

Université de Nantes
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

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

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

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

Contribution à l'étude hydrodynamique et à la modélisation des photobioréacteurs à haute productivité volumique

Thèse de Doctorat

Discipline : Sciences pour l'Ingénieur
Spécialité : Génie des Procédés

Présentée par
et soutenue publiquement par :

Antoine SOULIÈS

Le 27 février 2014, devant le jury ci-dessous

Président : Guillaume OVARLEZ (Directeur de recherche CNRS, Laboratoire NAVIER)

Rapporteurs : Jean-François CORNET (Professeur, Institut Pascal)
Jérôme MORCHAIN (Maître de conférences HDR, INSA de Toulouse)

Invité : Jack LEGRAND (Professeur, Université de Nantes)

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

Co-directrice de thèse : Cathy CASTELAIN, Directrice de recherche CNRS, Université de Nantes

Co-Encadrant : Teodor BURGHELEA, Chargé de recherche CNRS, Université de Nantes

Université de Nantes
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

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

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

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

Contribution à l'étude hydrodynamique et à la modélisation des photobioréacteurs à haute productivité volumique

Thèse de Doctorat

Discipline : Sciences pour l'Ingénieur
Spécialité : Génie des Procédés

Présentée par
et soutenue publiquement par :

Antoine SOULIÈS

Le 27 février 2014, devant le jury ci-dessous

Président : Guillaume OVARLEZ (Directeur de recherche CNRS, Laboratoire NAVIER)

Rapporteurs : Jean-François CORNET (Professeur, Institut Pascal)
Jérôme MORCHAIN (Maître de conférences HDR, INSA de Toulouse)

Invité : Jack LEGRAND (Professeur, Université de Nantes)

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

Co-directrice de thèse : Cathy CASTELAIN, Directrice de recherche CNRS, Université de Nantes

Co-Encadrant : Teodor BURGHELEA, Chargé de recherche CNRS, Université de Nantes

Remerciements

En premier lieu, je veux remercier la région Pays de la Loire pour m'avoir financé pendant trois ans et avoir ainsi permis d'échanger très souvent autour de l'énergie par le biais du programme PERLE 2 (Pôle d'Excellence pour la Recherche Ligérienne en Energie) auquel j'étais rattaché.

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 permis de réaliser cette thèse sur le site de Saint-Nazaire. Je veux le remercier également pour sa disponibilité et ses conseils, toujours pertinents, qu'il m'a prodigué tout au long de ces trois années.

Bien entendu, ce travail n'aurait jamais pu aboutir sans l'aide et les conseils de mes encadrants. D'abord, le professeur Jérémy Pruvost, directeur de thèse et directeur de l'axe Bioprocédés et Séparation en Milieu Marin (BSMM) du GEPEA, pour sa grande disponibilité et son regard posé et objectif sur le domaine des photobioréacteurs. Je suis heureux d'avoir pu partager sa vision du monde microalgale (et de continuer encore un peu!) et espère humblement que cette contribution sera utile pour améliorer la compréhension de cette discipline.

Également, le docteur Cathy Castelain, directrice du Laboratoire Thermocinétique de Nantes (LTN) pour m'avoir permis de réaliser quelques expérimentations dans son laboratoire (même tard le soir!). Elle m'a apporté le regard extérieur pour la partie biologique et transfert radiatif; regard toujours utile pour prendre du recul sur son sujet. Je suis content d'avoir pu travailler avec elle sur certaines parties qui n'ont malheureusement pas encore aboutis.

Le docteur Teodor I. Burghilea, chargé de recherche CNRS au LTN, qui a eu la patience de me former sur les aspects rhéologique et microfluidique présentés dans ce mémoire. Partager son excellence scientifique a été très enrichissant, et collaborer avec lui a été un réel plaisir même si cela a demandé de l'énergie, autant devant la paillasse que derrière son Mac. J'espère avoir la chance de continuer à approfondir certains aspects de l'écoulement en milieu confiné de suspension de microalgues avec lui.

Je voudrais remercier le professeur Jean-François Cornet et le docteur Jérémie Dauchet, chercheurs au Laboratoire de Génie Chimique et Biologique (LGCB) de Clermont-Ferrand. Leur niveau d'expertise exceptionnel dans le domaine du transfert radiatif m'a permis de comprendre les phénomènes mis en jeu lors de cultures microalgales. Ils ont toujours répondu présents au moindre blocage et j'espère avoir la chance de collaborer de nouveau avec eux par la suite. De même pour l'ensemble des chercheurs du GEPEA qui ont gardé leurs portes ouvertes quand j'avais des questions.

La partie expérimentale de ce travail n'aurait jamais pu se faire sans le soutien technique d'Hélène Marec, technicienne en instrumentation et de Jean-Luc Hauser, technicien mécanique. Ils ont toujours

accédé à mes requêtes avec rapidité et bonne humeur et sont à la base du succès expérimental en photobioréacteur. Sans oublier naturellement l'ensemble de l'équipe technique : Delphine Kucma, Candice Perrier, Emmanuel Dechandol, Franck Judic et Guillaume Roellens pour leur bonne humeur et leur aide au cours de ces trois ans. Une mention très spéciale pour Maryse Chaplain-Derouiniot qui nous a quitté tragiquement : elle reste néanmoins présente en chacune des personnes qui ont eu la chance de la connaître.

En trois ans, indubitablement, il y a des moments où il est difficile de garder le moral. Je tiens à remercier sincèrement mes amis et collègues de bureau Astrid De Luca, Razmig Kandilian, Camille Lemasson, Claire Mairot, Valéria Montalesco, Benjamin Moutel, Séverine Plantier (notamment pour une entraide mutuelle de 3,5 ans!), Thomas Rinaldi et Aumaya Taleb. Je les remercie pour tous ces bons moments passés aussi bien au bureau, dans les laboratoires qu'à l'extérieur. La bonne ambiance qu'ils ont su maintenir malgré les passages à vide de chacun m'a permis de garder les yeux sur l'objectif final que représente ce manuscrit. Il en est de même pour l'ensemble de mes collègues doctorants et stagiaires que j'ai eu la chance de côtoyer (et que je n'ai pas la place de tous les citer ici, je m'en excuse mais ne les oublie pas!) en particulier les "anciens" du bureau 226 (Farid Hadj-Romdhane, Sébastien Jubeau, Benjamin Le Gouic et Arnaud Martzloff), 223 (François Le Borgne) et 108 (Benoit Degrenne et Hosni Takache) pour les petites astuces, conseils ou discussions que nous avons pu échanger.

Une pensée spéciale à mes deux anciens stagiaires (aussi meilleurs l'un que l'autre!!!) Arnaud Artu et Nour Ayache. J'ai beaucoup apprécié travailler avec eux et je suis fier de les compter parmi mes amis. Je leur souhaite beaucoup de bonnes choses pour la suite.

La vie au laboratoire ne devant pas être l'unique activité, je remercie également mes amis "extérieurs" pour les moments échappatoires qu'ils m'ont offerts : Gwendoline B., Alexis et Anne-Rose D.P., Frédéric D.P., Maxime H., Juliette L., Magalie L. (Cocotte!), Jérémy M., Jean-Charles et Mirella M., Kenza S., Raphaël S..

Enfin, je tiens à remercier de tout mon cœur ma famille. Sans leur indéfectible soutien il m'aurait été difficile de venir à bout de ce travail. Pour tous ces bons moments (et les frayeurs dues aux aléas médicaux), ces week-end où on se croit en vacances, quelque soit la période, je veux que mes parents, ma grand-mère, Isabelle et Erwan (ma sœur et mon beau-frère) et Christophe et Marie (mon frère et ma belle-sœur) sachent que ça a été des moments extrêmement importants pour moi, liés à l'équilibre mentale indispensable à ce projet. Toutes mes pensées vont à la mémoire de mon grand-père, parti trop tôt.

Pour finir, je voudrais dédier ce travail à mes neveux et nièces : Maxime, Ronan, Clémentine et ma filleule Julia. Leurs accueils et sourires à chaque visite a été une ressource inépuisable d'énergie.

Merci à tous!

A Saint-Nazaire, le 27 février 2014
Antoine Souliès

Liste des communications

Publications

Publications

1. **Souliès, A.**, Pruvost, J., Legrand, J., Castalain, C., and Burghilea, T. (2013). Rheological properties of suspensions of the green microalga *Chlorella Vulggaris* at various volume fractions. *Rheologica Acta*, 52(6) :589-605.
2. S. Ben Rejeb, **A. Souliès**, C. Innocent and M. Pontié, " A novel fuel cell cathode based on carbon felt coated with tetrasulfonated nickel phthalocyanine electrodeposited film " - Journal of Solid State Electrochemistry - *Déposé le 27 août 2013, en révision.*

Article en préparation

1. **A. Souliès**, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghilea, " Microscopic flows of suspensions of the green non-motile *Chlorella vulgaris* microalgae "
2. **A. Souliès**, C. Castelain, T. Burghilea, J. Legrand and J. Pruvost, " Photoadaptation of a culture of *Chlorella vulgaris* under specific light conditions "

Communications internationales

1. "Shear thinning and yield stress behaviour of suspensions of *Chlorella vulgaris* microalgae." *International conference on Viscoplastic Fluids : From theory to application*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghilea. Reuil-Malmaison, France (Novembre 2013).
2. "Hydrodynamic investigation of *Chlorella vulgaris* suspensions as achieved in high cell density photobioreactors." *European Congress of Applied Biotechnology*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghilea. Deen Hague, Nederland (Avril 2013).
3. "Rheological properties and micro-flows of suspensions of the green micro algae *Chlorella vulgaris*." *Annual Meeting of the Society of Rheology*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghilea. Pasadena, USA (California) (Fevrier 2013).

4. "Development of high cell density photobioreactors : Light/Dark cycles induced by chaotic flow and rheological behavior of concentrated suspensions." *9th European Workshop : Biotechnology of Microalgae*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghlelea. Nuthetal, Allemagne (Juin 2012).
5. "Etude et modélisation de l'écoulement d'une suspension microalgale en milieu confiné." *6èmes Journées Francophones sur les Réacteurs Gaz-Liquide et Gaz-Liquide-Solide*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghlelea. Marrakech, Maroc (Mai 2012).
6. "Rheological properties of Chlorella micro algae suspensions." *Annual Meeting of the German Society of Rheology*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghlelea. Berlin, Germany (Avril 2012).

Communications nationales

1. "Rheological properties and microscopic flows of suspensions of *Chlorella vulgaris* microalgae." *48ème congrès du groupe français de rhéologie*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghlelea. Nantes, France (Octobre 2013).
2. "Contribution à l'étude hydrodynamique et à la modélisation des photobioréacteurs à hautes productivités volumiques." *Journées Annuelle du Pôle d'Excellence de la Recherche Ligérienne en Energie (PERLE2)*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghlelea. Nantes, France (Septembre 2013).
3. "Propriétés rhéologiques et écoulements microscopiques d'une suspension de *Chlorella vulgaris*." *Congrès Français de Mécanique*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghlelea. Bordeaux, France (Août 2013).
4. "Photobioréacteurs à haute productivité volumique : étude et optimisation du fonctionnement en conditions solaires." *Congrès de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP)*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghlelea. Lille, France (Decembre 2011).
5. "Ingénierie des Photobioréacteurs : présentation des activités du laboratoire GEPEA." *Colloque AdeBioTech : Algues : Filières du futur!*, J. Pruvost, J. Legrand, M. Titica, G. Cogne, F. Le Borgne, H. Takache, H. Marec, J-L. Hauser, E. Dechandol, A. Souliès. Paris, France (Novembre 2010).

Autres communications

1. "Propriétés rhéologiques et écoulements microscopiques d'une suspension de *Chlorella vulgaris*." *GDR PROcédés Biologiques et Bioinspirés pour l'Energie (PROBBE)*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghlelea. Rocquebrune sur Argens, France (Mars 2013).

REMERCIEMENTS

2. "Etude du transfert de rayonnement en photobioréacteur intensifié." *Journées de la Fédération de Recherche sur l'Energie Solaire (FédESol) Junior*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghlelea. Nantes, France (Novembre 2012).
3. "Photobioréacteurs à hautes productivités volumiques : Etude et optimisation du fonctionnement transitoire généré par un usage solaire." *Journées Annuelle du Pôle d'Excellence de la Recherche Ligérienne en Energie (PERLE2)*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghlelea. Nantes, France (Juin 2012).
4. "High cell density photobioreactors : Study an optimization of an using under solar conditions." *Seminar of SPIGA graduate school and ESA - MELISSA project*, A. Souliès, J. Pruvost, J. Legrand, C. Castelain and T. Burghlelea. Saint-Nazaire, France (Decembre 2011).

Sommaire

Remerciements	iii
Liste des communications	v
Introduction générale	1
1 Microalgues et ingénierie des photobioréacteurs - Etat de l'art	5
1.1 Introduction	6
1.2 Culture de microorganismes photosynthétiques	6
1.2.1 Généralités sur les microorganismes photosynthétiques	6
1.2.2 Présentation de la microalgue d'étude : <i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211-19	6
1.2.3 Fonctionnement du mécanisme photosynthétique	8
1.2.4 Les réactions photosynthétiques	9
Les réactions claires	9
Les réactions sombres	11
1.2.5 La respiration	11
1.2.6 La réponse à la lumière	13
Évolution avec le flux capté	13
Évolution avec le spectre incident	15
L'adaptation à la lumière	15
1.2.7 Apport de l'énergie lumineuse	16
Atténuation de la lumière	16
Vitesse spécifique d'absorption des photons, \mathcal{A}	17
1.2.8 Apport en nutriments	18
1.3 Ingénierie des systèmes de culture	20
1.3.1 Paramètres d'ingénierie	20
Géométrie des systèmes de culture	20
Surface spécifique	20
1.3.2 Rôle de l'hydrodynamique et de la rhéologie	21
1.3.3 Paramètres opératoires	21
Taux de dilution et temps de séjour	21
pH	22

	Température	22
1.3.4	Notions de productivité des systèmes de culture	23
1.3.5	Concept de système de culture à haute productivité volumique (HPV)	24
1.4	Technologies des systèmes de culture	27
1.4.1	Systèmes ouverts	27
1.4.2	Systèmes clos	29
	Systèmes clos à éclairage externe	29
	Systèmes clos à éclairage interne	35
	Bilan sur les systèmes de cultures	35
1.5	Modélisation des cultures et du transfert radiatif	38
1.5.1	Modèles de croissance	38
	Modèle de Monod	38
	Modèle de Andrews-Haldane	39
	L'approche prédictive	40
	La modélisation des flux métaboliques	40
1.5.2	Modélisation du transfert radiatif	41
	Équation des transferts radiatifs	41
	Détermination des propriétés radiatives	42
	Loi de Beer-Lambert (ou loi de Bouguer)	43
	Modèle à deux flux	44
	Approximation P1	46
	Méthode de Monte-Carlo	47
1.5.3	Modélisation de système de culture en photolimitation	49
1.6	Conclusion	50
2	Mise en culture et caractérisation de <i>C. vulgaris</i>	53
2.1	Mise en culture de <i>C. vulgaris</i>	54
2.1.1	Photobioréacteurs	54
	PBR torique	54
	PBR airlift plan	55
	Colonne à bulles	55
2.1.2	Composition élémentaire de <i>C. vulgaris</i>	56
2.1.3	Composition du milieu de culture	57
2.2	Analyses et détermination des grandeurs d'intérêts	59
2.2.1	Détermination des intervalles de confiance, IC	59
2.2.2	Analyses de taille et de forme	60
2.2.3	Préparation de suspensions artificiellement concentrées de microalgues	63
2.2.4	Mesure de la concentration en biomasse sèche, C_x	63
2.2.5	Comptage cellulaire, N_p	64
2.2.6	Estimation de la teneur en pigments	64
2.2.7	Estimation de la masse volumique de la matière sèche, ρ_{sec}	65

2.2.8	Estimation de la fraction volumique en eau dans <i>C. vulgaris</i>	66
2.2.9	Vérifications des grandeurs déterminées	67
2.2.10	Mesures du spectre de transmission d'une culture par sphère intégrante	69
2.3	Apport de l'énergie lumineuse	71
2.3.1	Présentation des technologies utilisées	71
2.3.2	Mesures de la densité de flux de photons et du spectre incident	73
2.3.3	Conversions d'unités de la lumière	74
2.4	Modélisation cinétique de la croissance de <i>C. vulgaris</i>	76
2.4.1	Formulation de la loi cinétique	76
2.4.2	Détermination des paramètres du modèle	78
3	Étude hydrodynamique de suspensions microalgales concentrées	81
3.1	Introduction	82
3.2	Rheological properties of suspensions of the green micro-alga <i>Chlorella vulgaris</i> at various volume fractions	84
3.2.1	Résumé	84
3.2.2	Abstract	85
3.2.3	Introduction	85
3.2.4	Experimental methods	87
	Preparation of the <i>Chlorella</i> microalgae suspensions	87
	Rheological measurements	91
3.2.5	Results	93
	Rheological regimes	94
	Reversibility of the deformation states at various microalgae volume fractions	105
3.2.6	Conclusions, outlook	110
3.2.7	Acknowledgements	112
3.3	Écoulement microscopique de suspensions de <i>Chlorella vulgaris</i>	113
3.3.1	Introduction	113
3.3.2	Matériels et méthodes	113
3.3.3	Résultats	115
3.3.4	Conclusion et discussion sur l'écoulement microscopique de <i>C. vulgaris</i> et ses conséquences sur un procédé de culture intensifié	119
3.4	Conclusion	121
4	Étude et modélisation d'un photobioréacteur à haute productivité volumique sous conditions spécifiques d'éclairement	123
4.1	Introduction	124
4.2	Propriétés radiatives	125
4.2.1	Introduction	125
4.2.2	Détermination de l'indice de réfraction complexe de <i>C. vulgaris</i>	125

	Détermination de la partie imaginaire	126
	Détermination de la partie réelle	128
4.2.3	Détermination des propriétés radiatives	128
	Paramètre de taille	128
	Solution de Lorenz-Mie	129
	Approximation de la diffraction anormale, ADA	130
	Présentation de la chaîne de calcul	130
	Mesure du spectre de transmission	131
	Validation de la méthode de calcul	133
4.2.4	Résultats	136
	Fonction de phase	136
	Coefficients massiques d'absorption ($E_{a\lambda}$) et de diffusion ($E_{s\lambda}$)	137
4.2.5	Conclusion sur la détermination des PR	138
4.3	Modélisation cinétique de la croissance de <i>C. vulgaris</i>	140
4.3.1	Obtentions des points expérimentaux de croissance	140
	Montage expérimental	140
	Obtention des productivités volumiques	140
	Évolution de la teneur massique en pigments	141
4.3.2	Calage du modèle cinétique	144
4.3.3	Conclusion sur la modélisation cinétique de la croissance de <i>C. vulgaris</i> en PBR	147
4.4	Application à un photobioréacteur à haute productivité volumique sous condi- tions spécifiques d'éclairement	149
4.4.1	Introduction de la problématique du transfert radiatif en conditions solaires	149
4.4.2	Montage expérimental	151
4.4.3	Pré-analyse théorique de l'impact de conditions spécifiques d'éclairement	152
4.4.4	Transmission de la lumière en maquette froide	155
4.4.5	Analyse expérimentale des résultats	157
4.5	Conclusion	160
	Conclusion générale	165
	Nomenclature	169
	Bibliographie	174

Table des figures

1.1	Schéma d'une cellule de <i>Chlorella vulgaris</i> (Pignolet et al., 2013)	7
1.2	Vue schématique en coupe d'un chloroplaste et réaction globale de la photosynthèse (Campbell and Reece, 2004)	8
1.3	Vue schématique de la structure de la chaîne photosynthétique (Degrenne, 2009)	9
1.4	Schématisation du transport acyclique (schéma en Z) et du transport cyclique, ou schématisation des réactions d'oxydo-réduction mises en jeu lors de la photosynthèse	10
1.5	Schématisation du cycle de Calvin pour la fixation du carbone inorganique	12
1.6	Schéma de la chaîne de transport des électrons dans la membrane interne des mitochondries (Degrenne, 2009)	12
1.7	Impact de la densité de flux sur le mécanisme photosynthétique de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . Données obtenues par H. Takache en 2008	14
1.8	Représentation schématique des trois états de transfert radiatif rencontrés en culture continue de microalgues, d'après Pruvost <i>et al.</i> (Pruvost and Cornet, 2012)	17
1.9	Répartition des différentes espèces carbonatées en fonction du pH à une température de 20°C et à force ionique nulle	19
1.10	"Transfert de rayonnement au sein de photobioréacteurs : mise en évidence de l'absorption de l'énergie lumineuse par la culture." - crédits : J. Pruvost	20
1.11	Evolution théorique de la vitesse surfacique de croissance d'une culture de <i>Chlorella vulgaris</i> avec la température de culture	23
1.12	Évolution des productivités surfaciques et volumiques en fonction de l'intensité du flux incident pour plusieurs surfaces spécifiques	25
1.13	Exemple de systèmes de culture ouverts	28
1.14	Schéma du PBR développé par Doucha et Livansky - CD : injection de CO ₂ , RW : récupération d'eau de pluie (Doucha and Livansky, 1999)	29
1.15	Schéma général d'un photobioréacteur clos instrumenté	30
1.16	Gaines plastiques pour culture de microorganismes photosynthétiques - sociétés Exxon Mobil et Synthetic Genomics	31
1.17	Exemples de PBR cylindriques	32
1.18	Exemples de PBR plans	33
1.19	Exemples de PBR plans intensifiés	34
1.20	PBR à éclairage interne	36

1.21	Définition de l'intensité locale spécifique I_λ de l'énergie lumineuse radiante dans la direction u (Cornet et al., 1994)	42
2.1	Schéma type du photobioréacteur torique	54
2.2	Schéma type du photobioréacteur plan airlift	56
2.3	Exemples de géométries obtenues à partir de la déformation d'une sphère par le polynôme de Tchebychev pour différents ordres n de déformation et différents paramètres ε de déformation positif (première ligne) et néгатif (seconde ligne)	61
2.4	distribution de taille statistique de <i>C. vulgaris</i> . La courbe représente la courbe de tendance suivant une loi log-normale	62
2.5	Vue globale, vue de la gravure et détail de la cellule de Malassez	64
2.6	Comparaison entre une particule de Tchebychev, $T_2(0.0965)$, en bleu et une ellipsoïde de ratio de Feret $R_{Feret} = 0.824$ en rouge	67
2.7	Schéma du banc expérimentale de l'Institut Pascal (Cornet, 2007)	69
2.8	Spectre de réflexion du Spectralon [®]	70
2.9	Schéma du spectrophotomètre à sphère d'intégration Carry 5000 d'après la documentation technique de la société Agilent Technologies	71
2.10	Spectres d'émission des différents panneaux de LED utilisés	72
2.11	Spectre d'émissions des tubes fluorescents	73
2.12	Photographie du quantum mètre utilisé et tracé de sa réponse spectrale	74
2.13	Photographie du spectroradiancemètre RAMSES 81C8 (TriOS optical sensor, Germany)	75
3.1	(a) Micrograph of a <i>Chlorella</i> suspension (b) Probability distribution function of the cell radius. The full line is a log-normal fit.	90
3.2	Micrographs of <i>Chlorella</i> suspensions at various volume fractions indicated in the inserts. The images have been acquired in a quiescent state (no stresses are applied onto the sample).	90
3.3	(a) Schematic view of the Rheoscope module : CCD - digital camera, M_1, M_2 - mirrors, EP - eye piece, MO - microscope objective, WLS - white light source, CL - collimating lens, GP - glass plate, S - <i>Chlorella</i> sample, GP - glass plate, C - cone. (b) Schematic representation of the increasing/decreasing controlled stress ramp. N is the total number of steps of the ramp and t_0 is the time corresponding to each step (the characteristic forcing time).	91
3.4	Stress dependence of the viscosity of the microalgal suspension measured in a controlled stress mode for several volume fractions : (∇) - $\Phi_v = 0.082$, (\diamond) - $\Phi_v = 0.165$, (\circ) - $\Phi_v = 0.556$. For each stress value the viscosity data has been averaged for a time $t_0 = 15$ s. The full line (—) is a fit according to the Cross model, the dashed line (---) is a fit according to the Herschel-Bulkley model.	94
3.5	(a) The micrograph presented in Fig. 3.2(c) together with the contours of individual cells detected via image segmentation. (b) The corresponding Voronoi diagram corresponding to the micrograph presented in Fig. 3.2(c).	96

- 3.6 Micrograph acquired during a controlled stress ramp (see Fig. 3.3(b)) corresponding to $\tau = 0.02 Pa$ and a volume fraction within the **ST** regime ($\Phi_v = 0.15$). The bright patches correspond to agglomerations of cells (flocs) that strongly scatter the light. 97
- 3.7 (a) Micrograph of a *Chlorella* suspension with a volume fraction $\Phi_v = 0.556$ (the **YS** regime) sheared at a stress $\tau = 0.02 Pa$. The time averaged velocity field obtained via the **DPIV** method is overlapped onto the image. (b) The corresponding time-averaged mean velocity field (the false colour map) and the time averaged velocity vectors. The closed curves superposed to each panel highlight the solid-like agglomerations of *Chlorella* cells. 101
- 3.8 Dependence of the relative viscosity of the microalgal suspension η_r on the volume fraction of the microalgue Φ_V . The dashed line is a fit according to the Quemada model (Quemada, 1997) and the full line is a fit according to the Simha model, (Simha, 1952). The labels indicate the experimentally observed rheological regimes : **N** - Newtonian, **ST** - shear thinning, **YS** - yield stress. Within the **ST** and **YS** regimes, the relative viscosity has been measured at a fixed stress, $\tau = 1 Pa$. The same data is re-plotted in the inset versus $1 - \frac{\Phi_v}{\Phi_v^m}$ 102
- 3.9 Dependence of the onset of the shear thinning behavior τ_0 measured within the **ST** regime and of the apparent yield stress τ_y on the volume fraction Φ_V . The labels indicate the experimentally observed rheological regimes : **N** - Newtonian, **ST** - shear thinning, **YS** - yield stress 104
- 3.10 Viscosity measurements within the intermediate concentration regime at a volume fraction $\Phi_v = 0.148$ (**ST**, see Fig. 3.8) for both increasing (\square) and decreasing (\circ) stress ramp and several values of the characteristic forcing time : (a) $t_0 = 5 s$ (b) $t_0 = 10 s$ (c) $t_0 = 15 s$ (d) $t_0 = 30 s$ 106
- 3.11 Viscosity measurements within the highly concentrated regime at a volume fraction $\Phi_v = 0.556$ (the **YS** regime, see Fig. 3.8) for both increasing (\square) and decreasing (\circ) stress ramp. The characteristic forcing time was $t_0 = 15s$ 107
- 3.12 Dependence of the zero shear viscosity η_0 (empty symbols) and the terminal viscosity η_{int} (full symbols) measured within the **ST** regime on the increasing branch of the stress ramp on the characteristic time of forcing t_0 . The symbols refer to different volume fractions of the microalgae : (\square, \blacksquare) - $\Phi_v = 0.148$, (\circ, \bullet) - $\Phi_v = 0.165$, ($\triangle, \blacktriangle$) - $\Phi_v = 0.181$ 109
- 3.13 Dependence of the viscosity of a highly concentrated suspension (within the **YS** rheological regime,) measured at a fixed stress on the characteristic forcing time. The symbols refer to stress value : (\circ) - $\tau = 0.1 Pa$, (\bullet) - $\tau = 10 Pa$.The volume fraction is $\Phi_v = 0.37$. 110
- 3.14 (a) Représentation schématique du banc expérimental : **M** - micro-canal, **I** - entrée du micro-canal, **O** - sortie du micro-canal, **MO** - objectif du microscope, **EP** - lentille, **EC** - filtre epi-fluorescent, **L** - Panneau de diode électro-luminescente (LED), **CCD** - camera digitale, **PC** - ordinateur (b) Représentation schématique des rampes de pressions hydrostatiques. t_0 est le temps caractéristique de forçage (le temps moyen par palier de contrainte) et N est le nombre total de paliers. 114

3.15	Évolution des profils de vitesses avec la fraction volumique pour des rampes montantes (symboles pleins) et descendantes (symboles vides)	116
3.16	Evolution de la vitesse moyenne pour $\Phi_V = 0,02$ (■, □), $\Phi_V = 0,12$ (▲, △) et $\Phi_V = 0,57$ (●, ○) pour des rampes montantes (symboles pleins) et descendantes (symboles vides)	117
3.17	Visualisation d'un agrégat de cellules en écoulement à forte densité cellulaire ($\Phi_V = 0,57 - C_x = 144g.l^{-1}$)	118
3.18	Evolution de la résistance à l'écoulement pour $\Phi_V = 0,02$ (■, □), $\Phi_V = 0,12$ (▲, △) et $\Phi_V = 0,57$ (●, ○) pour des rampes montantes (symboles pleins) et descendantes (symboles vides)	118
4.1	Reconstitution de la partie imaginaire de l'indice de réfraction de <i>C. vulgaris</i> en photolimitation stricte à partir des coefficients d'absorption des pigments présents dans la cellule pour $q_{\square} = 200\mu mol_{hv}.m^{-2}.s^{-1}$	127
4.2	Reconstruction de la partie réelle de l'indice de réfraction de <i>C. vulgaris</i> en photolimitation stricte à partir des coefficients d'absorption des pigments présents dans la cellule	129
4.3	Représentation schématique de la procédure de calcul des propriétés radiatives (Dauchet, 2012)	131
4.4	Spectre de transmission d'une suspension à $0,19g/l$ de <i>C. vulgaris</i>	132
4.5	Comparaison du spectre de transmission mesuré par sphère intégrante avec les valeurs calculées par la solution de Lorenz-Mie et par l'ADA	133
4.6	Influence d'une erreur de +10% sur la mesure du rayon moyen des cellules sur la prédiction de la transmission par la solution de Lorenz-Mie	134
4.7	Influence d'une erreur de $\pm 10\%$ sur la mesure de la concentration en MS microalgale dans la suspension sur la prédiction de la transmission par la solution de Lorenz-Mie .	135
4.8	Comparaison du spectre de transmission mesuré et du spectre de transmission modélisé par la solution de Lorenz-Mie avec un ajustement de -30% en Chla	135
4.9	Fonction de phase à 430, 550 et 670nm calculée pour une suspension de <i>C. vulgaris</i> (cf. tableau 4.1)	136
4.10	Évolution du coefficient de rétro-diffusion avec la longueur d'onde	137
4.11	Évolution des coefficients massiques d'absorption et de diffusion avec la longueur d'onde pour une suspension de <i>C. vulgaris</i> (cf. tableau 4.1)	138
4.12	Schéma simplifié du banc expérimental d'étude de l'influence du spectre incident . . .	141
4.13	Résultats du suivi de la concentration en biomasse sèche et de la productivité volumique en fonction du taux de dilution pour une culture sous éclairage rouge et une sous éclairage blanc	143
4.14	Résultats du suivi de la pigmentation avec le taux de dilution pour une culture sous éclairage rouge et une sous éclairage blanc ($q_0 = 200\mu mol_{hv}.m^{-2}.s^{-1}$)	144
4.15	Superposition des points expérimentaux avec les prédictions obtenues par modélisation de la croissance de <i>C. vulgaris</i> sous éclairage blanc et rouge en fonction du taux de dilution	146

4.16	Évolution des conditions d'éclairement d'un PBR sous éclairement solaire	149
4.17	Comparaison de l'atténuation du flux solaire moyen d'été ($1273\mu\text{mol}_{h\nu}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et $\theta = 26^\circ$) et d'hiver ($130\mu\text{mol}_{h\nu}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et $\theta = 80^\circ$) d'après Pruvost <i>et al.</i> (Pruvost et al., 2011)	150
4.18	Schématisation du montage expérimental d'étude de l'influence de l'angle d'incidence .	151
4.19	Évolution théorique de l'atténuation de l'énergie radiante et de l'évolution de la productivité volumique dans l'épaisseur de culture pour une incidence normale du rayonnement blanc ou rouge	152
4.20	Évolution théorique de l'atténuation de l'énergie radiante et de l'évolution de la productivité volumique dans l'épaisseur de culture pour une incidence non normale ($\theta = 60^\circ$) du rayonnement blanc ou rouge	153
4.21	Récapitulatif des résultats théoriques obtenus pour deux spectres incidents différents (blanc et rouge) et pour deux angles d'incidence du rayonnement ($\theta = 0^\circ$ et 60°)	155
4.22	Évolution expérimentale de l'atténuation de l'énergie radiante et de l'évolution de la productivité volumique dans l'épaisseur de culture pour une incidence non normale ($\theta = 0^\circ$) du rayonnement blanc ou rouge	158
4.23	Évolution expérimentale de l'atténuation de l'énergie radiante et de l'évolution de la productivité volumique dans l'épaisseur de culture pour une incidence non normale ($\theta = 60^\circ$) du rayonnement blanc ou rouge	159

Liste des tableaux

1.1	Tableau récapitulatif des principales technologies de systèmes de culture et leurs données essentielles	37
2.1	Composition élémentaire mesurée moyennée sur trois échantillons de cellules de <i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211-19	56
2.2	Composition du milieu de culture de <i>C. vulgaris</i> (pH ≈ 7) défini pour une concentration maximale en biomasse de $4g.l^{-1}$	57
2.3	Composition de la solution de Hutner	58
2.4	Composition du milieu de conservation	59
2.5	Récapitulatif de l'analyse de taille et de forme de <i>C. vulgaris</i>	63
2.6	Mise en correspondance des mesures de biomasse sèche et des comptages cellulaires	64
2.7	Longueurs d'ondes d'analyses et coefficients à appliquer pour les équations spectrophotométriques pour une extraction au méthanol (Ritchie and Raymond, 2006, Strickland and Parsons, 1970)	65
2.8	Mesures de la masse volumique de la matière sèche de <i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211-19	66
2.9	Calcul de la fraction volumique en eau dans une cellule de <i>C. vulgaris</i>	68
2.10	Validation de l'analyse de taille et de forme	68
2.11	Valeurs des coefficients du modèle cinétique de croissance intrinsèque à <i>C. vulgaris</i> calculés	80
3.1	Range of the volume fractions of the <i>Chlorella</i> solutions investigated. C_x^{rms} and Φ_v^{rms} stand for the root mean square deviation (rms) of the dry weight concentration and of the volume fraction, respectively.	89
4.1	Caractéristique de la suspension de <i>C. vulgaris</i> , utilisée pour les mesures en sphère intégrante	132
4.2	Valeurs des PO calculées pour différents teneurs en pigments totaux, avec et sans ajustement du taux de Chla. Les calculs ont été réalisés avec la partie réelle de l'indice de réfraction présentée dans le paragraphe 4.2.2	140
4.4	Tableau de résultats des productivités volumiques obtenues sous éclairage rouge	142
4.5	Tableau de résultats des productivités volumiques obtenues sous éclairage blanc	142
4.6	Valeurs des coefficients du modèle cinétique de croissance intrinsèque à <i>C. vulgaris</i> calés d'après les points expérimentaux	145

4.7	Productivité volumique moyenne théorique obtenue pour deux spectres (blanc et rouge) et deux angles d'incidence ($\theta = 0^\circ$ et 60°)	154
4.8	Tableau de résultats obtenus en maquette froide	156
4.9	Tableau de résultats expérimentaux obtenus pour une culture de <i>C. vulgaris</i> sous différentes conditions d'éclairement à taux de dilution quasi constant	157
4.10	Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux du transfert radiatif et de son impact sur la productivité de la culture pour deux spectres différents (rouge et blanc) et pour deux angles d'incidence différents (0° et 60°)	160

Introduction

La prise de conscience internationale de l'empreinte carbone et notamment en ce qui concerne l'émission de gaz à effet de serre (tel que le CO₂ par exemple) a fortement stimulé une réorientation politique et sociale de la "demande humaine en énergie" depuis une vingtaine d'année. Ceci s'est traduit, entre autres, par la prise de décision en terme de développement durable lors du Sommet de la Terre en 1992, puis, entre autre, par la création du Grenelle de l'environnement, réunissant les 193 pays membres des Nations Unies.

Combiné à ces raisons écologiques, l'appauvrissement terrestre en combustibles fossiles associé à un besoin de plus en plus important en énergie a dirigé la recherche scientifique à étudier de nouvelles pistes en termes d'utilisation de l'énergie d'une part et de sources d'énergies (combustibles liquides notamment) d'autre part. Ce second thème de recherche a mené par exemple à la production de biocarburants à partir de biomasse issue des plantes céréalières (bio-carburants de première génération) ou des industries forestières (bio-carburants de seconde génération). Bien que l'industrie produisant les bio-carburants de première génération soit bien développée (surtout en Amérique du Sud), elle présente l'inconvénient de rentrer en compétition directe avec la production de céréales pour l'alimentation humaine ou animale.

Actuellement, beaucoup de recherches se tournent vers les carburants dits de troisième génération, issus de biomasse de microorganismes photosynthétiques (microalgues et cyanobactéries (Oncel, 2013)). Cette valorisation possible vient s'ajouter aux nombreuses voies d'utilisation de la biomasse microalgale. Les applications agroalimentaires (compléments alimentaires pour l'alimentation humaine ou animale (Becker, 2007)), environnementales (dépollution des eaux et fumées), médicales (carence alimentaire, anticancéreux (Capelli and Cysewski, 2010, Talero et al., 2012, Taylor, 2011, Mata et al., 2010), *etc.*) peuvent ainsi être citées. Par rapport aux autres ressources végétales, l'exploitation des microorganismes photosynthétiques présente plusieurs avantages : leur fort taux de croissance donne accès à des rendements supérieurs aux plantes terrestres et leur biodiversité combinée à leur capacité à orienter leur métabolisme (pour favoriser la synthèse d'un composé, par imposition de conditions de culture spécifiques) offrent un large panel d'applications.

Il existe plusieurs façon de cultiver de microorganismes photosynthétiques, selon les applications souhaitées. Premièrement, deux modes de cultures sont à distinguer : l'autotrophie et l'hétérotrophie. L'autotrophie consiste en l'apport d'une source de carbone inorganique tandis que l'hétérotrophie utilise une source de carbone organique. Lorsque les deux sources sont mélangées, on parle alors de mixotrophie. Les microorganismes sont cultivés dans des réacteurs, dont

la géométrie dépend également de l'application visée. Deux grandes familles sont à distinguer : les réacteurs ouverts et les réacteur fermés (PBR).

Bien que coûteux de par leur haut niveau de technologie, ces derniers permettent un contrôle total des conditions de culture et donnent accès à des performances largement supérieures à celles obtenues dans des systèmes de culture extensifs (type raceway). Ceci est principalement dû au fait que toutes les limitations nutritionnelles peuvent être levées à l'exception de la lumière. La vitesse de croissance des microorganismes est alors uniquement pilotée par l'efficacité thermodynamique d'utilisation des photons (Cornet, 2007) et on parle alors de croissance photolimitée. Ce mode de culture permet d'obtenir des performances proches des maxima de productivités en surface (masse de biomasse produite par unité de surface) et peut apporter une solution au problème soulevé par Menten *et al.* (Menten et al., 2013). D'après son analyse de cycle de vie, la production de bio-carburants de troisième génération serait statistiquement plus émissive en gaz à effet de serre que celles de première et seconde génération. Les principales raisons sont les productivités des cultures et les post-traitements nécessaires de la biomasse avant la production du biodiesel proprement dit. L'enjeu principal qui se détache ici est la nécessité d'une diminution des impacts de production de la biomasse. Plusieurs voies sont étudiées comme par exemple le recyclage de fumées industrielles comme source de carbone, le recyclage des milieux de culture pour limiter la consommation en eau, l'utilisation d'eaux usées comme base de milieux de culture, et l'intensification des cultures.

Ce dernier point est intéressant car il joue de façon globale sur le procédé de production. Il constitue actuellement la principale voie d'évolution de la technologies photobioréacteurs. Le principe d'intensification des photobioréacteurs consiste alors à augmenter la disponibilité de l'énergie lumineuse à la culture en diminuant les épaisseurs de culture (ce qui revient à augmenter le ratio surface éclairée sur volume réactionnel). *In fine*, cela permet alors d'augmenter les concentrations en microorganismes photosynthétiques et donc de diminuer les quantités d'eau utilisées ainsi que les coûts liés à leurs manutentions. Dans la mesure où le volume d'eau joue sur un ensemble important de postes énergétiques (agitation, régulation thermique, pompage, récolte, ...), on comprend donc qu'intensifier la production a un rôle majeur sur la diminution de l'impact du procédé dans son ensemble.

L'objectif de cette thèse est de participer à la compréhension des phénomènes liés au transfert radiatif et à l'hydrodynamique pour des cultures intensifiées d'un microorganisme photosynthétique eucaryote particulier (*Chlorella vulgaris*). A terme, ces résultats doivent servir de base à la compréhension et à la mise en œuvre de cultures intensifiées sous éclairage solaire.

