteur du

véhicule. Le biodiesel, quant à lui, représente 15% du marché dont l'Union Européenne est responsable de 90% de cette production. Le biodiesel peut être mélangé au gazole à des teneurs de 5 à 30% sans avoir à modifier le moteur du véhicule. Cependant, il peut aussi être utilisé à 100% en exigeant l'utilisation de joints particuliers dans les moteurs.

Que ce soit le bioéthanol ou le biodiesel, leur utilisation à partir de ressources agricoles a des impacts négatifs en rentrant en compétition avec l'approvisionnement alimentaire. L'utilisation des cultures servant à l'alimentation humaine et animale pour la production de biocarburants posent beaucoup de problèmes éthiques, puisqu'elle engendre une augmentation des prix des produits agricoles tels que le maïs rendant ceux-ci moins accessibles en particulier dans les pays en voie de développement (Schenk et al., 2008). L'utilisation de ces biocarburants entraîne l'apparition d'autres problématiques, dont notamment la déforestation, l'augmentation de la consommation en eau et la pollution des sols et des eaux de surface et souterraines due à l'utilisation des pesticides. À titre d'exemple, les États-Unis consomment 0.53 milliard de mètre cubes de diesel annuellement. Afin de satisfaire ces besoins, la culture du palmier à huile, offrant les meilleurs rendements en huiles, serait nécessaire sur une superficie de 111 millions d'hectares, soit 61% de toutes les terres agricoles des États-Unis (Chisti, 2008). Au final, à la vue de ces limitations majeures liées à l'utilisation de ces biocarburants, deux autres générations de biocarburants ont été rapidement envisagées: (deuxième et troisième génération).

Pour les biocarburants de deuxième génération, on peut citer l'éthanol dit cellulosique. Ce biocarburant est obtenu à partir des différents déchets agricoles et ligneux ainsi que d'arbres à croissance rapide (la paille de blé, le peuplier, les sciures de bois et écorces, etc...). Or, la production d'éthanol à partir de ces matières souffre de problèmes principalement associés à la présence de lignine qui agit comme un inhibiteur de l'hydrolyse et de la fermentation des sucres présents dans la cellulose et l'hémicellulose, ainsi qu'à la difficulté d'hydrolyser la cellulose en glucose en raison de la rigidité de la liaison β 1,4 glucosidique (Himmel, 2009). Afin de permettre une production rentable et atteindre une efficacité économique, il est nécessaire de développer des installations qui permettent un traitement efficace de chaque type de biomasse et des procédés qui permettent de diminuer les coûts de production de l'éthanol cellulosique.

Les biocarburants de troisième génération, ou autrement dit les algocarburants, ont le potentiel de remplacer les carburants d'origine fossiles utilisés dans le transport sans affecter les ressources alimentaires, la consommation d'eau et la détérioration des sols cultivables (Chisti, 2008). De plus, il est aujourd'hui connu que les microalgues sont à l'origine de vecteurs énergétiques variés: le biodiesel et le biokérosène dérivés des lipides, le méthane (CH_4) à partir de la digestion anaérobie de la biomasse (Spolaore *et al.*, 2006), l'éthanol par fermentation et le dihydrogène (H_2) produit par bio-photolyse de l'eau. La

biomasse résultante peut également être simplement brûlée pour la cogénération d'énergie (électricité et chaleur) (Wang *et al.*, 2008).

9.2- Potentiel des microalgues pour la production de biodiesel

Les triglycérides (TAG) sont considérés comme étant la matière première idéale pour produire le biodiesel via une réaction de Trans-estérification avec le méthanol (Figure I-20). Cette réaction peut être catalysée par des catalyseurs acides, basiques (Meher *et al.*, 2006) et même par les enzymes lipases (Sharma *et al.*, 2001). Comme le montre la Figure I-20, 3 moles de méthanol sont nécessaires pour convertir une mole de triglycéride en trois moles d'esters méthyliques, base du biodiesel. Dans les industries, en pratique, on fait réagir 6 moles de méthanol avec une mole de TAG dans le but de déplacer l'équilibre de la réaction dans le sens de consommation de méthanol, autrement dit dans le sens de la production des méthyls-esters, ce qui engendre une augmentation du rendement de conversion des TAG en biodiesel.

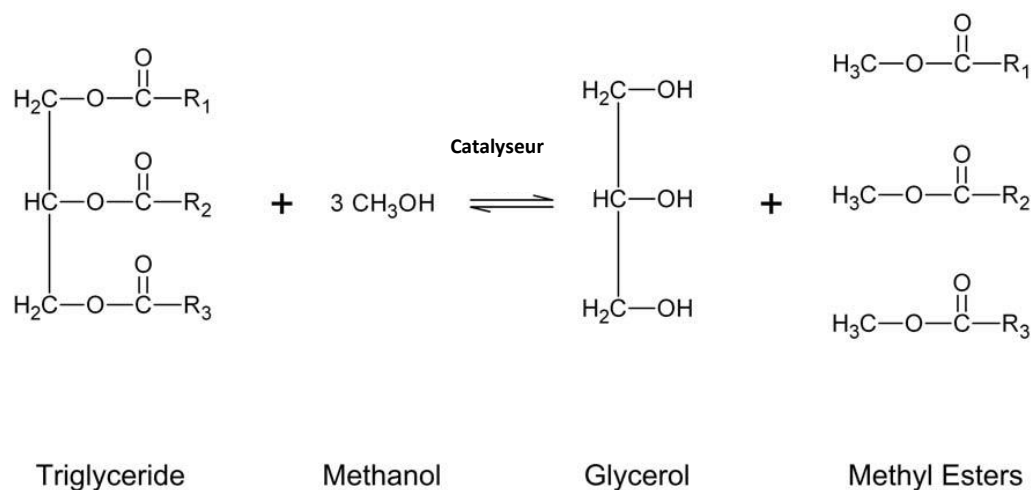


Figure I-20 Trans-estérification des triglycérides en biodiesel (Chisti, 2007)

Les microalgues constituent une source végétale d'intérêt pour la production de biodiesel (Chisti, 2007; Hu *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2010), du fait de leur tendance à accumuler des concentrations élevées de lipides de type TAG, comme le montre le Tableau I-1. Le biodiesel qui en sera issu est alors un biocarburant qui apparaît renouvelable, car il peut répondre en théorie en quantité à la demande mondiale globale

des carburants de transport, contrairement aux stocks actuels de plantes oléagineuses et de graisses animales qui n'en représentent que 0.3% environ (Schenk et al., 2008). De plus, Le biodiesel dérivé de la biomasse microalgale est quasi-neutre en émission de carbone du fait de la fixation de CO₂ lors de la phase de croissance. Des essais ont également montré qu'il contient des niveaux réduits de particules polluantes telles que le monoxyde de carbone, la suie, les hydrocarbures et le monoxyde de soufre SO_x du fait de son contenu élevé en oxygène (Brennan and Owende, 2010; Huang *et al.*, 2010). L'utilisation de biodiesel contribue à réduire de 10% la libération de monoxyde de carbone et de 30% les teneurs en soufre, ce qui pourrait diminuer par conséquent 90% de la toxicité de l'air et 95% des cancers par rapport à l'utilisation du pétrodiesel (Huang *et al.*, 2010).

Le fort potentiel des microalgues s'explique en premier lieu par la richesse en lipides neutres (Triglycérides) intracellulaire de certaines souches dites oléagineuses (Chisti, 2007; Hu *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2010). Comme le montre le Tableau 1-1, les microalgues peuvent accumuler entre 30 et 70% de leur poids sec en huiles (Mata *et al.*, 2010). De plus, l'accumulation des triglycérides à l'intérieur des microalgues peut être stimulée en changeant les conditions de cultures, en appliquant tout simplement un stress nutritif comme la carence en azote (Hu *et al.*, 2008). À cette teneur élevée en lipides, il faut ajouter le taux de croissance rapide (temps de dédoublement court, 1 à 3 pendant 24 heures) (Hu *et al.*, 2008), menant au final à une productivité surfacique élevée (Tableau 1-2). En comparaison avec les plantes terrestres, ces microorganismes ont au final une capacité 10 à 100 fois plus importante que les plantes supérieures à convertir le CO₂ en biomasse en utilisant l'énergie solaire (Chisti, 2007). Leur culture hors sol rend possible également l'exploitation de surfaces non utilisées pour l'agriculture. Les microalgues peuvent être cultivées également dans des eaux saumâtres sur des terres non arables sans application d'herbicides ou de pesticides. Elles n'apparaissent donc pas en compétition avec l'approvisionnement alimentaire.

Malgré ces avantages, cette technologie doit surmonter un certain nombre d'obstacles avant d'être largement déployée, pour en particulier rivaliser sur le marché du carburant avec les autres alternatives énergétiques.

Le paragraphe suivant attire l'attention sur les défis qui devront être surmontés afin que cette application soit un jour rentable et fiable à échelle industrielle.

Espèce	Teneur en lipides (% MS)	Productivité des lipides (mg/L/jour)	Productivité volumique de biomasse (g/L/jour)	Productivité surfacique de biomasse (g/m ² /jour)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24-31			11.5-17.4
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75		0.02	3
<i>Chaetoceros mulleri</i>	33.6	21.8	0.07	
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14.6-16.4/39.8	17.6	0.04	
<i>Chlorella emersonii</i>	25-63	10.3-50	0.036-0.041	0.91-0.97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6-57.8	1214	2-7.7	
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19-22	44.7	0.23-1.47	
<i>Chlorella vulgaris</i>	5-58	11.2-40	0.02-0.2	0.57-0.95
<i>Chlorella sp.</i>	10-48	42.1	0.02-2.5	1.61-16.47/25
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2		2.9-3.64	72.5/130
<i>Chlorella</i>	18-57	18.7		3.5-13.9
<i>Chlorococcum sp</i>	19.3	53.7	0.28	
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20-51.1		10	
<i>Dunaliella salina</i>	6-25	116	0.22-0.34	1.6-3.5/20-38
<i>Dunaliella primolecta</i>	23.1		0.09	14
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16.7-71		0.12	
<i>Dunaliella sp.</i>	17.5-67	33.5		
<i>Ellipsoidion sp.</i>	27.4	47.3	0.17	
<i>Euglena gracilis</i>	14-20		7.7	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25		0.05-0.06	10.2-36.4
<i>Isochrysis galbana</i>	7-40		0.32-1.6	
<i>Isochrysis sp.</i>	7.1-33	37.8	0.08-0.17	
<i>Monodus subterraneus</i>	16	30.4	0.19	
<i>Monallanthus salina</i>	20-22		0.08	12
<i>Nannochloris sp.</i>	20-56	60.9-76.5	0.17-0.51	
<i>Nannochloropsis occulata</i>	22.7-29.7	84-142	0.37-0.48	
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12-53	37.6-90	0.17-1.43	1.9-5.3
<i>Neochloris oleobundans</i>	29-65	90-134		
<i>Nitzschia sp.</i>	16-47			8.8-21.6
<i>Oocystis pusilla</i>	10.5			40.6-45.8
<i>Pavlova salina</i>	30.9	49.4	0.16	
<i>Pavlova lutheri</i>	35.5	40.2	0.14	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18-57	44.8	0.003-1.9	2.4-21
<i>Porphyridium cruentum</i>	9-18.8/60.7	34.8	0.36-1.5	25
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11-55		0.004-0.74	
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9-18.4	35.1	0.19	
<i>Scenedesmus sp.</i>	19.6-21.1	40.8-53.9	0.03-0.26	2.43-13.52
<i>Skeletonema sp.</i>	13.3-31.8	27.3	0.09	
<i>Skeletonema costatum</i>	13.5-51.3	17.4	0.08	
<i>Spirulina platensis</i>	4-16.6		0.06-4.3	1.5-14.5/24-51
<i>Spirulina maxima</i>	4-9		0.21-0.25	25
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20.6	17.4	0.08	
<i>Tetraselmis suecica</i>	8.5-23	27-36.4	0.12-0.32	19
<i>Tetraselmis sp.</i>	12.6-14.7	43.4	0.3	

Tableau I-1 Teneur et productivités en lipides des différentes espèces des microalgues (D'après Mata *et al.*, 2010)

Source végétale	Teneur en huile (% d'huile dans la biomasse)	Rendement en huile (L d'huile/ha/an)	Surface utilisée (m ² /an/Kg de biodiesel)	Productivité en biodiesel (Kg de biodiesel/ha/an)
Maïs (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Chanvre (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
Soja (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Jatropha (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Cameline (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
Colza (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Tournesol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
Ricin commun (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307	9	1156
Palmier à huile (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Microalgue (faible teneur en huile)	30	58,700	0.2	51,927
Microalgue (teneur moyenne en huile)	50	97,800	0.1	86,515
Microalgue (forte teneur en huile)	70	136,900	0.1	121,104

Tableau I-2 Comparaison entre le potentiel des microalgues et les autres matières premières de biodiesel (Mata *et al.*, 2010)

9.1- Défis et verrous de la production de biodiesel par microalgues

Les verrous et les défis qui restent à lever pour la production de biodiesel à partir des microalgues ont été discutés dans plusieurs revues scientifiques (Hannon *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). D'une façon générale, il ressort que le potentiel des microalgues vis-à-vis de cette application est réel, mais beaucoup de travail est encore nécessaire pour faire passer le biodiesel microalgal du rêve à la réalité.

Le principal défi est d'atteindre un coût suffisant pour une production commerciale de biodiesel microalgal (Chisti, 2007; Hannon *et al.*, 2010). Selon des estimations de coûts en 2009, un baril de biocarburants à base d'huiles microalgale coûterait entre 300-2600 \$ (US) en utilisant les technologies actuelles alors qu'un baril de pétrole coûte 40-80 \$ (Alabi *et al.*,

2009). Il faut noter que ce coût élevé est dû à une utilisation de procédés existants dans un schéma général représenté dans la figure I-21. Il apparaît ainsi que le coût de production et de récupération des molécules d'intérêts (TAG) contribuent à 50% du coût final de l'huile produite. Des améliorations sont donc nécessaires pour surmonter les obstacles qui existent à chaque étape. Cela inclue la sélection d'une souche à fort potentiel, l'optimisation des conditions de production, et l'amélioration des procédés de production de biomasse et d'extraction des lipides pour une conversion finale en biodiesel.

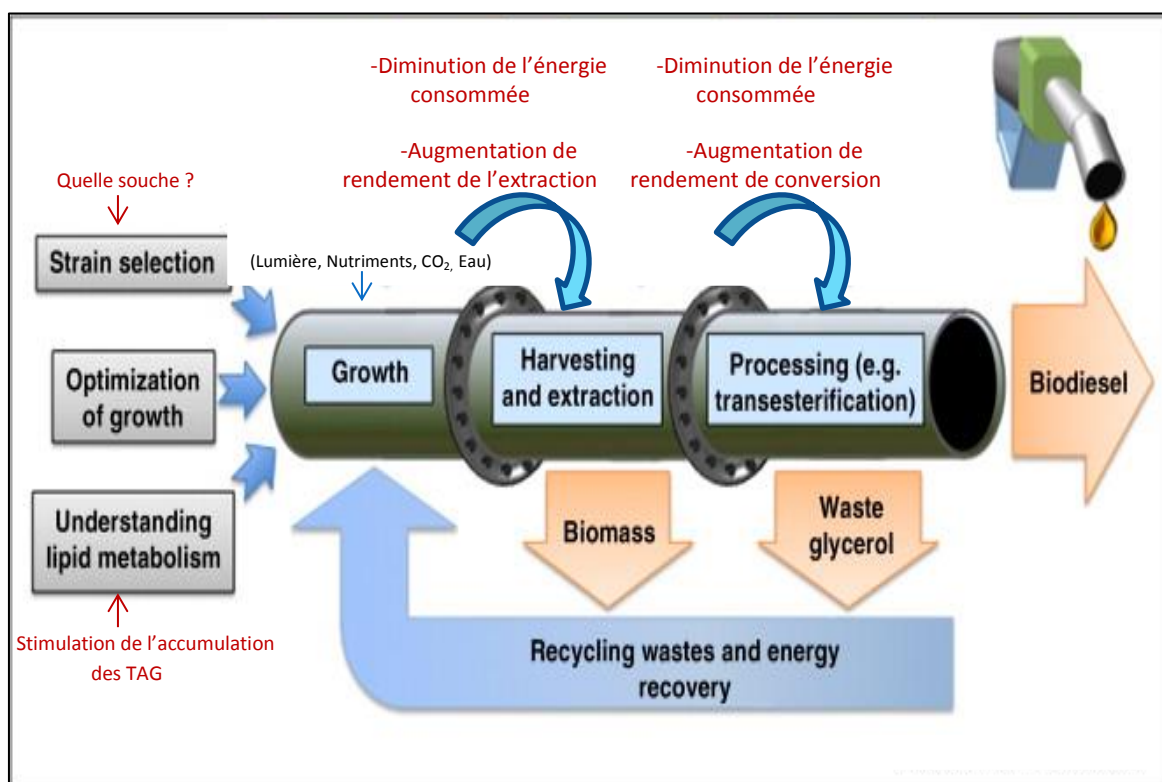


Figure I-21 Processus global de la production de biodiesel à partir des microalgues

Pour que le biodiesel microalgal soit rentable et compétitif au pétrodiesel, il faut réduire le coût de production actuel d'un litre d'huile microalgale de 2.8 \$ à 0.48 \$ environ (Chisti, 2007). Bien que cela reste un défi, cela reste envisageable. Ainsi, l'exploitation de biomasse contenant 70% de huiles pourraient réduire ce coût jusqu'à 0.72 \$. Quel que soit le procédé envisagé, augmenter la productivité des triglycérides par les microalgues est un paramètre important. Dans ce but, la sélection d'une souche «idéale» et l'optimisation des conditions

de cultures pour en optimiser la productivité en lipides d'intérêts sont des prérequis essentiels.

Toutefois, cet objectif bien que clair, n'est pas simple. Cette complexité s'explique par l'énorme biodiversité des microalgues existant dans la nature et la forte dépendance de leur activité photosynthétique ainsi que de leur métabolisme lipidique aux conditions de cultures, et notamment celles qui stimulent l'accumulation des lipides intracellulaires. Le pouvoir d'accumulation des triglycérides n'est également pas le seul critère pour sélectionner une souche idéale. De nombreuses espèces sont connues dans la littérature comme étant capables d'accumuler des grandes quantités des lipides neutres suite à des conditions de stress nutritif et lumineux (ex, carence en azote). Cependant, cela ne se traduit pas forcément par une productivité élevée, du fait de la mauvaise croissance des souches dans les conditions spécifiques qui stimulent l'accumulation des lipides (paragraphe 6.3-). En outre, d'autres critères nécessitent d'être pris en compte lors de la sélection des souches. Ainsi, une souche idéale est une souche qui présente un compromis des caractéristiques suivantes:

- i. Facilité de culture: La facilité de culture se traduit par une adaptation facile et rapide aux conditions de culture rencontrées dans les systèmes de culture. À titre d'exemple de comportements complexifiant l'exploitation industrielle, on peut citer ici la sédimentation ainsi que la formation des biofilms lors de la culture.
- ii. Productivité élevée des triglycérides: une productivité élevée s'explique par un fort potentiel de la souche à accumuler les triglycérides dans des conditions spécifiques de stress tout en gardant un taux de croissance élevé (une bonne croissance photosynthétique).
- iii. Profil adéquat des acides gras: Ce critère est important parce qu'il affecte directement les propriétés finales du biodiesel (Knothe, 2005). Un biodiesel de qualité est celui qui présente une stabilité oxydative importante, un indice de cétane élevé ainsi qu'un point de fusion faible qui se traduit par des bonnes propriétés de viscosité et d'écoulement à froid du biocarburant (Stansell *et al.*, 2012). Ces propriétés physiques et chimiques du biocarburant sont déterminées par la structure des acides gras tels que la longueur de la chaîne carbonée, le degré d'insaturation ainsi que la ramification de la chaîne carbonée (Islam *et al.*, 2013; Knothe, 2005). Des acides gras fortement saturés donnent un indice de cétane et une stabilité oxydative excellents pour le biodiesel (Stansell *et al.*, 2012). Un pourcentage très élevé d'acides gras saturés et de longues chaînes carbonées résulte cependant en une mauvaise viscosité lors de l'écoulement à froid du biocarburant. Au final, un compromis est donc nécessaire entre le pourcentage

des acides gras saturés et insaturés pour obtenir toutes les bonnes propriétés voulues. Cet équilibre est assuré notamment par la présence d'acides gras mono-insaturés (C18:1 et C16:1) dans le profil des TAG (Knothe, 2009).

En se basant aux normes standards européennes (EN14214), un profil de triglycérides est dit adéquat, s'il renferme un pourcentage élevé d'acides gras saturés et mono-insaturés, un pourcentage inférieur à 12 % (m/m) d'acide linoléique, et un pourcentage inférieur à 1 % (m/m) en acides gras polyinsaturés.

- iv. Aptitude à la récupération aisée des lipides intracellulaires: La fragilité cellulaire ou bien la résistance mécanique est un critère également important à prendre en compte lors de la sélection de souches, puisqu'il affecte le coût de consommation d'énergie ainsi que le rendement d'extraction lors de l'étape de récupération des triglycérides, qui sont des molécules intracellulaires. Pour y accéder, la destruction mécanique est en effet souvent utilisée (traitement dit en voie humide), notamment lorsqu'on souhaite éviter d'extraire les lipides sur biomasse sèche. L'étape de séchage est en effet hautement consommatrice d'énergie et menant donc à un bilan au final négatif.

En conclusion, trouver une telle souche «idéale» présentant toutes ces caractéristiques est une tâche très difficile, surtout si on considère la grande biodiversité des algues et le rôle important des conditions de culture.

Cette étude s'est focalisée sur l'enjeu lié à la recherche de souches d'intérêts pour la production de biodiesel algal. Cela a été réalisé par un criblage sur ces différents critères de souches identifiées comme prometteuses dans la littérature. Dans un second temps, un travail a été réalisé sur l'optimisation des conditions de culture dans un but d'améliorer la production des TAG de profil adéquat pour produire un biocarburant de bonne qualité comme déjà discuté ci-dessus.

Chapitre II : Mise en place d'une méthodologie de criblage des souches de microalgues pour la production de biodiesel

Résumé:

Ce chapitre présente le développement, la mise en place ainsi que la validation d'une méthodologie de criblage de souches de microalgues pour la production de biodiesel. Le présent chapitre s'articule en plusieurs parties. La première est une introduction générale qui traite la nécessité de développer une procédure robuste de criblage de souches face à la grande biodiversité des microalgues et présente l'originalité de la méthodologie mise en place par rapport aux autres déjà rapportées dans la littérature. La procédure de criblage ainsi que les différents critères de criblages tenus en compte dans cette étude sont expliqués et détaillés dans la deuxième partie. La troisième partie est consacrée à la description d'une dizaine de souches sélectionnées en se basant sur les données de la littérature et utilisées pour valider la mise en place de la méthodologie de criblage. Les milieux de culture ainsi que les collections d'origine des souches sont aussi précisés. Finalement, les différents photobioréacteurs utilisés pour cultiver les souches ainsi que les différentes méthodes adoptées pour suivre la culture et caractériser les souches (croissance, productivité en biomasse, productivité en lipides (TAG), profil des acides gras, fragilité cellulaire vis-à-vis au cisaillement,...) sont décrits dans la quatrième partie du chapitre.

1 Introduction

Les microalgues constituent une ressource végétale très prometteuse pour la production de biodiesel. Certaines souches ont une capacité importante à accumuler des larges quantités de lipides et notamment sous forme de triglycérides (Tableau I-1). Cependant, la sélection d'une souche de microalgues à partir de la biodiversité reste un enjeu majeur auquel il est difficile de répondre.

L'application au biodiesel, exige en effet de prendre en compte un ensemble important de caractéristiques chez la souche. La quantité de lipides, la qualité ainsi que la cinétique de production doivent être prises en considération. La stabilité et la robustesse de la culture (pas de formation de biofilm, pas de sédimentation cellulaire) et la possibilité de récupérer plus aisément les lipides d'intérêt (TAG) sont des critères également importants.

L'ensemble de ces éléments montre que le choix de la souche est une étape clé de la chaîne de développement de la production de biodiesel, puisqu'il affecte toutes les étapes, de la production d'une biomasse riche en huiles (TAG) jusqu'à la récupération de ces dernières pour les convertir en biocarburant (biodiesel). En partant de ce constat, il a été retenu de développer une procédure de criblage robuste dans l'objectif de réaliser une caractérisation et une comparaison reproductibles et représentatives des souches de microalgues.

Des études visant à identifier des souches prometteuses de microalgues oléagineuses ont déjà été rapportées dans la littérature (Rodolfi *et al.*, 2009; Converti *et al.*, 2009; Gouveia and Oliveira, 2009; Sydney *et al.*, 2011; Breuer *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Hempel *et al.*, 2012; Nascimento *et al.*, 2013; et Breuer *et al.*, 2013). Une grande variation des teneurs de lipides ainsi que des productivités des TAG a été signalée. Toutefois, du fait de conditions expérimentales très différentes, il est apparu difficile de comparer entre elles les données présentées dans ces études. En outre, plusieurs de ces études ne présentent pas le profil des triglycérides voire leur quantification précise (mesure limitée aux lipides totaux), bien que cette fraction des lipides soit celle ciblée pour l'application au biodiesel. Jusqu'à présent, aucune étude n'a donc rapporté une caractérisation complète des souches ainsi qu'une identification qui considère tous les critères de criblage cités précédemment.

En effet, l'originalité de la méthodologie de criblage mise en place dans cette étude est qu'elle prend en compte des critères importants de l'application industrielle finale envisagée. Elle vise à cribler les souches de microalgues dans des photobioréacteurs en conditions opératoires représentatives de l'application finale, selon leur facilité de culture, leur productivité en biomasse et en triglycérides en conditions optimales de croissance

ainsi qu'en conditions de carence azotée. De plus, la qualité des huiles produites par les souches ainsi que leur fragilité cellulaire en vue de la récupération aval des lipides ont été prises en compte lors du criblage.

Une description détaillée de cette procédure est présentée dans la partie suivante.

2 Aperçu de la procédure de criblage

L'approche globale de la procédure de criblage est présentée dans la Figure II-1. Elle consiste en (1) une étape de pré-criblage rapide (*Fast screening*) et (2) une étape de criblage approfondie et de validation finale (*final validation*). La première étape permet dans un premier temps d'adapter les différentes souches de microalgues aux conditions de culture rencontrées dans les PBR, puis de caractériser rapidement les souches en donnant des informations préliminaires liées à leur comportement en PBR, leur productivité en biomasse, leur pouvoir à accumuler les triglycérides ainsi que leur croissance en conditions spécifiques de carence en azote. La seconde étape vise à caractériser complètement les souches prometteuses sélectionnées dans l'étape de pré-criblage dans des conditions de culture hautement contrôlées et représentatives de celles rencontrées en PBR de production, afin de valider les performances des souches et de sélectionner le meilleur candidat pour l'application souhaitée.

2.1- Étape 1: Pré-criblage rapide dans des bacs de criblage spécifiques (*Fast screening*)

Pour l'étape de pré-criblage, les expériences ont été effectuées dans des photobioréacteurs de petites échelles ($V_R=30$ ml) conçus spécialement pour la caractérisation des souches de microalgues. Ces PBR ont été nommés: «Technologie EOSS-PBR», (*EOSS: efficient overproducing strains screening*), qui peuvent fonctionner en mode *batch* aussi bien qu'en mode semi-continu (*Fed batch*). Pendant cette étape de pré-criblage, les différentes souches étudiées ont été criblées sur six critères. Trois ont été obtenus en conditions optimales de croissance, à savoir (1) la productivité en biomasse, (2) le comportement de la culture, et (3) la fragilité cellulaire. Les trois autres ont été mesurés en conditions de carence azotée. Il s'agit de (4) la productivité en biomasse, (5) celle en triglycérides ainsi que (6) le profil des acides gras. Lors de leur cultures en conditions optimales, les souches sont cultivées en mode semi-continu, à un taux de dilution faible et constant ($D=0.01h^{-1}$) afin d'éviter le lessivage des cultures au cours de leur période

d'adaptation aux conditions des PBR EOSS. La croissance de chaque souche a été suivie en mesurant la concentration cellulaire des cultures, jusqu'à que le régime stable de la culture soit atteint. À ce stade où la concentration cellulaire demeure stable, la matière sèche a été mesurée pendant trois jours afin de calculer précisément la productivité en biomasse pour chacune des souches testées. À ce stade, les souches qui ont montré les productivités les plus élevées ont été remises en suspension dans un autre banc de criblage (autre PBR EOSS) fonctionnant en mode batch pour étudier leur potentiel à accumuler les triglycérides dans un milieu de culture dépourvu d'azote. Toutes les cultures ont alors été diluées, dans le but d'obtenir une concentration initiale en biomasse de 0.2 kg.m^{-3} ($C_{X_0} = 0.2 \text{ kg.m}^{-3}$). Les concentrations des lipides et des triglycérides ont été mesurées sur différentes périodes: au début de la mise en batch, au cinquième jour de la carence ainsi qu'à la fin (au onzième jour de carence) qui correspond à la durée approximative nécessaire pour une accumulation maximale. Il est à noter que l'ensemble de protocole de mise en carence a été repris ici d'études antérieures au GEPEA (Van Vooren *et al.*, 2012).

Il faut mentionner ici que l'originalité de cette méthodologie de criblage est qu'elle permet de comparer les performances de la croissance des souches à partir de leur productivité en biomasse sèche à l'état stationnaire, lorsque les cultures deviennent stables, et non plus en se basant sur leur taux de croissance spécifique maximal μ_{max} . En effet, dans la plupart des études de criblage, la caractérisation de la croissance des souches se fait en évaluant leur taux de croissance spécifique et la comparaison de leur réponses photosynthétiques se base sur les valeurs maximales obtenues (μ_{max}). Par définition, ce taux de croissance spécifique maximal est obtenu en absence de toute limitation. Or, comme déjà discuté dans la partie I.7.1.B du chapitre I, dans le cas des cultures de microalgues dans les PBR, et en dehors de toute limitation minérale, la lumière reste toujours un facteur limitant. Il est ainsi impossible de se débarrasser de l'atténuation de la lumière au sein de la culture. Donc, en PBR, la lumière n'est jamais homogène et par conséquent la croissance des microalgues est toujours limitée par la lumière. Autrement dit, la réponse mesurée en croissance est le résultat de cette atténuation de lumière, elle-même dépendante de la concentration en biomasse dans le réacteur pour un flux incident donné (plus de détails se trouvent dans la partie I.7.1.B.1). Au final, l'atténuation de la lumière dans les PBR mène à la mesure d'un taux de croissance moyen, résultat d'un ensemble des valeurs dont chacune correspond à une profondeur et une irradiance données. Par conséquent, la valeur moyenne mesurée sera par définition inférieure à la valeur maximale μ_{max} . La mesure de μ_{max} ne peut être obtenue rigoureusement que dans le cas où l'atténuation de la lumière est absente. Cela revient à avoir une concentration en biomasse nulle dans le réacteur ($C_X = 0$) ce qui est impossible.

Toutes les souches criblées dans cette étude ont été cultivées en mode semi-continu (étape 1) et continu (étape 2). L'intérêt de ces deux modes est d'affranchir les résultats de

la phase d'adaptation des souches, qui est généralement longue dans le cas des cultures des microalgues, comme observé en mode *batch* (Phase de latence). Au final, cette procédure permet de comparer la croissance des souches sur leur productivité en biomasse sèche en régime stable, et dans des conditions de photo-limitation rencontrées dans les PBR. Les résultats obtenus sont alors reproductibles et obtenus pour des conditions représentatives de l'application finale ciblée.

2.2- Étape 2: Criblage approfondi dans des PBR air-lift (1L) et validation finale (*final validation*)

La seconde étape du crible a consisté en une étude détaillée des souches identifiées dans le stade pré-criblage. Ces souches ont été cultivées dans des PBR *flat panel* de type *air-lift* et de volume ($V_R = 1$ L) qui seront décrits et présentés ci-après. Il faut noter que ce volume relativement plus important a autorisé d'effectuer un échantillonnage plus poussé, et par conséquent de caractériser plus en détails les souches et valider leurs performances.

Comme dans l'étape précédente, les souches sélectionnées ont été cultivées dans un premier temps en mode continu, à un taux de dilution faible ($D=0.01h^{-1}$) et dans un milieu de culture optimal. Le but ici était de valider leur productivité en biomasse ainsi que leur fragilité cellulaire en régime stable dans des conditions de cultures optimales. Cela a permis aussi de garantir une récolte de biomasse de qualité constante afin d'alimenter d'autres PBR de 1 L fonctionnant en *batch* en conditions de carence azotée afin de mesurer l'accumulation des triglycérides dans ces conditions. De façon identique au protocole utilisé au stade pré-criblage (Van Vooren *et al.*, 2012), les manipulations de carence soudaine en azote ont été inoculées avec une concentration initiale en biomasse de 0.2 kg.m^{-3} , obtenue en diluant la récolte stable du PBR en continu comme le montre la Figure II-2. La cinétique de croissance de chacune des souches dans les conditions de carence azotée ainsi que celle de production des lipides et des TAG ont été étudiées pendant 11 jours de carence dans les PBR en mode *batch*. Les profils d'acides gras ainsi que la fragilité cellulaire des souches ont été examinés. À la fin de cette étape, cela a permis d'identifier les souches qui ont montré une facilité de culture dans les conditions des PBR, une productivité élevée en triglycérides ayant des profils d'acides gras convenables, une bonne croissance en conditions de culture optimales et carencées, et une fragilité cellulaire intéressante pour une récupération facile des TAG.

Il est important de noter que les expérimentations effectués dans les PBR air-lift (1L) permettent d'avoir accès à une mesure précise des productivités en surface (géométrie plane), qui sont des données indépendantes du PBR et utiles pour l'application au biodiesel

(extrapolation à l'hectare de production), en permettant par exemple de faire une comparaison des rendements à l'hectare aux ressources agricoles (Pruvost et Cornet, 2012). Il est à noter que les PBR-EOSS sont ici moins précis, car il est difficile de définir avec précision la surface éclairée (géométrie cylindrique). Cette grandeur n'a donc pas été calculée pour cette géométrie.

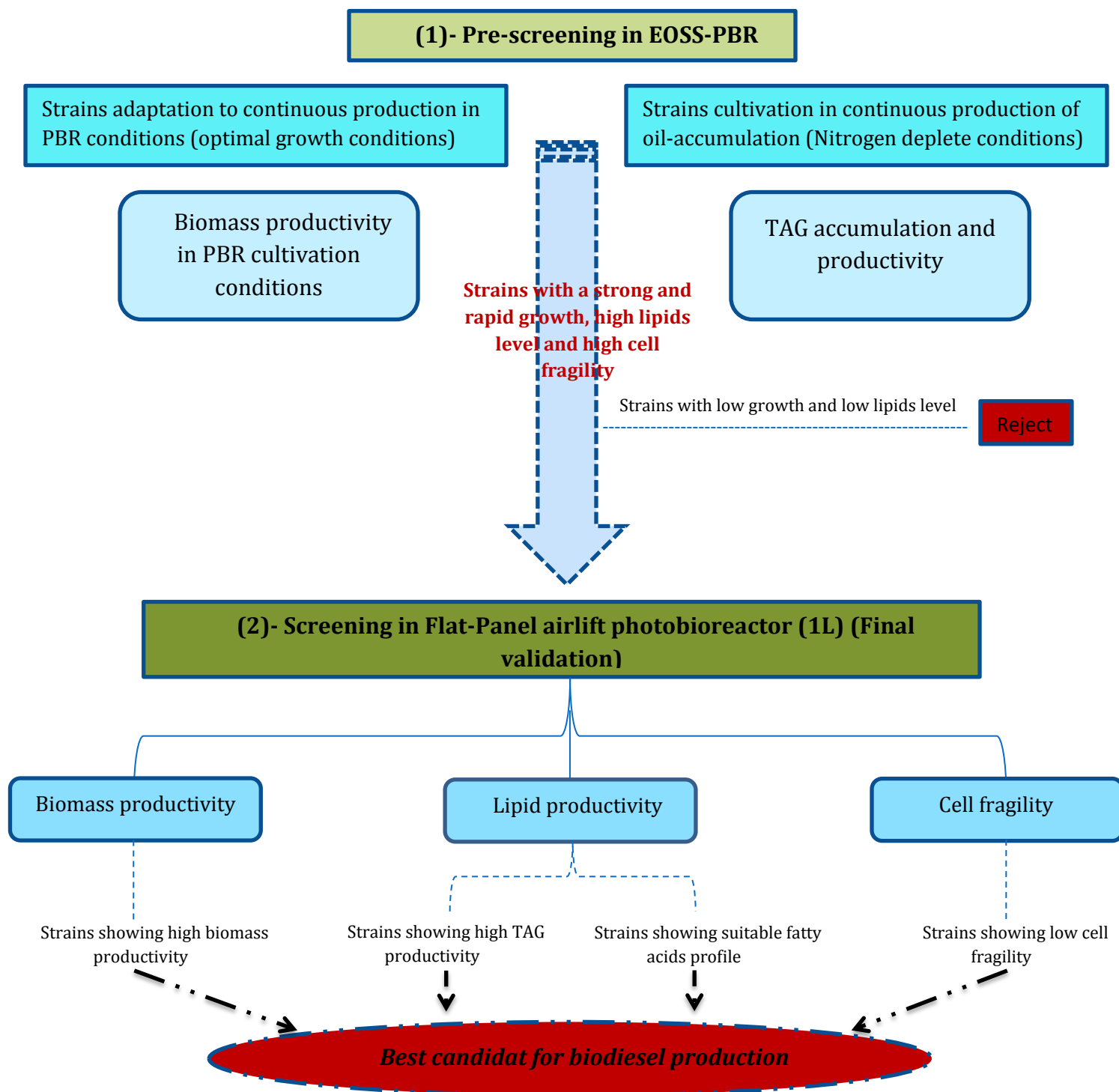


Figure II-1 Représentation schématique de la procédure globale de criblage développée dans cette étude

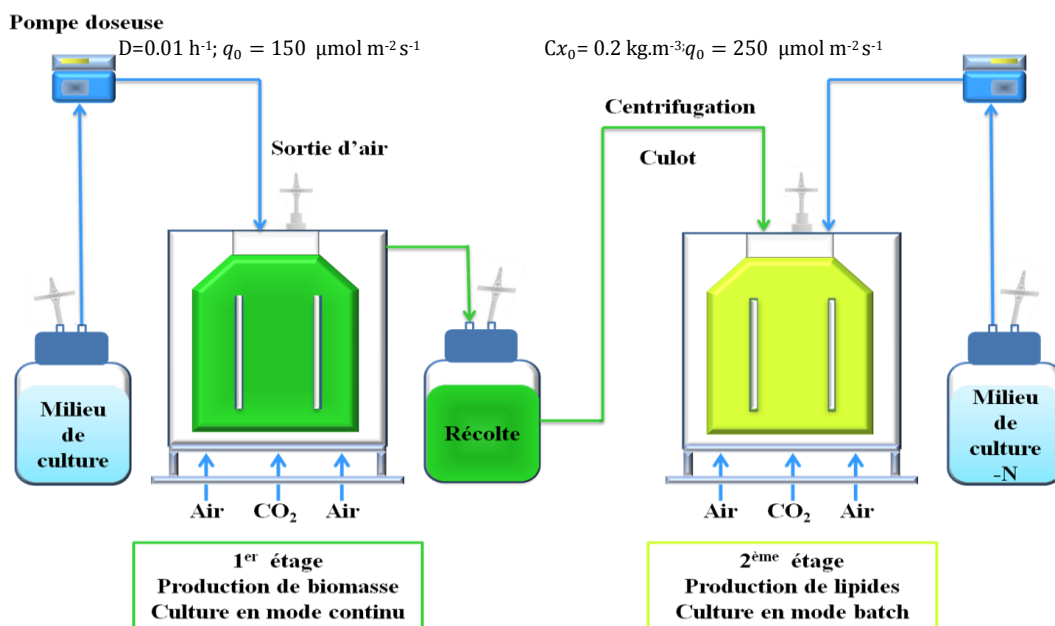


Figure II-2 Représentation schématique du protocole de mise en carence soudaine en azote

3 Souches d'étude

Pour valider la méthodologie de criblage décrite ci-dessus, quinze souches de microalgues ont été retenues sur la base de données bibliographiques.

Pour appréhender la notion de biodiversité des microalgues, des souches appartenant à cinq genres différents de microalgues ont été choisies (*Chlorella*, *Parachlorella*, *Neochloris*, *Scenedesmus* et *Nannochloropsis*). Ces genres sont bien connus pour leur intérêt industriel. Leur classification taxonomique est présentée dans le Tableau II-1. Les noms des différentes souches, l'espèce de laquelle font partie ainsi que leur environnement et l'origine de leur collection sont présentés dans le Tableau II-2. Neuf de ces souches sont marines alors que les autres sont issues d'habitats d'eau douce.

Genre	Division	Classe	Ordre	Famille
<i>Neochloris</i>	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlorococcales	Chlorococcaceae
<i>Chlorella</i>	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	Chlorellales	Chlorellaceae
<i>Parachlorella</i>	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	Chlorellales	Chlorellaceae
<i>Scenedesmus</i>	Chlorophyta	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Scenedesmaceae
<i>Nannochloropsis</i>	Heterokontophyta	Eustigmatophyceae		Eustigmataceae

Tableau II-1 Classification taxonomique des genres de microalgues testés dans cette étude

3.1- Le genre *Neochloris*

Neochloris est un genre de microalgue d'eau douce, appartenant à la famille des Chlorococcaceae et à la classe des Chlorophyceae (microalgues vertes).

Neochloris oleobundans est l'espèce de *Neochloris* la plus rapportée dans la littérature (Tornabene *et al.*, 1983a ; Li *et al.*, 2008a ; Pruvost *et al.*, 2009 ; Gouveia *et al.*, 2009). En effet, cette espèce est parmi les microalgues qui présentent une forte teneur de lipides totaux en absence de toute limitation minérale (23% de son poids sec) (Tornabene *et al.*, 1983; Pruvost *et al.*, 2009). En carence en azote, l'accumulation des lipides totaux augmente (entre 35-54% de son poids sec en lipides totaux) avec accumulation principalement de triglycérides qui constituent 80% des lipides totaux dans ces conditions. Ce pouvoir élevé d'accumulation ainsi que le pourcentage élevé des acides gras saturés et monoinsaturés (50% des acides gras totaux) font de cette espèce une source intéressante pour la production de lipides à usage biodiesel (Tornabene *et al.*, 1983).

Cependant, il n'existe pas beaucoup d'études systématiques dans la littérature concernant l'application de cette espèce pour la production de biodiesel, la plupart des études existantes étaient focalisées sur la valeur nutritionnelle de cette microalgue dans le domaine de l'aquaculture. Récemment, l'intérêt de *Neochloris oleobundans* pour la production des lipides a été confirmé avec une capacité à accumuler jusqu'à 40% de son poids sec en lipides totaux ce qui correspond à une productivité lipidiques de l'ordre de 0.133 kg.m⁻³.j⁻¹ (Li *et al.*, 2008b).

Dans cette étude, la souche *Neochloris oleobundans* UTEX 1185 a été criblée. Cette souche a été déjà étudiée pour la production de biodiesel. Une accumulation en lipides totaux jusqu'à 56% de son poids sec a été mesurée, avec des profils d'acides gras appropriés à l'application biodiesel (Gouveia *et al.*, 2009).

Nom de la souche	Espèce	Abréviation	Environnement	Collection de culture
<i>Nannochloropsis occulata</i> 525	<i>occulata</i>	CCMP525	Eau de mer	CCMP (Culture Collection of Marine Phytoplankton)
<i>Nannochloropsis occulata</i> Alphabiotech	<i>occulata</i>	N.o AB	Eau de mer	Alphabiotech
<i>Nannochloropsis salina</i> 537	<i>salina</i>	CCMP537	Eau de mer	CCMP (Culture Collection of Marine Phytoplankton)
<i>Nannochloropsis salina</i> 538	<i>salina</i>	CCMP538	Eau de mer	CCMP (Culture Collection of Marine Phytoplankton)
<i>Nannochloropsis limnetica</i> 505	<i>limnetica</i>	CCMP505	Eau douce	CCMP (Culture Collection of Marine Phytoplankton)
<i>Nannochloropsis granulata</i> 529	<i>granulata</i>	CCMP529	Eau de mer	CCMP (Culture Collection of Marine Phytoplankton)
<i>Nannochloropsis gaditana</i> 527	<i>gadicana</i>	CCMP527	Eau de mer	CCMP (Culture Collection of Marine Phytoplankton)
<i>Nannochloropsis</i> sp. 1779	<i>inconnue</i>	CCMP1779	Eau de mer	CCMP (Culture Collection of Marine Phytoplankton)
<i>Nannochloropsis</i> sp. 531	<i>inconnue</i>	CCMP531	Eau de mer	CCMP (Culture Collection of Marine Phytoplankton)
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	<i>océanica</i>	N.o (collection privée)	Eau de mer	Collection privée
<i>Scenedesmus obliquus</i> 393	<i>obliquus</i>	UTEX393	Eau douce	UTEX (culture collection of algae at the University of Texas at Austin)
<i>Scenedesmus</i> 1589	<i>sp. inconnue</i>	UTEX1589	Eau douce	UTEX (culture collection of algae at the University of Texas at Austin)
<i>Néochloris oléobundans</i> 1185	<i>oleobundans</i>	UTEX1185	Eau douce	UTEX (culture collection of algae at the University of Texas at Austin)
<i>Chlorella</i> 211/19	<i>vulgaris</i>	CCAP211/19	Eau douce	CCAP (Culture Collection of algae and protozoa)
<i>Parachlorella kessleri</i> 2229	<i>kessleri</i>	UTEX2229	Eau douce	UTEX (culture collection of algae at the University of Texas at Austin)

Tableau II-2 Nom, espèce, environnement et origine des souches criblées dans cette étude

3.2- Le genre *Scenedesmus*

Scenedesmus appartient à la classe des Chlorophyceae, l'ordre des Sphaeropleales et la famille des *Scenedesmaceae*. Ce sont des microalgues vertes d'eau douce (Chlorophyta). Les cellules non motiles sont couramment organisées en forme de cénobies (Figure II-3) avec un nombre fixe de cellules dans une colonie: des multiples de deux, de quatre ou de huit cellules disposées obliquement en séries distinctes. Ces dernières sont fusiformes, égales, un peu ventrues au milieu, aigues à l'extrémité libre et subaiguës ou arrondies à l'intérieur. Les cellules mononucléaires ont, chacune, un seul chloroplaste pariétal en forme de plaque, stratifié qui constitue la majeure partie du volume de la cellule et le plus souvent un pyrénoïde (un granulé de protéine et de l'emplacement de la formation de l'amidon). À noter qu'en milieu à faible phosphore ou de faible concentration en sel, *Scenedesmus* est amenée à une croissance unicellulaire, formant environ des cellules elliptiques de 10 µm de longueur.

Le mode le plus courant de reproduction de *Scenedesmus obliquus* est asexué. Une étape mobile dans le cycle de développement de *Scenedesmus obliquus* (zoospores) est un phénomène très rare dans la nature, et ne peut être observé que dans des conditions de stress particuliers comme la privation d'azote.

Le genre *Scenedesmus* est très robuste et a été utilisé avec succès pour traiter des effluents tels que ceux des eaux usées de l'usine d'olive, du biogaz ou des terrains municipaux (Zhen-Feng *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2010). *Scenedesmus* est caractérisée par une tolérance aux hautes températures, une résistance à des irradiances intenses ainsi qu'une tolérance à de larges gammes de pH (entre 5 et 10) bien que celui optimal soit de l'ordre de 7.5 à 8.0. De plus, *Scenedesmus* est un producteur primaire important et source de nourriture pour les niveaux trophiques supérieurs. C'est également un bio-indicateur commun des changements physico-chimiques dans des conditions environnementales. Ce genre est donc couramment utilisé pour détecter la présence de nutriments ou de toxines résultant de rejets anthropiques sur les systèmes aquatiques. Elle est également considérée comme un candidat potentiel pour la fixation et l'atténuation du CO₂ (Ho *et al.*, 2010).

L'espèce *Scenedesmus obliquus* est la plus connue de ce genre. La concentration des lipides est faible dans les cellules cultivées en conditions favorables de croissance (12.7% du poids sec) (Mandal and Mallick, 2009). Par contre l'accumulation des lipides est stimulée lorsque les conditions deviennent défavorables.

En ce qui concerne la composition biochimique, les composants majeurs de la biomasse de *S. obliquus* dans des conditions optimales de croissance sont des protéines (50-56 en pourcentage de poids sec), les carbohydrates (10-17%) (l'accumulation des carbohydrates

est stimulée suite à une limitation azotée et de fortes intensités lumineuses), et minoritairement les lipides (12-14%) (Richmond, 2008b). Comme tout Chlorophyte, *Scenedesmus* possède de la chlorophylle *a* et *b* et des caroténoïdes primaires tels que la lutéine, ainsi que des caroténoïdes secondaires et de l'astaxanthine comme produits accumulés sous conditions particulières d'accumulation (température et irradiation élevées).

En conditions de carence en azote, les lipides totaux représentent 43 % de la matière sèche. De même, en milieu carencé en phosphore, *Scenedesmus obliquus* peut accumuler plus de 30 % de son poids sec en lipides totaux (Mandal and Mallick, 2009). Les acides palmitiques et oléiques sont les constituants majeurs des lipides en ces conditions d'accumulation. Cela rend donc cette espèce intéressante pour la production de biodiesel.

En se basant sur les données de la littérature scientifique dans le domaine des microalgues, la souche *S. obliquus* UTEX 393 a été choisie. Elle est parmi les souches prometteuses pour la production des lipides lorsqu'elle est cultivée dans un milieu dépourvu d'azote. Sous ces conditions spécifiques, les triglycérides représentent plus de 35 % de son poids sec, ce qui est équivalent à une productivité de $0.322 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ (Breuer *et al.*, 2012).



Figure II-3 Photo d'une cénobie formée de huit cellules de la microalgue *Scenedesmus obliquus* (D'après Qin *et al.*, 2008)

3.3- La famille «Chlorellaceae»: genres *Chlorella* et *Parachlorella*

Le genre *Chlorella* est parmi les microalgues vertes les plus répandues et étudiées (Přibyl *et al.*, 2012a). En 1890, le microbiologiste Beijerinck a décrit *Chlorella vulgaris* «green ball», l'espèce type du genre *Chlorella*. Cette espèce a été isolée à partir d'une prolifération d'algues, issue d'une mare peu profonde près de Delft, aux Pays-Bas. Aujourd'hui, plus de 100 espèces marines et d'eau douce de *Chlorella* ont été décrites (Krienitz *et al.*, 2004).

Une révision du genre *Chlorella* principalement basée sur des données biochimiques et moléculaires a été effectuée en 1999 (Huss *et al.*, 1999). Dans cette étude, l'analyse de la petite sous-unité du gène de l'ARN ribosomal (18S rRNA) a permis de diviser le genre *Chlorella* en quatre espèces: *C. vulgaris* (espèce type), *C. kessleri* (Fott & Nováková), *C. lobophora* (Andreyeva) et *C. sorokiniana* (Shihira & Krauss). Comme dans le cas du genre *Nannochloropsis*, la distinction entre les différentes espèces grâce aux critères morphologiques est difficile voire impossible (Huss *et al.*, 1999).

Par la suite, en 2004, la séquence du gène 18S rRNA qui est conservative ainsi que celle de la région ITS2 qui est très variable ont été déterminées complètement, pour élucider la position phylogénétique de plusieurs genres et espèces de la famille Chlorellaceae, qui est une lignée monophylétique de la classe Trebouxiophyceae. En se basant sur cette étude, *C. kessleri* a été transférée à un nouveau genre, le genre «*Parachlorella*» (Krienitz *et al.*, 2004). Donc, en se basant sur des données moléculaires, l'arbre phylogénétique révèle qu'il y a deux genres sœurs appartenant à la famille des Chlorellaceae, le genre «*Chlorella*» et le nouveau genre «*Parachlorella*».