Ce présent travail s'intègre donc dans ce contexte et se compose de quatre chapitres. Le premier chapitre est dédié à une étude bibliographique présentant en premier lieu la microalgue d'étude (*Chlorella vulgaris*) et les mécanismes intra-cellulaires de la photosynthèse et de la respiration. Cela vise à donner des éléments de compréhension sur la formulation des modèles de croissance. La suite de ce chapitre est consacrée à l'ingénierie des systèmes pour la culture de microorganismes photosynthétiques. Après avoir présenté les différents paramètres d'ingénierie de tels procédés, les principales géométries de systèmes de culture sont présentées. Cette partie

INTRODUCTION

se termine par un tableau récapitulatif des différents systèmes ainsi que de leurs performances. La dernière partie de ce chapitre est dédiée à la modélisation des systèmes de cultures. Il se décompose en deux catégories de modèles : les modèles de croissance et les modèles de transfert de rayonnement. Enfin, le couplage entre ces deux types de modèles est présenté, permettant ainsi la modélisation globale du système de culture en photolimitation.

Le second chapitre regroupe l'ensemble des matériels et méthodes utilisés dans ce travail. Premièrement, les systèmes de cultures sont présentés. Ensuite, les protocoles d'analyses effectuées sur la biomasse sont présentés. La dernière partie de ce chapitre présente en détail la formulation du modèle cinétique de croissance, établi par Takache (Takache, 2010), et qui sera reprise ici pour la souche d'étude, à savoir *Chlorella vulgaris*.

Le troisième chapitre concerne l'étude hydrodynamique. L'intensification des productivités des systèmes de cultures mène, par définition, à une concentration cellulaire au sein des cultures plus élevée, pouvant atteindre plusieurs dizaines de grammes de biomasse sèche par litre de culture. L'augmentation de la concentration cellulaire (et donc de la fraction volumique occupée par les cellules dans la suspension) impacte donc la rhéologie de la suspension. Quelques études ont déjà été menées sur cette modification rhéologique (Rafaï et al., 2010, Wileman et al., 2011, Adesanya et al., 2012) montrant alors une évolution vers un comportement non newtonien. Une partie de ce travail de thèse sera donc dédiée à l'étude rhéologique de suspensions microalgales sur une large gamme de concentrations. A partir de mesures rhéologiques macroscopiques, couplées à des observations micro-rhéoscopiques, le comportement de la suspension sera étudié en fonction de la fraction volumique et de la contrainte appliquée. Afin d'améliorer la compréhension de l'évolution du comportement rhéologique, des mesures microscopiques d'écoulements en micro-canal droit ont été faites. Cet écoulement étant proche de ceux rencontrés dans les systèmes de cultures, cette étude permettra de donner un aperçu du comportement de la suspension microalgale en conditions proches de la réalité (notamment en terme de confinement de l'écoulement).

Enfin, le dernier chapitre traite du transfert de rayonnement en culture concentrée, plus précisément dans le cas de PBR intensifiés fonctionnant en conditions solaires. La source solaire présente ainsi l'inconvénient, non négligeable, de ne pas être constante. Ce chapitre est donc dédié respectivement à l'étude du transfert de rayonnement en culture concentrée ainsi qu'à l'effet des conditions spécifiques d'éclairement (spectre et angle incident). L'étude du transfert de rayonnement est ainsi divisée en trois points : d'abord, il a été nécessaire de caractériser optiquement les cellules, ce qui passe par la détermination des coefficients d'absorption et de diffusion de la lumière. Ensuite, l'impact de la variation de l'angle d'incidence et du spectre sur la productivité de la culture a été investigué. Les productivités mesurées sous ces conditions spécifiques d'éclairement seront finalement confrontées à celles obtenues par la modélisation, permettant de valider l'utilisation des modèles pour des conditions d'éclairement proche de celles rencontrées sous flux solaire.

Chapitre 1

Microalgues et ingénierie des photobioréacteurs - Etat de l'art

Sommaire

1.1	Introduction	6
1.2	Culture de microorganismes photosynthétiques	6
1.2.1	Généralités sur les microorganismes photosynthétiques	6
1.2.2	Présentation de la microalgue d'étude : <i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211-19	6
1.2.3	Fonctionnement du mécanisme photosynthétique	8
1.2.4	Les réactions photosynthétiques	9
1.2.5	La respiration	11
1.2.6	La réponse à la lumière	13
1.2.7	Apport de l'énergie lumineuse	16
1.2.8	Apport en nutriments	18
1.3	Ingénierie des systèmes de culture	20
1.3.1	Paramètres d'ingénierie	20
1.3.2	Rôle de l'hydrodynamique et de la rhéologie	21
1.3.3	Paramètres opératoires	21
1.3.4	Notions de productivité des systèmes de culture	23
1.3.5	Concept de système de culture à haute productivité volumique (HPV)	24
1.4	Technologies des systèmes de culture	27
1.4.1	Systèmes ouverts	27
1.4.2	Systèmes clos	29
1.5	Modélisation des cultures et du transfert radiatif	38
1.5.1	Modèles de croissance	38
1.5.2	Modélisation du transfert radiatif	41
1.5.3	Modélisation de système de culture en photolimitation	49
1.6	Conclusion	50

1.1 Introduction

Ce premier chapitre est dédié à la présentation de l'ensemble des définitions, idées, concepts et technologies relatifs à la culture de microorganismes photosynthétiques. La première section traitera de la culture de ces microorganismes d'un point de vue biologique. Cette section reprendra les généralités sur les microorganismes photosynthétiques et le fonctionnement de la photosynthèse. Il sera en particulier discuté des phénomènes d'absorption de l'énergie lumineuse et permettra d'aller vers la compréhension de l'adaptation des microorganismes photosynthétiques à différentes conditions d'éclairement, notamment celles spécifiques à leur culture sous irradiation solaire. Les besoins essentiels en nutriments minéraux seront également présentés. Après avoir listé les besoins d'une culture de microorganismes photosynthétiques, la section suivante présentera les différents paramètres d'ingénierie des systèmes de culture, nécessaires à leur conception et à leur optimisation. Un aperçu global des technologies existantes sera présenté. Enfin, la dernière partie sera dédiée à la modélisation appliquée aux cultures photosynthétiques et en particulier pour le calcul du transfert radiatif et de la croissance photosynthétique. En effet, il s'agit là de deux aspects essentiels puisqu'ils doivent permettre la prédiction du comportement d'une culture ainsi que les performances du système, elles-mêmes étroitement liées au transfert d'énergie lumineuse.

1.2 Culture de microorganismes photosynthétiques

1.2.1 Généralités sur les microorganismes photosynthétiques

Les microorganismes photosynthétiques sont des organismes unicellulaires, croissant en milieu aqueux et ayant la capacité de convertir l'énergie lumineuse par la photosynthèse. Ce sont des organismes photoautotrophes, *i.e.* ils utilisent une source de carbone inorganique et une source de lumière pour se développer. Ils proviennent d'un groupe polyphylétique (non issu d'un ancêtre commun direct). Ce groupe comprend les bactéries photosynthétiques et les microalgues. Alors que les microalgues sont des organismes eucaryotes, les bactéries photosynthétiques sont des organismes procaryotes, ne possédant pas de noyau ni d'autres organites compartimentés. On en distingue trois familles : les cyanobactéries, les chlorobactéries et les rhodobactéries. Dans cette étude nous nous intéresserons uniquement à l'étude de la croissance de la microalgue *Chlorella vulgaris* en condition photoautotrophique menée en photobioréacteur.

1.2.2 Présentation de la microalgue d'étude : *Chlorella vulgaris* CCAP 211-19

Chlorella vulgaris CCAP 211-19 (également appelée Chlorelle), microalgue d'eau douce, est quasi sphérique (ratio de Feret d'environ 0.82), de $2\mu\text{m}$ de rayon et est une souche très bien connue puisque largement étudiée depuis plusieurs décennies (Mandalam and B.O., 1998, Pratt and Fong, 1940a, Pratt and Fong, 1940b, Pratt, 1941, Pratt, 1943).

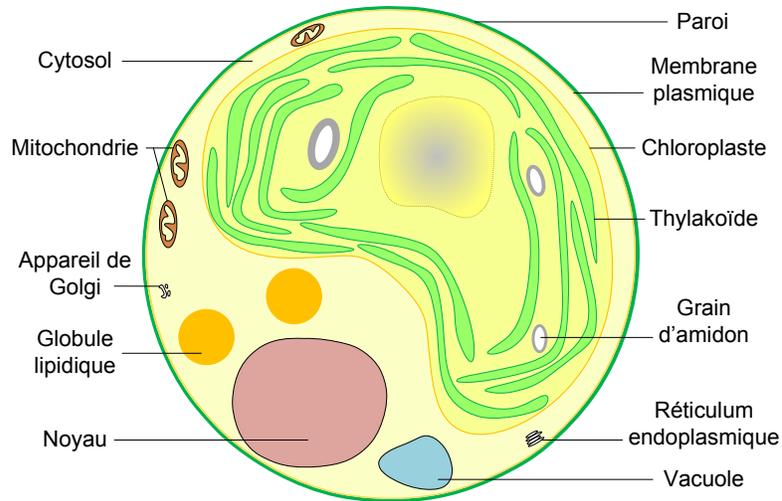


FIGURE 1.1 – Schéma d'une cellule de *Chlorella vulgaris* (Pignolet et al., 2013)

Sa haute teneur en pigments (notamment Chlorophylle a, entre 4 et 7% de sa matière sèche (MS)) en fait sa principale spécificité. Elle se compose d'environ 55 à 60% MS de protéines, 20% MS de glucides, 5 à 7% MS de pigments (majoritairement chlorophylle a, chlorophylle b et un cocktail de caroténoïdes de protections et photosynthétiques) et de 15% MS d'acides gras.

Son taux de protéines relativement important ainsi que son rapide temps de doublement (environ 12h) en font une espèce majeure pour la production à visée agroalimentaire (Spolaore et al., 2006). Son champ d'application est cependant bien plus étendu puisque la Chlorelle présente de bonnes capacités à fixer les métaux lourds et les toxines, ainsi qu'une large panoplie d'applications médicales reconnues, principalement sous forme d'extraits (antioxydant, détoxifiant, antitumorale-antiprolifératif, ...) (Merchant and Andre, 2001, Nakano et al., 2005, Kwak et al., 2012). Elle est également considérée comme candidate potentielle pour la production de lipides pour les applications biocarburants (Scarsella et al., 2010).

En 2010, G.Blanc *et al.* (Blanc et al., 2010) du laboratoire d'Information Génomique et Structurale (Marseille, France) ont séquencé le génome de *C. variabilis*. Cette étude a permis de mettre en évidence une voie de synthèse de la chitine, polysaccharide qui, lorsqu'il est associé au carbonate de calcium, devient rigide (constituant des carapaces des crustacés par exemple). Cette capacité rare dans le monde des microalgues à produire de la chitine serait due à une symbiose avec un chlorovirus ou un autre microorganisme (de la même manière que ce qui a été observé chez la microalgue *Emiliania huxleyi*). De plus, la production de composé similaire à de la chitine a été observé chez *Chlorella vulgaris*, entre autre par Kapaun et Reiser (Kapaun and Reiser, 1995). A noter également que, du fait de la présence de chitine dans la paroi cellulaire, la chlorelle est très résistante aux contaminations biologiques (bactérie, virus) ainsi qu'aux différents stress physiques (cisaillement, pression, ...).

1.2.3 Fonctionnement du mécanisme photosynthétique

L'utilisation de l'énergie lumineuse par les microorganismes photosynthétiques se fait grâce à la photosynthèse, suivant l'équation simplifiée 1.1.



Le siège de la photosynthèse est dans les chloroplastes. L'énergie lumineuse incidente est captée par les pigments et transférée aux photosystèmes. Il existe deux types de photosystèmes, travaillant en série mais à des niveaux d'énergie différents : le photosystème II (PSII) fonctionnant à 680nm et le photosystème I (PSI) fonctionnant à 700nm . Ils sont exprimés ici en équivalent de longueurs d'ondes, selon le pic d'absorption des pigments les composant : la chlorophylle A_0 au PSI et la phénophytine au PSII. Les photosystèmes se trouvent dans la membrane des thylacoïdes, à l'interface du lumen et du stroma. L'énergie collectée est ensuite transformée en énergie chimique, puis utilisée pour transformer du carbone inorganique (dioxyde de carbone, CO_2) en molécules carbonées du type glucide. La photosynthèse peut être séparée en deux types de réactions (cf. figure 1.2) :

- les réactions claires, où l'énergie lumineuse sera transformée en énergie chimique donnant un réducteur biochimique, la Nicotiamine Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH, H^+) et un composé à la base de l'énergétique cellulaire, l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP).
- les réactions sombres (Cycle de Calvin), où le carbone inorganique sera fixé par l'utilisation de l'énergie chimique des composés précédents et donnant la forme oxydée du NADPH, H^+ , le NADP^+ et de l'Adénosine Di-Phosphate (ADP).

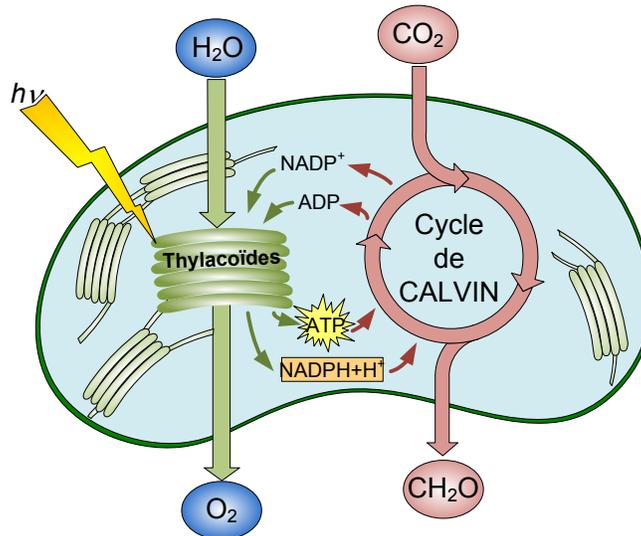


FIGURE 1.2 – Vue schématique en coupe d'un chloroplaste et réaction globale de la photosynthèse (Campbell and Reece, 2004)

Stœchiométriquement, la photosynthèse se résume en une réaction d'oxydo-réduction, catalysée par un flux de photon incident, noté $h\nu$, pouvant s'écrire comme dans l'équation 1.1.

1.2.4 Les réactions photosynthétiques

Cette section a pour but de donner un aperçu de la chaîne réactionnelle mise en jeu lors de la réaction photosynthétique, allant de l'irradiation des photosystèmes à la production d'ATP, puis à la production de molécules carbonées organiques. Dans un premier temps, nous allons nous intéresser aux réactions liées à l'absorption et l'utilisation d'un photon ainsi qu'au transport d'électrons induit. Ensuite, le cycle de Calvin (réactions sombres) sera détaillé, expliquant le mécanisme de fixation du carbone inorganique.

Les réactions claires

L'ensemble des réactions conduisant à la synthèse de l'ATP et du cofacteur NADPH, H^+ est regroupé dans la membrane des thylacoïdes (cf. figure 1.3). Une description plus détaillée est disponible dans les travaux de Allen *et al.* (Allen et al., 2011).

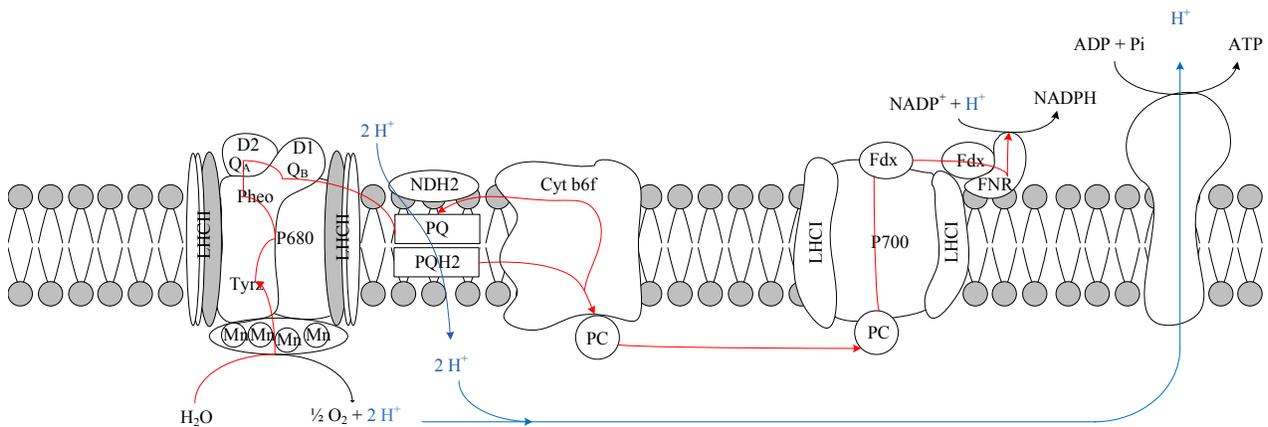


FIGURE 1.3 – Vue schématique de la structure de la chaîne photosynthétique (Degrenne, 2009)

En premier lieu, les photons incidents ayant une longueur d'onde comprise dans un domaine de radiations, appelé Photo Active Radiations (PAR, $400nm < \lambda < 700nm$) sont captés par une antenne collectrice de photons, nommée ici Light Harvesting Complex II (LHCII), composée de pigments (chlorophylle a et b et caroténoïdes de protection (PPC, Photo-Protective Carotenoids)). L'énergie des photons ayant un équivalent énergétique supérieur à celui d'un photon émis à $680nm$ ou $700nm$ ($E = \frac{hc}{\lambda}$) est dégradée jusqu'au même niveau d'énergie accepté par le photosystème correspondant. L'énergie équivalente à un photon émis à $680nm$ (PSII) ou $700nm$ (PSI) est ensuite transmise aux centres réactionnels (donneurs primaires d'électrons, appelés P680 et P700) par les protéines D1 et D2 (d'autres protéines sont également présentes, ayant pour rôle de protéger le complexe tyrosine Z, composé de 4 ions manganèse). Cet apport d'énergie au centre réactionnel va le faire passer d'un état P680 à un état excité noté P680*, libérant ainsi un électron. Ce dernier va être transféré par la plastoquinone (PQ) qui va prendre deux protons disponibles dans le stroma (intérieur du chloroplaste) pour passer à son état oxydé

PQH₂.

Les électrons récupérés par la PQ sont arrachés à l'eau par oxydation (photolyse de l'eau). Cette réaction se passe au niveau du complexe tyrosine Z et permet la libération de 4 protons, 4 électrons et 1 molécule de dioxygène par molécule d'eau oxydée. Les protons sont libérés dans le lumen (intérieur du thylacoïde).

La PQ transmet ses deux électrons au cytochrome b₆f et rejette deux protons dans le lumen. Le cytochrome b₆f pompe également deux protons du stroma vers le lumen, contribuant ainsi à accentuer le gradient de proton entre l'intérieur (fortement chargé en protons) et l'extérieur du thylacoïde (faiblement chargé). Les deux électrons sont ensuite transmis à un second transporteur d'électrons, la plastocyanine (PC). La PC va transmettre un électron à la fois au P700. Le P700 est similaire au P680, excepté qu'il fonctionne à un équivalent énergétique d'un photon à 700nm. Le P700 va accumuler deux électrons, ce qui va le faire passer à son état excité P700*.

Il va ensuite céder ses électrons à la ferrédoxine (Fd). La ferrédoxine transfère ses électrons à l'enzyme ferrédoxine NADP réductase (FNR) qui permettra la réduction du NADP⁺ en NADPH, H⁺, ce qui induit le pompage d'un proton supplémentaire du stroma vers le lumen. Le gradient de proton généré par la photolyse de l'eau est utilisé comme force proton-motrice pour la synthèse d'ATP par l'enzyme ATP synthase à partir d'ADP et de phosphate inorganique. L'ensemble de ces réactions peut être reporté sur un graphique, représentant les différents couples rédox actif lors du transport acyclique (schéma en Z) et lors du transport cyclique d'électrons (cf. figure 1.4).

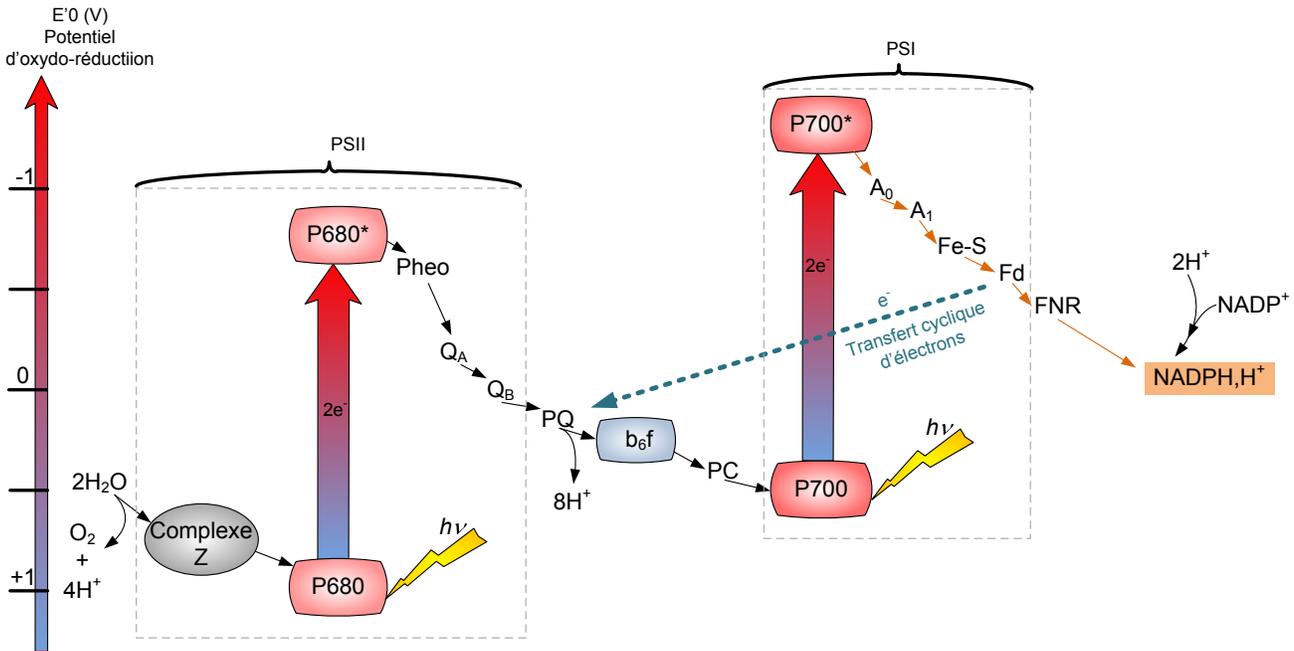


FIGURE 1.4 – Schématisation du transport acyclique (schéma en Z) et du transport cyclique, ou schématisation des réactions d'oxydo-réduction mises en jeu lors de la photosynthèse

Comme le montre le schéma en Z de la figure 1.4, il existe deux voies de transfert d'électrons : une voie acyclique, débouchant sur la synthèse d'ATP et de NADPH, H^+ par photophosphorylation, et une seconde, appelée transfert cyclique d'électrons. Il s'agit d'un transfert direct d'un électron de la ferrédoxine à la PQ. Ceci à pour incidence le pompage de protons par le cytochrome, ce qui augmente le gradient de proton et favorise la production d'ATP, sans produire de NADPH, H^+ .

Les vitesses spécifiques de production d'ATP et de NADPH, H^+ jouent directement sur le métabolisme et la croissance d'un microorganisme photosynthétique. Le rapport de ces deux termes (défini comme le rapport $P/2e^-$ par Cornet (Cornet, 2007)) traduira l'ajustement du métabolisme énergétique de la cellule. De la même manière, on définit le quotient photosynthétique, Q_P , comme le rapport entre les vitesses de production d'une mole de dioxygène et celle de consommation d'une mole de dioxyde de carbone.

De la même manière, le rapport QR_{O_2} (Quantum Requirement for oxygen production) définit le nombre de photons nécessaire à la production d'une mole de dioxygène. Théoriquement cette valeur est de huit photons par molécule de dioxygène (Takache, 2010).

Les réactions sombres

La fixation d'une molécule de CO_2 par la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) appelle la consommation de deux molécules de NADPH, H^+ et de trois molécules d'ATP pour la production de deux molécules de 3-phosphoglycérate. A partir de cette dernière molécule, les lipides, acides aminés, acides carboxyliques, et glucides pourront être synthétisés. La conversion de molécules de CO_2 se fait en quatre phases (cf. figure 1.5) : la phase de production de la RuBisCO, la phase de fixation du carbone inorganique, la phase de réduction d'une molécule de 3-phosphoglycérate et enfin la phase de régénération du Glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P) en Ribulose 5-phosphate (Karp et al., 2010).

1.2.5 La respiration

La respiration s'observe quand une cellule consomme du dioxygène et produit du dioxyde de carbone ; on parle alors de phosphorylation oxydative. Chez les organismes eucaryotes, la respiration est concomitante à la photosynthèse, comme l'a mentionné Martzloff par exemple (Martzloff, 2013). Le siège de la respiration est la mitochondrie, organite sub-cellulaire. La mitochondrie possède plusieurs sous-compartiments : la matrice mitochondriale, séparée par une membrane interne et un espace intermembranaire, compris entre la membrane externe et interne.

La phosphorylation oxydative débute par l'oxydation d'une molécule de NADPH, H^+ qui va fournir deux électrons au premier complexe de la chaîne de transport d'électrons, schématisée sur la figure 1.6. Deux protons sont également pompés de la matrice et stockés dans l'espace intermembranaire. Les électrons proviennent aussi de la réduction d'une molécule de flavine

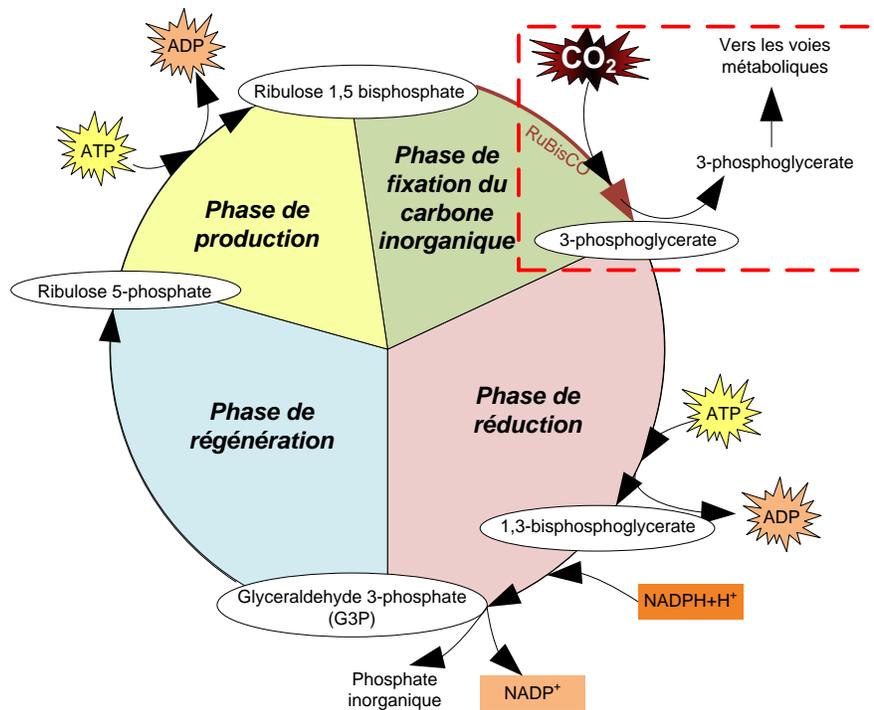


FIGURE 1.5 – Schématisation du cycle de Calvin pour la fixation du carbone inorganique

adénine dinucléotide (FADH_2) par un second complexe, la succinate déshydrogénase. La molécule de FADH_2 est un produit provenant de la dégradation du pyruvate en dioxyde de carbone dans le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs produit également une molécule d'ATP pour trois de NADPH, H^+ consommées.

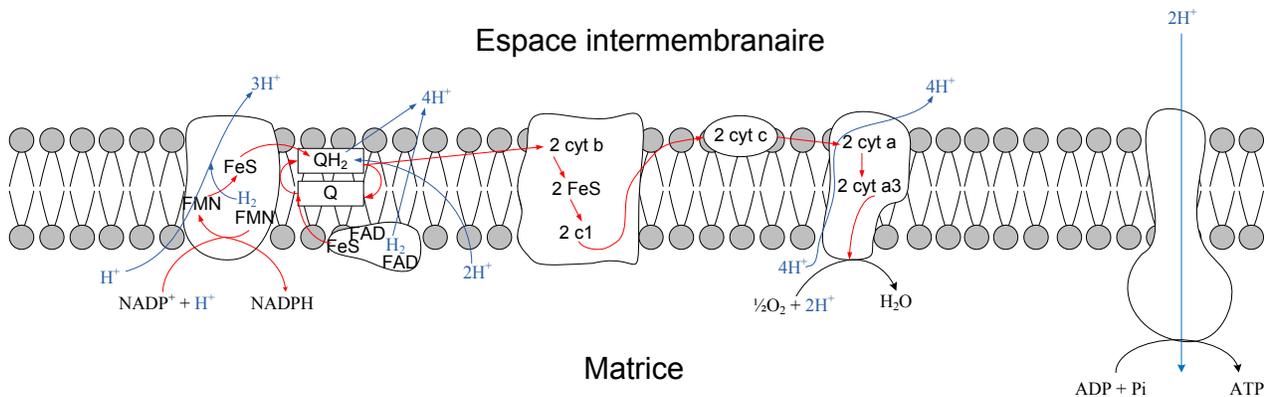


FIGURE 1.6 – Schéma de la chaîne de transport des électrons dans la membrane interne des mitochondries (Degrenne, 2009)

Le premier complexe est nommé NADH-Coenzyme Q oxydoréductase. Les deux électrons réduisent l'ubiquinone, qui devient QH_2 et transfère ses électrons au niveau d'un troisième complexe, la Q-cytochrome-c-oxydoréductase, en provoquant le pompage d'un proton, stocké dans l'espace intermembranaire. Le quatrième complexe, le cytochrome c oxydase, récupère les

électrons (un électron à la fois) du complexe III et les transmet au dioxygène qui, avec les protons disponibles, va former de l'eau. Au final, l'ATP synthase, utilisant la force proton-motrice, va conduire à la production d'ATP.

Pour caractériser l'énergie produite par phosphorylation oxydative, le rapport entre le nombre de molécules d'ATP produites et le nombre de molécules de dioxygène consommées est défini par le rapport P/O . De la même manière que pour les rapports Q_P et QR_{O_2} , les rapports Q_R et QR_{CO_2} sont définis comme (Takache, 2010) :

- le rapport entre la vitesse de production d'une molécule de dioxyde de carbone et celle de consommation d'une molécule de dioxygène, Q_R
- le nombre de photons utilisé et le nombre de molécules de dioxyde de carbone, QR_{CO_2} .

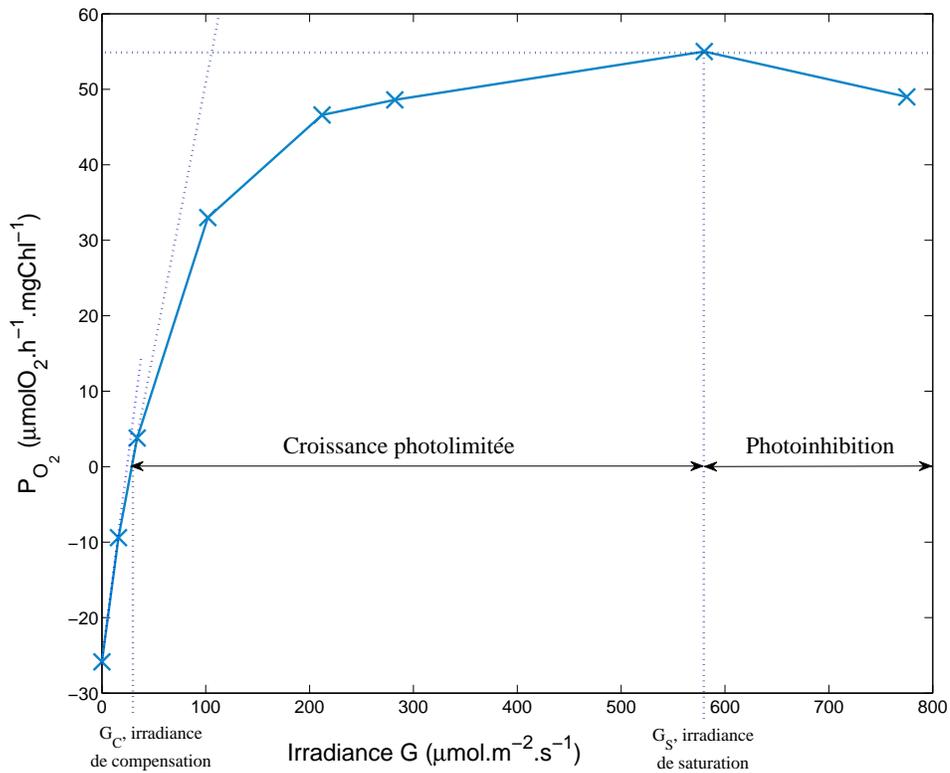
1.2.6 La réponse à la lumière

Évolution avec le flux capté

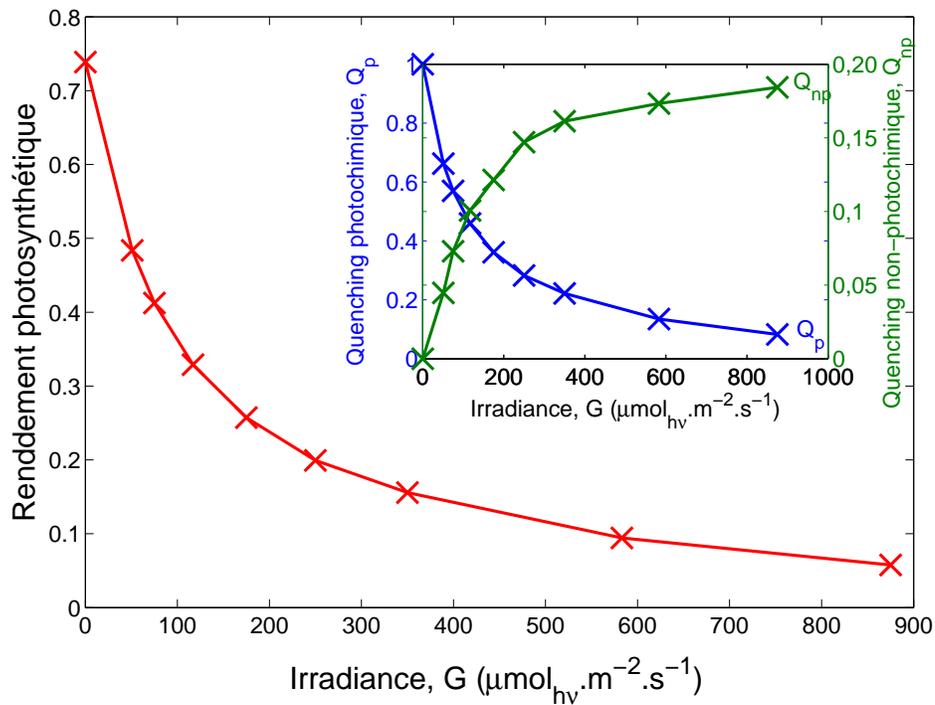
Les réactions photosynthétiques sont globalement dépendantes de l'énergie lumineuse captée, bien que l'évolution des rendements de croissance ou d'utilisation des photons ne soit pas linéaire avec le flux de photons. L'évolution du taux de croissance avec l'augmentation de la densité de flux peut être mise en évidence par la mesure du dégagement de dioxygène (Richmond, 2004). Les résultats obtenus d'après cette méthode donnent la courbe type, comme celle présentée sur le graphique 1.7a. Trois zones de fonctionnement du mécanisme photosynthétique sont mises en évidence, exprimées ici en fonction de la lumière reçue (irradiance, G) :

- la première vaut pour une plage d'irradiance de $0 < G < G_C$. Dans ce premier intervalle, les centres réactionnels ne reçoivent pas suffisamment de photons, ce qui permet à la phosphorylation oxydative d'être prédominante. Cet effet a été observé chez *Chlorella* par Kok (Kok, 1948). G_C est l'irradiance de compensation, valeur à partir de laquelle les réactions photosynthétiques deviennent majoritaires sur la respiration.
- dans une plage d'irradiance de $G_C < G < G_S$, la croissance est dite photolimitée. Le taux de croissance (donc le taux de dégagement de dioxygène) va croître jusqu'à une valeur maximale, G_S . Cette valeur est appelée irradiance de saturation.
- pour $G > G_S$, le microorganisme entre en photoinhibition, avec une diminution progressive de la croissance avec l'irradiance. Dans cette phase, la concentration en caroténoïdes de protection (pigments) va notamment augmenter et celle des chlorophylles va diminuer. Comme exemple de ce phénomène, on peut citer les cultures de *Dunaliella salina* et *Haematococcus pluvialis* qui, en conditions d'excès de lumière, vont accumuler des globules de caroténoïdes (respectivement β -carotène et astaxanthine) à l'extérieur de leurs chloroplastes. En augmentant encore l'irradiance, il peut y avoir photodégradation de la chaîne photosynthétique et mort de la cellule.

La fluorescence naturelle de la chlorophylle permet également de mettre en évidence l'effet de l'augmentation de l'irradiance sur le rendement photosynthétique du PSII (cf. graphique 1.7b). En appliquant des pulses saturants de lumière à intervalles de temps réguliers, la fluorescence mesurée traduit l'efficacité des centres réactionnels ouverts, et permet donc d'exprimer un rende-



(a) Évolution-type de la production de dioxygène avec l'irradiance



(b) Évolution-type du rendement photosynthétique avec l'irradiance

FIGURE 1.7 – Impact de la densité de flux sur le mécanisme photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii*. Données obtenues par H. Takache en 2008

ment photosynthétique. La diminution très nette de ce rendement est significative d'une réponse réduite du microorganisme aux forts flux lumineux.

Évolution avec le spectre incident

Il est à noter que l'irradiance n'est pas la seule caractéristique à avoir une influence sur la croissance des microorganismes photosynthétiques : le spectre d'émission de la source de lumière a également une influence. Par exemple, Hess et Tolbert (Hess and Tolbert, 1967) ont montré qu'une illumination bleu ou rouge imposait un temps d'adaptation de trois à cinq jours du taux de croissance avant que ce dernier ne devienne équivalent à celui mesuré sous éclairage blanc. Wang *et al.* (Wang et al., 2007) ont quant à eux montré que la croissance de *S. platensis* est favorisée sous irradiation rouge et limitée sous illumination bleu. Figueroa *et al.* (Figueroa et al., 1995) observent une augmentation du taux de croissance de *Porphyra umbilicalis* sous éclairage rouge en comparaison avec un éclairage bleu. Chez *Cylotella nana* et *Dunaliella terliolecta*, l'éclairage vert semble défavoriser la croissance alors que le bleu la favorise (par rapport à un éclairage blanc) d'après Wallen et Geen (Wallen and Geen, 1971).

L'ensemble des travaux conclut à un réel effet du spectre d'émission de la source lumineuse sur la réponse des microorganismes photosynthétiques. Il apparaît en particulier que la composition en pigments d'un microorganisme joue un rôle primordial sur la (les) longueur(s) d'onde(s) pour laquelle le taux de croissance sera optimal. En revanche, la majeure partie des exemples, cités ci-dessus, concerne des cultures de microalgues en erlenmeyer, à petite échelle (et le plus souvent en conditions peu contrôlées). Sur des temps plus longs en culture stabilisée Fargès *et al.* (Fargès et al., 2009) observent une modification pigmentaire qui tend à réduire l'influence du spectre incident. Ainsi, ces auteurs ont montré sur *Arthrospira platensis* que l'utilisation d'une source de lumière rouge (à 620nm) permettait d'obtenir une productivité en biomasse identique par rapport à un spectre rouge et bleu ainsi qu'une culture plus stable dans le temps. L'obtention de cette biomasse se fait au détriment de la concentration en phycocyanine (un des pigments majoritaire chez *A. platensis*). Cette variation physiologique permet d'équilibrer le flux d'électrons dans le schéma en Z de la photosynthèse (Fargès et al., 2009). Une partie de ce travail consistera à étudier l'impact d'une modification de spectre sur la microalgue *Chlorella vulgaris*. Cela sera réalisé en culture continue en photobioréacteur torique en vue de la modélisation du transfert radiatif et de son impact sur la productivité du système.

L'adaptation à la lumière

La réponse à la lumière présentée précédemment est le résultat complexe du métabolisme de conversion mais également de captation par les pigments et les photosystèmes, qui disposent de mécanismes complexes d'adaptation. Ainsi, lors d'une modification de la densité de flux, la chaîne photosynthétique va subir deux types de modifications : soit une modulation de la concentration / composition en pigments, soit une modification du nombre de centres réaction-

nels. Le but de cette adaptation est d'équilibrer l'absorption de la lumière et la production de NADPH, H^+ et d'ATP par les voies cycliques et acycliques.

La durée pour adapter les changements de la concentration / composition pigmentaire varie selon l'espèce de quelques heures à plusieurs jours. En cas d'urgence (augmentation brutale de l'irradiance), l'inactivation réversible de tout ou partie des centres réactionnels du PSII est alors mise en place. L'ensemble de ces mécanismes a pour but d'ajuster la quantité d'énergie transmise au métabolisme sur des dynamiques très variées, telles que rencontrées notamment en conditions solaires de croissance.

1.2.7 Apport de l'énergie lumineuse

Atténuation de la lumière

En culture de microorganismes photosynthétiques, l'apport de lumière est important puisqu'il va impacter directement la croissance. Il faut distinguer l'énergie captée en surface (caractérisée usuellement par le terme PFD pour Photon Flux Density) de l'énergie disponible dans le volume de culture. L'énergie lumineuse subira en effet une atténuation avec la profondeur de culture. Cette atténuation sera fonction de la composition du milieu (types et concentrations de sels) ainsi que de la taille, de la forme et du nombre de cellules. Ces derniers paramètres vont jouer sur la capacité des cellules à diffuser et/ou absorber la lumière (cf. section 1.5.2). Cette atténuation, qui peut être observée et modélisée (cf. section 1.5.2), est un phénomène clé des cultures de microorganismes photosynthétiques. Comme il a été dit précédemment, lorsque les microalgues sont soumises à une irradiation dans le PAR, il y a compétition entre les mécanismes de photosynthèse et de respiration. Il existe une valeur d'irradiance, dite de compensation, en deçà de laquelle les réactions photosynthétiques deviennent minoritaires devant la respiration. Cette valeur a pu être déterminée par Takache (Takache, 2010) pour *Chlamydomonas reinhardtii* autour de $G_c = 10 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (Takache, 2010).

Partant de ce constat, on définit la profondeur d'extinction de l'énergie lumineuse comme la profondeur nécessaire à l'extinction totale du flux lumineux incident γ . Elle se définit comme le rapport entre la profondeur recevant une irradiance supérieure à G_c et la profondeur de la culture. Ce rapport est important puisqu'il permet de définir trois états de fonctionnement d'un PBR en mode continu, schématisés sur le graphique 1.8. Ces trois états sont :

- $\gamma < 1$; l'ensemble de la culture ne reçoit pas l'énergie lumineuse nécessaire à la prédominance de la photosynthèse sur la respiration. La culture est en état de photolimitation (ou limitation physique), et il existe une zone sombre qui sera néfaste à la production du système, si le processus de respiration est actif.
- $\gamma = 1$; toute la culture reçoit un flux de photons suffisant pour favoriser la photosynthèse mais il n'y a pas de zone sombre : l'irradiance en fond de culture est égale à celle de compensation. Dans ce cas les performances du système sont maximales : on parle de limitation physique stricte, ou luminostat.
- $\gamma > 1$; la culture est totalement illuminée et l'irradiance en fond de culture est supérieure

à celle de compensation. La culture est dite en régime cinétique, avec une transmission d'une partie de l'énergie lumineuse, menant donc à une perte de performance par rapport au régime de luminostat.

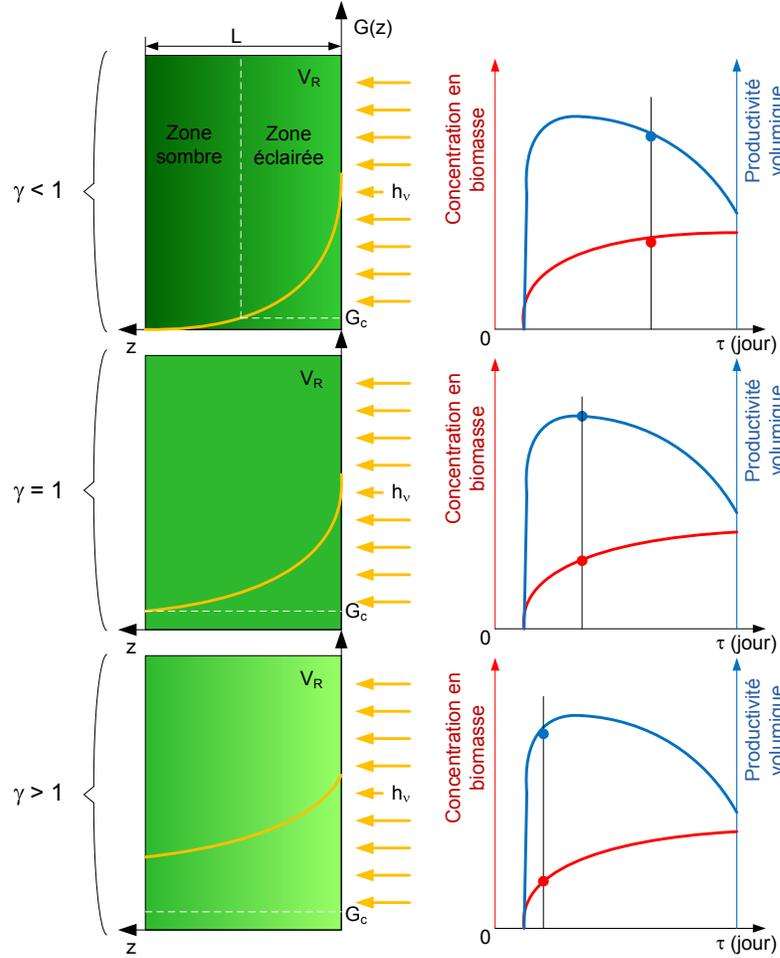


FIGURE 1.8 – Représentation schématique des trois états de transfert radiatif rencontrés en culture continue de microalgues, d'après Pruvost *et al.* (Pruvost and Cornet, 2012)

Vitesse spécifique d'absorption des photons, \mathcal{A}

Une autre manière de représenter l'atténuation de l'énergie radiante au sein de la culture est de travailler en vitesse volumétrique d'absorption des photons (Cassano et al., 1995), notée \mathcal{A} (cf. équation 1.2).

$$\mathcal{A} = \int_{\lambda} \int_{4\pi} E a_{\lambda} C_x I_{\lambda} d\lambda d\omega \quad (1.2)$$

Dans l'équation 1.2, \mathcal{A} s'exprime en $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$, $E a_{\lambda}$ est le coefficient massique d'absorption à une longueur d'onde (λ) donnée, C_x la concentration massique en biomasse sèche dans la culture, I_{λ} l'intensité lumineuse spécifique à la longueur d'onde λ et ω l'angle solide. Ces termes seront expliqués en détails dans la section 1.5.2.

Comme pour l'irradiance (G), \mathcal{A} peut être intégré sur l'ensemble de la culture. Dans le cas d'un PBR plan d'épaisseur de culture L (cf. équation 1.3), cette intégration se fera suivant la profondeur de culture z et donnera la valeur moyenne de la vitesse volumétrique d'absorption des photons ($\langle \mathcal{A} \rangle$).

$$\langle \mathcal{A} \rangle = \frac{1}{L} \int_0^L a(z) I_\lambda(z) dz \quad (1.3)$$

$$a(z) = E a \cdot C_x(z)$$

A noter qu'elle peut être exprimée également par unité de masse de la biomasse ($\mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Dans ce cas, l'équation 1.3 deviendra l'équation 1.4. \mathcal{A} deviendra alors la vitesse spécifique d'absorption des photons.

$$\mathcal{A} = \int_{\lambda} \int_{4\pi} E a_{\lambda} I_{\lambda}(z) d\omega d\lambda \quad (1.4)$$

Contrairement à G qui traduit l'énergie radiante disponible, \mathcal{A} correspond à l'énergie absorbée et utilisée pour les photoréactions. C'est notamment le cas lorsque cette grandeur est exprimée par unité de masse.

De la même façon que l'irradiance de compensation (G_c) est définie, l'énergie minimale nécessaire pour favoriser les réactions photosynthétiques est notée \mathcal{A}_c .

1.2.8 Apport en nutriments

Pour qu'un microorganisme photosynthétique se développe, il a besoin de nutriments essentiels, assurant au minimum une source d'ions nitrates (ou ammoniums), sulfates et phosphates. Lors de cultures artificielles (cultures forcées par l'Homme), ces nutriments sont apportés sous forme de sels chimiques dissous en solution aqueuse. La composition du milieu de culture est ajustée selon les besoins spécifiques du microorganisme cultivé. Pour *Chlorella vulgaris*, une description détaillée du milieu de culture utilisé est donnée dans la partie 2.1.3. En pratique, l'apport de nutriments peut se faire de trois manières différentes :

1. une dose importante est apportée uniquement en début de culture, on parle de mode de culture *Batch* ou *discontinu*,
2. la solution est apportée de manière continue à la culture (une partie de la culture est alors renouvelée en permanence), on parle de mode culture *Continu*,
3. l'apport de milieu neuf se fait ponctuellement en cours de culture, on parle de mode *Fed-Batch* ou *Semi-continu*.

En ce qui concerne le mode continu, on peut distinguer deux cas :

- l'apport du milieu est fixé par le débit de la pompe d'alimentation. Il s'agit du mode chemostat. Toutes les cultures de ce travail ont été réalisées en mode chemostat.
- l'apport du milieu est régulé en fonction de la quantité de biomasse dans la culture. Il s'agit du mode turbidostat. Ce mode d'apport du milieu neuf nécessite d'implanter une

mesure de la biomasse dans le réacteur, comme par une sonde optique mesurant la turbidité (pour la culture de microalgue, il peut s'agir de la densité optique (absorbance) mesurée à $750nm$), asservissant la pompe d'alimentation.

La photosynthèse nécessite également une source de carbone inorganique. Le dioxyde de carbone gazeux n'est pas directement assimilable par les microorganismes photosynthétiques. Seul le CO_2 dissous et les ions carbonatés (HCO_3^- et CO_3^{2-}) sont assimilés. Comme le montre la figure 1.9, la concentration en espèces issues de la dissolution du CO_2 dans l'eau est fonction du pH. Le pH de la culture va donc avoir un impact sur les espèces carbonatées disponibles. Dans le cas de *C. vulgaris*, le pH optimal de culture est de 7,5. Ceci impose donc une prédominance du CO_2 dissous et des ions HCO_3^- dans le milieu de culture.

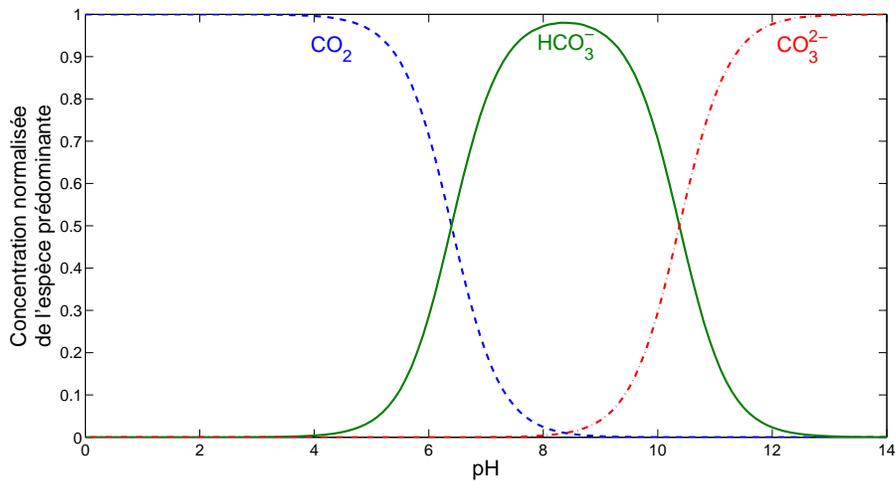


FIGURE 1.9 – Répartition des différentes espèces carbonatées en fonction du pH à une température de $20^{\circ}C$ et à force ionique nulle

Récemment, une étude poussée a été menée au laboratoire GEPEA (Le Gouic, 2013). Cela a permis de déterminer l'impact d'une limitation de la source de carbone sur la croissance de *Chlorella vulgaris* (productivité et composition de la biomasse). Il a ainsi pu être mis en évidence, pour un flux donné de $250\mu mol_{hv}.m^2.s^{-1}$, la gamme de concentration minimale en carbone inorganique dissous au delà de laquelle la croissance de *C. vulgaris* n'est pas limitée par la source de carbone (entre 4 et 8 mM). Pour des cultures non carencées en nutriments, ceci a été pris en compte dans cette étude, seule la lumière étant alors limitante à la croissance.

1.3 Ingénierie des systèmes de culture

1.3.1 Paramètres d'ingénierie

Géométrie des systèmes de culture

La géométrie du système de culture va avoir un impact important sur le transfert de lumière au sein de la culture. Il existe deux grands types de géométries, en fonction de la surface de captation du flux lumineux : les géométries planes et les géométries cylindriques.

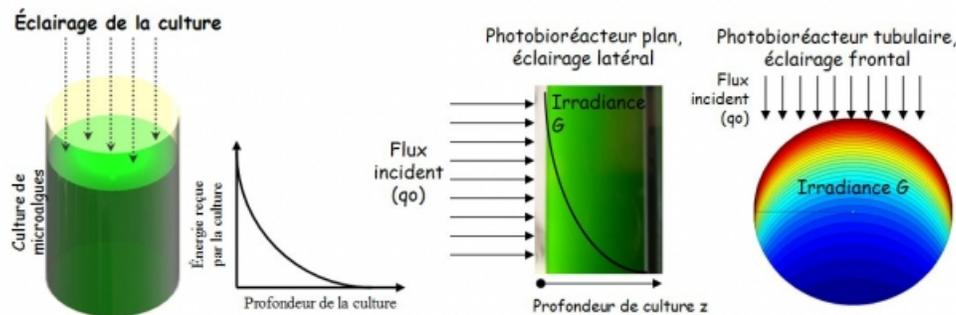


FIGURE 1.10 – "Transfert de rayonnement au sein de photobioréacteurs : mise en évidence de l'absorption de l'énergie lumineuse par la culture." - crédits : J. Pruvost

Comme le montre la figure 1.10, la géométrie plane permet d'atteindre une atténuation de la lumière monodirectionnelle. Les géométries cylindriques, lorsqu'elles sont éclairées d'un seul côté (cas du solaire), amènent à une répartition plus complexe du fait de l'absence de symétrie cylindrique. Une atténuation monodirectionnelle sera obtenue si un éclairage radial symétrique est appliqué (Takache et al., 2010).

Une description plus détaillée des différentes technologies existantes, ainsi que leur caractéristiques et avantages principaux sera donnée dans la section 1.4.

Surface spécifique

La surface spécifique, notée a_S et exprimée en $m^2 \cdot m^{-3}$ (soit en m^{-1}), est le rapport entre la surface éclairée et le volume de culture. Cette grandeur est très importante car elle relie la captation (liée à la surface) et l'atténuation (liée au volume) de la lumière. L'augmentation de la surface spécifique conduira nécessairement à la réduction des épaisseurs de cultures. Dans le cas des systèmes plans, on a en effet $a_S = \frac{S}{V} = 1/L$ ($a_S = 2/r$ dans le cas de technologies cylindriques, avec r le rayon du cylindre). Lorsque les valeurs importantes de a_S sont atteintes (*i.e.* $a_S > 100m^{-1}$), les épaisseurs de cultures rencontrées sont alors inférieures au centimètre. Cela conduit à des problématiques d'écoulement en milieu confiné. Comme nous le verrons par la suite, l'augmentation de a_S est une condition nécessaire pour atteindre des hautes valeurs de productivités volumiques (cf. section 1.3.4).

1.3.2 Rôle de l'hydrodynamique et de la rhéologie

L'hydrodynamique a un rôle important en assurant l'homogénéité de la culture et en jouant sur les transferts de matière, de chaleur et de lumière (Pruvost, 2000, Pruvost et al., 2006). Comme l'ont montré Pruvost *et al.* (Pruvost et al., 2008), du fait de l'atténuation et du mélange hydrodynamique, les cellules microalgales passent systématiquement de la zone sombre à la zone éclairée. Ces cycles, appelés régimes fluctuants de lumière (ou L/D cycles pour Light/Dark cycles), peuvent être obtenus par une approche Lagrangienne, permettant le calcul de la variation au cours du temps de l'énergie lumineuse reçue par les cellules en circulation. Takache (Takache, 2010) a étudié le couplage non linéaire entre l'hydrodynamique et les L/D cycles pour *Chlamydomonas reinhardtii*. Il a mis en évidence que le microorganisme ne semblait pas réagir aux variations de flux de manière instantanée mais s'adaptait à la moyenne des variations rencontrées.

Une mauvaise maîtrise de l'hydrodynamique peut également favoriser la formation de biofilm ou d'agrégats de cellules (flocs). Ceci est d'autant plus vrai que le milieu est confiné et que la concentration cellulaire est importante. Davies-Colley *et al.* (Davies-Colley et al., 1986) ont d'ailleurs montré que la présence de flocs dans une culture altérerait grandement l'absorption de la lumière par la culture.

L'augmentation de la concentration cellulaire mène aussi à des propriétés rhéologiques différentes d'un fluide tel que l'eau (milieu nutritif des cellules). Plusieurs caractérisations rhéologiques de suspension de microalgues ont déjà été réalisées à diverses concentrations. On peut par exemple citer les travaux de Rafaï *et al.* (Rafaï et al., 2010) sur la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*, qui constatent une forte dépendance de la viscosité avec la fraction volumique (rapport volume de cellule sur volume total de culture). Wileman *et al.* (Wileman et al., 2011) ont également montré l'apparition d'un comportement rhéofluidifiant avec l'augmentation de la concentration. Adesanya *et al.* (Adesanya et al., 2012) ont constaté l'apparition de flocs expliquée par des interactions de type Van Der Waals. Cependant ces travaux n'ont pas porté sur des fractions volumiques supérieures à 15% (ce qui correspond à environ $C_x = 38g/l$). Seuls Wu et Shi (Wu and Shi, 2008) ont mis en évidence un comportement de type fluide à seuil pour des suspensions de *Chlorella pyrenoidosa* très concentrées. A noter par ailleurs que la fraction volumique maximale théorique est de 74%, soit $C_x = 208g/l$ pour *C. vulgaris*.

1.3.3 Paramètres opératoires

Taux de dilution et temps de séjour

Comme il a déjà été vu dans la section 1.2.8, l'apport de la solution nutritive (milieu de culture) peut se faire de manière continue. Le débit d'alimentation va imposer un temps de séjour (τ) des cellules dans le système de culture.

L'inverse du temps de séjour est le taux de dilution, noté D et exprimé en $temps^{-1}$. Il représente le pourcentage du volume réactionnel renouvelé par unité de temps. Expérimentalement, D est

le rapport entre le débit d'alimentation et le volume réactionnel comme le montre l'équation 1.5.

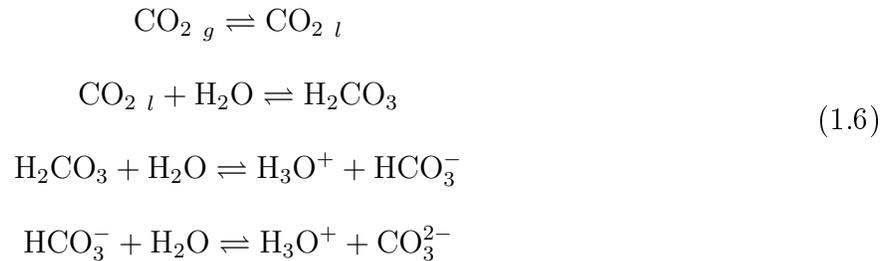
$$\tau = \frac{1}{D} = \frac{V_R}{Q} \quad (1.5)$$

Le temps de séjour (ou taux de dilution) est une grandeur importante puisque c'est lui qui, pour un flux lumineux donné, permettra d'être ou non à la configuration optimale de fonctionnement du système (*i.e.* $\gamma = 1$, cf. figure 1.8) en jouant sur la concentration en biomasse obtenue dans le PBR.

pH

Le pH joue sur le milieu de culture (espèces carbonatées par exemple, c.f. équations 1.6) mais également sur les réactions biologiques. Comme l'ont montré Rachlin et Grosso (Rachlin and Grosso, 1991), le taux de croissance d'une culture de *Chlorella vulgaris* est optimal pour un pH entre 7,5 et 8. La valeur de 7,5 sera retenue comme valeur de consigne pour la suite des expérimentations.

La régulation du pH peut se faire soit par injection d'acide-base, soit par injection de dioxyde de carbone. Dans le cas présent, cette dernière sera appliquée puisqu'en plus de réguler le pH, le CO₂ injecté formera des ions carbonatés, source de carbone pour les microorganismes. Le mécanisme de dissolution et formation des ions carbonates et bicarbonates est présenté dans le système 1.6.



Température

La température de l'environnement d'un organisme est un paramètre important puisque l'état physiologique en dépend. Aussi, chaque microorganisme a une température de culture optimale, pour laquelle son taux de croissance (ou sa productivité) sera maximale (cf. figure 1.11). Il existe plusieurs travaux, notamment sur les bactéries, visant à modéliser le taux de croissance d'un microorganisme en fonction de sa température de culture (Alexandrov and Yamagata, 2007, Zwietering et al., 1991).

Lemasson (Lemasson, 2011) a repris les modèles de Ratwosky (Zwietering et al., 1991), de Hinshelwood (Zwietering et al., 1991) et d'Alexandrov (Alexandrov and Yamagata, 2007) pour les appliquer à la culture continue de *C. vulgaris* à température contrôlée. Il a obtenu un écart entre les modèles et les expérimentations inférieur à 10%. La température optimale de culture est alors estimée autour de 21°C. Cette valeur semble être en accord avec celle obtenue

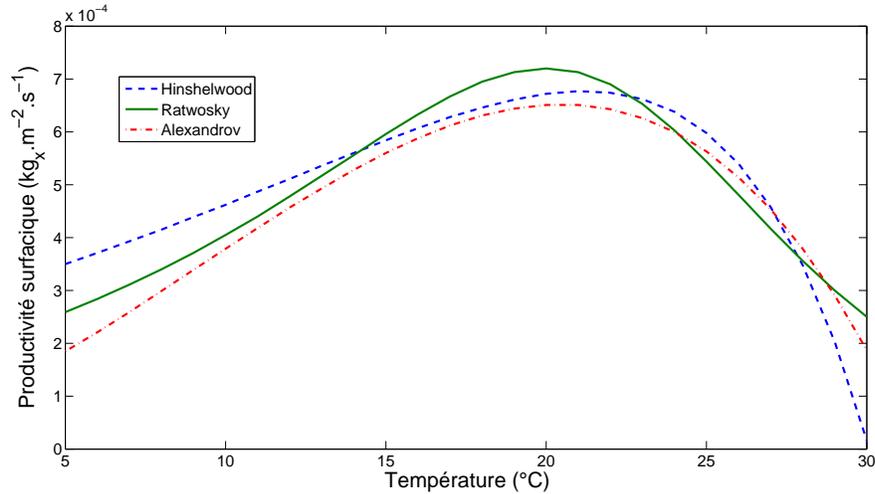


FIGURE 1.11 – Evolution théorique de la vitesse surfacique de croissance d'une culture de *Chlorella vulgaris* avec la température de culture

par Sayed et El-Shahed (Sayed and El-Shahed, 2000) qui trouvaient une température optimale de culture de l'ordre de 25°C. Il est à noter que, de ces résultats, découle toute une nouvelle problématique liée à l'utilisation du flux solaire. En effet, le rayonnement solaire est composé en grande partie de rayonnement infra-rouge qui va chauffer la culture. Il est donc très important de réguler la température de la culture pour la maintenir à une valeur la plus proche possible de son optimum. Par la suite, toutes les cultures réalisées étaient thermostatées à 21°C, le rôle de la température n'ayant pas été étudié ici.

1.3.4 Notions de productivité des systèmes de culture

La productivité d'un système de culture est une grandeur largement utilisée pour caractériser ses performances et comparer différents systèmes entre eux. Deux types de productivités peuvent être définis en culture de microorganismes photosynthétiques : la productivité volumique et la productivité surfacique.

La productivité volumique (P_x) définit la quantité de biomasse produite par volume de culture et par unité de temps. Cornet et Dussap (Cornet and Dussap, 2009) ont montré que la productivité volumique maximale d'une culture pouvait se calculer théoriquement d'après l'équation 1.7.

$$\langle P_x \rangle_{max} = \rho_M \bar{\phi} \frac{2\alpha}{1+\alpha} a_S K \left[\frac{\bar{x}_d}{2} \ln \left[1 + \frac{2\bar{q}}{K} \right] + (1 - \bar{x}_d) \overline{\cos \theta} \ln \left[1 + \frac{\bar{q}}{K \overline{\cos \theta}} \right] \right] \quad (1.7)$$

Dans cette équation, ρ_M est le rendement photochimique maximum, $\bar{\phi}$ le rendement stœchiométrique quantique massique, α est le module linéique d'absorption (cf. section 1.5.2), K le coefficient de demi-saturation de la photosynthèse. \bar{q} représente l'ensemble du flux de photons incident, direct ($q_{//}$) et hémisphérique (q_{\cap}), avec la fraction de rayonnement diffus égale à \bar{x}_d . θ est l'angle d'incidence entre le rayonnement direct et la surface de captation du flux lumineux. a_S est la surface spécifique éclairée. La productivité surfacique (S_x) définit la quantité de bio-

masse produite par unité de surface de captation de la lumière et par unité de temps. Cette grandeur est importante lors de culture sous flux solaire puisqu'elle impose la surface d'occupation au sol. La culture de microorganismes photosynthétiques rentrant en compétition avec l'agriculture ou d'autres systèmes comme les champs d'héliostats, maximiser les productivités en surface est donc essentiel.

A noter que Pruvost et Cornet (Pruvost and Cornet, 2012) ont proposé une équation (cf. équation 1.8) permettant de calculer la productivité surfacique maximale d'un système en fonction de l'espèce microalgale considérée (croissant sur une source donnée d'azote), de la géométrie du PBR et du flux incident (intensité, degré de collimation et angle d'incidence).

$$\langle S_x \rangle_{max} = \rho_M \bar{\phi} \frac{2\alpha}{1+\alpha} \left[\frac{\bar{x}_d K}{2} \ln \left[1 + \frac{2\bar{q}}{K} \right] + (1 - \bar{x}_d) \overline{\cos \theta} K \ln \left[1 + \frac{\bar{q}}{K \overline{\cos \theta}} \right] \right] \quad (1.8)$$

La multiplication de la productivité surfacique avec la surface spécifique donne la productivité volumique.

L'équation 1.8 montre que la productivité surfacique ne dépend que du PFD, ce qui implique que la productivité surfacique est indépendante de la géométrie du système de culture. Cette base de raisonnement a permis à Cornet (Cornet, 2010) de calculer la limite de production atteignable en conditions solaire. Cette productivité idéale théorique (calculée pour un rendement thermodynamique de conversion de l'énergie lumineuse de l'ordre de 5%, et donc indépendant du microorganisme) est alors estimée à $30 g_x \cdot m^{-2} \cdot j^{-1}$, d'après Cornet (Cornet, 2010), pour un système dit à captation directe.

Il est possible d'augmenter la productivité surfacique en améliorant le rendement thermodynamique de la photosynthèse par dilution dans le volume du flux capté. C'est le principe de base du photobioréacteur DiCoFLuV dont nous parlerons dans la section 1.4.2. La productivité théorique idéale passe alors à $110 g_x \cdot m^{-2} \cdot j^{-1}$, ce qui est la limite thermodynamique de conversion de l'énergie lumineuse par photosynthèse (Cornet, 2010).

A l'opposé, l'équation 1.7 montre le rôle de la surface éclairée, lui-même dépendant très fortement de la géométrie. Ce facteur, comme montré ci-après, se révélera donc un paramètre important d'intensification.

1.3.5 Concept de système de culture à haute productivité volumique (HPV)

L'intensification de PBR mène à introduire le concept de système de culture à haute productivité volumique (ou HPV). L'obtention de haute productivité volumique repose sur trois voies :

1. travailler à forte surface spécifique éclairée, *i.e.* $a_S > 100 m^2 \cdot m^{-3}$ et donc une épaisseur de culture $L < 1 cm$ dans le cas des systèmes plans,
2. travailler à fort flux incident (tel que rencontré sous flux solaire),

3. absorber tout le flux lumineux sur l'épaisseur de culture, si possible en évitant l'apparition d'une zone sombre, *i.e.* $\gamma = 1$.

Comme le présente la figure 1.12 la productivité volumique est alors fortement dépendante de la géométrie du système, en particulier de la surface spécifique.

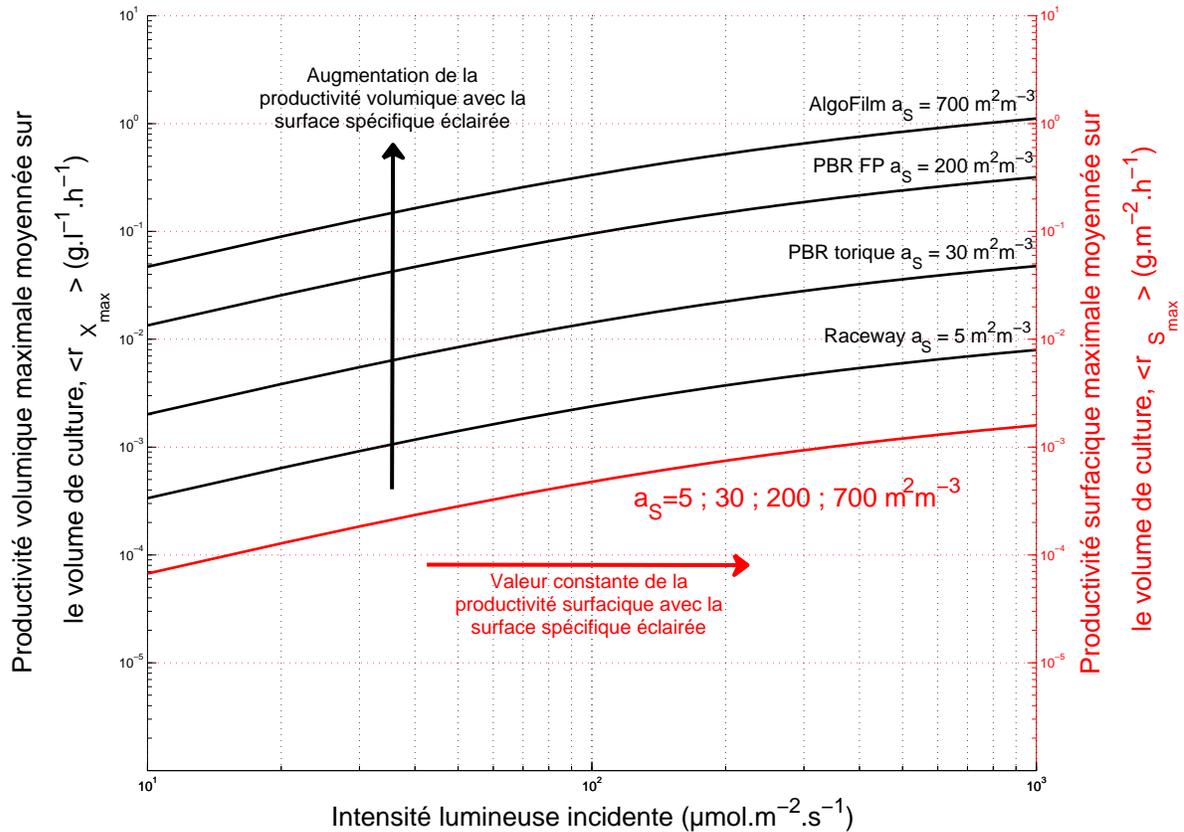


FIGURE 1.12 – Évolution des productivités surfaciques et volumiques en fonction de l'intensité du flux incident pour plusieurs surfaces spécifiques

La conséquence majeure est alors l'augmentation de la concentration en biomasse de la suspension, passant ainsi de $C_x < 5g.l^{-1}$ pour les systèmes classiques à des concentrations de l'ordre de $50g.l^{-1}$ (augmentation de la productivité volumique directement liée d'un ordre de grandeur). Cela présente de grands intérêts, notamment pour les étapes de récolte et de post-traitement de la biomasse puisque les volumes d'eau à manutentionner sont alors moins importants.

Néanmoins, plusieurs problématiques sont liées à l'utilisation et à la conduite de culture dans ce type de systèmes. La réduction de l'épaisseur de culture conduit à travailler en milieu confiné. La maîtrise des transferts (de lumière et/ou de matière) devient alors critique pour garantir une bonne croissance, ce qui est d'autant plus difficiles à maîtriser que la suspension s'écoulant en milieu confiné est concentrée.

En effet, il a déjà été vu dans la partie 1.3.2 qu'à haute concentration, la suspension montrait un comportement fortement non-newtonien de type rhéofluidifiant et présentant éventuellement un comportement thixotropique (pas le même comportement en fonction de l'augmentation ou de la diminution de la contrainte). De plus, du fait de la haute densité, la distance entre les cellules est fortement réduite. Cela augmente la probabilité d'interactions physiques entre les cellules. Selon l'espèce microalgale, les cellules vont avoir tendance à s'agréger. L'ensemble des transferts de matière, chaleur et lumière va s'en trouver perturbés, pouvant alors limiter la croissance.

D'un point de vue conduite de la culture, le fait de travailler à haute concentration implique une alimentation avec du milieu de culture plus riche en éléments nutritifs que celui de base. Ainsi, le risque de formation de précipités et de chocs osmotiques (différence de salinité trop importante entre le milieu et l'intérieur de la cellule) est accru et peut induire des instabilités de la culture. Dans le cas de perte de biomasse, la matière organique présente dans le milieu peut alors favoriser une prolifération bactérienne.

Au final, la conduite et la mise en place de systèmes HPV repose sur la maîtrise d'un ensemble de paramètres.

1.4 Technologies des systèmes de culture

Cette partie recense les principales technologies existantes de systèmes de culture, leurs intérêts et leurs performances. Il est à noter que, si une attention non négligeable est portée actuellement sur le développement des systèmes de cultures, c'est qu'il s'agit du cœur du procédé et qu'ils sont à la base de nombreuses problématiques. En effet, si l'optimisation génétique permet d'accéder à des souches améliorées pour la production de composé(s) spécifique(s) d'intérêt(s), elle est bien souvent au détriment de la robustesse du microorganisme. Dans ce cas, le système de culture devra être conçu de façon à limiter les contraintes subies par les microorganismes.

Il est également important de souligner qu'il n'existe pas de technologie type, mais en fonction de l'application et des contraintes liées, il peut être nécessaire d'adapter la conception du PBR en fonction du microorganisme, mais aussi par rapport à l'ensemble de la chaîne de production. Ainsi, l'augmentation de la productivité volumique diminuera la quantité d'eau associée à une quantité donnée de biomasse produite, réduisant par là même les volumes à gérer sur le procédé global (récolte par exemple).

1.4.1 Systèmes ouverts

Les systèmes de cultures sont dits *ouverts* lorsqu'il n'y a pas de séparation physique entre la culture et l'environnement extérieur. Ce sont des technologies facilement extrapolables puisque généralement basiques dans leur conception. Une des limites majeures à l'utilisation de ce type de technologie est l'absence de contrôle de la culture. En effet, la régulation du pH et de la température sur ce type de système est délicate techniquement. Du fait qu'il n'y ait pas de séparation physique, l'évaporation du milieu n'est également pas contrôlée et la culture est exposée à des contaminations extérieures.

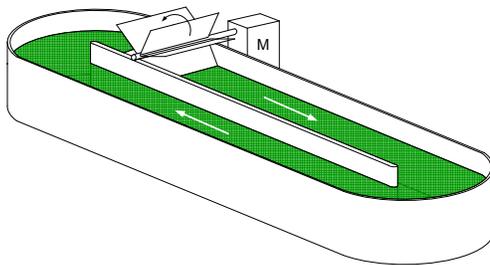
Comme il a été vu précédemment dans la section 1.3.4, la productivité en volume est très fortement dépendante de la surface spécifique, a_S . Or, dans ce type de système, celle-ci est également inférieur à $20m^{-1}$ (épaisseur supérieure à $5cm$). Il en ressort ainsi une productivité volumique d'autant plus diminuée par le manque de contrôle global du système, menant à une diminution globales des performances en volume, mais aussi en surface. Cela est compensé usuellement par une augmentation de la taille de ces technologies, facilement extrapolables. Les volumes mis en jeu dans ce type de systèmes sont souvent de plusieurs mètres cubes.

Étant donné l'absence quasi-totale de contrôle sur ces systèmes, leur utilisation est limitée à la production de souches robustes, voire extrémophile (comme par exemple *Chlorella vulgaris* ou *Dunaliella salina*, entre autres). Cette production est orientée vers l'industrie agroalimentaire, la fixation de dioxyde de carbone ou la production de pigments à forte valeur ajoutée (comme la production d'astaxanthine par *Haematococcus pluvialis* (Olaizola, 2000)). La grande majorité des systèmes de culture ouverts fonctionnent en utilisant l'énergie solaire du fait de leur grande taille.

Pour les "petites" tailles de ce type de systèmes (mais quand même plusieurs mètres cubes

de volume réactionnel), il est envisageable d'ajouter un couvercle. Cela permet de limiter les pertes par évaporation, de contrôler l'atmosphère gazeuse (et donc le transfert de carbone au sein de la culture) et de limiter le risque de contaminations (Artu, en cours). Plusieurs sociétés, comme la société AlphaBioTech (Asserac, Loire-Atlantique, France), ont ainsi choisi de faire un compromis en plaçant leurs systèmes sous serre.

L'une des technologies ouvertes les plus répandues est le système "raceway". Ces systèmes se présentent comme schématisés sur la figure 1.13a. Leur nom vient de leur forme en piste de course. La mise en circulation de la culture se fait par une roue à aubes, entraînée par un moteur. L'extrapolation d'échelle relativement aisée de ces systèmes donne lieu à de véritables champs de culture comme on peut le voir sur la photographie 1.13b.



(a) Schéma d'un système de culture de type raceway



(b) Photographie d'un champ de raceway - Cyanotech Corporation (Hawaï - USA)



(c) Exemple de production de β -carotène en lagunes - Société Cognnis, Australie

FIGURE 1.13 – Exemple de systèmes de culture ouverts

Il existe des systèmes plus rudimentaires, à savoir des bassins sans agitation artificielle : ce sont les lagunes (cf. photographie 1.13c). Ce type de procédé est plutôt utilisé à des fins environnementales (traitement d'effluents par lagunage), bien que ces systèmes soient les premiers à avoir été développés pour la production industrielle de microalgues. On peut citer ici à titre d'exemple la production industrielle de β -carotène par la société Cognis. De plus certains peuples, en Afrique et en Amérique latine notamment, utilisent les efflorescences naturelles de microorganismes photosynthétiques (comme la Spiruline) en complément alimentaire.

L'utilisation pour des applications environnementales de ces systèmes vient du fait que les microorganismes photosynthétiques ont la possibilité de fixer certains composés nocifs (voire toxiques) ; la phycorémédiation est ainsi : un moyen simple, peu onéreux et rustique de dépolluer les sols ou des effluents, liquides ou gazeux.

Le système détaillé sur la figure 1.14 contraste avec les systèmes présentés précédemment et peut être considéré comme le lien entre les systèmes de cultures ouverts basiques et les photobioréacteurs (systèmes clos). Dans ce système, la partie éclairée du réacteur est ouverte, alors qu'une cuve, où circule la culture, est fermée pour permettre la carbonatation du milieu. Cette technologie consiste à produire un film ruisselant de faible épaisseur ($< 2\text{cm}$) de suspension microalgale. La diminution de l'épaisseur de culture, couplée au fort flux pouvant être rencontré sous flux incident solaire permet d'atteindre des hautes productivités volumiques, typiquement supérieur à $0,01\text{g}_x.l^{-1}.h^1$.

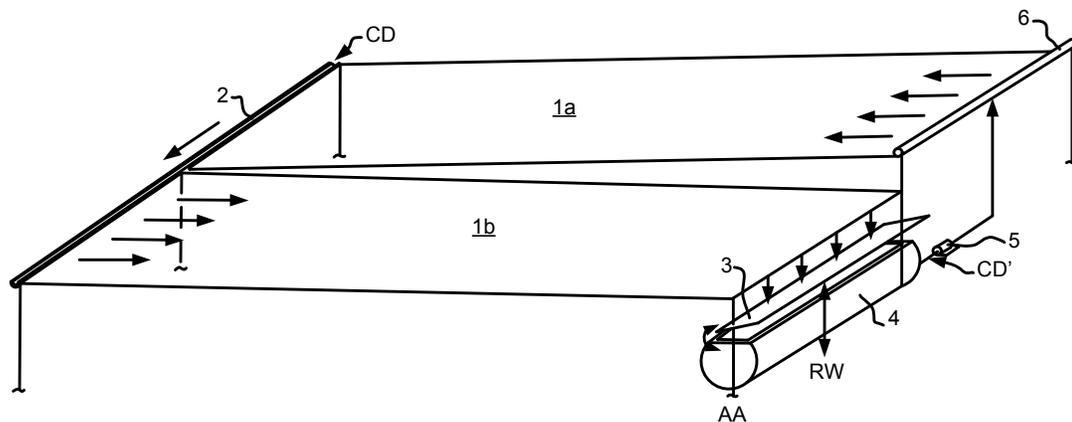


FIGURE 1.14 – Schéma du PBR développé par Doucha et Livansky - CD : injection de CO_2 , RW : récupération d'eau de pluie (Doucha and Livansky, 1999)

1.4.2 Systèmes clos

Systèmes clos à éclairage externe

A contrario des systèmes ouverts, les photobioréacteurs clos sont isolés de l'environnement extérieur. Toute entrée ou sortie peut être de plus stérilisée de manière à garder la culture

axénique. Ce type de système peut-être instrumenté selon les besoins de contrôle de la culture.