Ces deux genres se distinguent par la substitution de 35 nucléotides au niveau du gène 18S rRNA, et 88 nucléotides au niveau des hélices de la région ITS2. Plus de détails ont été mentionnés dans la publication de Krienitz *et al.*, (2004). Par ailleurs, ces deux genres se diffèrent aussi par la structure de la paroi cellulaire des cellules filles lors de la division cellulaire qui s'effectue par le mode auto-sporulation, qui est le mode de propagation le plus connu pour les algues unicellulaires (Yamamoto *et al.*, 2005).

Les souches de microalgues appartenant à la famille des Chlorellaceae ont la capacité d'accumuler l'amidon et les lipides en conditions de limitation minérale (Takeshita *et al.*, 2014). Cette capacité d'accumulation des lipides en plus de leur croissance rapide, leur facilité de culture ainsi que leur adaptation aux changements de températures (2-42 °C) les rendent intéressantes pour la production de biodiesel (Mata *et al.*, 2010).

Dans cette étude, deux souches de l'espèce *Chlorella vulgaris* et *Parachlorella kessleri* ont été choisies pour être caractérisées et criblées.

3.3-A. *Chlorella vulgaris*

Comme déjà mentionné, *Chlorella vulgaris* est l'espèce type du genre *Chlorella*. C'est une espèce d'eau douce, dont les cellules se caractérisent par une forme sphérique comme le montre la Figure II-4. C'est pour cette raison, que le microbiologiste Beijerinck l'a nommée «green ball». Le diamètre des cellules se situe entre 2 et 10 μm (Yamamoto *et al.*, 2005). Comme c'est illustré dans la Figure II-4, la cellule renferme des éléments structuraux identiques aux plantes supérieures: un cytoplasme contient un noyau, un chloroplaste, des mitochondries, etc ... Elle est entourée d'une paroi cellulaire rigide (Safi *et al.*, 2014).

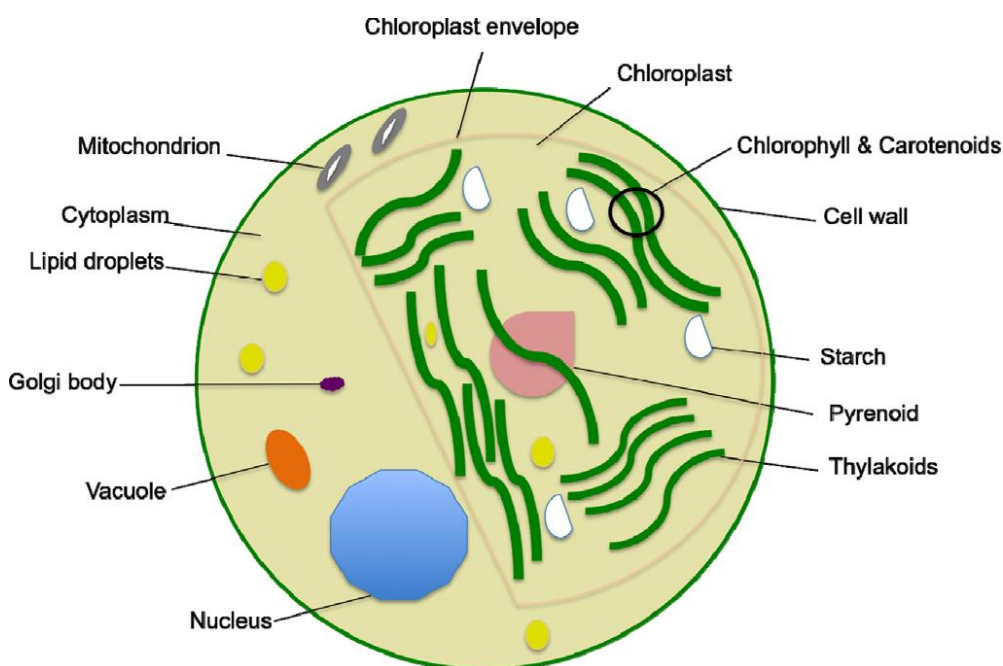


Figure II-4 Schéma ultrastructure de *C. vulgaris* représentant les différentes organelles de la cellule (Safi *et al.*, 2014)

L'espèce *Chlorella vulgaris* est bien connue, du fait qu'elle est largement étudiée depuis plusieurs décennies. Elle se caractérise par sa teneur élevée en pigments (notamment les chlorophylles a, représentant entre 4 et 7% de sa matière sèche). Les protéines constituent 42-58% de son poids sec (Seyfabadi *et al.*, 2011), cette quantité variant selon les conditions de culture. À noter que ces protéines jouent des rôles capitaux dans la croissance, la réparation et la maintenance de la cellule. De plus, elles sont impliquées dans les mécanismes de la signalisation cellulaires et de la régulation de l'activité cellulaire (Safi *et*

al., 2014). Les carbohydrates représentent 20 % de la matière sèche, cette quantité changeant aussi en variant les conditions de croissances. Par exemple suite à une limitation en azote, le taux de sucres totaux peut atteindre jusqu'à 55 % de la matière sèche (Choix *et al.*, 2012). Ces carbohydrates regroupent des polysaccharides comme l'amidon et la cellulose. L'amidon est le polysaccharide le plus abondant chez *Chlorella vulgaris*. Il est localisé généralement à l'intérieur des chloroplastes, et sert comme une réserve énergétique pour la cellule, alors que la cellulose est un constituant majeur de la paroi cellulaire. C'est un polysaccharide de structure de haute résistance.

En ce qui concerne le contenu en lipides, les souches appartenant à cette espèce contiennent jusqu'à 15% de leur matière sèche en lipides totaux sous des conditions optimales de croissance (Přibyl *et al.*, 2012a). Toutefois, ce pourcentage peut être augmenté jusqu'à 40 à 57% , lorsque les cellules sont cultivées dans des milieux limités en nutriments (Přibyl *et al.*, 2012a). En plus de sa capacité à accumuler les lipides, les souches de cette espèce gardent une bonne croissance dans des conditions défavorables ce qui aboutit à une productivité intéressante en lipides, de l'ordre de 0.4 à $0.6 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ (Přibyl *et al.*, 2012a).

En plus d'être une bonne productrice de lipides, le profil en acides gras de *Chlorella vulgaris* est riche en acide gras saturés. Son temps de dédoublement rapide (environ 12 heures) ainsi que sa résistance aux contaminations bactériennes et virales ainsi qu'aux différents stress physiques (cisaillement, pression,...) du fait de la rigidité de sa paroi cellulaire (Yamamoto *et al.*, 2005) rendent cette espèce fortement intéressante pour la production de biodiesel à grande échelle.

Il a été donc choisi d'inclure cette espèce dans la procédure de criblage. Dans cette étude la souche *Chlorella vulgaris* CCAP 211-19, a été examinée.

3.3-B. *Parachlorella kessleri*

Il s'agit d'une espèce d'eau douce. Cette espèce se caractérise par une paroi cellulaire épaisse et rigide (Yamamoto *et al.*, 2005). L'épaisseur de la paroi des cellules varie dans l'intervalle [54-59 nm] selon les phases du cycle de la division cellulaire. Elle augmente durant le cycle cellulaire (au fur et à mesure de la phase de maturation des autospores). La rigidité de la paroi s'explique par sa composition en β -1, 3-glucan et N-acétyl- β -D-glucosamine (Yamamoto *et al.*, 2005) .

En outre, *Parachlorella kessleri* est une espèce facile à cultiver. Elle se caractérise par une croissance rapide (Li *et al.*, 2013a). Les cellules ont un diamètre moyen de l'ordre de 4.3 μm avec une majorité située entre 3.5 et 6.6 μm .

En conditions optimales de croissance, les cellules contiennent une quantité faible en lipides (1-10 % du poids sec), par contre elles accumulent des réserves sous forme d'amidon (Li *et al.*, 2013b). L'accumulation est cependant forte (jusqu'à 60% du poids sec) lorsque les cellules sont soumises à un stress nutritif (limitation en macroélément : azote, soufre et phosphore) (Li *et al.*, 2013b). Suite à une carence en soufre, il a ainsi été montré une accumulation d'amidon dans un premier temps (3 fois plus qu'en conditions optimales de croissance). Cette accumulation précède l'accumulation des lipides qui commencent à augmenter dans un deuxième temps (2.4 fois plus qu'en conditions optimales de croissance) simultanément avec la diminution du taux d'amidon déjà accumulé (Mizuno *et al.*, 2013; Takeshita *et al.*, 2014). En outre, en réponse à la limitation en soufre, la composition des acides gras est altérée. Le pourcentage des acides gras saturés passe de 24.3 % en conditions optimales à 59.7% en milieu dépourvu de soufre.

En plus de cette capacité à accumuler les lipides dans des conditions de limitation minérale, les souches de cette espèce sont caractérisées par le maintien d'une bonne croissance en conditions défavorables de culture, aboutissant à des productivités intéressantes en lipides (de l'ordre de 0.576 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{j}^{-1}$) (Přibyl *et al.*, 2012a).

La souche *P. kessleri* UTEX 2229, a été étudiée ici (Figure II-5). L'accumulation des triglycérides à l'intérieur des cellules en conditions de carence en azote a déjà été examinée dans la littérature pour cette souche (Kobayashi *et al.*, 2013). En milieu de culture optimal, les cellules contiennent 0.3% de leur poids sec en triglycérides (Kobayashi *et al.*, 2013). Suite à une carence azotée ce pourcentage augmente jusqu'à 17% (Kobayashi *et al.*, 2013).

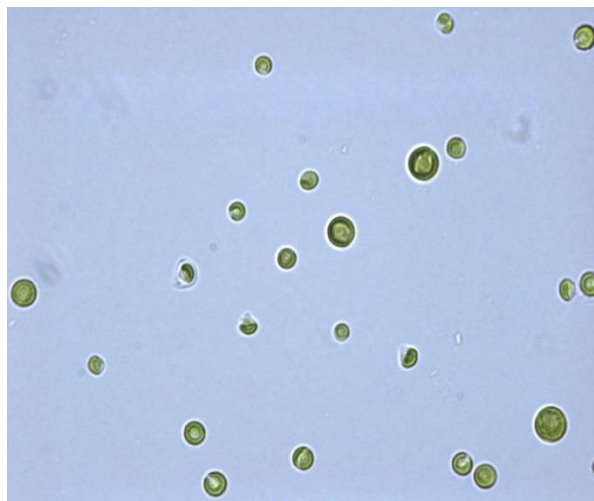


Figure II-5 Photo de la souche *Parachlorella kessleri* UTEX 2229

3.4- Le genre *Nannochloropsis*

Le genre *Nannochloropsis* a été décrit en premier par Hibberd (1981). C'est une microalgue eucaryotique appartenant à la classe Eustigmatophyceae et à la famille Eustigmataceae déjà décrite dans le chapitre I.

Nannochloropsis est un genre comprenant environ 6 espèces, dont cinq sont largement distribuées dans le plancton des écosystèmes marins, en particulier dans les eaux côtières, et sont reconnues dans les habitats salins (*N. occulata*, *N. salina*, *N. granulata*, *N. oceanica* et *N. gaditana*) (Andersen *et al.*, 1998) tandis que la sixième espèce (*N. limnetica*) se développe dans les eaux douces.

Toutes les espèces de *Nannochloropsis* sont des petites sphères dont le diamètre des cellules est inférieur à 5 μm , non motiles qui n'expriment pas des caractéristiques morphologiques distinctes, et ne peuvent pas être distinguées par la microscopie optique ou électronique (Fawley and Fawley, 2007). La caractérisation se fait principalement par le gène *rbcl* et l'analyse des séquences d'ADNr18S.

Ce genre est bien connu comme étant une source potentielle d'acide eicosapentanoïque (20:5 ω 3), un acide gras polyinsaturé utilisé en consommation humaine pour la prévention de plusieurs maladies. *Nannochloropsis* est ainsi utilisé avec succès comme un aliment dans l'aquaculture marine (Watanabe *et al.*, 1983) et cultivée à une échelle industrielle en raison de sa forte teneur en acides gras.

Récemment, le genre *Nannochloropsis* a été étudié pour la production de biocarburants du fait d'une grande capacité à accumuler des quantités importantes de lipides et surtout des lipides neutres (TAG) en réponse à des contraintes telles que la carence en azote et/ou en phosphore (Rodolfi *et al.*, 2009; Gouveia and Oliveira, 2009). Les microalgues appartenant à ce genre sont particulièrement intéressantes en raison de leur capacité à accumuler des grandes quantités de lipides, qui peuvent atteindre des concentrations allant jusqu'à 65-70% du poids sec total (Boussiba *et al.*, 1987; Hodgson *et al.*, 1991). Par conséquent, ce genre a émergé ces dernières années comme l'un des meilleurs candidats pour la production de biodiesel.

Vue la littérature scientifique importante rapportant l'intérêt de *Nannochloropsis* et particulièrement son fort potentiel à produire les TAG, 10 souches appartenant aux six espèces différentes de *Nannochloropsis* (Tableau II-2) ont été sélectionnées pour être étudiées et caractérisées dans cette étude.

4 Culture des souches en conditions axéniques

4.1- Élaboration des milieux de culture

Seule la croissance photoautotrophe a été étudiée. Les milieux de culture adoptés pour cultiver toutes les souches déjà citées ne contiennent donc aucun élément organique. Ils sont intégralement reconstitués à partir d'eau osmosée et de sels minéraux.

Les souches marines, ont été cultivées dans l'eau de mer artificielle (Berges *et al.*, 2001), enrichie avec le milieu Conway modifié noté 3N3P (3ml Conway 3N3P/1L eau de mer artificielle). Le pH et la salinité du milieu final sont ajustés à 8 et 25 g.L⁻¹ respectivement. La composition finale de ce milieu est présentée dans le Tableau II-3. Les souches d'eau douce ont été cultivées sur un milieu nommé GVV-Neo modifié. Il s'agit d'un milieu BBM (Bold Basal Medium) modifié dont la composition est donnée dans le Tableau II-4. Ce milieu a été utilisé pour les précultures et pour la croissance en photobioréacteurs. Le pH de ce milieu est fixé à 8 comme dans le cas du milieu des souches marines, puisque le pH optimal de croissance de nombreuses souches d'eau douce est proche de 8 (Kong *et al.*, 2010).

	Composé	Concentration finale (mol.L ⁻¹)
Milieu Conway 3N3P	<i>Solution de macronutriments</i>	
	Na ₂ EDTA, (H ₂ O) ₂	3.63.10 ⁻⁴
	NaNO ₃	1.06. 10 ⁻²
	H ₃ BO ₃	1.63. 10 ⁻³
	NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	1.17. 10 ⁻³
	MnCl ₂ , (H ₂ O) ₄	5.45. 10 ⁻⁶
	FeCl ₃ , (H ₂ O) ₆	1.44. 10 ⁻⁵
	<i>Solution des métaux de traces</i>	
	ZnCl ₂	4.61.10 ⁻⁷
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	2.52.10 ⁻⁷
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	2.4.10 ⁻⁷
	<i>Solution de molybdate</i>	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , (H ₂ O) ₄	1.53.10 ⁻⁷
Eau de mer artificielle	NaCl	2.49.10 ⁻¹
	Na ₂ SO ₄	3.43.10 ⁻²
	KCl	5.5.10 ⁻³
	NaHCO ₃	1.5.10 ⁻² (Erlenmeyer)/1.42.10 ⁻³ (PBR)
	H ₃ BO ₃	2.6.10 ⁻⁴
	NaF	4.55.10 ⁻⁵
	MgCl ₂ , (H ₂ O) ₆	3.24.10 ⁻²
	CaCl ₂	8.3.10 ⁻³
	KBr	4.97.10 ⁻⁴

Tableau II-3 Composition du milieu de culture des souches marines

Composé	Concentration finale (mol.L ⁻¹)
Na ₂ EDTA, (H ₂ O) ₂	1.22.10 ⁻⁴
NaNO ₃	8.02.10 ⁻³
MgSO ₄ , 7H ₂ O	8.3.10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	7.833.10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	8.8.10 ⁻⁴
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1.55.10 ⁻⁴
FeSO ₄ , 7H ₂ O	4.58.10 ⁻⁵
Additif 1	
ZnSO ₄ , (H ₂ O) ₇	7.72.10 ⁻⁷
CuSO ₄	4.95.10 ⁻⁷
MnCl ₂ , (H ₂ O) ₄	9.15.10 ⁻⁶
H ₃ BO ₃	4.63.10 ⁻⁵
Co(NO ₃) ₂ , (H ₂ O) ₆	1.51.10 ⁻⁷
Additif 2	
Na ₂ MoO ₄	1.06.10 ⁻⁶
NaHCO ₃	1.5.10 ⁻² (Erlenmeyer)/0.5.10 ⁻² (PBR)

Tableau II-4 Composition du milieu de culture des souches d'eau douce (GVV-Neo) (Pruvost *et al.*, 2009)

Il faut noter que la composition du milieu ci-dessus utilisé pour cultiver les différentes souches est ajustée afin d'atteindre une concentration de 1 kg.m⁻³ en biomasse sèche sans limitation minérale, pour garantir des cultures limitées uniquement par la lumière (conditions de photo-limitation).

4.2- Préculture et entretien des souches

Avant de cultiver les souches dans les PBR, les souches ont été entretenues dans des erlenmeyers de 250 ml. L'intérêt de cette étape est d'adapter les souches aux conditions de culture en milieu liquide (phase d'adaptation pour le passage du milieu solide sur boîte ou tube au milieu liquide en fiole Erlenmeyer, ou pour le passage d'un milieu de culture liquide à un autre de composition différente). Il s'agit donc d'un repiquage régulier des souches, effectué à la fin de la phase exponentielle de leur croissance de façon à avoir en permanence du matériel biologique ayant des états physiologiques les plus équivalents possibles pour l'ensemencement du PBR, et pour éviter les risques de mutation liées au vieillissement des cultures.

Huit souches marines (*N. oculata* CCMP525, *N. salina* CCMP537, *N. salina* CCMP538, *N. limnetica* CCMP505, *N. sp* CCMP1179, *N. sp* CCMP531, *N. granulata* CCMP529 et *N. gaditana* CCMP527) ont été fournies par le laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues (LB3M) du Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) de Cadarache, France. La souche *Nannochloropsis océanica* est issue d'une collection privée, *Nannochloropsis oculata* Alphabiotech a été obtenue à partir de la collection de l'entreprise Alphabiotech (Asserac, France). À noter que cette souche a servi de référence dans le programme Shamash. Toutes ces souches ont été reçues dans des tubes stériles de 15 ml, en milieu de culture liquide. Dans le but de les adapter aux conditions de culture rencontrées dans les PBR, un repiquage régulier a été appliqué pour chacune d'elles. Ainsi, chaque souche a été repiquée quatre fois dans des erlenmeyers de 250 ml contenant de l'eau de mer artificielle enrichie par le Conway 3N3P dont la composition finale est présentée dans le Tableau II-3. Lors de ce stade de pré-culture, le pH de milieu était fixé à 7.5 pour éviter le problème de précipitation du milieu lors de la croissance des microalgues. Chaque erlenmeyer a été bouché par du coton enveloppé avec une bande de gaze stérile permettant les échanges gazeux nécessaires pour la croissance et empêchant la contamination. Les manipulations de repiquage sont réalisées sous une hotte à flux laminaire à côté du bec, et d'une façon régulière (chaque semaine). Ces cultures en mode *batch* sont maintenues 24/24 heures sous une illumination continue d'intensité modérée ($70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), à température ambiante de 25°C et en perpétuelle agitation afin de prévenir la décantation des cellules sans les soumettre au cisaillement.

Les souches d'eau douce. *Scenedesmus obliquus* UTEX393, *Scenedesmus sp.* UTEX1589 et *Parachlorella Kessleri* UTEX2229 ont été reçues de la collection UTEX sur gélose dans des tubes stériles (milieu de culture solide). *Chlorella vulgaris* CCAP211/19 et *Neochloris oleobundans* UTEX1185 étaient déjà disponibles dans le laboratoire GEPEA, donc fournies sur milieu liquide. Comme pour les souches marines, ces souches ont été repiquées régulièrement quatre fois dans des erlenmeyers contenant un milieu de culture unique, le milieu GVV-Neo présenté précédemment dans le Tableau II-4. Après cette phase d'adaptation en erlenmeyers aux nouvelles compositions de milieu de culture, ces précultures ont servi à inoculer les PBR.

4.3- Culture des souches en conditions contrôlées et description des PBR

Après leur préculture dans les erlenmeyers, toutes les souches (Tableau II-2) ont été cultivées dans des conditions contrôlées des PBR (systèmes clos). Des milieux de culture de composition identique à ceux employés dans les erlenmeyers ont été utilisés. Pour réaliser

la procédure de criblage des souches déjà décrite, deux technologies différentes de photobioréacteurs ont été utilisées, en fonction de l'étude souhaitée. Pendant la première étape de la méthodologie de criblage, les souches ont été cultivées dans une technologie spécifique appelée «EOSS-PBR», alors que pendant la deuxième, les manipulations étaient effectuées dans des photobioréacteurs *airlift* plans. Quel que soit le type de PBR utilisé, les systèmes ont été nettoyés et stérilisés avant chaque culture avec une solution d'acide peroxyacétique diluée dans l'eau distillée (3% en volume, pendant 20 minutes).

4.3-A. «EOSS-PBR»

«EOSS-PBR» (*Efficient Overproducing Strains Screening-PBR*), comme son nom indique, est une technologie spécifique dédiée au criblage des souches. Il s'agit d'un banc de criblage représenté par la figure II-6. Cette technologie, a été mise en place récemment au laboratoire GEPEA. Actuellement, quatre bancs de criblages sont fonctionnels. Comme le montre la figure II-6, EOSS-PBR se compose de 6 PBR de petite échelle, séparés l'un de l'autre, et qui peuvent fonctionner en parallèle. Ce sont des colonnes à bulles (PBR tubulaires) entièrement fabriqués en polyméthacrylate de méthyle (PMMA), chacune ayant un volume réactionnel $V_R = 30\text{ml}$, et un diamètre de 15 mm. Ce système de culture a été éclairé par un ensemble de 4 tubes fluorescents blancs de façon à obtenir une intensité lumineuse constante de l'ordre de $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour les expérimentations de croissance dans les conditions normales (sans stress nutritif), et $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dans le cas des manipulations de carence soudaine en azote. L'intensité lumineuse peut être changée simplement en changeant la tension (V) des tubes. Le pH et la température ont été réglés à 8 et 25 °C respectivement. Cette valeur de pH a été obtenue par une injection continue d'air à 2 % de CO_2 (en volume) à un débit de 3 ml / min.

Les PBR EOSS peuvent fonctionner en mode *batch* aussi bien qu'en mode semi-continu. Le système est entièrement automatisé en termes d'injection du produit et de la récolte de biomasse pour permettre une culture semi-continue, avec la possibilité de définir des séquences d'alimentation ou de récolte dans chaque tube, une séquence étant définie par son temps d'application, sa durée, et le débit d'alimentation / de récolte. Dans cette étude, comme le but était de cribler les souches dans les mêmes conditions de culture, les mêmes paramètres ont été appliqués à tous les tubes.

Au final, le PBR EOSS apparaît comme une technologie utile pour adapter et caractériser des souches de microalgues dans des conditions représentatives de celles rencontrées dans des PBR de volumes plus importants (culture photolimitée en suspension par principe air-

lift). Cette technologie permet de cribler simultanément 6 souches de microalgues dans les mêmes conditions de culture, avec une possibilité de cribler 12 souches si on met deux bancs l'un à côté de l'autre devant un ensemble des tubes fluorescents. Il est ainsi possible de réaliser un criblage rapide, et d'obtenir des informations préliminaires liées à la croissance et au comportement des souches dans des systèmes comme les PBR. Leur métabolisme lipidique (potentiel d'accumulation des triglycérides) peut aussi être analysé pour au final réaliser une comparaison reproductible et significative des souches, et sélectionner les souches les plus prometteuses pour l'application souhaitée.

Dans cette étude, cette technologie a été utilisée lors de la première étape de la procédure de criblage. Comme détaillé dans la partie 2 de ce chapitre, toutes les souches marines et d'eau douces ont été cultivées et examinées pour leur comportement en PBR et leur productivité en biomasse en conditions optimales de croissance, leur capacité à accumuler les triglycérides ainsi que leur croissance en conditions spécifiques de carence en azote. En se basant sur les données expérimentales de cette phase de criblage rapide, un ensemble de souches a été sélectionné pour une validation et caractérisation ultérieure.

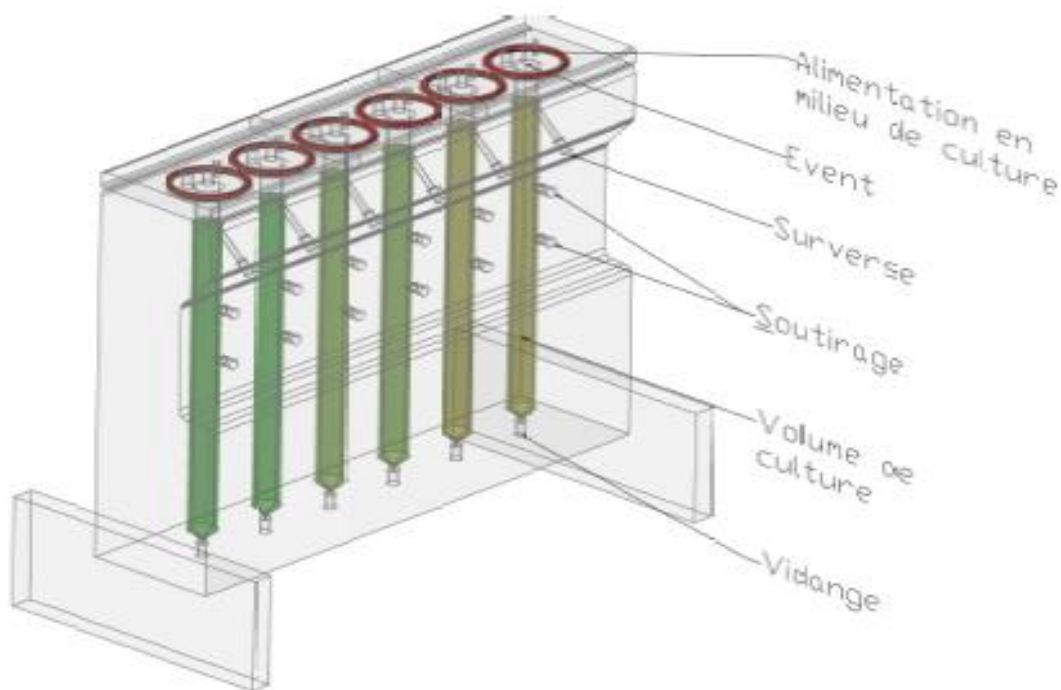


Figure II-6 Représentation schématique des EOSS-PBR

4.3-B. PBR air-lift plan

Ce type de PBR a été utilisé lors des manipulations de la deuxième étape de la procédure de criblage pour étudier en détails les souches issues de la phase de pré-criblage rapide (étape 1). Toutes les expérimentations ont ici été effectuées dans des PBR *airlift* de géométrie plane, de volume plus important. Comme le montre la Figure II-7, le PBR est constituée de 3 parties: une partie centrale où l'air est injecté et deux parties latérales pour la recirculation de la culture. Il est construit en PMMA (Polyméthacrylate de méthyle transparent et non toxique pour les microorganismes en étude). La face arrière (non optique) en acier inoxydable comporte une sortie en haut pour la récupération de la récolte par trop-plein. Le réacteur fait 1 L de volume, de dimensions (16 cm x 24.5 cm) et une profondeur de culture $L_z = 0.03$ m (perpendiculaire à la surface optique), donnant une surface spécifique éclairée $a_s = 33.3$ m⁻¹

Le flux de lumière incident est assuré par un panneau de diodes électroluminescentes «DEL» (ou en anglais LED pour *Light Emitting Diode*) parallèle à la face optique du PBR.

Le pH est mesuré par une sonde reliée à un transmetteur qui est connecté à un ordinateur fonctionnant avec un logiciel LabVIEW qui contrôle le réacteur. Le pH est régulé par injection de CO₂ gazeux venant se dissoudre dans la culture, permettant également de prévenir la limitation de la croissance par le carbone. Ainsi, dès que le pH dépasse la valeur de consigne (8 dans cette étude), une électrovanne injecte automatiquement du CO₂, se dissolvant ensuite dans la suspension microalgale, provoquant ainsi une acidification du milieu et donc la régulation du pH. Il est à noter qu'on ne peut pas agir que dans un seul sens, celui de diminution du pH.

Comme ceci est présenté dans la Figure II-7, la partie supérieure du PBR reçoit une platine en PMMA qui supporte différents piquages pour recevoir les capteurs et les différentes injections :

- une électrode à pH (Vernier pH SENSOR),
- une sonde de température en inox, n'interagissant pas avec le milieu,
- un évent isolé du milieu extérieur par un filtre gaz de 0.2 µm,
- une canne vers une pompe doseuse d'injection du milieu neuf,
- un septum pour le prélèvement par seringue.

Les différents capteurs présents sur le PBR sont reliés à une carte d'acquisition (Vernier, SensorDAQ, USB data-acquisition, National Instruments). Les acquisitions et le contrôle du réacteur sont effectués grâce au logiciel labVIEW.

À noter que ce type de PBR sera utilisé dans toute la suite de l'étude, pour réaliser les expériences d'optimisation de la production des lipides et l'étude de la production des TAG en conditions de cycles jours/nuits qui sera présentée dans les chapitre IV et V.

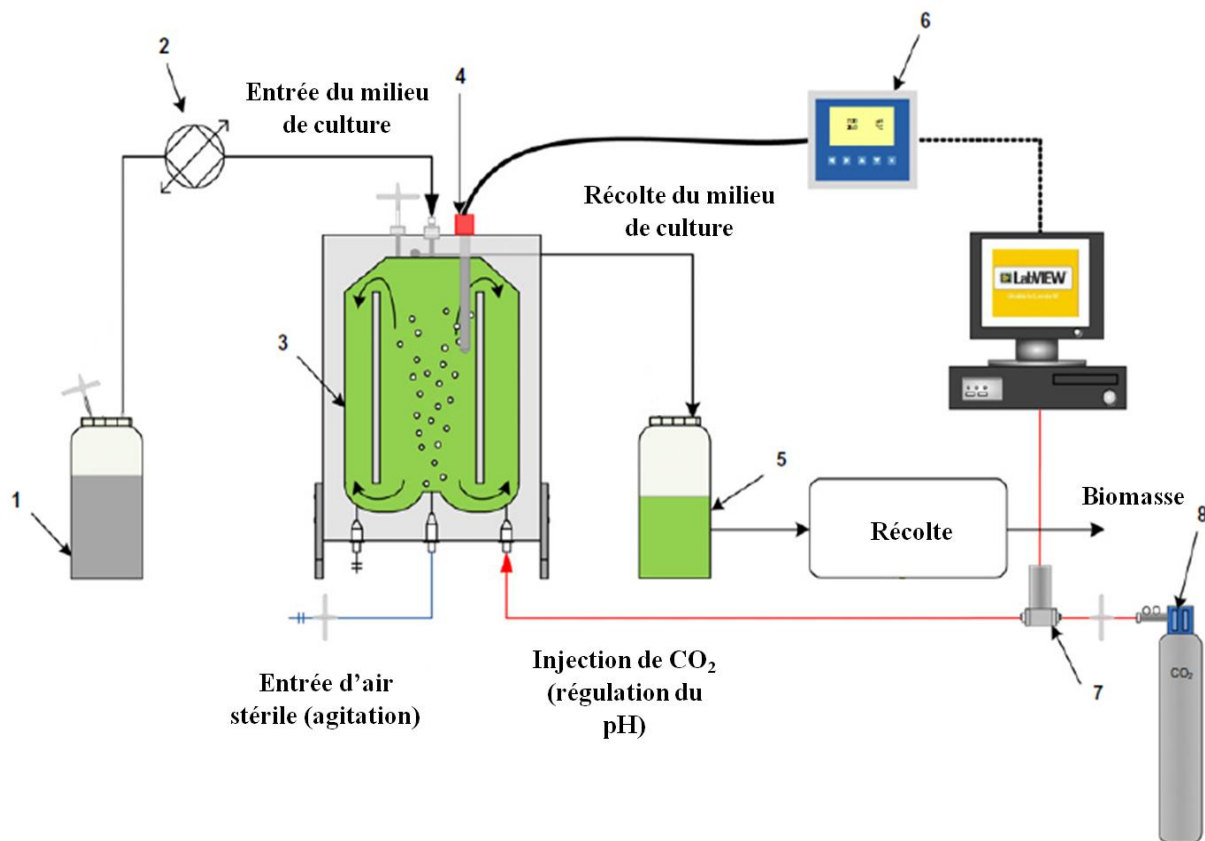


Figure II-7 Représentation schématique d'un PBR air-lift (1L)

1- Bouteille d'alimentation en milieu de culture, 2-pompe doseuse, 3-PBR airlift, 4-sonde de pH et de température, 5-bouteille de récolte, 6-transmetteur de pH et de température, 7-électrovanne, 8-bouteille de CO_2

5 Protocoles d'analyse et détermination des grandeurs des souches

5.1- Dénombrement cellulaire

La concentration en nombre de cellules présente dans la suspension microalgale est déterminée pour toutes les souches au microscope optique (objectif 40) par comptage sur hématimètre de type Malassez, présenté dans la Figure II-8.

La cellule de Malassez est une lame spéciale en verre (Figure II-9) développée pour le comptage de diverses cellules animales et végétales. Elle est munie de deux chambres de comptage sur la surface supérieure, et sur lesquelles est placée une lamelle de verre spéciale (plaque couvre-objet) délimitant une profondeur de 0.2 mm (Figure II-8). Chaque chambre de comptage est gravée horizontalement et verticalement. Cette gravure précise trace un quadrillage dont on connaît les dimensions. Comme schématisé dans la (Figure II-9), chaque chambre de comptage est donc un quadrillage composé de 25 grands rectangles dont les dimensions sont connues (0.25 de longueur et 0.25 mm de largeur), chacun est subdivisé en 20 petits carrés de 0.05 mm de côté (Figure II-9).

Le principe d'utilisation est simple. Connaissant les dimensions des rectangles de comptage, ainsi que le volume de comptage de la cellule, la concentration cellulaire dans le PBR (après comptage) sera mesurée grâce au calcul expliqué ci-après. Chaque rectangle a un volume de $0,2 \times 0,2 \times 0,25 = 0,01 \text{ mm}^3$. La totalité de la cellule, soit 100 rectangles de $0,20 \times 0,25 \text{ mm}$, a un volume de $0,2 \times 2 \times 2,5 = 1 \text{ mm}^3$ soit 10^{-3} ml . En prenant en considération le facteur de dilution ($f = \frac{V_f}{V_i}$) dans le cas d'une culture préalablement diluée, la concentration N (Nombre de cellules/ml de la culture) est calculée comme suit:

$$N = \frac{n}{25} * f * 10^{-5}$$

Équation II-1

avec «n» désignant le nombre total des cellules comptées dans l'ensemble des 25 rectangles. Il faut noter qu'afin que la concentration calculée soit précise, il faut compter au moins 300 cellules pour chaque échantillon.

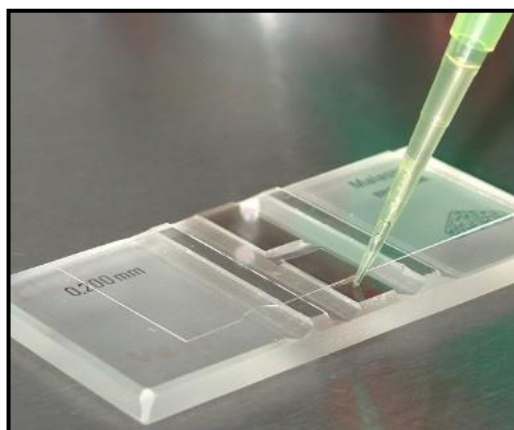


Figure II-8 Photo d'une cellule de Malassez

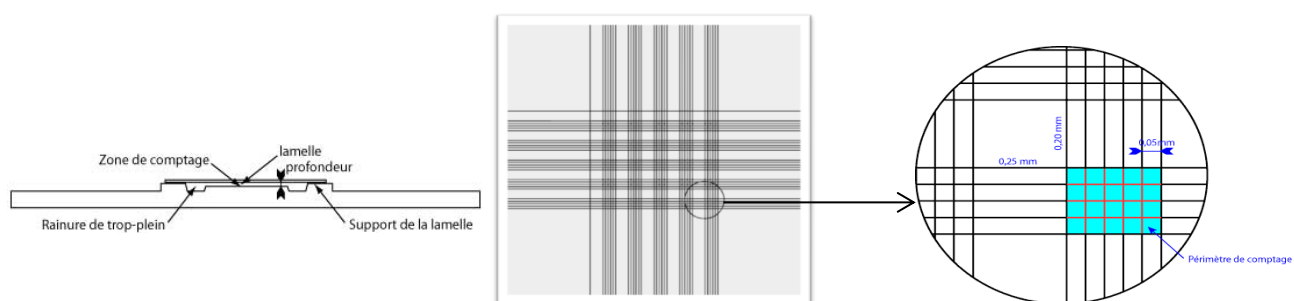


Figure II-9 Vue d'une coupe et de la gravure d'une cellule de Malassez

5.2- Mesure de la matière sèche et détermination des productivités des souches

La concentration en matière sèche des souches, notée dans la suite C_X , est déterminée par filtration d'un volume déterminé de la culture dépendant de la concentration de la biomasse dans le PBR, à travers un filtre en fibre de verre pré-séché et taré (Whatman GF / F ; $0.7 \mu\text{m}$). En moyenne, le volume de prélèvement est de 3ml pour une concentration en biomasse $C_X = 1 \text{ kg.m}^{-3}$. Ainsi, la biomasse filtrée est 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 matière sèche C_X est calculée à partir de la différence des 2 pesées sur le volume prélevé de la culture. La valeur est obtenue en (g.L^{-1} ou kg.m^{-3}) par l'équation ci-dessous:

$$C_X = \frac{m_2 - m_1}{V_{\text{prélevé}}} \times 10^3$$

Équation II-2

Les résultats présentés sont la moyenne de trois mesures. Cette mesure sert à estimer et déterminer les productivités volumiques (quantité de biomasse sèche produite par unité de volume et unité de temps; Kg/m³.j) et surfaciques (quantité de biomasse sèche produite par unité de surface éclairée et unité de temps; g/m².j) en matière sèche. À noter que l'obtention des productivités varie en fonction du mode de fonctionnement du PBR, et de sa géométrie.

En mode continu, la productivité volumique est obtenue par mesure de la quantité récoltée en sortie de PBR, comme donné par l'équation ci-dessous (Pruvost *et al.*, 2008) :

$$P_X = D * C_X = \frac{C_X}{\tau}$$

Équation II-3

Avec τ désignant le temps de séjour dans le PBR ($\tau = \frac{1}{D}$). En régime stable, C_X atteint une valeur constante. La productivité mesurée est donc constante.

En mode *batch*, en absence de l'application d'un taux de dilution pour la culture, la productivité volumétrique en biomasse sèche est obtenue en calculant l'accroissement de biomasse dans le temps. Elle est donnée par:

$$P_X = \frac{C_{Xf} - C_{Xi}}{T_f - T_i}$$

Équation II-4

Avec :

- C_{X_i} désigne la concentration de la matière sèche obtenue au début de l'expérience et exprimée en Kg.m⁻³
- C_{X_f} désigne la concentration de la matière sèche obtenue au moment de la récolte et exprimée en Kg.m⁻³

- T_f et T_i désignent respectivement le temps de la récolte et du début de la culture

Il est à noter qu'en batch la productivité dépend de l'instant de récolte. La productivité n'est pas donc constante dans le temps.

Une fois la productivité volumique connue, cette dernière est reliée à la productivité surfacique par la relation suivante:

$$S_X = P_X * \frac{V}{S} = \frac{P_X}{a_s}$$

Équation II-5

avec a_s désignant la surface spécifique éclairée du système de culture utilisé, déjà expliquée dans le chapitre I (partie I.7.3).

Si le PBR a une géométrie plane, la productivité surfacique est donnée par l'équation suivante ($a_s = \frac{1}{e}$):

$$S_X = P_X * e$$

Équation II-6

avec «e» désignant l'épaisseur de la culture, symbolisée aussi par L.

5.3- Détermination de la concentration et la composition des pigments

Le contenu en pigments est déterminé par une méthode spectrophotométrique. Ainsi, un volume noté V_1 de la culture, placé dans un Eppendorf, est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 rpm. Ensuite, le surnageant est éliminé et le culot est mis en suspension dans un volume V_2 convenable de méthanol (99.8%) pendant une durée minimale de 30 minutes et maximale de 3 heures, à 44°C et à l'obscurité. Par la suite, les débris cellulaires sont précipités et séparés par centrifugation pendant 5 minutes à 12000 rpm; la couleur blanche du culot est un moyen de vérification que l'extraction est complète. L'absorbance du surnageant contenant les pigments dissous dans le méthanol est mesurée à différentes longueurs d'onde (480, 652, 665 et 750 nm). La mesure de la densité optique à 750 nm (inférieure à 0.01) permet de vérifier l'absence de turbidité (débris cellulaires restantes,

bactéries, etc...). Trois réplicats sont préparés. Les valeurs moyennes de ces absorbances notées A_{480} , A_{652} , et A_{665} sont finalement utilisées pour calculer les concentrations de la chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* et les caroténoïdes de protection (PPC pour *Photo Protective Carotenoides*) via les équations de (Ritchie, 2006) pour les chlorophylles et de (Strickland and Parsons, 1968) pour les caroténoïdes:

$$[Chl-a] (\mu g/ml) = [-8.0962 * A_{652} + 16.5169 * A_{665}] * V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

Équation II-7

$$[Chl-b] (\mu g/ml) = [27.4405 * A_{652} - 12.1688 * A_{665}] * V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

Équation II-8

$$[PPC] (\mu g/ml) = [4.0 * A_{480}] * V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

Équation II-9

avec l^{-1} la profondeur optique de la cuve exprimée en cm.

Connaissant la concentration massique de la culture, la teneur en pigments en gramme de pigments par gramme de biomasse sèche peut être calculée. Le rapport des absorbances à 480 nm (relative aux caroténoïdes) et à 665 nm (relative aux chlorophylles *a*) est aussi utilisé. Il est dénommé « indice de stress » et sera présenté ultérieurement.

6 Analyse des lipides et détermination des productivités des TAG

Dans cette étude, la quantité et le profil des différentes classes de lipides sont obtenus suivant un protocole spécifique développé au sein du laboratoire GEPEA en collaboration avec le LEMAR (Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin) à Brest, France. Il s'agit d'une extraction effectuée sur des cellules entières (pas d'isolation des lipides) présentant l'avantage d'obtenir un meilleur rendement d'extraction, suivie par une analyse par GC-FID (*Gas chromatography-Flame ionisation detector*). Cette méthode est détaillée et a été validée dans les travaux de Van Vooren *et al.*, (2012). Elle est reprise ci-dessous.

6.1- Extraction des lipides totaux

Comme dans les méthodes de Folch *et al* (1957) et Bligh and Dyer (1959), le mélange d'extraction est constitué d'une mixture de chloroforme/méthanol dont une proportion

(2:1, V/V). Ce mélange de solvants de polarité différente (polaire/apolaire) combine l'extraction des lipides à la capacité de l'alcool à éclater les cellules de microalgues et y pénétrer, afin de rendre les lipides accessibles au chloroforme, résultant d'une obtention d'un extrait lipidique complet.

Contrairement à ces deux méthodes, le protocole appliqué dans cette étude est plus avantageux, car plus rapide, plus simple à réaliser, il ne nécessite qu'une faible quantité de matière nécessaire à analyser, et est au final plus économique (moins de volume de solvants, expliqué par la réduction du nombre de lavage et de séparation en deux phases organique/aqueuse) et plus efficace (permet d'obtenir un meilleur rendement d'extraction). Les analyses se faisant à l'état de traces, tout le matériel utilisé doit être en verre préalablement chauffé à 450°C pendant 6h (tubes, pipettes Pasteur) ou en téflon rincé à l'acétone (bouchons) afin d'éviter toute pollution. Les extractions se font en triplicats. Tout le matériel en verre doit être préalablement cramé ou rincé avec le solvant d'utilisation.

Afin de quantifier et qualifier les lipides contenants dans la culture, un volume de culture de microalgues correspondant à une quantité en lipides comprise entre 100 et 2000 µg est prélevé dans un tube en verre (à noter que par exemple un volume de 2.5 ml d'une culture d'une concentration en matière sèche 1 g.L⁻¹ et d'un pourcentage 20%/MS d'accumulation de lipides, correspond à 500 µg de lipides). Après l'élimination du surnageant contenant le milieu de culture, suite à une centrifugation pendant 10 minutes à 6000 rpm (3600g) à 20°C, un volume de 10 µL d'une solution de BHT (butyl-hydroxytoluène) à 20µg/l est ajouté au culot contenant les cellules entières de microalgues. Le BHT est un composé organique lipophile, dérivé de phénol, qui est bien connu pour ses propriétés antioxydantes. Ainsi, ce dernier permet de conserver l'intégrité des molécules tout en évitant la dénaturation des doubles liaisons. À noter que ce protocole peut être appliqué aussi sur une matière lyophilisée. Dans ce cas, il faut ajouter 100 µL d'eau distillée, afin de réhydrater les cellules avant l'ajout des solvants d'extraction, pour permettre au méthanol d'accomplir son rôle correctement.

Arrivant à l'étape d'extraction, 2 ml du mélange $CHCl_3/MeOH$ (2/1 : v/v) sont ajoutés. Par la suite, après un vortex de 10 secondes, les tubes sont placés dans un bain d'ultrasons pendant 40 secondes, en les retirant chaque 10 secondes pendant 5 secondes, afin d'éviter le réchauffement des tubes et par conséquent la détérioration potentielle des lipides. La combinaison de cette extraction avec des ultrasons améliore le rendement de l'extraction. En effet, les ultrasons émis vont former des bulles dans le solvant, celles-ci vont éclater au voisinage des micro-algues et optimiser ainsi l'extraction des lipides contenus à l'intérieur de la cellule.

Ensuite, cette opération est répétée encore deux fois, jusqu'obtenir un volume total de 6 ml du mélange ($CHCl_3/MeOH$). Les tubes sont alors laissés recouverts avec un papier d'aluminium pendant 6 heures sur un balancier. Une évaporation du solvant à 40°C en utilisant un flux d'azote est nécessaire avant la transméthylation des échantillons pour les analyser ultérieurement par chromatographie gazeuse (GC), et la masse sèche obtenue est reprise dans 1 ml de ($CHCl_3/MeOH$) (2/1: V/V). Cet extrait contenant les lipides totaux est utilisé pour déterminer la quantité et le profil des acides gras des lipides totaux et des TAG. Les échantillons sont stockés à -20°C tant qu'ils ne sont pas transméthylés.

6.2- Séparation des TAG par microcolonnes SPE

Les TAG sont séparés des autres classes de lipides par une méthode d'extraction sur phase solide, nommée SPE (pour *Solid-Phase Extraction*). Ainsi, un aliquot de 100 µL de l'extrait lipidique complet déjà préparé, additionné de 10 µg d'une solution de glycérol tri-heptadécanoate (TG 17:0) (40 µL), un étalon standard interne, est évaporé à sec sous flux d'azote. La matière sèche ainsi obtenue est lavée par 500 µL du chloroforme stabilisé à l'amyène (deux lavages successifs de 250 µL), traitée aux ultrasons pendant 30s, agitée par vortex pendant 10s, et déposée par la suite en tête d'une micro-colonne de silice de 7 cm, désactivée à 450°C et stabilisée avec 6 % en masse d'eau distillée.

Après ce dépôt, les TAG sont élués avec 8 ml du chloroforme stabilisé à l'amyène. La fraction des TAG est récupérée dans un tube propre de 8 ml, et stockée à -20°C, jusqu'à l'étape de leur transméthylation et leur analyse par GC-FID.

6.3- Quantification et qualification par GC-FID

Avant d'analyser les lipides totaux ainsi que les TAG par GC-FID, ceux-ci doivent être trans-estérifiés avec un alcool (méthanol le plus souvent) en présence d'un catalyseur et transformés en ester méthylique d'acides gras «FAME» (fatty acids methyl ester). Dans ce contexte, 100 µL de l'échantillon à analyser sont évaporés sous flux d'azote après l'ajout de 10 µg de (TG 17:0) et mis en réaction avec 1.2 ml de Méthanol- BF_3 (14% W/W) pendant 10 minutes à 100°C, à savoir le temps et la température nécessaires pour la formation des liaisons esters mises en jeu. Le BF_3 , tri-fluorure de bore, joue le rôle d'un catalyseur qui accélère la réaction.

Après refroidissement pendant 20 minutes à la température ambiante, les échantillons transméthylés, sont repris dans 1 ml d'hexane. Par la suite, la phase organique contenant les ester méthyliques en acides gras (FAME) est lavée 3 fois par 1.5 ml d'eau distillée saturée en hexane, dans le but d'éliminer le BF_3 . Enfin, les FAME sont récupérés et injectés afin d'être analysés via une chromatographie gazeuse, équipée d'un injecteur sur colonne (pré-colonne), une colonne capillaire (TR-FAME) et un détecteur à ionisation de flamme. Les différents esters méthyliques en acides gras sont identifiés grâce à la comparaison de leur temps de rétention aux étalons standards connus (37 composés), alors que leur quantité est obtenue par comparaison la surface de leur pics à celle de l'étalon interne standard (TG 17:0). À noter que, les intégrations ainsi que les calculs sont obtenus grâce à un logiciel nommé ChromCard 2.4.1 (Thermo-Fisher).

À la fin de cette analyse, le pourcentage des lipides totaux ainsi que celui des TAG par rapport à la biomasse sèche (% MS) dans l'échantillon est connu. Leur composition en acides gras du point de vue classe et quantité (profil d'acide gras) est également obtenue.

Par la suite, connaissant la concentration de biomasse sèche à l'intérieur du PBR, la concentration et la productivité en lipides totaux et en TAG seront calculées. Ainsi, pour une culture opérée en mode *batch*, la vitesse de production des lipides totaux ou des TAG s'obtient à partir de l'augmentation temporelle:

$$\langle P_{LT} \rangle = \frac{\%_{TL_f} C_{X_f} - \%_{TL_i} C_{X_i}}{T_f - T_i}$$

Équation II-10

Avec:

- $\langle P_{LT} \rangle$ désigne la productivité volumique ou la vitesse de production des lipides totaux exprimée en $\text{Kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$
- $\%_{TL_i}$ et C_{X_i} désignent respectivement le pourcentage des lipides totaux par rapport à la matière sèche et la concentration de la matière sèche obtenus au début de l'expérience
- $\%_{TL_f}$ et C_{X_f} désignent respectivement le pourcentage des lipides totaux par rapport à la matière sèche et la concentration de la matière sèche obtenus au moment de la récolte
- T_f et T_i désignent respectivement le temps de la récolte et du début de la culture

De la même façon pour les TAG, on obtient:

$$\langle P_{TAG} \rangle = \frac{\%_{TAG_f} C_{X_f} - \%_{TAG_i} C_{X_i}}{T_f - T_i}$$

Équation II-11

Avec:

- $\langle P_{TAG} \rangle$ désigne la productivité volumique ou la vitesse de production des triglycérides en Kg.m⁻³.j⁻¹
- $\%_{TAG_i}$ et C_{X_i} désignent respectivement le pourcentage des triglycérides par rapport à la matière sèche et la concentration de la matière sèche obtenus au début de l'expérience
- $\%_{TAG_f}$ et C_{X_f} désignent respectivement le pourcentage des triglycérides par rapport à la matière sèche et la concentration de la matière sèche obtenus au moment de la récolte
- T_f et T_i désignent respectivement le temps de la récolte et du début de la culture

En mode continu, la productivité est donnée par l'équation suivante:

$$\langle P_{LT} \rangle = \langle P_X \rangle * \%_{LT_{\text{équilibre}}}$$

Équation II-12

$$\langle P_{TAG} \rangle = \langle P_X \rangle * \%_{TAG_{\text{équilibre}}}$$

Équation II-13

avec $\langle P_X \rangle$ désignant la productivité volumique en biomasse sèche comme déjà définie dans le paragraphe 5.2-.