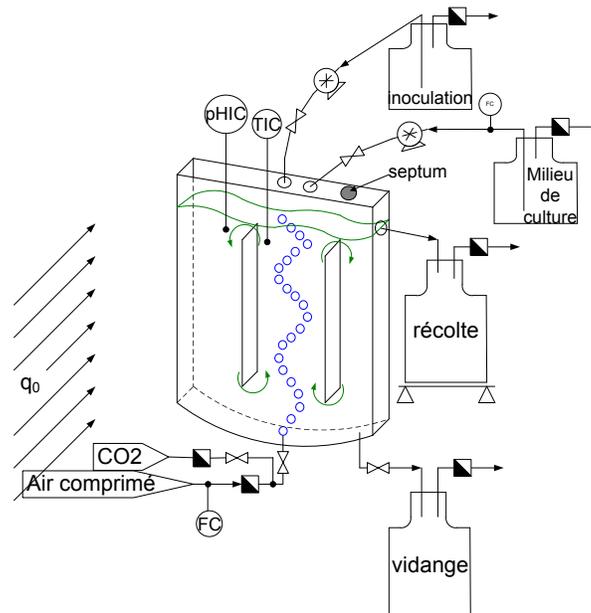


FIGURE 1.15 – Schéma général d'un photobioréacteur clos instrumenté

Le schéma 1.15 représente un PBR de type airlift couramment utilisé en laboratoire, se composant :

1. d'une paroi en matériau transparent (par exemple en verre ou en polyméthacrylate de méthyle, PMMA) laissant passer le flux photonique,
2. d'un système d'agitation pneumatique et / ou mécanique. Le système d'agitation remplit le rôle d'homogénéisateur ce qui permet d'assurer un niveau suffisant de transfert au sein de la culture.
3. d'une sonde pH/température, le pH étant relié à un système de régulation (CO_2 ou acide/base) et la température à un thermo-cryostat par exemple,
4. d'un septum, permettant d'effectuer des prélèvements dans le PBR en respectant l'axénie,
5. d'une alimentation en milieu de culture,
6. d'une récolte et d'une vidange.

Cet exemple de PBR très contrôlé est très intéressant pour tout ce qui concerne les expérimentations en laboratoire, du fait du contrôle poussé de la culture. On peut noter un effort actuel important sur le développement de PBR clos, leur potentiel étant plus important que celui des technologies ouvertes. En effet, ils offrent plus de possibilités quant aux éléments de conception (géométrie, utilisation de matériaux, ...). De plus, l'accroissement des transferts (lumière, matière et chaleur) dans la culture couplé à la réduction des épaisseurs de culture, donne accès à des productivités volumiques et surfaciques plus importantes que celles obtenues en système ouvert. Cependant, les coûts de production augmentent fortement avec le niveau de technologie

du procédé mis en œuvre. Les cultures de microorganismes photosynthétiques dans les PBR clos sont donc actuellement orientées majoritairement vers la production de molécules à haute valeur ajoutée. A noter que la technologie photobioréacteur a un intérêt pour la production de bioénergies (biodiesel par exemple), où les maxima de productivité en lipides seront obtenus en appliquant des conditions de cultures très spécifiques (carence par exemple). Le contrôle du système devient donc important pour garantir des performances élevées.

Du fait des contraintes technologiques induites par l'utilisation de système clos (tenue à la pression hydrostatique notamment) les volumes de cultures rencontrés dans les PBR clos sont en général plus faibles que dans les systèmes ouverts, bien qu'ils puissent atteindre plusieurs centaines de mètre cubes (Pulz, 2001). Cependant, leur plus faible contenance est partiellement compensé par une concentration en microorganismes dans la suspension plus importante.

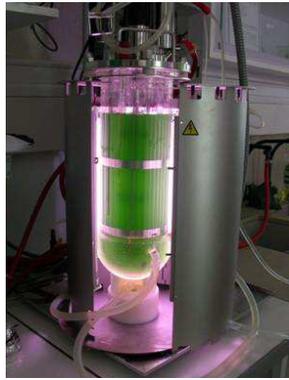
Les technologies de PBR clos sont nombreuses et évoluent au fur et à mesure des développements et innovations. Les plus rudimentaires (et donc les moins chers) sont des systèmes souples, tels que les gaines plastiques, présentées sur la photographie 1.16. D'autres systèmes sont développés, par la N.A.S.A. par exemple, fondés sur le même principe mais avec un degré de technologie plus important (Litzler, 2010). Il s'agit toujours de gaines mais celles-ci sont placés directement dans l'océan. Ces gaines sont poreuses et permettent aux nutriments présents dans l'océan de rentrer dans le système de culture, tout en empêchant les microorganismes d'en sortir.



FIGURE 1.16 – Gainés plastiques pour culture de microorganismes photosynthétiques - sociétés Exxon Mobil et Synthetic Genomics

Les systèmes tubulaires sont également largement utilisés dans l'industrie microalgale. Ils sont facilement adaptables à différents types de culture et donnent accès à des volumes de culture intéressants d'un point de vue industriel (jusqu'à plusieurs mètres cubes). Plusieurs exemples sont donnés dans la figure 1.17, allant des technologies de laboratoire (volumes $< 10l$, cf. figs. 1.17a, 1.17b) aux technologies pré-industrielles et industrielles (volumes $> 100l$, cf. figs. 1.17c, 1.17d). Il est intéressant de remarquer que la photographie 1.17d représente une technologie industrielle fonctionnant exclusivement sous flux solaire.

Pour les activités de laboratoire, les technologies présentées sur les photographies 1.18a et



(a) Photographie d'un PBR pilote 3l - société Infors



(b) Photographie d'un PBR tubulaire airlift 10l - GEPEA



(c) Photographie d'un PBR type colonne à bulles 130l - GEPEA



(d) Photographie de PBR tubulaires horizontaux $>10m^3$ - (Milledge, 2011)

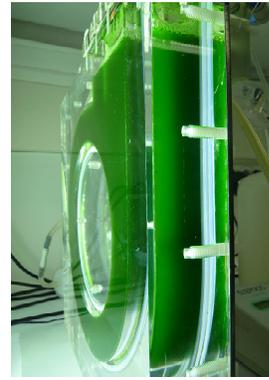
FIGURE 1.17 – Exemples de PBR cylindriques

1.18b sont privilégiées puisqu'elles sont parfaitement caractérisées d'un point de vue transfert (notamment le PBR torique, sur lequel de nombreuses études ont été menées au laboratoire GEPEA). Cette technologie étant utilisée pour les expérimentations, elle sera plus amplement détaillée par la suite (cf. section 2.1.1). Le PBR "HectoR" (pour Hectolitre Réacteur, cf. figure 1.18c) est un prototype également réalisé au laboratoire GEPEA. Son volume utile est de 130 litres. Enfin, comme il est présenté sur la photographie 1.18d, la culture de microorganismes photosynthétiques en solaire peut se faire dans des technologies de PBR cylindriques ou planes. Se posent alors d'autres problématiques, fortement similaires à celles rencontrées dans le domaine du photovoltaïque, comme celles de l'optimisation de la captation solaire et de la diminution de l'auto-ombrage entre autre. La gestion de la température est également un paramètre important, le fonctionnement clos amenant à un fort échauffement de la culture (Le Borgne, 2011).

Comme cela a été dit précédemment, une voie majeure d'optimisation des PBR concerne l'intensification des productivités volumiques. L'intérêt est de diminuer le volume pour une produc-



(a) Photographie d'un PBR mini-airlift 1l - GEPEA



(b) Photographie d'un PBR torique 1l - GEPEA



(c) Photographie d'un PBR plan airlift 130l - GEPEA

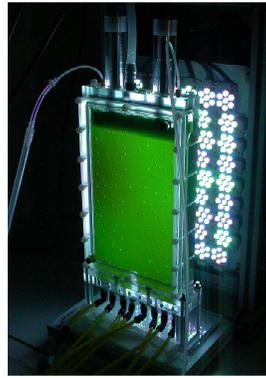


(d) Photographie de PBR plans $>10m^3$ - société NanoVoltaics, Inc.

FIGURE 1.18 – Exemples de PBR plans

tion donnée, avec donc des bénéfices sur l'encombrement du système et la quantité de matériaux nécessaires. Cela passe par la diminution des épaisseurs de cultures, et donc l'augmentation de la surface spécifique éclairée. Comme discuté, cette diminution de l'épaisseur amène des problématiques spécifiques puisque l'augmentation de la concentration en microalgues peut avoir un rôle sur l'hydrodynamique, et donc sur les transferts au sein de la culture. A titre d'exemple, le PBR "flat panel", présenté sur la photographie 1.19a est un PBR de $7mm$ d'épaisseur optique. Il permet d'atteindre des hautes productivités volumiques grâce à de fortes valeurs de la surface spécifique éclairée ($a_S > 100m^2.m^{-3}$). Il sera utilisé dans ce travail et sera donc plus amplement décrit par la suite, cf. partie 2.1.1.

La photographie 1.19b présente également une géométrie originale basée sur l'utilisation d'un concept appliqué dans l'optimisation d'échangeurs thermiques qui est l'advection chaotique. Cette dernière présente tous les avantages de mélange d'un régime turbulent bien que l'on travaille dans ce cas en régime laminaire à des nombres de Reynolds inférieurs à 500 ; les performances en terme d'homogénéité sont obtenues en jouant sur la géométrie, et en générant



(a) Photographie d'un PBR plan airlift - GEPEA



(b) Photographie d'un PBR chaotique - GEPEA



(c) Photographie du PBR AlgoFilm - GEPEA

FIGURE 1.19 – Exemples de PBR plans intensifiés

des trajectoires chaotiques dans l'espace (Mokrani et al., 1997, Castelain et al., 2001, Castelain et al., 2000). Ceci est particulièrement intéressant pour les souches microalgales très fragiles. L'application aux PBR de l'advection chaotique permet également de maîtriser les régimes fluctuants de lumière qui, comme l'a montré Takache (Takache, 2010), peuvent avoir un impact sur la productivité globale de la culture.

En dernier exemple, on peut citer le système présenté sur la photographie 1.19c. Celui-ci est fondé sur le même principe que le système présenté sur la figure 1.14. Un film ruisselant de faible épaisseur coule sur une surface lisse, exposée la lumière du soleil. La vitesse d'écoulement du film permet de gérer l'épaisseur du film pour atteindre des épaisseurs de culture inférieure au centimètre (Le Borgne, 2011). La principale innovation sur le PBR "AlgoFilm" par rapport à la technologie proposée par Doucha et Livansky (cf. photographie 1.14) vient de l'ajout de la vitre, permettant de passer d'un système ouvert à un système totalement clos avec tous les avantages que cela représente.

Systèmes clos à éclairage interne

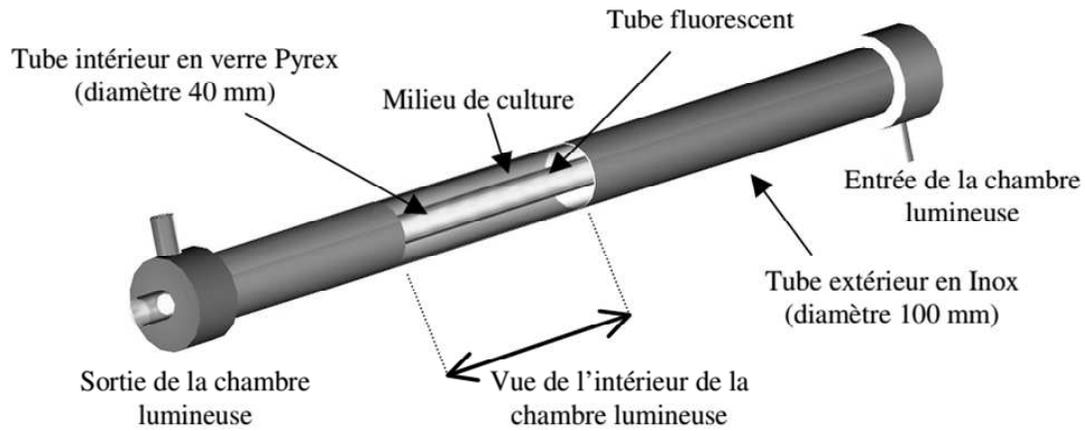
Le but des systèmes à éclairage interne est d'augmenter la surface d'apport de l'énergie lumineuse à la culture. Ce concept a donné lieu à plusieurs technologies dont les plus anciennes remontent à la fin des années 1980. Un état de l'art des différentes technologies à éclairage interne est disponible dans le travail de Le Borgne (Le Borgne, 2011).

Récemment a été proposé le concept de dilution contrôlée du flux lumineux en volume (Di-CoFLuV) (Cornet, 2010). Ce concept, pouvant travailler sous flux solaire (par l'intermédiaire d'un système de captation / concentration du flux incident) comme artificiel, permet au flux de photons émis par la source lumineuse d'être réparti sur l'ensemble de la surface grâce à un réseau de fibres optiques à diffusion latérale (FODL). Le flux envoyé aux microorganismes est alors faible, ce qui permet d'approcher l'optimum d'efficacité thermodynamique du système, soit $\approx 15\%$ au lieu de 4 à 7% pour un flux incident supérieur à $100\mu\text{mol}_{hv}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Cornet, 2010) (cf. figure 1.20b représentant la vue de dessus et en coupe de la répartition optimisée de fibres optiques).

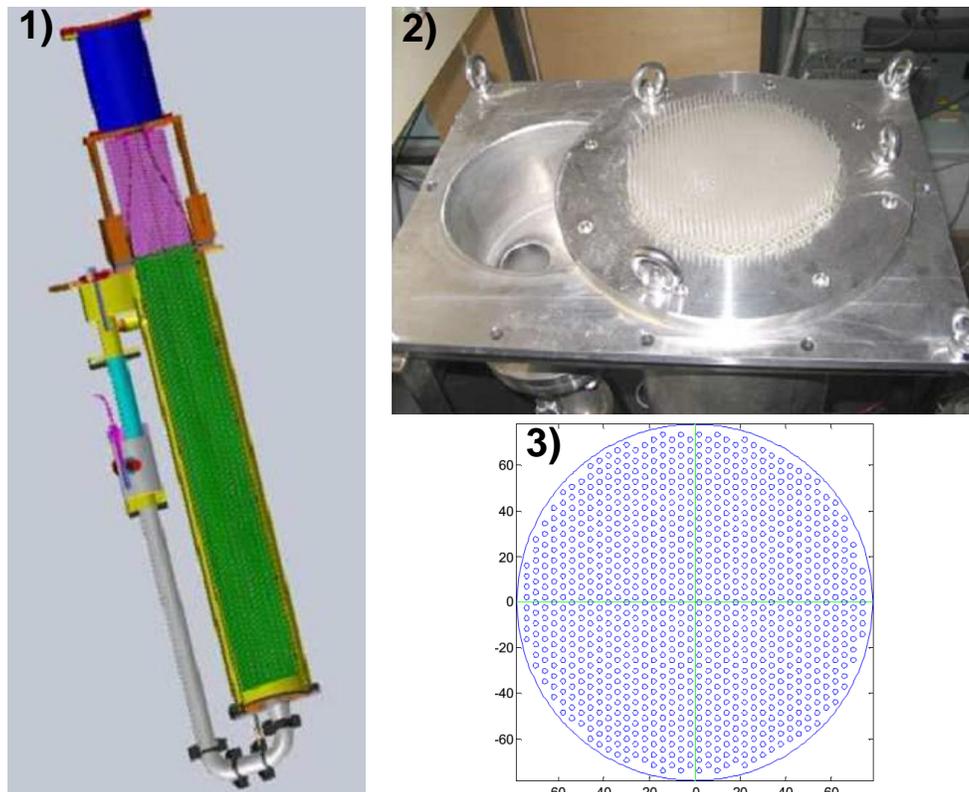
D'autres technologies permettent d'utiliser des sources lumineuses immergées telles que les tubes fluorescents. La photographie 1.20a représente une vue schématique d'un module du PBR LAMP2, développé à l'IFREMER (Pruvost, 2000) et utilisant des tubes fluorescents immergés.

Bilan sur les systèmes de cultures

En conclusion des technologies présentées dans cette section, il apparaît que les systèmes ouverts (raceway, lagunes), bien qu'industriellement matures, ont des limites inhérentes à leur principe qui amènent à des productivités modérées. Ces technologies ont cependant un intérêt évident, du fait de leur faible coût et de leur extrapolation aisés. A noter qu'il existe des alternatives, comme le système proposé par Doucha et Livansky (Doucha and Livansky, 1999), qui vise à diminuer les épaisseurs de cultures et maximiser la captation du flux solaire incident. Même s'il s'agit là d'une amélioration notable par rapport aux technologies ouvertes classiques, le contrôle de la culture reste difficile et l'axénie est impossible à maintenir. A l'opposé, les photobioréacteurs (systèmes clos) permettent de contrôler fortement la culture, et offrent une grande possibilité d'évolution. Le fait de maîtriser les transferts, notamment radiatifs, permet d'accroître les productivités volumiques d'un facteur de 10 à 100 environ, selon le niveau d'intensification appliqué. Ces systèmes permettent également d'introduire des notions de qualité de production puisque ce sont des systèmes stérilisables. L'ensemble des technologies et leurs caractéristiques générales est résumé dans le tableau 1.1.



(a) Schéma d'un module du PBR LAMP 2 (Pruvost, 2000)



(b) 1) Vue CAO du PBR DiCoFLuV, 2) Vue du réseau de fibres optiques, 3) Vue en coupe de l'agencement des fibres optiques (Cornet, 2010) - programme BIOSOLIS

FIGURE 1.20 – PBR à éclairage interne

Type de PBR	Caractéristiques générales	Type de système	Type d'éclairage	Volume réactionnel (m ³)	Surface spécifique éclairée (m ⁻¹)	Productivité vol. théo. max. (kgx.m ⁻³ .j ⁻¹)**	Exemples d'utilisation
Cylindrique	Horizontal	Clos	Solaire et/ou artificiel	0.1 à 700			Molina et al. 2001
	Incliné	Clos	Solaire et/ou artificiel	0.1 à >100	<10 – 200	<0.21 – 4.25	Lee et al. 1995
		Vertical	Clos	Solaire et/ou artificiel	0.01 à >100		
	Hélicoïdal	Clos	Artificiel	<0.01			Watanabe et al. 1996
Annulaire	Diminution des pertes de lumière, maintenance difficile	Clos	Artificiel	<1	<50	<1.06	Pruvost 2000
DiCoFLuV	Fonctionnement au maximum théorique du rendement thermo. photosynthétique, maintenance difficile	Clos	Solaire et/ou artificiel	0.08	>400	>8.49	Cornet 2010
Plan	Lagunes	Ouvert	Solaire	0.1 à >100	<5	<0.11	
	Raceway	Ouvert ou Clos	Solaire et/ou artificiel	0.1 à >100	<10	<0.21	Ugwu et al. 2008
	Film tombant	Ouvert ou Clos	Solaire et/ou artificiel	0.635-400	100 - 500	2.13 – 10.6	Doucha Livansky 1999, Pruvost et al. 2010
	Airlift plan	Clos	Solaire et/ou artificiel	10 ⁻⁶ à >100	<50 ou >200*	<1.06 ou >4.25*	Richmond et Cheng-Wu 2001, Zhang et al. 2001
Torique	Non extrapolable, contrôle parfait de la culture, idéal pour les études en laboratoire	Clos	Solaire et/ou artificiel	1.5*10 ⁻³	25	0.53	Pottier et al. 2005
Gaine plastique	Culture discontinue uniquement, peu de contrôle	Clos	Solaire et/ou artificiel	≈0.1	≈10	≈0.21	Moheimani 2013

* Dans le cas des PBR intensifiés, les épaisseurs de culture sont de l'ordre de quelques mm, donc les surfaces spécifiques rencontrées sont beaucoup plus importantes.

** Les productivités annoncées ont été calculées à partir du modèle développé par Cornet et al. (2009) pour un éclairage de 270µmol.m⁻².s⁻¹, correspondant à la moyenne solaire annuelle reçue à Saint-Nazaire, pour le microorganisme eucaryote *Chlamydomonas reinhardtii* en production autotrophique

TABLE 1.1 – Tableau récapitulatif des principales technologies de systèmes de culture et leurs données essentielles

1.5 Modélisation des cultures et du transfert radiatif

La modélisation des procédés permet d'en prédire les performances, de les dimensionner et de les optimiser. Cela demande cependant une connaissance approfondie des phénomènes mis en jeu, ce qui est relativement complexe dès lors qu'on s'intéresse à un système biologique. Le cas particulier des microorganismes photosynthétiques n'est pas trivial puisque le rôle de la lumière sera à prendre en compte, rajoutant, de ce fait, des difficultés supplémentaires.

Cette partie s'intéresse à deux types de modélisation : la modélisation de la croissance biologique et la modélisation physique du transfert radiatif au sein d'une culture. Pour chaque type de modélisation, différents modèles seront présentés, de complexité différentes. Il est à noter que l'utilisation de modèles évolués, bien que plus précis, peut nécessiter un nombre de paramètres d'entrée plus élevé, et peut induire dans la plupart des cas des temps de calculs plus importants. Comme très souvent, le choix du modèle à utiliser sera donc un compromis entre la connaissance des phénomènes en présence et leur modélisation spécifique, la précision des prédictions souhaitées et le temps de calcul.

1.5.1 Modèles de croissance

La modélisation de la croissance d'une culture s'étend des approches globales et peu détaillées (Muller-Feuga, 1999), aux approches fondées sur la représentation précise des réactions pour tendre vers un modèle dit de connaissance. L'approche globale consiste généralement à trouver une loi mathématique (le plus souvent de type hyperbolique, exponentielle, logarithmique, *etc.*) traduisant correctement le comportement expérimental constaté. Les paramètres de ce type de modèle sont à ajuster pour chaque cas mais ne sont pas nécessairement représentatifs des réactions physiques, chimiques ou biologiques mises en œuvre. Comme exemples de modèles représentatifs, les plus utilisés sont ceux de Monod (Monod, 1942) et d'Andrews-Haldane (Andrews, 1968), présentés ci-dessous. D'autres modèles sont présentés par Muller-Feuga (Muller-Feuga, 1999) et Pottier (Pottier, 2005). A l'opposé, les modèles de connaissance vont se baser sur les phénomènes impliqués à la base du comportement observé. La différence entre les modèles vient alors du niveau de représentation choisi. Deux modèles tendant vers des modèles de connaissances seront ainsi présentés : un modèle cinétique semi-prédictif basé sur la thermodynamique des processus irréversibles, utilisé notamment par Takache (Takache, 2010), et la modélisation des flux métaboliques utilisée par Martzloff (Martzloff, 2013).

Modèle de Monod

Le modèle de Monod (Monod, 1942), présenté dans l'équation 1.9, est couramment utilisé pour décrire la croissance bactérienne. Ce modèle est fondé sur les hypothèses que le rendement de croissance Y , (en g de biomasse/g de substrat) de conversion d'un substrat donné (concentration de ce substrat noté S , en $g.l^{-1}$) en biomasse reste constant dans le temps, et que l'évolution de la vitesse spécifique de croissance (μ , en h^{-1}) avec l'évolution de la concentration en substrat considéré suit une tendance hyperbolique.

Dans l'équation 1.9, μ_{max} est la vitesse spécifique maximale de croissance et K_S représente la constante de demi-saturation du microorganisme par rapport au substrat considéré. Cette constante est dépendante du microorganisme et de ses conditions de culture. Une valeur importante de cette constante traduit une haute tolérance du microorganisme au substrat, donc une affinité plus faible.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (1.9)$$

Dans le cas de la culture de microorganismes photosynthétiques en mode continu, il est possible de retenir comme substrat limitant la lumière (Takache et al., 2010). Cette dernière est notée G et représente l'irradiance locale.

Modèle de Andrews-Haldane

Une limite du modèle de Monod est la non prise en compte de l'effet inhibiteur d'un substrat présent en excès. Le modèle D'Andrews-Haldane (Andrews, 1968) introduit pour cela un terme supplémentaire d'inhibition du substrat.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_1 + S + \frac{S^2}{K_2}} - \mu_m \quad (1.10)$$

Dans l'équation 1.10 :

- μ est la vitesse spécifique de croissance, en h^{-1} ,
- μ_{max} la vitesse spécifique maximale de croissance, en h^{-1} ,
- S la concentration en substrat dans le milieu extracellulaire, en $g.l^{-1}$ ou $mol.l^{-1}$,
- K_1 la constante de limitation, en $g.l^{-1}$ ou $mol.l^{-1}$,
- K_2 la constante d'inhibition, en $g.l^{-1}$ ou $mol.l^{-1}$.

Le terme μ_m correspond au terme de maintenance des microorganismes (respiration). Ce terme permet d'accéder aux valeurs négatives de productivité de cultures observées pour des faibles valeurs de substrats.

Comme pour le modèle de Monod, la modélisation de la croissance de microorganismes photosynthétiques photolimitée par le modèle d'Andrews-Haldane se fera en remplaçant le substrat, S , par l'irradiance, G , pour les valeurs locales du taux de croissance, ou une valeur moyennée, G_{moy} , sur l'ensemble de la culture du flux de photons pour une valeur moyenne du taux de croissance. Le type de modèle est souvent utilisé pour la bonne approximation des comportements expérimentaux qu'il offre (Chen et al., 2013, Bernard and Rémond, 2012), bien que sa formulation pose problème dans le cas des microorganismes photosynthétiques. Il n'y a ainsi pas de proportionalité entre le couple respiration - intensité lumineuse (Falkowski et al., 1985) et, d'autre part, le terme de maintenance n'a aucune signification physiologique pour les microorganismes photosynthétiques (Cornet, 2007), bien que l'absence de lumière mène bien à une "croissance" négative par respiration. D'autre part, il est important de noter que pour limiter les risques de biais liés à l'utilisation de ce type de modèle, il est préférable de travailler avec les

valeurs locales de flux de lumière plutôt qu'avec une valeur moyenne (Fouchard et al., 2008).

L'approche prédictive

A contrario des modèles de représentation, les modèles de connaissance nécessitent de pouvoir expliquer de manière théorique et prédictive les réactions attendues lors des différentes réactions biologiques. C'est dans ce sens que va l'approche thermodynamique des processus irréversibles, initialement introduite par Prigogine (Prigogine, 1967). Elle a été appliquée par Stucki (Stucki, 1978) et Dussap (Dussap, 1988) pour décrire les réactions biologiques observées lors de cultures de microorganismes. Cette approche consiste à considérer que, dans un processus biologique complexe tel que la photosynthèse, l'état moyen des réactions mesurées (non stables thermodynamiquement en valeur instantanée, du fait des étapes autocatalytiques d'activation et d'inhibition enzymatiques (Cornet, 2007)) est stable sur une échelle de temps appropriée (d'après Cornet *et al.* (Cornet et al., 2003), environ une minute).

L'analyse du schéma en Z de la photosynthèse par Cornet (Cornet, 2007) a mené à la création d'un modèle de croissance fondé sur cette approche qui a pu être confronté aux expérimentations sur les cultures de deux microorganismes : *Rhodospirillaceae sp.* et *Arthrospira platensis* (Cornet et al., 2003, Cornet and Dussap, 2009). Cette méthode prédictive offre une grande précision et a ainsi été validée pour différentes conditions de culture (géométries de PBR, mode continu ou batch) et souches. Néanmoins, elle impose un haut degré de connaissance théorique puisqu'elle est fondée sur l'analyse précise des phénomènes majeurs gouvernant la croissance, comme l'énergétique de la conversion photosynthétique, de l'anabolisme et du catabolisme.

Dans la lignée des travaux de Cornet appliqués aux cyanobactéries et bactéries photosynthétiques, Takache (Takache, 2010) a modélisé la croissance de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* en PBR torique et en éclairage continu. Ces mêmes travaux ont été repris par Dauchet en remplaçant la notion d'irradiance par la notion, plus juste, de vitesse spécifique d'absorption des photons (\mathcal{A}) (Dauchet, 2012). Dans ce travail, étant donné que *Chlorella vulgaris* est également une microalgue, cette approche sera reprise. Il sera notamment confirmé l'intérêt de se baser sur la vitesse d'absorption des photons, \mathcal{A} .

La modélisation des flux métaboliques

L'analyse des flux métaboliques est une méthode récente qui permet de modéliser le métabolisme intracellulaire en réponse aux variations génétiques et/ou environnementales d'un système biologique. Toute modélisation repose sur la reconstruction d'un réseau métabolique associant à chaque réaction un gène et une protéine. Cela permet d'identifier les mécanismes et les réactions responsables de la conversion d'un substrat donné en produits d'intérêts. Le résultat est présenté sur une carte des flux métaboliques.

A titre d'exemple, les travaux de Cogne *et al.* (Cogne et al., 2003) ont établi le réseau métabolique de la croissance autotrophique d'*Arthrospira platensis* ; 121 réactions associées à 134 métabolites ont permis de reconstruire un réseau métabolique lié à la production de C-phycocyanine. Plus récemment, le travail de Martzloff (Martzloff, 2013), fondé sur deux approches de calcul

des flux métaboliques, a concerné la modélisation du comportement de la microalgue eucaryote modèle *Chlamydomonas reinhardtii* cultivée en conditions photoautotrophes. La reconstruction d'un réseau métabolique comprenant 599 réactions métaboliques liées à 532 métabolites a été réalisée. L'étude a pu mettre en avant une réorientation du métabolisme en réponse aux modifications d'éclairement.

1.5.2 Modélisation du transfert radiatif

Comme son nom l'indique, la culture de microorganismes photosynthétiques nécessite un apport d'énergie lumineuse. La maîtrise de cet apport et du transfert au sein de la culture sont donc des notions essentielles au contrôle global du système de production (PBR). Pour cela, plusieurs approches existent. La loi de Beer-Lambert est ainsi basée sur l'absorption du rayonnement par une solution. Avec l'objectif constant d'obtenir de meilleures représentations, d'autres modèles ont été développés, prenant en compte les phénomènes de diffusion de la lumière par les particules pouvant être présentes dans le milieu (microorganismes dans notre cas). C'est le cas des modèles à deux ou six flux (Pottier et al., 2005). Les cas les plus complexes peuvent également être résolus par l'approche stochastique de Monte-Carlo (Dauchet, 2012).

Équation des transferts radiatifs

Le transfert d'un rayonnement à travers un milieu homogène, absorbant, diffusant et non-émitif est traduit par l'équation des transferts radiatifs (ETR), exprimée dans l'équation 1.11 (Chandrasekhar, 1960, Dauchet, 2012).

$$\vec{u} \cdot \nabla I_\lambda(\vec{u}, \vec{r}) = -a_\lambda I_\lambda(\vec{u}, \vec{r}) - s_\lambda I_\lambda(\vec{u}, \vec{r}) + \frac{s_\lambda}{4\pi} \iint_{\pi} I_\lambda(\vec{u}, \vec{r}) p_\lambda(\vec{u}, \vec{u}') d\omega' \quad (1.11)$$

L'équation 1.11 traduit l'intensité spécifique du rayonnement, I_λ , reçu sur un élément de surface, représenté par l'angle solide $d\omega$ (cf. 1.21). Dans cette équation, \vec{u} et \vec{u}' représentent respectivement les vecteurs unitaires de la direction incidente et diffusée du rayonnement. $p_\lambda(\vec{u}, \vec{u}')$ est la fonction de phase normalisée, décrivant la distribution spatiale directionnelle de la diffusion de la lumière. Cette grandeur peut-être déterminée soit expérimentalement, par mesure au néphélomètre (Berberoglu and Pilon, 2007), soit théoriquement par la solution de Lorenz-Mie par exemple. Les coefficients a_λ et s_λ sont les coefficients linéiques d'absorption et de diffusion. Ils sont le produit des coefficients massiques d'absorption (Ea) et de diffusion (Es) avec la concentration en biomasse sèche dans la culture. L'équation des transferts radiatifs (ETR) est donc la combinaison de trois termes :

- $a_\lambda I_\lambda(\vec{u}, \vec{r})$ représente les pertes par absorption,
- $s_\lambda I_\lambda(\vec{u}, \vec{r})$ représente les pertes par diffusion,
- $\frac{s_\lambda}{4\pi} \iint_{\pi} I_\lambda(\vec{u}, \vec{r}) p_\lambda(\vec{u}, \vec{u}') d\omega'$ représente les gains par diffusion.

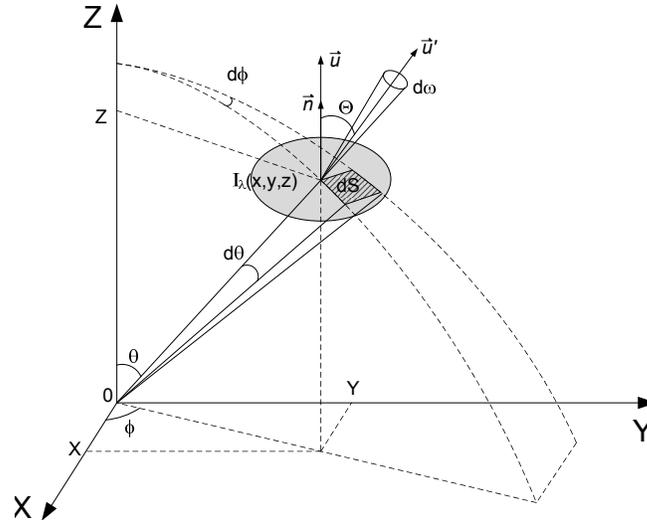


FIGURE 1.21 – Définition de l'intensité locale spécifique I_λ de l'énergie lumineuse radiante dans la direction u (Cornet et al., 1994)

La résolution précise de l'ETR peut être obtenue par la méthode de Monte Carlo (Dauchet, 2012), qui est néanmoins une méthode lourde à mettre en œuvre et imposant des temps de calculs conséquents. Grâce à une collaboration avec l'Institut Pascal (Clermont-Ferrand, France), cette méthode sera cependant utilisée comme référence lors de la détermination des propriétés radiatives des microorganismes.

Détermination des propriétés radiatives

Comme l'a expliqué Dauchet (Dauchet, 2012), la détermination des propriétés radiatives et des propriétés radiatives est à la base de toute modélisation du transfert radiatif en milieu hétérogène. Les modèles les plus simplistes, du type loi de Beer-Lambert, ne font appel qu'à un coefficient global d'extinction, le plus généralement ajusté sur des points expérimentaux. Cette méthode nécessite d'ajuster le coefficient global d'extinction pour chaque condition expérimentale (de la même façon que pour les modèles biologiques représentatifs). On comprend alors aisément que pour la modélisation de cas plus complexes (géométrie complexe de photobioréacteurs, conditions de cultures variant dans le temps, ...) cette approche n'est pas idéale.

De ce fait, des modèles prédictifs ont ici été appliqués, où les coefficients utilisés que l'on retrouve dans l'ETR (coefficient d'absorption, de diffusion et de rétrodiffusion) sont calculés selon le type de "particules" (microorganismes) présentes dans le PBR. Ainsi, la géométrie (taille et forme) de la cellule est le paramètre influençant le plus la diffusion du rayonnement par la cellule.

Aujourd'hui, il est possible d'aborder un grand nombre de formes de cellules, permettant de couvrir quasiment l'ensemble de la biodiversité sans hypothèses majeures (Cornet, 2007, Dauchet, 2012). En revanche, l'hypothèse est souvent faite que l'absorption du rayonnement est homogène dans la cellule. Le phénomène de diffusion étant néanmoins plus important que celui d'absorption, cette hypothèse ne cause pas d'erreurs importantes sur la résolution finale, même

si des travaux d'amélioration sont actuellement menés à l'Institut Pascal.

Comme exemple de travaux allant dans ce sens (servant de base aux travaux actuels), on peut citer ceux de Davies-Colley *et al.* (Davies-Colley et al., 1986). Ces auteurs ont étudié les facteurs impactant la relation entre la concentration en chlorophylle a (majoritairement présente chez les *Chlorophyceae*) et les coefficients d'absorption et de diffusion de plusieurs microorganismes. Cette corrélation, estimée linéaire par leurs contemporains, met en avant un éventuel effet synergique sur l'absorption (effet packaging) de la présence de plusieurs pigments différents dans les cellules.

Actuellement, un partenariat existe entre les laboratoires GEPEA (Saint Nazaire, France) et l'Institut Pascal (Clermont-Ferrand, France) et l'équipe de L. Pilon (UCLA, Los-Angeles, USA) pour travailler sur la détermination des propriétés radiatives. Les laboratoires GEPEA et l'Institut Pascal appliquent une approche théorique de détermination des propriétés radiatives à partir de la concentration en pigment et d'une analyse la plus fine possible de la taille et de la forme globale du microorganisme considéré. A partir de ces données, la partie imaginaire de l'indice de réfraction est reconstituée et, en appliquant la méthode de Kramers-Krönig, l'indice de réfraction de la cellule et les sections efficaces d'absorption et de diffusion sont déterminés (Dauchet, 2012).

L'approche de l'équipe de L. Pilon est fondée sur des mesures expérimentales d'absorbance (mesure normal-normal) et de transmittance (mesure normal-hémisphérique). De ces mesures, l'indice de réfraction de la cellule est reconstruit et les sections efficaces d'absorption et de diffusion sont déterminées (Lee et al., 2013, Kandilian et al., 2013). Ces deux méthodes seront plus amplement détaillées et expliquées dans la partie 4.2 du chapitre 4.

Loi de Beer-Lambert (ou loi de Bouguer)

La loi de Beer-Lambert est une loi relativement simple permettant de modéliser correctement l'atténuation exponentielle d'un rayonnement monochromatique à travers un milieu homogène, absorbant et non diffusif. C'est une loi qui est très largement utilisée en spectrophotométrie, notamment pour les dosages d'espèces chimiques en solution. Cette loi ne prend pas en compte les phénomènes de diffusion du rayonnement et s'exprime comme indiqué dans l'équation 1.12.

$$I(\lambda, l) = I_0(\lambda) \cdot e^{-m_a l C_x} \quad (1.12)$$

Dans cette équation, $I(\lambda, l)$ représente l'intensité lumineuse transmise, pour une longueur d'onde λ donnée et une épaisseur optique l définie. $I_0(\lambda)$ est l'intensité du flux incident, m_a le coefficient massique d'extinction et C_x la concentration de l'espèce absorbante (concentration en microalgue dans notre cas). Son extrême simplicité d'utilisation fait que cette loi, même si elle néglige un phénomène important, à savoir la diffusion, reste très utilisée pour modéliser, en première approximation, le transfert de lumière en PBR (Grima et al., 1999, Molina et al., 2001, Hsieh and Wu, 2009, Lee, 1999).

Modèle à deux flux

Le modèle à deux flux a été développé initialement par Schuster au début du XX^e siècle (Schuster, 1905). Il s'agit d'une simplification de l'ETR qui consiste à approximer le fait que l'atténuation du rayonnement est monodimensionnelle. Cette hypothèse est valable dans notre cas si on considère les géométries présentant ce type d'atténuation (comme le flat panel par exemple) et le fait qu'un photon diffusé a statistiquement peu de chance de changer de direction et de longueur d'onde (approximation de la diffusion anormale (Van De Hulst, 1981)). Cette méthode a été reprise et adaptée au transfert de lumière en photobioréacteur (de toute géométrie) (Cornet et al., 1995, Cornet et al., 1998, Csögör et al., 2001, Takache, 2010, Pilon et al., 2011, Li and Yang, 2013).

A partir de là, l'atténuation de la lumière est définie en deux termes de sens opposé : le terme provenant de la source lumineuse, I^+_λ , et le terme décrivant la partie rétrodiffusée du rayonnement, I^-_λ . L'intensité spécifique, I_λ est la somme de ces deux termes et donne accès à l'irradiance G_λ (équation 1.13) et à la densité de flux (équation 1.14) (Takache et al., 2010). Dans cette dernière, θ est l'angle polaire du rayonnement incident.

$$G_\lambda = \iint_{4\pi} I_\lambda d\omega = I^+_\lambda + I^-_\lambda \quad (1.13)$$

$$q_\lambda = \iint_{4\pi} I_\lambda \cos \theta d\omega = I^+_\lambda - I^-_\lambda \quad (1.14)$$

Dans le cas usuel d'atténuation monodirectionnelle et d'un flux quasi collimaté (*i.e.* $\theta \simeq 0$), le système d'équations différentielles présenté dans l'équation 1.15, en appliquant les conditions aux limites adéquates, permet de calculer l'irradiance en chaque côte z de la profondeur L du PBR.

$$\begin{cases} \frac{dI^+_\lambda}{dz} = -Ea_\lambda \cdot C_x I^+_\lambda - Es_\lambda \cdot C_x \bar{b}_{2\lambda} (I^+_\lambda - I^-_\lambda) \\ \frac{dI^-_\lambda}{dz} = -Ea_\lambda \cdot C_x I^-_\lambda - Es_\lambda \cdot C_x \bar{b}_{2\lambda} (I^+_\lambda - I^-_\lambda) \end{cases} \quad (1.15)$$

Dans ce système, Ea_λ et Es_λ sont respectivement les coefficients massiques spectraux d'absorption et de diffusion et $\bar{b}_{2\lambda}$ est le coefficient de rétrodiffusion. $\bar{b}_{2\lambda}$ est obtenu par intégration de la fonction de phase telle que définie dans l'équation 4.10.

$$\bar{b}_{2\lambda} = \frac{1}{2} \int_{\pi/2}^{\pi} p_\lambda(\theta, \theta') \sin \theta d\theta \quad (1.16)$$

L'expression de la condition limite dépend du réacteur considéré. Dans le cas du PBR torique qui est une géométrie plane éclairée par une source de lumière collimatée en incidence normale ($\theta = 0$), et ayant une face arrière en acier inoxydable (coefficient de réflectivité, ρ_r), on obtient les conditions limites définies dans le système 1.17. Pour $z = L$, cela fait intervenir le coefficient

de réflectivité du fond du PBR (ρ_r). Ce coefficient est compris entre 0 pour les matériaux transparents, et 1 pour ceux totalement réfléchissants.

$$\begin{cases} z = 0, & I_\lambda^+ = q_{\lambda,0} \\ z = L, & I_\lambda^- = \rho_r I_\lambda^+ \end{cases} \quad (1.17)$$

La résolution avec ces conditions limites amène à la solution analytique donnée par Pottier *et al.* pour le PBR torique (Pottier et al., 2005) présentée dans l'équation 1.18.

$$\frac{G_\lambda(z)}{q_{\lambda,0}} = 2 \times \frac{[\rho(1 + \alpha_\lambda) \exp(-\delta_\lambda L) - (1 - \alpha_\lambda) \exp(\delta_\lambda L)] \exp(\delta_\lambda z) + [(1 + \alpha_\lambda) \exp(\delta_\lambda L) - \rho(1 - \alpha_\lambda) \exp(\delta_\lambda L)] \exp(-\delta_\lambda z)}{(1 + \alpha_\lambda)^2 \exp(\delta_\lambda L) - (1 - \alpha_\lambda)^2 \exp(-\delta_\lambda L) - \rho(1 - \alpha_\lambda^2) \exp(\delta_\lambda L) + \rho(1 - \alpha_\lambda^2) \exp(-\delta_\lambda L)} \quad (1.18)$$

A noter que cette solution à été également développée par Cornet (Cornet, 2007) pour un angle d'incidence non normal ($\theta \neq 0$), tel que le présente l'équation 1.19.

$$\frac{G_\lambda(z)}{q_{\lambda,0}} = 2 \sec(\theta_c) \times \frac{[\rho(1 + \alpha_\lambda) \exp(-\delta_\lambda L) - (1 - \alpha_\lambda) \exp(\delta_\lambda L)] \exp(\delta_\lambda z) + [(1 + \alpha_\lambda) \exp(\delta_\lambda L) - \rho(1 - \alpha_\lambda) \exp(\delta_\lambda L)] \exp(-\delta_\lambda z)}{(1 + \alpha_\lambda)^2 \exp(\delta_\lambda L) - (1 - \alpha_\lambda)^2 \exp(-\delta_\lambda L) - \rho(1 - \alpha_\lambda^2) \exp(\delta_\lambda L) + \rho(1 - \alpha_\lambda^2) \exp(-\delta_\lambda L)} \quad (1.19)$$

Dans les expressions 1.18 et 1.19, α_λ correspond au module de diffusion linéaire (sans dimension) et est donné par la relation 1.20. δ_λ représente le coefficient d'extinction pour la méthode à deux flux, exprimé en m^{-1} . A noter que son expression diffère selon que le flux incident soit collimaté (cf. équation 1.21) ou diffus (cf. équation 1.22).

$$\alpha_\lambda = \sqrt{\frac{Ea_\lambda}{(Ea_\lambda + 2\bar{b}_{2\lambda}Es_\lambda)}} \quad (1.20)$$

$$\delta_{col,\lambda} = \frac{\alpha C_x}{\cos \theta} (Ea_\lambda + 2\bar{b}_{2\lambda}Es_\lambda) \quad (1.21)$$

$$\delta_{dif,\lambda} = 2\alpha C_x(Ea_\lambda + 2\bar{b}_{2\lambda}Es_\lambda) \quad (1.22)$$

L'expression 1.19 est donnée pour un angle incident du rayonnement lumineux θ_c , par rapport à la normale. Dans les deux cas, les expressions données par les équation 1.18 et 1.19 le sont pour une longueur d'onde, λ . Il est possible d'utiliser ce modèle pour des spectres incidents polychromatiques ou en longueur d'onde moyenne en utilisant des valeurs moyennes de coefficients d'absorption et de diffusion. Bien que dans ce dernier cas le temps de calcul nécessaire et la difficulté d'implémentation du modèle soient grandement diminués, la précision du résultat peut s'en trouver affecter.

En amélioration du modèle à deux flux, il est possible de décliner la distribution spatiale de la diffusion des particules en plus de deux directions. On peut citer comme exemple le modèle à six flux (Chu and Churchill, 1955) où la distribution spatiale est donnée suivant les six directions d'une bipyramide à base carrée. Une comparaison des deux approches (deux et six flux) a été faite par Pottier (Pottier, 2005) et a permis de démontrer que, dans le cas des microorganismes photosynthétiques considérés (ici *Chlamydomonas reinhardtii*), l'approche par le modèle à six-flux imposait un temps de calcul plus important pour une solution théorique moins proche des valeurs expérimentales, ceci s'expliquant par la difficulté alors accrue de définir les propriétés de diffusion dans les différentes directions considérées. Il a donc été conclu que le modèle à deux flux était un très bon compromis entre précision et applicabilité. Il a donc été retenu dans cette thèse.

Approximation P1

L'approximation P1 est une méthode très récente, développée par Dauchet (Dauchet, 2012). Cette méthode "consiste à modéliser \hat{L} par un développement à l'ordre 1 en harmoniques sphériques" (Dauchet, 2012), \hat{L} étant la luminance : intensité lumineuse de la source divisée par la surface éclairée.

Dauchet présente deux manières d'appliquer cette approximation aux photobioréacteurs : une résolution directe de l'équation de diffusion avec les conditions aux limites de Marshak et une seconde pour un rayonnement incident collimaté qui sépare les photons balistiques de ceux diffus. Cette dernière manière considère que les photons diffus sont des photons qui sont diffusés par le milieu (suspension d'algues) et non dus à une anisotropie du rayonnement.

Si on considère cette dernière méthode, le champ d'irradiance est défini dans l'équation 1.24 où C_0 et C_1 sont des constantes satisfaisant les conditions aux limites imposées par l'équation de diffusion, eq. 1.23.

$$\begin{aligned}
 -D\partial_z^2 \widehat{G}^{(d)}(z) &= -k_a^* \widehat{G}^{(d)}(z) + S_{\widehat{G}^{(d)}}(z) \\
 k_a^* &= (1 - \alpha_S^*) k_{ext}^* \\
 k_{ext}^* &= k_{ext} \cdot (1 - \alpha_S^* g) \\
 \alpha_S^* &= \alpha_S \frac{1-g}{1-\alpha_S g} \\
 D &= 1 / (3k_{ext}^*) \cdot S_{\widehat{G}^{(d)}}(z) \\
 S_{\widehat{G}^{(d)}}(z) &= \alpha_S^* k_{ext}^* \frac{q_\cap}{\mu_i} \exp\left(-k_{ext}^* \frac{z}{\mu_i}\right)
 \end{aligned} \tag{1.23}$$

$$\begin{aligned}
 \widehat{G}(z) &= \frac{q_\cap}{\mu_i} \left[\exp\left(-k_{ext}^* \frac{z}{\mu_i}\right) + C_0 \exp(\xi z) + C_1 \exp(-\xi z) \right. \\
 &\quad \left. - \frac{\xi^2 - k_{ext}^*/D}{\xi^2 - (k_{ext}^*/\mu_i)^2} \left(\exp\left[-k_{ext}^* \frac{z}{\mu_i}\right] - \exp[-\xi z] \right) \right] \tag{1.24}
 \end{aligned}$$

Dans l'équation de diffusion, 1.23, D est le coefficient de diffusion macroscopique, k_{ext}^* le coefficient d'extinction de transport, α_S l'albédo de diffusion simple, α_S^* l'albédo de transport g le paramètre d'assymétrie, $S_{\widehat{G}^{(d)}}(z)$ le terme source de la diffusion des photons balistiques dans la suspension microalgale, μ_i le cosinus de l'angle d'incidence du rayonnement et q_\cap la densité du flux de photon par unité de surface (exprimé en $mol_{h\nu} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Dans l'équation 1.24, ξ correspond à $\sqrt{k_a/D}$, où k_a est le coefficient linéique d'absorption, exprimé en $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

L'approximation P1 est fondée sur l'utilisation du problème de transport et part du principe que la luminance varie en cosinus autour d'une valeur moyenne et un flux de photon incident isotopique. De plus, elle permet de traiter séparément les photons balistiques de ceux diffus; cela peut se révéler très utile pour travailler sur les problèmes liés à l'utilisation de l'énergie solaire comme source d'énergie lumineuse en photobioréacteur, le flux solaire étant constitué de parts directes et diffuses variables dans le temps.

Méthode de Monte-Carlo

La méthode de Monte Carlo (MMC) est une méthode numérique de résolution de l'ETR. Elle a déjà été utilisée pour traiter des cas de transfert radiatif en photobioréacteur (Dauchet et al., 2012, Heinrich et al., 2012). Cette méthode sert généralement de méthode référence puisque c'est la seule qui donne la valeur de l'erreur numérique commise par rapport à une résolution exacte. Le principe de la MMC est relativement simple : un ensemble stochastique de chemins optiques est généré, ce qui revient à suivre le trajet parcouru par un photon dans le volume réactionnel. Par exemple, un photon incident interagira soit avec une des parois du PBR, soit avec un microorganisme. Dans le premier cas, en considérant un coefficient de réflexion de la paroi, ρ_r ,

le photon a une probabilité ρ_r d'être réfléchi, et $1 - \rho_r$ d'être absorbé. Pour une interaction avec le microorganisme, la probabilité d'être absorbé est de $1 - \alpha_S$ et donc une probabilité de α_S d'être diffusé. La direction de diffusion du photon se fera en fonction de la fonction de phase du microorganisme, à la longueur d'onde du photon. Ce schéma est reproduit un grand nombre de fois pour obtenir une moyenne représentative.

De plus, comme l'a expliqué Dauchet (Dauchet, 2012), un des principaux avantages de cette méthode est qu'elle est dite analogue *i.e.* les phénomènes simulés par la MMC ont un sens physique (réflexion à la paroi, absorption, diffusion, ...). La prise en compte de la géométrie du PBR est également plus aisée, surtout pour les géométries complexes.

Cependant cette méthode impose des temps de calculs importants. Dans ce travail, la MMC ne sera utilisée que pour valider le calcul des propriétés radiatives sur quelques cas types (cf. 4.2).

1.5.3 Modélisation de système de culture en photolimitation

La modélisation globale de la culture en photolimitation (culture uniquement limitée par l'apport d'énergie lumineuse), implique le couplage à la fois d'un modèle de croissance et d'un modèle de transfert radiatif (Pruvost and Cornet, 2012).

La première étape de la modélisation consiste à écrire l'équation bilan donnant l'évolution temporelle de la concentration en biomasse, selon l'équation 1.25.

$$\frac{dC_x}{dt} = -D \cdot C_x + \langle r_x \rangle \quad (1.25)$$

Cette équation de bilan classique comprend un terme de sortie ($D \cdot C_x$), correspondant à l'évacuation d'une partie de la biomasse par l'apport de milieu de culture à un taux de dilution (D) donné. Le terme $\langle r_x \rangle$ correspond à la production biologique globale due à la croissance et est l'intégrale sur l'ensemble du réacteur des vitesses locales (données par une loi cinétique de croissance), elles-mêmes dépendantes de l'énergie disponible au sein de la culture, prédite par un modèle de transfert radiatif.

La modélisation des systèmes de cultures par cette méthode a déjà été appliquée dans plusieurs cas. Takache *et al.* l'ont notamment utilisée pour prédire les performances maximales atteintes par une culture de *Chlamydomonas reinhardtii* dans deux géométries différentes de PBR (cylindrique et torique) (Takache et al., 2010). Ces auteurs ont utilisé la formulation développée et validée pour la cyanobactérie *Arthrospira platensis* par Cornet et Dussap (Cornet and Dussap, 2009). Takache *et al.* a alors montré que, pour une souche donnée (*C. reinhardtii*), quelle que soit la géométrie du système de culture, les mêmes productivités sont atteintes si le flux hémisphérique, la surface spécifique éclairée et la fraction volumique éclairée sont identiques. Par la suite, Takache a utilisé ce modèle pour apporter des éléments de compréhension sur l'impact des régimes fluctuants de lumière (L/D cycles, passage des cellules de la zone éclairée à la zone sombre du PBR) sur la productivité du système (Takache, 2010).

Cornet a appliqué l'outil théorique de la modélisation pour la conception du prototype de PBR dit DiCoFLuV (Cornet, 2010), défini dans la partie 1.4.2. Son raisonnement a mené à un agencement idéal des fibres optiques (tel que celui présenté sur la figure 1.20b1)) pour lequel les simulations prédisent des performances maximales, proches des limites atteignables de conversion photosynthétique. A noter aussi que Cornet a défini les points cruciaux définissant le concept de PBR idéal (usage en condition solaire ou artificielle).

Enfin, on peut également citer les travaux de Pruvost *et al.* sur la modélisation du fonctionnement de PBR rectangulaire sous conditions solaires (Pruvost et al., 2011). Toujours grâce à la modélisation, ces auteurs ont étudié l'impact des conditions solaires, menant à un comportement dynamique du procédé. Ils ont également montré que la productivité d'un PBR sous conditions solaire n'est pas seulement fonction de la densité de flux incidente ou de la géométrie du PBR, mais également impactée par les conditions de pénétration et d'atténuation au sein de la culture. Ils ont ainsi mis en évidence un probable double effet de l'angle d'incidence,

impactant la captation (diminution du flux capté avec l'augmentation de l'angle d'incidence) mais aussi l'exploitation biologique au sein du volume de culture. L'importance de prendre en compte séparément la part de rayonnement diffus et collimaté (direct) lors de calculs réalisés pour des PBR sous conditions solaire a également été montrée.

1.6 Conclusion

Ce premier chapitre visait à donner un aperçu aussi complet que possible des problématiques associées à la culture de microorganismes photosynthétiques, de l'organisation cellulaire à la modélisation de la culture.

Les différentes études qui ont été précédemment menées sur *Chlorella vulgaris* (microalgue sélectionnée pour cette étude) ont montré que cette microalgue d'eau douce est remarquable de par sa composition cellulaire (forte teneur en pigments et présence de chitine notamment).

Après un tour d'horizon sur les généralités du mécanisme de la photosynthèse et de la respiration, les mécanismes liés à l'adaptation des cellules à la lumière ont été présentés. Cela a permis de mettre en évidence un manque d'informations sur l'impact d'une modification du flux lumineux (comme rencontré en conditions solaires) sur cette adaptation et ses effets sur la productivité globale de la culture. Une partie de ce travail (cf. chapitre 4) sera donc consacrée à l'étude de l'impact de conditions particulières d'éclairement sur la productivité d'une culture de *C. vulgaris*.

La section concernant l'ingénierie des systèmes de culture a mis en avant l'importance de maîtriser l'ensemble des paramètres opératoires pour une production optimisée, et la possibilité d'intensifier fortement la productivité volumique pour mener aux PBR dits HPV (contexte de cette thèse). Elle a également mis en évidence l'intérêt de contrôler l'hydrodynamique au sein de tels systèmes de culture. En effet, à haute concentration cellulaire, la rhéologie de la suspension est modifiée, bien que cela reste largement sous étudié. Le chapitre 3 sera donc dédié à l'étude approfondie de la rhéologie et de l'écoulement de suspensions de *C. vulgaris* en milieu confiné (micro-canaux) pour différentes valeurs de la concentration en microalgues.

Enfin, après avoir présenté les différentes technologies de systèmes de culture et leurs principales caractéristiques, la dernière section a traité des modèles biologiques et de transfert radiatif utilisés pour l'étude et la prédiction des performances des procédés de culture de microorganismes photosynthétiques. Il est apparu que pour *Chlorella vulgaris*, le modèle semi-prédictif proposé par Takache *et al.* (Takache et al., 2010) était applicable. Les paramètres du modèle cinétique de croissance n'étant pas connus, leur détermination sera nécessaire ainsi que pour les propriétés radiatives (coefficients de diffusion et absorption). L'étude bibliographique a aussi confirmé que, pour une bonne représentation globale d'un PBR, le transfert radiatif devait être considéré avec attention. Le modèle à deux flux devrait de révéler dans notre cas (atténuation monodirectionnelle) un bon compromis, sous réserve que les propriétés radiatives de la culture soient connues.

Aussi, la détermination de ces propriétés radiatives sera détaillée dans le chapitre 4, section 4.2,

et le modèle à deux flux sera testé. Les paramètres du modèle cinétique de croissance de *C. vulgaris* seront également calés sur les points expérimentaux et seront présentés dans le même chapitre, section 2.4.

Chapitre 2

Mise en culture et caractérisation de *C. vulgaris*

Sommaire

2.1	Mise en culture de <i>C. vulgaris</i>	54
2.1.1	Photobioréacteurs	54
2.1.2	Composition élémentaire de <i>C. vulgaris</i>	56
2.1.3	Composition du milieu de culture	57
2.2	Analyses et détermination des grandeurs d'intérêts	59
2.2.1	Détermination des intervalles de confiance, IC	59
2.2.2	Analyses de taille et de forme	60
2.2.3	Préparation de suspensions artificiellement concentrées de microalgues	63
2.2.4	Mesure de la concentration en biomasse sèche, C_x	63
2.2.5	Comptage cellulaire, N_p	64
2.2.6	Estimation de la teneur en pigments	64
2.2.7	Estimation de la masse volumique de la matière sèche, ρ_{sec}	65
2.2.8	Estimation de la fraction volumique en eau dans <i>C. vulgaris</i>	66
2.2.9	Vérifications des grandeurs déterminées	67
2.2.10	Mesures du spectre de transmission d'une culture par sphère intégrante	69
2.3	Apport de l'énergie lumineuse	71
2.3.1	Présentation des technologies utilisées	71
2.3.2	Mesures de la densité de flux de photons et du spectre incident	73
2.3.3	Conversions d'unités de la lumière	74
2.4	Modélisation cinétique de la croissance de <i>C. vulgaris</i>	76
2.4.1	Formulation de la loi cinétique	76
2.4.2	Détermination des paramètres du modèle	78

2.1 Mise en culture de *C. vulgaris*

2.1.1 Photobioréacteurs

Pour réaliser cette étude, plusieurs technologies différentes de PBR ont été utilisées, en fonction du volume de culture ou du type d'étude souhaités. Elles appartiennent toutes à la famille de PBR décrite dans la partie 1.4.2 (PBR clos contrôlés). Chaque système permet au minimum un apport de lumière par une source lumineuse qui traverse une paroi en matériau transparent (ici du polyméthacrylate de méthyle, PMMA), un mouvement des cellules par mise en circulation mécanique et/ou pneumatique de la suspension, un contrôle et une régulation du pH et de la température ainsi qu'un fonctionnement en mode batch ou continu (apport et soutirage constant de milieu de culture). Avant leur mise en culture, ces systèmes sont nettoyés puis stérilisés soit par une solution aqueuse d'acide peracétique (3‰ en volume, pendant 20min) soit par de la vapeur d'eau (100°C, pendant 30min). Pour ce travail, trois types de PBR différents ont été utilisés et sont décrits ci-après.

PBR torique

Grâce à sa géométrie, le PBR torique donne accès à un haut niveau de contrôle de la culture. Les performances en terme de mélange (Pruvost et al., 2006), de transfert de lumière (Takache, 2010) et de transfert de gaz (Le Gouic, 2013) de ce PBR ont été caractérisées.

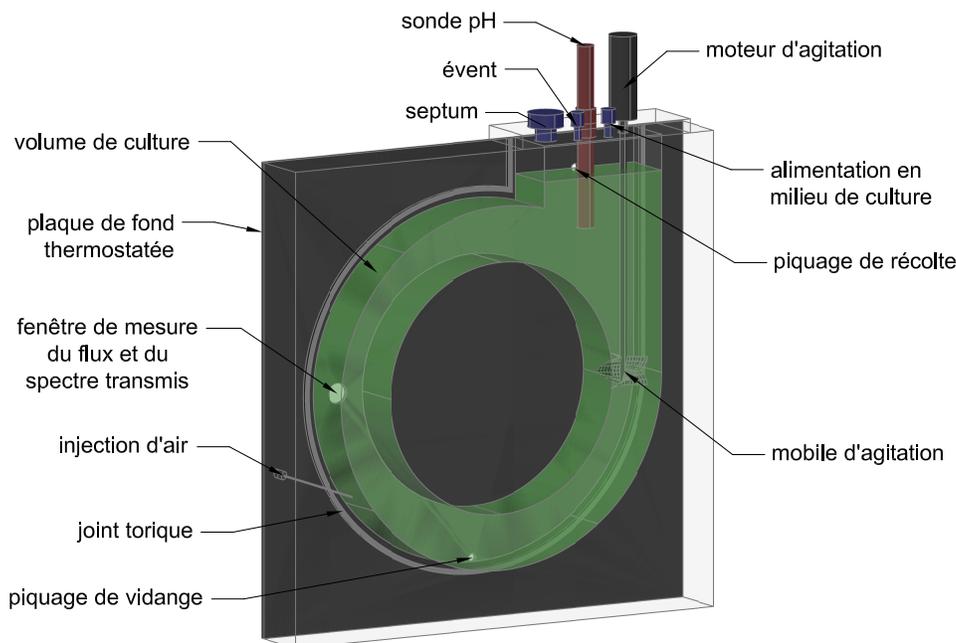


FIGURE 2.1 – Schéma type du photobioréacteur torique

Le corps du PBR (cf. figure 2.1) peut être soit en PMMA soit en acier inoxydable (dans ce cas, une plaque de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) ou de polycarbonate permet l'apport de

lumière). La section d'écoulement dans le PBR est une section carrée de 4cm de côté. L'apport de gaz (air + CO_2 , le dioxyde de carbone servant de source de carbone et permettant la régulation du pH) se fait par un piquage de 1mm de diamètre sur le côté du PBR. La lumière est apportée frontalement à la culture. La platine (partie supérieure du PBR) permet l'insertion d'une sonde pH/température (Mettler-Toledo), d'un piquage pour l'alimentation en milieu de culture, d'un évent et d'un septum (permettant de prélever un volume de culture pour analyses *ex-situ*). Sur la platine est également fixé un moteur pour la mise en rotation de l'hélice marine (agitation mécanique). Le soutirage se fait par débordement, par un piquage à l'arrière du PBR. Un échangeur de chaleur fixé sur la plaque arrière du PBR (toujours en acier inoxydable) permet de réguler la température de la culture. Le volume de culture est de $1,4\text{l}$ et la surface spécifique est de $25\text{m}^2.\text{m}^{-3}$. Du fait du haut degré de contrôle, cette technologie sera utilisée pour étudier les effets d'une variation de spectre lumineux sur la croissance (cf. chapitre 4, section 2.4).

PBR airlift plan

Le PBR airlift plan (dénommé FP pour Flat Panel par la suite) est entièrement fabriqué en PMMA. Comme pour le PBR torique, il se compose d'un corps de réacteur, d'une plaque arrière sur laquelle vient se fixer une double enveloppe pour la régulation de la température, et d'une platine pour l'insertion d'une sonde pH/température, d'une alimentation en milieu de culture, d'un évent et d'un septum. L'apport de lumière se fait frontalement. L'agitation est assurée par un bullage permanent d'air, provenant de huit piquages d'air situés à la base du PBR. La régulation du pH se fait par ajout de dioxyde de carbone mélangé à l'air. Ce type de PBR fait partie des technologies dites "intensifiées". En effet, sa très fine épaisseur de culture (ici 7mm) permet de monter en mode continu à des concentrations en biomasse sèche de plus de $10\text{g}.\text{l}^{-1}$. Le volume de culture de ce PBR est d'environ 290ml et sa surface spécifique est de $150\text{m}^2.\text{m}^{-3}$ soit 8 fois plus importante que pour le PBR torique. Ce PBR sera utilisé pour étudier le comportement de PBR intensifiés sous conditions d'irradiations particulières telles que celles rencontrées en usage solaire (flux élevés, cycles jour/nuit, modification de l'angle d'incidence des rayons lumineux).

Colonne à bulles

La colonne à bulles (ou scobalite) a été uniquement utilisée pour la production en grand volume de suspensions microalgales dans le but de préparer les échantillons pour les mesures rhéologiques et hydrodynamiques. Le volume de culture de cette colonne est de 120 litres. L'apport de lumière se fait sur les trois quarts de la surface de la colonne. On y retrouve une sonde pH/température ainsi que huit piquages pour le bullage permanent d'air (agitation uniquement pneumatique) et l'ajout de dioxyde de carbone pour la régulation du pH. Même s'il est possible de travailler en mode continu avec ce type de système, dans ce travail, seul le mode batch a été utilisé, ce qui a permis d'obtenir des concentrations en biomasse sèche de l'ordre de $0,4\text{g}.\text{l}^{-1}$. La surface spécifique de cette technologie est de $10\text{m}^2.\text{m}^{-3}$, soit 2,5 fois inférieure à celle du PBR torique et 15 fois inférieure à celle du FP.

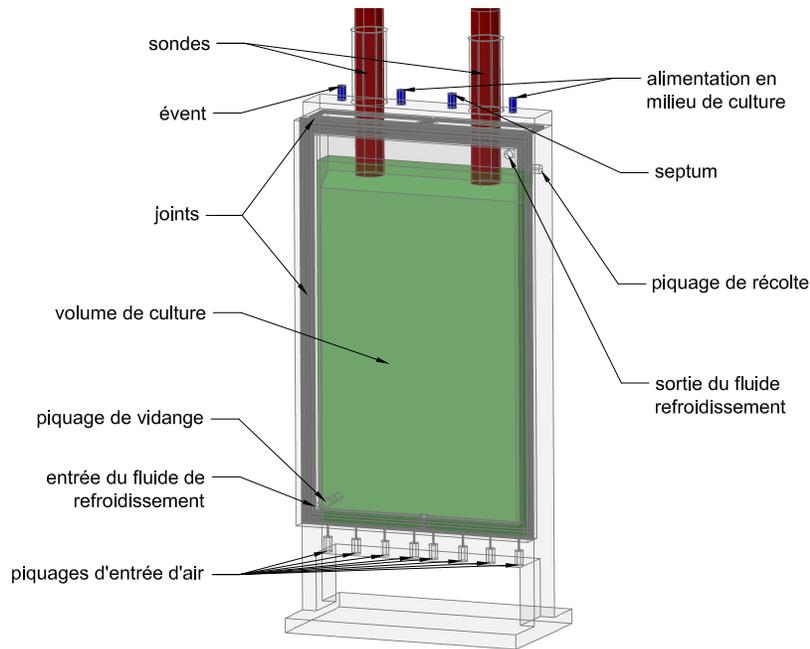


FIGURE 2.2 – Schéma type du photobioréacteur plan airlift

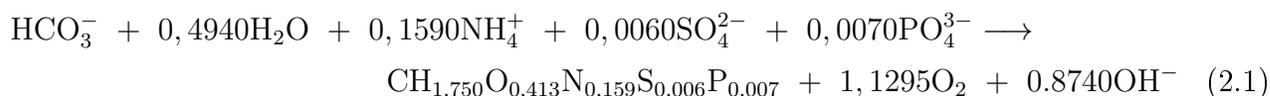
2.1.2 Composition élémentaire de *C. vulgaris*

La composition élémentaire de la biomasse permet de connaître la proportion des éléments constitutifs principaux dans la matière sèche. Cette analyse a été réalisée par le Service central d'analyse (SCA) du CNRS (Département des sciences analytiques - Villeurbanne, Lyon, France). L'analyse élémentaire a été faite sur 3 échantillons différents de *C. vulgaris*, cultivés dans un PBR plan de 7mm d'épaisseur sous une irradiation de $100\mu\text{mol}_{hv}$. La composition élémentaire moyenne est présentée dans le tableau 2.1. Sa masse C-molaire, notée M_x est de $23,5\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

TABLE 2.1 – Composition élémentaire mesurée moyennée sur trois échantillons de cellules de *Chlorella vulgaris* CCAP 211-19

éléments	C	H	O	N	S	P	K	Mg	Ca
% massique	0.480	0.070	0.264	0.089	0.008	0.009	0.011	0.003	0.002
Composition C molaire	1	1.742	0.413	0.158	0.006	0.008	0.0073	0.0036	0.0013

Takache a montré que la composition élémentaire de *C. reinhardtii* variait très peu avec la densité de flux de photons (Takache, 2010). Cette conclusion a été reprise ici pour *C. vulgaris*, ce qui a permis de déterminer, à partir de la composition élémentaire, la stœchiométrie globale moyenne de la conversion des substrats, comme le présente l'équation 2.1. Cette équation a été établie pour une source d'azote se trouvant sous forme d'ions ammoniums, de soufre sous forme d'ions sulfates, et de phosphore sous forme d'ions phosphates.



2.1.3 Composition du milieu de culture

A partir de l'équation stœchiométrique de croissance 2.1, le milieu Sueoka (Sueoka, 1960) a été modifié pour correspondre aux besoins de *C. vulgaris*. La composition de la base de ce milieu est donnée dans le tableau 2.2 et celle de la solution Hutner, apportant les éléments trace, dans le tableau 2.3.

TABLE 2.2 – Composition du milieu de culture de *C. vulgaris* (pH \approx 7) défini pour une concentration maximale en biomasse de $4g.l^{-1}$

Constituant	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Concentration massique ($g.l^{-1}$)	Concentration molaire ($mol.l^{-1}$)
NH ₄ Cl	53.5	1.45	$2.71 * 10^{-2}$
MgSO ₄ , 7H ₂ O	246.25	0.28	$1.14 * 10^{-3}$
CaCl ₂	147.02	0.05	$3.40 * 10^{-4}$
KH ₂ PO ₄	136.09	0.61	$4.48 * 10^{-3}$
NaHCO ₃	84.01	1.68	$2.00 * 10^{-2}$
<i>SolutionHutner</i>	$1ml.l^{-1}$		

Ce milieu permet d'obtenir une concentration maximale en biomasse d'environ $4g.l^{-1}$ avant apparition d'une carence minérale. A noter que le milieu Sueoka présente l'inconvénient, du fait des concentrations importantes nécessaires (en particulier pour les cultures intensifiées), d'un fort risque de précipités entre le calcium et le phosphate, surtout à chaud (également à froid mais avec une cinétique beaucoup plus lente). Le composé principalement formé est un précipité d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). L'apparition de ce précipité limite fortement la disponibilité du calcium et du phosphate dans la culture (les microalgues assimilent uniquement ce qui est en suspension). Aussi, pour limiter le risque d'apparition de ce précipité, le phosphate sera ajouté dans le milieu de culture par filtration, après autoclavage. Il en est de même pour le carbonate qui risquerait de former à chaud un précipité de carbonate de calcium, ou de désorber lors de l'autoclavage.

De la même manière, un milieu dit de conservation a été mis au point. Ce milieu a la particularité de contenir une source d'azote de type nitrate à la place de l'ammonium, et de ne pas contenir de bicarbonate (l'unique source de carbone est donc le dioxyde de carbone échangé avec

TABLE 2.3 – Composition de la solution de Hutner

Constituant	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Concentration massique ($g.l^{-1}$)	Concentration molaire ($mol.l^{-1}$)
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	287.6	22	$7.65 * 10^{-2}$
H ₃ BO ₃	61.8	11.4	$1.84 * 10^{-1}$
MnCl ₂ , 4H ₂ O	197.9	5.06	$2.56 * 10^{-2}$
CoCl ₂ , 6H ₂ O	237.9	1.61	$6.77 * 10^{-3}$
CuSO ₄ , 5H ₂ O	249.7	1.57	$6.29 * 10^{-3}$
FeSO ₄ , 7H ₂ O	278.0	4.99	$1.79 * 10^{-2}$
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	1235.9	1.1	$8.90 * 10^{-4}$
KOH	56.1	50	$8.91 * 10^{-1}$
Na ₂ EDTA	338.2	≈ 20	$5.91 * 10^{-2}$

l'atmosphère). Ceci a pour effet de ralentir la croissance du microorganisme et ainsi d'éviter les repiquages trop fréquents, et donc de limiter les dérives génétiques. Sa composition est donnée dans le tableau 2.4 permettant d'obtenir une concentration maximale de $4g.l^{-1}$. A ce milieu, il est possible d'ajouter 1.75% en masse de gélifiant (agar) de façon à obtenir des géloses pour une culture immobilisée (conservation de souche).

TABLE 2.4 – Composition du milieu de conservation

Constituant	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Concentration massique ($g.l^{-1}$)	Concentration molaire ($mol.l^{-1}$)
NaNO ₃	85.0	0.2510	$2.95 * 10^{-3}$
MgSO ₄ , 7H ₂ O	246.2	0.0750	$3.05 * 10^{-4}$
K ₂ HPO ₄	174.2	0.0750	$4.31 * 10^{-4}$
KH ₂ PO ₄	136.1	0.1750	$1.29 * 10^{-3}$
NaCl	58.4	0.0600	$1.03 * 10^{-3}$
CaCl ₂ , 2H ₂ O	147.0	0.0250	$1.70 * 10^{-4}$
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	287.6	0.0009	$3.13 * 10^{-6}$
MnCl ₂ , 4H ₂ O	197.9	0.0001	$5.05 * 10^{-7}$
MoO ₃	143.3	0.0001	$6.95 * 10^{-7}$
CuSO ₄ , 5H ₂ O	249.7	0.0002	$8.01 * 10^{-7}$
CoNO ₃ , 6H ₂ O	229.1	0.00001	$4.37 * 10^{-8}$
BO ₃ H ₃	61.8	0.0011	$1.78 * 10^{-5}$
Na ₂ EDTA	338.2	0.0500	$1.48 * 10^{-4}$
KOH	56.1	0.0310	$5.53 * 10^{-4}$
FeSO ₄ , 7H ₂ O	278.0	0.0050	$1.80 * 10^{-5}$
H ₂ SO ₄	98.1	0.0010	$1.02 * 10^{-5}$

2.2 Analyses et détermination des grandeurs d'intérêts

2.2.1 Détermination des intervalles de confiance, IC

Toutes les grandeurs mesurées sont associées à des incertitudes. Dans le cas présent, il peut s'agir d'incertitude absolue (basée sur la précision des mesures et des appareils utilisés) ou d'intervalle de confiance déterminés pour une moyenne à partir de la loi de Student (Daudin et al., 1999). Pour que les calculs d'intervalles de confiance soient applicables, les analyses (notamment biomasse sèche et pigments) ont été réalisées au minimum en triplicats.

Le principe de la méthode est de fixer deux bornes entre lesquelles les valeurs des échantillons sont attendues. En règle générale, on se place dans le cas où la probabilité d'avoir des valeurs comprises entre les deux bornes est égale à $1 - \alpha$ avec α relativement petit (de l'ordre de 5%). De là, en utilisant une statistique dite pivotale, dépendante des variables mesurées (équation 2.2), on obtient que la probabilité d'avoir la fonction $T^{p\nu}$ comprise entre deux quantiles, $u_{\alpha/2}$ et $u_{1-\alpha/2}$, est égale à $1 - \alpha$.

$$T^{p\nu} = \sqrt{n} \frac{\bar{X} - \mu}{\sigma} \quad (2.2)$$

La loi de probabilité est symétrique ce qui implique que $u_p = -u_{1-p}$. On peut donc écrire la relation 2.3.

$$Pr \left\{ -u_{1-\alpha/2} < T^{p\nu} = \sqrt{n} \frac{\bar{X} - \mu}{\sigma} < u_{1-\alpha/2} \right\} = 1 - \alpha \quad (2.3)$$

En extrayant μ de l'équation 2.3, on obtient la définition des deux bornes $B1$ et $B2$ telles que présentées dans l'équation 2.4.

$$Pr \left\{ \bar{X} - u_{1-\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + u_{1-\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right\} = 1 - \alpha \quad (2.4)$$

$$B1 = \bar{X} - u_{1-\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad \text{et} \quad B2 = \bar{X} + u_{1-\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

2.2.2 Analyses de taille et de forme

L'analyse de taille et de forme a été réalisée sur des clichés obtenus en microscopie droite à transmission (microscope AxioScope A.1 muni d'une caméra couleur AxioCam MRC, ZEISS) à l'aide du logiciel fourni avec le microscope (AxioVision, ZEISS). 2871 cellules ont été analysées manuellement par détermination de leurs diamètres de Ferret (minimum et maximum). A partir de ces données, les caractéristiques de forme et de distribution ont été calculées. Concernant la forme, deux cas ont été considérés :

- Approximation de la géométrie des cellules par des sphères équivalentes en volume : cette approximation considère la forme des cellules parfaitement sphérique. Dans ce cas, la résolution des équations du transfert radiatif au sein de la culture sera plus simple et plus rapide puisqu'il est possible d'utiliser la solution de Lorenz-Mie des équations de Maxwell (Mie, 1908).
- Approximation de la géométrie des cellules par des particules de Tchebychev : les particules de Tchebychev, $T_n(\varepsilon)$, sont des sphères ayant subi une déformation d'ordre n . Le polynôme de Tchebychev est défini sur l'intervalle $[-1, 1]$ et est donné par la première relation de l'équation 2.5. Son rayon est donné en coordonnées sphériques par la dernière relation de l'équation 2.5. La déformation d'une sphère par le polynôme de Tchebychev donne accès à un grand nombre de formes différentes, comme celles qui sont présentées sur la figure 2.3. L'axe de révolution est ici l'axe des abscisses. L'orientation de la particule par rapport à cet axe est donnée par le signe du paramètre de déformation ε : positif représenté sur la première ligne de la figure 2.3 ou négatif représenté sur la seconde ligne. Le volume d'une particule de Tchebychev ainsi que son rayon équivalent en volume ($R(4, 3)$)

est donné par les relations 2.5 (Cornet, 2007).

$$\begin{aligned}
 T_n(\cos(\theta)) &= \cos(n\theta) \\
 r(\theta, \phi) &= a[1 + \varepsilon T_n(\cos\theta)] \\
 T_v &= 1 + \frac{3}{2}\varepsilon^2 - \frac{3\varepsilon(4 + \varepsilon^2)}{8(n^2 - 1)}(\cos(n\pi) + 1) - \frac{3}{4}\frac{\varepsilon^2}{4n^2 - 1} - \frac{1}{8}\frac{\varepsilon^3}{9n^2 - 1}(\cos(n\pi) + 1) \\
 \lim_{n \rightarrow \infty} [T_v] &= 1 + \frac{\varepsilon}{20} \\
 V &= \frac{4}{3}\pi a^3 T_v \\
 r_v &= a\sqrt[3]{T_v}
 \end{aligned} \tag{2.5}$$

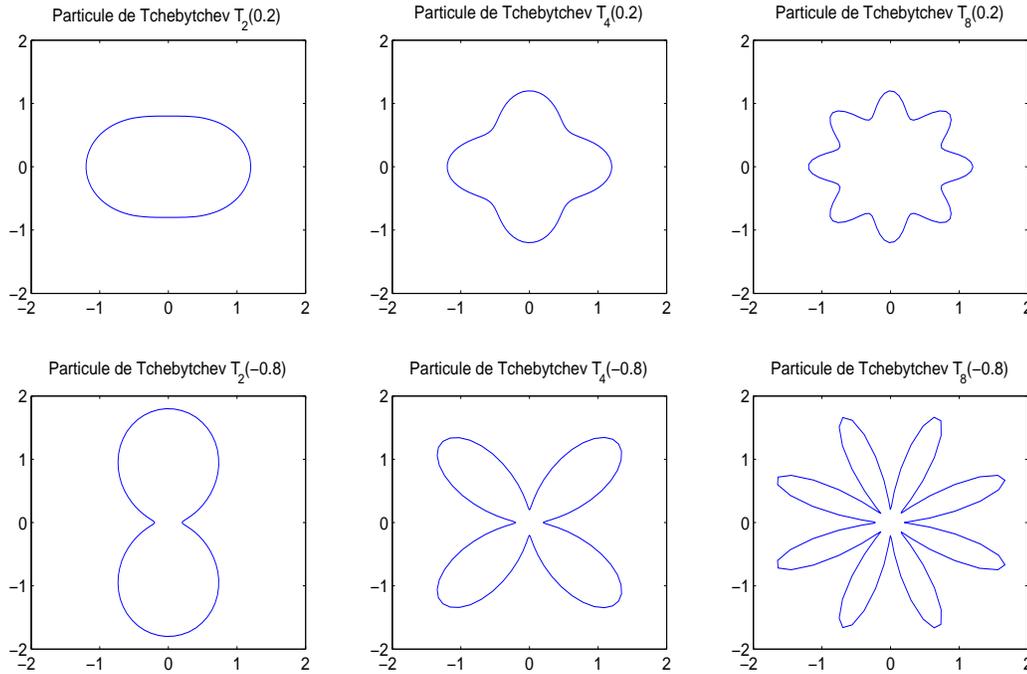


FIGURE 2.3 – Exemples de géométries obtenues à partir de la déformation d’une sphère par le polynôme de Tchebychev pour différents ordres n de déformation et différents paramètres ε de déformation **positif** (première ligne) et **négatif** (seconde ligne)

Pour une forme donnée, la distribution de taille (rayon) peut-être déterminée. Trois cas types sont classiquement utilisés :

- Traitement statistique pour une distribution gaussienne : dans ce cas, la distribution de taille est approximée par une loi de Gauss (ou loi normale). Cette loi, définie par Laplace en 1774 puis par Gauss en 1809, fait appel à deux grandeurs qui sont l’espérance (nombre réel, noté μ) et la variance (nombre réel strictement positif, noté σ^2). La den-

sité de probabilité correspondante à une distribution normale est définie par l'équation 2.6.