Concernant la productivité surfacique, comme déjà discuté dans le paragraphe 5.2- de ce chapitre, cette dernière est reliée à la productivité volumique par la surface spécifique éclairée:

$$S_{LT} = \frac{\langle P_{LT} \rangle}{a_s}$$

Équation II-14

$$S_{TAG} = \frac{\langle P_{TAG} \rangle}{a_s}$$

Équation II-15

Pour les manipulations effectuées dans les PBR *Flat-Panel* de 1L, la productivité surfacique sera calculée via les équations ci-dessous :

$$S_{LT} = \langle P_{LT} \rangle * e$$

Équation II-16

$$S_{TAG} = \langle P_{TAG} \rangle * e$$

Équation II-17

7 Destruction des cultures et détermination de la fragilité cellulaire des souches

L'application aux biocarburants impose de développer des procédés d'extraction de lipides à faible consommation énergétique. Le laboratoire GEPEA travaille ainsi à la mise en place de l'extraction en voie humide, consistant à détruire les cellules dans leur milieu puis à récupérer les lipides alors libérés (Cooney *et al.*, 2011). La fragilité des cellules apparaît ici comme un critère important, car elle conditionne le niveau d'énergie à appliquer lors de la destruction, mais également la facilité à extraire ensuite les lipides du broyat obtenu. La fragilité cellulaire des souches suite à une destruction mécanique a donc été examinée.

Cette fragilité cellulaire est exprimée par le pourcentage de destruction des cellules suite à un passage dans un broyeur cellulaire haute pression (BHP) «TS series, 2.2 KW» fabriqué par Constant Systems Limited, Borthants, UK (Jubeau *et al.*, 2013). Cet équipement a en effet permis au GEPEA de définir un protocole reproductible et représentatif de l'opération de broyage. Il se compose d'une tête de broyage comprenant une chambre de compression de 10 ml dans lequel va être dirigé l'échantillon à traiter. Une fois la chambre remplie, un

piston va forcer le liquide à passer à grande vitesse à travers une buse de faible diamètre (180 µm). Le jet ainsi formé va aller impacter une cible localisée sur une double enveloppe thermostatée. Au cours d'un cycle de broyage, le passage des cellules d'une zone à haute pression à celle d'une plus faible pression, les fortes contraintes de cisaillement au niveau de la buse et enfin le violent impact sur la cible amenant à une destruction cellulaire.

Pour caractériser la fragilité cellulaire des souches, un volume de 40 ml a été prélevé des cultures dans des erlenmeyers de 250 ml. Ensuite, ce volume est passé dans le broyeur à une pression de 1750 bars en 4 cycles. Le premier cycle correspond au lavage de la chambre de 10 ml alors que les 3 autres correspondent aux triplicats de l'échantillon à traiter. A noter qu'avant chaque opération de broyage, la solution de microalgues a été mélangée dans le réservoir d'alimentation afin d'assurer une bonne homogénéité des échantillons dans la chambre. Chacun des essais a été réalisé en triplicat. Après broyage, les échantillons sont collectés et la concentration cellulaire en sortie est mesurée par comptage.

Le pourcentage de destruction cellulaire est défini par le rapport de la concentration cellulaire dans l'échantillon à traiter avant et après le broyage, suivant l'équation ci-dessous:

$$\% \text{ destruction} = \frac{N \text{ après broyage}}{N \text{ avant broyage}} * 100$$

Équation II-18

8 Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés par colorimétrie à 484 nm par la méthode de Dubois et al. (1956). L'hydrolyse des polysaccharides en monosaccharides est réalisée en présence d'acide sulfurique fumant (98%). Les monosaccharides obtenus sont déshydratés puis réarrangés pour former du furfural à partir des pentoses ou hydroxyméthylfurfural à partir des hexoses. Ces composés conduisent à une coloration jaune caractéristique par condensation avec le phénol.

Une gamme étalon de glucose a été préalablement préparée à 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 et 0.1 g/L⁻¹. Un volume adéquat de culture a été prélevé via le septum du PBR, centrifugé (centrifugeuse Mikro R22, 5 min, 20 °C, 6000 g), puis repris dans un volume d'eau de telle sorte que la concentration en glucide de l'échantillon soit comprise dans la gamme de concentration de la gamme étalon. 0.5 ml de phénol (50 g.L⁻¹) a été ajouté à 0.5 ml de culture lavée ainsi qu'à 0.5 ml de gamme étalon. Tous les échantillons ont été réalisés en triplicat. Toutes les 30 secondes, 2.5 ml d'acide sulfurique fumant (98%) ont été ajoutés à chaque tube. Après dix minutes d'hydrolyse, les solutions ont été homogénéisées avec un agitateur de type vortex pendant 10 secondes puis incubées à 35 °C pendant 30 minutes. La coloration jaune obtenue a été lue au spectrophotomètre à 483 nm et les concentrations en glucides des échantillons ont été déduites en comparaison à la gamme étalon de glucose.

9 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé par une méthode colorimétrique (Lowry et al., 1951). Cette méthode combine l'utilisation des ions Cu²⁺ 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 Cu²⁺ 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.

Chapitre III : Criblage et sélection des souches de microalgues en vue d'une application au biodiesel

Résumé:

Ce chapitre présente les résultats de criblage des souches décrites au chapitre précédent. Il est divisé en deux grandes parties: la première sera consacrée au précriblage de toutes les souches dans les bancs de crible nommés «PBR-EOSS», et la seconde au crible final en PBR *air-lift* plan. Ce crible sera réalisé sur le comportement des souches dans les conditions de culture rencontrées en PBR, leur productivité en biomasse en conditions optimales de croissance ainsi qu'en conditions de carence brusque en azote, leur fragilité cellulaire suite à une destruction mécanique à haute pression (1750 bar) et leur pouvoir d'accumulation des lipides en conditions de stress nutritif (carence brusque en azote). Les résultats obtenus au niveau de la première partie de crible ont conduit à sélectionner un ensemble de quatre souches prometteuses, dont deux marines (*Nannochloropsis gaditana* CCMP527 et *Nannochloropsis salina* CCMP537) et deux d'eau douce (*Scenedesmus obliquus* UTEX393 et *Parachlorella kessleri* UTEX2229). À noter que les travaux de criblage des souches de *Nannochloropsis* dans les «PBR-EOSS» ont mené à une publication dans Bioresource Technology (Taleb *et al.*, 2015)

La deuxième partie de ce chapitre traite des résultats de caractérisation des 4 souches sélectionnées dans des PBR de type *air-lift* (1L). L'objectif a été ici de valider la robustesse de la procédure de pré-criblage des souches dans les bancs de criblage «PBR-EOSS» Grâce au volume relativement important des PBR utilisés, les souches ont été totalement caractérisées ce qui a permis d'identifier complètement leur potentiel afin de choisir les souches présentant le meilleur potentiel. La procédure de criblage globale a conduit au final à identifier deux souches d'intérêt, *Parachlorella kessleri* UTEX2229 comme souche d'eau douce et *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 comme souche marine. Sur ces deux souches, la souche *Parachlorella kessleri* UTEX2229 s'est révélée plus performante.

1 Pré-criblage des souches dans le PBR «EOSS» et sélection de souches d'intérêts

1.1- Introduction

En première étape du crible, toutes les souches ont été cultivées dans les bancs de criblage «EOSS-PBR» décrits en détails dans le paragraphe 4.3-A. Les dix souches qui appartiennent au même genre «*Nannochloropsis*» ont été cultivées séparément des souches d'eau douce. La sélection des souches a été effectuée en plusieurs phases successives. Tout d'abord, la sélection a été basée sur des critères de croissance des souches dans les PBR en dehors de tout stress (conditions optimales de croissance) et en mode semi-continu. Les résultats ont mené à sélectionner les souches qui apparaissaient les plus faciles à cultiver dans des systèmes de culture de type photobioréacteurs, et qui présentaient également des productivités élevées en biomasse. Par la suite, ces souches ont été comparées par rapport à leur pouvoir d'accumulation ainsi que leur productivité en lipides (TAG), par mise en carence pendant une durée de 11 jours en conditions de carence soudaine en azote dans des «EOSS-PBR» fonctionnant en mode *batch*. Les meilleures souches productrices de TAG ont été sélectionnées pour estimer leur fragilité cellulaire exprimée en pourcentage de destruction cellulaire suite à leur broyage dans un broyeur à haute pression (1750 bar) dans une dernière phase de sélection. Les souches qui ont montré les fragilités cellulaires les plus importantes ont été sélectionnées.

Donc, au final, suite au pré-criblage, à partir d'une quinzaine de souches criblées, un ensemble de souches d'intérêt pour la production de biodiesel a été retenu.

1.2- Phase de sélection liée aux critères de croissance

1.2-A. *Caractérisation qualitative et quantitative de la croissance en conditions optimales des souches cultivées en PBR «EOSS» utilisé en mode «Fed-batch»*

Toutes les souches marines et d'eau douce ont été cultivées en conditions de croissance optimales, dans des milieux de culture ajustés afin d'éviter toute limitation minérale. Par conséquent, la croissance dans les PBR était uniquement limitée par la lumière (voir partie II.2.1).

Après leur mise en culture dans les «EOSS-PBR» en mode semi-continu, à un taux de dilution faible ($D = 0.01 h^{-1}$) et une intensité lumineuse $q_0 = 150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, la croissance des souches a été suivie en mesurant la concentration des cellules pour chaque culture. Ensuite, la concentration en matière sèche a été mesurée à l'état stationnaire, et la productivité de chaque souche a été déterminée comme donné dans le Tableau III-1. À noter que le taux de dilution de chaque souche a été mesuré expérimentalement (Tableau III-1) afin de déterminer précisément les productivités en matière sèche. Les résultats expérimentaux montrent qu'une déviation de 3 % a été trouvée entre les taux de dilution appliqués aux différents PBR constituants EOSS.

III.1.2.A.1 Comportement et adaptation des souches

Même en conditions optimales de croissance, la comparaison de souches n'est pas évidente. En effet, les microalgues présentent une adaptation forte aux conditions de culture. Lors d'un changement de conditions, comme notamment lors d'une simple inoculation dans un réacteur, il peut s'ensuivre un temps plus ou moins long de latence. Cela rend compliquée la comparaison de cultures batch, les conditions de préculture pouvant jouer plus ou moins fortement suivant les souches sur le démarrage de croissance. Il a donc été choisi ici de comparer les souches en mode de culture semi-continu. Cela permet d'adapter progressivement les souches à la culture en PBR jusqu'à obtention d'un régime stable de croissance (état stabilisé du réacteur). La productivité obtenue est alors significative pour une comparaison des souches entre-elles.

Outre la caractérisation quantitative classique de la croissance des souches exprimée par des mesures de la concentration de la matière sèche ainsi que la détermination des productivités, la caractérisation qualitative qui se traduit par le comportement observé en culture se révèle très importante dans la logique de la sélection des souches. Ainsi, la vitesse d'adaptation d'une souche à de nouvelles conditions de culture est un critère. La durée de la phase de latence des microalgues après inoculation a donc été considérée. La formation de biofilms et la sédimentation des cellules ont aussi été considérées comme des critères de sélection dans la procédure de criblage, car cela impacte la facilité de culture en PBR.

III.1.2.A.2 Évaluation de la facilité de culture des souches

Les courbes de croissance des souches marines et d'eau douce sont données dans la figure III-1. Comme le montre cette figure, toutes les souches à l'exception de la souche marine *Nannochloropsis salina* CCMP538 ont présenté une bonne croissance dans les PBR EOSS. Par contre, *Nannochloropsis salina* CCMP538 s'est révélée avoir une croissance initiale faible et les cellules ont commencé à mourir dès le quatrième jour de la culture.

En ce qui concerne la durée de la phase de latence des souches, toutes les souches ont montré une phase de latence relativement courte (4 jours maximum), avec pour la plupart une phase de latence dont la durée est de 2 à 3 jours. Donc, au final, sauf pour la souche CCMP538, les souches se sont facilement adaptées aux conditions de culture en PBR de type EOSS.

Par ailleurs, la formation de biofilms et la sédimentation des cellules ont été examinées. Pour les quatre souches d'eau douce (*Parachlorella kessleri* UTEX2229, *Scenedesmus* sp. UTEX1589, *Scenedesmus obliquus* UTEX393 et *Chlorella vulgaris* CCAP211/19) aucune formation de biofilms ou sédimentation des cellules n'a été observée. Par contre, pour la souche *Neochloris oleobundans* UTEX1185, une faible sédimentation a été obtenue à la fin de la culture. Pour les souches de *Nannochloropsis*, une sédimentation a été observée pour les souches *Nannochloropsis oculata* CCMP525, *Nannochloropsis limnetica* CCMP505, *Nannochloropsis oculata* alphabiotech (N.o AB), tandis qu'une sédimentation plus importante a été observée pour les souches *Nannochloropsis granulata* CCMP529 et *Nannochloropsis salina* CCMP538. Les autres souches *Nannochloropsis salina* CCMP537, *Nannochloropsis* sp. CCMP1779, *Nannochloropsis* sp. CCMP531, *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 et *Nannochloropsis oceanica* (collection privée) n'ont pas souffert de ce problème.

Au final, selon leur comportement de culture en PBR, les souches ont été divisées en 3 catégories:

- La première catégorie regroupe les souches très faciles à cultiver (*Nannochloropsis* sp. CCMP531, *Nannochloropsis* sp. CCMP1779, *Nannochloropsis gaditana* CCMP527, *Nannochloropsis salina* CCMP537, *Nannochloropsis oceanica* N.o (collection privée), *Scenedesmus obliquus* UTEX393, *Scenedesmus* sp. UTEX1589, et *Chlorella vulgaris* CCAP211/19).
- La deuxième regroupe les souches dont la culture présente quelques difficultés (*Nannochloropsis oculata* CCMP525, *Nannochloropsis oculata* alphabiotech (N.o AB), *Neochloris oleobundans* UTEX 1185 et *Nannochloropsis limnetica* CCMP505).

- La dernière catégorie regroupe les souches qui se sont montrées difficiles à cultiver (*Nannochloropsis granulata* CCMP529 et *Nannochloropsis salina* CCMP538).

Ces premiers essais ont montré qu'il y a une différence dans le comportement de croissance des souches exposées aux mêmes conditions de culture. Il faut noter que cette différence se manifestait non seulement au niveau des différents genres de microalgues testés dans cette étude, mais aussi entre les souches appartenant au même genre (le cas des souches de *Nannochloropsis*) et provenant de la même espèce (le cas des souches *Nannochloropsis salina* CCMP537 et *Nannochloropsis salina* CCMP538 qui appartiennent à l'espèce *salina* du genre *Nannochloropsis*). Ces différences montrent l'intérêt de prendre en compte ce critère de comportement général en culture dans la procédure de criblage et de sélection de souches.

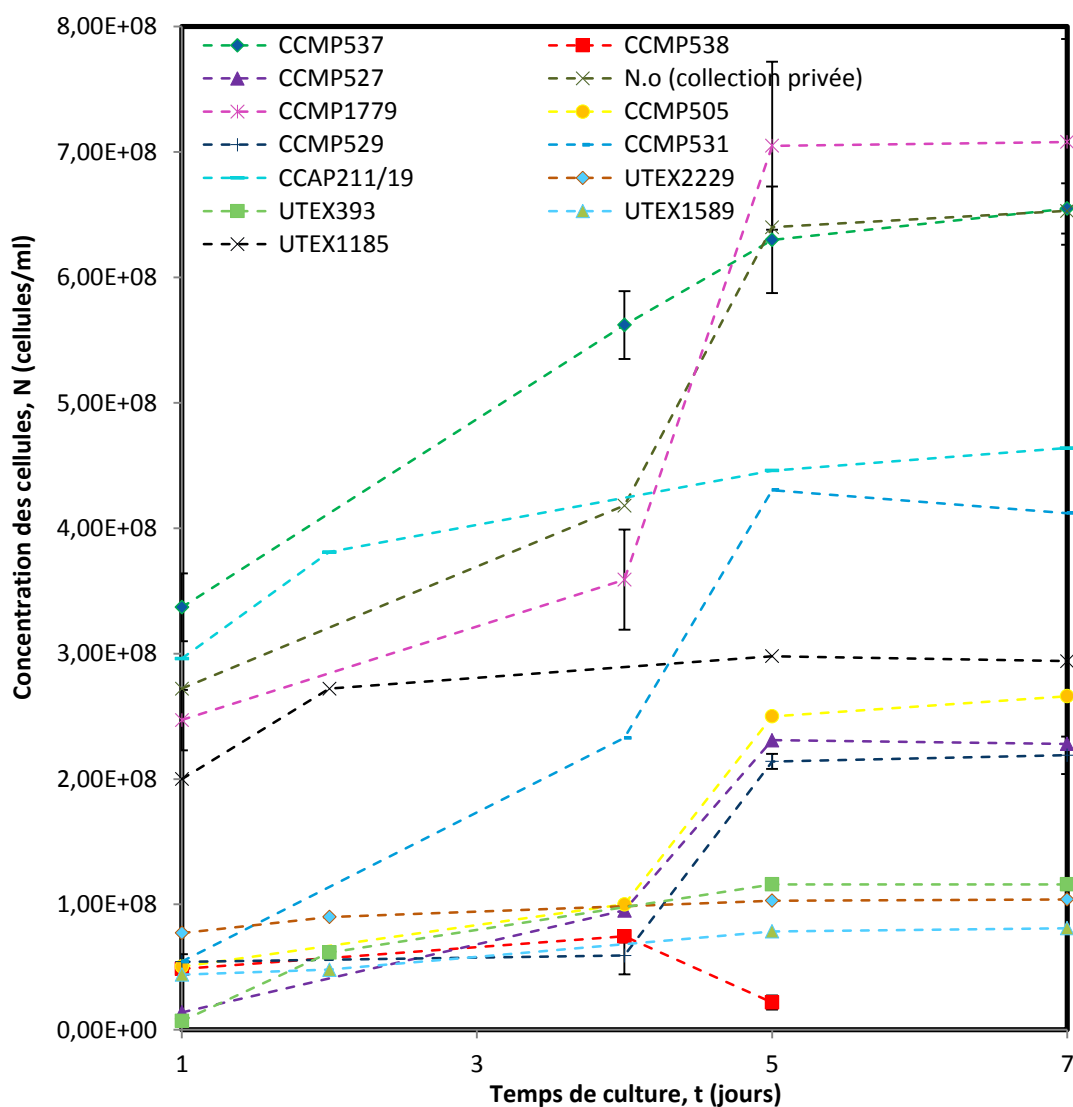


Figure III-1 Courbes de croissance des souches cultivées en «EOSS-PBR» sous des conditions normales de croissance (+N)

III.1.2.A.3 Détermination de la concentration et de la productivité en biomasse sèche obtenus en régime stationnaire de culture en mode semi-continu

Les résultats du Tableau III-1 donnent les concentrations ainsi que les productivités volumiques en matière sèche obtenues à l'état stationnaire pour 15 souches différentes. Comme le montre, une grande variation au niveau de la productivité a été observée entre les souches des différents genres de microalgues testés dans cette étude, même après la période d'adaptation qui s'est révélée nécessaire pour obtenir une production stable. Ainsi, la productivité mesurée a varié de $0.05 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ pour la souche *Nannochloropsis occulata* Alphabiotec (N.o AB) jusqu'à $0.89 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ pour *Scenedesmus obliquus* UTEX393. Cette variation dans les valeurs de la productivité volumique en matière sèche ne se limitait pas seulement au niveau du genre des souches. Une variation importante a été observée entre les différentes espèces au sein du même genre et également entre les souches de la même espèce. C'est le cas des genres *Nannochloropsis* et *Scenedesmus* testés dans cette étude.

Pour le genre *Nannochloropsis*, cette variation est assez claire entre les différentes espèces (*oculata*, *salina*, *oceanica*, *gaditana*, *granulata* et *limnetica*). Les résultats présentés dans le Tableau III-1 montrent nettement que pour les souches de *Nannochloropsis* testées dans cette étude, les valeurs de la productivité varient de $0.05 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ pour la souche N.o AB jusqu'à $0.669 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ pour la souche CCMP1779. Cela signifie que pour un seul critère de criblage fixé, une variation d'un ordre de grandeur a été observée entre les souches appartenant à différentes espèces du même genre de microalgues. De plus, la souche CCMP537 a une productivité de $0.631 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ alors que CCMP538 était deux fois moins productive ($P_X = 0.284 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$). Une variation d'un facteur de 2 a donc été observée entre des souches qui appartiennent à la même espèce. Pour les souches du genre *Scenedesmus*, la variation s'est révélée moins importante que celle trouvée chez *Nannochloropsis*. Ainsi, une variation d'un facteur de 12% a été signalée entre la productivité de la souche *Scenedesmus obliquus* UTEX393 ($0.890 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$) et la souche *Scenedesmus* sp. UTEX1589 ($0.792 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$).

En regardant les valeurs maximales et minimales obtenues pour les productivités des souches, une valeur de $0.5 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ a été prise comme valeur limite afin de définir les souches les plus productives. Ainsi, neuf souches dont cinq marines (N.o (collection privée), CCMP537, CCMP531, CCMP527, et CCMP1779) et quatre d'eau douce (UTEX2229, UTEX1589, UTEX393 et CCAP211/19) ont présenté une productivité en matière sèche supérieure, ou égale à cette valeur.

<i>Souche</i>	Biomasse sèche $C_{X_{ss}}$ (kg.m ⁻³)	Intervalle de confiance $IC_{C_{X_{ss}}}$	Taux de dilution expérimental D_{exp} (h ⁻¹)	Intervalle de confiance $IC_{D_{exp}}$ (%)	Productivité volumique P_X (kg.m ⁻³ .j ⁻¹)	Productivité surfacique S_X (g.m ⁻² .j ⁻¹)	ΔP_X (kg.m ⁻³ .j ⁻¹)
CCMP525	0.5				0.12	0.5	
CCMP537	2.89	0.15	0.0091	6.369	0.631	2.4	0.07
CCMP538	1.23	0.087	0.0096	9.39	0.284	1.1	0.05
CCMP1779	3.2	0.076	0.0087	16.17	0.6691	2.5	0.12
CCMP531	2.07	0.3	0.01	17	0.5	1.9	0.16
CCMP505	1.71	0.2	0.0099	6.5	0.405	1.5	0.07
CCMP527	2.25	0.2	0.0099	8.65	0.538	2	0.09
CCMP529	1.6	0.303	0.0097	9.11	0.186	0.7	0.05
CCAP211/19	2.8545	0.578	0.0096	14	0.655	2.5	0.22
UTEX2229	2.913	0.1	0.0096	7.17	0.672	2.5	0.07
UTEX1185	1.998	0.1	0.0098	7.09	0.472	1.8	0.06
UTEX393	3.848	0.015	0.0096	5.09	0.890	3.3	0.05
UTEX1589	3.414	0.057	0.0097	10.69	0.792	3	0.10
N.o AB	0.21				0.05	0.2	
N.o(collection privée)	2.8		0.0093		0.624	2.3	

Tableau III-1 Concentrations et productivités en matière sèche à l'état stationnaire des souches cultivées en «EOSS-PBR»

1.2-B. Conclusions sur le pré-criblage en croissance

Au niveau de cette première phase de crible, les souches ont été criblées en regard de leur croissance en terme (1) qualitatif exprimé ici par le comportement général de chaque souche dans les conditions de culture rencontrées dans les PBR et (2) quantitatif, représenté ici par la productivité en biomasse obtenue en régime stationnaire de croissance. Malgré des conditions de culture identiques, une variation très importante a été observée entre les différents genres (facteur 16). De plus, les résultats ont montré qu'au sein du même genre (*Nannochloropsis* et *Scenedesmus*) et de la même espèce (le cas de l'espèce *Nannochloropsis salina* testée ici), une différence importante dans le comportement des souches et dans leur cinétique de croissance.

Ces différences obtenues entre les souches de la même espèce et criblées pour un seul critère (croissance ici) explique bien la difficulté associée à un objectif pourtant simple de criblage de souches. À noter également que les résultats de cette phase de sélection soulignent l'intérêt de développer une méthodologie robuste de criblage des souches de microalgues, et notamment en prenant en compte l'adaptation des souches aux conditions de culture, ce qui amène à privilégier la mise en culture en semi-continu ou continu pour obtenir des résultats stables de production s'affranchissant de la phase d'adaptation.

Au final, quatre souches d'eau douces (*Parachlorella kessleri* UTEX2229, *Scenedesmus* sp. UTEX1589, *Scenedesmus obliquus* UTEX393 et *Chlorella vulgaris* CCAP211/19) et cinq marines (*Nannochloropsis oceanica* N.o (collection privée), *Nannochloropsis salina* CCMP537, *Nannochloropsis* sp. CCMP531, *Nannochloropsis gaditana* CCMP527, et *Nannochloropsis* sp. CCMP1779) se sont révélées très faciles à cultiver en PBR et ont présenté une productivité intéressante en biomasse (supérieure à $0.5 \text{ Kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$). Par conséquent, ces souches ont été sélectionnées parmi les 15 souches testées comme étant les plus productives en biomasse, avec possibilité de les cultiver dans les PBR sans difficulté majeure. Dans les étapes ultérieures, ces souches seront criblées pour examiner leur productivité en TAG et leur fragilité cellulaire.

1.3- Phase de sélection liée à la production des triglycérides

Dans cette étape de criblage consacrée à examiner le potentiel de production des TAG des souches sélectionnées, ces dernières ont été cultivées 11 jours en batch dans des «PBR-EOSS» sous des conditions de carence brusque en azote. Les PBR «EOSS» ont été inoculés à partir des cultures en conditions normales de croissance. La capacité d'accumulation des lipides et des triglycérides ainsi que la concentration en matière sèche ont ensuite été déterminées pour chacune des souches.

1.3-A. Capacité d'accumulation des lipides totaux et des TAG en carence azotée

Dans un premier temps, la capacité d'accumulation des lipides totaux et des triglycérides a été étudiée pour toutes les souches cultivées en conditions de stress nutritif (carence brusque en azote). Les résultats obtenus sont présentés dans les Figure III-2 et Figure III-3, respectivement. La capacité d'accumulation des lipides totaux et des TAG est exprimée ici par le pourcentage par rapport à la matière sèche à la fin de la période de culture des souches en «PBR-EOSS» dans des milieux de culture dépourvus d'azote ($t=11$ jours).

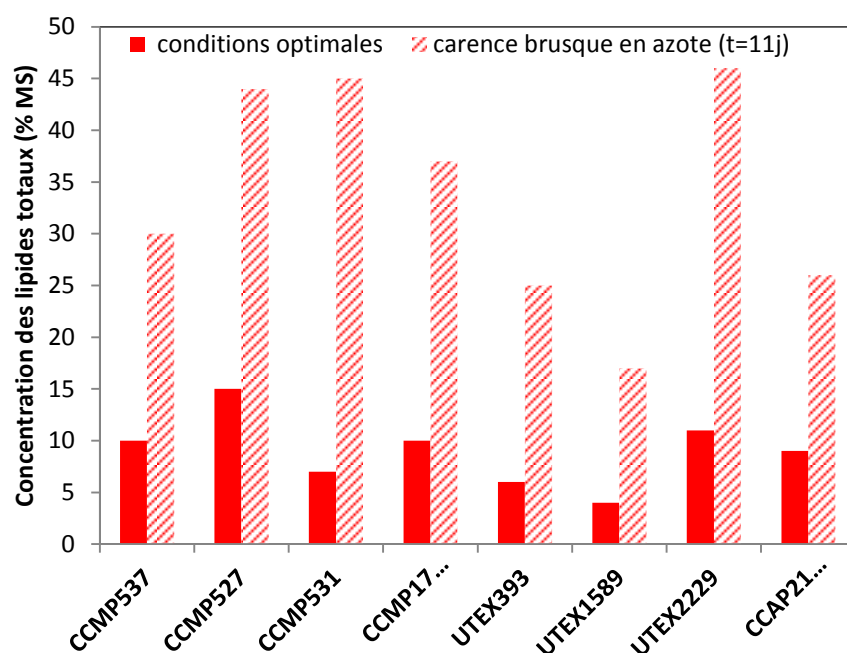


Figure III-2 Augmentation de la teneur des souches en lipides totaux après 11 jours de leur culture en «PBR-EOSS» sous des conditions de carence brusque en azote

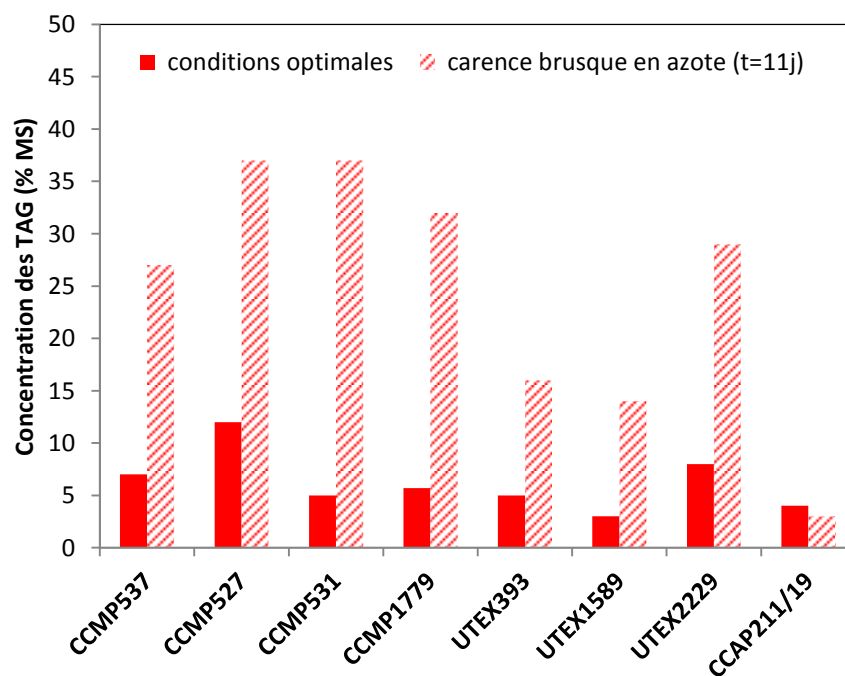


Figure III-3 Augmentation de la teneur des souches en triglycérides après 11 jours de leur culture en «PBR-EOSS» sous des conditions de carence brusque en azote

Souches	% TAG/lipides totaux
<i>CCMP537</i>	90
<i>CCMP527</i>	84
<i>CCMP531</i>	82
<i>CCMP1779</i>	86
<i>UTEX393</i>	64
<i>UTEX1589</i>	82
<i>UTEX2229</i>	63
<i>CCAP211/19</i>	12

Tableau III-2 Concentration en TAG par rapport aux lipides totaux en conditions de carence en azote

Les Figure III-2 et Figure III-3 montrent clairement l'augmentation importante de la teneur des souches en lipides totaux et en triglycérides après 11 jours de carence. En comparaison avec la teneur en lipides totaux dans les conditions de croissance normales (+N), les résultats montrent que le pourcentage des lipides totaux a été augmenté d'un facteur 3 pour les souches CCMP537, CCMP527 et CCAP211/19 (Figure III-2). Pour les souches CCMP1779, UTEX393, UTEX1589 et UTEX2229, à la fin de la période de leur culture en carence azotée (t=11jours), la teneur des lipides totaux a atteint une valeur quatre fois plus élevée. Il faut noter que la souche CCMP531 a montré l'écart le plus élevé entre les valeurs de la concentration des lipides totaux dans les deux conditions de culture. Ainsi, une concentration 6 fois plus élevée a été signalée le 11^{ème} jour de la carence.

De même, pour les contenus en triglycérides, une augmentation nette et élevée a été observée le 11^{ème} jour de la carence chez toutes les souches, sauf pour la souche CCAP211/19 (Figure III-3). La quantité des triglycérides a ainsi augmenté respectivement d'un facteur de 3, 4, 5, 6, et 7 pour les souches CCMP527 et UTEX393, CCMP537 et UTEX2229, UTEX1589, CCMP1179 et CCMP531.

Il est également constaté qu'en présence d'une carence azotée, les lipides sont constitués principalement des TAG (Tableau III-2). Les triglycérides constituent en effet la proportion majoritaire des lipides totaux de toutes les souches (63 à 90% des lipides totaux), sauf pour la souche CCAP211/19 dont seulement 12 % des lipides totaux sont des triglycérides. Ces résultats obtenus sont en accord avec la littérature et confirment l'idée qu'en conditions de carence en azote, les microalgues accumulent principalement des lipides de réserves (TAG) afin de s'adapter aux nouvelles conditions défavorables.

Les résultats ont aussi montré une différence dans la réponse et le métabolisme lipidique des souches cultivées en carence azotée. Une catégorie a accumulé une quantité importante de lipides totaux (CCMP527, CCMP531 et UTEX2229) (> 40%) et de

triglycérides (CCMP527, CCMP531 et CCMP1179) (>30%) en conditions de carence. Toutefois, une accumulation forte en lipides totaux n'implique pas forcément une accumulation forte en triglycérides. À titre d'exemple la souche CCMP1179 est l'une des souches qui a montré une forte capacité à accumuler les TAG alors qu'elle n'était pas parmi les souches qui ont accumulé fortement les lipides totaux. De la même manière, la souche UTEX2229 a manifesté une capacité d'accumulation des lipides totaux la plus élevée (46% de son poids sec) alors qu'elle n'a accumulé que 29% de son poids sec en triglycérides.

1.3-B. Évaluation de la productivité en TAG

La capacité d'accumulation des TAG n'est pas un critère suffisant. Un critère clé est la productivité des triglycérides qui est liée à la vitesse de production de la souche mesurée ici dans des conditions défavorables de la carence brusque en azote. Dans le but de caractériser la productivité des souches en triglycérides, la croissance en conditions de carence azotée a donc été suivie (Tableau III-3).

La productivité en biomasse au cours de la carence en azote a été observée plus faible d'un ordre de grandeur que celle obtenue dans les conditions favorables de la croissance. Ces résultats sont classiques du fait que la biomasse sèche est composée de 10 à 15% d'azote. En privant la culture de l'azote, une diminution significative de la productivité de biomasse est alors provoquée (Van Vooren *et al.*, 2012). Cependant, le comportement des souches dans ces conditions de croissance défavorables (-N) s'est révélé ici également très variable. Ainsi, des souches ont maintenu une bonne croissance (CCMP537, CCMP527, UTEX393, UTEX1589 et UTEX2229) ($\langle r_x \rangle > 0.03 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$) tandis que les autres (CCMP1779, CCAP211/19 et CCMP531) ont montré une croissance beaucoup plus faible.

Comme déjà mentionné, une productivité élevée en TAG est assurée via un compromis entre la capacité de la souche à accumuler un taux élevé de TAG tout en gardant une bonne croissance dans les conditions de la carence azotée. Donc un taux d'accumulation élevé en TAG est un critère insuffisant de sélection du fait qu'il ne garantit pas une productivité intéressante. À titre d'exemple, les souches CCMP531 et CCMP1779 ont montré un potentiel d'accumulation important (37 et 32 % de leur poids sec, respectivement), mais leur incapacité à bien croître dans des conditions de croissance défavorables (-N), résulte en une productivité faible en triglycérides (0.009 et $0.004 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$, respectivement) (Tableau III-3). Par contre, UTEX39, UTEX1589 et UTEX2229 n'ont pas accumulé des grandes quantités de TAG (16, 14 et 29%, respectivement), mais le maintien d'une bonne croissance résulte en une productivité importante en TAG ($> 0.01 \text{ Kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$).

Souches	$\langle P_X \rangle$ (kg.m ⁻³ .j ⁻¹)	$\langle P_{TAG} \rangle$ (kg.m ⁻³ .j ⁻¹)
CCMP537	0.06	0.018
CCMP527	0.033	0.013
CCMP531	0.02	0.009
CCMP1779	0.004	0.004
UTEX393	0.055	0.012
UTEX1589	0.118	0.02
UTEX2229	0.036	0.016
CCAP211/19	0.009	0.0002

Tableau III-3 Productivité volumique en matière sèche et en TAG obtenue après une période de 11 jours de culture des souches en conditions de carence azotée (mode batch)

1.3-C. Conclusion sur l'étape de pré-criblage en carence azotée

L'impact de la biodiversité s'est une nouvelle fois révélé important sur le critère de la productivité en TAG. Ainsi, les souches ont montré une grande différence dans leur capacité à accumuler les lipides et les TAG avec une croissance également très variable lorsqu'elles étaient mises sous des conditions de carence brusque en azote. Au final, les souches qui ont montré une production de TAG supérieure à 0.01 kg.m⁻³.j⁻¹ ont été ici sélectionnées. Ainsi, parmi les huit souches testées dans cette partie, quatre répondent à ce critère. Ces souches sont: *Nannochloropsis salina* CCMP537, *Nannochloropsis gaditana* CCMP527, *Scenedesmus obliquus* UTEX393, *Scenedesmus* sp. UTEX1589 et *Parachlorella kessleri* UTEX2229. Dans l'étape ultérieure, elles seront criblées pour étudier leur fragilité cellulaire suite à une destruction mécanique à haute pression (1750 bar).

1.4- Phase de sélection liée au critère de fragilité cellulaire

Comme les triglycérides (TAG) sont des molécules intracellulaires, il est nécessaire de les récupérer avant de les convertir en biodiesel. Il est généralement admis que le travail sur une biomasse sèche doit être évité, en raison de la surconsommation d'énergie utilisée pour le séchage, ce qui conduit à un bilan énergétique négatif sur le processus global de la production (Cooney *et al.*, 2011; Halim *et al.*, 2012). Le développement d'un procédé de récupération des TAG en voie humide est donc un enjeu fort.

Parmi les nombreuses solutions possibles, il est possible de combiner des techniques de destruction cellulaire (broyage) pour libérer les TAG intracellulaires avec des méthodes d'extraction des molécules cibles par solvant. Cela permet de traiter la biomasse dans son milieu aqueux (extraction en voie humide). Dans ce contexte, la fragilité cellulaire est un critère très important à prendre en considération lors de la sélection des souches, puisqu'il affecte la consommation d'énergie lors du broyage, ainsi que le rendement d'extraction lors de l'étape de récupération des TAG (Résultats internes au GEPEA, thèses de V. Montalescot et E. Angles).

Donc, dans la logique de la procédure de criblage des souches de microalgues développée dans cette étude et qui prend en considération des critères de l'application finale envisagée, la fragilité cellulaire des souches productrices des triglycérides a été examinée. Ceci a été évalué en déterminant le pourcentage de destruction des cellules après le passage de la culture dans un broyeur haute pression, qui est une technologie possible de broyage en voie humide. Dans cette étude, la pression appliquée à toutes les souches était de 1750 bars. Cette pression s'était révélée représentative de la mesure dans la fragilité cellulaire, dans la mesure où elle-même à une destruction partielle des cellules (essais internes au GEPEA). Les résultats sont présentés dans la Figure III-4.

Comme le montre la Figure III-4, les souches ont montré des fragilités cellulaires très différentes. Nous avons classifié comme souches les plus sensibles, celles qui présentaient un pourcentage de destruction cellulaire supérieur à 80%. C'est le cas des souches *Parachlorella kessleri* UTEX2229 (90%) et *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 (80.5%). De plus, deux souches ont montré une fragilité cellulaire moyenne, *Nannochloropsis salina* CCMP537 (58.1%) et *Scenedesmus obliquus* UTEX393 (73%). La souche la plus résistante a été *Scenedesmus sp.* UTEX1589 (41%).

Donc, une nouvelle fois, un impact fort de la souche a été observé en ce qui concerne la fragilité cellulaire, lié certainement à la composition et les propriétés physico-chimiques de la paroi cellulaire. Une variation nette a été observée entre les souches des différents genres et même les souches du même genre. A titre d'exemple, pour le genre *Scenedesmus*, un écart important a été signalé. La souche *Scenedesmus obliquus* UTEX393 a montré une fragilité cellulaire moyenne (73%) alors que la souche *Scenedesmus sp.* UTEX1589 était la souche la plus résistante identifiée ici (41%). De même, pour le genre *Nannochloropsis* la souche *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 s'est révélée être parmi les souches les plus sensibles identifiées dans cette étude (80.5%), tandis que *Nannochloropsis salina* CCMP537 a une fragilité cellulaire moyenne (58.1%).

À la fin de cette étape de sélection, les souches productrices de TAG qui ont montré une fragilité cellulaire moyenne (>50%) et intéressante (>80%) ont été choisies. Par

conséquent, quatre souches ont été sélectionnées (*Nannochloropsis salina* CCMP537, *Nannochloropsis gaditana* CCMP527, *Scenedesmus obliquus* UTEX393 et *Parachlorella kessleri* UTEX2229).

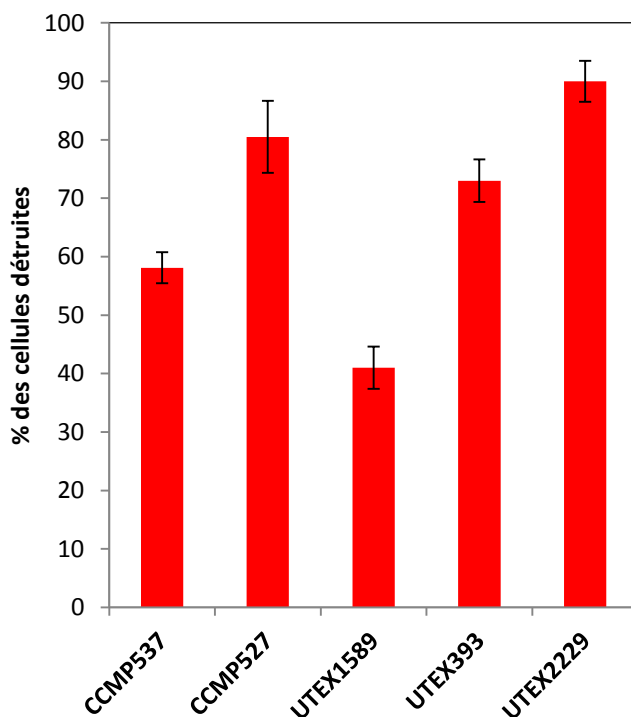


Figure III-4 Caractérisation de la fragilité cellulaire des souches productrices de TAG, cultivées dans des conditions normales de croissance (+N)

1.5- Bilan final sur l'étape de pré-criblage

La technologie «PBR-EOSS» développée et mise en place dans cette étude a permis de caractériser les souches de microalgues issues de collections et de genres différents. Les informations liées à leur comportement, leur croissance, leur fragilité, et leur métabolisme lipidique (capacité d'accumulation et productivité des lipides et TAG) dans des conditions de culture différentes (optimales de croissance et carence azotée) ont été obtenues.

Les résultats obtenus ont montré que ces bancs de criblage sont utiles pour mettre en place une comparaison pertinente des souches issues de différentes collections, ici obtenues dans des conditions spécifiques de culture en PBR.

Quels que soit les critères, l'impact de la biodiversité des microalgues a été observé avec une grande variation au niveau du comportement et de la réponse des souches caractérisées, même entre les souches qui font partie du même genre et de la même espèce.

En bilan de cette première étape de pré-criblage, un ensemble de quatre souches prometteuses a été sélectionné à partir de 15 souches examinées. A noter que ces souches appartiennent à 3 genres différents de microalgues. Tout d'abord, pour le genre *Nannochloropsis*, les souches *Nannochloropsis salina* CCMP537 et *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 ont été identifiées comme étant les meilleures des dix souches de *Nannochloropsis* caractérisées ici. En ce qui concerne le genre *Scenedesmus*, la souche *Scenedesmus obliquus* UTEX393 a été choisie. La dernière souche intéressante identifiée au niveau de cette étape est *Parachlorella kessleri* UTEX2229. Ces quatre souches sélectionnées ont montré les meilleures performances sur les différents critères de criblage fixés à ce niveau: facilité de culture, productivité en biomasse intéressante sous des conditions optimales et défavorables de culture, bonne production de TAG et fragilité cellulaire suffisante pour la récupération ultérieure des TAG en voie humide.

Souche	Productivité intéressante en biomasse $P_X > 0.01$ (kg.m ⁻³ .j ⁻¹)	Facilité de culture	Productivité intéressante en TAG $P_{TAG} > 0.01$ (kg.m ⁻³ .j ⁻¹)	Fragilité cellulaire à 1500 bars (% destruction>60%)
CCMP525		x		
CCMP537	x	xx	x	x
CCMP538			x	
CCMP531	x	x		x
CCMP1779	x	x		
CCMP527	x	xx	x	x
CCMP529			x	
N.o (collection privée)	x	xx	x	
CCMP 505		x		x
N.o. AB		x	x	
UTEX393	x	xx	x	x
UTEX1589	x	xx	x	
UTEX2229	x	xx	x	x
UTEX1185		x		
CCAP211/19	x	xx		

Tableau III-4 Bilan final du pré-criblage (x: Facile à cultiver ; xx: Très facile à cultiver).

Les souches retenues comme étant les plus performantes sont marquées en rouge.

2 Criblage approfondi et choix final des souches d'intérêt

2.1- Introduction

Au niveau de cette étape de criblage, toutes les expérimentations sont réalisées dans des PBR de type air-lift (1L) décrits en détails dans le paragraphe (II.4.3-B) du chapitre II. La culture des quatre souches sélectionnées dans ces PBR en conditions de culture hautement contrôlées a pour but d'étudier en détails valider leurs performances dans des conditions de culture représentatives de l'application industrielle finale. De plus, le volume relativement important de ce type des PBR a permis de réaliser une étude détaillée des souches sélectionnées et de les caractériser de façon plus approfondie.

En effet, le volume relativement faible des «PBR-EOSS» (30ml) a limité le nombre d'échantillonnage et donc l'étude des cinétiques d'accumulation de TAG dans les conditions de carence en azote. À titre d'exemple, il n'a pas été possible d'identifier les souches qui accumuleraient rapidement une quantité significative de TAG avant le 11^{ème} jour qui est la durée retenue pour réaliser l'expérience. L'analyse des lipides était restreinte au début et à la fin de la culture carencée.

En complément à ces essais, la cinétique de croissance et d'accumulation des lipides (TAG) en conditions défavorables de culture (-N) a été étudiée plus en détails dans les PBR air-lift (1L). La qualité des huiles produites par les souches (profil d'acide gras des TAG) sera aussi caractérisée.

2.2- Validation des performances en croissance des souches dans des conditions de culture optimales (+N) et défavorables (-N)

Dans cette étude, les performances de croissance se traduisent par la capacité des souches à produire de la biomasse en conditions de culture normales (+N) et défavorables (-N). Afin de valider les performances des souches sélectionnées dans l'étape précédente, leur croissance photosynthétique dans des conditions représentatives d'atténuation de lumière en PBR en régime dit de photolimitation, ainsi qu'en conditions de carence azotée ont été examinées. Les résultats sont présentés dans les paragraphes suivants.

Comme mentionné dans la partie II.2 du chapitre précédent, les quatre souches sélectionnées lors de l'étape de pré-criblage en «PBR-EOSS-», ont été cultivées en mode continu (chemostat) dans des PBR *air-lift* (1L) en dehors de toute limitation minérale (régime dit de photolimitation). Cela a permis la stabilisation de la culture aux conditions rencontrées dans les photobioréacteurs. Une fois les concentrations en biomasse et en pigments stables, la productivité de chaque souche en biomasse a été mesurée. Ensuite, dans le but d'étudier la cinétique de croissance des souches dans les conditions de carence azotée, une partie de la culture (récolte) a été re-suspendue dans un second photobioréacteur air-lift (1L) contenant un milieu de culture dépourvu en azote pour stimuler l'accumulation intracellulaire des lipides totaux et notamment les TAG.

2.2-A. Caractérisation de la productivité en biomasse sèche en mode continu dans des conditions normales de croissance (régime de photo-limitation)

La croissance photosynthétique des souches cultivées dans des PBR air-lift (1L) en mode continu, et sous une illumination constante de $150 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et un taux de dilution $D=0.01\text{h}^{-1}$ a été étudiée. À noter qu'ici, toute limitation minérale a été évitée. Par conséquent, les productivités déterminées sont uniquement en fonction de la lumière et de son utilisation biologique, résultats ici de l'intensité lumineuse reçue à la surface du PBR et des conditions de transfert de la lumière à l'intérieur du volume réactionnel du PBR. Ces conditions sont dites de photolimitation (voir la partie I.7.1.B.2). À noter que ces résultats obtenus ici en géométrie plane sont intéressants car ils permettent d'obtenir des productivités en surface précise pour ensuite une extrapolation des données à d'autres PBR ou conditions d'éclairement comme montré dans les travaux de Pruvost *et al.*, (2011). Les résultats sont présentés par la Figure III-5 et le Tableau III-5.

Comme le montre la figure III.5, pour chacune des souches étudiées, le temps nécessaire à la stabilisation de la culture ainsi que la concentration en matière sèche à l'état stationnaire diffèrent. Ainsi, les résultats expérimentaux montrent qu'une période moyenne de deux semaines (11 à 14 jours) est nécessaire pour que les cultures atteignent leur régime stable. Ainsi, pour les souches CCMP527 et UTEX2229, la stabilité apparaît après 11 jours, et elles atteignent des concentrations moyennes en matière sèche de 1.61 et 1.51 kg.m^{-3} (Figure III-5), ce qui correspond respectivement à des productivités volumiques de 0.386 et 0.364 $\text{kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ et des productivités surfaciques de 11.58 et $10.92 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ (Tableau III-5). La souche CCMP537 atteint son régime stable après 12 jours avec une concentration moyenne en matière sèche de l'ordre de 1.32 kg.m^{-3} , équivalente à une productivité volumique de 0.317 $\text{kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ et une productivité surfacique de $9.51 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$. La souche la plus productive en biomasse se révèle être *Scenedesmus obliquus* UTEX393. Après deux semaines de culture en PBR, une concentration stable en matière sèche de 2.61 kg.m^{-3} (Figure III-5), équivalente à une productivité volumique de 0.627 $\text{kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ et une productivité surfacique de $18.81 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ est obtenue (Tableau III-5). À noter que cette souche a aussi montré la production en biomasse la plus élevée lors de l'étape de pré-criblage (Tableau III-1), ce qui confirme donc l'utilisation des PBR-EOSS à cette fin. En prenant en compte le pourcentage d'erreur statistique qui correspond aux valeurs de l'incertitude de l'opérateur, les souches CCMP537, CCMP527 et UTEX2229 ont des productivités réduites en biomasse (0.317, 0.386 et 0.364 $\text{kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ respectivement).

Ces résultats confirment au final les conclusions obtenues dans le pré-criblage dans les PBR«EOSS» et valident donc les performances de croissance des souches sélectionnées dans les conditions normales de croissance (+N).