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp - \left[\frac{1}{2\sigma^2}(x - \mu)^2 \right] \quad (2.6)$$

- Traitement statistique pour une distribution log-normale : la loi log-normale ou loi de Galton est une loi de probabilité où le logarithme de la variable aléatoire suit une loi normale. Elle est utilisée lorsque toutes les valeurs étudiées sont positives. La densité de probabilité est définie par l'équation 2.7 où μ et σ^2 sont, comme dans la loi normale, l'espérance et la variance, et x l'échantillon considéré, strictement positif.

$$f(x; \mu, \sigma) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp - \left[\frac{1}{2\sigma^2} \ln(x - \mu)^2 \right] \quad (2.7)$$

- Cas monodisperse : ce cas, le plus simple, représente le cas où toutes les cellules auraient la même taille (ce qui est loin de la réalité).

Les résultats obtenus par les différentes approches sont répertoriés dans le tableau 2.5. Au vu des résultats, le diamètre obtenu par traitement statistique avec la loi log-normale sera retenu puisqu'il permet de prendre en compte une répartition des tailles tout en minimisant l'erreur commise sur le diamètre obtenu expérimentalement. L'erreur est ici définie comme étant la somme des variances entre la fréquence des différentes classes mesurées et obtenues par la loi statistique considérée. La fonction de probabilité de distribution est tracée avec une courbe de tendance suivant une loi log-normale sur le graphique 2.4.

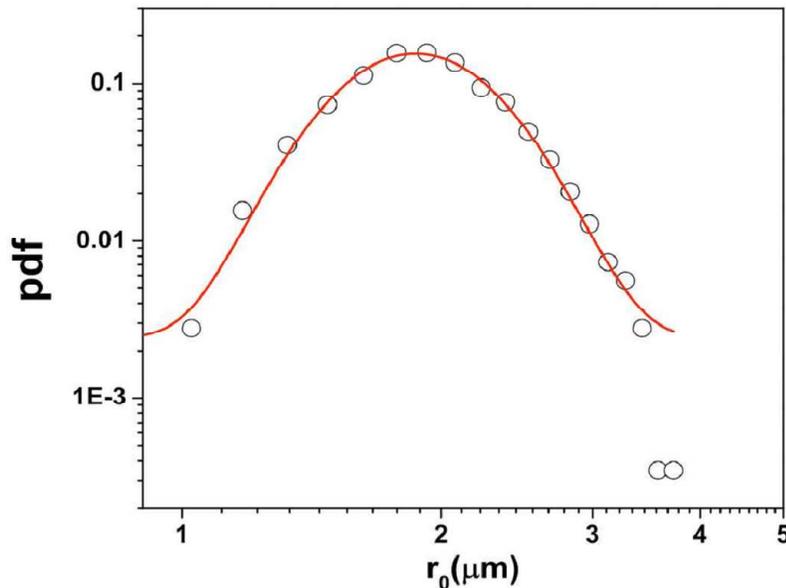


FIGURE 2.4 – distribution de taille statistique de *C. vulgaris*. La courbe représente la courbe de tendance suivant une loi log-normale

TABLE 2.5 – Récapitulatif de l’analyse de taille et de forme de *C. vulgaris*

Caractéristique de taille de <i>C. vulgaris</i> CCAP 211-19		Nombre de cellules étudiées : 2871		
Approximation sphère (R_{32})	r_{moyeq} (μm)	2.120		
	écart type	0.418		
Particule de Tchebychev	r_{moyeq} (μm)	1.986	Epsilon	0.091
			y	2
Traitement par distribution gaussienne	r_{moyeq} (μm)	1.916	Erreur commise	
	écart type	0.386	3.30 %	
Traitement par distribution log-normale	r_{moyeq} (μm)	1.939	Erreur commise	
	écart type	1.218	2.28 %	

2.2.3 Préparation de suspensions artificiellement concentrées de microalgues

Pour toutes les expérimentations menées sur l’étude rhéologique et hydrodynamique, les suspensions de microalgues utilisées ont été préparées artificiellement (les systèmes de production les plus performants comme AlgoFilm (Pruvost et al., 2010) atteignent 30 à 40g/l au maximum). La culture initiale des microalgues s’est faite dans une colonne à bulles (cf. 2.1.1) avec un apport d’énergie lumineuse par tubes fluorescents (cf. 2.11). Après récolte d’un volume important de culture peu concentrée (environ 50l, $0,3 < C_x < 0,5g.l^{-1}$) celle-ci a été centrifugée à 5000g pendant 15 minutes dans une centrifugeuse continue (Rousselet-Robatel - DRA20VX) permettant de concentrer la suspension à un volume de 3l environ. Ensuite, pour la même valeur d’accélération et la même durée, la culture a été centrifugée dans des godets de 500ml maximum (centrifugeuse Thermo - Sorvall[©] RC6 Plus). Enfin, pour concentrer la suspension au-delà de 100g.l⁻¹, le concentrat obtenu précédemment a été centrifugé (5000g – 15min) dans des tubes de 50ml (centrifugeuse Hettich - Mikro 22R) jusqu’à obtenir la concentration maximale souhaitée. A chaque étape, les microalgues ont été resuspendues avec le milieu de culture récupéré (surnageant) par centrifugation.

2.2.4 Mesure de la concentration en biomasse sèche, C_x

La mesure de la matière sèche s’effectue grâce à des filtres secs (110°, 24h) de 0.7 μm en fibre de verre Whatman (GF/F). Ils sont utilisés pour filtrer un volume connu de suspension microalgale. Ce volume doit être tel que la masse de biomasse soit approximativement de 10mg sur le filtre. Les filtres contenant la biomasse sont ensuite séchés à l’étuve (110°C pendant 24 heures) puis refroidis au dessiccateur (environ 15 minutes) et enfin pesés. La différence de masse entre le filtre seul (sec) et le filtre séché contenant la biomasse permet de déterminer la concentration en biomasse sèche.

2.2.5 Comptage cellulaire, N_p

Le comptage cellulaire à la cellule de Malassez (cf figure 2.5) consiste à dénombrer les cellules présentes sur une surface donnée et connue. Un quadrillage de dimensions précises est gravé sur une lame de profondeur connue ce qui permet de compter les cellules présentes dans un volume connu de culture. Pour que le comptage soit statistiquement correct, il faut pouvoir compter au moins 300 cellules. Ceci permet de calculer la concentration cellulaire dans le PBR.

Comme schématisé sur la figure 2.5, chaque rectangle de $0,2 * 0,25mm$ a un volume de $10^{-5}ml$ et la totalité des 100 rectangles a un volume de $10^{-3}ml$. Si la culture est diluée avant d'être comptée, le taux de dilution est pris en considération ($f = \frac{V_f}{V_i}$). Le nombre de cellules par ml est alors déduit par :

$$N = \frac{n}{25} * f * 10^{-5} \text{ cell.ml}^{-1} \quad (2.8)$$

Des mesures simultanées de matière sèche et de comptage cellulaire (cf. tableau 2.6) ont montré qu'il y avait environ $11,7 * 10^7$ cellules par ml dans une suspension de *C. vulgaris* à $1g/l$ de matière sèche, soit une masse cellulaire moyenne de $8,76.10^{-15}kg.cell^{-1} \pm 10\%$.

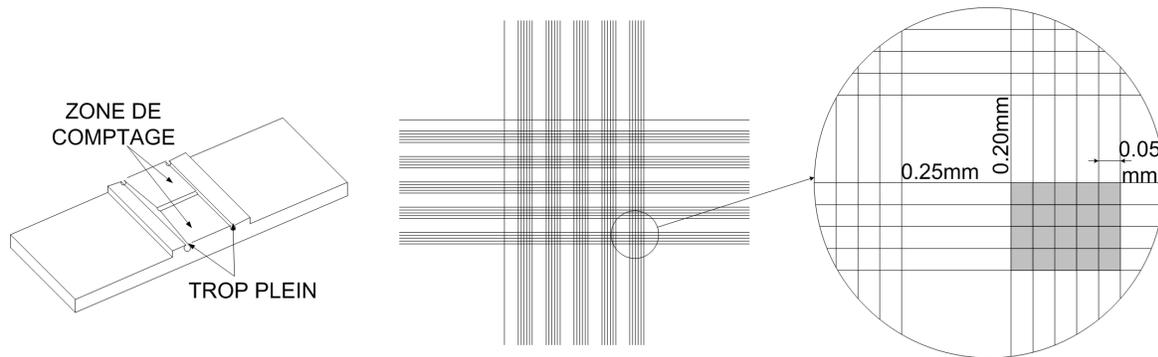


FIGURE 2.5 – Vue globale, vue de la gravure et détail de la cellule de Malassez

TABLE 2.6 – Mise en correspondance des mesures de biomasse sèche et des comptages cellulaires

C_x ($g.l^{-1}$)	0,19	0,27	0,21	0,18
IC (%)	4,5	4,3	6,8	6,7
N_p ($cell.ml^{-1}$)		$3,17.10^7$	$2,07.10^7$	$2,35.10^7$
Masse cellulaire moyenne (kg)		$8,52.10^{-15}$	$1,01.10^{-14}$	$7,66.10^{-15}$

2.2.6 Estimation de la teneur en pigments

Après avoir concentré un volume connu de suspension microalgale, l'extraction des pigments contenus dans le culot en voie humide est faite par addition d'un volume connu de méthanol puis incubation à l'abri de la lumière à $44^{\circ}C$ pendant une durée comprise entre $45min$ et $3h$. Ensuite,

les échantillons sont centrifugés $10min$ à $12000g$ pour séparer les débris cellulaires du surnageant contenant les pigments. Ce surnageant est ensuite dosé par spectrophotométrie à double faisceaux. Les travaux de Ritchie et Raymond (Ritchie and Raymond, 2006, Ritchie, 2008) et de Strickland et Parsons (Strickland and Parsons, 1970) permettent d'estimer les concentrations en chlorophylle a et b ainsi qu'en caroténoïdes de protection (ou PhotoProtective Caroténoïdes - PPC) d'après les relevés d'absorbance du surnageant à des longueurs d'ondes précises. La relation utilisée est la suivante :

$$C = [E_{\lambda_1,1}A_{\lambda_1} + E_{\lambda_2,1}A_{\lambda_2}]V_2l^{-1}V_1^{-1} \quad (2.9)$$

où E est le coefficient d'absorbance (exprimé en $mg.l^{-1}.cm.A^{-1}$) à l'absorbance considérée A (exprimée en $A.cm^{-1}$), l la profondeur optique de la cuve, V_1 le volume de suspension microalgale et V_2 le volume de solvant.

Pour *C. vulgaris* (Chlorophytes) les longueurs d'ondes d'analyses et les coefficients à appliquer sont répertoriés dans le tableau 2.7 (Ritchie and Raymond, 2006, Strickland and Parsons, 1970). A chaque absorbance mesurée, la valeur de la turbidité (valeur de l'absorbance pour une longueur d'onde $\lambda \geq 750nm$) est retranchée. Cela permet de s'affranchir dans une certaine mesure des impuretés présentes dans les échantillons (débris cellulaire restants, bactéries, ...). L'équation 2.9 devient donc :

$$C = [E_{\lambda_1,1}(A_{\lambda_1} - A_{750}) + E_{\lambda_2,1}(A_{\lambda_2} - A_{750})]V_2l^{-1}V_1^{-1} \quad (2.10)$$

TABLE 2.7 – Longueurs d'ondes d'analyses et coefficients à appliquer pour les équations spectrophotométriques pour une extraction au méthanol (Ritchie and Raymond, 2006, Strickland and Parsons, 1970)

λ (nm)		480	652	665
E_{λ} ($mg.l^{-1}.cm.A^{-1}$)	Chlorophylle a		-8.0962	16.5169
	Chlorophylle b		27.4405	-12.1688
	Caroténoïdes	4.00000		

2.2.7 Estimation de la masse volumique de la matière sèche, ρ_{sec}

Cette valeur est importante puisqu'elle permet de passer des sections efficaces d'absorption ou de diffusion, en m^2 , aux coefficients massiques d'absorption ou de diffusion, exprimés en $m^2.kg^{-1}$ (cf. chapitre 4 section 4.2). Après récolte d'une suspension microalgale de *C. vulgaris* (50litres, $C_x \simeq 0.5g.l^{-1}$), concentration par centrifugation à 5000 g et rinçage à l'eau déminéralisée, le concentrat a été séché trois jours à $60^{\circ}C$ puis trois jours à $110^{\circ}C$. Une fois sec, le dépôt

a été broyé pour obtenir une poudre fine (afin d'éviter la présence de bulles d'air emprisonnées dans le dépôt). Une masse connue de poudre a été ajoutée dans une burette graduée remplie à un niveau connu d'huile de paraffine. Le niveau du ménisque est relevé après addition de la poudre et la différence donne le volume de la poudre. Le rapport masse de poudre sur volume de poudre donne la masse volumique de la matière sèche. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.8. La masse volumique de la matière sèche obtenue est d'environ $1371 \pm 21 \text{kg.m}^{-3}$. Cela est cohérent avec la littérature, où la masse volumique de la matière sèche de 1400kg.m^{-3} est usuellement utilisée (Pottier, 2005, Cornet, 2007).

TABLE 2.8 – Mesures de la masse volumique de la matière sèche de *Chlorella vulgaris* CCAP 211-19

essai 1	Masse de poudre ajoutée	2.7183	g
	Variation du niveau d'huile	1.95	ml
	Masse volumique de la MS	1394 ± 72	kg.m^{-3}
essai 2	Masse de poudre ajoutée	3.1524	ml
	Variation du niveau d'huile	2.3	ml
	Masse volumique de la MS	1371 ± 60	kg.m^{-3}
essai 3	Masse de poudre ajoutée	3.2238	g
	Variation du niveau d'huile	2.40	ml
	Masse volumique de la MS	1343 ± 56	kg.m^{-3}
essai 4	Masse de poudre ajoutée	2.2025	g
	Variation du niveau d'huile	1.6	ml
	Masse volumique de la MS	1377 ± 86	kg.m^{-3}
Masse volumique moyenne de la MS		1371 ± 69	kg.m^{-3}

2.2.8 Estimation de la fraction volumique en eau dans *C. vulgaris*

A partir des valeurs déterminées ci-avant (correspondance comptage cellulaire / biomasse sèche (cf. tab 2.6) et de la distribution de taille log-normale (cf. tab 2.5)), il est possible de calculer la fraction volumique des cellules. La forme des cellules a été modélisée ici par des particules de Tchebychev d'ordre $n = 2$ et de paramètre de déformation $\varepsilon = 0.0965$. Comme le montre la figure 2.6 on obtient dans le cas présent une forme très proche de la sphère.

En raisonnant par unité de volume et pour une concentration en biomasse sèche donnée (par exemple 1litre avec 1g.l^{-1}), la quantité d'eau extracellulaire peut être déterminée. Dans un litre de suspension, il y a donc 1gramme de biomasse sèche, représentant un volume de $1/1371 \text{litre}$. En soustrayant ce volume au volume occupé par les cellules "humides" (*i.e.* biomasse sèche + eau intracellulaire) le volume d'eau intracellulaire est déterminé. Le rapport *volume d'eau*

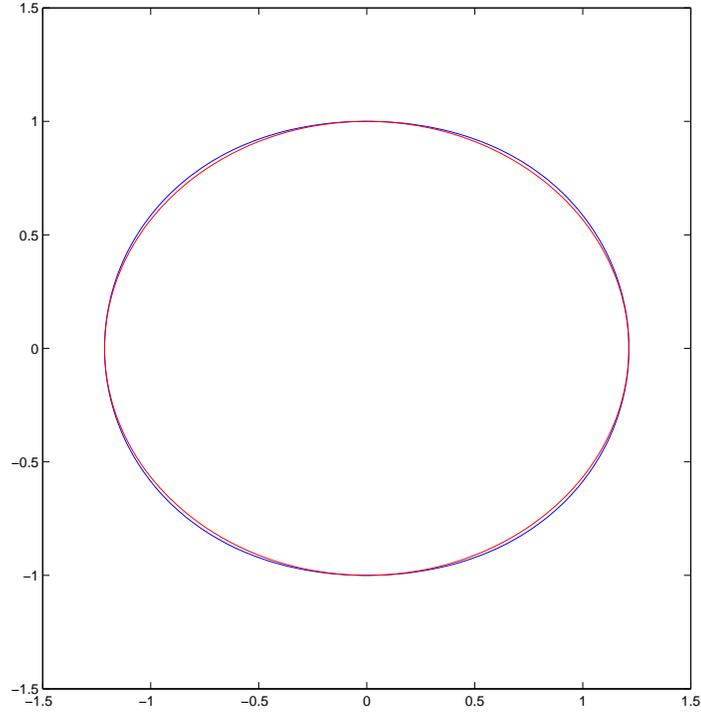


FIGURE 2.6 – Comparaison entre une particule de Tchebychev, $T_2(0.0965)$, en bleu et une ellipse de ratio de Feret $R_{Feret} = 0.824$ en rouge

intracellulaire / *volume total occupé par les cellules* donne la fraction volumique en eau intracellulaire, x_w . Les résultats détaillés sont présentés dans le tableau 2.9, avec une fraction volumique x_w de 0,7878.

2.2.9 Vérifications des grandeurs déterminées

Afin de vérifier la justesse des paramètres déterminés ci-avant (C_x , N_p , \bar{V}_p , ρ_D et x_w), ceux-ci doivent satisfaire la relation 2.11 (Cornet, 2007). Elle permet de détecter une erreur sur une des grandeurs (notamment l'analyse de taille) et doit être validée à 10 – 20% près (écart calculé entre les deux termes, de chaque côté du signe =).

$$\frac{C_x}{N_p} = \bar{V}_p \rho_D (1 - x_w) \quad (2.11)$$

Cette relation est déduite des relations 2.12 où Φ_v est le volume occupé par les cellules, w_{sec} la fraction massique en matière sèche dans une cellule et ρ_p la masse volumique d'une particule humide.

TABLE 2.9 – Calcul de la fraction volumique en eau dans une cellule de *C. vulgaris*

données	biomasse sèche ($g.l^{-1}$)	1.0000
	masse volumique de la MS ($kg.m^{-3}$)	1371
	comptage cellulaire ($cell.ml^{-1}$)	$11.73 * 10^7$
incertitudes	biomasse sèche (%)	5
	masse volumique de la MS (%)	5
	comptage cellulaire (%)	5
	taille & forme (%)	10
résultats	volume total occupé par les cellules par unité de volume	0.0034
	volume d'eau extracellulaire (l)	0.9966
	volume d'eau intracellulaire (l)	0.0027
	fraction volumique en eau intracellulaire	0.7878 ± 0.6460

$$\Phi_v = N_p \bar{V}_p$$

$$C_x = \Phi_v \rho_p w_{sec} \quad (2.12)$$

$$\rho_p = x_w \rho_{eau} + (1 - x_w) \rho_{sec}$$

$$w_{sec} = \frac{(1 - x_w) \rho_{sec}}{\rho_p}$$

Les résultats obtenus par la relation 2.11 permettent de valider nos mesures (écart systématiquement inférieur à 20%). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.6.

TABLE 2.10 – Validation de l'analyse de taille et de forme

Matière sèche ($g.l^{-1}$)	0.19	0.27	0.21	0.18
Intervalle de confiance (%)	4.5	4.3	6.8	6.7
Comptage cellulaire ($cell.ml^{-1}$)		$3.17 * 10^7$	$2.07 * 10^7$	$2.35 * 10^7$
Écart relatif (cf. équation 2.11) (%)		0.54	15.6	11.8

2.2.10 Mesures du spectre de transmission d'une culture par sphère intégrante

L'objectif *in fine* de la mesure du spectre de transmission est la détermination et/ou la validation des propriétés radiatives (coefficient massique d'absorption, de diffusion et coefficient de rétrodiffusion, cf. partie 4.2). Pour la validation des PO, la mesure du spectre de transmission est un des points de départ avec l'analyse de taille et de forme ainsi que la concentration en biomasse sèche et la teneur en pigments. Cette mesure doit être la plus fiable et précise possible du fait de l'importance des propriétés radiatives dans la modélisation du transfert radiatif en PBR. Pour cela, les mesures ont été réalisées en sphère d'intégration, permettant de collecter la quasi totalité du flux diffusé par les microalgues.

Deux appareillages différents ont été utilisés pour réaliser ces mesures :

- Les premières mesures ont été réalisées en collaboration avec l'Institut Pascal de Clermont-Ferrand, en utilisant leur matériel. Le banc expérimental (cf. figure 2.7) est un prototype développé par la société SAFAS (Monaco). Il se compose d'une sphère d'intégration d'un diamètre de 152mm, qui a été développée aux USA par la société Labsphere®. Le revêtement intérieur est en SPECTRALON®. Cette matière a une réflectance hémisphérique de plus de 99% sur l'ensemble du PAR (cf. figure 2.8), ce qui permet, combiné à la taille importante de la sphère, d'obtenir une très bonne précision sur la mesure. Elle est, de plus, équipée d'un système permettant d'identifier la réflexion diffuse ou spéculaire. La sphère est reliée à un spectrofluorimètre à lampe au xénon (SAFAS, Monaco) par le biais de fibres optiques. Cela permet également d'envoyer un rayonnement collimaté (par des lentilles) sur l'échantillon à analyser. L'avantage majeur de ce banc est que, la puissance de la lampe permet de travailler avec des échantillons fortement absorbant (densité optique jusqu'à 3). Le spectrofluorimètre est relié à un poste informatique permettant l'acquisition des données.

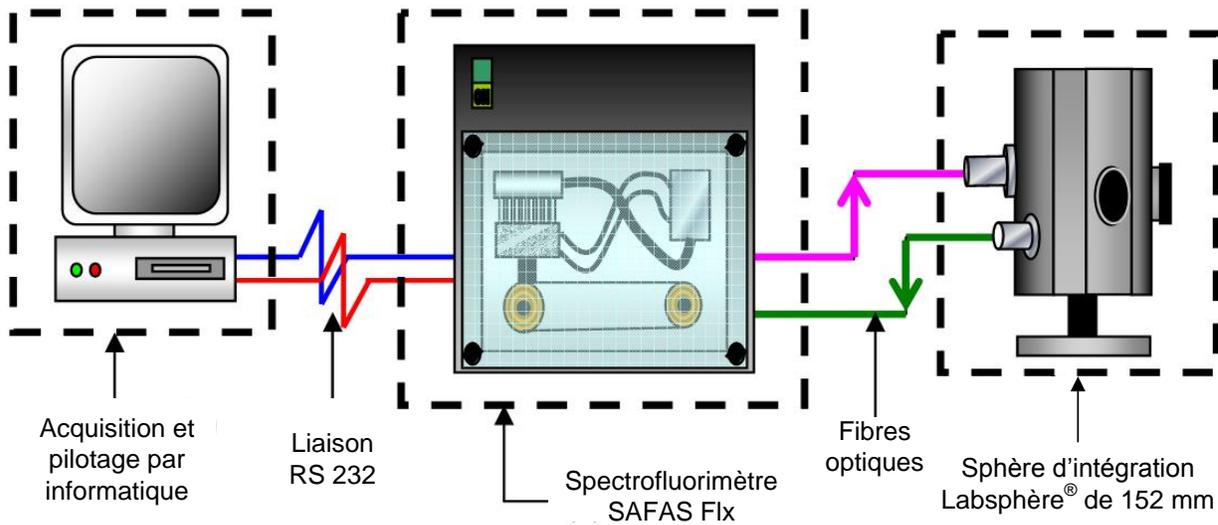


FIGURE 2.7 – Schéma du banc expérimentale de l'Institut Pascal (Cornet, 2007)

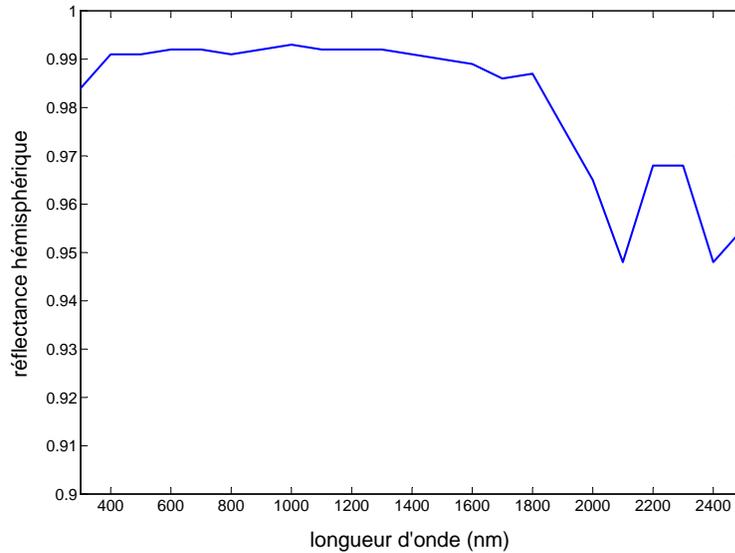


FIGURE 2.8 – Spectre de réflexion du Spectralon®

- Par la suite, le laboratoire GEPEA s'est équipé d'un spectrophotomètre à sphère d'intégration de type Cary 5000 commercialisé par la société Agilent Technologies (cf. figure 2.9). Il s'agit avant tout d'un spectrophotomètre classique, fonctionnant avec une lampe au deutérium (pour le rayonnement UV à partir de 175 nm) ou au tungstène (pour le rayonnement visible et infrarouge, jusqu'à 3300 nm). Il est équipé d'un double monochromateur ce qui permet de travailler en double faisceau avec des échantillons très absorbants (densité optique jusqu'à 8) et de tout type (solide, liquide, gels, poudres, etc.). Contrairement au banc expérimentale de l'IP, la sphère d'intégration est ici interne. Son diamètre est de 110mm et son revêtement est en PolyTétraFluoroEthylène (PTFE) permettant une réflectance hémisphérique entre 80 et 85% sur le PAR. D'autre part, cette sphère permet des mesures relatives de réflexion diffuse, totale et d'avoir accès à la réflexion spéculaire par calcul.

Le pilotage du Cary 5000 se fait par informatique, par le biais du logiciel Cary WinUV, développé par la société Agilent Technologies.

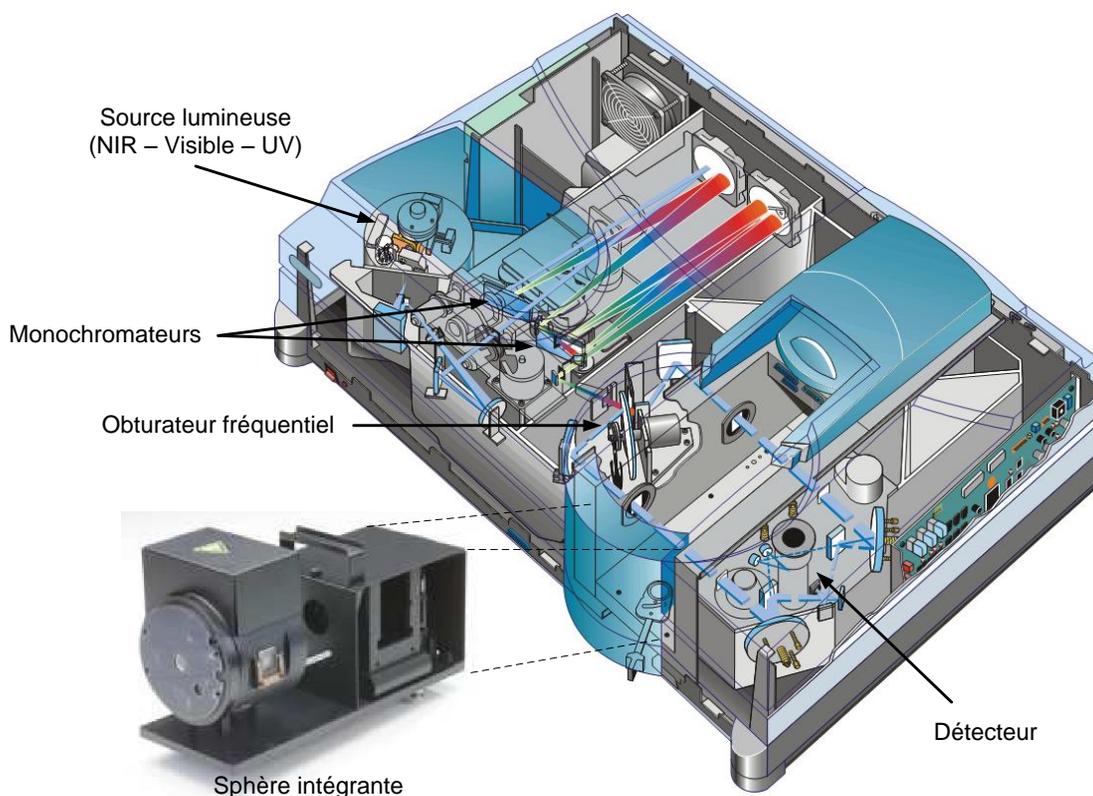


FIGURE 2.9 – Schéma du spectrophotomètre à sphère d'intégration Carry 5000 d'après la documentation technique de la société Agilent Technologies

2.3 Apport de l'énergie lumineuse

2.3.1 Présentation des technologies utilisées

Comme il a été vu dans la partie 2.1, plusieurs systèmes de cultures différents ont été utilisés. A chaque PBR est associé un système d'éclairage dédié ; ici des panneaux de LED. Pour les expérimentations concernant l'influence d'une modification du spectre ou de l'angle d'incidence, le spectre d'émission ainsi que l'intensité émise par chaque panneau doivent être parfaitement contrôlés.

Trois sortes différentes de LED ont été utilisées pour constituer les panneaux éclairants :

- des LED blanches (figure 2.10a blanc froid, environ 5500K) utilisées comme éclairage de référence,
- des LED rouges (figure 2.10b, Led Engin, LZ1-00R200) ayant un pic d'émission à 660nm, proche du pic d'absorption de la chlorophylle *a*,
- des LED tricolores (dites BGR, pour *blue, green, red*) (figure 2.10c, Lamina, Titan NT-53F0-0428 RGB) ayant des pics d'émissions à respectivement 625nm, 525nm et 465nm.

Les panneaux de LED émettent en continu, ils ne fonctionnent pas en mode pulsations de lumière (PWM pour Pulse Width Modulation). Les LED ont un angle de collimation relativement faible (< 10%) et aucun matériau diffusant n'est utilisé.

Tous les panneaux sont pilotables soit par une alimentation extérieure, soit par ordinateur. Ils

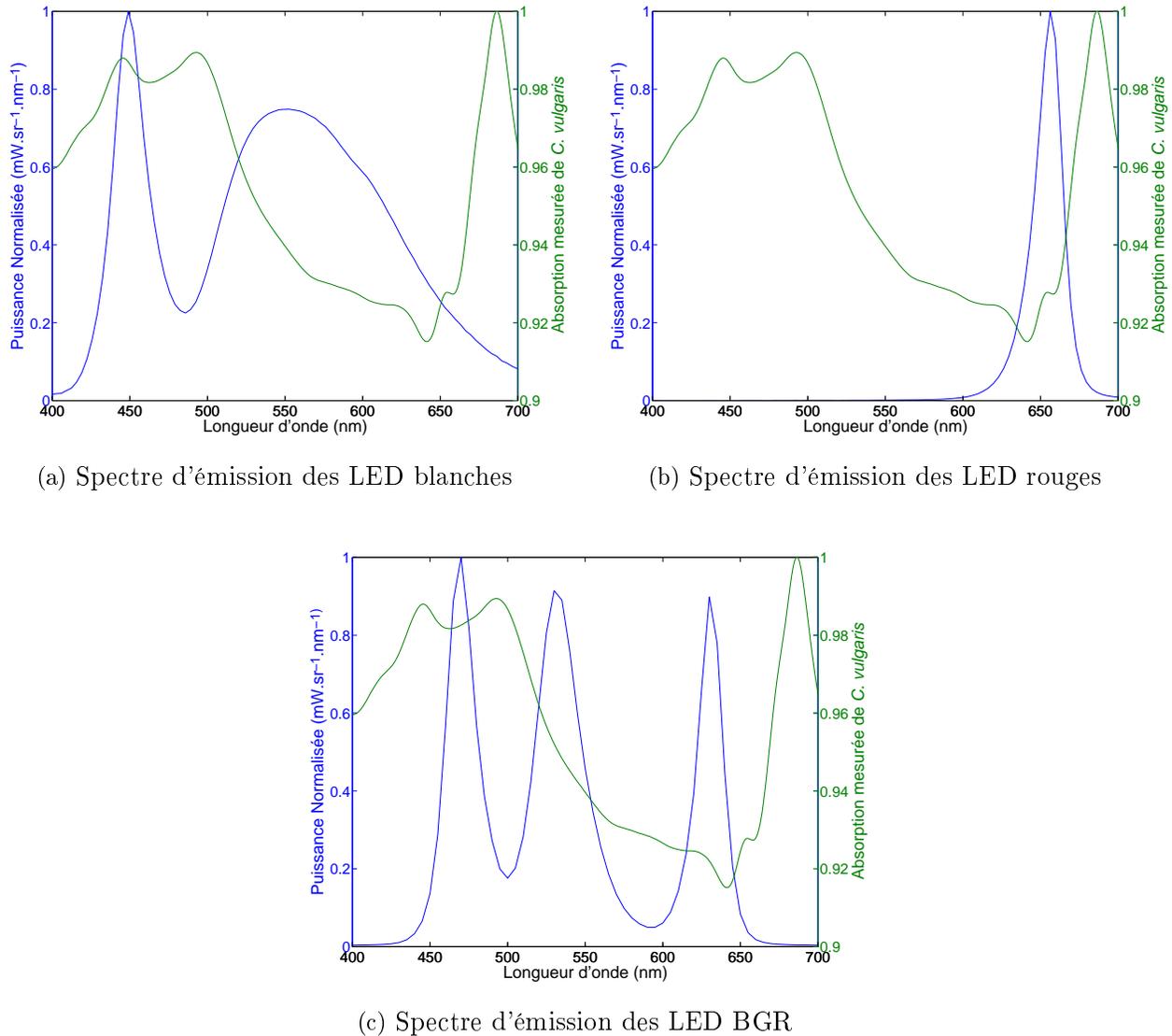


FIGURE 2.10 – Spectres d'émission des différents panneaux de LED utilisés

apportent une homogénéité d'environ 90% sur la surface éclairée. Dans le cas du panneau avec les LED tricolores, chaque couleur est pilotable indépendamment. Cela a permis d'ajuster le spectre au spectre solaire ainsi que de générer des cycles de lumière le plus proche possible de ceux rencontrés en éclairage solaire. Ce panneau est dédié spécifiquement à l'airlift plan (cf. 2.1.1). Les panneaux de LED blanches et rouges ont été utilisés uniquement avec des PBR toriques (cf. 2.1.1).

Pour la production simple de suspensions de *C. vulgaris* en quantité élevée, menée dans la colonne à bulles, un éclairage par tubes fluorescents a été préféré pour des raisons de simplicité et de coûts d'installation. La densité de flux émise par ces tubes est d'environ $150 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Le spectre d'émission des tubes fluorescents utilisés est présenté dans la figure 2.11.

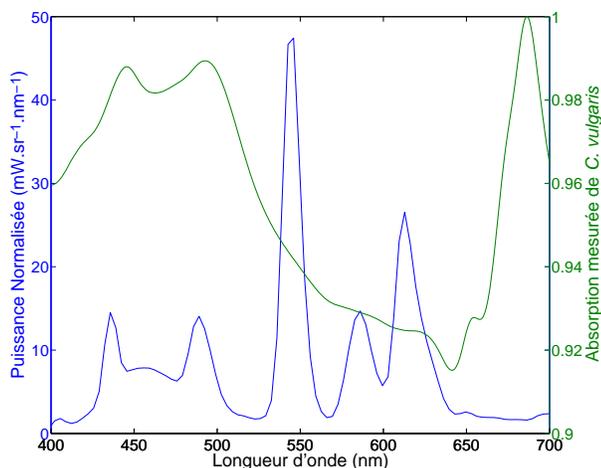


FIGURE 2.11 – Spectre d'émissions des tubes fluorescents

2.3.2 Mesures de la densité de flux de photons et du spectre incident

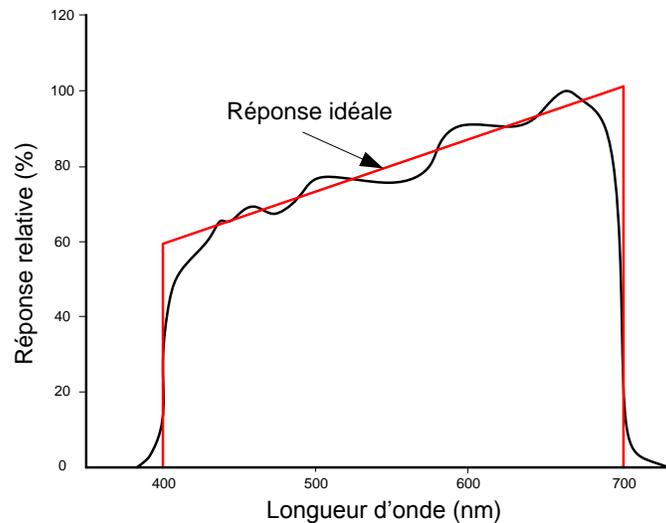
La lumière, paramètre essentiel à contrôler pour la culture de microalgues, est caractérisée pour les cultures en photobioréacteurs par la densité du flux de photons ou PFD (pour Photon Flux Density) impactant la face optique du PBR. Le PFD est donné pour une plage de longueurs d'ondes appelée PAR (Photosynthetically Active Radiations). Dans le cas présent, pour *C. vulgaris*, le PAR est défini entre 400nm et 700nm . Pour chaque panneau éclairant, deux types de mesures ont donc été réalisés pour les caractériser :

- des mesures de PFD (noté q_{Γ} , exprimé en $\mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).
- des mesures de spectres énergétiques sur le PAR (noté w_{λ} exprimés en $\text{mW} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{nm}^{-1} \cdot \text{sr}^{-1}$), dont les résultats ont permis d'obtenir les spectres d'émission présentés dans le paragraphe précédent.

Les mesures de PFD ont été réalisées par un capteur LI-190-SA relié, par un câble coaxiale à prise BNC, à un boîtier de mesure LI-250A Light Meter de la société LI-COR (USA) (cf. figure 2.12a). Le capteur plan permet des mesures intégrées de PFD sur une demie sphère (angle solide de $2\pi \text{ sr}$). Il est constitué d'une photodiode en silicone qui capte les photons, ainsi que d'un jeu de filtres visibles interférentiels à bande passante sur le PAR. Le capteur corrige automatiquement les valeurs de PFD pour des angles d'incidence du rayonnement, suivant la loi de cosinus de Lambert, jusqu'à 80° . A un angle de 90° , la réponse sera nulle et l'erreur de mesure infinie. L'erreur de mesure de ce capteur est inférieure à 5% sur l'ensemble du PAR (cf. figure 2.12b) avec une déviation maximale de 1% pour un flux allant jusqu'à $10\,000 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. L'obtention des spectres d'émission des sources lumineuses s'est fait par mesure au spectro-radiance mètre RAMSES 81C8 (TriOS optical sensor, Germany, cf. figure 2.13). Il s'agit du même type de technologie que celle utilisé dans le quantum mètre : une surface de photodiodes en silicone permet une lecture simultanée sur 256 canaux. L'ensemble permet la mesure du



(a) Photographie du capteur LI-190-SA et du boîtier de mesure LI-250A Light Meter (LI-COR, USA)



(b) Réponse spectrale du capteur LI-190-SA (LI-COR, USA) sur le PAR

FIGURE 2.12 – Photographie du quantum mètre utilisé et tracé de sa réponse spectrale

spectre énergétique sur 190 valeurs de longueur d'onde, comprises entre 320 et 950nm, avec une précision de 0,3nm sur chaque longueur d'onde. L'imprécision de la mesure énergétique est au maximum de 6% (dépendant de la plage spectrale) pour un champ de vue de 7° dans l'air. Le temps d'intégration, dépendant de la quantité d'énergie, est compris entre 4ms et 8s. A noter que l'appareil sature, typiquement pour des valeurs d'énergie supérieures à $1 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{nm}^{-1}\cdot\text{sr}^{-1}$, ce qui peut poser problème pour les mesures de sources très collimatées et pour des flux importants.