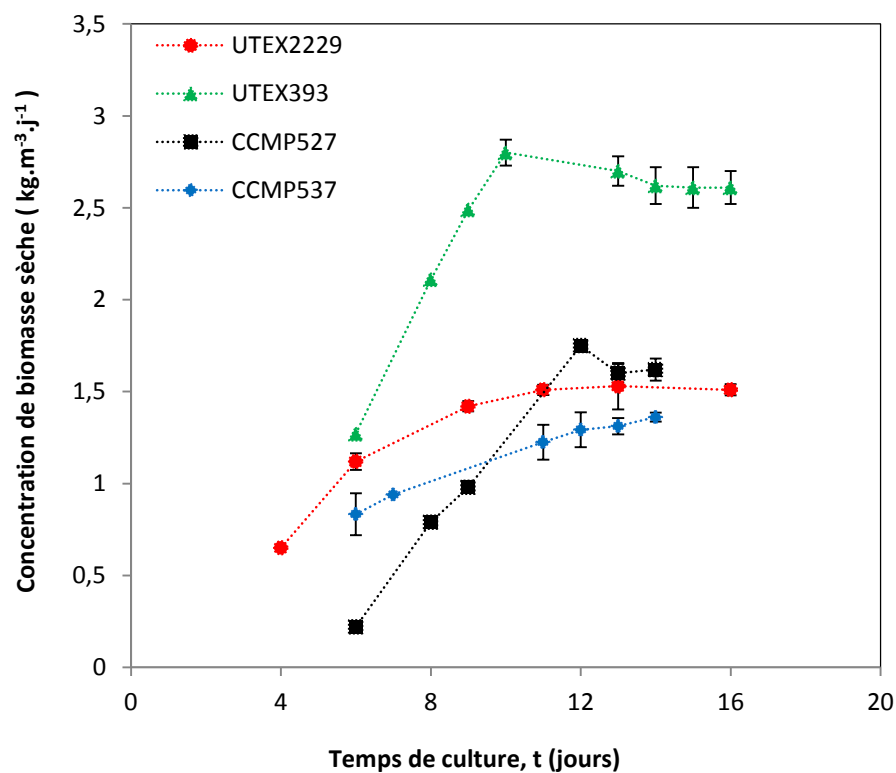


Figure III-5 Evolution temporelle de la concentration en biomasse sèche des souches cultivées en mode continu (conditions de croissance normales (+N))

Souches	Productivité volumique P_X ($\text{kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$)	Productivité surfactive S_X ($\times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$)	Intervalle de confiance (%)
CCMP537	0.317	9.51	6.67
CCMP527	0.386	11.58	7.89
UTEX2229	0.364	10.92	1.89
UTEX393	0.627	18.81	0.55

Tableau III-5 Productivités volumiques et surfaciques en matière sèche des souches en régime stable

2.2-B. Étude de la cinétique de croissance des souches dans des conditions de carence brusque en azote (-N)

Les souches présentent des comportements très différents lors de la mise en carence azotée, comme cela a été déjà montré dans le paragraphe 1.3-B de l'étape de pré-criblage. Toutes les souches ont donc été cultivées 11 jours en *batch* dans des PBR *air-lift* (1L) contenant un milieu de culture dépourvu d'azote (le protocole est détaillé dans le paragraphe II.2). Les résultats sont donnés dans la Figure III-6. Au début de la culture, toutes les souches exposées à une illumination continue de $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ont une concentration en biomasse sèche de 0.2 kg.m^{-3} tel que fixée par Van Vooren *et al.*, (2012). Malgré des conditions de culture identiques pour toutes les souches, des cinétiques de croissance très différentes ont été obtenues.

En effet, toutes les souches examinées ici (UTEX2229, UTEX393 et CCMP527) à part CCMP537, ont présenté une évolution quasi-linéaire de leur concentration en matière sèche en fonction du temps. Pour les souches UTEX2229 et UTEX393, la concentration en matière sèche a continué à augmenter tout le long de la culture, de 0.2 kg.m^{-3} tout au début de l'expérience jusqu'à 1.9 et 1 kg.m^{-3} respectivement le dernier jour de la carence ($t=11\text{j}$). Pour la souche CCMP537, la concentration en matière sèche a augmenté de 0.2 kg.m^{-3} le jour du début de la culture jusqu'à 0.6 kg.m^{-3} le 7^{ème} jour de carence. Au-delà de cette période, la concentration est demeurée constante comme le montre la Figure III-6. Pour la souche CCMP527, qui est une souche du même genre que CCMP537, la concentration en matière sèche a continué à augmenter tout au long de la culture, de 0.2 kg.m^{-3} au début jusqu'à 1.5 kg.m^{-3} le dernier jour de la carence ($t=11 \text{ jours}$). Une nouvelle fois, un effet «souche» a donc été observé.

Ces résultats montrent que toutes les souches sélectionnées ont une bonne croissance, même lorsque les conditions deviennent défavorables. Les souches UTEX2229 et CCMP527 ont montré la croissance la plus importante et présentent donc les vitesses de production en biomasse les plus élevées, avec 1.88 et $1.48 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ respectivement à la fin de la culture.

En comparant la croissance photosynthétique des souches dans les deux conditions de culture appliquées dans cette étude (optimales et carence azotée), les résultats montrent que les performances des souches sont fortement liées aux conditions de culture appliquées. Autrement dit, une croissance importante en conditions de croissance optimales n'implique pas une bonne croissance lorsque les conditions deviennent défavorables à la croissance comme la carence azotée. À titre d'exemple, la souche UTEX393 a la croissance photosynthétique la plus importante lorsqu'elle est cultivée dans des conditions de croissance favorables, alors qu'en conditions de carence en azote, elle

montre une croissance moins intéressante que celle observée pour les souches UTEX2229 et CCMP527. En résumé, ces résultats montrent l'importance d'étudier la croissance des souches dans les deux conditions de culture, les performances intrinsèques étant très influencées par les conditions de culture.

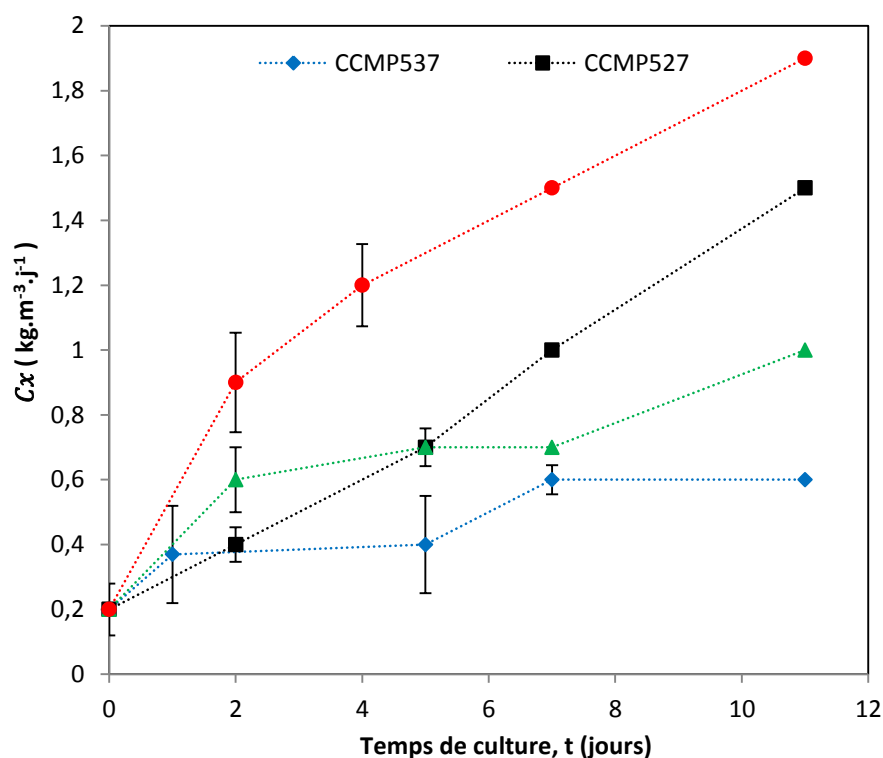


Figure III-6 Caractérisation de la croissance des souches cultivées dans des conditions de culture en carence azotée (-N)

2.3- Validation des performances en production de TAG

Le volume important des PBR air-lift utilisés dans cette partie du criblage a permis de caractériser en détails la réponse des souches aux conditions de carence brusque en azote en termes d'accumulation et de production de TAG. Les lipides et les TAG ont été analysés tous les deux jours.

2.3-A. Étude de la cinétique d'accumulation des lipides et des TAG

Dans un premier temps, la cinétique d'accumulation des lipides et des TAG en réponse à une carence azotée appliquée à la culture des souches a été examinée. Les résultats sont présentés respectivement dans les Figure III-7 et Figure III-8.

Les résultats montrent que pour toutes les souches, l'accumulation des lipides et des TAG présente une cinétique identique. Cette observation s'explique par le fait que sous de telles conditions de culture (-N), les TAG constituent la proportion majeure des lipides totaux (80 à 97% ici) et l'accumulation est donc expliquée principalement par l'augmentation en TAG.

Pour toutes les souches, l'accumulation des lipides et des TAG a été stimulée dès le début de la carence (Figure III-7 et Figure III-8). Cela implique que les voies de *novo* de biosynthèse des acides gras ont été activées rapidement suite à la resuspension des cellules dans le milieu de culture dépourvu d'azote. Pour les souches UTEX393 et CCMP527, la teneur des cellules en lipides totaux a augmenté considérablement jusqu'au 5^{ème} jour de carence (de 8 à 29 % et de 6 à 52 %, respectivement). Puis à partir de cette date, aucune augmentation significative n'a été signalée. De même, en ce qui concerne les TAG, la même cinétique a été observée. Pour la souche CCMP527, une augmentation d'un facteur 15 de la teneur des cellules en TAG a été obtenue le 5^{ème} jour de carence (de 3 à 50%), alors que pour la souche UTEX393, la teneur en TAG était 10 fois plus importante le cinquième jour de carence. En outre, la souche UTEX2229 a présenté une cinétique d'accumulation intéressante pendant les quatre premiers jours de carence, où les lipides totaux et les TAG ont atteint des concentrations 5 fois plus élevées (de 9 à 40% et de 6 à 31% respectivement). Par contre, la souche CCMP537 a montré une cinétique différente. Cette dernière a continué à accumuler fortement les lipides totaux et les TAG jusqu'au 7^{ème} jour de carence (de 15 à 63 % et de 12 à 59 %, respectivement). Ensuite, au-delà de cette période, la concentration des lipides totaux et des TAG commence à diminuer légèrement.

Au final, les souches qui ont présenté la capacité la plus forte à accumuler les lipides totaux et les TAG, sont les souches de *Nannochloropsis* CCMP537 et CCMP527. Ces résultats s'accordent avec les données de la littérature (Tableau III-1) qui rapportent que *Nannochloropsis* est parmi les meilleurs genres de microalgues à accumuler les TAG (paragraphe II.3.4). À noter que dans cette étude, les souches identifiées ont montré une accumulation plus importante que celle des souches citées dans la littérature (Tableau I-1). On notera aussi que dans la plupart des études, la caractérisation se limite aux lipides totaux, celle des TAG nécessitant en premier temps leur séparation des lipides totaux, ce qui plus est long et compliqué. Dans cette étude, les souches *Nannochloropsis salina*

CCMP537 et *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 ont accumulé respectivement jusqu'à 59 et 56 % de leur poids sec en TAG. Ces valeurs sont importantes, et n'ont jamais été citées dans la littérature.

En résumé, les quatre souches examinées ici se révèlent fortement oléagineuses. Elles accumulent fortement des lipides totaux et surtout des TAG suite à leur culture en absence d'azote. À noter qu'une accumulation intéressante et rapide a été observée chez les souches UTEX2229, CCMP527 et CCMP537. Une nouvelle fois, les souches du même genre (CCMP537 et CCMP527) ont présenté des cinétiques d'accumulation différentes.

Ces résultats sont aussi en accord avec les résultats en accumulation des TAG trouvés lors de l'étape de pré-criblage de ces souches (paragraphe 1.3-A).

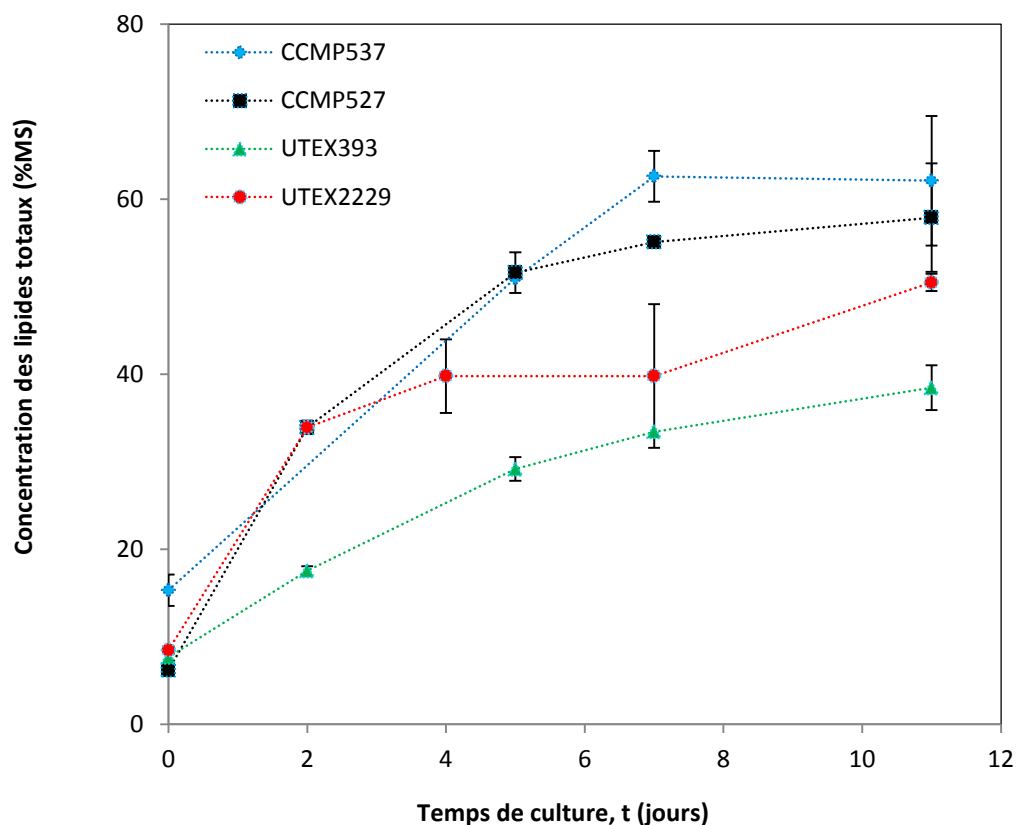


Figure III-7 Accumulation des lipides totaux des souches cultivées en *batch* dans des PBR air-lift (1L) sous carence azotée (-N)

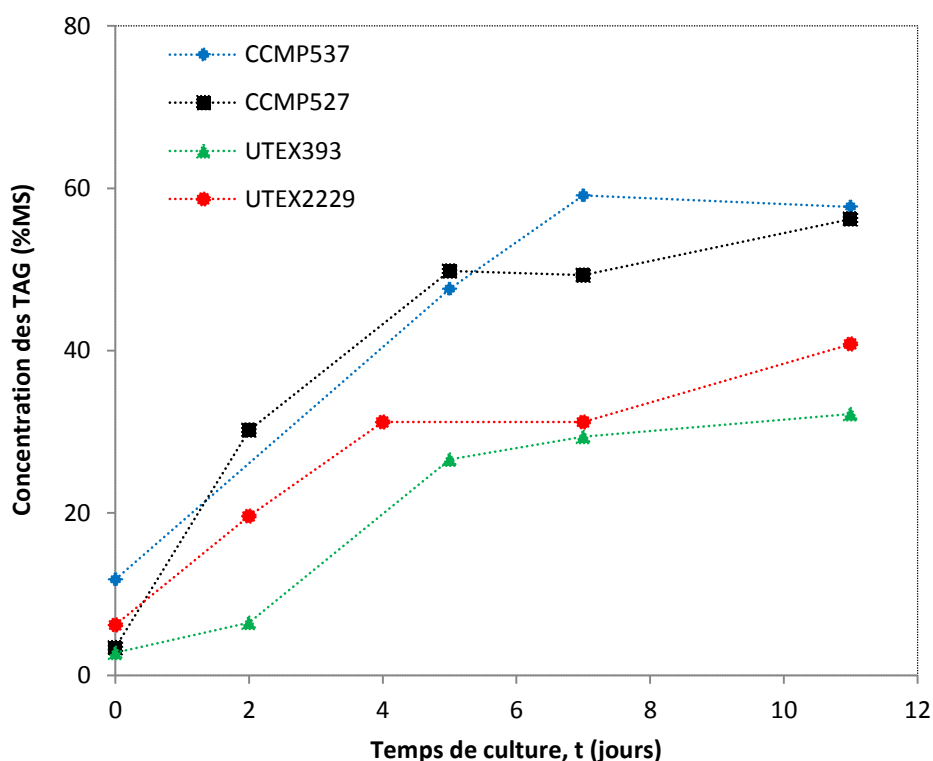


Figure III-8 Accumulation des TAG des souches cultivées en *batch* dans des PBR air-lift (1L) sous carence azotée (-N)

2.3-B. Étude de la productivité en TAG

Dans le paragraphe précédent, les souches ont montré des fortes teneurs intracellulaires dans les conditions de carence brusque en azote. Or, comme déjà mentionné, le critère clé de la sélection d'une souche d'intérêt pour la production de biodiesel est sa productivité en triglycérides. La cinétique de production des triglycérides a donc été suivie pour chacune des souches. Les résultats sont donnés dans la Figure III-9.

Dans cette figure, l'évolution de la vitesse de production des TAG $\langle P_{TAG} \rangle$ pendant les 11 jours de culture en absence d'une source d'azote est visible. Les résultats montrent également que les quatre souches ont des cinétiques de production très différentes. On observe une nouvelle fois une différence dans les cinétiques de production des souches du même genre *Nannochloropsis*. En effet, pour la souche *Nannochloropsis gaditana* CCMP527, la vitesse de production des TAG augmente fortement pendant les trois premiers jours de la carence. La production des TAG par la souche continue ensuite à augmenter mais avec des vitesses plus lentes, et la productivité maximale est atteinte à la fin de la culture (0.08

kg.m⁻³.j⁻¹). Pour la souche *Nannochloropsis salina* CCMP537, la production des TAG a une cinétique totalement différente. Pour cette dernière, la production des TAG augmente progressivement avec le temps de culture et atteint une valeur maximale le 7^{ème} jour de la carence (0.05 kg.m⁻³.j⁻¹). Au-delà de cette période, une chute drastique de la productivité des TAG est observée (jusqu'à 0.03 kg.m⁻³.j⁻¹ à la fin de la culture). En comparant la productivité maximale de CCMP537 en TAG et celle de CCMP527, *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 apparaît deux fois plus productive que *Nannochloropsis salina* CCMP537 dans les mêmes conditions. À noter que dans le paragraphe précédent (2.3-A), ces deux souches ont montré un potentiel proche à accumuler des TAG. La meilleure productivité en TAG de *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 s'explique donc par sa capacité à garder une bonne croissance dans des conditions défavorables (-N) (Figure III-6), comme cela a aussi été observé précédemment dans le paragraphe (2.2-B). Cette observation renforce l'idée de comparer les souches en se basant sur leur productivité en TAG et non pas sur leur potentiel d'accumulation seul.

La souche *Scenedesmus obliquus* UTEX393 était la souche la moins productive des TAG identifiée dans la présente étude. Elle a cependant montré une cinétique de production proche de celle observée pour jusqu'à une valeur maximale le 5^{ème} jour (0.04 kg.m⁻³.j⁻¹) suivie d'une chute de la productivité (jusqu'à 0.029 kg.m⁻³.j⁻¹). Après la chute observée le 7^{ème} jour de carence, la productivité demeure constante.

En ce qui concerne la souche UTEX2229, la courbe d'évolution de sa productivité en fonction du temps a pris une forme exponentielle pendant les 3 premiers jours de la carence, où la vitesse de production des TAG a augmenté fortement. Une productivité volumique maximale de 0.09 kg_{TAG}.m⁻³.j⁻¹ a été atteinte le 4^{ème} jour de la carence. Ensuite une chute au niveau de la productivité a été observée où cette dernière a baissé jusqu'à atteindre une valeur de 0.07 kg.m⁻³.j⁻¹ le 7^{ème} jour de carence. À partir de cette date, la productivité des TAG demeure constante.

Au final, les souches les plus productives en TAG identifiées ici sont *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 et *Parachlorella kessleri* UTEX2229. Le pouvoir d'accumulation de TAG de *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 se révèle être beaucoup plus important (Figure III-8). La meilleure croissance observée pour *Parachlorella kessleri* UTEX2229 compense cela et amène au final à des productions plus élevées en TAG (Figure III-6).

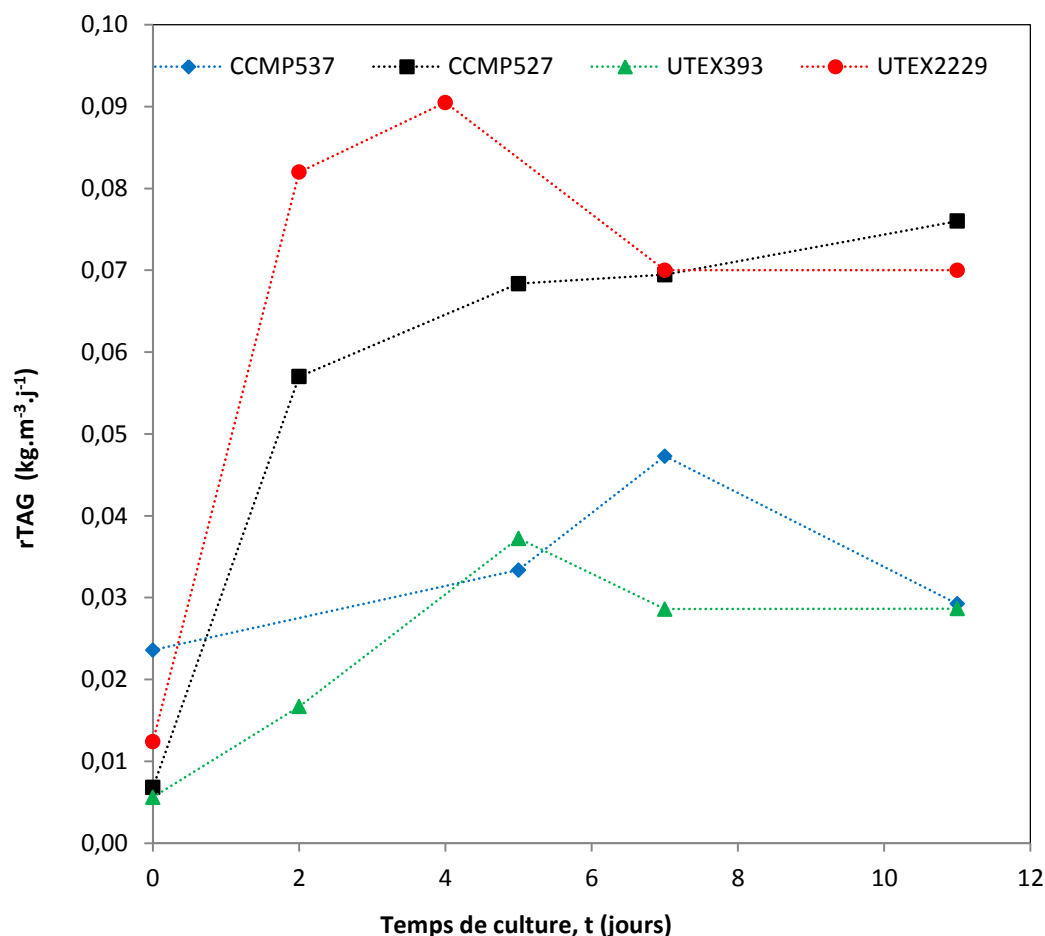


Figure III-9 Caractérisation de la cinétique de production des TAG des souches cultivées en *batch* dans des PBR air-lift (1L) en carence azotée (-N)

2.4- Évaluation de la qualité des huiles produites

La qualité des huiles produites par les microalgues est aussi un critère de sélection des souches pour le biodiesel. Ce critère est très important puisqu'il affecte directement les propriétés du biodiesel final (Knothe, 2005). Ce sont ici les acides gras liés aux molécules de triglycérides qui déterminent cette qualité. Dans ce contexte, le profil des acides gras des TAG a été examiné pour les quatre souches sélectionnées, et pour les conditions de culture appliquées.

2.4-A. Étude des profils des acides gras dans des conditions de culture normales (+N) et défavorables (-N)

Le profil des acides gras liés aux TAG a été étudié dans les conditions normales de culture (+N) ainsi que sous celles qui stimulent une forte accumulation des TAG (carence brusque en azote:-N) dans le but d'évaluer la qualité des huiles produites. Les résultats sont présentés dans la Figure III-10. Le changement de la composition des acides gras des TAG est représenté ici par la variation de leur abondance en pourcentage des acides gras totaux associés aux TAG.

Dans les conditions normales de croissance (+N), les TAG extraits des quatre souches étudiées ici sont principalement composés d'acides gras saturés, tels que l'acide myristique (C14:0), l'acide palmitique (C16:0), et l'acide stéarique (C18:0), avec une prédominance de l'acide palmitique (C16:0). Les analyses effectuées ont souligné l'absence des acides gras polyinsaturés, rencontrés principalement dans les lipides de structure (phospholipides). Pour *Nannochloropsis salina* CCMP537, les TAG ont montré le profil suivant: 30% de l'acide myristique (C14:0); 59.2 % de l'acide palmitique (C16:0); et 10.8% de l'acide stéarique (C18:0). Pour *Nannochloropsis gaditana* CCMP527, l'acide myristique (C14:0) n'était pas présent. Seulement deux classes ont été détectées, l'acide palmitique (C16:0) (56.3%) et l'acide stéarique (C18:0) (43.7%). De même, les résultats de GC-FID montrent que les TAG produits par la souche *Scenedesmus obliquus* UTEX393, étaient aussi constitués de ces deux classes d'acides gras mais dans des pourcentages d'abondance différents (65.3 % pour l'acide palmitique (C16:0) et 34.7% pour l'acide stéarique (C18:0)). En ce qui concerne la souche *Parachlorella kessleri* UTEX2229, les acides gras sont répartis en 5.37% pour l'acide myristique (C14:0), 77.01% pour l'acide palmitique (C16:0) et 17.62% pour l'acide stéarique (C18:0).

Ces résultats aboutissent à conclure que les TAG produits par ces différentes souches comprennent approximativement les même classes d'acides gras, mais dans des pourcentages d'abondance différents.

Il a été remarqué que la composition des acides gras issus des TAG n'a pas montré un changement significatif en termes de classe lorsque les souches ont été cultivées dans des milieux de culture dépourvus d'azote. La seule différence a été l'apparition avec des pourcentages relativement faibles (< 13%) de l'acide nervonique (C24:1n-9) pour les souches CCMP527 (le 7^{ème} jour de la carence), UTEX2229 (à partir du 2^{ème} jour de la carence) et UTEX393 (à partir du 5^{ème} jour de la carence) comme le présente la Figure III-10. Cet acide gras appartient à la famille ω -9 des acides gras. Par ailleurs, concernant la répartition des acides gras exprimés en pourcentage d'abondance des acides gras totaux associés aux TAG, les résultats n'ont pas montré de variations importantes. D'une façon

générale, les principales variations détectées se sont révélées dans l'augmentation du pourcentage de l'acide palmitique (C16:0), et dans la diminution de ceux de l'acide myristique (C14:0) et stéarique (C18:0).

Au final, le degré élevé de la saturation des acides gras des TAG produits par les 4 souches étudiées ici affecte à la fois positivement et négativement la qualité de biodiesel. La richesse en acides gras saturés et l'absence de l'acide linoléique (C18:2n-6) et des acides gras polyinsaturés garantissent la production d'un biodiesel qui présente une stabilité oxydative importante et un indice de cétane élevé. Mais cela mène aussi à un point de fusion élevé et par conséquent des propriétés de viscosité et d'écoulement à froid mauvaises (Stansell *et al.*, 2012).

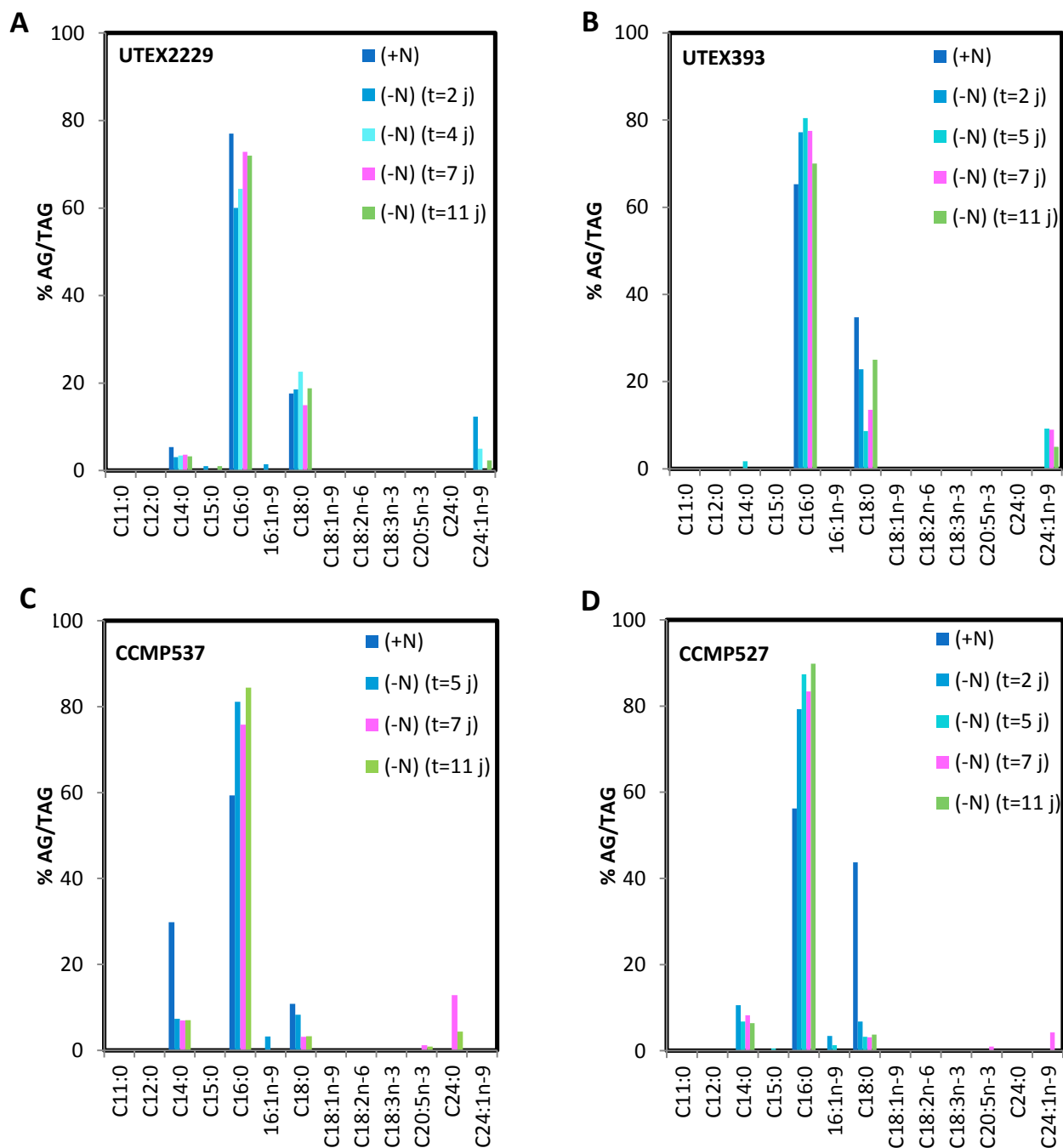


Figure III-10 Variation de la composition des acides gras des TAG dans des conditions de culture normales (+N) et de carence brusque en azote (-N). (A): *Parachlorella kessleri* UTEX2229; (B): *Scenedesmus obliquus* UTEX393; (C): *Nannochloropsis salina* CCMP537; et (D): *Nannochloropsis gaditana* CCMP527.

2.5- Validation de la fragilité cellulaire des souches

Lors de l'étape de pré-criblage (pré-criblage en «EOSS-PBR»), la fragilité cellulaire des souches a été estimée le 10^{ème} jour de la culture en conditions optimales de croissance (partie 1.4-). Cependant, leur fragilité dans les conditions d'induction de la production des TAG, comme la carence soudaine en azote appliquée dans ce travail, n'a pas été examinée.

Il est cependant possible que la fragilité cellulaire des souches soit dépendante des conditions de culture, surtout celles qui induisent l'accumulation des lipides. Comme déjà expliqué dans le chapitre I (paragraphe I.6.4), suite à la culture des souches dans des milieux dépourvus de l'azote, la physiologie de la cellule subit en effet des changements importants (Pruvost *et al.*, 2011; Breuer *et al.*, 2012). Dans ces conditions, la plupart des lipides accumulés sont des lipides neutres de réserves (TAG) qui ne remplissent aucun rôle structural, et dont une partie provient généralement de l'activation des voies novo de la synthèse des acides gras alors que l'autre partie provient de la rénovation des acides gras membranaires (lipides polaires), comme cela a été observé chez l'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* (Siaut *et al.*, 2011). Donc ces changements du métabolisme lipidique, associés à la chute significative de la teneur en protéines, peuvent affecter au final les propriétés de la paroi cellulaire des microalgues. Pour une souche donnée, une fragilité cellulaire importante estimée sous des conditions de culture normales ne signifie pas également une fragilité intéressante lorsque les conditions changent et deviennent défavorables. Dans ce contexte, la fragilité cellulaire a été mesurée après 11 jours en batch dans des PBR *air-lift* (1L) en conditions de carence en azote. La fragilité cellulaire dans les conditions de croissance optimales a également été de nouveau mesurée, ici dans des conditions de cultures stables des souches cultivées en mode continu dans des PBR *air-lift* (1L). La composition biochimique constante permet d'évaluer précisément les fragilités cellulaires des souches, et aussi de comparer les résultats à ceux du pré-criblage en «PBR-EOSS».

Les fragilités cellulaires pour les deux conditions de culture sont présentées dans la Figure III-11. Ces fragilités cellulaires s'expriment par le pourcentage de destruction cellulaire déterminé après le passage des cultures dans le broyeur cellulaire à haute pression (1750 bar) comme indiqué dans le paragraphe II.7 du chapitre II.

Les résultats présentés dans la Figure III-11 montrent que les différentes souches étudiées ont des fragilités cellulaires différentes. De plus, une variation suite au changement des conditions de culture est observée, mais pas pour toutes les souches. Ainsi, chez *Nannochloropsis gaditana* 527 et *Scenedesmus obliquus* 393, la fragilité cellulaire diminue en carence azotée. Tandis que pour *Nannochloropsis salina* CCMP537 et

Parachlorella kessleri UTEX2229, la fragilité cellulaire est peu affectée par la carence brusque en azote appliquée à leur culture.

On peut remarquer qu'à part pour la souche *Scenedesmus obliquus* UTEX393, les fragilités cellulaires des souches cultivées en conditions de croissance normales, sont très proches de celles estimées lors du pré-criblage (Figure III-4). Ces résultats permettent de confirmer la fragilité cellulaire trouvée précédemment. Les souches qui ont montré les fragilités cellulaires les plus importantes sont ainsi *Parachlorella kessleri* UTEX2229 (96 % (+N) et 98% (-N)) et *Nannochloropsis gaditana* 527 (57 % (+N) et (-N)).

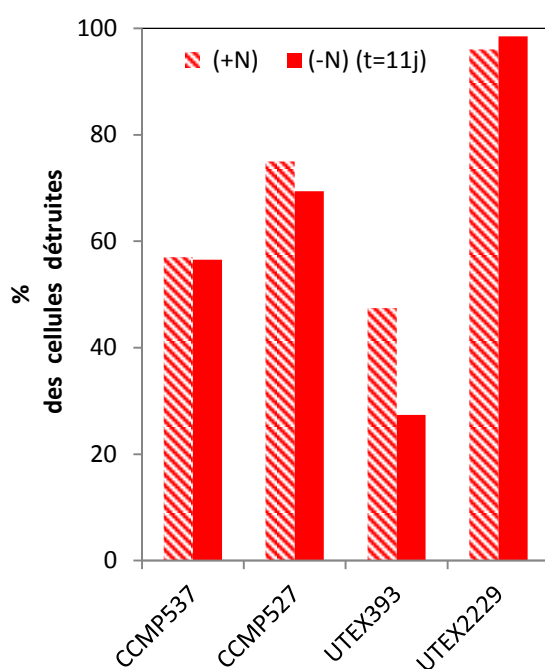


Figure III-11 Caractérisation de la fragilité cellulaire des souches productrices de TAG cultivées dans des PBR air-lift (1L) sous des conditions de croissance normales (+N) et défavorables (-N)

2.6- Sélection finale de la souche la plus intéressante

Les résultats de cette partie de caractérisation approfondie dans les PBR air-lift (1L) ont mené à conclure qu'à partir des 4 souches sélectionnées lors de pré-criblage en PBR «EOSS», deux ont montré un potentiel plus marqué en vue d'une production de biodiesel. Ainsi, la meilleure souche marine identifiée dans ce travail est *Nannochloropsis gaditana* CCMP527. Cette souche présente un fort potentiel à accumuler les TAG (jusqu'à 56 % de

son poids sec), une productivité intéressante en TAG avec un profil proche de la cible voulue ($S_{TAG_{max}} = 2.4 \cdot 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$), et une fragilité cellulaire importante dans les conditions qui induisent l'accumulation des TAG (57%). La meilleure souche d'eau douce identifiée ici est la souche *Parachlorella kessleri* UTEX2229. Cette souche a montré une capacité moyenne à accumuler des TAG (jusqu'à 40.8 % de leur poids sec), mais une forte capacité à maintenir une croissance dans des conditions de culture en carence azotée, ce qui s'est traduit au final par une productivité intéressante en huiles appropriés ($S_{TAG_{max}} = 2.7 \cdot 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$). Enfin, la fragilité cellulaire est très intéressante dans les conditions qui induisent l'accumulation des TAG (-N), avec une destruction observée importante (98%).

Si on compare ces deux souches, la souche qui présente le plus grand intérêt, est la souche *Parachlorella kessleri* UTEX2229. Par rapport à *Nannochloropsis gaditana* CCMP527, *P. kessleri* UTEX2229 atteint plus rapidement sa productivité maximale en TAG. De plus, sa fragilité cellulaire est plus importante (98% Vs 57%), ce qui pourrait être décisif dans la mise en place du procédé global de production de biodiesel.

Au final, parmi les 15 souches intéressantes criblées dans cette étude, la meilleure

Souche	S_x ($\text{g.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$) (+N)	Contenu maximal en TAG (% MS)	$S_{TAG_{max}}$ ($\text{g.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$)	Fragilité cellulaire à 1500 bars (+N) (% destruction)	Fragilité cellulaire à 1500 bars (-N) (% destruction)
CCMP537	9.51	59x	1.4	57	56.53
CCMP527	11.58	56	2.3	75	69.4
UTEX2229	10.92	41	2.7	96	98.47
CCMP393	18.81	32	1.1	47.43	27.4

Tableau III-6 Bilan final de criblage approfondi (les deux souches retenues sont marquées en rouge)

souche s'avère être la souche d'eau douce *Parachlorella kessleri* UTEX2229.

3 Conclusion générale

De grandes différences ont été observées lors du crible de souches, sur l'ensemble des critères utilisés. Cela concerne leur croissance en culture, le métabolisme lipidique (réponse aux conditions spécifiques de carence brusque en azote) et la fragilité cellulaire. Cela illustre parfaitement la difficulté à trouver la souche idéale, surtout lorsque l'application envisagée est exigeante comme le cas du biodiesel. Cet écart observé entre les

souches au regard de chaque critère de criblage, renforce l'idée qu'il est quasi impossible de choisir une souche idéale en se basant sur des données de la littérature scientifique obtenues dans des conditions diverses (comme le montre le Tableau III-7), et confirme par conséquent le besoin d'une méthodologie de criblage robuste comme cela a été développé dans ce travail, qui prend en considération des critères allant de la production des quantités importantes de biomasse riche en TAG appropriés, jusqu'à l'étape de leur récupération pour les convertir en biocarburant de bonne qualité.

Les résultats obtenus lors de l'étape de pré-criblage ont ainsi montré que les bancs de criblage PBR «EOSS» développés dans cette étude, permettent de caractériser rapidement les souches issues des collections et des genres différents de microalgues. Ainsi, des informations préliminaires liées à leur comportement, leur croissance et leur métabolisme lipidique ont été obtenues. De plus, ils se sont révélés utiles pour mener une comparaison pertinente des diverses souches, en considérant également l'importance d'adapter les souches issues de différentes collections à une production dans des conditions spécifiques de culture en PBR. L'étape de criblage approfondi dans les PBR air-lift (1L) a permis de valider les conclusions obtenues lors du pré-criblage. Cela a permis également de caractériser de façon plus approfondie les souches. Les deux parties de la procédure de criblage mise en place dans cette étude, apparaissaient donc comme complémentaires. En garantissant une culture en parallèle de 6 souches dans des conditions de culture identiques, le PBR «EOSS» permet de sélectionner rapidement un ensemble des souches prometteuses, alors que le volume relativement important (1L) des PBR air-lift, permet d'assurer un échantillonnage plus poussé et de caractériser en détails les souches d'intérêt en vue d'un choix final.

En comparaison avec d'autres approches de criblage rapportées dans la littérature, la procédure développée dans cette étude a permis d'identifier des souches ayant des capacités plus intéressantes à accumuler les lipides et les TAG (Tableau III-7). Ainsi, d'autres souches que *Nannochloropsis oculata* Alphabiotek qui était la souche référence du laboratoire GEPEA (programme Shamash) ont été identifiées comme plus prometteuses pour la production de biodiesel. À titre d'exemple, la souche *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 et *Nannochloropsis salina* CCMP537 ont montré des améliorations respectives de 30% et 37% en terme d'accumulation de TAG par rapport à *N. oculata* Alphabiotek. De plus, ces deux souches marines de *Nannochloropsis* ont accumulé plus de lipides et de TAG que celles identifiées dans les travaux de Rodolfi *et al.*, (2009), Griffiths *et al.*, (2012), Simionato *et al.*, (2013) et Boussiba *et al.*, (1987) (Tableau III-7). En ce qui concerne les souches d'eau douce étudiées ici, la capacité d'accumulation de lipides et de TAG observée pour la souche *Scenedesmus obliquus* UTEX393 examinée dans cette étude est proche de celle trouvée dans les travaux de Breuer *et al.*, (2013) dans des conditions de carence azotée. La souche *P. kessleri* UTEX2229 a cependant présenté une capacité plus importante

à accumuler les lipides et les TAG que d'autres souches appartenant à la même espèce et testées dans des études précédentes (Přibyl *et al.*, 2012).

Au final, à partir de 15 souches criblées via cette procédure, le meilleur candidat identifié dans ce travail pour une production compétitive de biodiesel à l'échelle industrielle est *Parachlorella kessleri* UTEX2229. L'optimisation de sa croissance et de sa production des lipides (TAG) sera étudiée en détails dans le chapitre suivant (chapitre IV). De plus, sa capacité à produire les TAG en conditions réelles de production (cycles jours/nuits) sera examinée dans le dernier chapitre de ce présent travail (chapitre V).

Souche cultivée	Culture	Lipides totaux (% MS)	TAG (% MS)	Productivité en lipides (mg.L ⁻¹ .j ⁻¹)	Productivité en TAG (mg.L ⁻¹ .j ⁻¹)	Références
<i>S. obliquus</i> UTEX393	PBR air-lift (1L) (batch) (-N) pH=8, T=25°C, $q_0=250\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	38.5	32	38	36	Présente étude
<i>P.kessleri</i> UTEX2229	PBR air-lift (1L) (batch) (-N) pH=8, T=25°C, $q_0=250\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	65	46	115	91	Présente étude
<i>N. gaditana</i> CCMP527	PBR air-lift (1L) (batch) (-N) pH=8, T=25°C, $q_0=250\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	58	56	80	76	Présente étude
<i>N. salina</i> CCMP537	PBR air-lift (1L) (batch) (-N) pH=8, T=25°C, $q_0=250\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	63	59	49	47	Présente étude
<i>Scenedesmus obliquus</i> CNW-N	Cuve en verre (1L) (batch) (-N)(5j) pH=6.2, T=28°C, $q_0=140\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ 2.5% CO ₂	22.4		140.4		(Ho <i>et al.</i> , 2012)
<i>Scenedesmus obliquus</i> UTEX 393	PBR air-lift plat (V=380 ml) (batch) (-N) pH=7, T=27.5°C, $q_0=500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	30-45	30-40			(Breuer <i>et al.</i> , 2013)
<i>Scenedesmus obliquus</i> UTEX 393	Erlenmeyers (250ml) (batch) T=25°C, $q_0=40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ Cycles jours/nuits (16:8h)				322	(Breuer <i>et al.</i> , 2012)
<i>N.gaditana</i> CCAP 849/5	Erlenmeyers (batch)(-N) T=23°C, $q_0=100\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$		38			(Simionato <i>et al.</i> , 2013)
<i>N.salina</i> (GSBSTICHO)	Tubes en verre (500 ml) (-N) pH=7, T=28°C, $q_0=175\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	25				(Boussiba <i>et al.</i> , 1987)
<i>N. occulata</i> Alphabiotech	PBR air-lift (1L)(batch) (-N) pH=8, T=25°C, $q_0=250\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	50	43			(Van Vooren <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. kessleri</i> CCALA 255	Tubes (50ml) (batch) (-N) pH=8, T=28°C, $q_0=500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	51				(Přibyl <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. kessleri</i> CCALA 251	Tubes (50ml)(batch) (-N) pH=8, T=28°C, $q_0=500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	50.8				(Přibyl <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. kessleri</i> CCALA 253	Tubes (50ml) (batch) (-N) pH=8, T=28°C $q_0=500\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	40.76				(Přibyl <i>et al.</i> , 2012)
<i>Chlorella sp.</i> F&M-M48	Glass bubbled tubes (0.6L)(batch)(-N) pH=7.5-8.1, T=25°C, $q_0=200\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	30		120		(Rodolfi <i>et al.</i> , 2009)
<i>Scenedesmus sp.</i> DM	Glass bubbled tubes (0.6L)(batch)(-N) pH=7.5-8.1, T=25°C, $q_0=200\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	20		108		(Rodolfi <i>et al.</i> , 2009)
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M33	Glass bubbled tubes (0.6L)(batch)(-N) pH=7.5-8.1, T=25°C, $q_0=200\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	38		288		(Rodolfi <i>et al.</i> , 2009)
<i>Nannochloropsis sp.</i> F&M-M24	Glass bubbled tubes (0.6L)(batch)(-N) pH=7.5-8.1, T=25°C, $q_0=200\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	60		360		(Rodolfi <i>et al.</i> , 2009)
<i>Nannochloropsis sp.</i> (university of Hawaii) culture collection	PBR air-lift (3.2L) Limitation en azote Batch (14 jours)	35			63	(Griffiths <i>et al.</i> , 2012)
<i>Scenedesmus Sp</i> (olate, Uppington, South Africa)	PBR air-lift (3.2L) Limitation en azote Batch (14 jours)	43				(Griffiths <i>et al.</i> , 2012)

<i>Nannochloropsis</i> sp.	poly-ethylene bags with bubbling air $q_0=150\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	28.7	25.83	(Gouveia and Oliveira, 2009)
<i>Neochloris</i> <i>oleabundans</i> UTEX1185	poly-ethylene bags with bubbling air $q_0=200\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	29	26.1	(Gouveia and Oliveira, 2009)

Tableau III-7 Bilan de comparaison des performances de souches identifiées dans cette étude comme étant prometteuses pour la production de biodiesel avec celles reportées dans la littérature

Chapitre IV : Optimisation de la croissance et de la production de TAG par *Parachlorella kessleri* UTEX2229 en PBR sous lumière continue

Résumé:

Ce chapitre vise à déterminer la productivité en biomasse maximale et à optimiser la production en TAG pour la souche d'intérêt *P. kessleri* UTEX2229. Il traite les effets des différents modes de culture et des diverses techniques de limitation en azote sur la croissance ainsi que la composition biochimique de la culture. La productivité des TAG a ainsi été mesurée pour des cultures batch et continues sous différentes stratégies de carence en azote. En outre, la forte dépendance de la croissance ainsi que du mécanisme d'accumulation des TAG à la lumière reçue par la cellule a été mise en évidence. Une productivité volumique maximale de biomasse sèche de $0.9 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ équivalente à une productivité surfacique de $27 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ (environ $100 \text{ t.ha}^{-1}.\text{a}^{-1}$) a été obtenue pour un temps de résidence $\tau=33 \text{ h}$ et un flux incident de $q_0 = 430 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. En ce qui concerne la productivité en TAG, des rendements élevés de $2.5 \text{ à } 4.4 \times 10^{-3} \text{ kg}_{\text{TAG}}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ équivalents à des productivités surfaciques de $9 \text{ à } 16 \text{ t}_{\text{TAG}}.\text{ha}^{-1}.\text{a}^{-1}$ ont été atteints pour des cultures batch carencées en azote, avec une teneur massique de 40-48% en TAG.

1 Introduction

Comme déjà discuté dans le premier chapitre de ce mémoire de thèse, l'étape de production des huiles microalgales est essentielle. Cela inclut la sélection d'une souche idéale, mais également l'optimisation des conditions de culture afin d'optimiser son rendement de production. Dans le chapitre précédent, la procédure de criblage a permis de sélectionner *Parachlorella kessleri* UTEX2229 comme étant un candidat d'intérêt pour une production de biodiesel à grande échelle. Ce chapitre visera à optimiser la production de cette souche que ce soit en biomasse ou vis à vis des TAG.

Ce chapitre est divisé en deux grandes parties. La première traite de l'optimisation de la croissance de *P. kessleri* UTEX229 dans des conditions normales de croissance, et sous des conditions d'éclairement proches de celles rencontrées à Nantes (France), dans le but de déterminer la productivité optimale de cette souche dans de telles conditions. La deuxième partie est consacrée à l'optimisation de la production des lipides, et en particulier des TAG. Il faut noter que dans les deux parties, toutes les expérimentations ont été effectuées dans des PBR de type *air-lift* (1L) décrits précédemment dans la partie (II.4.3-B) du chapitre II.

2 Détermination des performances maximales en biomasse de *Parachlorella kesslerii* UTEX2229 cultivée en PBR sous lumière continue

2.1- Introduction

L'objectif de cette partie est d'optimiser la croissance en PBR et sous une illumination continue de *P. kessleri* afin de découvrir les performances maximales en biomasse de cette souche. Pour cette partie, les expérimentations ont été réalisées sur des cultures continues et sous des conditions normales de croissance (absence de toute limitation minérale). La souche a été cultivée dans des PBR de type *air-lift* (1L) décrits précédemment dans la partie (II.4.3-B) du chapitre II. Les productivités volumiques et surfaciques en biomasse sèche ont été déterminées dans des conditions opératoires différentes de densité de flux lumineux incident (PFD) et de temps de résidence τ_p (différents taux de dilution D), et cela dans le but de chercher la productivité maximale dans de telles conditions. La croissance de la souche a ainsi été évaluée pour trois intensités lumineuses différentes ($q_0=150$, 430 et 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les deux premières intensités ($q_0 = 150$ et $q_0 = 430 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) correspondent respectivement aux valeurs moyennes de flux solaire reçu pendant l'hiver et

l'été à Nantes (France), comme mentionné dans les travaux de Pruvost *et al.*, (2012). Un flux intermédiaire ($q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) correspondant approximativement à la valeur moyenne d'irradiation solaire annuelle a également été étudié (valeurs calculées sur le PAR).

2.2- Étude de la croissance photo-limitée de *P. kessleri* UTEX2229 sous différents flux incidents

Dans un premier temps, la croissance de *P. kessleri* UTEX2229 a été examinée pour trois flux incidents différents ($q_0=150, 430$ et $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) afin de mettre en évidence l'influence de la lumière sur l'évolution de la croissance photosynthétique de la souche. Comme déjà traité en détails dans la partie I.7.1-B du chapitre I, dans un système de culture des microalgues comme le PBR, en ajustant tous les paramètres de culture et en dehors de toute limitation minérale, la lumière reste le facteur limitant du procédé. Cependant, même pour un flux incident donné, les conditions d'atténuation de la lumière jouent un rôle crucial (voir le chapitre I et en particulier la Figure I-12). La distribution de la lumière au sein de la culture n'est jamais homogène à cause de l'atténuation de la lumière absorbée et diffusée par les cellules. Par conséquent, l'irradiance disponible pour la culture dans le procédé varie avec la profondeur de culture, et dépend de plusieurs facteurs (à savoir la géométrie du procédé, la densité du flux lumineux incident PFD, le transfert radiatif au sein de la culture, les propriétés optiques de la souche cultivée, etc.). Ainsi, dans le domaine de culture des microalgues en PBR, et selon la valeur de la fraction volumique éclairée γ qui dépend de la concentration en biomasse et donc du taux de dilution appliqué dans le cas d'une culture continue, trois régimes de fonctionnement du photobioréacteur peuvent être rencontrés (Figure I-12).

Pour les trois flux incidents testés, il a été choisi de cultiver *P. kessleri* UTEX2229 en photolimitation ($\gamma < 1$). Cela a été obtenu en appliquant un temps de séjour long ($\tau_p = 100$ h), ou autrement dit un taux de dilution faible ($D=0.01 \text{ h}^{-1}$) pour assurer aux microalgues le temps nécessaire pour achever leur division cellulaire et se multiplier. Il en résulte des densités cellulaires élevées menant à l'apparition d'une zone sombre dans le système. Cela permet de caractériser la croissance de la souche dans des conditions d'absorption totale de l'énergie lumineuse reçue à la surface du PBR. D'un point de vue fonctionnement, un PBR dans un tel régime se révèle également plus stable, le temps de séjour dans le réacteur était éloigné de celui menant au lessivage.

Pour chaque condition, la concentration en biomasse sèche et la teneur en pigments ont été mesurées. La productivité volumique et surfacique en biomasse sèche a ainsi été déterminée. La composition biochimique en régime stationnaire a aussi été déterminée sous chacune des conditions lumineuses appliquées. Les résultats sont présentés dans la Figure IV-1 et les Tableau IV-1 et Tableau IV-2.

Les résultats présentés dans la Figure IV-1 montrent qu'un état d'équilibre est obtenu pour chaque condition d'illumination avec une concentration constante en biomasse sèche et par conséquent des conditions d'atténuation de lumière constantes. De plus, la Figure IV-1 et le Tableau IV-1 montrent que pour un taux de dilution fixé (ici $D=0.01 \text{ h}^{-1}$), la concentration ainsi que les productivités volumiques et surfaciques en biomasse sèche qui sont liées augmentent avec l'augmentation de la densité du flux lumineux incident reçue à la surface du PBR. En effet, pour une illumination de $q_0 = 430 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, la productivité surfacique en matière sèche des cultures stables ($S_X = 20 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$) de *P. kessleri* UTEX2229 est deux fois plus élevée que dans le cas où la souche a été exposée à un flux lumineux de $q_0 = 150 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($S_X = 10 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$). Une productivité intermédiaire ($S_X = 15 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$) est obtenue pour le flux de $q_0 = 250 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ces résultats confirment qu'augmenter le flux incident augmente la productivité de la culture, mais d'une façon non linéaire. Ceci est expliqué ici par la saturation progressive de la photosynthèse avec le flux lumineux. L'augmentation du flux lumineux augmente la productivité en biomasse, mais avec une efficacité diminuant avec le flux capté.

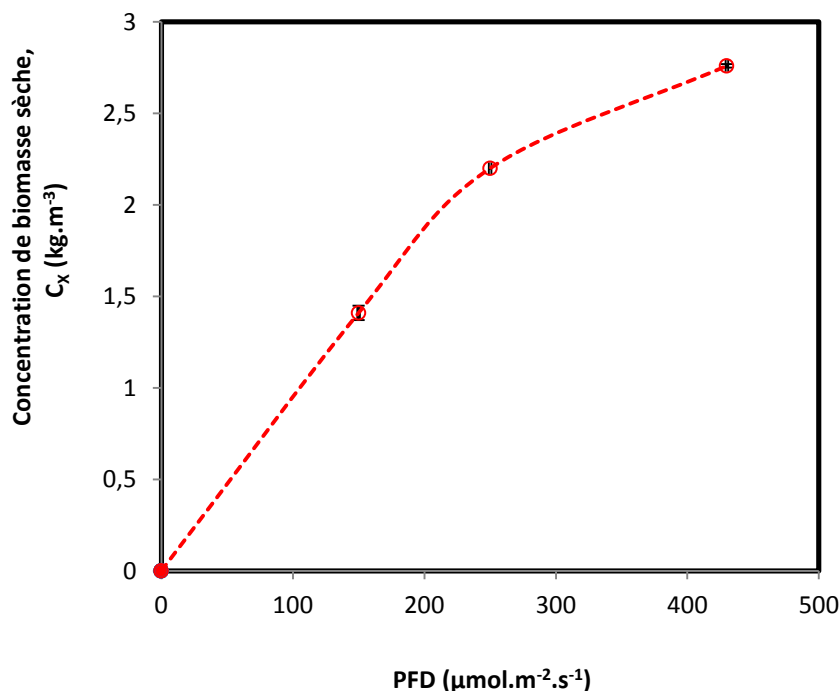


Figure IV-1 Influence de l'intensité lumineuse sur la concentration de biomasse sèche obtenue à l'état stationnaire de *P. kessleri* UTEX2229 cultivée en mode continu ($\tau_p = 100$ h; $D = 0.01$ h⁻¹)

PFD ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	150	250	430
C_X moyenne (kg.m^{-3})	1,41	2,12	2,76
P_X ($\text{kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$)	0,3384	0,5088	0,6624
S_X ($.10^{-3}$ $\text{kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$)	10,152	15,264	19,872
Intervalle de confiance (%)	2,84	1,89	0,36

Tableau IV-1 Productivités volumiques et surfaciques en biomasse sèche déterminées à l'état stationnaire de *P. kessleri* UTEX2229 cultivée en mode continu ($\tau_p = 100$ h; $D = 0.01$ h⁻¹) sous différentes intensités lumineuses

Concernant la pigmentation, les résultats présentés dans le Tableau IV-2 montrent que la teneur en pigments totaux diminue avec l'augmentation des intensités lumineuses. Ce phénomène de photoadaptation a déjà été observé par Takache *et al.*, (2010). Cela s'explique par le fait qu'en présence d'une intensité lumineuse plus élevée, la cellule reçoit plus de lumière, menant à une diminution du contenu pigmentaire. Ces observations s'accordent également avec ce qui est rapporté dans la littérature (Falkowski and LaRoche, 1991; Hu *et al.*, 2008 ; et Finazzi *et al.*, 2010). Dans leur études, Finazzi *et al.*, (2010) ont

rapporté qu'en faible éclairage, les microalgues augmentent le taux de chlorophylles dans leurs chloroplastes.

En ce qui concerne la composition biochimique de la souche en d'autres composés tels que les sucres totaux, les protéines et les lipides totaux, les résultats du Tableau IV-2 montrent que, quelle que soit l'intensité lumineuse reçue à la surface du PBR, la souche a conservé une composition biochimique quasi-constante. Ainsi, sous des conditions normales de croissance, et lorsque la culture atteint son régime stable, les sucres totaux constituent 23 à 25 % de la biomasse sèche, alors que les protéines et les lipides totaux constituent respectivement 55 à 60% et 8.5 à 11.2 %. Au final, ces résultats montrent le rôle adaptatif majeur des pigments, avec une composition biochimique hors pigments peu affectée.

PFD ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	150	250	430
Pigments totaux (%)	8,9	8,6	8
<i>Chl a</i> (%)	6	5,7	5,3
<i>Chl b</i> (%)	1,4	1,4	1,3
<i>PPC</i> (%)	1,5	1,4	1,4
Sucres totaux	23	25	24
Protéines	60	55,2	58
Lipides totaux	8,5	11,2	11

Tableau IV-2 Détermination de la composition biochimique de *P. kessleri* UTEX2229 cultivée en mode continu ($\tau_P = 100$ h; $D = 0.01 \text{ h}^{-1}$) sous différents flux lumineux incidents. (Note: la teneur des différents composés est exprimée en pourcentage par rapport à la biomasse sèche obtenue en régime stationnaire)

2.3- Optimisation de la productivité volumique en biomasse sèche pour un flux incident donné

Dans le paragraphe précédent, la souche *P. kessleri* UTEX2229 a montré une productivité en biomasse sèche la plus élevée pour une intensité lumineuse de $430 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Tableau IV-1). Toutefois, cette productivité ne présente pas la valeur maximale dans ces conditions d'éclairage. L'application d'un taux de dilution faible aux cultures de *P. kessleri* UTEX2229 ($D = 0.01 \text{ h}^{-1}$) conduit à l'obtention de densités cellulaires élevées responsables de l'apparition des zones sombres dans la culture. L'apparition de ces dernières résulte en des productivités inférieures à la productivité maximale obtenue pour

$\gamma = 1$, la condition idéale d'atténuation de lumière, où tous les photons sont absorbés sans l'apparition d'une zone sombre dans le réacteur.

En vue de chercher les conditions optimales d'absorption lumineuse et par conséquent la productivité volumique maximale en biomasse sèche de *P. kessleri* UTEX2229 sous des conditions d'illumination représentatives de celles reçues en moyenne pendant l'été à Nantes (France) ($q_0 = 430 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), les expérimentations ont été effectuées en mode continu dans un PBR (1L) *air-lift* plat pour quatre temps de résidence différents ($\tau = 25; 33.3; 50$ et 100 h). Pour chaque valeur appliquée, la croissance a été suivie en mesurant la concentration des pigments et en biomasse sèche. La productivité volumique en biomasse sèche en régime stationnaire a été obtenue à partir de la moyenne des 3 concentrations en biomasse sèche mesurées à l'équilibre. Les résultats sont illustrés dans la Figure IV-2. On observe que la concentration en biomasse sèche obtenue à l'équilibre augmente linéairement et progressivement avec le temps de résidence τ dans le PBR. Cette évolution est logique puisqu'en augmentant le temps de résidence de la culture dans le PBR, les cellules ont plus de temps pour se diviser. Cependant, la productivité volumique en biomasse sèche n'évolue pas de la même manière, cette valeur étant le résultat du temps de séjour et de la concentration de biomasse sèche obtenue ($P_X = \frac{C_X}{\tau_p}$). Les résultats présentés dans la Figure IV-2 montrent ainsi que pour un flux lumineux incident de densité ($q_0 = 430 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), une productivité volumique maximale ($\langle P_X \rangle_{\max} = 0.9 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$) a été atteinte pour une concentration de biomasse sèche de $C_X = 1.25 \text{ kg.m}^{-3}$, et un temps de résidence de 33 heures ($D = 0.03 \text{ h}^{-1}$). Il faut noter que pour ce taux de dilution dit optimal, la productivité de la souche est maximale avec donc une absorption totale de l'énergie lumineuse reçue et l'absence de zone sombre ($\gamma = 1$).

Pour les concentrations de biomasse sèche plus faibles ($C_X < (C_X)_{\text{opt}}$), la perte de la productivité s'explique par la transmission d'une partie des photons en arrière du PBR ($\gamma > 1$). Dans ces conditions, le PBR fonctionne en régime dit cinétique. À l'opposé, quand la concentration en biomasse est trop élevée ($C_X > (C_X)_{\text{opt}}$), la présence de zone sombre ($\gamma < 1$) amène également à une perte de productivité. Ces résultats sont tout à fait uniformes à ceux observés sur d'autres microalgues comme *Chlamydomonas reinhardtii* (Takache *et al.*, 2010).

L'utilisation de PBR plan permet de déduire aisément la productivité surfacique ($S_X = P_X \times e$). Or, comme montré par Pruvost et Cornet, (2012), cette productivité en surface est indépendante du PBR utilisé. Cela permet de déterminer les performances en biomasse intrinsèques de la souche pour un flux incident donné. En effet, dans la mesure où des conditions de photolimitation sont appliquées, la productivité surfacique maximale obtenue correspond à la valeur maximale permise par la souche sous cette condition

d'éclairement. Dans le cas présent, une productivité maximale de $27 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ a été obtenue à un flux lumineux incident de ($q_0 = 430 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), ce qui correspond à une valeur similaire aux souches connues pour avoir des performances en biomasse importantes. À titre d'exemple, la comparaison de la productivité surfacique maximale de *P. kessleri* obtenue dans cette étude à celle des souches bien connues pour leur croissance rapide et par conséquent leur production importante en biomasse, comme *Chlamydomonas reinhardtii* et *Neochloris oleobundans*, confirment les performances importantes de cette souche pour la production de biomasse. En effet, une productivité surfacique maximale proche ($S_X = 28.8 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$) a été trouvée pour *Chlamydomonas reinhardtii* dans les travaux de Takache *et al.*, (2010), mais pour un flux lumineux incident plus élevé ($q_0 = 500 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). De même, *P. kessleri* a montré une productivité surfacique maximale plus importante que celles trouvées pour *Neochloris oleobundans* dans les travaux de Pruvost *et al.*, (2011)., même sous des conditions d'éclairement plus élevées ($S_X = 23 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ pour $q_0 = 590 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), soit une amélioration de 26% pour *P. kessleri*.

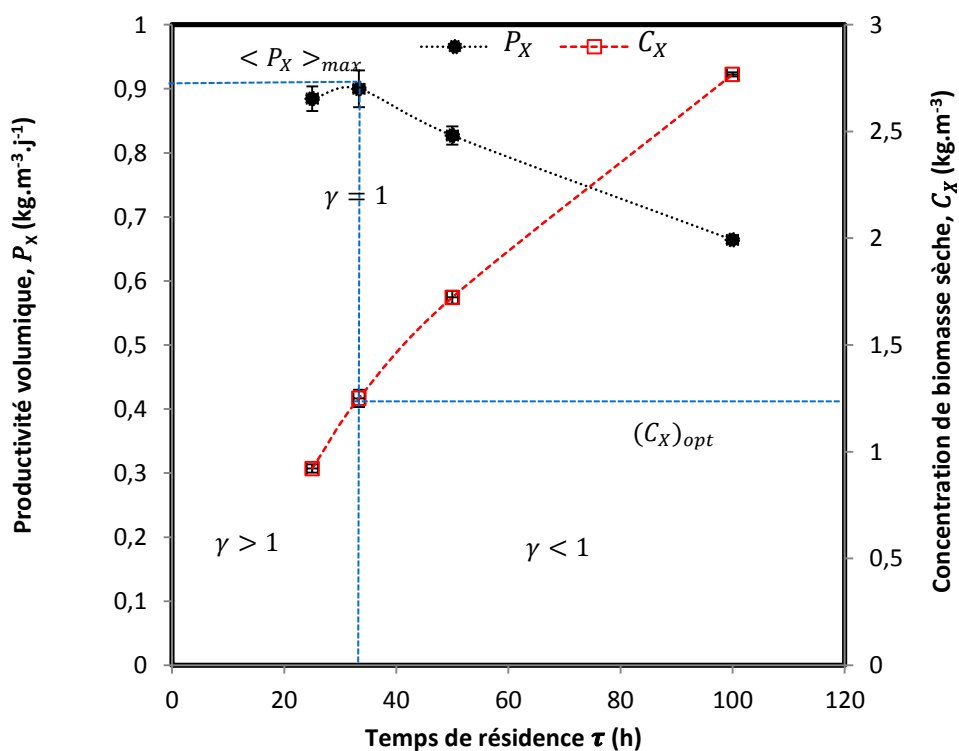


Figure IV-2 Evolution expérimentale de la concentration et de la productivité de biomasse sèche avec le temps de résidence τ (h) sous une densité de flux lumineux incident $q_0 = 430 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Note: chaque valeur de concentration ainsi que de productivité volumique rapportée dans ce graphe représente la moyenne de 3 mesures obtenues à l'état stationnaire, atteint ici pour chaque temps de résidence τ appliqué

Le contenu pigmentaire a été déterminé en régime stationnaire pour chaque temps de résidence(τ) testé ici. Les résultats sont présentés dans la Figure IV-3 et le Tableau IV-3. Comme le montre la Figure IV-3, en augmentant le temps de résidence (τ) de la culture dans le PBR, la concentration des pigments obtenues à l'équilibre augmente progressivement. Cette évolution est en corrélation avec celle de la densité de matière sèche. L'augmentation de la concentration des pigments totaux s'explique donc par l'augmentation de la densité cellulaire dans la culture. Les cellules adaptent leur contenu pigmentaire en réponse à la disponibilité de la lumière dans la culture. Ainsi, dans le cas où le temps de résidence est élevé, la densité cellulaire ainsi provoquée est à l'origine de la création de zone sombre où les cellules reçoivent une intensité lumineuse faible pour effectuer la photosynthèse ($\gamma < 1$). Dans ce cas, les cellules activent la synthèse de pigments afin d'augmenter leur taux d'absorption de l'énergie lumineuse. À titre d'exemple, pour le temps de résidence le plus élevé ($\tau = 100$ h), le PBR fonctionne en régime de photolimitation ($\gamma < 1$) et les pigments totaux constituent 8 % de la biomasse sèche. Cependant, au fur et à mesure de la diminution du temps de résidence de la culture dans le PBR, la teneur de la biomasse en pigments diminue progressivement pour atteindre 5.5 % pour le temps de résidence le plus faible testé ici ($\tau = 25$ h).

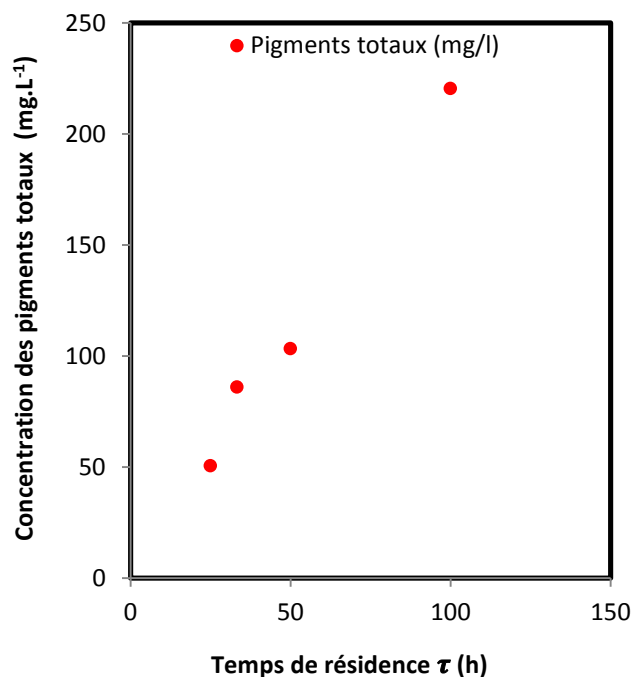


Figure IV-3 Evolution de la concentration des pigments totaux avec le temps de résidence τ (h) sous une densité de flux incident $q_0 = 430 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Note: chaque valeur de la concentration rapportée dans ce graphe représente la moyenne de 3 mesures obtenues à l'état stationnaire, atteint ici pour chaque temps de résidence τ appliqué.

Temps de résidence τ (h)	25	33,3	50	100
Pigments totaux (% MS)	5,5	6,9	6	8
Chl a (% MS)	3,7	4,6	4	5,3
Chl b (% MS)	0,8	1,1	1	1,3
PPC (% MS)	1	1,2	1,1	1,4

Tableau IV-3 Détermination de la teneur en pigments des cultures stables de *P. kessleri* UTEX2229 cultivée en mode continu sous une intensité lumineuse $q_0 = 430 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et sous différents temps de résidence τ (h) (Note: la teneur est exprimée en pourcentage par rapport à la biomasse sèche obtenue à l'état stationnaire).

2.4- Conclusion

Une relation étroite entre la croissance de la souche et la quantité des photons reçue par la culture a été mise en évidence dans cette partie. De façon logique, la productivité la plus élevée de biomasse sèche correspond à l'intensité lumineuse la plus élevée ($q_0 = 430 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Sous ces conditions d'éclairage, une productivité volumique maximale de $0.9 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ a été obtenue. Cela a permis d'en déduire les performances en surface maximale de cette souche, à savoir $27 \text{ g.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$, soit une productivité similaire aux souches connues pour leur productivité élevée en biomasse. Cette valeur a été obtenue pour des conditions optimales d'atténuation lumineuse, pour une concentration optimale $C_{X_{opt}} = 1.25 \text{ kg.m}^{-3}$ de biomasse sèche et un temps de résidence de 33 heures ($D = 0.03 \text{ h}^{-1}$).

3 Optimisation de la production de lipides (TAG)

3.1- Introduction

La première partie de ce chapitre s'est focalisée sur l'optimisation de la croissance de *Parachlorella kessleri* UTEX2229 en conditions normales de culture. Cette partie sera consacrée à l'optimisation de la production des lipides totaux et en particulier des TAG dans des conditions de stress nutritif (carence en azote). À cet effet, la souche a été cultivée dans diverses modes de culture (batch et continu) et sous des conditions opératoires différentes afin d'évaluer sa productivité et déterminer les conditions de culture optimales qui conduisent à une production maximale de TAG. Pour les expérimentations en mode batch, deux types de carence en azote ont été imposés aux cultures: carence soudaine (brusque) et carence progressive. Le premier protocole de mise en carence est obtenu par suspension des cellules préalablement cultivées dans un milieu de culture riche en azote dans un milieu exempt de ce macronutriment. Pour le second protocole, la limitation se fait progressivement et naturellement par le biais de la consommation d'azote simultanée à la croissance. Cette dernière technique amène à une réponse complexe car l'augmentation progressive de la concentration en biomasse modifie les conditions de transfert de lumière et par conséquent la réponse photosynthétique, l'accumulation de lipides et la productivité en triglycérides (Pruvost *et al.*, 2009; Van Vooren *et al.*, 2012).

Pour les manipulations de carence soudaine en azote, deux expérimentations ont été réalisées sous le même flux incident ($q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et en modifiant la

concentration initiale en biomasse. Deux expérimentations de carence progressive ont été également effectuées. Dans ce cas, la concentration initiale d'azote est identique et deux flux incidents ont été testés. L'ensemble de ces expérimentations a permis d'étudier, en plus de la carence en azote, l'effet éventuel des conditions d'atténuation lumineuses.

Dans la mesure où la production en batch implique par principe un mode de production séquentiel, il a été également étudié la mise en production en mode continu sous limitation azotée. Ce mode de culture, non conventionnel, a fait l'objet d'une campagne expérimentale spécifique. La productivité en lipides a été examinée sous flux incident constant, pour différentes concentrations d'alimentation en azote afin de déterminer la valeur optimale qui correspond à la meilleure productivité en TAG.

3.2- Étude de la production de TAG sous carence soudaine en azote (mode *batch*)

L'effet de la carence soudaine en azote sur le métabolisme lipidique et la croissance de *P. kessleri* UTEX2229 a été étudié en détail. Cela concerne la production en lipides totaux et en TAG. L'évolution du profil en acides gras en réponse aux changements des conditions de culture a également été examinée. La récolte d'une culture continue et stable en conditions normales de *P. kessleri* UTEX2229 a été utilisée pour inoculer deux PBR air-lift (1L) exposés à la même intensité lumineuse ($q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) avec deux concentrations initiales différentes de biomasse sèche ($C_{X_0} = 0.2$ et 0.76 kg.m^{-3}) selon le protocole suivi par Van Vooren *et al.*, (2012) et décrit précédemment dans le chapitre II (Figure II-2). Suivant la concentration initiale souhaitée de biomasse, un volume déterminé a été prélevé de la récolte du PBR fonctionnant en mode continu et conditions optimales de croissance. Ensuite, ce volume a été centrifugé pendant 5 minutes à 6000g afin d'éliminer le milieu et la quantité d'azote restante dans la récolte. Le culot ainsi obtenu a été lavé 3 fois avec un milieu de culture dépourvu d'azote (GVV-Neo) dont la composition est présentée dans le Tableau IV-4. Dans une dernière étape, le culot a été dilué dans un second PBR fonctionnant en batch et contenant le milieu dépourvu d'azote. Il faut noter que pour toutes ces expérimentations, le pH et la température ont été toujours maintenus à 8 et 25 °C respectivement.

3.2-A. Effets sur l'évolution de la croissance

La croissance de *P. kessleri* UTEX2229 en conditions de carence brusque en azote a été caractérisée en suivant l'évolution temporelle de la teneur des pigments et de biomasse sèche. Les résultats sont présentés dans les Figure IV-4, Figure IV-5 et Figure IV-6.

Pour les deux expériences de carence soudaine en azote effectuées ici ($C_{X_0} = 0.2$ et 0.76 kg.m^{-3}), les résultats illustrés dans la Figure IV-4 montrent clairement une diminution des concentrations des pigments totaux avec la mise en carence. Cette chute drastique a été observée immédiatement dès la suspension des cellules dans un milieu dépourvu d'azote. Il faut remarquer que dans les deux cas ($C_{X_0} = 0.2$ et 0.76 kg.m^{-3}), la diminution signalée au niveau de la concentration des pigments totaux était plus forte pendant les cinq premiers jours de la carence. Ensuite les pigments totaux continuent à diminuer mais à une vitesse plus faible. Cette chute est due en grande partie à la forte diminution de la concentration des chlorophylles a comme le montre la Figure IV-5. Ce résultat est souvent expliqué par le rôle de la chlorophylle a dans le stockage interne de l'azote. Les cellules dégradent leur chlorophylle pour soutenir la division cellulaire et par conséquent maintenir une croissance dans ces conditions spécifiques de culture (Van Vooren *et al.*, 2012; Kandilian *et al.*, 2014).

On note que la teneur des caroténoïdes diminue pendant les cinq premiers jours de la carence, mais légèrement, et reste à peu près constante pendant la durée restante de la culture (Figure IV-5). Ceci permet l'introduction d'un indicateur simple de la carence azotée sur les cellules, défini par le rapport de l'absorbance à 480 et à 665 nm, qui sont proportionnelles respectivement au contenu de la biomasse en caroténoïdes (Strickland and Parsons, 1968) et en chlorophylles (Ritchie, 2006). Ce rapport est nommé «indice de stress» (Heath *et al.*, 1990). Il s'agit également d'un indicateur de l'état nutritif de la cellule (rapport carbone/azote) comme cela est proposé par Heath *et al.*, (1990) et permet de suivre l'évolution de la culture au cours de la carence en azote, en étant lié à un effet direct d'une carence azotée, à savoir la modification des pigments.

La Figure IV-5 montre l'évolution temporelle de l'indice de stress pour les deux cultures batch carencées en azote décrites précédemment. Comme le montre les résultats, dans les conditions normales de croissance, une valeur d'environ 0.8 est observée pour *P. kessleri* UTEX2229. L'indice de stress s'accroît ensuite progressivement avec le temps de la culture pour les deux expérimentations réalisées, mais plus rapidement dans le cas d'une concentration initiale de $C_{X_0} = 0.2 \text{ kg.m}^{-3}$. En effet, dans ces conditions de concentration

initiale en biomasse sèche faible, l'indice de stress est approximativement 6 fois plus grand en fin de culture, en passant de 0.8 à 4.47. Dans le cas où la concentration initiale en biomasse est plus importante ($C_{x0} = 0.76 \text{ Kg.m}^{-3}$), l'indice de stress augmente de 0.8 à 1.5 en fin de culture.

Selon Heath *et al.*, (1990), l'indice de stress est inversement proportionnel au rapport C/N. Donc ces résultats suggèrent que dans les conditions d'une carence brusque en azote avec une concentration initiale plus faible ($C_{x0} = 0.2 \text{ Kg.m}^{-3}$), le rapport C/N diminue plus rapidement. Cela suggère que les cellules subissent plus de divisions cellulaires. Cette interprétation est appuyée par le fait que la teneur des cellules en chlorophylles à la fin de la période de la culture carencée avec la faible concentration initiale en biomasse ($C_{x0} = 0.2 \text{ Kg.m}^{-3}$) est à peu près 12 fois moins importante que dans le cas où la concentration initiale est plus grande ($C_{x0} = 0.76 \text{ Kg.m}^{-3}$). Cette teneur plus faible à la fin de la culture s'explique par une vitesse de reconsommation plus importante des chlorophylles a et de l'azote, et par conséquent une division cellulaire plus soutenue.

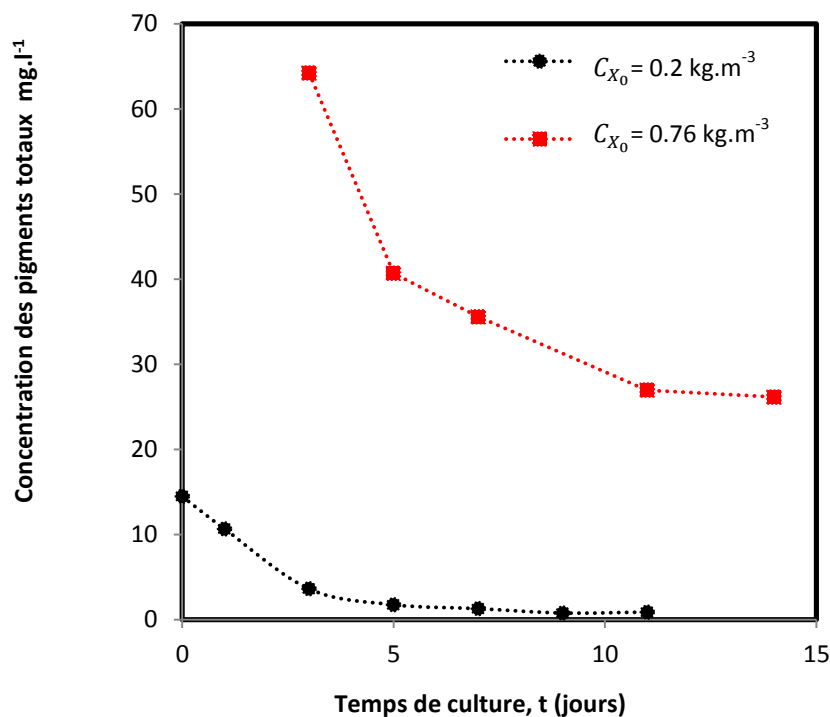


Figure IV-4 Évolution temporelle de la concentration des pigments totaux des cultures *batch* de *P.kessleri* UTEX2229 cultivée dans un PBR air-lift (1L) exposé à $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pendant deux semaines de carence brusque en azote pour deux différentes concentrations initiales de biomasse sèche ($C_{X_0} = 0.2$ et 0.76 kg.m^{-3})

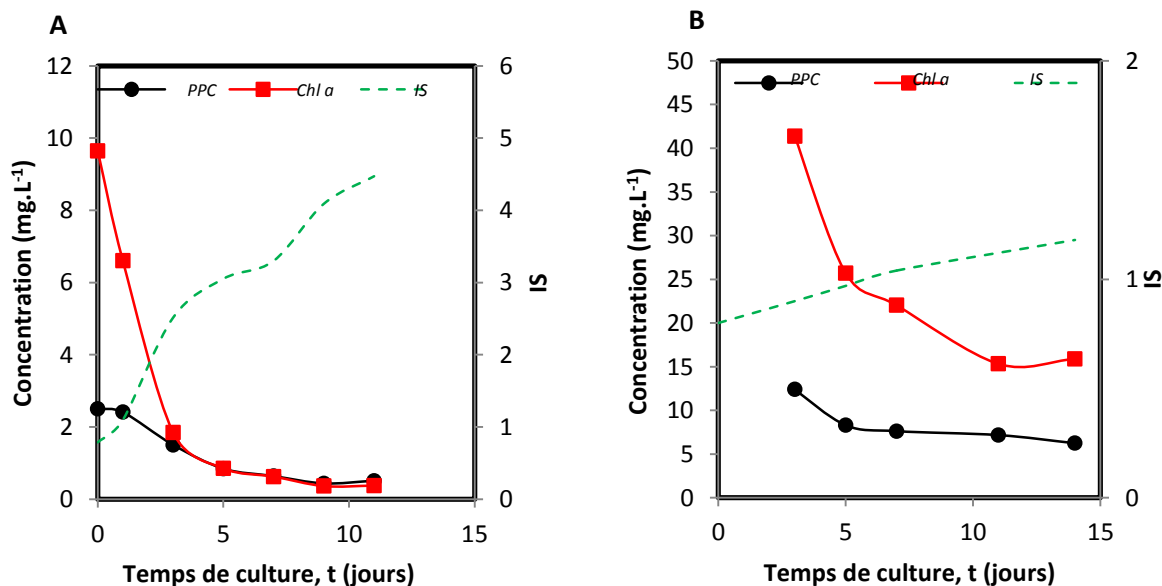


Figure IV-5 Évolution temporelle de la concentration de chlorophylle a ($Chl a$), de caroténoïdes (PPC) et de l'indice de stress (IS) des cultures *batch* de *P. kessleri* UTEX2229 cultivée dans un PBR air-lift (1L) exposé à $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pendant deux semaines de carence brusque en azote. A) $C_{X_0} = 0.2 \text{ kg.m}^{-3}$, B) $C_{X_0} = 0.76 \text{ kg.m}^{-3}$

La Figure IV-6 montre l'évolution de la concentration en biomasse sèche. Pour la culture carencée ayant la plus faible concentration initiale en biomasse ($C_{X_0} = 0.2 \text{ Kg.m}^{-3}$), la concentration de la biomasse sèche augmente pour atteindre une valeur de 2 kg.m^{-3} en fin de la culture (le 14^{ème} jour de la carence). Cependant, dans l'autre expérience où le PBR a été inoculé avec une concentration en biomasse sèche plus élevée ($C_{X_0} = 0.76 \text{ Kg.m}^{-3}$), la concentration atteint une valeur de 5.61 kg.m^{-3} en fin de la culture. La concentration initiale a donc un effet majeur sur la croissance obtenue. Bien qu'une inoculation à plus forte concentration amène à une concentration en biomasse finale plus élevée, le taux d'accroissement est favorisé pour une concentration plus faible. Pendant deux semaines de culture dans un milieu dépourvu totalement d'azote, la biomasse s'est donc accrue d'un facteur 10 pour la culture avec la concentration initiale la plus faible ($C_{X_0} = 0.2 \text{ Kg.m}^{-3}$), tandis que pour la culture de la concentration initiale la plus élevée ($C_{X_0} = 0.76 \text{ Kg.m}^{-3}$), la biomasse sèche a augmenté approximativement d'un facteur 7. Le taux de croissance de la souche s'est donc révélé plus important dans les conditions d'une concentration initiale faible en biomasse sèche. Cette évolution en biomasse sèche est en corrélation avec les évolutions des pigments et d'indice de stress discutées précédemment. Ces résultats indiquent en effet que la croissance est plus active pour les cultures carencées de faible concentration initiale en biomasse. Cette différence peut être expliquée par le rôle que joue la lumière. Comme cela a été récemment démontré dans les travaux de Van Vooren *et al.*, (2012) et Kandilian *et al.*, (2014), le transfert de la lumière au sein de la culture des microalgues cultivées dans des PBR sous des conditions de carence en azote, affecte fortement la croissance ainsi que le métabolisme des cellules. Ainsi, pour les cultures de faible concentration initiale en biomasse, la faible densité cellulaire garantit une accessibilité plus élevée des cellules à la lumière disponible à l'intérieur de la culture. Cela mène à une activité métabolique plus élevée.

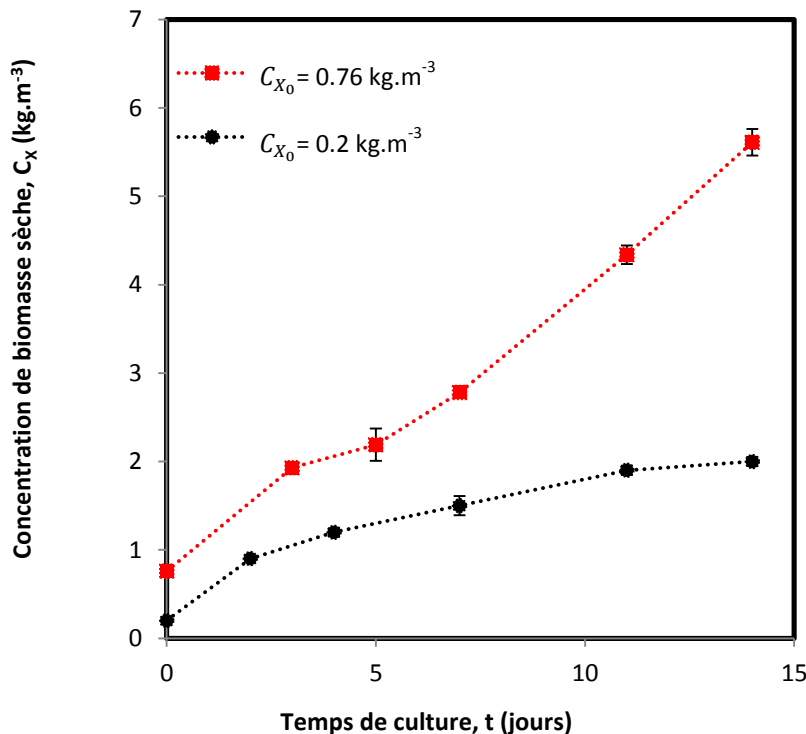


Figure IV-6 Évolution temporelle de la concentration de biomasse sèche des cultures *batch* de *P.kessleri* UTEX2229 cultivée dans un PBR air-lift (1L) exposé à $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pendant deux semaines de carence brusque en azote, et avec deux concentrations initiales en biomasse sèche différentes ($C_{x_0} = 0.76$ et 0.2 Kg.m^{-3}).

3.2-B. Effets sur la composition biochimique de la cellule

Le mode de culture ainsi que l'état nutritionnel de la cellule affectent fortement le métabolisme intrinsèque et par conséquent la composition biochimique des microalgues. L'objectif principal de la présente étude a été d'examiner l'effet des différents protocoles de carence en azote sur le métabolisme lipidique et la cinétique d'accumulation des TAG. Une attention particulière a aussi été accordée aux changements au niveau des teneurs cellulaires en sucres totaux et en protéines, afin de mieux comprendre les modifications physiologiques et l'orientation des voies métaboliques de la cellule dans ces conditions. Les résultats sont illustrés dans la figure IV-7 qui montre l'évolution de la teneur des sucres totaux, des protéines ainsi que des lipides totaux pendant une durée de deux semaines de carence brusque en azote et pour des cultures de concentrations initiales différentes en biomasse sèche ($C_{x_0} = 0.2$ et 0.76 kg.m^{-3}). Une grande modification dans la composition biochimique de la cellule est constatée suite au transfert des cellules à une culture batch

carencée en azote. En effet, les résultats de la figure IV-7 montrent nettement que pour les deux cultures carencées examinées ici ($C_{X0} = 0.2$ et 0.76 kg.m^{-3}), l'accumulation des sucres et des lipides totaux a été déclenchée directement lors de la suspension des cellules dans des milieux dépourvus d'azote. La carence soudaine en azote appliquée ici aux deux cultures active donc les voies de synthèse des sucres et des lipides tout au début de l'expérience (figures IV-7 et IV-8). L'accumulation des sucres totaux a atteint son maximum le 3^{ème} jour de la carence (66.5 % pour $C_{X0} = 0.2 \text{ kg.m}^{-3}$ et 67.8 % pour $C_{X0} = 0.76 \text{ kg.m}^{-3}$ (figure IV-7). Au-delà de cette date, la teneur cellulaire en sucres totaux commence à diminuer pour constituer respectivement 37% et 35 % de la biomasse sèche le 11^{ème} jour de la carence. La cellule continue cependant à accumuler les lipides totaux principalement sous forme de triglycérides pendant toute la durée de la culture comme cela est visible dans la figure IV-7.

La diminution de la teneur intracellulaire en sucres totaux s'explique par le fait que leur concentration a augmenté fortement au cours des trois premiers jours de la carence et demeure à peu près constante pendant le reste de la durée de culture (Figure IV-8). Cependant, pendant cette période, la concentration de biomasse sèche continue à s'accroître (Figure IV-6), ce qui engendre une baisse progressive en termes de pourcentage par rapport à la biomasse sèche. Il est à noter que contrairement aux sucres, la concentration des lipides totaux ne cesse d'augmenter tout au long de la durée de culture (Figure IV-8).

L'accumulation intracellulaire en sucres et en lipides totaux coïncide avec une chute directe de la teneur des cellules en protéines dès le début de l'expérience. Pour les cultures carencées de faible concentration initiale en biomasse sèche $C_{X0} = 0.2 \text{ kg.m}^{-3}$ la teneur des protéines a diminué de 59% jusqu'à 19% pendant 11 jours de carence en azote. Pour l'expérience où la concentration initiale en biomasse sèche est de $C_{X0} = 0.76 \text{ Kg.m}^{-3}$, le contenu cellulaire en protéines a diminué de 60 % jusqu'à 9% pendant cette même durée.

En résumé, les résultats ainsi obtenus mènent à conclure que sous des conditions de carence brusque en azote, les microalgues présentent la même réponse typique illustrée dans la figure IV-7 quelle que soit la concentration initiale de biomasse sèche. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les travaux de Pruvost *et al.*, (2011) et Breuer *et al.*, (2012). Ces auteurs montrent que suite à la privation de la souche en azote, une accumulation intracellulaire progressive des lipides intervient, avec une augmentation soudaine du contenu des sucres qui diminue puis demeure constant. Une chute significative des protéines est également observée en général chez les microalgues oléagineuses en réponse à ses conditions de croissance défavorables. Bien que les comportements soient similaires, l'accumulation en lipides est différente, montrant à nouveau le rôle de la

concentration initiale en biomasse sur cette accumulation comme cela a été observé par Van Vooren *et al.*, (2012) et Kandilian *et al.*, (2014). Ainsi, l'accumulation en lipides est plus élevée quand la concentration en biomasse est la plus faible (64% contre 41%). Cela montre qu'une trop forte atténuation lumineuse est néfaste à l'accumulation de lipides. On observe également de façon intéressante, que *P. kessleri* continue à accumuler des lipides même après 14 jours de carence.

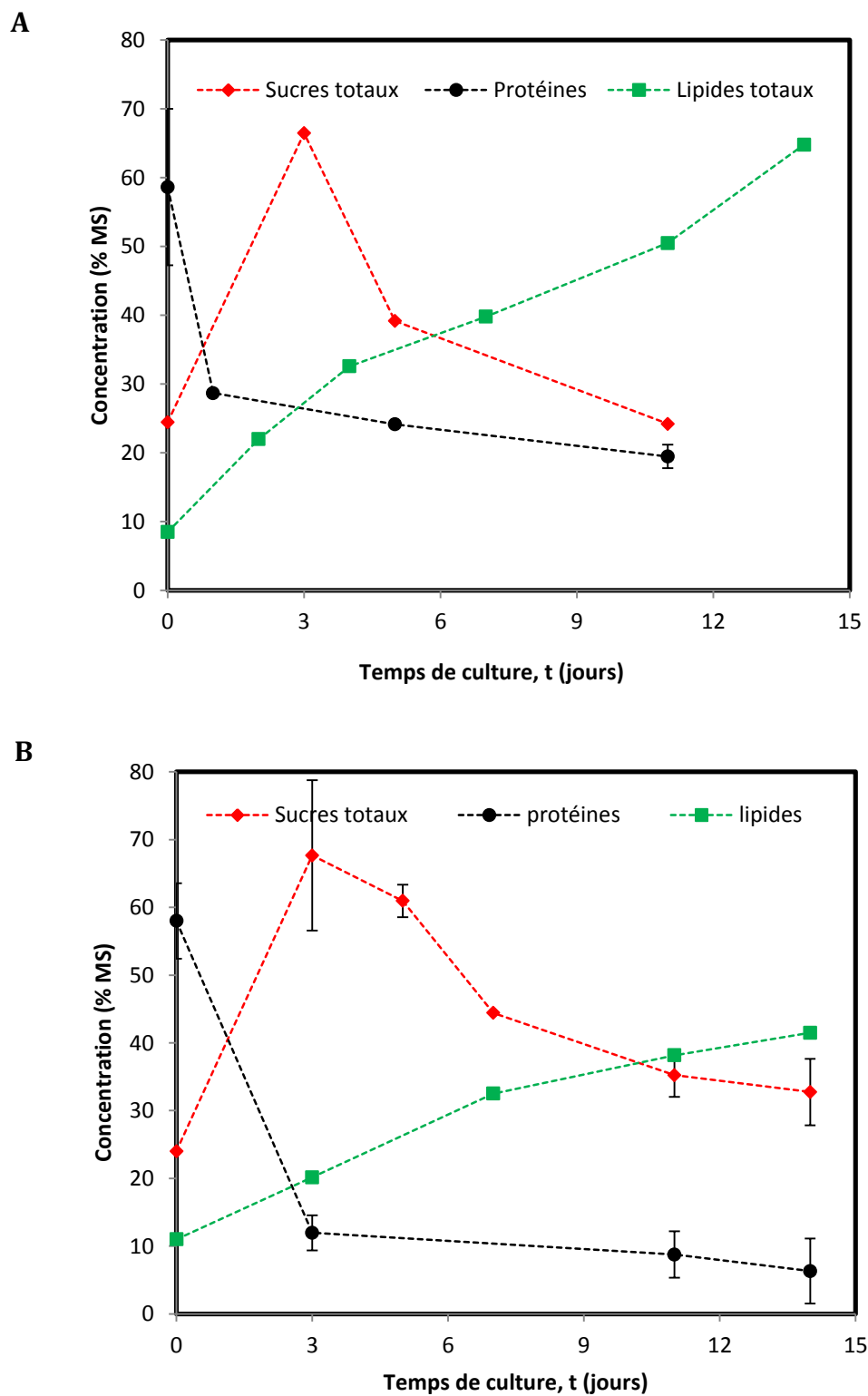


Figure IV-7 Évolution temporelle de la composition biochimique des cultures *batch* de *P. kessleri* UTEx2229 dans des conditions de carence soudaine en azote. A) $C_{x0} = 0.2 \text{ kg.m}^{-3}$, B) $C_{x0} = 0.76 \text{ kg.m}^{-3}$

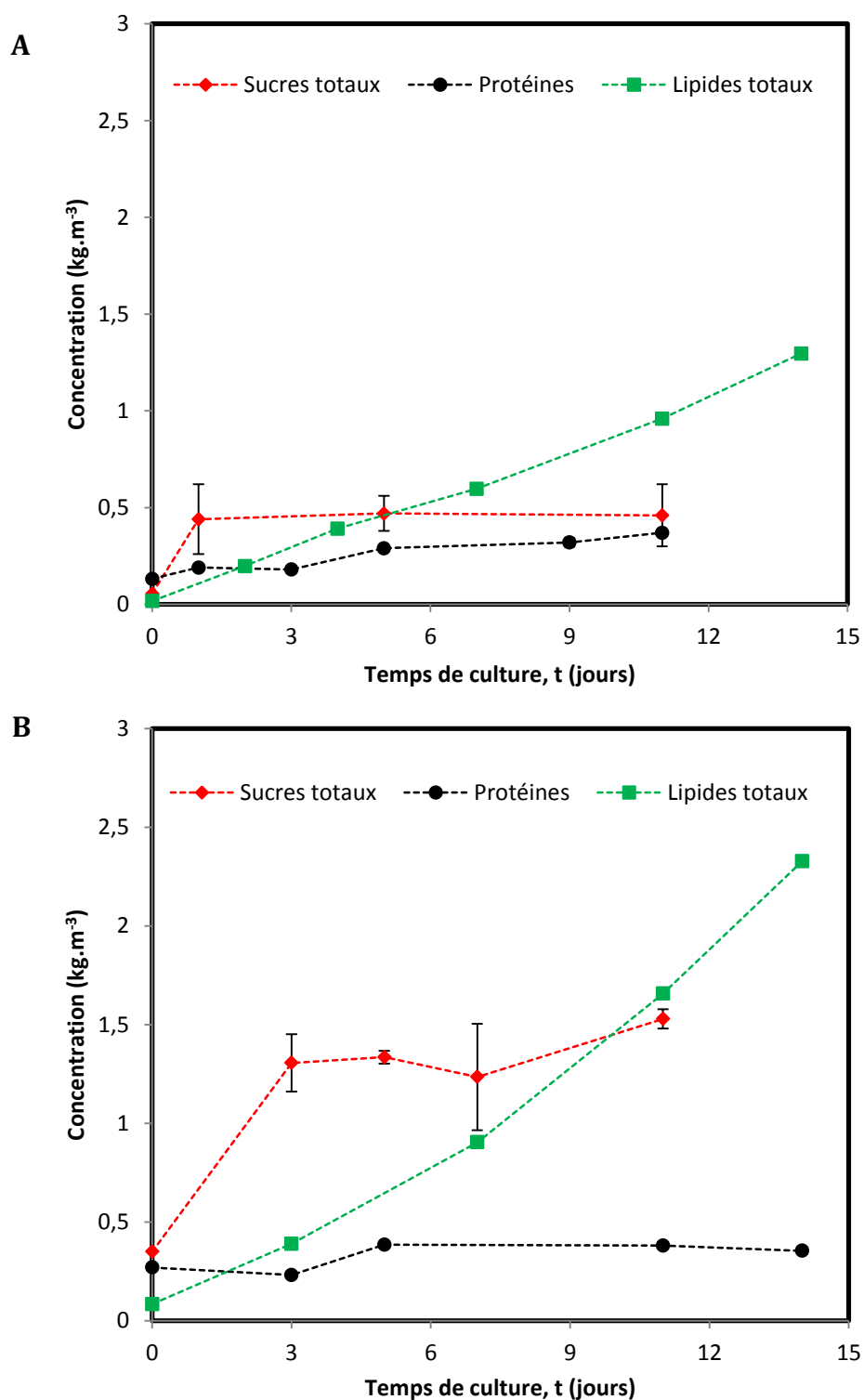


Figure IV-8 Évolution temporelle de la concentration des sucres totaux, des protéines, et des lipides totaux des cultures batch de *P. kessleri* UTEx2229 dans des conditions de carence soudaine en azote. A) $C_{X_0} = 0.2 \text{ kg.m}^{-3}$, B) $C_{X_0} = 0.76 \text{ kg.m}^{-3}$

3.2-C. Effets sur la cinétique d'accumulation et de production des TAG

IV.3.2.C.1 Effet de la lumière sur l'accumulation des TAG

La limitation minérale en azote est l'une des stratégies les plus connues pour déclencher l'accumulation des lipides chez les algues oléagineuses et principalement sous forme de triglycérides (Tornabene *et al.*, 1983a; Van Vooren *et al* 2012 et Kandilian *et al.*, 2014). Cette accumulation concerne alors principalement les TAG comme cela a été observé précédemment.

Dans des études récentes (Pruvost *et al* 2009; Van Vooren *et al* 2012) une influence conjointe de la carence azotée et de la quantité de lumière reçue par la cellule sur son mécanisme d'accumulation des lipides a également été discutée, mais cette dernière n'est pas clairement démontrée. Dans les travaux de Van Vooren *et al.*, (2012), il a été remarqué que dans des conditions de forte atténuation de la lumière et de carence azotée, la capacité de la cellule à accumuler les lipides totaux devient plus faible. Ensuite dans les travaux de Kandilian *et al.*, (2014), une relation plus claire a été admise entre les conditions d'atténuation de la lumière dans les PBR, et l'accumulation des lipides (TAG) à l'intérieur des cellules de *Nannochloropsis oculata*. Cette relation fait un lien entre la capacité de la cellule à absorber la lumière et le métabolisme lipidique intrinsèque de la cellule. À noter que la capacité d'absorption de lumière dépend elle-même de la teneur des pigments et de l'intensité lumineuse reçue à la surface du PBR. Cela rend au final complexe l'optimisation de ce paramètre, notamment à cause de la dégradation pigmentaire lors de la carence. Ainsi, la relation mise en évidence par Kandilian *et al.*, (2014) indique que la cinétique de biosynthèse des lipides (TAG) est limitée par la vitesse volumétrique d'absorption des photons, MVREA (*mean volumetric rate of energy absorption*) notée $\langle \mathcal{A} \rangle$ et exprimée en $\mu\text{mol}_{\text{hv}}/\text{g. s.}$ Cette grandeur peut être calculée à partir de la connaissance du transfert radiatif au sein de la culture.