L'appareil donne la quantité d'énergie reçue pour un angle solide donné. Dans notre cas, nous nous intéressons surtout à ce qui est reçu par la surface éclairée, soit sur 2π stéradian. Afin de s'affranchir de ce problème, les mesures de spectres ont été systématiquement couplées à des mesures au quantum mètre.

2.3.3 Conversions d'unités de la lumière

L'unité utilisée classiquement pour exprimer l'énergie lumineuse est $\mu\text{mol}_{hv}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (unités classique lors de l'étude de la photosynthèse) ou $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$. La conversion du spectre énergétique, w_λ , en spectre photonique, w'_λ , se fait par la relation 2.13 où h est la constante de Planck et c

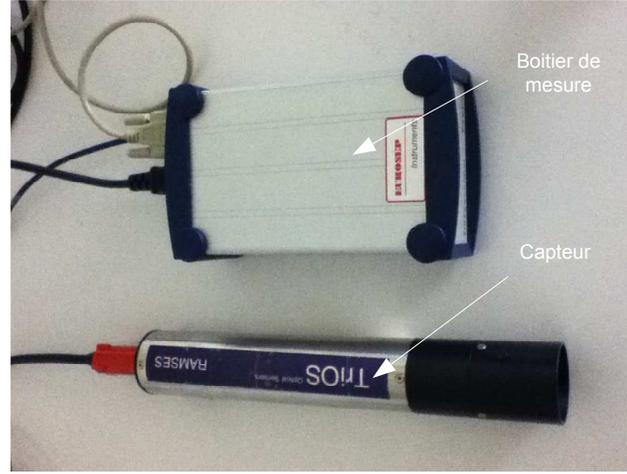


FIGURE 2.13 – Photographie du spectroradiancemètre RAMSES 81C8 (TriOS optical sensor, Germany)

la célérité de la lumière dans le vide (Cornet, 2007).

$$w'_\lambda \cdot 6,02 \cdot 10^{17} \frac{hc}{\lambda} = w_\lambda \quad (2.13)$$

$$w'_\lambda = \frac{w_\lambda \lambda}{1,1974 \cdot 10^{-7}}$$

A partir de là, le rapport de conversion entre les deux unités, \aleph , peut être défini, soit pour chaque valeur de longueur d'onde (équation 2.14) soit entre les valeurs intégrées de flux de photons exprimées en énergétique et en photonique pour une longueur d'onde d'émission moyenne (équation 2.15).

$$\aleph_\lambda = \frac{1,1974 \cdot 10^{-7}}{\lambda} \quad (2.14)$$

$$\lambda_{m,w} = \frac{\int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{max}} w_\lambda \lambda d\lambda}{\int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{max}} w_\lambda d\lambda} \quad (2.15)$$

Ce rapport s'écrit comme présenté dans l'équation 2.16 (Cornet, 2007). Au final, l'utilisation d'une longueur d'onde moyenne, décrivant l'énergie moyenne d'un photon de même énergie que l'énergie totale captée revient à écrire l'équation 2.17.

$$\frac{W}{W'} = \aleph = \frac{\int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{max}} w_\lambda d\lambda}{\int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{max}} w_\lambda \lambda d\lambda} 1,1974 \cdot 10^{-7} \left[\frac{J}{\mu mol_{h\nu}} \right] \quad (2.16)$$

$$\aleph = \frac{1,1974 \cdot 10^{-7}}{\lambda_{m,w}} \quad (2.17)$$

Pour une source de lumière blanche à 5500K (cas de l'éclairage blanc utilisé ici) le rapport \aleph est de $0.2177 J \cdot \mu\text{mol}_{h\nu}^{-1}$, donc $1W \cdot m^2 = 4,6 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Dans le visible, \aleph varie entre $0.2994 J \cdot \mu\text{mol}_{h\nu}^{-1}$ ($1W \cdot m^2 = 3.34 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) à 400nm et $0.1597 J \cdot \mu\text{mol}_{h\nu}^{-1}$ ($1W \cdot m^2 = 6.3 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) à 750nm.

Lors de mesures de densité de flux par le capteur (LI-COR, Allemagne), le rapport moyen $\aleph = 0.2177 J \cdot \mu\text{mol}_{h\nu}^{-1}$ est utilisé (donnée constructeur), correspondant à un spectre blanc. L'utilisation d'une source lumineuse monochromatique implique donc la prise en compte, pour correction, du spectre d'émission de cette source qui permet de remonter au coefficient \aleph_λ et de corriger la valeur mesurée de la densité de flux mesuré par le capteur en fonction de son spectre d'émission. Pour exemple, une source lumineuse bleu émettant à 450nm, le coefficient \aleph_{450nm} sera de 0,2661 (soit $1W \cdot m^{-2} = 3,76 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) alors que pour une source lumineuse rouge émettant à 670nm, le coefficient \aleph_{670nm} sera de 0,1787 (soit $1W \cdot m^{-2} = 5,60 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Sur le PAR (400 - 700nm), la variation d'énergie d'un photon peut donc varier jusqu'à 43%.

2.4 Modélisation cinétique de la croissance de *C. vulgaris*

La modélisation est un outil puissant de compréhension, dimensionnement et de contrôle des procédés. En PBR, la modélisation du procédé est d'autant plus complexe que les réactions mises en jeu sont, en partie, d'ordre biologique et couplées au transfert de rayonnement au sein de la culture.

Cornet et Dussap ont en particulier développé une approche prédictive basée sur la thermodynamique linéaire des processus irréversible (TLPI) pour modéliser la croissance de microorganismes procaryotes (Cornet and Dussap, 2009)(cf. paragraphe 1.5.1). Une extension du modèle a été développée par Takache pour la prédiction de la croissance de microorganismes eucaryotes tels que *Chlamydomonas reinhardtii*, et récemment reformulée par Dauchet pour introduire la vitesse spécifique d'absorption des photons (\mathcal{A}) à la place de l'irradiance (G). Cette approche est reprise ci-dessous pour pouvoir être appliquée ensuite à *Chlorella vulgaris*.

2.4.1 Formulation de la loi cinétique

Dans le cas d'une culture photolimitée en PBR plan éclairé d'un seul côté, l'atténuation de la lumière par les microalgues induit la séparation du volume de culture en deux "sous-volumes" distincts : un volume éclairé (V_l) et un volume sombre (V_d). La limite entre ces deux sous-volumes est définie par la condition de lumière absorbée, amenant au point de compensation de la croissance du microorganisme, lui-même défini comme étant l'énergie minimale nécessaire pour avoir une croissance positive (G_c correspondant à la vitesse spécifique d'absorption des photons \mathcal{A}_c). La vitesse volumétrique de croissance moyennée sur l'ensemble de la culture peut

être alors exprimée d'un point de vue cinétique par la relation 2.18 (Cornet, 2007).

$$\begin{aligned}
 \langle r_x \rangle &= \frac{1}{V_R} \iiint_{V_R} r_x dV \\
 &= \gamma \frac{1}{V_l} \iiint_{V_l} r_{x,l} dV + (1 - \gamma) \frac{1}{V_d} \iiint_{V_d} r_{x,d} dV \\
 &= \frac{1}{V_R} \left[\iiint_{V_l} r_{x,l} dV + \iiint_{V_d} r_{x,d} dV \right]
 \end{aligned} \tag{2.18}$$

Il est à noter que l'équation 2.18 ne donne aucune information quant à la formulation des deux vitesses volumétriques de croissance exprimées respectivement dans le volume éclairé et le volume sombre, $r_{x,l}$ et $r_{x,d}$. Dans le cas de microorganismes procaryotes (comme *A. platensis* par exemple) Cornet et Dussap ont montré que $r_{x,d} = 0$ dans le volume sombre (Cornet and Dussap, 2009) *i.e.* que la croissance dans la zone sombre est négligeable. Le cas des microalgues qui présentent une activité mitochondriale à la lumière est toutefois différent.

Comme l'a expliqué Takache (Takache, 2010), pour chaque sous-volume, r_x peut être défini par une loi de couplage au champ de radiation (donnant la part de la vitesse de croissance par les réactions photosynthétiques dans le chloroplaste, notée $r_{x,p}$) et par une loi de couplage liée à l'activité mitochondriale (donnant la part de la vitesse de croissance par les réactions de respiration, notée $r_{x,r}$).

Cependant, cette définition impose que, pour que la solution soit continue sur l'ensemble du volume de culture (et donc que $r_x = r_{x,p} + r_{x,r}$), $r_{x,p}$ soit nulle dans le volume sombre, que $r_{x,r}$ soit nulle dans le volume éclairé et que ces deux termes soient nuls à la frontière entre les deux sous-volumes. Ceci est incompatible avec la définition d'un microorganisme eucaryote où les réactions photosynthétique et de respiration cohabitent en permanence. Par ailleurs, cet ensemble de conditions est incohérent avec la définition du point de compensation, définissant la fraction volumique éclairée. En effet, à la limite entre les deux sous-volumes, les vitesses volumétriques de croissance $r_{x,p}$ et $r_{x,r}$ s'équilibrent mais sont non nulles.

Ces dernières constatations conduisent à redéfinir l'équation 2.18 en ne faisant pas de distinction de la formulation cinétique entre les deux sous-volumes (Takache et al., 2010). A partir de cette dernière définition, l'enjeu est de trouver une formulation de chacun des termes $r_{x,p}$ et $r_{x,r}$. Pour le microorganisme photosynthétique procaryote (cyanobactérie) *A. platensis*, Cornet et Dussap ont proposé une formulation pour $r_{x,p}$ faisant intervenir la vitesse spécifique d'absorption des photons, représentée par \mathcal{A} (Cornet and Dussap, 2009).

$$r_{x,p} = \frac{M_x}{\nu_{O_2-x}} \bar{\phi} \mathcal{A} \rho_{\mathcal{A}} \tag{2.19}$$

Dans l'équation 2.19, $\rho_{\mathcal{A}}$ est le rendement photochimique, $\bar{\phi}'$ le rendement quantique stœchiométrique molaire et \mathcal{A} la vitesse spécifique d'absorption des photons.

De la même manière que pour la partie photosynthèse (liée à l'étude du fonctionnement du chloroplaste), l'étude du fonctionnement de la mitochondrie (avec l'étude de la régénération des cofacteurs, cf. partie 1.6), Takache a proposé l'écriture de $r_{x,r}$ par l'équation 2.20 (Takache, 2010).

$$r_{x,r} = \frac{J_{NADH_2}}{\nu_{NADH_2-O_2}} \frac{M_x}{\nu_{O_2-x}} \frac{K_{r_{\mathcal{A}}}}{K_{r_{\mathcal{A}}} + \mathcal{A}} \quad (2.20)$$

Dans l'équation 2.20, $K_{r_{\mathcal{A}}}$ est le coefficient d'inhibition de la respiration à la lumière, J'_{NADH_2} est la vitesse spécifique de réoxydation des cofacteurs sur la chaîne respiratoire, $\nu_{NADH_2-O_2}$ et ν_{O_2-x} des coefficients stœchiométrique et M_X la masse C-molaire de la biomasse.

Les expressions de $r_{x,p}$ et $r_{x,r}$ conduisent au final à une expression de la vitesse volumétrique locale de croissance du type de celle présentée dans l'équation 2.21.

$$r_x = \left[\rho_M \bar{\phi}' \frac{M_x}{\nu_{O_2-x}} \frac{K_{\mathcal{A}} \mathcal{A}}{K_{\mathcal{A}} + \mathcal{A}} - \frac{J_{NADH_2}}{\nu_{NADH_2-O_2}} \frac{M_x}{\nu_{O_2-x}} \frac{K_{r_{\mathcal{A}}}}{K_{r_{\mathcal{A}}} + \mathcal{A}} \right] C_X \quad (2.21)$$

2.4.2 Détermination des paramètres du modèle

Les paramètres du modèle cinétique de croissance peuvent être séparés en deux groupes : les paramètres calculés théoriquement et ceux qui seront ajustés.

Ces paramètres déterminés théoriquement sont :

- $\bar{\phi}$: le rendement quantique stœchiométrique massique. Ce rendement traduit l'efficacité de conversion des quanta par la mécanisme photosynthétique pour une échelle temporelle de l'ordre de la minute (état pseudo-permanent) (Cornet, 2007). L'expression de ce rendement, présenté dans l'équation 2.22, vient de l'analyse stœchiométrique du schéma en Z, en approximant le fait que tout l'oxygène globalement produit (cf. équation de conversion stœchiométrique des substrats, équation 2.1) vient uniquement de la photosynthèse. Cela revient donc à négliger la respiration sous éclairément. Le passage du rendement quantique stœchiométrique molaire ($\bar{\phi}'$) au rendement quantique stœchiométrique massique ($\bar{\phi}$) se fait en multipliant $\bar{\phi}'$ par la masse C-molaire de la biomasse ($M_x = 23,5g.mol^{-1}$, paragraphe cf. 2.1.2).

$$\bar{\phi} = \frac{1}{2\nu_{NADH_2-X}(1 + P/2e^-)} \quad (2.22)$$

Dans l'équation 2.22, ν_{NADH_2-X} est le coefficient stœchiométrique de conversion du $NADH_2$ en biomasse, X. Le rapport $P/2e^-$ est le rapport entre les flux cycliques et acycliques d'électrons dans la chaîne photosynthétique (cf. partie 1.2.3).

Cornet a montré que la valeur de $\bar{\phi}$ restait quasi-constante sur une grande plage de densité hémisphérique de flux de photons puisque, bien que le rapport $P/2e^-$ varie, il est équilibré par une variation de ν_{NADH_2-X} (Cornet, 2007). A noter que $\bar{\phi}$ est déterminé pour une culture en conditions contrôlées (pH et température notamment), sans carence minérale.

Pour *C. vulgaris*, en utilisant les hypothèses établies par Cornet pour la cyanobactérie *A. platensis* (Cornet, 2007) et reprises par Takache pour la microalgue *C. reinhardtii* (Takache, 2010), les valeurs obtenues, calculées à partir des données de l'analyse élémentaire, sont données dans l'équation 2.23.

$$\begin{aligned}
 P/2e^- &= 1,23 \\
 \nu_{NADH_2-X} &= 2,18 \\
 \bar{\phi}' &= 1,03 \cdot 10^{-7} \text{ mol}_X \cdot \mu\text{mol}_{h\nu}^{-1} \\
 \bar{\phi} &= 2,36 \cdot 10^{-9} \text{ kg}_X \cdot \mu\text{mol}_{h\nu}^{-1}
 \end{aligned} \tag{2.23}$$

- ρ_M : le rendement quantique photochimique maximum. Il représente l'efficacité maximale de transfert de photons dans les antennes collectrices. Ce rendement est défini lorsque la culture est opérée en conditions thermodynamiquement optimales *i.e.* lorsque la valeur d'éclairement est celle de compensation. Ainsi, Cornet a proposé l'équation 2.24 (Cornet, 2007), provenant d'une extension d'une formulation du rendement de Carnot, représentant la conversion maximale de l'énergie radiante au niveau des antennes collectrices.

$$\rho_M = 1 - \frac{T}{T_R} \tag{2.24}$$

Dans l'équation 2.24, T est la température de rayonnement du corps considéré et T_R la température de rayonnement du corps noir (référence idéale, cf. équation 2.25)(Takache, 2010).

$$T_R = \frac{hn_m c}{k_B \bar{\lambda} \ln \left[1 + \frac{2hn_m^2 c^2}{I_{C,\bar{\lambda}} \bar{\lambda}^5} \right]} \tag{2.25}$$

L'équation 2.25 fait intervenir les constantes de Planck ($h = 6,626 \cdot 10^{-34} J.s$) et de Boltzman ($k = 1,381 \cdot 10^{-23} J.K^{-1}$), l'indice de réfraction du milieu (n_m), la célérité de la lumière dans le vide ($c = 299\,792\,459 m.s^{-1}$), la longueur d'onde moyenne d'émission sur la PAR ($\bar{\lambda}$) et l'intensité spectrique de compensation ($I_{C,\bar{\lambda}}$). Typiquement, pour un microorganisme photosynthétique, $\rho_M = 0,8$. Connaissant la valeur maximale, la dépendance du rendement quantique photochimique avec l'irradiance est traduite par l'équation 2.26.

$$\rho_{\mathcal{A}} = \rho_M \frac{K_{\mathcal{A}}}{K_{\mathcal{A}} + \mathcal{A}} \tag{2.26}$$

Les paramètres à ajuster sont :

- $K_{\mathcal{A}}$: le coefficient de demi-saturation de la photosynthèse. Bien que ce coefficient puisse être estimé expérimentalement de deux façons distinctes (fluorimétrie ou oxymétrie), il reste difficile à obtenir de façon précise. Ce coefficient sera donc ajusté sur les résultats obtenus par expérimentations.
- Ea : le coefficient massique d'absorption. Ce coefficient sera déterminé dans une partie spécifique, dédiée au calcul des PO (cf. partie 4.2.4).

En plus du coefficient $K_{\mathcal{A}}$, le coefficient d'inhibition de la respiration à la lumière ($K_{r_{\mathcal{A}}}$) et la vitesse spécifique de régénération des cofacteurs (J'_{NADH_2}) ont été identifiés sur les points expérimentaux. Le coefficient $K_{\mathcal{A}}$, lié au terme représentant la croissance photosynthétique (cf. équation 2.19) permettra de jouer sur la sensibilité de la croissance à la lumière.

Les deux autres ($K_{r_{\mathcal{A}}}$ et J'_{NADH_2} , reliés à l'activité respiratoire) sont reliés par la solution analytique, déduite de la définition du point de compensation appliquée à l'équation 2.21. En effet, au point de compensation, donc pour $\mathcal{A} = \mathcal{A}_c$, la productivité globale est nulle, soit $r_x = 0$. Finalement, l'équation 2.21 s'écrit, à ce point, suivant l'équation 2.27.

$$K_r = \frac{\mathcal{A}_c}{\frac{J_{NADH_2}}{\nu_{NADH_2-O_2} \rho_M \bar{\phi}'} \left[\frac{1}{\mathcal{A}_c} + \frac{1}{K_{\mathcal{A}}} \right] - 1} \quad (2.27)$$

L'équation 2.27 implique que l'identification d'un des deux paramètres impose forcément la valeur du second si \mathcal{A}_c est connu. Cette propriété sera utilisée au chapitre 4, où seront présentées les expérimentations nécessaires au calage complet du modèle.

Certains paramètres ont pu être prédits à ce stade de façon théorique et sont résumés dans le tableau 2.11.

TABLE 2.11 – Valeurs des coefficients du modèle cinétique de croissance intrinsèque à *C. vulgaris* calculés

Paramètres	Valeurs	Unité
$P/2e^-$	1,23	-
ν_{NADH_2-X}	2,18	-
$\bar{\phi}'$	$1,03 \cdot 10^{-7}$	$mol_X \cdot \mu mol_{h\nu}^{-1}$
$\bar{\phi}$	$2,36 \cdot 10^{-9}$	$kg_X \cdot \mu mol_{h\nu}^{-1}$
ρ_M	0,8	-

Les expérimentations présentées au chapitre 4 permettront d'identifier le coefficient de demi-saturation de la photosynthèse ($K_{\mathcal{A}}$), celui d'inhibition de la respiration à la lumière ($K_{r_{\mathcal{A}}}$) et la vitesse spécifique de régénération des cofacteurs (J'_{NADH_2}) devront être identifiés. Le coefficient $K_{\mathcal{A}}$ permettra d'ajuster la sensibilité de la microalgue à la lumière. $K_{r_{\mathcal{A}}}$ et J'_{NADH_2} seront reliés par la relation découlant de l'écriture du modèle cinétique au point de compensation. L'identification d'un de ces deux facteurs entraînera donc la détermination du second. Ces deux derniers paramètres permettront d'ajuster l'impact de la respiration sur la croissance observée du microorganisme.

Chapitre 3

Étude hydrodynamique de suspensions microalgales concentrées

Sommaire

3.1	Introduction	82
3.2	Rheological properties of suspensions of the green micro-alga <i>Chlorella vulgaris</i> at various volume fractions	84
3.2.1	Résumé	84
3.2.2	Abstract	85
3.2.3	Introduction	85
3.2.4	Experimental methods	87
3.2.5	Results	93
3.2.6	Conclusions, outlook	110
3.2.7	Acknowledgements	112
3.3	Écoulement microscopique de suspensions de <i>Chlorella vulgaris</i> .	113
3.3.1	Introduction	113
3.3.2	Matériels et méthodes	113
3.3.3	Résultats	115
3.3.4	Conclusion et discussion sur l'écoulement microscopique de <i>C. vulgaris</i> et ses conséquences sur un procédé de culture intensifié	119
3.4	Conclusion	121

3.1 Introduction

Ce chapitre est consacré à une étude approfondie de l'évolution du comportement rhéologique et hydrodynamique d'une suspension de *C. vulgaris* sur une gamme étendue de concentrations cellulaires.

Actuellement, les systèmes de culture utilisés industriellement permettent rarement d'obtenir des concentrations en microorganismes photosynthétiques supérieures à $10g/l$, soit une fraction volumique Φ_V de l'ordre de 3%. A ces concentrations, la suspension obtenue peut être assimilée à une suspension diluée à très diluée (théorie d'Einstein, $\Phi_V < 0,01$). Dans ce cas, plusieurs auteurs (Rafaï et al., 2010, Wileman et al., 2011, Adesanya et al., 2012, Wu and Shi, 2008) ont montré qu'il n'y a pas ou peu d'influence de la fraction volumique sur le comportement rhéologique de la suspension. L'évolution de la viscosité avec la fraction volumique peut être décrite dans ce cas, et ce jusqu'à $\Phi_V < 0,10$, par le modèle de Quémada (Quémada, 1997).

L'intensification des technologies de cultures permet d'obtenir des suspensions à des concentrations microalgale de l'ordre de $30g/l$ ($\Phi_V \approx 0,1$) voire plus. Cela permet de réduire les quantités d'eau nécessaires au procédé pour une production donnée de biomasse mais induit de nouvelles problématiques. Ainsi, pour des suspensions concentrées, il peut être nécessaire d'apporter plus d'énergie d'agitation pour garantir l'homogénéité de l'écoulement (et éviter en particulier la formation de biofilm).

A ces concentrations, Rafaï *et al.*, Wileman *et al.* et Adesanya *et al.* (Rafaï et al., 2010, Wileman et al., 2011, Adesanya et al., 2012) ont pu observer un comportement rhéofluidifiant (*i.e.* une diminution de la viscosité avec la contrainte de cisaillement). Cependant, mis à part les travaux de Wu et Shi (Wu and Shi, 2008), aucun auteur ne parle de comportement de type fluide à seuil (nécessitant une contrainte seuil au delà de laquelle il y a écoulement). Ce comportement est cependant bien connu des suspensions de particules sphériques (Quémada, 2006), auxquelles pourraient s'apparenter une culture de microalgue concentrées.

Ce chapitre concerne donc l'étude détaillée de la rhéologie d'une suspension de *C. vulgaris* sur une large gamme de concentrations, et donc de fraction volumique. L'étude débute par une étude macroscopique sous un rhéomètre cône-plan couplé à un montage de micro-rhéoscopie. Ce dispositif permet de caractériser la suspension d'un point de vue mesure ainsi que par des visualisations de la suspension sous contrainte.

Le type d'écoulement rencontré sous un rhéomètre est toutefois bien différent de celui en photobioréacteur. La seconde section de ce chapitre est donc dédiée à l'étude de l'écoulement des mêmes suspensions de *C. vulgaris* en milieu confiné, *i.e.* en micro-canaux.

Le micro-canal utilisé a une section rectangulaire de $150 \times 50\mu m$. Il est placé sous un microscope optique droit (AxiScope A.1, Zeiss, Allemagne) permettant l'acquisition d'images. La vitesse d'écoulement (et donc la contrainte de cisaillement) est imposée par le contrôle de la différence de pression (ΔP) entre l'entrée et la sortie du micro-canal. Pour chaque valeur de ΔP une série d'images a été acquise, permettant par le biais du logiciel Matlab, d'obtenir les profils de vitesses dans la conduite (DPIV - Digital Particles Image Velocimetry). Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus lors de l'analyse rhéologique, confirmant la nature non

newtonienne de suspensions microalgales dès lors que $\Phi_V > 0.10$.

La première partie de l'étude a fait l'objet d'un article "Rheological properties of suspensions of the green micro-alga *Chlorella vulgaris* at various volume fractions" (Souliès et al., 2013). Sauf pour le résumé qui donne les principales conclusions obtenues, elle sera donc présentée en anglais. Cette partie dédiée à l'étude rhéologique (cf. partie 3.2) sera suivie de l'étude hydrodynamique en micro-canal (cf. partie 3.3).

3.2 Rheological properties of suspensions of the green micro-alga *Chlorella vulgaris* at various volume fractions

Authors : Antoine SOULIES, Jérémy PRUVOST, Jack LEGRAND, Cathy CASTELAIN,
Teodor I. BURGHELEA

Rheologica Acta, 52(6) :589-605.

3.2.1 Résumé

Partant du constat que *C. vulgaris* contiendrait de la chitine dans sa paroi (c.f. section 1.2.2 (Blanc et al., 2010)), l'hypothèse que les cellules de *C. vulgaris* puissent être assimilées à des particules rigides a été avancée. Cette hypothèse a permis d'envisager la dépendance de la viscosité relative ($\eta_R = \frac{\eta}{\eta_0}$) avec la fraction volumique, le nombre de Péclet et le nombre de Deborah, d'après la relation établie par Krieger et Dougherty (Krieger and Dougherty, 1959) (c.f. éq 3.1).

$$\eta_r = \eta_r(\Phi_v, Pe, De) \quad (3.1)$$

Dans cette équation, le nombre de Péclet représente la compétition entre l'advection et la diffusion et le nombre de Deborah est le rapport du temps Brownien et du temps caractéristique de la mise en écoulement. Il traduit la stabilité de l'écoulement dans le temps (étude de l'impact du temps d'application de la contrainte sur le comportement de la suspension).

Dans cette section, les mesures ont été effectuées à l'aide d'un rhéomètre / rhéoscope cône-plan (2°) Haake Mars III (Thermo-Fisher, Allemagne).

Cette étude a mis en évidence que les suspensions de *C. vulgaris* sont assimilables à des suspensions de particules rigides puisque l'équation 3.1 est validée. Une forte dépendance de la viscosité avec la fraction volumique est traduite par les modèles de Quémada (Quémada, 1997) jusqu'à $\Phi_V \approx 10\%$, puis par le modèle de Simha (Simha, 1952).

La dépendance de la viscosité avec le nombre de Péclet a été démontrée par l'apparition d'un comportement thixotrope. Ce comportement, qui traduit l'irréversibilité de la réponse de la suspension suivant le sens d'application de la contrainte, a été mis en relation avec l'apparition d'agrégats au sein de l'écoulement. Il a été démontré dans ce travail que ces agrégats sont dus à des répulsions électrostatiques entre les cellules. Une cartographie par technique de Voronoï a permis de mettre en évidence ces structures et les raisons de leur apparition. Pendant les mesures, un dispositif de micro stéréo P.I.V. (Particles Image Velocimetry) a permis également la visualisation de ces agrégats. A haute densité cellulaire, les grosses cellules repoussent les petites cellules, moins chargées électriquement. Ces dernières, n'ayant pas suffisamment de place pour circuler, se rapprochent suffisamment pour permettre aux interactions de type Van der Waals de rentrer en jeu, provoquant la formation d'agrégats pouvant ensuite se détruire sous l'effet de la contrainte hydrodynamique. Le comportement thixotrope observé est donc une résultante de déstructuration / restructuration de ces agrégats.

L'étude de la relation entre le nombre de Deborah et la viscosité a montré que, du fait de la

présence de structures au sein de la suspension, la stabilité de l'écoulement n'est atteinte qu'à partir du moment où l'ensemble des agrégats sont déstructurés.

3.2.2 Abstract

A systematic study of the rheological properties of solutions of non-motile microalgae (*Chlorella Vulgaris* CCAP 211-19) in a wide range of volume fractions is presented. As the volume fraction is gradually increased, several rheological regimes are observed. At low volume fractions (but yet beyond the Einstein diluted limit) the suspensions display a Newtonian rheological behaviour and the volume fraction dependence of the viscosity can be well described by the Quemada model (Quemada, 1997). For intermediate values of the volume fraction a shear thinning behaviour is observed and the volume fraction dependence of the viscosity can be described by the Simha model (Simha, 1952). For the largest values of the volume fraction investigated an apparent yield stress behaviour is observed. Increasing and decreasing stress ramps within this range of volume fractions indicate a thixotropic behaviour as well.

The rheological behaviour observed within the high concentration regime bears similarities with the measurements performed by Heymann et al. (Heymann and Aksel, 2007) on Polymethyl Methacrylate (PMMA) suspensions : irreversible flow behaviour (upon increasing/decreasing stresses), dependence of the flow curve on the characteristic time of forcing (the averaging time per stress values). All these findings indicate a behaviour of the microalgae suspensions similar to that of suspensions of rigid particles.

A deeper insight into the physical mechanisms underlying the shear thinning and the apparent yield stress regime is obtained by an in-situ analysis of the microscopic flow of the suspension under shear. The shear thinning regime is associated to the formation of cell aggregates (flocs).

Based on the Voronoi analysis of the correlation between the cell distribution and cell sizes, we suggest that the repulsive electrostatic interactions are responsible for this micro-scale organisation. The apparent yield stress regime originates in the formation of large scale cell aggregates which behave as rigid plugs leading to a *maximally random jammed state*.

keywords : microalgue, yielding, jamming

3.2.3 Introduction

Microalgae are photosynthetic aquatic microorganisms. Their biodiversity enables to produce various compounds (proteins, pigments, lipids, etc.) having potential applications in a wide range of domains such as food-processing industry (Becker, 2007), cosmetics, pharmaceuticals, green chemistry or energetic industry (Mouget and Tremblin, 2002, Mata et al., 2010, Satyanarayana et al., 2011). *Chlorella Vulgaris*, a non motile unicellular non-flagellated green micro-alga is, undoubtedly, one of the major species cultivated at an industrially relevant scale. This is because of its easy growth and of its commercial potential, mainly for nutrition rela-

ted purposes (Spolaore et al., 2006), due to its high content in proteins (60%), polysaccharide (20%), carotenoids, vitamins, unsaturated fatty acids (15%) (Basu et al., 2001) and lutein for food complements (Shi et al., 1997). Its robustness enables its exploitation in a broad diversity of systems, ranging from open ponds to photobioreactor technology (closed systems) (Richmond, 2004, Carvalho et al., 2006, Ugwu et al., 2008, Lehr and Posten, 2009, Pandey et al., 2011).

Due to a high degree of control of the culture conditions, the photobioreactor technology allows a higher productivity. With an appropriate engineering and operating protocol, a high cell density culture (*i.e.*, high biomass concentration) can especially be obtained. Hydrodynamics is one of the key aspects when working in high-cell density culture. High-cell density cultures are indeed obtained in systems having a very high ratio between the illuminated surface and the culture volume, which translates into a shallow depth, typically smaller than $0.01m$ (Cornet, 2010, Pandey et al., 2011, Doucha et al., 2005). The high degree of confinement combined with a high biomass concentration tends to decrease the mixing performances, which can have several negative impacts on the process : a decrease of the efficiency of the mass transfer, an increase in the risk of biofilm formation and a less efficient light conversion in the systems due to smaller displacement of flowing cells along the light gradient in the culture volume.

A high degree of optimisation of the hydrodynamic conditions requires a proper understanding of the rheological behaviour of the suspension of cells. There exist, however, very few studies regarding the rheological properties of suspensions of microalgae, particularly in the context of high-cell density culture conditions with dry biomass concentration ($> 10kg\ m^{-3}$).

A rheological characterisation of microalgae slurries at various mass concentrations has been recently presented by Wileman et al. (Wileman et al., 2011). Depending on the microalgae concentration, they identify either a Newtonian behaviour within the dilute regime or a shear-thinning behaviour (characterised by a power law stress rate of strain dependence) within the semi-dilute regime. No apparent yield stress behaviour is reported and the reversibility of the deformation states upon increasing/decreasing stresses was not investigated.

Adesanya and coworkers have recently performed an experimental study of the rheological behaviour of suspensions of *Scenedesmus obliquus* microalgae at various volume fractions up to 0.15, (Adesanya et al., 2012).

Using the piezoaxial vibrator (**PAV**) technique which allowed one to measure the complex viscosity η^* at various frequencies, they observe a deviation from the Cox-Merz rule corresponding to the high volume fraction regime. By a separate microscopical visualisation of the micro-algae suspensions, they relate this effect to the formation of cell aggregates (flocs) which they claim it is due to attractive van der Waals forces. Up to the maximal volume fraction they have investigated, they do not observe yield stress effects. This may be due to the rather limited value of the maximal volume fraction they have investigated.

The study of the dependence of the viscosity of a solution of *Chlorella pyrenoidosa* by Wu et al reveals a yield stress at large volume fractions, (Wu and Shi, 2008). The yield stress behaviour of high volume fraction *Chlorella* suspensions remains, however, largely unexplored.

As *Chlorella* microalgae have a roughly spherical shape with radii of the order of several microns and a supposedly rigid membrane (Northcote and Goulding, 1958, Takeda, 1988, Kapaun

and Reisser, 1995) it appears natural to attempt to understand the rheological behaviour of suspensions of these micro-organisms within the general framework of the rheology of suspensions of rigid particles.

As opposed to the rheology of *Chlorella* microalgae suspensions which, to our best knowledge, is still poorly documented an important and detailed body of literature (both theoretical and experimental) can be found on the rheology of suspensions of rigid particles.

A comprehensive review of these studies can be found in both the *Springer Handbook of Experimental Fluid Dynamics*, (Tropea et al., 2007), and in a more recent textbook, (Wagner, 2011). A systematic study of the shear thinning behaviour of intermediately concentrated suspensions of rigid particles is presented by Kruif and his coworkers, (Kruif et al., 1985).

The volume fraction correlation of the yield stress behavior of concentrated suspensions has been recently investigated by Mueller and his coworkers, (Mueller et al., 2010). A detailed experimental investigation of the yield stress behavior of concentrated suspensions of polymethylmetacrylate (PMMA) was reported by Heymann and Aksel, (Heymann and Aksel, 2007). A major finding of their work is that, except for the fluid deformation regime, the deformation states are not recoverable upon an increase/decrease of the applied stresses and a clear hysteresis is observed.

The global aim of this study is to investigate in depth the rheological properties of *Chlorella Vulgaris* suspensions in a wide range of volume fractions and externally applied stresses.

The paper is organised as follows. The description of the experimental methods is presented in Sec. 3.2.4 and includes the description of the preparation protocol of the suspensions of microalgae Sec. 3.2.4 and the rheological procedures employed in characterising the suspensions, Sec. 3.2.4.

The experimental results are presented in Sec. 3.2.5. The rheological regimes corresponding to various volume fractions of the suspension are described in Sec. 3.2.5.

The reversibility of the deformation states and the time dependence of the rheological properties within each of these regimes are investigated in Sec. 3.2.5.

The paper closes with a brief discussion of the main conclusions of our experiments and the impact of our findings on future theoretical, numerical and experimental investigation of *Chlorella* suspensions, Sec. 3.2.6.

3.2.4 Experimental methods

Preparation of the *Chlorella* microalgae suspensions

Chlorella microalgae were grown in a bubble column photobioreactor (volume of 0.12 m^3 , diameter of 0.57 m and specific illuminated area 3.5 m^2). Each culture was illuminated with an incident photon flux density (PFD) of around $150 \mu\text{mole}_{hv} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (white light). The culture medium was composed of (in g/l) NH_4Cl , 1.45, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.28, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05, KH_2PO_4 , 0.61, NaHCO_3 , 1.68 and $0,5 \text{ ml l}^{-1}$ of Hutner solution (trace elements, see Ref. (Harris, 1989) for a complete description). The *Chlorella* suspensions, once collected, were artificially concentrated by centrifugation (15 minutes at 5000 g). The dry biomass concentration C_x of the concentrate

was then measured. Filters (glass micro-fiber filters, GF/F Whatman) with 0.22 micrometer pore size were dried during 24 hours in a 110°C oven. They were then weighted and used to filter a known volume of algal suspension. The filters were finally placed for 24 hours in a 100°C oven and re-weighted. This duration was sufficient to obtain a complete drying. The weight difference was finally used to calculate the dry biomass concentration of the concentrate (C_x , express in dry mass of microalgae per volume of the total suspension). A range of samples of known concentration (here expressed in volume fraction, Φ_v , which represented the volume occupy by the microalgae cells (wet) per volume of the total suspension) was then prepared by diluting the concentrated wet suspension with the supernatant previously removed. The volume fraction (Φ_v) was determined from the dry weight concentration following the relations below :

$$\Phi_v = \frac{C_x}{\rho_W w_D} \quad (3.2)$$

$$\rho_W = x_W \rho_0 + (1 - x_W) \rho_D \quad (3.3)$$

In the equations above ρ_W and ρ_D stand for the density of the wet and dry biomass (expressed in wet mass of microalgae cells per volume of microalgae cells for ρ_W , and in dry mass of microalgae cells per volume of dry microalage cells for ρ_D), respectively and ρ_0 is density of the medium of culture. $w_D = \frac{(1-x_W)\rho_D}{\rho_W}$ stands for the mass fractional content in dry solid in the microalgae (mass of dry solid per mass of the wet microalgae) and x_W is the volumetric water fractional content in wet microalgae (in volume of water in a microalgae cell per volume of a microalgae cell) (both quantities are non-dimensional).

The water mass content x_w and density of dry biomass ρ_D necessary for the calculation were respectively 0.82 and 1400 kgm^{-3} , as proposed in Ref. (Cornet, 2010) who found those values nearly constant among various microorganisms including microalgae and bacteria.

The range of investigated volume fractions is given in Table 3.1 (because it is a usual parameter in the field of microalgae cultivations, dry weight concentrations are also given).

It is very important to note Table 3.1 that the range of volume fractions we have explored is significantly broader than the ranges previously explored by others see for example Ref. (Adesanya et al., 2012). This allows us to provide a more complete description of the rheological behaviour of *Chlorella* microalgae.

The maximum packing fraction corresponding to a *maximally random jammed state* is $\Phi_v = 0.637$ ($C_x = 159.25$ g/l).

Microalgae generally produce Exo-Poly Saccharides and Extracellular Polymeric Substances (EPS) in order to mitigate a physiologic stress (related to either nutrient or light) or a mechanical stress. We also note that EPS favors biofilm and floc formation. The volume fraction calculation presented above was solely based on the mass of the *Chlorella* cells.

To characterise size distribution of microalgae, a set of 165 images comprising 2873 cells were acquired using a digital colour camera (Axio Cam MRc third version, 1.4 megapixels, 12 bit quantisation) mounted on Zeiss upright microscope (Zeiss Axio Scope A₁). The microscope is equipped with an objective with 20X magnification and a depth of field of 5.8 μm . The contour

TABLE 3.1 – Range of the volume fractions of the *Chlorella* solutions investigated. C_x^{rms} and Φ_v^{rms} stand for the root mean square deviation (rms) of the dry weight concentration and of the volume fraction, respectively.

$C_x(\text{g/l})$	$C_x^{rms}(\text{g/l})$	$\Phi_v(\%)$	$\Phi_v^{rms}(\%)$
147	4.74	58.3	1.88
92	1.8	36.5	0.71
62.5	2.28	24.8	0.9
58.3	2.24	23.1	0.89
54.2	2.08	21.5	0.82
50	1.92	19.8	0.76
45.8	1.76	18.2	0.7
37.5	1.44	14.9	0.57
29.2	1.12	11.6	0.44
20.8	0.8	8.3	0.31
12.5	0.48	5	0.19
4.2	0.16	1.7	0.06

of each cell was extracted from each image using a commercial image processing software (Axio vision routine) and the radii of the cells were determined. The analysis of the shape of the *Chlorella* cells is illustrated in Fig. 3.1. Cells were found of a roughly spherical shape (see Fig. 3.1 (a)) with a mean radius $\bar{r}_0 = 1.98\mu\text{m}$ and a standard deviation of $r_0^{std} = 0.41\mu\text{m}$. Cells size distribution (radii) can be modelled by a log-normal distribution (the full line in Fig. 3.1 (b)) as already observed elsewhere for *Chlamydomonas Reinhardtii* species which was found almost similar in shape (Pottier, 2005). It must be noticed that the rather large cell size makes *Chlorella* suspensions to fall into the class of non-Brownian suspensions.

To get a deeper insight into the microstructure of *Chlorella* suspensions, we present in Fig. 3.2 micrographs of such suspensions at various volume fractions (indicated in the inserts). Note that the micrographs have been acquired in a quiescent state (no flow).