Les expérimentations réalisées dans notre étude permettent d'aborder cet effet lié à la lumière reçue par cellule. Les résultats sont présentés dans la Figure IV-9. Ces derniers permettent d'évaluer nettement l'influence des différentes conditions d'atténuation de la lumière générées par les deux concentrations initiales différentes en biomasse sèche testées sur le métabolisme lipidique des cellules carencées, et par conséquent leur cinétique d'accumulation intracellulaire en TAG. Pour la culture carencée de concentration initiale élevée en biomasse sèche ($C_{X_0} = 0.76 \text{ Kg.m}^{-3}$), les cellules accumulent fortement les TAG pendant la première semaine de la carence où leur teneur intracellulaire a augmenté

d'un facteur 4 (de 6.8 tout au début de l'expérience jusqu'à 28 % de la biomasse sèche le 7^{ème} jour). Toutefois cette augmentation linéaire du contenu des TAG à l'intérieur des cellules a été accompagnée d'une chute des pigments et surtout des chlorophylles a comme déjà présenté dans la Figure IV-5 (B). Ensuite, la cellule continue à accumuler les TAG pour constituer 30.8% de la biomasse sèche le 11^{ème} jour de la carence, mais avec une vitesse très faible. Cet affaiblissement suit la perte des pigments (surtout les chlorophylles) qui continuent à diminuer drastiquement entre le 7^{ème} et le 11^{ème} jour de la carence (voir Figure IV-5 (B)). On observe d'autre part une augmentation de la concentration cellulaire comme l'illustre la Figure IV-6 présentée précédemment. Cela tend à augmenter l'atténuation de la lumière dans le PBR, mais la perte en pigments (surtout les chlorophylles) affaiblit l'absorption de l'énergie lumineuse par les cellules. Au final, ces deux paramètres (la perte des pigments et l'augmentation de la densité cellulaire) participent ensemble à affaiblir le taux volumique d'absorption des photons par la cellule, ce qui affecte négativement le métabolisme lipidique comme cela a été montré par Kandilian *et al.*, (2014). Dans de telles conditions, les cellules ne reçoivent pas une énergie lumineuse suffisante pour activer significativement leur voies de biosynthèse des acides gras et d'accumuler ainsi des quantités plus grandes de TAG.

Un phénomène similaire est observé pour la culture avec la plus faible concentration initiale de biomasse sèche ($C_{X0} = 0.2 \text{ kg.m}^{-3}$). L'accumulation en TAG est forte pendant les 7 premiers jours de la carence (Figure IV-9). La teneur intracellulaire en TAG augmente alors de 6.2% tout au début de l'expérience jusqu'à 34.2 % le 7^{ème} jour de la carence. Le taux d'accumulation des TAG apparaît beaucoup plus fort dans les premières 48 heures de la culture où une augmentation de 6.2% jusqu'à 20% est détectée au niveau du contenu intracellulaire des TAG (facteur 3). Cette accumulation importante coïncide avec une forte chute de la concentration des pigments totaux et principalement les chlorophylles a (Figure IV-5 (A)). De plus, les résultats de la Figure IV-9 montrent qu'au-delà du 7^{ème} jour de la carence, le contenu des TAG continue à augmenter mais plus légèrement. La perte signalée au niveau de la teneur cellulaire des pigments semble ici aussi à l'origine de la diminution de la vitesse d'accumulation des TAG. Cette teneur faible en pigments empêche les cellules d'absorber suffisamment de photons pour stimuler fortement leur métabolisme de synthèse lipidique.

Au final, pendant toute la durée de la culture, la capacité des cellules à accumuler des TAG est plus forte dans les conditions de la faible concentration initiale en biomasse sèche ($C_{X0} = 0.2 \text{ kg.m}^{-3}$). En effet, la teneur en TAG a augmenté approximativement d'un facteur 6 en une semaine de culture sous carence brusque en azote, alors que dans le cas où la concentration initiale en biomasse était plus importante ($C_{X0} = 0.76 \text{ kg.m}^{-3}$) et pour la

même durée de la culture, le contenu intracellulaire des TAG n'a augmenté que d'un facteur 4. Il faut rappeler ici que les deux cultures sont exposées à la même intensité lumineuse ($\text{PFD}=250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). L'atténuation de la lumière dans le PBR ainsi que les propriétés optiques des cellules (dépendent de la teneur en pigments) sont donc à l'origine de cette différence observée au niveau du métabolisme lipidique des deux cultures. Ces résultats montrent qu'une faible concentration initiale en biomasse sèche engendre une atténuation plus faible de la lumière au sein de la culture, ce qui garantit une absorption des photons suffisante pour activer les voies de biosynthèse des acides gras et améliorer ainsi l'accumulation des TAG. Ces résultats sont en d'accord avec ceux obtenus dans les travaux de Van Vooren *et al* (2012) et Kandilian *et al.*, (2014).

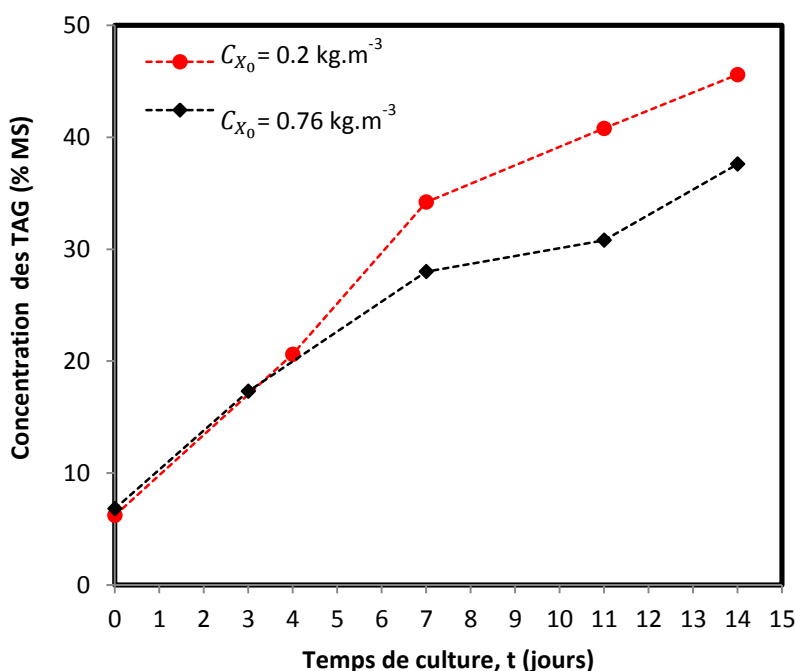


Figure IV-9 Influence de la concentration initiale en biomasse sèche sur la cinétique d'accumulation des triglycérides de *P. kessleri* UTEX2229 dépourvue d'azote

IV.3.2.C.2 Cinétique de production des TAG

Dans le paragraphe précédent, l'effet de la carence soudaine en azote et celui de la lumière sur l'évolution de l'accumulation des TAG ont été étudiés et les résultats ainsi

obtenus ont montré qu'une faible concentration initiale en biomasse sèche engendre en général une accumulation plus forte des TAG à l'intérieur des cellules. Or cette conclusion ne permet pas de généraliser sur les aptitudes de la souche en termes de productivité en TAG. Cette dernière dépend également de la croissance de la souche donc de la concentration de la biomasse sèche. Dans ce contexte, la productivité des TAG a été déterminée pendant deux semaines pour les deux cultures carencées en azote de différentes concentrations initiales en biomasse sèche ($C_{X_0} = 0.2$ et 0.76 kg.m^{-3}). Les résultats sont affichés dans la Figure IV-10. Comme le montre la figure, la productivité en TAG des deux cultures carencées est différente. En effet, pour la culture de faible concentration initiale en biomasse, la productivité surfacique des TAG augmente progressivement avec le temps de culture pour atteindre une valeur maximale de $2.7 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ le 4^{ème} jour de la carence. Ensuite elle baisse pour atteindre $1.95 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ le 7^{ème} jour, et demeure approximativement stable jusqu'à la fin de la culture. En ce qui concerne la culture carencée de la grande concentration initiale en biomasse sèche ($C_{X_0} = 0.76 \text{ kg.m}^{-3}$), les résultats illustrés dans la Figure IV-10 indiquent que la productivité surfacique des TAG a continué à augmenter pendant toute la durée de la culture. Elle a aussi augmenté de 1.5 jusqu'à $4.5 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ pendant deux semaines de culture sous des conditions de carence brusque en azote.

Ces résultats montrent que les productivités en TAG sont les plus fortes dans l'expérience de carence azotée avec la plus grande concentration initiale en biomasse ($C_{X_0} = 0.76 \text{ Kg.m}^{-3}$), au contraire donc de l'accumulation en TAG plus forte dans la culture carencée avec faible concentration initiale en biomasse ($C_{X_0} = 0.2 \text{ Kg.m}^{-3}$). Cette productivité plus élevée s'explique ici par des concentrations en biomasse plus importantes obtenues pour $C_{X_0} = 0.76 \text{ kg.m}^{-3}$ (voir Figure IV-6).

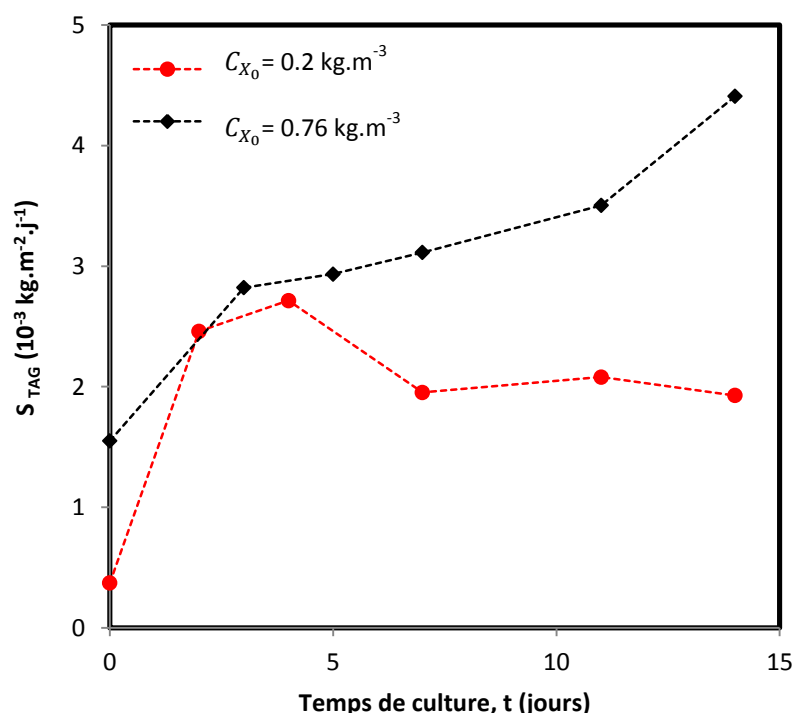


Figure IV-10 Évolution temporelle de la productivité surfacique des TAG des cultures batch de *P. kessleri* UTEX2229 cultivées en PBR *air-lift* (1L) sous des conditions de carence brusque en azote pour différentes concentrations initiales en biomasse sèche ($C_{X_0} = 0.2$ et 0.76 kg.m^{-3})

3.3- Étude de la production en TAG sous des conditions de carence progressive en azote (mode batch)

La limitation d'azote peut être en pratique réalisée de deux façons différentes: soudaine et progressive. La présente partie sera consacrée à étudier l'effet de la carence progressive en azote sur le métabolisme lipidique (accumulation en TAG) et la croissance de *P. kessleri* UTEX2229. Dans ce but, deux expérimentations de carence progressive en azote ont été effectuées en mode batch dans deux PBR identiques à ceux utilisés pour les expériences de la carence soudaine. Un milieu de culture (GVV-Neo) de même concentration initiale en azote $[N]_0 = 2.3 \text{ mM}$ a été utilisé. Les PBR ont été inoculés avec une concentration initiale identique de biomasse sèche ($C_{X_0} = 0.05 \text{ kg.m}^{-3}$) provenant d'une culture normale et stable de *P. kessleri* UTEX2229 utilisée en conditions optimales. Le seul paramètre différent entre les deux expériences a été l'intensité lumineuse reçue sur la surface du PBR. Ainsi, les deux cultures batch limitées en azote ont été exposées à deux flux lumineux incidents différents ($q_0 = 160$ et $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

3.3-A. Effets sur l'évolution des pigments et de la croissance

L'évolution de la concentration des pigments totaux des deux cultures a été suivie pendant deux semaines suite à la suspension des cellules dans des PBR contenant des milieux limités en azote (Figure IV-11). Comme le montre la figure IV.11, les deux cultures ont montré la même cinétique d'évolution avec une augmentation forte de la concentration en pigments pendant les trois premiers jours de la carence suivie d'une chute drastique pendant le 3^{ème} et le 9^{ème} jour de la carence expliquée surtout par les chlorophylles (Figure IV-12) qui constituent une réserve d'azote pour les cellules carencées. Ensuite la teneur des pigments demeure approximativement constante. Il faut noter que pendant toute la durée des expériences, la culture exposée à l'illumination la plus faible ($q_0=160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a montré des concentrations plus élevées en pigments (Figure IV-11). Cette observation s'explique par le fait qu'en présence d'intensité lumineuse plus faible, les cellules ont tendance à synthétiser plus de pigments et en particulier les chlorophylles pour renforcer leur capacité d'absorption des photons comme déjà démontré précédemment dans le paragraphe (2.2-) de ce chapitre.

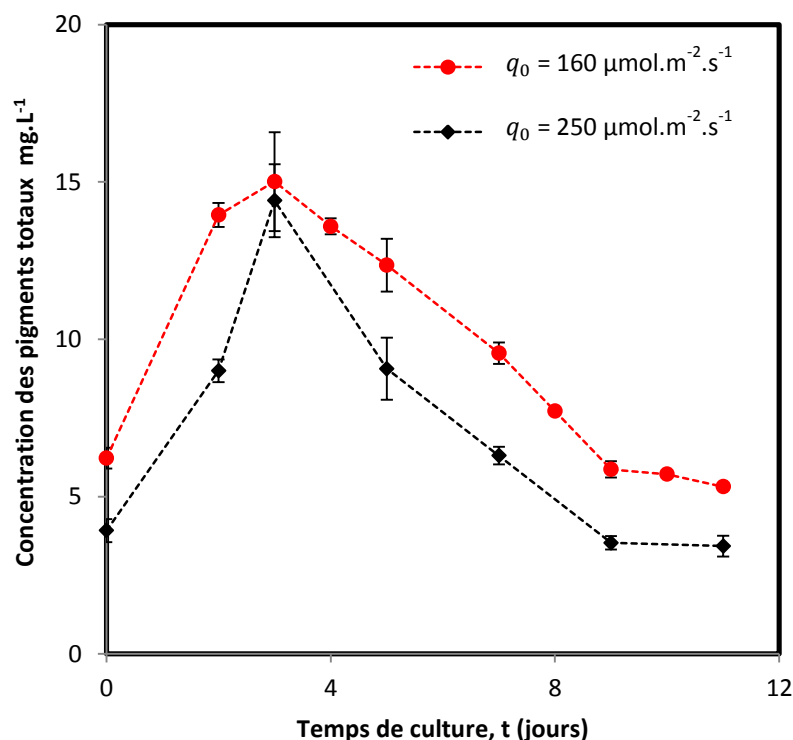


Figure IV-11 Évolution temporelle de la concentration des pigments totaux des cultures batch de *P. kessleri* UTEX2229 limitées progressivement en azote ($[N]_0=2.3 \text{ mM}$) et exposées à deux densités différentes de flux lumineux incident ($q_0 = 250$ et $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

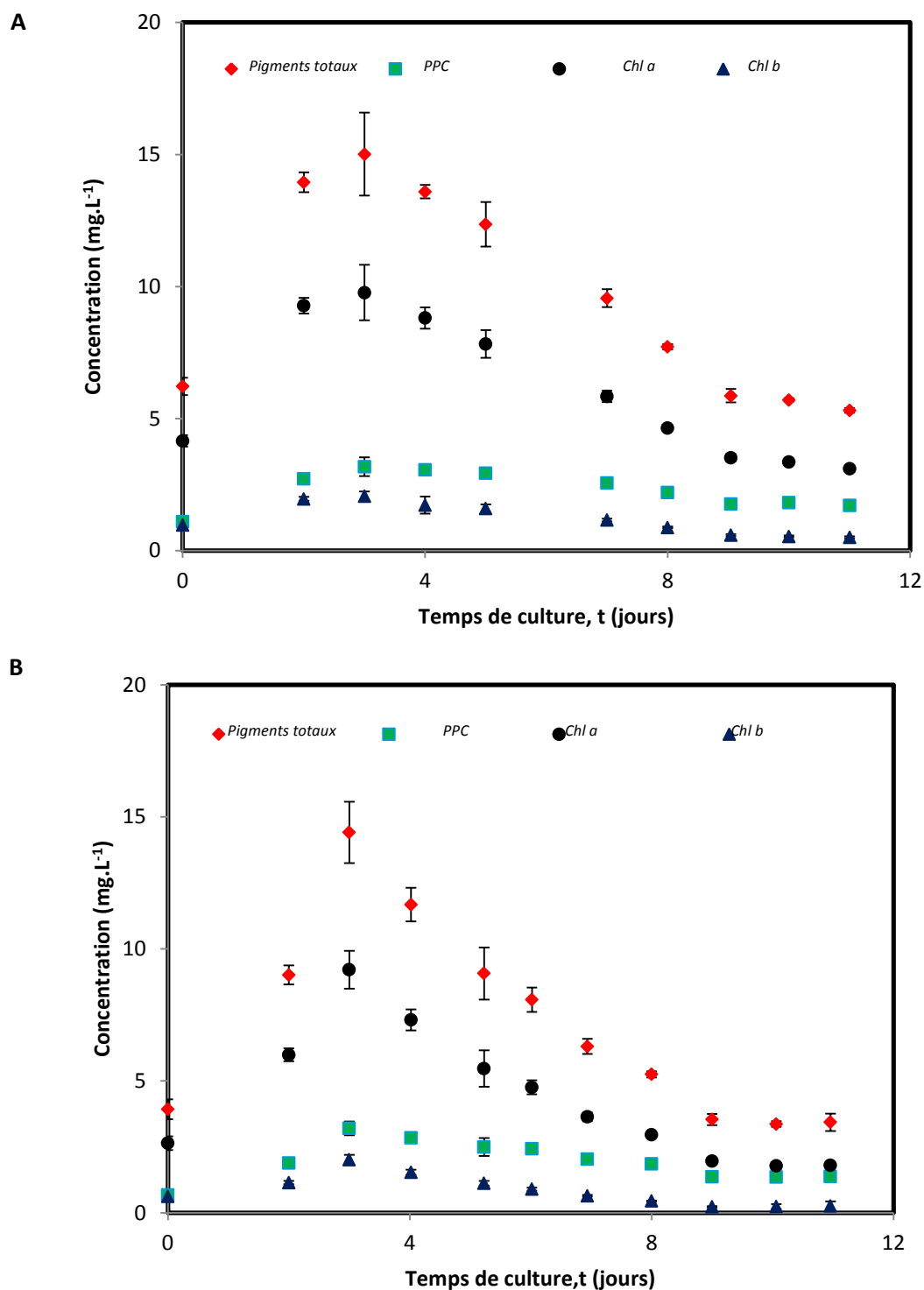


Figure IV-12 Évolution de la concentration des différents pigments de la chaîne photosynthétiques des cellules limitée en azote (carence progressive ($[N]_0=2.3$ mM) cultivées en batch sous deux conditions différentes d'illumination. A) $q_0=160$, B) $q_0=250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

En comparant l'évolution de la concentration des pigments observée ici avec celle obtenue précédemment pour les cultures dépourvues totalement d'azote (carence soudaine en azote), les résultats soulignent une différence nette en termes de cinétique. En effet, pour les deux expériences de carence soudaine en azote déjà présentées, la teneur des cultures en pigments diminue drastiquement dès la suspension des cellules dans les milieux dépourvus d'azote (Figure IV-4). Pour les cultures de carence progressive en azote, la concentration des pigments a augmenté fortement tout au début de l'expérience pour atteindre une valeur maximale le 3^{ème} jour de la carence. Au-delà de cette date, une chute forte a été observée. Cette variation suit la consommation progressive de l'azote dans le milieu ($[N]_0 = 2.3 \text{ mM}$) dont l'épuisement a lieu dans les 48 heures qui suivent le lancement de la culture (Figure IV-13). Donc, tant que de l'azote est disponible (2 premiers jours de la carence) la synthèse de pigments est possible. On peut noter que les résultats de la Figure IV-13 montrent que le taux de consommation des nitrates était plus important pour les cultures exposées à $q_0 = 160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ceci permet de constater que les cellules ont eu besoin de plus d'azote dans ces conditions pour éventuellement produire plus de pigments.

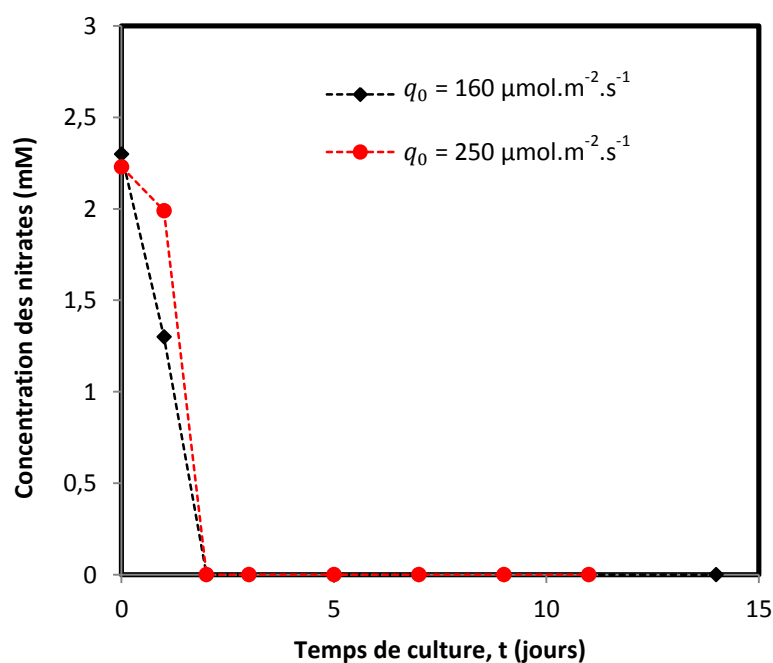


Figure IV-13 Consommation des nitrates au cours des expériences de carence progressive en azote ($[N]_0 = 2.3 \text{ mM}$)

Les résultats en termes de croissance sont présentés dans la Figure IV-14. Les deux cultures ont présenté des cinétiques similaires de croissance. En effet, dans les deux cas, un fort accroissement de la biomasse sèche a été observé pendant la première semaine de la culture où la concentration a augmenté de 0.05 kg.m^{-3} au début de l'expérience pour arriver approximativement à 2 kg.m^{-3} (en une semaine, la biomasse sèche devient donc 40 fois plus importante). Ensuite, elle demeure constante pendant deux jours (Figure IV-14, A) et reprend son augmentation le 9^{ème} jour où elle augmente de nouveau de 2 kg.m^{-3} et atteint une valeur maximale de 2.7 kg.m^{-3} le 11^{ème} jour de carence pour la culture exposée à $q_0 = 250 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, et 3 kg.m^{-3} le 14^{ème} jour pour la culture exposée à $q_0 = 160 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La stabilisation observée au niveau de la concentration de la biomasse sèche pendant le 7^{ème} et le 9^{ème} jour de la carence pour les deux expériences (Figure IV-14, A) s'accompagne d'une perte au niveau des concentrations cellulaires comme le montre la Figure IV-14, B. Ces résultats permettent de supposer que pendant cette période, une partie des cellules stressées dépérit. Le fait que les deux cultures présentent des croissances identiques malgré le changement de flux incident montre l'effet majeur de la limitation minérale sur la croissance. La croissance se retrouve «bridée», empêchant d'avoir une croissance supérieure alors que le flux incident capté est supérieur.

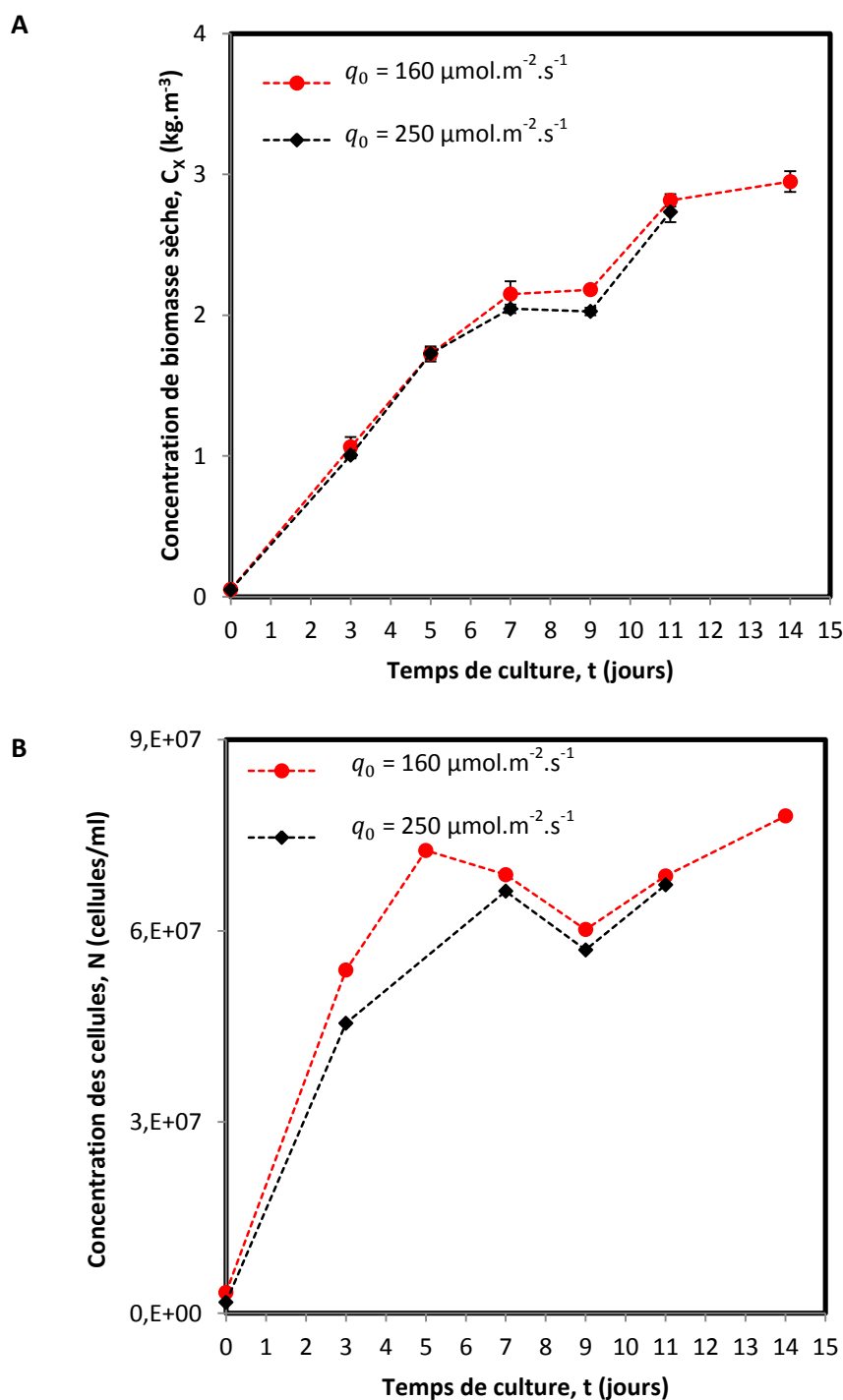


Figure IV-14 Évolution temporelle de la croissance des cultures batch de *P. kessleri* UTEX2229 limitées progressivement en azote ($[N]_0=2.3 \text{ mM}$) et exposées à deux densités différentes de flux lumineux incident ($q_0=250$ et $160 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$). A) Concentration en biomasse sèche B) Concentration en cellules

3.3-B. Effets sur la composition biochimique de la cellule

L'évolution de la teneur intracellulaire des différents constituants organiques a été suivie (sucres totaux, protéines et lipides totaux). Les résultats sont présentés dans la Figure IV-15. Ces résultats confirment l'effet important de la carence azotée sur la physiologie cellulaire. Sous des conditions de croissance normales, les cellules de *P. kessleri* UTEX2229 renferment environ 23 à 25 % de sucres totaux, 55 à 60% de protéines et 8.5 à 11.2 % de lipides totaux (Tableau IV-2). La teneur intracellulaire des sucres totaux augmente ensuite fortement pour atteindre un maximum d'accumulation le 3^{ème} jour de la carence, puis diminue (Figure IV-15). Pour la culture exposée à $q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, les sucres totaux augmentent de 24.6% au début de l'expérience pour constituer 58% de la biomasse sèche le 3^{ème} jour de la carence. Ensuite une chute rapide est observée pour arriver à 28% le 9^{ème} jour de la carence. Ce même phénomène est observé pour le flux le plus faible. Ainsi une forte accumulation intracellulaire des sucres totaux (de 24 à 55% de la biomasse sèche) suivie d'une chute (de 55% le 3^{ème} jour jusqu'à 34% le 11^{ème} jour) ont été observées. Par ailleurs, comme déjà observé pour les expériences de carence soudaine en azote, cette suraccumulation soudaine du contenu cellulaire en sucres totaux coïncide avec une chute au niveau de la teneur des cellules en protéines dont la concentration diminue de 59% au début de l'expérience jusqu'à 8% le 3^{ème} jour de la carence, tandis qu'elle demeure à peu près constante jusqu'à la fin de la culture pour la culture limitée en azote exposée à $q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figure IV-15, A).

Si on compare les deux expériences, les résultats présentés dans la Figure IV-15 montrent que les cultures possèdent le même profil d'évolution de la composition biochimique. En comparant ces résultats avec ceux des expériences de carence soudaine en azote (Figure IV-7), les mêmes changements physiologiques sont obtenus au niveau des sucres totaux et des protéines. Les voies métaboliques cellulaires des sucres et des protéines suivent donc la même orientation quel que soit le protocole de la mise en carence azotée. En revanche, l'effet est différent concernant les lipides et les pigments. En effet, les résultats de la Figure IV-15 révèlent une différence au niveau de la cinétique d'accumulation et d'évolution des lipides totaux entre les deux techniques. Contrairement à l'accumulation forte et directe des lipides totaux observée précédemment pour les expériences de carence brusque en azote (Figure IV-7), les résultats présentés dans la Figure IV-15 montrent un décalage de trois jours avant que les cellules ne commencent à accumuler les lipides totaux. Ce décalage correspond au temps nécessaire à la consommation et l'épuisement de la quantité des nitrates contenue dans les milieux de culture. Cela confirme que les voies de biosynthèse des acides gras ne s'activent fortement que suite à l'absence d'azote dans le milieu de culture. Ainsi, comme le montre la Figure IV-15, pour la culture exposée à $q_0 = 250$

$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, le contenu cellulaire des lipides totaux reste constant pendant les 3 premiers jours de la carence (10.1 à 10.9 % de la biomasse sèche), ensuite la suraccumulation des lipides totaux est déclenchée pour atteindre 44.9% de la biomasse sèche le 9^{ème} jour de la carence (Figure IV-15, A). Ensuite, aucun changement significatif n'est observé. De la même manière, pour la culture exposée à $q_0 = 160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, la suraccumulation des lipides totaux n'est induite qu'à partir du 3^{ème} jour de la carence où la teneur intracellulaire a augmenté de 13% pour atteindre une valeur maximale de 55% de la biomasse sèche le 11^{ème} jour de la carence.

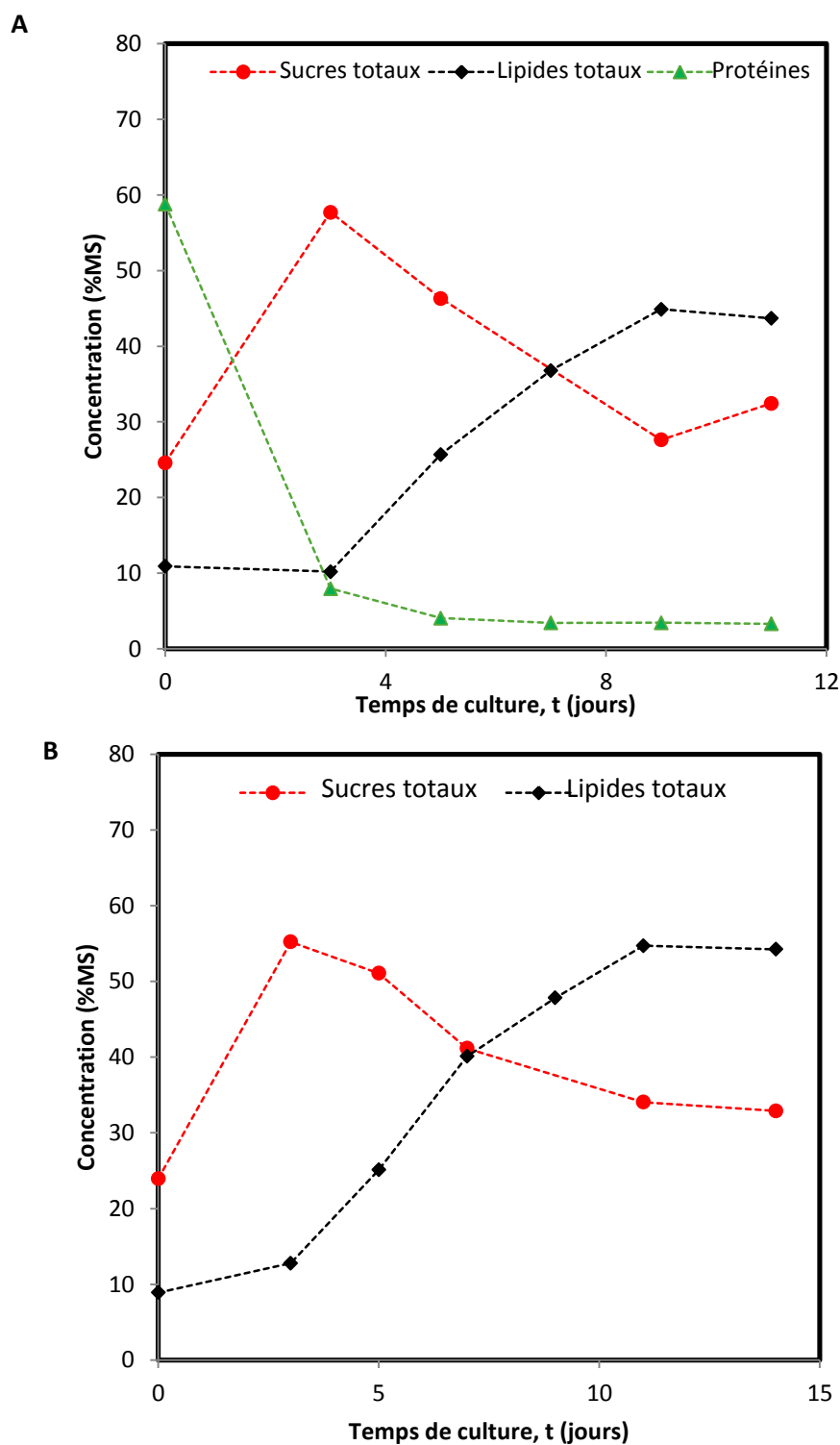


Figure IV-15 Évolution temporelle de la composition biochimique des cultures batch de *P. kessleri* UTEX2229 dans des conditions de carence progressive en azote $[N]_0 = 2.3 \text{ mM}$. A) $q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$
B) $q_0 = 160 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$

3.3-C. Étude de la cinétique d'accumulation et de production de TAG

IV.3.3.C.1 Accumulation des TAG

Les résultats d'accumulation en TAG en carence progressive sont présentés dans la Figure IV-16. Pour la culture exposée à la faible intensité lumineuse ($q_0 = 160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), aucun changement significatif du contenu intracellulaire des TAG n'est observé pendant les trois premiers jours de la carence, la concentration des TAG a été augmenté de 6 % au début de l'expérience jusqu'à 10 % le 3^{ème} jour. Cependant, au-delà de cette période, une forte accumulation des TAG est déclenchée et les cellules accumulent jusqu'à 48.4 % de leur poids sec en TAG le 11^{ème} jour de la carence, puis le contenu des TAG diminue légèrement et atteint une concentration de 46.1% à la fin de la culture (le 14^{ème} jour).

Pour la culture éclairée par une intensité lumineuse plus importante ($q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), la concentration intracellulaire des TAG est également constante au cours des trois premiers jours de la carence, et ensuite le contenu des TAG augmente fortement de 5.2 % jusqu'à atteindre une concentration maximale de 36.7% à la fin de la culture (11^{ème} jour de la carence) (Figure IV-16).

Donc, pour les deux cultures, une accumulation forte des acides gras n'a eu lieu que suite à l'épuisement total de l'azote. L'accumulation a lieu ensuite tout le long de la période de culture mais avec des vitesses qui diminuent avec le temps. Cela s'accompagne par une perte de pigments au fur et à mesure de la période de culture (Figure IV-11). On observe cependant que le contenu cellulaire en TAG de la culture exposée à la faible intensité lumineuse ($q_0 = 160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) est plus important. Ce résultat tend à aller à l'encontre des conclusions précédentes sur l'effet bénéfique de l'apport de lumière dans la synthèse de TAG. On observe cependant que cela s'accompagne de concentrations plus élevées en pigments (Figure IV-11).

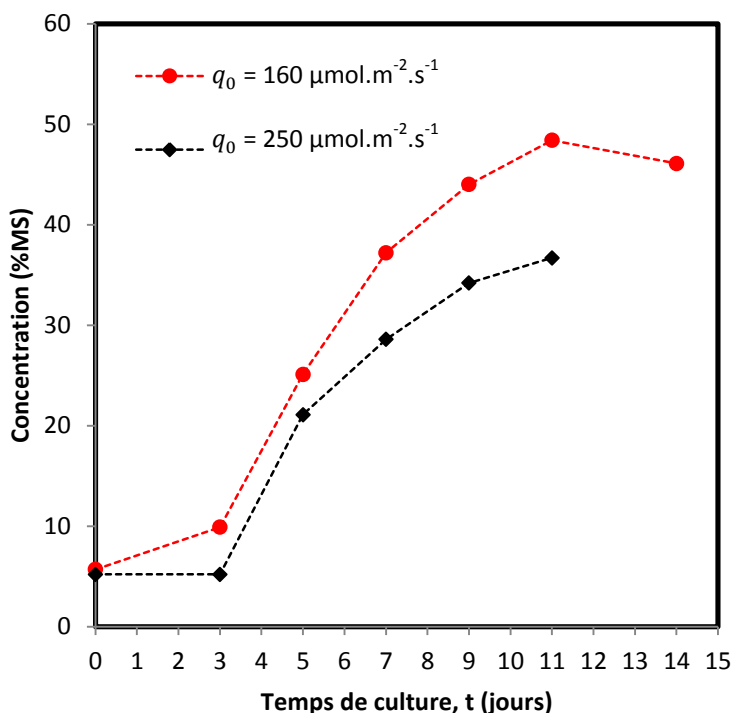


Figure IV-16 Évolution temporelle de l'accumulation intracellulaire des triglycérides des cultures *batch* de *P. kessleri* UTEX2229 cultivées en PBR *air-lift* (1L) sous des conditions de carence progressive en azote ($[N]_0 = 2.3\text{mM}$) et exposées à deux intensités lumineuses différentes ($q_0 = 250$ et $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

IV.3.3.C.2 Cinétique de production des TAG

Les résultats des productivités en TAG sont présentés dans la Figure IV-17. La cinétique de production des TAG des deux cultures carencées est différente. En effet, pour la culture éclairée avec la faible intensité lumineuse ($q_0 = 160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), la productivité surfacique en TAG augmente progressivement avec le temps de la culture pour atteindre une valeur maximale de $3.7 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ le 11^{ème} jour de la carence. Ensuite elle commence à décroître rapidement pour arriver à $2.9 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ à la fin de la culture (14^{ème} jour). Il faut noter que dans ces conditions, les cellules continuent à produire des TAG mais avec des vitesses de production plus faibles.

La même tendance est observée pour la culture sous flux incident plus élevé ($q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les résultats illustrés dans la Figure IV-17 indiquent que la vitesse de production de TAG est relativement faible pendant les 3 premiers jours de la croissance où la productivité surfacique des TAG a augmenté légèrement de 0.08 à $0.5 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$.

Ensuite un fort accroissement de 0.5 jusqu'à $2.17 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ est observé entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour de la carence. Ensuite, les vitesses de productions restent faibles, pour atteindre une valeur maximale de productivité de $2.7 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ en fin de la culture (le 11^{ème} jour).

Les faibles vitesses de production des TAG signalées pendant les 3 premiers jours de la carence s'expliquent par la faible accumulation de TAG pendant cette période (Figure IV-16). La forte augmentation des vitesses de production après le 3^{ème} s'explique par un accroissement simultané au niveau de leur croissance (concentration en biomasse sèche) (voir Figure IV-14) et de l'accumulation en TAG (Figure IV-16) au cours de cette période. Il en résulte une cinétique de production en TAG très forte. Enfin, l'affaiblissement des vitesses de production pendant la durée restante de la culture s'explique certainement par une diminution de la capacité des cellules à absorber les photons nécessaires à la croissance et à la synthèse lipidique. En effet, il y a alors simultanément une augmentation de l'atténuation de la lumière au sein de la culture générée par la forte densité cellulaire et une perte des pigments au fur et à mesure de la culture.

Si on compare les cultures, les résultats soulignent une productivité en TAG plus importante pour la culture exposée à $q_0 = 160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ce résultat est surprenant et va à l'encontre des phénomènes observés par Van Vooren *et al.*, (2012). Ces auteurs ont montré que l'augmentation du flux incident dans les mêmes conditions était bénéfique pour *Nannochloropsis oculata* Alphabiotec. On observe néanmoins que dans notre cas, la culture à fort flux mène à une pigmentation plus faible. Ceci explique certainement nos résultats. Comme montré par Kandilian *et al.*, (2014.), il est en effet nécessaire de satisfaire en carence une vitesse d'absorption de photons suffisante. Cette condition a été vérifiée dans le cas des expérimentations de Van Vooren *et al.*, (2012). Dans notre cas, les propriétés radiatives de *P. kessleri* n'étant pas connues, cette analyse n'est pas possible. Toutefois, on peut supposer que la différence de teneur en pigments observée joue ici un rôle majeur. En effet, celui-ci joue fortement sur l'absorption de photons, en modifiant l'atténuation de lumière dans le réacteur, et donc la quantité absorbée de photons par chaque cellule. Une analyse détaillée telle que menée dans les travaux de Kandilian *et al.*, (2014) serait ici intéressante pour expliquer ce résultat. La vitesse d'absorption de photons semble en effet jouée un rôle ici aussi, avec néanmoins une différence liée à une teneur en pigments significativement plus élevée dans le cas du faible flux, ce qui n'avait pas été observé dans les expérimentations de Van Vooren *et al.*, (2012). L'évolution pigmentaire, qui apparaît ici comme étant souche-dépendante, semble jouer un rôle essentiel. Il apparaît au premier abord qu'un contenu pigmentaire plus important soit favorable à la productivité en TAG.

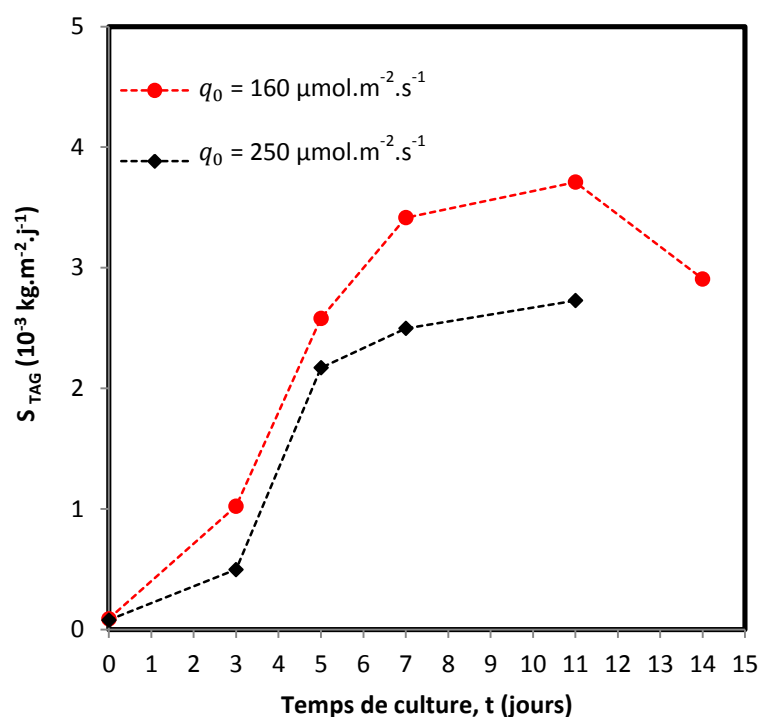


Figure IV-17 Évolution temporelle de la productivité surfacique des TAG des cultures batch de *P. kessleri* UTEX2229 cultivées en PBR *air-lift* (1L) sous des conditions de carence progressive en azote ($[N]_0 = 2.3\text{mM}$) et exposées à deux intensités lumineuses différentes ($q_0 = 250$ et $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

3.4- Étude de la production de TAG en culture continue de *P. kessleri* UTEX2229 limitée en azote

3.4-A. Introduction

Dans la partie précédente, deux techniques différentes de limitation en azote (carence soudaine et progressive) ont été appliquées. Les résultats ont montré que l'azote n'était pas le seul paramètre qui affecte le métabolisme lipidique et une carence en azote toute seule ne garantit pas une production importante de TAG. Une production intéressante de TAG est le résultat d'une bonne croissance de la souche dans ces conditions de culture spécifiques et d'un fort pouvoir d'accumulation de TAG. Ces deux paramètres dépendent de la quantité de photons absorbée par la cellule, qui elle-même dépend de l'intensité lumineuse reçue sur la surface du PBR, de l'atténuation de la lumière à l'intérieur de la culture et de la teneur en pigments des cellules. Les effets de chacun de ces aspects sont compliqués à prévoir et le résultat n'est donc pas facile à optimiser.

En prolongement à ces essais, des cultures continues sous limitation azotée ont été testées. Le mode de culture continu permet de stabiliser des conditions opératoires. Il peut donc se révéler utile en vue d'optimiser ces conditions pour la production de TAG. De plus, industriellement, une production continue de quantité importante de TAG serait évidemment intéressante car elle ne nécessiterait qu'une étape.

Cette étude a été réalisée dans un PBR *air-lift* (1L) identique à ceux utilisés pour réaliser les expériences batch précédentes. Il a été exposé à un flux lumineux incident constant $q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, avec une alimentation continue en milieu à un faible taux de dilution ($D = 0.01\text{h}^{-1}$). La stratégie de culture suivie ici est d'alimenter la culture par un milieu de culture «Neo-GVV» contenant tous les éléments nutritifs en quantités suffisantes, sauf pour l'azote dont la concentration est inférieure à celle nécessaire pour assurer une croissance optimale. Il s'agit donc d'une limitation en azote en mode continu, où la faible concentration d'azote utilisée peut permettre de déclencher une accumulation des lipides tout en gardant une bonne croissance des microalgues.

Dans un premier temps, une culture continue de *P. kessleri* UTEX2229 dans des conditions normales de croissance a été réalisée en référence. La quantité d'azote dans le milieu de culture a été ajustée d'une façon à éviter toute limitation minérale ($[\text{N}] = 8\text{mM}$ pour atteindre 1 kg.m^{-3} de biomasse sèche sans limitation). Une fois que le régime stationnaire a été atteint et que la culture est devenue stable, les expériences ont été menées en conditions de limitation azotée où trois concentrations différentes d'azote ont

été testées; à savoir [3.65mM], [2.3mM] et [1mM]. Pour chacune de ces concentrations, la composition biochimique de la culture ainsi que la productivité en biomasse et en lipides (TAG) ont été déterminées à l'état stationnaire. La concentration en azote résiduel dans la culture a été mesurée par chromatographie ionique.

3.4-B. Effets de la concentration d'azote sur l'évolution des pigments et de la biomasse sèche

Dans un premier temps, l'influence de la limitation en azote sur la croissance des cultures continues de la souche a été évaluée. Ainsi, l'évolution temporelle de la concentration des pigments ainsi que celle de la biomasse sèche a été suivie pour les différentes concentrations d'azotes appliquées. La productivité volumique de la biomasse sèche ainsi que la teneur et la composition cellulaire des pigments ont été ensuite déterminées en régime stationnaire pour chaque concentration d'azote testée ici. Les résultats sont présentés dans la Figure IV-18 et le Tableau IV-4.

La Figure IV-18 montre une diminution forte de la concentration en pigments totaux qui coïncide avec la diminution de la concentration d'azote dans le milieu de culture. Ainsi le contenu des pigments totaux déterminé par rapport à la biomasse sèche baisse fortement de 8% dans des conditions optimales de croissance jusqu'à 1 % sous des conditions de limitation en azote pour une concentration $[N]=3.65\text{mM}$ (Tableau IV-4). En baissant la concentration d'azote de 2.3mM à 1mM, une diminution légère de 0.35% jusqu'à 0.27% a été observée. Les résultats présentés dans le Tableau IV-4 montrent que le pourcentage des caroténoïdes par rapport aux pigments totaux s'accroît progressivement avec la baisse de la concentration d'azote dans le milieu. Ces observations s'expliquent par le rôle de la chlorophylle comme réservoir en azote des cellules d'une part, et d'autre part par le rôle protecteur que jouent les pigments secondaires comme les caroténoïdes en réduisant l'excès de la lumière qui frappe le chloroplaste (Hu *et al.*, 2008). Ces observations illustrent un phénomène de photo-adaptation forte aux conditions de culture.

En ce qui concerne la biomasse sèche, la Figure IV-18 montre que celle-ci décroît graduellement avec la réduction de la concentration d'azote dans le milieu. Sous des conditions normales de croissance, la culture atteint son régime permanent en deux semaines avec une concentration moyenne de $2.12 \pm 0.01 \text{ kg.m}^{-3}$ de biomasse sèche, équivalente à une productivité volumique moyenne de $510. \pm 4. \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ (Tableau IV-4). Suite à la baisse de la concentration d'azote jusqu'à 3.65mM, les cellules commencent à perdre leurs pigments et la concentration de la biomasse sèche atteint une

valeur moyenne de $1.85 \pm 0.09 \text{ kg.m}^{-3}$ à l'état stationnaire (Figure IV-18) équivalente à une productivité volumique moyenne de $443 \pm 20. \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$, soit une baisse de 14% de la productivité en biomasse (Tableau IV-4). Il faut noter ici que, suite aux modifications des conditions de culture et avant que la culture n'atteigne son régime permanent pour les nouvelles conditions de limitation en azote pour $[\text{N}]=3.65\text{mM}$, une augmentation nette de la concentration de la biomasse sèche a été détectée pendant les premiers jours de cette période dite transitoire comme le montre la Figure IV-18. On peut supposer ici que cette augmentation est due à la quantité résiduelle d'azote dans le milieu de culture. Il en résulte une bonne croissance expliquée par le taux élevé des pigments pendant cette période avant que ceux-ci ne diminuent. Ensuite en continuant à réduire la concentration d'azote jusqu'à 2.3 et 1mM, des concentrations respectives de 1.58 ± 0.02 et $0.97 \pm 0.04 \text{ kg.m}^{-3}$ ont été atteintes aux régimes permanents, équivalentes à des productivités moyennes respectives de 378 ± 5 et $232 \pm 8. \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$. La plus forte limitation appliquée ici mène donc à une baisse de la productivité en biomasse de 55%.

Il est intéressant de noter que, suite aux changements des conditions de culture, la biomasse sèche se stabilise avant les pigments qui prennent plus de temps pour s'adapter aux nouvelles conditions de culture, pour au final se stabiliser. À titre d'exemple, en passant des conditions de culture normales ($[\text{N}]=16 \text{ mM}$) à celles de limitation en azote pour $[\text{N}]=3.65\text{mM}$, la concentration de la biomasse sèche se stabilise en 10 jours alors que les pigments ont pris environ 20 jours pour se stabiliser (Figure IV-18). Ce résultat met en avant ici la réponse complexe de la culture à la limitation azotée, avec donc une réorganisation du contenu pigmentaire, jouant lui-même sur l'atténuation de la lumière et donc la concentration en biomasse. Cette dernière modifiant en retour l'atténuation de lumière et donc l'adaptation pigmentaire. L'ensemble mène à une mise en équilibre du réacteur relativement complexe mais qui finalement est atteint.

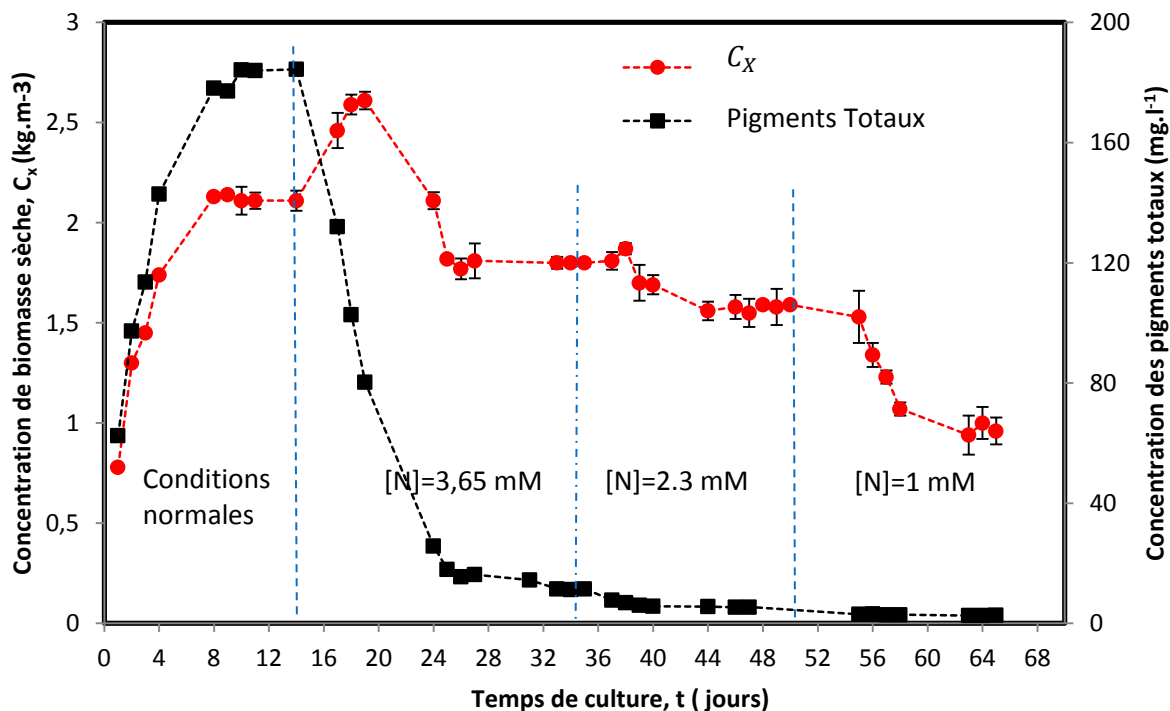


Figure IV-18 Évolution temporelle de la concentration des pigments et de biomasse sèche des cultures continues de *P. kessleri* UTEX2229 limitées en azote

[N] (mM)	16	3,65	2,3	1
P_x (10^{-3} kg.m ⁻³ .j ⁻¹)	510	443	378	232
Intervalle de confiance (%)	0,71	4,88	1,27	3,61
Pigments totaux (% à la biomasse sèche)	8	1	0,35	0,27
% PPC/pigments totaux	16	22-23	26-27	32-33

Tableau IV-4 Détermination de la productivité volumique moyenne de biomasse sèche et la teneur des pigments en régime stationnaire stable atteint pour chaque concentration d'azote examinée

3.4-C. Effets de la concentration d'azote sur la composition biochimique de la cellule

Les résultats obtenus de la composition biochimique en limitation en mode continu sont présentés dans la Figure IV-19. De façon similaire aux cultures batch, suite aux passages des conditions de cultures normales à celles de limitation en azote, une accumulation des sucres et des lipides totaux est détectée. Le contenu des sucres totaux a augmenté de 25% pour les conditions de croissance optimales $[N]=16\text{mM}$ jusqu'à atteindre une valeur maximale de 64% pour $[N]=3.65\text{mM}$. Au-delà de cette concentration, la teneur des sucres diminue légèrement jusqu'à environ 50% pour $[N]=2.3\text{mM}$ et 46% pour $[N]=1\text{mM}$. De même, le contenu des lipides totaux est passé de 11% jusqu'à atteindre une valeur de 21% pour $[N]=3.65\text{mM}$. Ensuite, la concentration des lipides totaux commence à diminuer légèrement pour constituer 19% de la biomasse sèche pour $[N]=2.3\text{mM}$. Donc entre $[N]=3.65\text{mM}$ et $[N]=2.3\text{mM}$, aucune amélioration en termes d'accumulation des lipides totaux n'est détectée, malgré la réduction de la concentration d'azote dans le milieu. Suite à la diminution de la concentration d'azote dans le milieu jusqu'à une valeur $[N]=1\text{mM}$, la teneur en lipides totaux augmente de nouveau pour atteindre une valeur maximale de 27%. Ces résultats, a priori surprenant, pourraient une nouvelle fois être expliqués par l'influence cruciale de la quantité de photons reçue par les cellules sur le métabolisme lipidique.

Enfin, on observe que l'évolution des sucres et des lipides totaux est concomitante à une chute considérable des protéines dont la teneur décroît fortement de 58% pour $[N]=16\text{mM}$ (conditions normales de croissance) jusqu'à 13.5% pour $[N]=3.65\text{mM}$. Ensuite aucun changement significatif n'est détecté avec la réduction de la concentration en azote.

Au final, ces changements physiologiques et métaboliques au niveau des sucres et des protéines se révèlent identiques à ceux observées pour les différentes cultures batch carencées en azote présentées précédemment. Les résultats montrent toutefois des teneurs de lipides plus faibles pour les cultures continues.

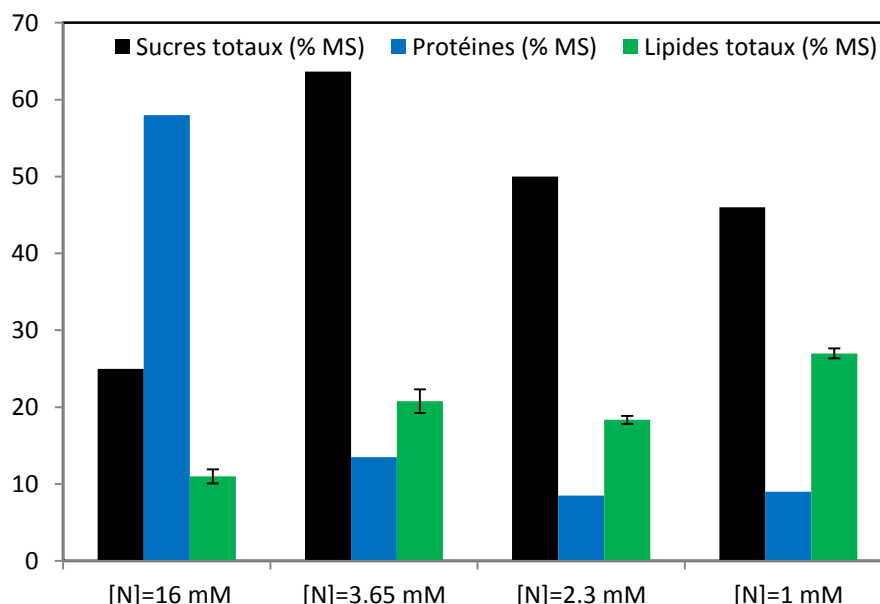


Figure IV-19 Détermination de la composition biochimique des cultures continues de *P. kessleri* UTEX2229 exposée à $q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sous des conditions de croissance optimales et de limitation en azote. A noter que le contenu des différents constituants cellulaires est déterminé en régime stationnaire pour chaque concentration d'azote testée.

3.4-D. Effets de la concentration d'azote sur la productivité en TAG

La Figure IV-20 présente l'évolution de la concentration et de la productivité surfacique en TAG déterminée à l'état stationnaire des cultures continues de *P. kessleri* UTEX2229 en limitation azotée. Comme le montre cette dernière, la baisse de la concentration d'azote de [N]=16mM (conditions normales) à [N]=3.65mM déclenche une accumulation au niveau des triglycérides dont le contenu par rapport à la biomasse sèche a augmenté respectivement de 7 à 20% (voir 3 fois). Ensuite, la teneur des TAG diminue avec la baisse de la quantité d'azote où une concentration de 16% est notée pour [N]=2.3mM. Suite à la diminution de la concentration d'azote dans le milieu de [N]=2.3mM à [N]=1mM, les cellules reprennent leur capacité à accumuler les TAG où la teneur en TAG est augmentée pour atteindre une valeur maximale de 24% (soit une augmentation d'un facteur de 1.5). Ces résultats intéressants permettent de mettre en évidence le rôle d'un paramètre autre que l'azote dans le mécanisme d'accumulation des TAG. Il s'agit du rôle crucial de la

lumière sur le métabolisme lipidique et les voies de biosynthèse des acides gras. Les résultats surprenants obtenus ici, confirment par conséquent la forte relation entre la vitesse d'absorption des photons par les cellules notée $\langle \phi \rangle$ (quantité de photons reçue par les cellules) et l'accumulation des TAG, comme déjà observé par Kandilian *et al.* (2014). En effet, nos résultats montrent qu'en réduisant la concentration d'azote dans le milieu de $[N]=3,65\text{mM}$ à $[N]=2,3\text{mM}$, le contenu pigmentaire par rapport à la biomasse sèche a été diminué de 1% jusqu'à 0.35% (soit une réduction d'un facteur de 3) (Tableau IV-4). À noter que cette diminution de la quantité d'azote ne s'est pas accompagnée par une diminution importante au niveau de la densité cellulaire dans la culture ($C_X \approx \text{constante}$) (Figure IV-18). Il en résulte donc un affaiblissement au niveau de la capacité des cellules à absorber la lumière ($\langle \phi \rangle$ diminue). Par contre, en comparant les conditions où $[N]=2,3\text{mM}$ et $[N]=1\text{mM}$, la densité cellulaire dans la culture a été diminuée de $C_X = 1,6 \text{ kg.m}^{-3}$ jusqu'à $C_X = 1 \text{ kg.m}^{-3}$ (soit une réduction d'un facteur de 1.6), alors que le contenu pigmentaire est demeuré approximativement constant. Cette réduction au niveau de la densité cellulaire a diminué l'atténuation de la lumière dans la culture, ce qui se résulte par une augmentation au niveau de la capacité des cellules à absorber la lumière ($\langle \phi \rangle$ augmente), et les cellules reprennent au final leur activité à synthétiser les acides gras et accumuler les TAG. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'une valeur seuil de vitesse d'absorption de photons $\langle \phi \rangle$ pour la souche *P. kessleri* nécessaire pour induire l'accumulation des TAG. Au-dessous de cette valeur, les voies de biosynthèse des acides gras restent faibles, même en conditions de limitation azotée.

La productivité surfacique des TAG a doublé suite au passage sous des conditions de limitation en azote avec $[N]=3,65 \text{ mM}$. En effet sous des conditions de croissance normales et plus précisément en absence de toute limitation minérale en azote, la culture stable produit continuellement environ $1 \times 10^{-3} \text{ kg}_{\text{TAG}}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}$. Or, en baissant la concentration d'azote jusqu'à $3,65\text{mM}$, la productivité des TAG augmente jusqu'à atteindre une valeur moyenne maximale de $2,6 \times 10^{-3} \text{ kg}_{\text{TAG}}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}$. Il faut souligner que cette productivité est à peu près égale à celle maximale obtenue pour la culture batch sous des conditions de carence soudaine en azote ($C_{X_0} = 0,2 \text{ kg.m}^{-3}$) (Figure IV-10). Si on durcit la limitation azotée, l'effet sur la productivité est négatif. En effet, elle commence à décroître pour arriver à $1,81 \times 10^{-3} \text{ kg}_{\text{TAG}}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ pour $[N]=2,3 \text{ mM}$. Cela s'explique par une faible teneur en TAG. Une nouvelle fois, ceci pourrait s'expliquer par les faibles teneurs cellulaires en pigments et surtout en chlorophylles détectées dans ces conditions (Tableau IV-4). La limitation azotée plus forte réduit également la vitesse de croissance, d'où une concentration en biomasse plus faible. Il en résulte une diminution de l'absorption en photons néfastes à la synthèse de TAG. Ce comportement est en effet en adéquation avec l'étude de Kandilian *et al.* (2014) qui montre qu'une valeur spécifique d'absorption de photons correspond à une vitesse

maximale de synthèse de TAG. Cela illustre le rôle essentiel qu'accomplissent les pigments et la lumière dans le mécanisme cellulaire d'accumulation des lipides et surtout les TAG. La limitation d'azote n'est donc pas le seul paramètre qui affecte la production des TAG par les microalgues.

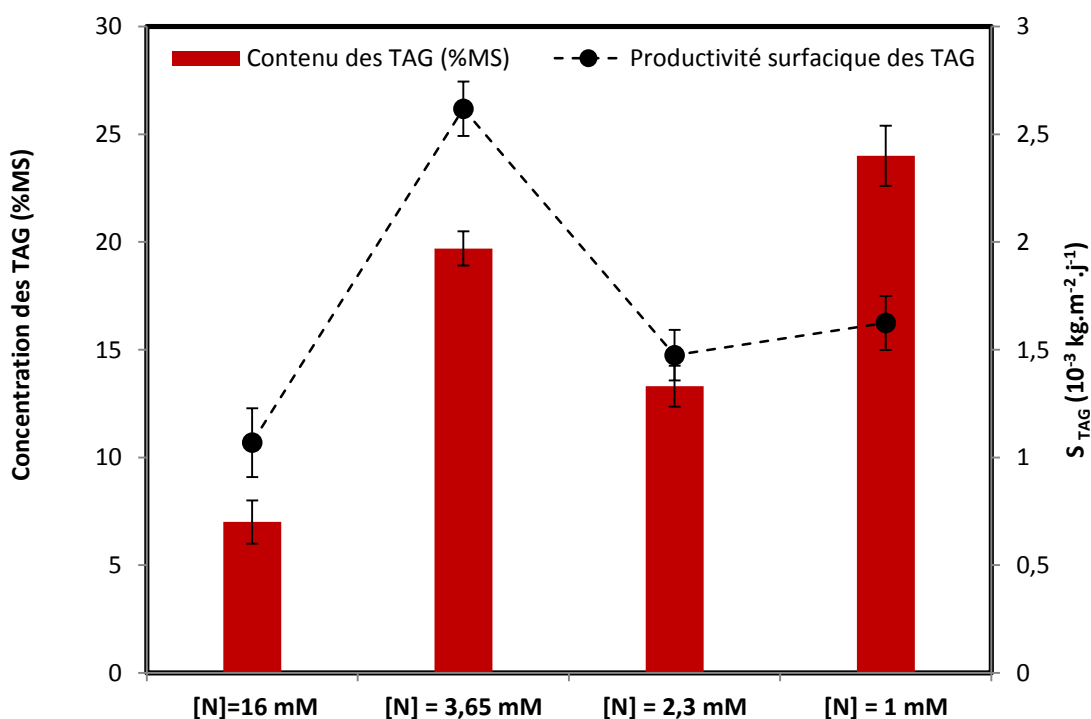


Figure IV-20 Évolution du contenu et de la productivité surfacique des TAG des cultures continues et stables de *P. kessleri* UTEX2229 avec la réduction de la concentration d'azote dans le milieu de culture (limitation en azote)

3.4-E. Conclusion sur la production continue en limitation azotée

Dans cette étude, un procédé de culture continue de *P. kessleri* UTEX2229 a été mis en place. Les résultats expérimentaux obtenus ont démontré qu'une limitation en azote de l'ordre de 3.65mM amène à une productivité surfacique maximale de $2.6 \times 10^{-3} \text{ kg}_{\text{TAG}}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ à peu près égale à la meilleure valeur obtenue pour la culture batch sous des conditions de carence soudaine en azote ($C_{x_0} = 0.2 \text{ kg}.\text{m}^{-3}$). Donc, ces observations expérimentales nous montrent qu'un procédé continu alimenté par un milieu de culture renfermant une quantité limitante d'azote ($[\text{N}] = 3.65\text{mM}$) est pertinent pour une production continue des triglycérides. À noter que la productivité pourrait encore être optimisée. Il faudrait tester d'autres concentrations d'azote, en particulier dans la gamme $[10^{-4} \text{ mM}]$. De plus, les résultats ont montré le rôle a priori crucial de la vitesse d'absorption de photons sur le mécanisme d'accumulation des TAG. Une étude approfondie du transfert radiatif en limitation azotée serait donc intéressante. La limitation azotée permet en effet de moduler la concentration en biomasse et en pigments, ce qui laisse suggérer que des conditions optimales de production peuvent être définies.

4 Conclusion

L'optimisation des conditions de culture pour améliorer simultanément la croissance de la biomasse et la production de lipides et de TAG est un problème contradictoire car les conditions requises pour ces deux fins sont peu conciliables.

La première partie du présent chapitre s'est consacrée à la détermination de la productivité maximale en biomasse de *P. kessleri* UTEX2229 en conditions optimales de croissance. La productivité en biomasse sèche en culture continue a été caractérisée sous différents flux lumineux incidents et pour différents temps de résidence. Une productivité volumique maximale de $0.9 \text{ kg}.\text{m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ équivalente à une productivité surfacique de $27 \text{ g}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ (soit environ $100 \text{ t}.\text{ha}^{-1}.\text{a}^{-1}$) a été obtenue pour un temps de résidence de $\tau = 100 \text{ h}$ pour la culture exposée à $q_0 = 430 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Dans un second temps, l'effet de carence azote a été testé, en batch puis en continu. Ainsi une réponse typique de la cellule à une carence azotée se résume par une accumulation des carbohydrates et des lipides dont la majorité est constituée de TAG (lipides de réserve), au détriment des protéines et des pigments quelle que soit la technique de limitation appliquée. Il faut mentionner ici que dans des conditions de faible concentration d'azote, la souche accumule plus de carbohydrates que

des TAG. Les plus fortes accumulations de lipides (TAG) ne se sont déclenchées qu'en absence totale d'azote.

Cette étude confirme le potentiel de *P. kessleri*. De fortes accumulations en lipides totaux qui constituent jusqu'à 62 % du poids sec de la souche ont été observées en conditions de carence azotée. À noter que la capacité à accumuler des lipides s'est révélée plus importante que celle des souches appartenant à la même espèce et testées par Přibyl *et al.*, (2012) (Tableau IV-5). De plus, des teneurs en TAG très élevées jusqu'à 48% de la biomasse sèche ainsi que des productivités surfaciques importantes de 2.5 à $4.4 \cdot 10^{-3} \text{ kg}_{\text{TAG}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$ équivalents à des rendements importants de 9.125 à $16.06 \text{ t}_{\text{TAG}} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{a}^{-1}$ ont été observées pour les cultures batch carencées en azote. Une productivité maximale similaire de $2.6 \cdot 10^{-3} \text{ kg}_{\text{TAG}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$ a été notée pour la culture continue limitée en azote pour $[\text{N}] = 3.65 \text{ mM}$, montrant l'intérêt de ce protocole. Les différents résultats ont également montré que la vitesse d'absorption des photons (lumière reçue par la cellule) affecte fortement la croissance aussi bien que les voies de biosynthèse des acides gras. Cette vitesse dépend de plusieurs paramètres (conditions d'atténuation de la lumière au sein de la culture, teneur de la cellule en pigments, propriétés optiques de la souche,...). L'azote n'est donc pas le seul paramètre qui affecte le métabolisme lipidique et une carence en azote seule, bien que nécessaire, ne garantit pas une production importante de TAG.

Au final, d'une façon générale, nos résultats ont confirmé l'idée admise qu'une productivité importante en TAG est le résultat d'une bonne croissance de la souche dans les conditions de limitation par la source d'azote menant à l'accumulation de TAG. La souche *Parachlorella kessleri* UTEX2229 s'est révélée intéressante sur ce critère. En comparant cette souche avec *Nannochloropsis occulata* Alphabiotec (la souche de référence du GEPEA pour le programme Shamash, et étudiée par Van Vooren *et al.*, 2012) dans les mêmes conditions de carence azotée et dans les mêmes type de PBR, les résultats obtenus dans cette étude montrent que des productivités en TAG plus importantes ont été observées pour *P. kessleri*, avec une amélioration de 30% sur les productivités en TAG (Tableau IV-5). Cette amélioration s'explique par les valeurs plus élevées de la productivité en biomasse obtenues pour *P. kessleri* (Tableau IV-5) en conditions de carence azotée (amélioration de 35%). Il faut ajouter que cette souche a présenté une fragilité cellulaire plus intéressante et elle s'est révélée également plus robuste et plus facile à cultiver (voir chapitre III). Cette étude démontre donc que *P. kessleri* est un candidat plus compétitif que *N. occulata* Alphabiotec pour l'application industrielle de biodiesel. De plus, dans les conditions de culture appliquées dans cette étude, *P. kessleri* UTEX2229 a montré une capacité d'accumulation de lipides et de TAG supérieure à celle trouvée pour d'autres souches appartenant à la même espèce et testées dans les travaux de Přibyl *et al.*, (2012)

(Tableau IV-5). Cela montre que l'optimisation des conditions de culture est également un facteur important pour optimiser les productivités finales.

Souche cultivée	Mode de culture	Technique de limitation azotée	Contenu maximal lipides totaux (% MS)	Contenu maximal en TAG (% MS)	$S_{TAG_{max}}$ ($10^{-3} \text{kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$)	Productivité en biomasse ($\text{kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$)	Références
<i>P. kessleri</i> UTEX2229	PBR air-lift (1L)	Carence brusque	41.5 ^b _ 65 ^a	38 ^b _ 46 ^a	2.7 ^a _ 4.4 ^b	0.28 ^a _ 0.45 ^b	Présente étude
<i>N. occulata</i> Alphabiottech	PBR air-lift (1L)	Carence brusque	19 ^b _ 50 ^a	14.7 ^b _ 43 ^a	1.4 ^b _ 2.6 ^a	0.18 ^a _ 0.31 ^b	(Van Vooren <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. kessleri</i> UTEX2229	PBR air-lift (1L)	Carence progressive	45 ^c _ 55 ^d	37 ^c _ 48 ^d	2.7 ^c _ 3.7 ^d	0.3 ^{c, d}	Présente étude
<i>N. occulata</i> Alphabiottech	PBR air-lift (1L)	Carence progressive	48 ^d _ 50 ^c	32 ^d _ 42 ^c	2.6 ^d _ 2.9 ^c	0.2 ^d _ 0.24 ^c	(Van Vooren <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. kessleri</i> CCALA 255	Tubes (50ml)	Carence soudaine	51 ^e				(Přibyl <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. kessleri</i> CCALA 251	Tubes (50ml)	Carence soudaine	50.8 ^e				(Přibyl <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. kessleri</i> CCALA 253	Tubes (50ml)	Carence soudaine	40.76 ^e				(Přibyl <i>et al.</i> , 2012)

Tableau IV-5 Bilan de comparaison entre les productivités en TAG et en biomasse de *P. kessleri* UTEX2229 testée ici avec d'autres souches de la même espèce reportées dans la littérature et *N. occulata* Alphabiottech (souche référence du programme Shamash). ^a $C_{X_0} = 0.2 \text{ kg.m}^{-3}$, ^b $C_{X_0} = 0.76 \text{ kg.m}^{-3}$, ^c $q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ^d $q_0 = 160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ^e $q_0 = 500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Chapitre V : Étude de la croissance et de la production de lipides (TAG) de cultures batch de *P. kessleri* UTEX2229 carencées en azote en cycles jour/nuit

Résumé:

Ce dernier chapitre vise à étudier la culture en cycles jour/nuit de *P. kessleri* UTEX2229 en conditions de carence brusque en azote, afin d'évaluer la production de TAG en conditions proches des conditions réelles de production solaire. Ainsi, des cycles jour/nuit (16/8 h) ont été appliqués et l'influence sur la croissance, la composition biochimique de la cellule ainsi que la cinétique d'accumulation et de production de TAG a été étudiée. Les périodes de nuit se sont révélées induire une perte au niveau de la biomasse sèche, de la teneur des carbohydrates et de TAG. Les cinétiques d'évolution de la composition biochimique sont donc au final altérées, avec une accumulation en TAG progressive mais modifiée par rapport aux conditions d'éclairement continu.

1 Introduction

Dans la nature, les microalgues sont soumises aux conditions environnementales variables, avec en particulier des périodes éclairées et d'obscurité (cycles jour/nuit). Ces cycles ont une grande influence sur la physiologie des microalgues. La littérature montre que les cycles jour/nuit affectent fortement la croissance ainsi que la composition intracellulaire des microalgues (Fábregas *et al.*, 2002; Khoeyi *et al.*, 2012; Lacour *et al.*, 2012; Sukenik and Carmeli, 1990; Gris *et al.*, 2014). Les microalgues se comportent différemment durant les périodes d'éclairement et les périodes d'obscurité. En général, les périodes d'illumination se caractérisent par des taux élevés de fixation de CO₂ grâce au phénomène de photosynthèse (Jacob-Lopes *et al.*, 2009), et une accumulation des carbohydrates et de lipides (Fábregas *et al.*, 2002; Sukenik and Carmeli, 1990; et Gris *et al.*, 2014), ce qui engendre des productivités élevées en biomasse. Cependant, la nuit mène à des pertes au niveau de la productivité en biomasse (Le Borgne *et* Pruvost, 2013). Ces pertes sont dus à la respiration où les cellules consomment une partie de leurs constituants organiques et en particulier les constituants énergétiques tels que les carbohydrates et les lipides neutres (TAG), afin de soutenir la croissance (Fábregas *et al.*, 2002; Sukenik *et* Carmeli, 1990). Cela permet notamment la division cellulaire qui survient pendant les premières heures des périodes d'obscurité (Fábregas *et al.*, 2002; Sukenik *et* Carmeli, 1990).

Des études ont regardé plus précisément l'influence des cycles jour/nuit sur l'accumulation des lipides et sur la composition des acides gras (Khoeyi *et al.*, 2012; Fábregas *et al.*, 2002 ; Perez-Pazos *et* Fernandez-Izquierdo, 2011 et Dittamart *et al.*, 2014). Dans les travaux de Perez-Pazos *et* Fernandez-Izquierdo, (2011) et Dittamart *et al.*, (2014), il a été remarqué que la productivité des lipides augmente avec l'augmentation des périodes d'illumination. Cela peut être expliqué par le fait que les lipides sont des molécules très énergétiques, et que leur synthèse a donc besoin de plus de temps que les autres constituants de la cellule (Fábregas *et al.*, 2002). D'autre part, il peut être supposé que les longues durées d'illumination résultent en un déséquilibre du potentiel d'oxydo-réduction, ce qui engendre une accumulation du pouvoir réducteur et donc la synthèse de composants de réserves organiques tels que les carbohydrates et les lipides (Perez-Pazos *et* Fernandez-Izquierdo, 2011). En ce qui concerne les acides gras, des altérations au niveau de leur composition ont été observées en cycles jour/nuit (Fábregas *et al.*, 2002; Khoeyi *et al.*, 2012), avec une prédominance de la synthèse des acides gras saturés pendant les périodes d'illumination (Fábregas *et al.*, 2002).

Au final, pour une production solaire à grande échelle, il ne suffit donc pas de se baser sur des données obtenues sous des conditions de lumière continue, mais il est également nécessaire d'examiner le comportement de la souche sous des conditions se rapprochant

du réel. Il a ainsi été choisi d'étudier la production de TAG en cycles jour/nuit. Concernant la production de TAG sous ces conditions, il est ainsi connu que les microalgues oléagineuses oxydent une partie de leurs réserves en TAG et en carbohydrates pendant la phase d'obscurité pour fournir l'énergie (ATP) nécessaire pour les voies de *novo* de synthèse des molécules dites structurales et la division cellulaire (Fábregas *et al.*, 2002; Lacour *et al.*, 2012). L'objectif a donc été d'étudier plus précisément cela.

La dernière partie de cette thèse s'est donc consacrée à caractériser des cultures batch de *P. kessleri* carencées en azote et cultivées sous des conditions représentatives de conditions solaires rencontrées à Saint-Nazaire (France). Des cycles jour/nuit d'une journée typique annuelle ont été appliqués à la culture. Le profil d'irradiations moyennes pour une journée type annuelle est présenté sur la Figure V-1. La phase d'illumination dure 16 heures et pendant cette période l'intensité lumineuse varie. Elle commence à monter progressivement dès le début de la journée et atteint une valeur maximale de $847 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ après 9.25 heures. Ensuite elle diminue progressivement pour être nulle à la fin de la journée. La durée de la phase d'obscurité est de 8 heures. L'expérience a été effectuée dans un PBR *air-lift* (1L) (identique à ceux utilisés dans le chapitre précédent), contenant un milieu «Neo-GVV» dépourvu d'azote, inoculé par une biomasse issue d'un PBR fonctionnant en continu et en conditions optimales de croissance, fournissant une biomasse de composition biochimique stable et de concentration initiale $C_{X_0} = 0.2 \text{ kg.m}^{-3}$. Cette culture a été exposée pendant une durée de 7 jours de carence en azote aux cycles jour/nuit. L'évolution de la croissance ainsi que les changements au niveau de la composition cellulaire a été suivie au début (1^{er} jour de la carence), au milieu (4^{ème} jour de la carence) et à la fin de l'expérience (7^{ème} jour de la carence). La concentration des différents constituants de la cellule (protéines, sucres totaux, lipides totaux, TAG) a été déterminée en fin de la phase d'éclairement (après une durée de 13.5 h d'exposition à la lumière), le temps estimé suffisant pour la synthèse des différents constituants de la cellule, et à la fin de la phase d'obscurité afin de savoir les altérations métaboliques pendant la nuit. En outre les cinétique de croissance et de production des lipides (TAG) ont été comparées à celles obtenues sous des conditions d'illumination continue, afin d'évaluer l'impact des cycles jour/nuit sur la productivité. Le flux incident appliqué a été retenu pour donner la même valeur moyenne après 24 h ($q_0 = 250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), afin de comparer les résultats à énergie incidente moyenne égale.

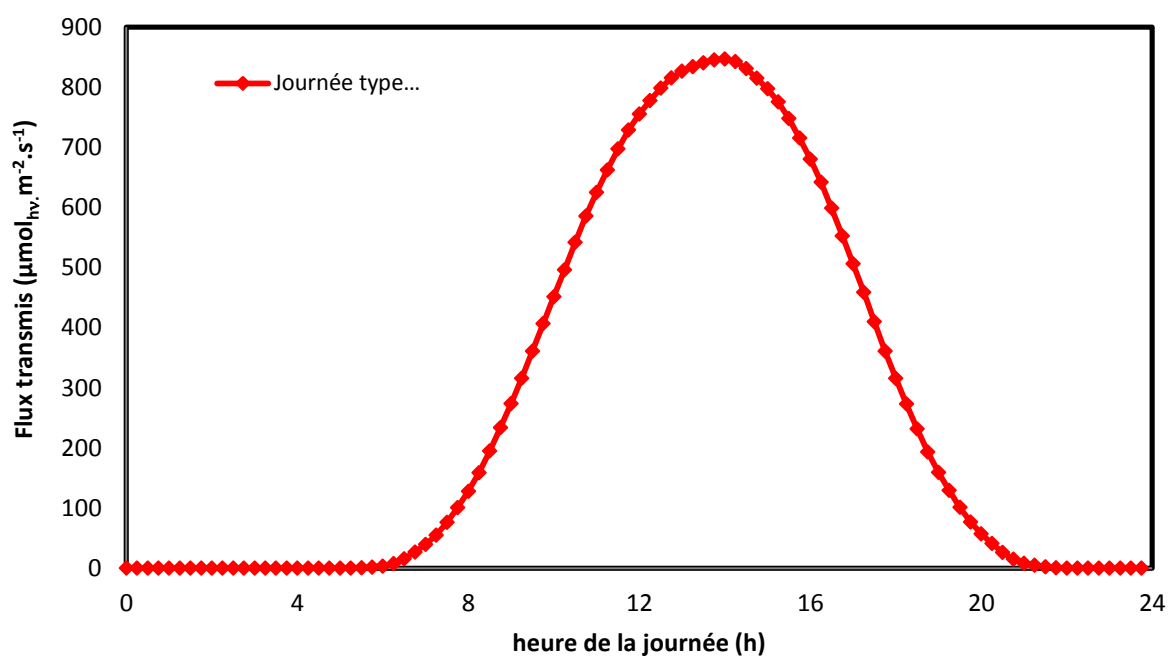


Figure V-1 Profil d'irradiation moyenne pour une journée type annuelle à Saint-Nazaire (déterminé grâce au logiciel «Meteonorm»)

2 Effets des cycles jour/nuit sur l'évolution de la croissance

2.1- Influences sur l'évolution des pigments

La Figure V-2 présente l'évolution de la concentration en pigments de *P. kessleri* UTEX2229 pendant les 7 jours de culture dans un milieu dépourvu d'azote sous des cycles jour/nuit. La concentration des pigments totaux diminuent rapidement de 14.47 mg.L^{-1} au début de l'expérience pour atteindre une valeur de 3.1 mg.L^{-1} à la fin de l'expérience. Comme dans le cas de la culture carencée en azote sous illumination continue, le contenu en pigments chute directement suite à la suspension des cellules dans un milieu dépourvu d'azote. Pendant le 4^{ème} et le 7^{ème} jour de l'expérience, la concentration des pigments totaux a été déterminée en fin de phase d'éclairement et en fin de la période d'obscurité, dans le but d'étudier une éventuelle variation pendant la nuit. Comme le montre la figure V.2, les résultats obtenus ne révèlent pas de diminution significative. La phase d'obscurité n'affecte donc pas fortement les pigments. Dans la mesure où les pigments n'accomplissent aucun rôle pendant la nuit, ce résultat semble logique.

En comparant la cinétique de diminution des pigments totaux dans les deux conditions d'éclairage (lumière continue et cycles jour/nuit), une différence nette est mise en évidence comme le montre la Figure V-3. Le taux de dégradation des pigments au cours de la culture est plus faible dans les conditions où la culture est soumise à des cycles jour/nuit. En effet, sous une lumière continue, la teneur des pigments totaux a diminué de 14.47 mg.L^{-1} au début de l'expérience pour arriver à une concentration de 1.29 mg.L^{-1} à la fin de l'expérience, soit une perte de 91% des pigments totaux au bout d'une semaine de carence. Cette perte est réduite à 75% lorsque la culture est soumise à des cycles jour/nuit avec une baisse de 14.47 mg.L^{-1} au début de l'expérience jusqu'à 3.6 mg.L^{-1} à la fin de la culture a été signalée. Ces résultats laissent à penser que la réduction de la période d'illumination de 24h à 16h, mène à un taux de dégradation plus faible des pigments, et ce malgré le fait que la quantité de lumière reçue en 24 h soit identique.

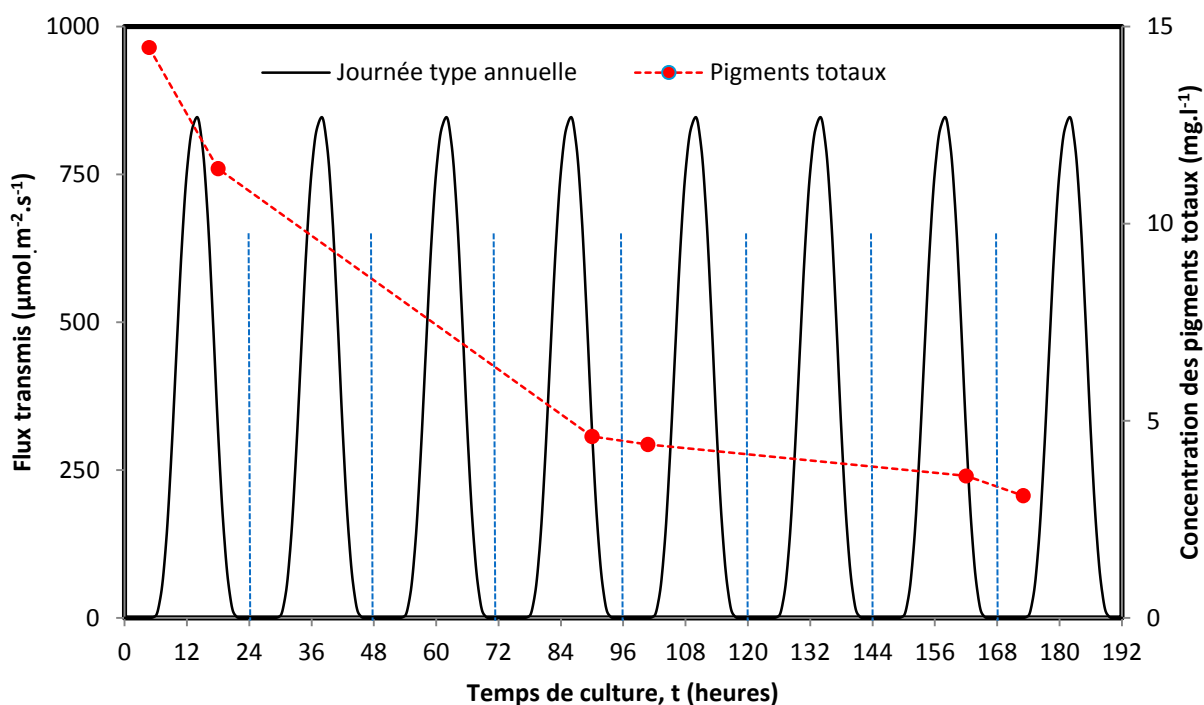


Figure V-2 Évolution temporelle de la concentration des pigments totaux de la culture *batch* de *P. kessleri* UTEX2229 carencée en azote sous des cycles jour/nuit (16:8 h)

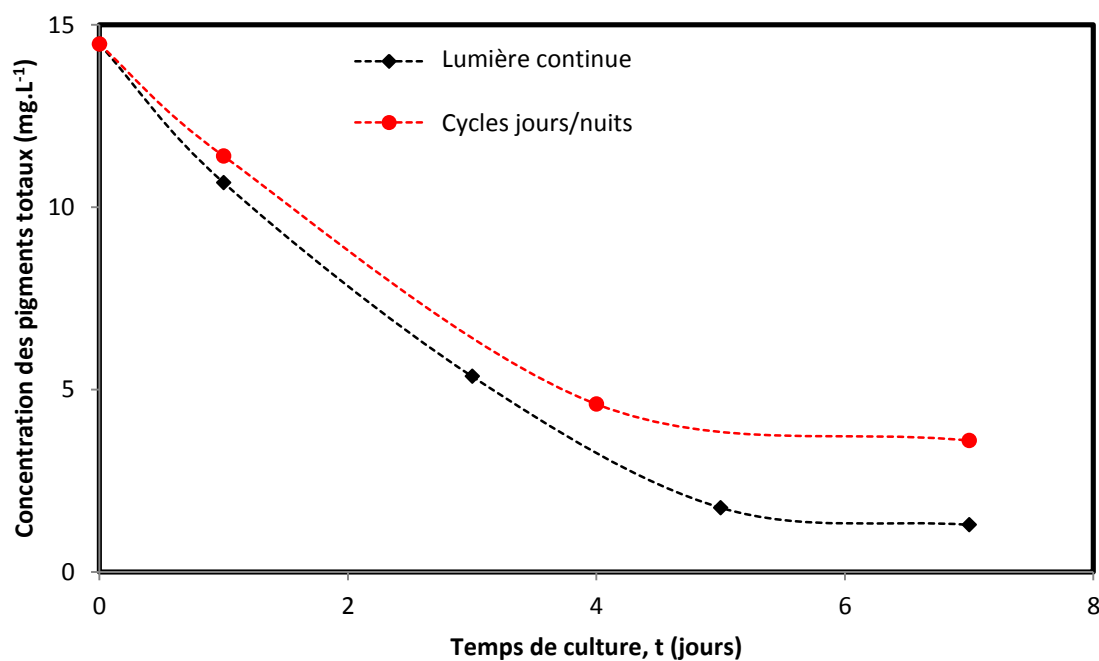


Figure V-3 Comparaison de l'évolution des pigments totaux de la culture carencée en azote de *P. kessleri* UTEX2229 sous des conditions d'illumination continue et sous des cycles jour/nuit (16:8 h)

2.2- Influence sur l'évolution de la concentration et de la productivité de biomasse sèche

Les Figure V-4 et Figure V-5 montrent l'évolution de la concentration de biomasse sèche et du nombre de cellules de *P. kessleri* UTEX2229 en cycles jour/nuit et sous carence azotée. Une augmentation progressive de la concentration en biomasse est globalement obtenue, avec cependant une dynamique spécifique imposée par la succession de périodes éclairées et d'obscurité. Les résultats révèlent que le premier jour de la carence, la concentration de la culture en biomasse sèche mesurée en fin de la phase d'illumination était de 0.68 kg.m^{-3} , et qu'elle a baissé pour atteindre une valeur de 0.58 en fin de phase sombre. De même, vers la fin de la phase d'illumination du 4^{ème} et 7^{ème} jour de la culture, les concentrations de biomasse sèche ont été respectivement de 1.04 et 1.32 kg.m^{-3} . Or, à la fin de la phase d'obscurité, ces dernières ont diminué pour atteindre des valeurs respectives de 0.96 et 1.28 kg.m^{-3} . Ces observations confirment une perte au niveau de la biomasse sèche pendant la nuit de 15 %, 8 % et 4% le 1^{er}, le 4^{ème} et le 7^{ème} jour de la carence respectivement. Cette perte est due au processus de respiration cellulaire pendant la phase d'obscurité. Ces résultats obtenus sont en accord avec les observations de la diminution au niveau de la biomasse pendant les périodes obscures dans les travaux de Le Borgne *et* Pruvost, (2013). On observe néanmoins qu'au fur et à mesure de l'avancement de la carence, la perte en biomasse pendant la nuit diminue jusqu'à devenir très faible à la fin de culture (4% de perte).

Il faut noter également que la perte signalée au niveau de la biomasse sèche pendant la phase obscure n'est pas corrélée avec une perte au niveau de la concentration cellulaire. Les résultats présentés dans la Figure V-5 montrent un accroissement au niveau de la concentration cellulaire de la culture pendant la période d'obscurité le 1^{er} et le 7^{ème} jour de la carence, où la concentration cellulaire a augmenté respectivement de 1.6×10^{-7} à 1.72×10^{-7} cellules/ml (soit une augmentation de 7%) et de 4×10^{-7} à 4.12×10^{-7} cellules/ml (soit une augmentation de 3%). Cette augmentation légère observée au niveau de la concentration cellulaire pendant la nuit diffère des travaux de Fábregas *et al.*, (2002) et Sukenik and Carmeli, (1990), obtenus en conditions optimales de croissance. Ces derniers ont rapporté que la division cellulaire survient pendant les premières heures de la nuit, ce qui résulte en une augmentation importante du nombre des cellules accompagnée d'une réduction au niveau de leur volume cellulaire. Dans cette étude, l'augmentation faible observée au niveau de la concentration cellulaire pendant la nuit pourrait être expliquée par la carence azotée qui ralentit la division cellulaire.

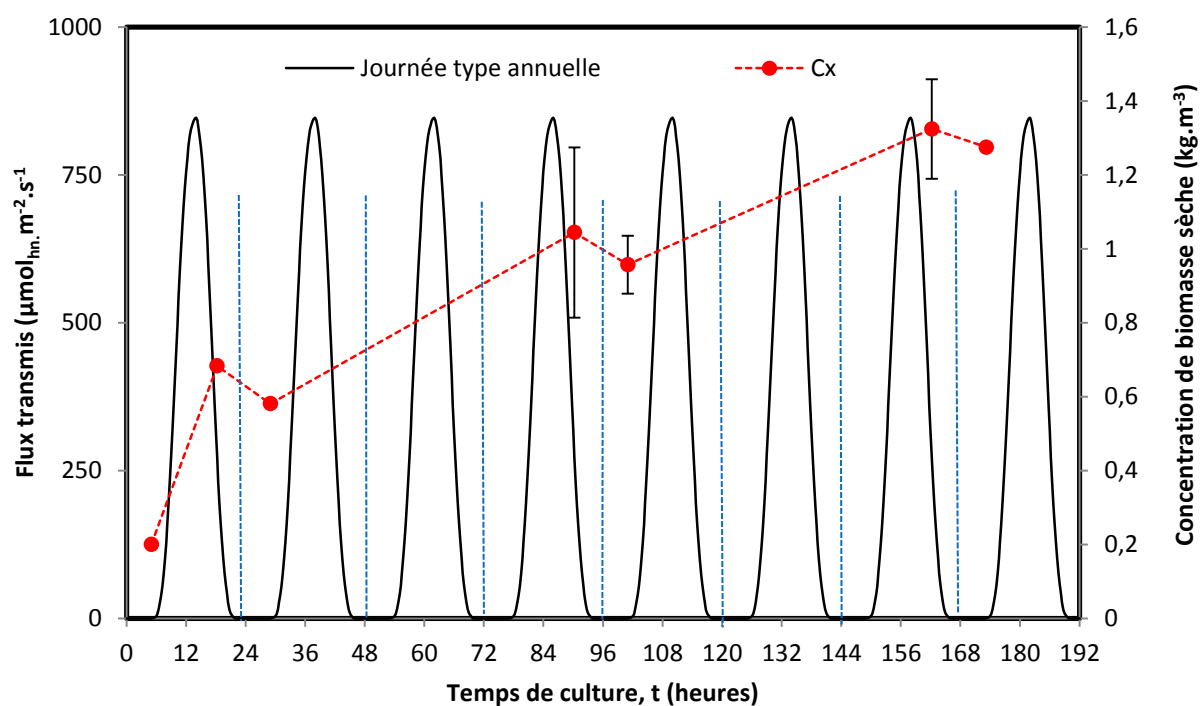


Figure V-4 Évolution temporelle de la concentration de biomasse sèche de la culture *batch* de *P. kessleri* UTEX2229 carencée en azote sous des cycles jour/nuit (16:8 h)

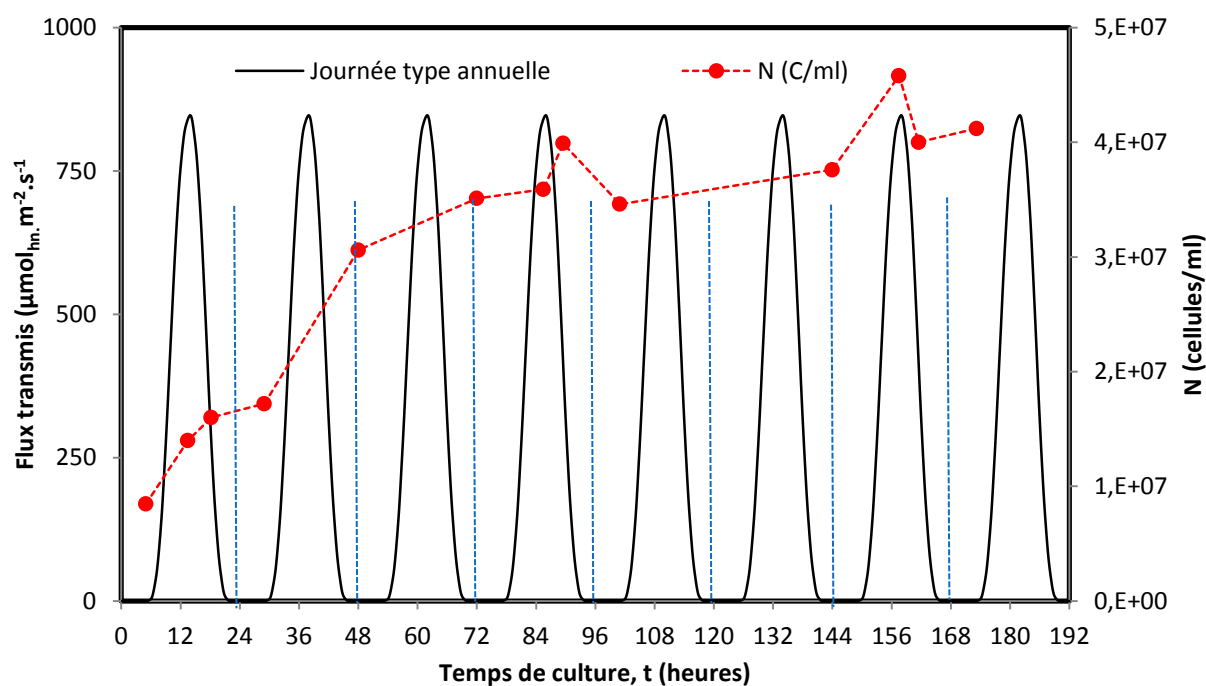


Figure V-5 Évolution temporelle de la concentration cellulaire de la culture *batch* de *P. kessleri* UTEX2229 carencée en azote sous des cycles jour/nuit (16:8 h)

La cinétique de production de la biomasse sèche sous cycles jour/nuit a été comparée avec celle sous conditions d'illumination continue. Les résultats sont présentés dans la Figure V-6. Sous une illumination continue, la concentration de la biomasse sèche a augmenté fortement les 3 premiers jours de la culture avec une augmentation de 0.2 à 0.98 kg.m⁻³. Ensuite, la cinétique de croissance s'est révélée moins importante. Pour la culture soumise à des cycles jour/nuit, une cinétique de croissance similaire a été notée. En effet dans ces conditions, la concentration de la biomasse sèche a augmenté de 0.2 kg.m⁻³ tout au début de l'expérience jusqu'à atteindre une valeur de 1.32 kg.m⁻³ à la fin de la culture, soit une augmentation d'un facteur 6 sur une semaine. Une productivité volumique moyenne de $160 \pm 39 \times 10^{-3}$ kg m⁻³ de biomasse sèche par jour équivalente à un rendement surfacique de $4.82 \pm 0.12 \times 10^{-3}$ kg.m⁻².j⁻¹ est ainsi obtenue. Concernant la culture exposée à une illumination continue, une productivité volumique moyenne de $181 \pm 16 \times 10^{-3}$ kg m⁻³ de biomasse sèche par jour équivalente à une productivité surfacique de $5.44 \pm 0.49 \times 10^{-3}$ kg.m⁻².j⁻¹ a été obtenue sur la même durée (7jours).

En tenant en considération les incertitudes liées à la mesure, ces résultats ne révèlent pas une grande différence au niveau de la cinétique de croissance. Une perte de biomasse est observée pendant la phase d'obscurité, mais celle-ci n'a au final qu'un effet limité sur la productivité obtenue.

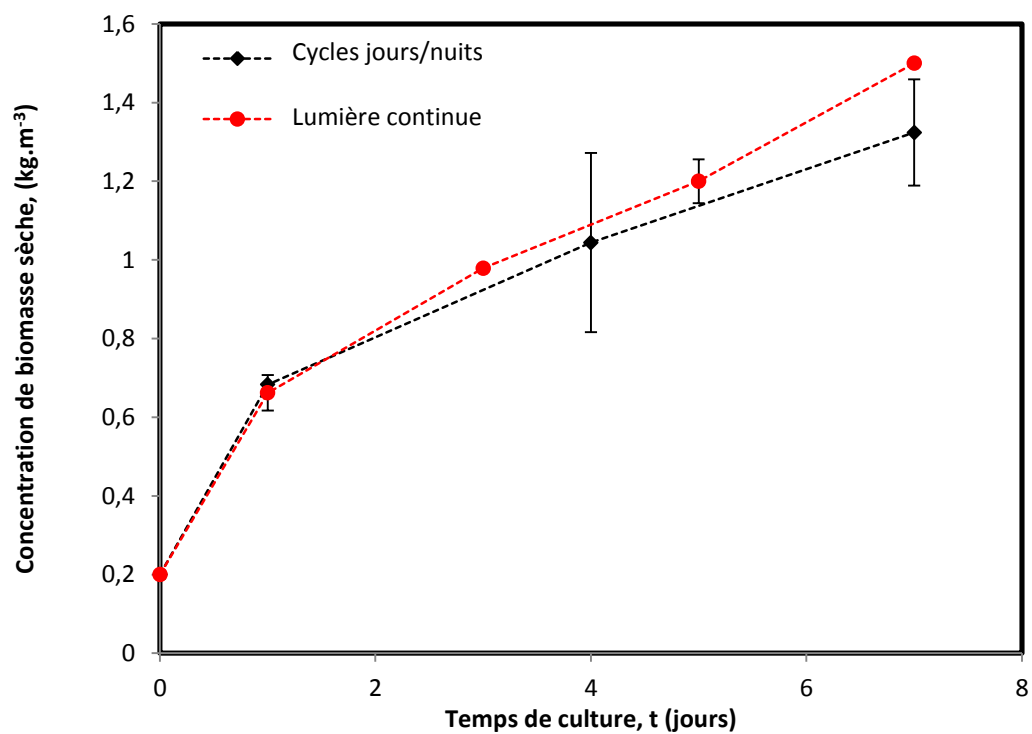


Figure V-6 Comparaison de l'évolution de la concentration de biomasse sèche de la culture carencée en azote de *P. kessleri* UTEX2229 sous des conditions d'illumination continue et sous des cycles jour/nuit (16:8 h)

3 Effets des cycles jour/nuit sur la composition biochimique

Les résultats obtenus dans la Figure V-7 montrent que la synthèse des sucres totaux et des lipides est activée fortement pendant les 4 jours qui suivent la mise en suspension des cellules dans un milieu dépourvu d'azote. Ensuite leur teneur demeure approximativement constante jusqu'à la fin de la culture (Figure V-7, A et C). Les protéines quant à elles n'ont pas bougé significativement (Figure V-7, B). On retrouve donc une réponse typique d'une culture sous carence azotée comme déjà observé dans le chapitre IV (Chapitre IV3.2-B), avec cependant un effet des cycles jour/nuit qui altère la dynamique d'évolution des pools intracellulaires. À la fin de la phase d'obscurité, la teneur de la culture en sucres totaux et en triglycérides est plus faible par rapport à celle déterminée vers la fin de la phase de lumière. La quantité des lipides totaux augmente légèrement alors que celle des protéines ne change pas significativement. A titre d'exemple, pendant le 1^{er}, le 4^{ème} et le 7^{ème} jour de la carence, une diminution respective de 0.065, 0.26 et 0.463 kg.m⁻³ vers la fin de la phase de lumière jusqu'à 0.048, 0.197 et 0.383 kg.m⁻³ à la fin de la phase d'obscurité a été détectée au niveau de la teneur de la culture en TAG. Cette observation permet de suggérer que pendant la phase d'obscurité, les cellules ont consommé respectivement 26%, 24 % et 17,5 % de la quantité des TAG qu'elles ont accumulée pendant la période de jour pour le 1^{er}, le 4^{ème} et le 7^{ème} jour de la culture. On observe de façon intéressante que la perte des TAG pendant la phase obscure est également accompagnée par une augmentation légère de la concentration en lipides totaux au début et à la fin de la culture. Le 4^{ème} jour de la carence, cette augmentation a été plus importante (Figure V-7, C).

En ce qui concerne les sucres totaux, une diminution nette au niveau de leur concentration a été détectée à la fin de la phase d'obscurité. En effet, pendant le 4^{ème} jour de la carence, la quantité des sucres totaux a baissé de 0.57 Kg.m⁻³ vers la fin de la phase éclairée à 0.42 kg.m⁻³ à la fin de la phase obscure. De même, une diminution de 0.62 jusqu'à 0.52 kg.m⁻³ a été observé le 7^{ème} jour de la carence comme ceci est illustré dans la Figure V-7, A. Donc, pendant la phase d'obscurité, les cellules consomment aussi une partie de leurs réserves en carbohydrates (26% le 4^{ème} jour de la carence et 16 % le 7^{ème} jour).

Afin de mieux appréhender le comportement et le métabolisme cellulaire de *P. kessleri* pendant la nuit, la teneur cellulaire de différents constituants (sucres totaux, protéines, lipides totaux et TAG) a été déterminée en fin de phase d'éclairement et en fin de période obscure. Les résultats sont présentés dans la Figure V-8. Comme le montre cette figure, les photopériodes appliquées ont fortement altéré les pools intracellulaires et en particulier les sucres totaux et les TAG dont la teneur intracellulaire a diminué respectivement de 15.7 à 12.1 et de 7.2 à 5.7 pg/cellule le 4^{ème} jour de la carence (avec une consommation respective de 23% et de 21% des sucres et de TAG accumulés pendant la période

d'éclairement. Ce même comportement a été observé le 7^{ème} jour de la carence où le contenu intracellulaire des sucres totaux a diminué de 15.4 à 12.5 pg/cellule (soit une consommation de 19%), et celui de TAG de 11.6 à 9.3 pg/cellule (soit une consommation de 19%). Il a été ainsi remarqué que la souche n'a pas montré une consommation préférentielle de ses réserves pour maintenir sa croissance en absence de la lumière. En ce qui concerne les protéines, leur teneur intracellulaire est peu affectée et altérée par les cycles jour/nuit.

En résumé, ces résultats permettent de montrer que, dans des conditions de carence brusque en azote et sous des régimes lumière/obscurité comme celles appliquées ici, la souche *P. kessleri* UTEX2229 accumulent fortement les triglycérides et les carbohydrates pendant la période de lumière. Ces derniers constituent les majeures réserves de carbone et d'énergie lors de période de nuit où l'activité photosynthétique est absente. Les cellules en consomment alors une partie pour permettre notamment leur division cellulaire en absence de lumière. Contrairement aux autres souches reportées dans la littérature, *P. kessleri* n'a pas montré une consommation préférentielle des composés énergétiques pendant la nuit. Elle a consommé autant les sucres totaux que les TAG. Même si cela nécessiterait d'être approfondi, les résultats obtenus ici permettent de suggérer que la cellule oxyde une partie de ses carbohydrates pour générer de l'énergie pour accomplir sa division cellulaire, la synthèse des constituants de la cellule et assure la maintenance cellulaire. Concernant les TAG, il est possible de suggérer qu'une partie de la teneur accumulée pendant le jour est remodelée en lipides polaires structuraux. En effet, nos résultats ont montré une augmentation des lipides structuraux pendant la nuit. Il est à noter cependant que d'autres souches comme *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 ont montré une consommation préférentielle des lipides pendant les phases obscures (Fábregas *et al.*, 2002). La réponse des microalgues aux régimes de photopériodes semble donc souche-dépendant.

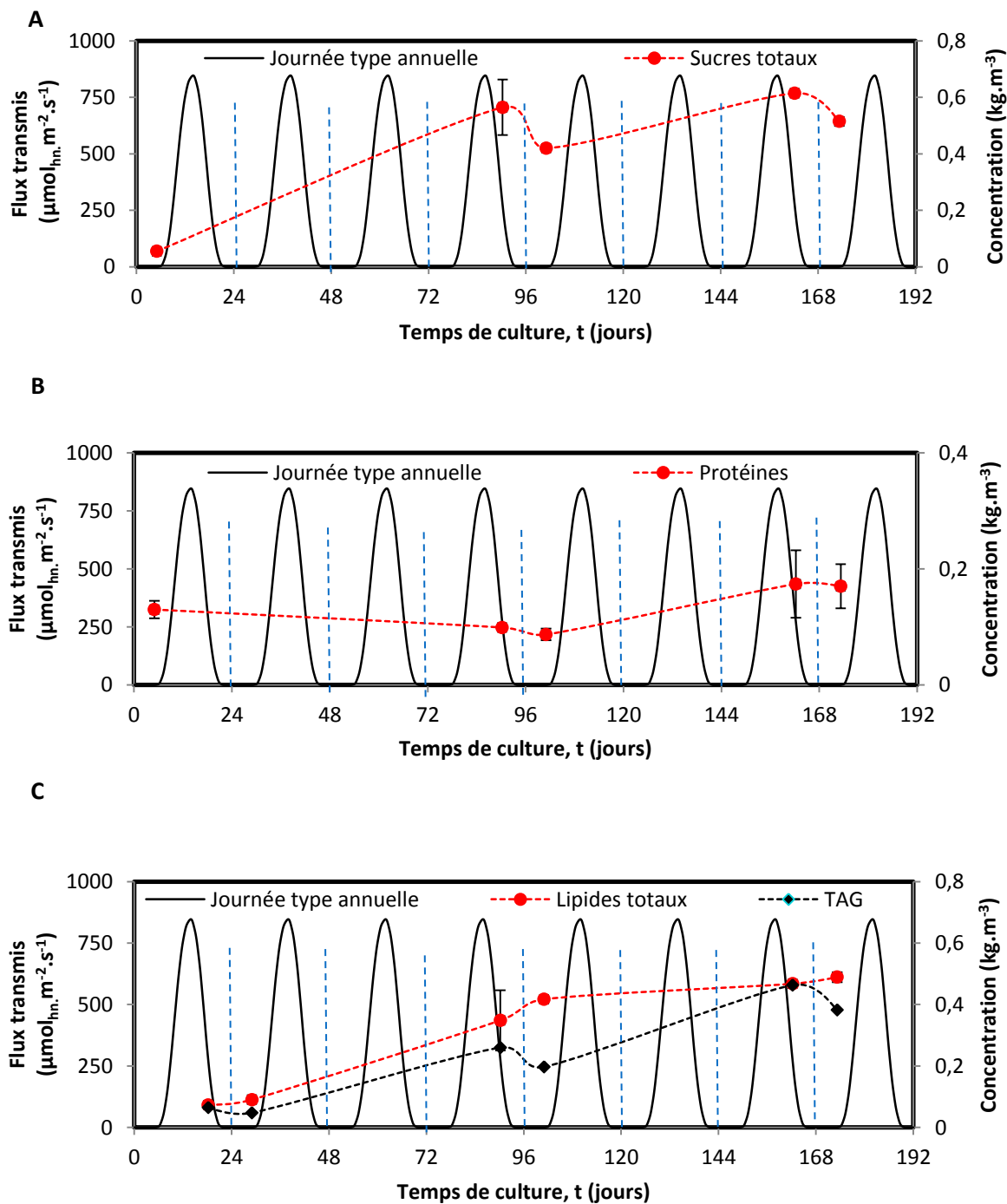


Figure V-7 Evolution temporelle de la concentration des protéines, des carbohydrates et des lipides totaux de la culture batch de *P. kessleri* UTEX2229 carencée en azote sous des cycles jours/nuits (16:8 h)

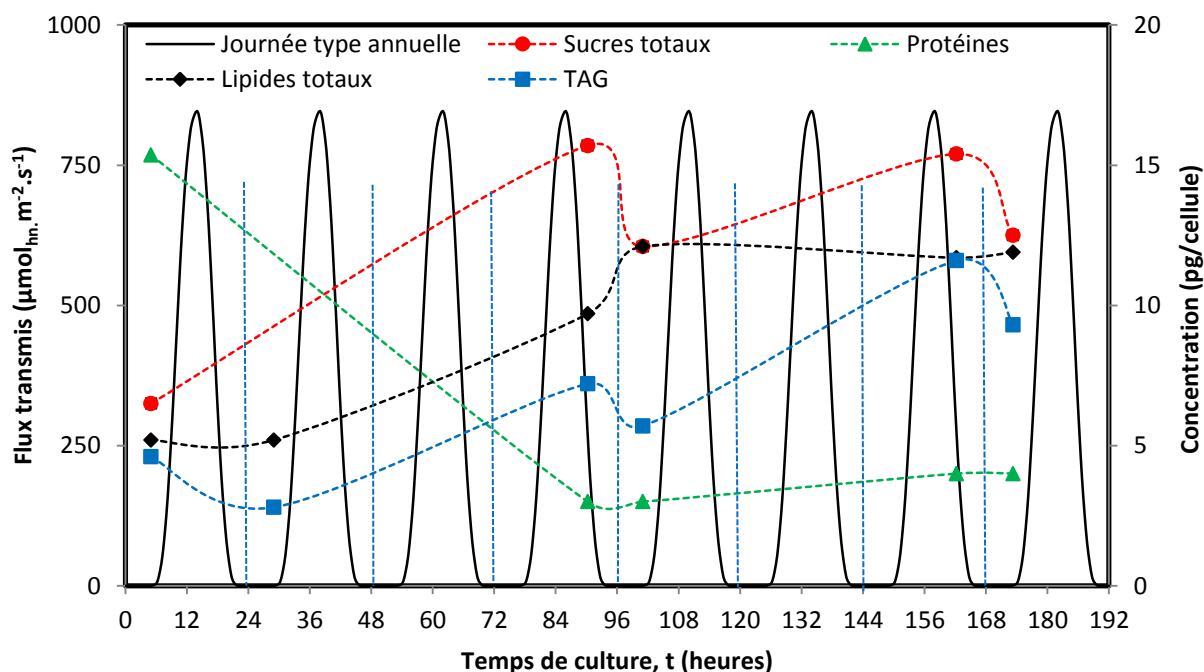


Figure V-8 Évolution dynamique des constituants cellulaires en cycles jour/nuit d'une culture batch de *P. kessleri* carencée en azote

4 Effets des cycles jour/nuit sur la cinétique d'accumulation et de production de TAG

Dans le paragraphe précédent, les résultats obtenus ont montré que sous cycles jour/nuit, la souche cultivée dans des conditions de carence brusque en azote consomme pendant la nuit 20 à 26 % des triglycérides qu'elle accumule pendant la période d'exposition à la lumière. Il en résulte une perte au niveau de la productivité des TAG pendant la nuit, ce qui pourrait affecter négativement le processus global de production. Néanmoins, les résultats ont aussi clairement démontré que suite à la réexposition de la culture à la lumière, la souche reprend sa capacité à synthétiser les TAG. Cela peut donc compenser la perte survenue pendant l'obscurité. Il est donc difficile au final de déduire l'impact réel sur la productivité globale.

Comme le montre la Figure V-9, la cinétique d'accumulation de TAG est différente. Le pourcentage de TAG par rapport à la matière sèche a augmenté fortement de 5.2% à 35 % pendant une semaine pour la culture soumise à des cycles jour/nuit, et de 6.2% à 41 % pendant la même durée pour la culture éclairée par une lumière continue (Figure V-9, A). La capacité des cellules à accumuler les TAG s'est révélée plus importante dans le cas d'un

éclairage continu. Cela pourrait être expliqué par une durée d'illumination plus longue dans le cas de l'illumination continue, ce qui serait en accord avec ce qui est cité dans la littérature (Perez-Pazos *et* Fernandez-Izquierdo, 2011).

En ce qui concerne l'évolution de la productivité surfacique de TAG en fonction du temps de culture, les résultats obtenus soulignent aussi une différence significative entre les deux expériences (Figure V-9, B). En effet, pour la culture soumise à des cycles jour/nuit, la productivité surfacique de TAG a augmenté fortement pendant les 24 heures qui suivent la mise en suspension des cellules dans le milieu dépourvu d'azote, où un accroissement de 0.31×10^{-3} à $1.64 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ a été observé. Ensuite, les cellules continuent à produire de TAG mais avec une vitesse de production plus faible. Une productivité maximale de $1.9 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ est atteinte vers le 4^{ème} jour de l'expérience, puis la productivité de TAG demeure constante jusqu'à la fin de la culture. De même, pour la culture carencée exposée à une illumination continue, la productivité surfacique en TAG a augmenté de 0.37×10^{-3} au début de l'expérience jusqu'à atteindre une valeur maximale de $2.7 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ le 4^{ème} jour de l'expérience. Au-delà de cette période, la souche continue à produire les TAG mais avec des vitesses constantes.

Même si les tendances sont similaires, en comparant les deux expériences, une réduction de 26% est observée au niveau de la productivité maximale en TAG en cycles jour/nuit. Ceci est expliqué principalement par la capacité d'accumulation de TAG plus faible en cycles jour/nuit. La succession de phases de synthèse et de remobilisation des TAG a donc globalement un rôle négatif sur la productivité en TAG. Il est utile de rappeler ici que peu d'effet a été observé sur la productivité en biomasse.

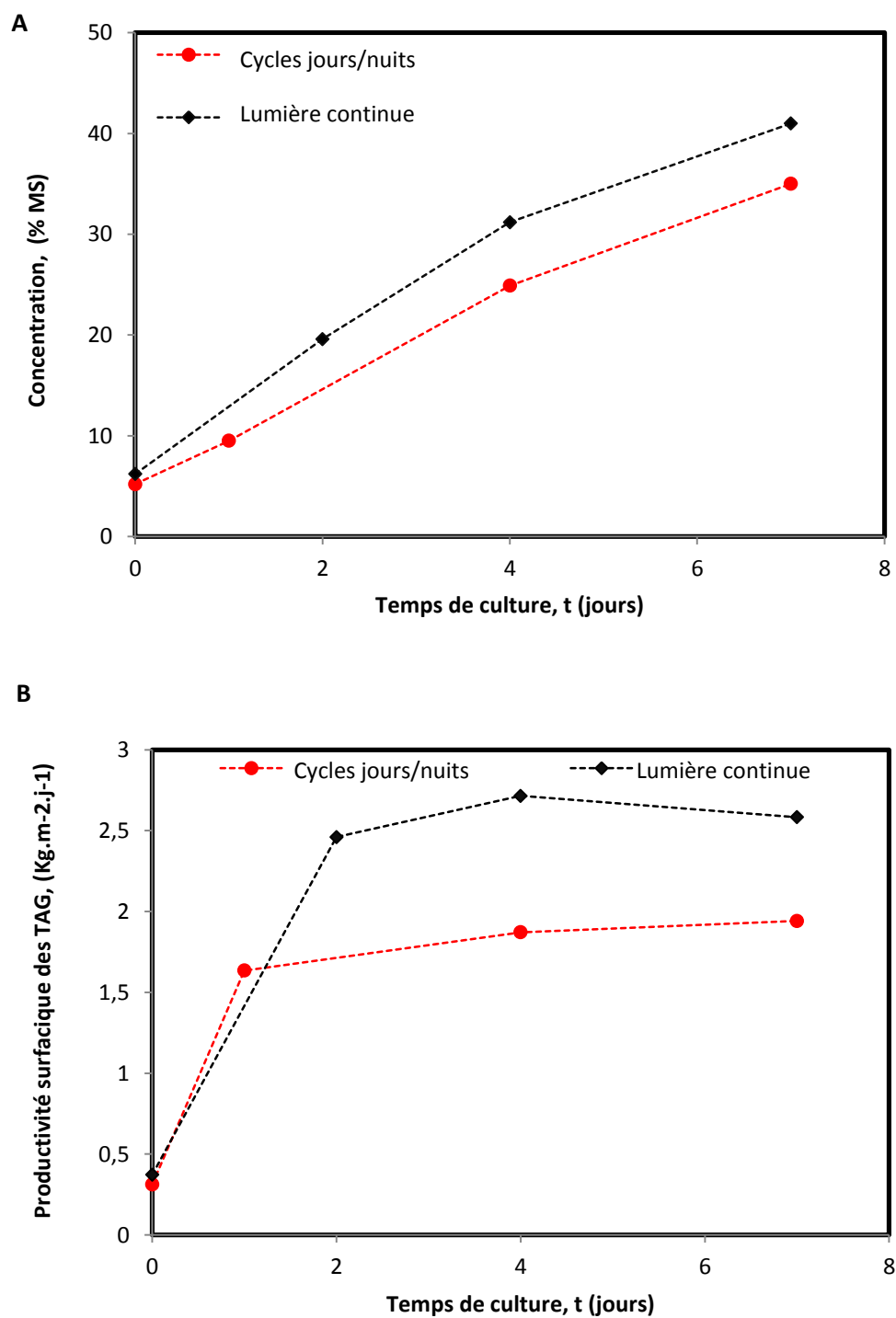


Figure V-9 Comparaison de la cinétique d'accumulation (A) et de production des TAG (B) de la culture carencée en azote de *P. kessleri* UTEX2229 sous des conditions d'illumination continue et sous des cycles jour/nuit (16:8 h)

5 Conclusion

Dans ce chapitre, l'influence de la carence brusque en azote couplée à des cycles jour/nuit a été étudiée sur la microalgue d'eau douce *P. kessleri* UTEX2229. Une attention particulière a été accordée aux changements métaboliques subit pendant la phase d'obscurité, et à la cinétique de production de TAG en vue de chercher à mieux appréhender le comportement de la souche pendant la nuit et d'évaluer son rendement de production de TAG sous ces conditions dites réelles de production.

Les résultats obtenus ont montré que les carbohydrates et les triglycérides en tant que réserves énergétiques majeures, ont une évolution très influencée par les cycles jour/nuit. Ces deux constituants hautement dynamiques sont accumulés par la souche en présence de la lumière et sont consommés pendant la nuit grâce au processus de respiration. Pourtant, leur taux de consommation diminue au fur et à mesure de la culture ce qui signifie que l'activité cellulaire s'affaiblit avec le temps de carence. Il faut noter que la souche n'a pas montré une préférence de consommation entre TAG et carbohydrates. Elle a consommé autant de TAG que des carbohydrates pendant la nuit pour soutenir sa croissance. D'ailleurs, les résultats des lipides totaux ont conduit à suggérer que pendant la nuit, les TAG pourraient être en partie remodelées en lipides polaires dits de structure (glycolipides et phospholipides). Ceux-ci augmentent en effet légèrement pendant la nuit.

En comparant les résultats à ceux obtenus en lumière continue, un taux de dégradation des pigments plus faible a été observé pour la culture soumise aux cycles. Ceci résulte par une cinétique de croissance similaire à celle obtenue en conditions de lumière continue. En ce qui concerne les TAG, une capacité d'accumulation plus faible a été trouvée en cycles jour/nuit. Il en résulte une productivité surfacique en TAG réduite de 26% à celle obtenue en lumière continue (même flux incident moyen). Les phases successives de synthèse et de remobilisation de TAG ont donc un effet non négligeable sur la productivité. Néanmoins, malgré cela, les productivités en TAG, bien que réduites, restent tout à fait acceptables pour une application solaire réelle.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le travail présenté dans ce mémoire a porté d'une part sur le développement d'une procédure robuste de criblage des souches de microalgues pour la production de biodiesel, et d'autre part sur l'optimisation des conditions de culture de la meilleure souche identifiée dans cette étude en photobioréacteurs sous différentes conditions de limitation azotée (batch, continu) et d'éclairage (lumière continue et cycles jour/nuit). L'objectif principal et commun de toutes les études expérimentales ainsi effectuées a été d'évaluer et étudier le rendement de production en TAG d'une souche d'intérêt industriel pour la production de biodiesel.

La méthodologie originale et spécifique de criblage des souches de microalgues a reposé sur des bancs de criblages spécifiques nommés «EOSS-PBR» qui ont été développés. 15 souches d'intérêt ont alors été criblées sur des critères jugés pertinents de l'application industrielle finale. Les résultats obtenus ont souligné une grande différence au niveau du comportement des souches au sein du même genre et même au sein de la même espèce en termes de croissance, de métabolisme lipidique (réponse aux conditions spécifiques de carence brusque en azote) et de fragilité cellulaire. Ces observations ont révélé la grande biodiversité des microalgues et mis en avant par conséquent le défi de trouver la souche idéale, surtout lorsque l'application envisagée implique beaucoup de critères spécifiques comme dans le cas du biodiesel. Cet écart observé entre les souches au regard de chaque critère de criblage, renforce de plus l'idée qu'il est difficile de choisir une souche en se basant sur les données de la littérature scientifique, cela confirme le besoin d'une méthodologie de criblage robuste comme celle développée dans ce travail, qui prend en considération des critères allant de la production de quantités importantes de biomasse riche en TAG appropriés, jusqu'à leur récupération pour les convertir en biocarburant de bonne qualité.

Cette procédure a conduit à identifier deux souches, à savoir *Parachlorella kessleri* UTEX2229 comme souche d'eau douce et *Nannochloropsis gaditana* CCMP527 comme souche marine. Le meilleur candidat pour l'application envisagée s'est révélée être la souche *Parachlorella kessleri* UTEX2229. Cette souche a montré une capacité intéressante à accumuler les TAG (jusqu'à 40.8 % de leur poids sec), mais surtout une forte capacité à maintenir sa croissance photosynthétique dans des conditions de carence ou limitation azotée, ce qui s'est traduit au final par une productivité intéressante en TAG ($S_{TAG_{max}} =$

$2.7 \times 10^{-3} \text{ kg.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$), et la fragilité cellulaire s'est également révélée très encourageante dans les conditions qui induisent l'accumulation des TAG (-N).

À la suite de l'identification du meilleur candidat, les études expérimentales se sont focalisées sur l'optimisation des conditions de culture en PBR pour améliorer la productivité en biomasse et en TAG. Dans un premier temps, les conditions optimales de la croissance de *P. kessleri* UTEX2229 ont été recherchées. Ainsi la productivité de biomasse sèche des cultures continues a été caractérisée sous différentes intensités lumineuses et pour différents temps de résidence. Une productivité volumique maximale d'environ $1 \text{ kg.m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ a été obtenue pour un temps de résidence de $\tau = 33 \text{ h}$ pour la culture exposée à $q_0 = 430 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. D'autre part, différentes techniques et plusieurs protocoles de limitation en azote ont été appliqués à des cultures batch et continu en vue de chercher les conditions optimales pour la production de TAG.

Tous les résultats expérimentaux obtenus prouvent clairement que le mode de culture ainsi que la limitation en azote affectent considérablement la physiologie cellulaire et par conséquent la composition biochimique de la culture. Ainsi une réponse typique de la cellule à une carence azotée se résume par une accumulation des carbohydrates et des lipides dont la majorité sont des TAG (lipides de réserve), au détriment des protéines et des pigments, quelle que soit la technique de limitation appliquée et le protocole expérimental réalisé. Des teneurs élevées en TAG qui constituent jusqu'à 48% de la biomasse sèche ainsi que des productivités surfaciques importantes de 2.5 à $4.4 \times 10^{-3} \text{ kg}_{\text{TAG}}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ ont été observées pour les cultures batch carencées en azote. Une productivité maximale de $2.6 \times 10^{-3} \text{ kg}_{\text{TAG}}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ a été obtenue pour la culture continue limitée en azote pour $[\text{N}] = 3.65 \text{ mM}$. Il faut noter que les différents résultats obtenus ont souligné que la vitesse d'absorption des photons (lumière reçue par la cellule) affecte fortement la croissance aussi bien que les voies de biosynthèse des acides gras. Cette vitesse d'absorption des photons dépend de plusieurs paramètres dont la plupart sont reliés entre-eux (conditions d'atténuation de la lumière au sein de la culture, teneur de la cellule en pigments, propriétés optiques de la souche,...). L'azote n'est pas donc le seul paramètre qui affecte le métabolisme lipidique et une carence en azote seule ne garantit pas une production importante des TAG. L'accumulation des lipides (TAG) est aussi limitée par la lumière. Ce point constitue très certainement la perspective principale de cette thèse. Il serait en effet particulièrement utile de calculer la vitesse d'absorption des photons comme cela a été fait récemment par Kandilian *et al.*, (2014), pour ensuite étudier et optimiser l'influence de ce paramètre pour la production de TAG.

Finalement, la dernière partie de ce manuscrit a été consacrée à examiner l'influence de des cycles jour/nuit sur la croissance en carence azotée. Une attention particulière a été accordée aux changements métaboliques subis pendant la période d'obscurité et à la cinétique de production de TAG, en vue de chercher à mieux comprendre le comportement

de la souche pendant la nuit et d'évaluer sa production de TAG sous ces conditions dites réelles de production. Les résultats obtenus ont montré que les carbohydrates et les triglycérides constituent les majeures réserves de carbone et d'énergie. Ces deux constituants hautement dynamiques ont été accumulés par la souche en présence de la lumière et sont consommés partiellement pendant la nuit grâce au processus de respiration. Pourtant, leur taux de consommation diminue au fur et à mesure de la durée de la carence, ce qui signifie que l'activité cellulaire s'affaiblit avec le temps de carence. Il faut noter que la souche n'a pas montré une préférence de consommation entre TAG et carbohydrates. Les résultats des lipides totaux ont conduit cependant à suggérer que pendant la nuit, les TAG sont remodelées en lipides polaires dits de structure (glycolipides et phospholipides). Au final, malgré un effet négatif des phases de remobilisation la nuit, les cinétiques d'accumulation et de production de TAG se révèlent proches de celles obtenues sous des conditions d'illumination continue. Ces observations permettent de suggérer que la souche *P. kessleri* UTEX2229 examinée ici constitue une matière première hautement prometteuse pour une production solaire à grande échelle de biodiesel à partir des microalgues.

Les résultats obtenus dans ce travail ouvrent de nombreuses perspectives. Les expérimentations de limitation azotée en mode continu ont souligné l'existence d'une relation étroite entre le taux d'absorption des photons (quantité de photons reçue par cellule) et la capacité des cellules à accumuler les TAG. Il serait donc intéressant d'effectuer une optimisation spécifique du rôle de la lumière sur la production de TAG en limitation azotée, et notamment l'évolution des pigments et de la concentration en biomasse qui se sont révélés deux aspects clés.

Les productivités obtenues en TAG avec le procédé continu se sont révélées encourageantes mais très certainement souche-dépendante. Il faudrait donc transposer à une autre souche accumulant facilement des lipides neutres, comme *Nannochloropsis gaditana* CCMP527.

La souche *Parachlorella kessleri* UTEX229 a été caractérisée dans cette étude dans différentes conditions de culture, et des données liées à sa teneur en différents constituants cellulaires (lipides totaux, TAG, sucres totaux, protéines, pigments, ...) ainsi que leur évolution dans les différentes conditions ont été déterminées. Il serait intéressant, toujours dans l'optique d'optimiser la production des lipides de réserve, de se servir de ces données pour effectuer une modélisation cinétique de la production de lipides. Cela permettrait de transposer à d'autres conditions, pour réaliser par exemple une optimisation systématique en cycles jour/nuit pour la souche *Parachlorella kessleri* UTEX2229.

Au cours de cette étude, le comportement de *Parachlorella kessleri* a été examiné en cycles jour/nuit à température constante. Or, en conditions solaires réelles, la température

est susceptible de varier. Dans ce contexte, il serait nécessaire d'étudier les effets de la variation de température sur le métabolisme lipidique et par conséquent sur la productivité de TAG.

D'une façon plus générale, la production de lipides de réserve est à coupler à l'étape d'extraction. Les recherches en cours au GEPEA ont en effet montré que l'extraction en voie humide est très fortement liée à l'état physiologique des cellules. Les deux opérations sont donc fortement liées et leur couplage sera donc à étudier.

Au final, l'ensemble de ces études devrait permettre une transposition optimisée à grande échelle en conditions solaires réelles. La plateforme de R&D Algosolis nouvellement construite sera en ce sens un outil idéal.

Nomenclature

$\langle \mathcal{G} \rangle$	Vitesse d'absorption des photons	$[\mu mol_{hv}.kg^{-1}.s^{-1}]$
A	Absorbance	$[-]$
a_s	Surface spécifique éclairée	$[m^2.m^{-3}]$
C_X	Concentration massique en biomasse sèche	$[kg.m^{-3}]$
C_{X_i}	Concentration massique initiale en biomasse sèche	$[kg.m^{-3}]$
C_{X_f}	Concentration massique finale en biomasse sèche	$[kg.m^{-3}]$
D	Taux de dilution	$[h^{-1}]$
e	Épaisseur de la culture du Photobioréacteur	$[m]$
f	Facteur de dilution	$[-]$
G	Irradiance	$[\mu mol_{hv}.m.^{-2}.s^{-1}]$
G_c	Irradiance de compensation	$[\mu mol_{hv}.m.^{-2}.s^{-1}]$
G_s	Irradiance de saturation	$[\mu mol_{hv}.m.^{-2}.s^{-1}]$
h	Constante de Planck	$[\mu mol_{hv}.m.^{-2}.s^{-1}]$
IC	Intervalle de confiance	$[-]$
l^{-1}	Profondeur optique de la cuve	$[cm]$
n	Nombre total des cellules comptées dans l'ensemble des 25 rectangles d'un hématimètre de type Malassez	$[Cellules]$

N	Concentration cellulaire	$[Cellules.ml^{-1}]$
P_{LT}	Productivité volumique en lipides totaux ou vitesse de production des lipides totaux	$[kg.m^{-3}.j^{-1}]$
P_{O_2}	Taux spécifique de production d'oxygène	$[\mu mol_{O_2}.h^{-1}.mgChl^{-1}]$
P_{TAG}	Productivité volumique en triglycérides ou vitesse de production des triglycérides	$[kg.m^{-3}.j^{-1}]$
P_X	Productivité volumique en biomasse sèche ou vitesse de production de biomasse sèche	$[kg.m^{-3}.j^{-1}]$
q_0	Flux lumineux incident	$[\mu mol_{hv}.m^{-2}.s^{-1}]$
Q_e	Débit d'alimentation du milieu neuf (débit d'entrée)	$[ml/min \text{ ou } L/h]$
Q_s	Débit de soutirage de la biomasse	$[ml/min \text{ ou } L/h]$
S_{LT}	Productivité surfacique en lipides totaux totaux	$[kg.m^{-2}.j^{-1}]$
S_{TAG}	Productivité surfacique en triglycérides	$[kg.m^{-2}.j^{-1}]$
S_X	Productivité surfacique en biomasse sèche	$[kg.m^{-2}.j^{-1}]$
S	Surface illuminée du Photobioréacteur	$[m^2]$
V_R	Volume réactionnel du Photobioréacteur	$[m^3]$
t	Temps de culture	$[jours]$
T_f	Temps de la récolte (fin de l'expérience)	$[jours]$
T_i	Temps du début de l'expérience	$[jours]$

Lettres Grecques

γ	Fraction volumique éclairée	$[-]$
μ	Taux de croissance	$[h^{-1}]$
τ	Temps de residence de culture	$[h]$
λ	Longueur d'onde	$[nm]$
ν	Fréquence de rayonnement	$[Hz]$
θ	Angle	$[^{\circ}]$

Indices

i	Relatif au début de l'expérience
f	Relatif à la fin de l'expérience
max	Maximum
s	Relatif au point de compensation
opt	Relatif à l'optimum
C	Relatif à l'optimum
X	Relatif à la biomasse sèche
LT	Relatif aux lipids totaux
TAG	Relatif aux triglycérides

* État excité

Abréviations

AAC	Acétyl-CoA carboxylase
AAD1	Acido acyl desaturase delta 9
ACP	Acyl carrier protein
ADP	Adénosine Di-Phosphate
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BF₃	Tri-fluorure de bore
BHT	Butyl-hydroxytoluène
Chl a	Chlorophylle a
Chl b	Chlorophylle b
CHCl₃	Chlorpforme
DAG	Diacylglycérol
DGAT	Diacyldlycéride acyl transférase
FA	Fatty acids
FAD	Flavine adénine dinucléotide, forme oxydée
FADH₂	Flavine adénine dinucléotide, forme réduite
FAME	Fatty acids methyl ester
FATA	Fatty acid thioesterases A pour les acides gras insaturés
FATB	Fatty acid thioesterases A pour les acides gras saturés
Fd	Ferrédoxine

FID	Flame Ionization Detector
GC	Chromatographie gazeuse
GPAT	Glycérol phosphate acyl transférase
G3P	Glycéraldéhyde 3-phosphate
JSP	Jouin Solutions Plastiques
LED	Diode Électro-Luminescente
LHCII	Light Harvesting Complex II
LPAAT	Lysophosphatidic acid acyl transferase
LT	Lipides Totaux
KAS (I, II, III)	Kétoacyl-ACP synthases
MAG	Monoacylglycérol
MAT	Malonyl CoA
MeOH	Méthanol
MS	Matière Sèche
MVREA	Mean volumetric rate of energy absorption
NADP⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
P680	Centre réactionnel du PSII
P700	Centre réactionnel du PSI
PAR	Photosynthetically Active Radiations
PBR	Photobioréacteur
PC	Plastocyanine

PFD	Photons Flux Density
Pheo	Phéophytine
PMMA	PolyMethylMethAcrylate
PPC	Photo-Protective carotenoids
PQ	Plastoquinone
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Q	Ubiquinone, forme oxydée
Q_A	Quinone A
Q_B	Quinone B
QH₂	Ubiquinone, forme réduite
QRo₂	Quantum Requirement For Oxygen Production
RuBisCO	Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase
SPE	Solid-Phase Extraction
TAG	Triacylglycérol
TG	Triacyl-sn-glycerol
(TG 17:0)	1,3-diheptadecanoyl-2-(10Z heptadecenoyl)-glycerol (d5)

BIBLIOGRAPHIE

- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., Mccourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., Taylor, M.F.J.R., 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 399–451.
- Allen, J.F., de Paula, W.B.M., Puthiyaveetil, S., Nield, J., 2011. A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 16, 645–655.
- Andersen, R.A., Brett, R.W., Potter, D., Sexton, J.P., 1998. Phylogeny of the Eustigmatophyceae Based upon 18S rDNA, with Emphasis on *Nannochloropsis*. *Protist* 149, 61–74.
- Berger, M., Ayerdi-Gotor, A., Sarrafi, A., Maury, P., Daydé, J., Calmon, A., 2010. Que sait-on du déterminisme de la qualité des huiles du tournesol face aux nouvelles attentes ? *Ol. Corps Gras Lipides* 17, 171–184.
- Berges, J.A., Franklin, D.J., Harrison, P.J., 2001. Evolution of an artificial seawater medium: Improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *J. Phycol.* 37, 1138–1145.
- Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z., Avissar, Y., Richmond, A., 1987. Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass* 12, 37–47.
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 557–577.
- Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., 2012a. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour. Technol.* 124, 217–226.
- Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., 2013. Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technology*. 143, 1–9.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306.
- Chisti, Y., 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26, 126–131.
- Chisti, Y., 2013. Constraints to commercialization of algal fuels. *J. Biotechnol.* 167, 201–214.
- Choix, F.J., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2012. Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: I. Autotrophic conditions. *Enzyme Microb. Technol.* 51, 294–299.
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 48, 1146–1151.

- Cooney, M.J., Young, G., Pate, R., 2011. Bio-oil from photosynthetic microalgae: case study. *Bioresour. Technol.* 102, 166–177.
- Cornet, J.-F., Favier, L., Dussap, C.-G., 2003. Modeling Stability of Photoheterotrophic Continuous Cultures in Photobioreactors. *Biotechnol. Prog.* 19, 1216–1227.
- Degrenne, B., 2009. Production d'hydrogène par *Chlamydomonas reinhardtii* en photobioréacteur : analyse des conditions de culture et mise en place d'un protocole autotrophe. Nantes.
- DuBois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., & Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- E G BLIGH, W.J.D., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–7.
- Elsay, D., Jameson, D., Raleigh, B., Cooney, M.J., 2007. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *J. Microbiol. Methods* 68, 639–642.
- Falkowski, P.G., LaRoche, J., 1991. Acclimation to Spectral Irradiance in Algae. *J. Phycol.* 27, 8–14.
- Fawley, K.P., Fawley, M.W., 2007. Observations on the Diversity and Ecology of Freshwater Nannochloropsis (Eustigmatophyceae), with Descriptions of New Taxa. *Protist* 158, 325–336.
- Finazzi, G., Moreau, H., Bowler, C., 2010. Genomic insights into photosynthesis in eukaryotic phytoplankton. *Trends Plant Sci.* 15, 565–572.
- FOLCH, J., LEES, M., SLOANE STANLEY, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Gouveia, L., Marques, A.E., Silva, T.L. da, Reis, A., 2009. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 821–826.
- Gouveia, L., Oliveira, A.C., 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 269–274.
- Griffiths, M.J., Hille, R.P. van, Harrison, S.T.L., 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J. Appl. Phycol.* 24, 989–1001. d
- Gris, B., Morosinotto, T., Giacometti, G.M., Bertucco, A., Sforza, E., 2014. Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors: effects of light intensities and light-dark cycles on growth, productivity, and biochemical composition. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 2377–2389.
- Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol. Adv.* 30, 709–732.
- Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., Mayfield, S., 2010. Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels* 1, 763–784.
- Heath, M.R., Richardson, K., Kirtboe, T., 1990. Optical assessment of phytoplankton nutrient depletion. *J. Plankton Res.* 12, 381–396.
- Hempel, N., Petrick, I., Behrendt, F., 2012. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 24, 1407–1418.
- Himmel, M.E., 2009. Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy. xviii + 505 pp.
- Hodgson, P.A., Henderson, R.J., Sargent, J.R., Leftley, J.W., 1991. Patterns of variation in the

- lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch culture. *J. Appl. Phycol.* 3, 169–181.
- Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol.*, Special issue on the Challenges in Environmental Science and Engineering 113, 244–252.
- Ho, S.-H., Chen, W.-M., Chang, J.-S., 2010. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 101, 8725–8730.
- Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., Chen, G., 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energy* 87, 38–46.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621–639.
- Huss, V.A.R., Frank, C., Hartmann, E.C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B.M., Wenzeler, P., Kessler, E., 1999. Biochemical Taxonomy and Molecular Phylogeny of the Genus *Chlorella* Ssensu Lato (chlorophyta). *J. Phycol.* 35, 587–598.
- Islam, M.A., Magnusson, M., Brown, R.J., Ayoko, G.A., Nabi, M.N., Heimann, K., 2013. Microalgal Species Selection for Biodiesel Production Based on Fuel Properties Derived from Fatty Acid Profiles. *Energies* 6, 5676–5702.
- Iverson, T.M., 2006. Evolution and unique bioenergetic mechanisms in oxygenic photosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, Bioinorganic chemistry / Biocatalysis and biotransformation 10, 91–100.
- Jacob-Lopes, E., Scoparo, C.H.G., Lacerda, L.M.C.F., Franco, T.T., 2009. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 48, 306–310.
- Jubeau, S., Marchal, L., Pruvost, J., Jaouen, P., Legrand, J., Fleurence, J., 2013. High pressure disruption: a two-step treatment for selective extraction of intracellular components from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J. Appl. Phycol.* 25, 983–989.
- Kandilian, R., Pruvost, J., Legrand, J., Pilon, L., n.d. Influence of Light Absorption Rate by *Nannochloropsis oculata* on Triglyceride Production During Nitrogen Starvation. *Bioresour. Technology*.
- Khoeyi, Z.A., Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., 2012. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquac. Int.* 20, 41–49.
- Knothe, G., 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process. Technol.*, Biodiesel Processing and Production 86, 1059–1070.
- Knothe, G., 2009. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy Environ. Sci.* 2, 759–766.
- Kobayashi, N., Noel, E.A., Barnes, A., Rosenberg, J., DiRusso, C., Black, P., Oyler, G.A., 2013. Rapid Detection and Quantification of Triacylglycerol by HPLC-ELSD in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella* Strains. *Lipids* 48, 1035–1049.
- Kok, B., 1948. A critical consideration of the quantum yield of *Chlorella*-photosynthesis. *W. Junk, Amsterdam*.
- Kong, Q., Li, L., Martinez, B., Chen, P., Ruan, R., 2010. Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Wastewater for Biomass Feedstock Production. *Appl. Biochem.*

- Biotechnol. 160, 9–18.
- Krienitz, L., Hegewald, E.H., Hepperle, D., Huss, V.A.R., Rohr, T., Wolf, M., 2004a. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia* 43, 529–542.
- Kroth, P.G., Chiovitti, A., Gruber, A., Martin-Jezequel, V., Mock, T., Parker, M.S., Stanley, M.S., Kaplan, A., Caron, L., Weber, T., Maheswari, U., Armbrust, E.V., Bowler, C., 2008. A Model for Carbohydrate Metabolism in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Deduced from Comparative Whole Genome Analysis. *PLoS ONE* 3, e1426.
- Lacour, T., Sciandra, A., Talec, A., Mayzaud, P., Bernard, O., 2012. Diel Variations of Carbohydrates and Neutral Lipids in Nitrogen-Sufficient and Nitrogen-Starved *Cyclotella* Cultures of *Isochrysis* Sp.1. *J. Phycol.* 48, 966–975.
- Le Borgne, F., Pruvost, J., 2013. Investigation and modeling of biomass decay rate in the dark and its potential influence on net productivity of solar photobioreactors for microalga *Chlamydomonas reinhardtii* and cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Bioresour. Technol.* 138, 271–276.
- Li, X., Příbyl, P., Bišová, K., Kawano, S., Cepák, V., Zachleder, V., Čížková, M., Brányiková, I., Vítová, M., 2013a. The microalga *Parachlorella kessleri*--a novel highly efficient lipid producer. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 97–107.
- Li, Y.-G., Xu, L., Huang, Y.-M., Wang, F., Guo, C., Liu, C.-Z., 2011. Microalgal biodiesel in China: Opportunities and challenges. *Appl. Energy*, Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends 88, 3432–3437.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q., 2008a. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 629–636.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q., Dubois-Calero, N., 2008c. Biofuels from Microalgae. *Biotechnol. Prog.* 24, 815–820.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall , 1951 Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Mandal, S., Mallick, N., 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 281–291.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010a. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 217–232.
- Meher, L.C., Vidya Sagar, D., Naik, S.N., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 10, 248–268.
- Mizuno, Y., Sato, A., Watanabe, K., Hirata, A., Takeshita, T., Ota, S., Sato, N., Zachleder, V., Tsuzuki, M., Kawano, S., 2013. Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresour. Technol.* 129, 150–155.
- Morineau-Thomas, O., Jaouen, P., Legentilhomme, P., 2002. The role of exopolysaccharides in fouling phenomenon during ultrafiltration of microalgae (*Chlorella* sp. and *Porphyridium purpureum*): advantage of a swirling decaying flow. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25, 35–42.
- Muñoz, R., Guieysse, B., 2006. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Res.* 40, 2799–2815. doi:10.1016/j.watres.2006.06.011
- Nascimento, I.A., Marques, S.S.I., Cabanelas, I.T.D., Pereira, S.A., Druzian, J.I., Souza, C.O. de, Vich, D.V., Carvalho, G.C. de, Nascimento, M.A., 2013. Screening Microalgae Strains for

- Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. *BioEnergy Res.* 6, 1–13.
- Olaizola, M., 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 12, 499–506.
- Patterson, G.W., Tsitsa-Tzardis, E., Wikfors, G.H., Ghosh, P., Smith, B.C., Gladu, P.K., 1994. Sterols of eustigmatophytes. *Lipids* 29, 661–664.
- Perez-Pazos, J.-V., Fernandez-Izquierdo, P., 2011. Synthesis of Neutral Lipids in *Chlorella* Sp. Under Different Light and Carbonate Conditions. *CT F Cienc. Tecnol. Futuro* 4, 47–57.
- Pottier, L., Pruvost, J., Deremetz, J., Cornet, J.-F., Legrand, J., Dussap, C.G., 2005. A fully predictive model for one-dimensional light attenuation by *Chlamydomonas reinhardtii* in a torus photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 91, 569–582.
- Přibyl, P., Cepák, V., Zachleder, V., 2012a. Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 549–561.
- Přibyl, P., Eliáš, M., Cepák, V., Lukavský, J., Kaštánek, P., 2012c. Zoosporogenesis, Morphology, Ultrastructure, Pigment Composition, and Phylogenetic Position of *Trachydiscus Minutus* (eustigmatophyceae, Heterokontophyta)1. *J. Phycol.* 48, 231–242.
- Pruvost, J., Cornet, J.F., Goetz, V., Legrand, J., 2012. Theoretical investigation of biomass productivities achievable in solar rectangular photobioreactors for the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biotechnol. Prog.* 28, 699–714.
- Pruvost, J., Cornet, J.-F., Legrand, J., 2008. Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: An energetically consistent analysis. *Chem. Eng. Sci.* 63, 3679–3694.
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., Legrand, J., 2009a. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 100, 5988–5995.
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., Legrand, J., 2009b. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 100, 5988–5995.
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Le Gouic, B., Couzinet-Mossion, A., Legrand, J., 2011. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresour. Technol.*, Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells 102, 150–158. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.153
- Pulz, O., Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 635–648.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2013. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl. Energy* 103, 444–467.
- Richmond, A. (Ed.), 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, Oxford, OX, UK ; Ames, Iowa, USA.
- Richmond, A., 2008a. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons.
- Ritchie, R.J., 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.* 89, 27–41.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100–112.

- Roessler, P.G., Bleibaum, J.L., Thompson, G.A., Ohlrogge, J.B., 1994. Characteristics of the gene that encodes acetyl-CoA carboxylase in the diatom *Cyclotella cryptica*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 721, 250–256.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 35, 265–278.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Res.* 1, 20–43.
- Scott, S.A., Davey, M.P., Dennis, J.S., Horst, I., Howe, C.J., Lea-Smith, D.J., Smith, A.G., 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology – Environmental biotechnology* 21, 277–286.
- Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., Khoeyi, Z.A., 2011. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *J. Appl. Phycol.* 23, 721–726.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19, 627–662.
- Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y., Peltier, G., 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol.* 11, 7.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96.
- Stansell, G.R., Gray, V.M., Sym, S.D., 2012. Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *J. Appl. Phycol.* 24, 791–801.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1968. A practical handbook of seawater analysis. Queen's Printer.
- Sukenik, A., Carmeli, Y., 1990a. Lipid Synthesis and Fatty Acid Composition in *Nannochloropsis* Sp. (eustigmatophyceae) Grown in a Light-Dark Cycle1. *J. Phycol.* 26, 463–469.
- Sukenik, A., Carmeli, Y., 1990b. Lipid Synthesis and Fatty Acid Composition in *Nannochloropsis* Sp. (eustigmatophyceae) Grown in a Light-Dark Cycle1. *J. Phycol.* 26, 463–469.
- Sydney, E.B., da Silva, T.E., Tokarski, A., Novak, A.C., de Carvalho, J.C., Woiciechowski, A.L., Larroche, C., Soccol, C.R., 2011. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Appl. Energy, Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends* 88, 3291–3294.
- Takache, H., Christophe, G., Cornet, J.-F., Pruvost, J., 2010. Experimental and theoretical assessment of maximum productivities for the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in two different geometries of photobioreactors. *Biotechnol. Prog.* 26, 431–440.
- Takeshita, T., Ota, S., Yamazaki, T., Hirata, A., Zachleder, V., Kawano, S., 2014. Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. *Bioresour. Technol.* 158, 127–134.
- Taleb, A., Pruvost, J., Legrand, J., Marec, H., Le-Gouic, B., Mirabella, B., Legeret, B., Bouvet, S., Peltier, G., Li-Beisson, Y., Taha, S., Takache, H., 2015. Development and validation of a screening procedure of microalgae for biodiesel production: Application to the genus of marine microalgae *Nannochloropsis*. *Bioresour. Technol.* 177, 224–232.

- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T.R., Graham, I.A., 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61, 15–24.
- Tornabene, T.G., Holzer, G., Lien, S., Burris, N., 1983a. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb. Technol.* 5, 435–440.
- Vandanjon, L., Rossignol, N., Jaouen, P., Robert, J.M., Quéméneur, F., 1999. Effects of shear on two microalgae species. Contribution of pumps and valves in tangential flow filtration systems. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 1–9.
- Van Vooren, G., Le Grand, F., Legrand, J., Cuiné, S., Peltier, G., Pruvost, J., 2012. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresour. Technol.* 124, 421–432.
- Wang, B., Lan, C.Q., Horsman, M., 2012. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnol. Adv.*, *Biorefining: Thermochemical and Enzymatic Biomass Conversion International Conference on Biomass and Energy Technologies* 30, 904–912.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 707–718.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: A review. *Aquaculture* 34, 115–143.
- Yamamoto, M., Kurihara, I., Kawano, S., 2005. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta* 221, 766–775.
- Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K., 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochem. Eng. J.* 6, 87–102.
- Zhen-Feng, S., Xin, L., Hong-Ying, H., Yin-Hu, W., Tsutomu, N., 2011. Culture of *Scenedesmus* sp. LX1 in the modified effluent of a wastewater treatment plant of an electric factory by photo-membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 102, 7627–7632.