At low volume fractions ($\Phi_v = 5.4\%$ panel (a) in Fig. 3.2), a dilute regime is observed and no apparent organisation of the cells is observed. As the volume fraction is increased ($\Phi_v = 16.2\%$ panel (b) in Fig. 3.2) an apparent reorganisation of the *Chlorella* cells can be observed at a close inspection : the larger cells tend to group together and voids (regions free of cells) can be observed as well. As the volume fraction is increased even further, ($\Phi_v = 37.8\%$ panel (c) in Fig. 3.2) the organisation of the *Chlorella* cells becomes more obvious. The cells are organised in flocs and individual flocs are interconnected by "bridges" formed by smaller cells. Within the highly concentrated regime, ($\Phi_v = 48.6\%$ panel (d) in Fig. 3.2) a highly dense and randomly packed cell structure is observed (although we could not identify individual cells within the high volume fraction micrographs a simple visual inspection reveals no particular arrangements

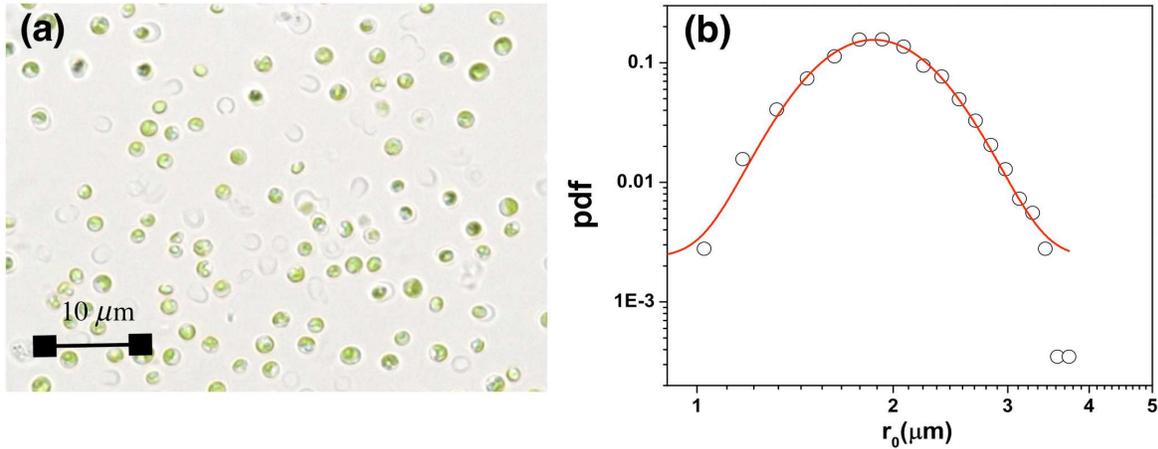


FIGURE 3.1 – (a) Micrograph of a *Chlorella* suspension (b) Probability distribution function of the cell radius. The full line is a log-normal fit.

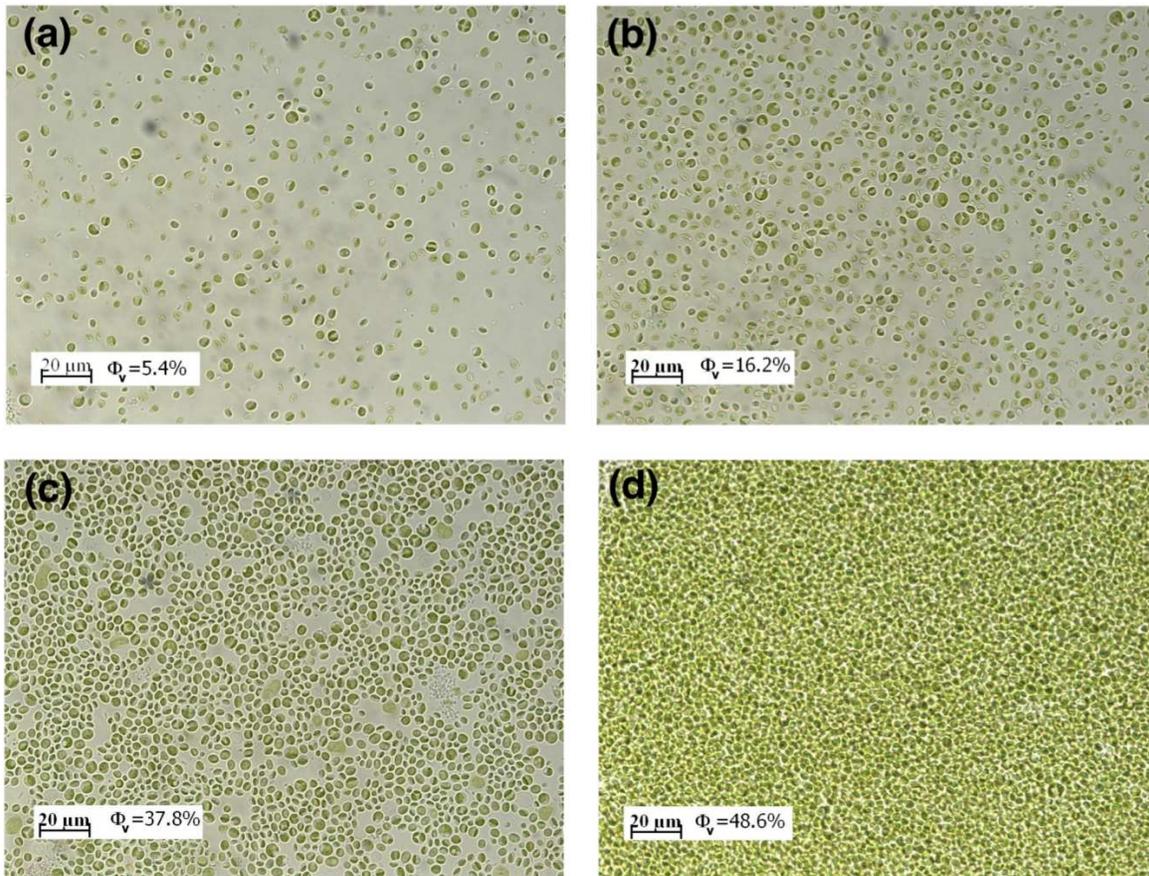


FIGURE 3.2 – Micrographs of *Chlorella* suspensions at various volume fractions indicated in the inserts. The images have been acquired in a quiescent state (no stresses are applied onto the sample).

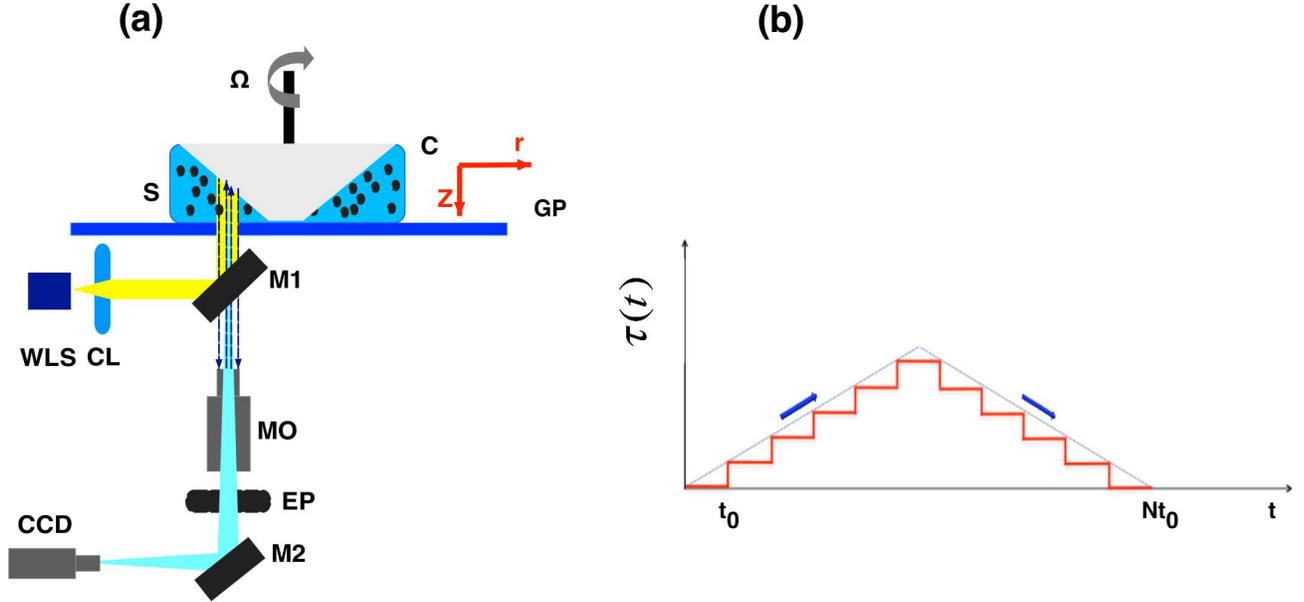


FIGURE 3.3 – (a) Schematic view of the Rheoscope module : **CCD** - digital camera, M_1, M_2 - mirrors, **EP** - eye piece, **MO** - microscope objective, **WLS** - white light source, **CL** - collimating lens, **GP** - glass plate, **S** - *Chlorella* sample, **GP** - glass plate, **C** - cone. (b) Schematic representation of the increasing/decreasing controlled stress ramp. N is the total number of steps of the ramp and t_0 is the time corresponding to each step (the characteristic forcing time).

of individual cells). Within this state, the cells come into contact consistently with a jammed particle system.

We note that, from an industrial stand point, it is precisely this regime of high volume fractions that presents a high practical interest (high cell density photobioreactor).

Rheological measurements

The rheological characterisation of the microalgae solutions has been performed on a Haake Mars *III* rotational rheometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) equipped with a nano-torque module. The nano-torque module allows accurate rheological measurements of dilute samples in a range of low applied shear stresses.

The measurements have been performed using a cone-plate geometry ($r = 60 \text{ mm}$ radius and 2 deg angle). Prior to each rheological test, the samples have been carefully loaded paying attention to the reproducibility of the shape of the free meniscus in subsequent experiments. To prevent the evaporation of the sample during long tests, the fluid meniscus has been covered by a protective thin film of silicone oil. Additionally, the entire geometry has been enclosed in a bell-shaped chamber made of a thermally insulating material (teflon).

All the experiments reported in this paper have been conducted at the same temperature, $T = 20^\circ\text{C}$.

The minimum torque that could be resolved during our measurements was $T_{min} = 0.01 \mu\text{Nm}$ which corresponds to a minimum stress $\tau_{min} = 1.76 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}$. The minimum angular speed that could be resolved during our measurements was $\Omega_{min} = 10^{-7} \text{ rot/min}$ which corresponds to

a minimum shear rate $\dot{\gamma}_{min} = 3 \cdot 10^{-7} s^{-1}$. We have made sure that, during of each of the experiments reported in this paper, the applied stresses and the measured rates shear were larger than the limiting values given above.

The rheometer is also equipped with a Rheoscope module (from ThermoFisher Scientific, Karlsruhe, Germany) which equally allows the visualisation of the microstructure of the suspensions and the measurement of the velocity fields during the rheological tests, 3.3 (a). A white light beam emitted by the source **WLS** is collimated by the lens **CL** and directed by the mirror M_1 onto the sample **S** through the glass plate **GP**. The light reflected by the smooth inner surface of the cone **C** is focused by a microscope objective **MO** (10X magnification and $8.5 \mu m$ depth of field) and an eye piece **EP** onto the charged coupled device of the digital camera **CCD** (Chameleon CMLN-13S2M-CS from Point Grey), see Fig.3.3 (a).

The Rheoscope module is equipped with a motorised focusing system which allows one to acquire flow images at various depths within the sample. A second motorised translational stage allows one to move the focusing point along the radial direction r over a distance of $15 mm$ measured from the position $r = 0 mm$;

It is important to point out that the Rheoscope microscopic visualisation system works in reflection, *i.e.* the **CCD** camera receives the light reflected by the surface of the cone **C**. This inherently results into a image quality lower than that provided by the classical upright microscope used to visualise the suspensions in quiescent state (*i.e.* in the absence of a flow), see the description provided in Sec. 3.2.4 and the micrographs illustrated in Figs. 3.1(a), 3.2.

Whereas the quality of the images acquired with the Rheoscope system does not suffice for an accurate identification of individual *Chlorella* cells, two other functionalities of this module have been employed through our study.

Firstly, the ability to focus at any point along the vertical direction z allows one to probe the emergence of the wall slip phenomenon which is of paramount importance for rheology of suspensions, (Buscall, 2010).

Secondly, the acquisition of a sequence of flow imaging and its processing via a standard multi-pass Digital Particle Image Velocimetry (**DPIV**) algorithm (see Refs. (Scarano and Rhiethmuller, 2001, Raffel et al., 2007) for a comprehensive description of the method) allows in-situ measurements of the velocity distributions which may be used to indirectly probe the formation of micro-structures of *Chlorella* cells. For this purpose, a judicious choice of the inter frame of the **CCD** camera together with a appropriate choice of the sequence of interrogation windows (adapted to the magnitude of the cell's displacements in the field of view) allowed one to resolve speeds as small as $0.3 \mu m s^{-1}$ with an instrumental error better than 6 %. These rather low flow speeds could be successfully resolved due to a additional sub-pixel interpolation routine developed in the house.

For this rheometric flow the Reynolds number can be defined as $Re = \frac{R^2 \Omega \rho}{\eta}$ where Ω is the angular velocity of the geometry, ρ the density of the suspension and η its viscosity. Corresponding to each of the measurements further reported, the Reynolds number Re was of order of unity (or smaller) indicating that inertial effects typically responsible for the emergence of secondary flows were practically absent.

The rheological behaviour of the microalgae suspensions has been assessed by controlled stress flow ramps schematically illustrated in Fig. 3.3 (b). The time interval t_0 corresponding to each step of the ramp was varied in order to probe the sensitivity of the rheological response of the sample to the steadiness of the rheometric flow.

To probe the reversibility of the deformation states, both increasing and decreasing stress ramps have been performed.

3.2.5 Results

According to the dimensional analysis by Krieger et al. (Krieger and Dougherty, 1959), the relative viscosity of a (mono-disperse) suspension of rigid particles $\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0}$ (where η_0 is the viscosity of the culture medium which is slightly larger than that of the water, $\eta_0 \approx 2mPas$) should satisfy the follow functional dependence :

$$\eta_r = \eta_r(\Phi_v, Pe, De) \quad (3.4)$$

In the Eq. above, Pe and De stand for the Péclet number and Deborah numbers are defined as $Pe = t_{br}\dot{\gamma}$ and $De = t_{br}/t_0$, respectively. Here $\dot{\gamma}$ is the rate of shear, $t_{br} = \frac{6\pi\eta_0\bar{r}_0^3}{k_B T}$ (k_B is the Boltzmann constant and T the absolute temperature) is a characteristic time scale associated with the Brownian motion and t_0 is a time scale associated with the experiment. Whereas the dependence of the relative viscosity on the volume fraction and the Péclet number has been studied by many authors (see Ref. (Tropea et al., 2007) for a review of these studies) the dependence on the Deborah number has been much less explored : most of the previous rheological studies report steady state rheological measurements, $t_0 \rightarrow \infty$ or $De \rightarrow 0$. We note, however, that realistic flows of microalgae suspensions in various reactors are not necessarily steady (t_0 is finite and $De > 0$) and, to properly model them, the De dependence of the relative viscosity needs to be investigated as well.

The global aim of this study is to explore experimentally the entire functional dependence predicted by Eq. 3.4.

The volume fraction dependence of the rheological properties of the *Chlorella* suspensions has been assessed by running controlled stress flow ramps for suspension with various volume fractions given in Table 3.1. By choosing an appropriate range of the applied stresses, for some of the volume fractions listed in Table 3.1 the Péclet number was varied over nearly three orders of magnitude. For each value of the volume fraction, the Deborah dependence has been investigated by varying the characteristic forcing time t_0 during which the stress is maintained constant during the flow ramp. The time dependence of the rheological properties has been further investigated by studying the reversibility of the deformation states by performing increasing and decreasing flow ramps.

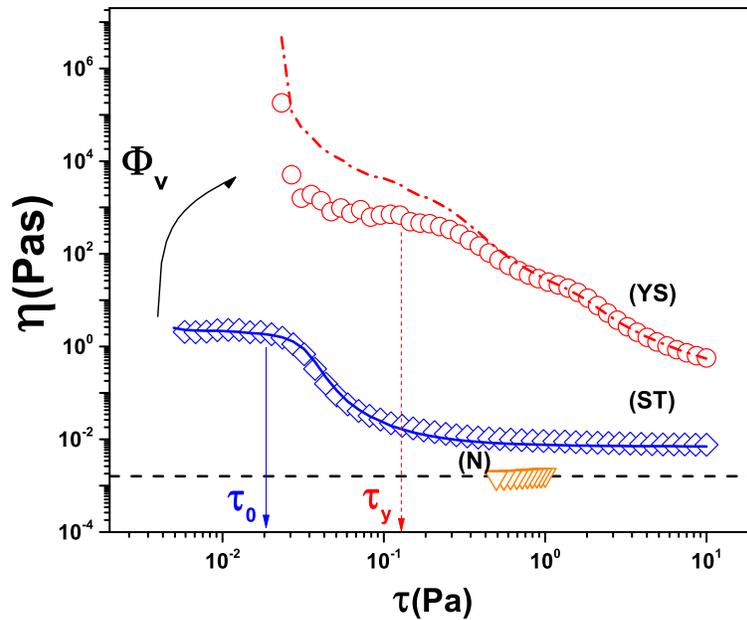


FIGURE 3.4 – Stress dependence of the viscosity of the microalgal suspension measured in a controlled stress mode for several volume fractions : (∇) - $\Phi_v = 0.082$, (\diamond) - $\Phi_v = 0.165$, (\circ) - $\Phi_v = 0.556$. For each stress value the viscosity data has been averaged for a time $t_0 = 15$ s. The full line (—) is a fit according to the Cross model, the dashed line (---) is a fit according to the Herschel-Bulkley model.

Rheological regimes

To identify various rheological regimes, controlled stress flow ramps have been performed in identical conditions for various microalgae solutions with the cell volume fraction Φ_v ranging in between 0.016 and 0.556.

Several such measurements are presented in Fig. 3.4. Within the dilute regime¹ ($\Phi_v \leq 0.115$) no stress dependence of the viscosity is observed (the down-triangles in Fig. 3.4, (∇)) indicating a Newtonian (**N**) rheological behaviour.

As the volume fraction is increased, an entirely different rheological behavior is observed (the rhombs (\diamond) in Fig. 3.4). Corresponding to stress values smaller than a critical value ($\tau \leq \tau_0$) a Newtonian behaviour characterized by a viscosity plateau which defines the zero shear viscosity η_0 is observed. Beyond this critical stress value ($\tau > \tau_0$) a shear thinning rheological behaviour **ST** is observed, $\eta \propto K\dot{\gamma}^{\frac{n-1}{n}}$ where K , n stand for the consistency and the power law index, respectively. A second viscosity plateau which defines the infinite shear viscosity η_{inf} is observed at large applied stresses.

The viscosity measurements within the **ST** regime may be described over the entire range of rates of shear explored during our measurements by the Cross model (the full line in Fig. 3.4), (Cross, 1965)²

1. We note that this regime is yet beyond the Einstein's ultra-dilute limit which was of no particular interest to the present study.

2. Here, the index n of pseudoplasticity is equal to 0.9985.

$$\eta = \eta_{inf} + \frac{\eta_0 - \eta_{inf}}{1 + \alpha \dot{\gamma}^n} \quad (3.5)$$

Within the framework of the Cross model, the onset of the shear thinning (see the diamonds in Fig. 3.4) behaviour may be estimated as $\tau_0 \approx \eta_0 \alpha^{-1/n}$.

The good agreement of the viscosity data acquire within the **ST** volume fraction regime illustrated by the full line in Fig. 3.4 prompts us to investigate closer the main assumption underlying the Cross model according to which the low stress viscosity plateau is related to the formation of a flocculated microstructure of individual particles (cells). Although some voids (regions without cells) are clearly visible in Fig. 3.2(c) an organisation of individual cells in flocculated micro-structures is not obvious. To get a deeper insight into the micro-scale organisation of the *Chlorella* suspension, we have passed this micrograph to a sequence of image processing algorithms implemented under Matlab[®] able to detect the edge of individual cells, fit their contour by an ellipsis which ultimately gives the coordinates of their centroid and their size. The result of such an analysis is presented in Fig. 3.5(a). The accuracy of the cell identification is about 5%.

The simultaneous determination of the centroids of the cells and their size (area in the field of view) allows the partition of the field of view in Voronoi polygons. The Voronoi diagram consists in the partition of the field of view in convex polygons (equal in number to the number of the detected *Chlorella* cells) such as each polygon contains exactly one centroid of a cell (called in this context generating point) and every point of a given polygon is closer to its generating point than to any other, (De Berg et al., 2008).

The result of the Voronoi triangulation of the micrograph presented in Fig. 3.5 (a) is presented in Fig. 3.5 (b).

The false colormap is related to the size of the *Chlorella* cells. The computation of the Voronoi diagram allows one to visualise the agglomerations (flocs) of cells of similar sizes separated by voids. It is interesting to note that the flocs are mainly constituted of the smallest cells (colour coded in blue, Fig. 3.5 (b)) whereas the biggest cells (colour coded in red, Fig. 3.5 (b)) tend to isolate themselves creating voids around them.

This rather unexpected correlation between the spatial distribution of the cells and their sizes may be understood in terms of repulsive interactions between the cells. Indeed, the surface of the *Chlorella* cells is negatively charged, (Kumar et al., 1981) and, assuming that various cells are characterised by similar superficial charge density, it is likely that larger cells repel the small ones leading to the formation of the flocs visible in Fig. 3.5 (b)).

This conclusion is consistent with the experiments of Dibble and his coworkers which demonstrated that inter-particle short range interactions (attractive, in their case) may lead to a microscopic scale organisation of individual particles in a colloidal dispersion, (Dibble et al., 2006).

As the micrograph presented in Fig. 3.2(c) and reanalysed in Fig. 3.5 has been acquired in a quiescent state (absence of flow) the points made above can only be used to understand the rheological behaviour in the limit of vanishing applied stress, $\tau \rightarrow 0$.

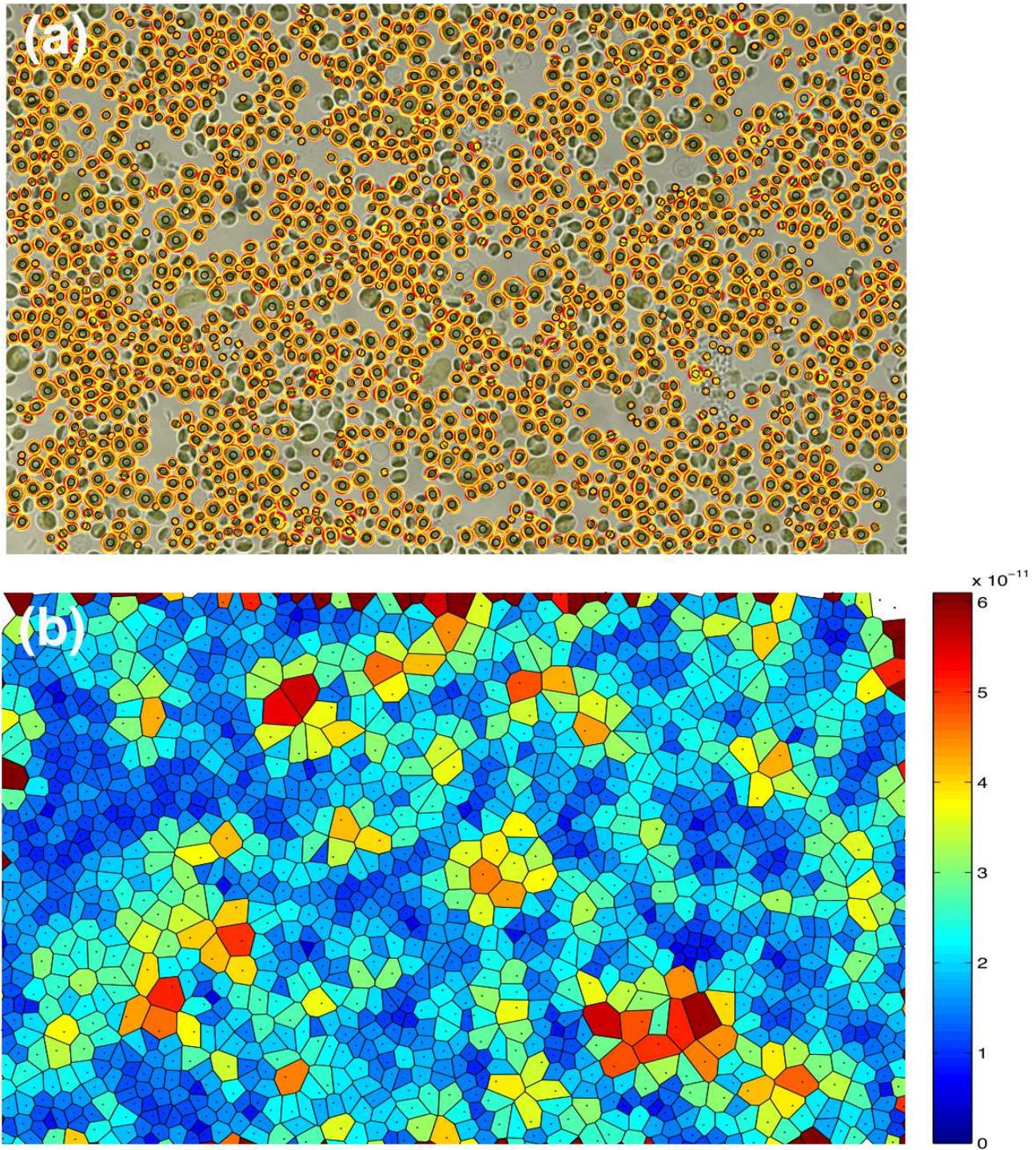


FIGURE 3.5 – (a) The micrograph presented in Fig. 3.2(c) together with the contours of individual cells detected via image segmentation. (b) The corresponding Voronoi diagram corresponding to the micrograph presented in Fig. 3.2(c).

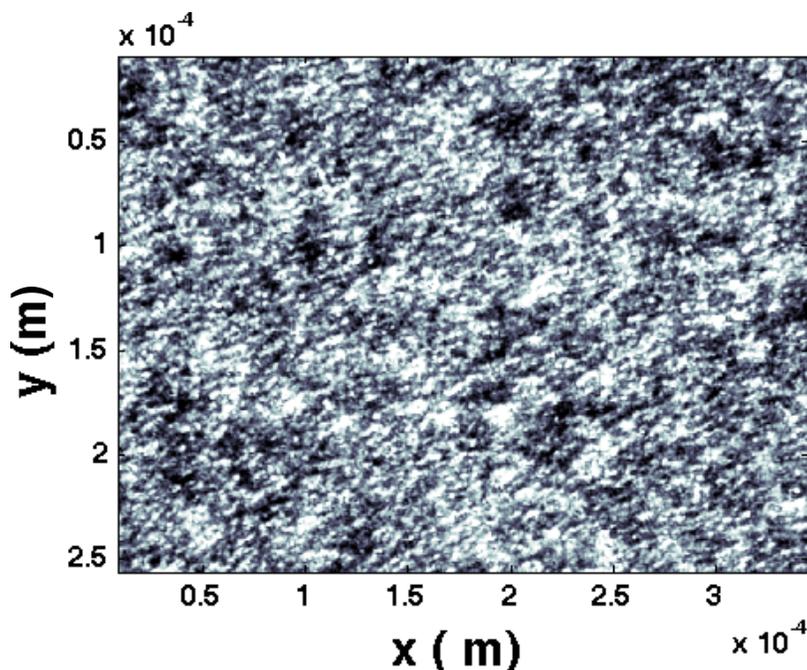


FIGURE 3.6 – Micrograph acquired during a controlled stress ramp (see Fig. 3.3(b)) corresponding to $\tau = 0.02 Pa$ and a volume fraction within the **ST** regime ($\Phi_v = 0.15$). The bright patches correspond to agglomerations of cells (flocs) that strongly scatter the light.

The natural question that needs to be addressed at this point is whether the microscopic scale organisation of cells in flocs persists under shear at values of the applied stress corresponding to the low shear viscosity plateau visible in Fig. 3.4 (the rhumbs, (\diamond)).

To address this question, we resort to the in-situ flow visualisation using the Rheoscope module presented in Fig. 3.3 (a) and described in Sec. 3.2.4.

A micrograph of a *Chlorella* suspension with a volume fraction corresponding to the **ST** regime acquired during a controlled stress ramp for $\tau = 0.02 Pa$ is presented in Fig. 3.6. Although the quality of this flow image does not fully match the quality of the micrographs acquired in the absence of flow with the table top upright microscope, individual flocs of cells are clearly visible as white colour patches.

Of particular interest within the **ST** regime was the emergence of the wall slip phenomenon which is often encountered during the rheological measurements of intermediately and highly concentrated suspensions, (Buscall, 2010).

The Rheoscope module equally offers a simple and elegant method of directly probing the wall slip by focussing the the microscope objective **MO** at the level of the bottom glass plate **GP** (see Fig. 3.3 (a)). The direct visual assessment of the micro-flow led us to the conclusion for each of the volume fractions investigated with the **ST** regime the slip velocity at the bottom glass plate **GP** never exceeded 5% of the speed of the rotating cone **C**. This conclusion has been reinforced by additional rheological tests performed with a roughened plate-plate geometry (obtained by gluing sand paper on the parallel plates) which revealed no significant differences in the viscosity curves.

To conclude this part, the micro-structural observation of the *Chlorella* suspension in both a quiescent and sheared state confirms the initial hypothesis that the low stress viscosity plateau observed within the **ST** volume fraction regime is associated to the formation of cell aggregates (flocs) in agreement with the main assumptions of the Cross model (Cross, 1965) and to the more recent theoretical work by Quemada (Quemada, 1997).

As the volume fraction is increased even further, $\Phi_v \geq 0.25$ an apparent yield stress **YS** behaviour can be observed : the low shear stress plateau visible within the **ST** regime degenerates into a viscosity divergence (the circles (○) in Fig. 3.4).

We emphasise once more that, to our best knowledge, a yield stress behaviour of suspensions of *Chlorella* has been very little documented by previous experimental studies, (Wu and Shi, 2008).

It is important to note that, based on the resolution of both the torque and angular speed measurements on the Mars III rheometer (see the discussion and figures presented in Sec. 3.2.4) the rather large values of the viscosity observed in Fig. 3.4) in a range of low applied stresses remain within the operating range of the device and should not be attributed to instrumental artefacts.

The yield stress behaviour can be quantitatively (but yet formally) assessed using a Herschel-Bulkley model (Herschel and Bulkley, 1926) for the stress-rate of strain dependence, $\tau = \tau_y + K\dot{\gamma}^n$, where τ_y stands for the yield stress (see the circles and the dash-dot line in Fig. 3.4).

It has to be pointed out that, from an industrial perspective, it is precisely the high volume fraction (high cell density culture) regime that presents an industrial interest. The emergence of a apparent yield stress behaviour within this volume fraction regime might actually change most of what we thought we know about the impact of both the rheology and the hydrodynamics on the design of efficient photobioreactors. Namely, a viscosity divergence would naturally lead to the emergence of a unmixed plug flow regions or stagnant volumes in flow regions characterised by a low shear rate.

Such non-trivial hydrodynamic effects triggered by a still insufficiently understood rheological behaviour would certainly render the commercially available numerical tools commonly used to "design" an efficient mixing protocol useless and new ones would have to be developed. This motivates us to pay a particular attention to the high volume fraction **YS** regime.

A fundamental question that needs to be addressed is : *What are the underlying physical mechanisms behind the experimental observation of an apparent yield stress behaviour during slow shear flows of Chlorella suspensions ?*

Jaishankar and his coworkers observed an apparent (bulk) yield stress behaviour in a solution of Bovine Serum Albumin (BSA) under shear, (Jaishankar et al., 2011). They have elegantly demonstrated that the apparent yield stress exhibited by these solutions originates in the presence of a viscoelastic layer formed due to the adsorption of protein molecules at the air-water interface in the rheometric geometry. The elastic origins of the apparent bulk yield stress behaviour was unequivocally demonstrated by creep tests performed at various applied constant stresses which revealed an oscillatory behaviour of the creep compliance at short times known in the literature as the *creep ringing* phenomenon. Moreover, they have demonstrated that addition

of a surfactant (Tween 80) which inhibits the protein adsorption at the interface may diminish and even entirely suppress the apparent yield stress behaviour turning the BSA solution into a Newtonian fluid (see Figs. 9 and 11 in Ref. (Jaishankar et al., 2011)).

It is known that the *Chlorella* micro-alga is rich in proteins, which justifies its potential importance to the food industry. However, these proteins are part of the intracellular matter and, unless the cells are mechanically or chemically damaged, they are not expected to be found in the culture medium. As our suspensions consisted of living cells, we do not expect that the mechanism underlying the apparent yield stress behaviour is the same as in Ref. (Jaishankar et al., 2011)).

To probe this, however, rheological measurements performed on the culture medium itself (the cells have been eliminated via centrifugation) revealed a Newtonian behaviour (a viscosity constant with the applied stress).

Additional creep tests performed at low applied stresses and volume fractions Φ_v within the **YS** regime revealed no *creep ringing* phenomenon (data not shown here).

These tests demonstrate that, unlike in the case of the experiments reported by Jaishankar and his coworkers in Ref. (Jaishankar et al., 2011)), the apparent yield stress behaviour observed in Fig. 3.4 is not related to an interfacial elasticity effect and, most probably, its physical origins should be investigated in relation to the bulk microscopic organisation of individual cells under shear.

It is equally known that an apparent yield stress behaviour may emerge in particle systems via both a jamming and a glass transition. A recent theoretical study by Ikeda and his coworkers points out the difficulty of separating the two contributions in a practical setting as well as a non-negligible level of ambiguity of the interplay between the glass and jamming transition existing in the rheological literature, (Ikeda et al., 2012). A theoretical suggestion of how the two contributions can be separated based on the careful correlation of the nonlinear rheological data with the unified jamming diagram initially proposed by Liu and Nagel (see Ref. (Liu and Nagel, 1998)) in the space (η_r, Φ_v, T) is proposed in Ref. (Ikeda et al., 2012).

As all of our rheological measurements have been performed at a constant temperature T , we can not reconstruct a three dimensional jamming diagram and resort to the conceptual framework proposed in Ref. (Ikeda et al., 2012).

To get a deeper physical insight into the origins of the apparent yield stress behaviour observed in Fig. 3.4 (the circles (○)) we turn our attention to the microscopic scale organisation of the *Chlorella* suspension within this range of volume fractions.

The micrograph of a $\Phi_v = 48.6\%$ *Chlorella* suspension acquired in a quiescent state indicates a highly dense distribution of cells that nearly come into a mechanical contact with each other, Fig. 3.2 (d). Such suspensions of rigid particles that nearly come in contact to each other are often referred to as *random closed packed* suspensions (Krieger and Dougherty, 1959, Kruif et al., 1985, Heymann and Aksel, 2007).

Recently, Torquato and his coworkers noted that the two terms *random* and *close packed* are, mathematically speaking, at odds with each other and proposed for this state the term *maximally random jammed state*, (Torquato et al., 2000).

Although it may support the term above, the visual information presented in Fig. 3.2 (d) is rather minimalistic as it refers to a quiescent state (no flow) and can not fully answer two fundamental questions :

1. Is the viscosity divergence observed at low applied stresses within the **YS** regime related to a cell aggregation under shear or simply to a *maximally random jammed state* microscopic state ?
2. Is the flow of the suspension homogeneous within this range of volume fractions and at low applied stresses ?

To address these questions we resorted to the in-situ visualisation of the rheometric flow using the Rheoscope module. We have acquired a long sequence (for 60 seconds) of micrographs of a *Chlorella* suspension with a volume fraction $\Phi_v = 0.556$ (the **YS** regime). One such flow image is presented in Fig. 3.7 (a) (the bright points are *Chlorella* cells which scatter the incoming white light). The images have been acquired at a constant applied stress $\tau = 0.02 Pa$ which lies precisely in the range where the apparent yield stress behaviour is observed.

The acquisition of the image sequence allowed one to measure a time series of velocity fields and calculate the time averaged flow field (see the arrows in Fig. 3.7 (a)) using the **DPIV** method described in Sec. 3.2.4. The result of this quantitative assessment is presented in Fig. 3.7 (b).

A first thing to note is the smallness of the flow speeds (typically smaller $1\mu m/s$) which is consistent with the extremely large values of the measured viscosity (the circles (○) in Fig. 3.4).

Secondly, the measurement of the time averaged flow field allows one to indirectly assess the micro-structural organisation of the *Chlorella* suspension by monitoring the regions in the flow field where there exists no measurable flow.

Such regions are highlighted by the closed curves overlapped on each panel of Fig. 3.7.

The experimental observation of these plug-like flow regions answers both of the questions stated above :

1. The emergence of the apparent yield stress behaviour is related to the formation of large scale particle aggregates that do not move over extended time intervals and ultimately lead to a divergence of the measured viscosity.
2. Corresponding to this state, the flow is highly inhomogeneous. Consequently, the viscosity measurements performed within this regime should be treated as apparent measurements³.

Unfortunately, the quality and resolution of the flow images acquired with the Rheoscope module did not allow us to analyse the correlation between the local speed, centroids of individual cells and their sizes using the Voronoi triangulation technique previously illustrated in our manuscript. We can only speculate at this point that, as in the case of the cell aggregates

3. Note that this strongly inhomogeneous flow field significantly departs from the analytical solution of a cone-plate rheometric flow which allows the accurate conversion of the measured torque (T) and angular speeds (Ω) into stresses (τ) and rates of shear ($\dot{\gamma}$).

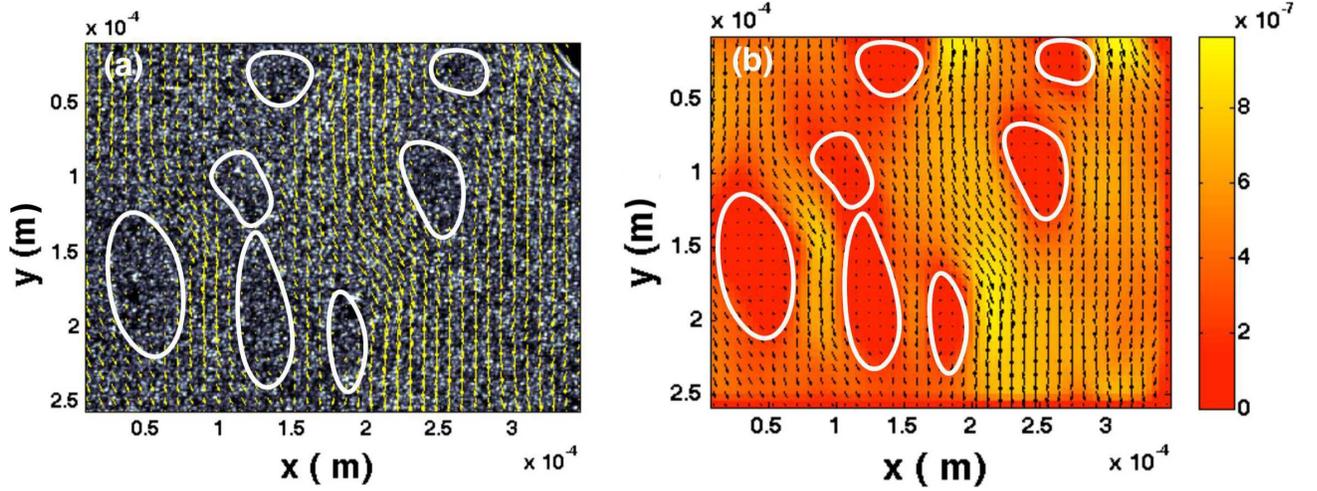


FIGURE 3.7 – (a) Micrograph of a *Chlorella* suspension with a volume fraction $\Phi_v = 0.556$ (the **YS** regime) sheared at a stress $\tau = 0.02$ Pa. The time averaged velocity field obtained via the **DPIV** method is overlapped onto the image. (b) The corresponding time-averaged mean velocity field (the false colour map) and the time averaged velocity vectors. The closed curves superposed to each panel highlight the solid-like agglomerations of *Chlorella* cells.

(flocs) observed within the **ST** volume fraction regime, the repulsive inter-cell interactions due to the negative interfacial charge of the cell's membrane may play an important role. Future experimental investigation of the microscopic flow and its correlation to the cell distributions are needed to clarify this point.

As in the case of the **ST** volume fraction regime, we have used the Rheoscope module to probe the emergence of the wall slip phenomenon within the **YS** volume fraction regime by monitoring the local flow speed at various depths z within the sample down to the bottom glass plate **GP** (see Fig. 3.3 (a)). Unlike in the case of the intermediately concentrated **ST** volume fraction regime previously discussed, a significant slip can be observed at the bottom glass plate which, in terms of speeds, accounts up to 30% of the speed of the top cone **C**.

Consequently, separate rheological measurements (data not shown here) performed with a system of rough plates have shown significant differences (as compared to the measurements performed with the smooth cone and plate system) in a range of small applied stresses. Particularly, the apparent yield stress measured in the presence of slip is several times smaller than that measure with rough geometries.

From a fundamental and strictly rheological standpoint, the measurements performed in the presence of wall slip are absolutely unacceptable as they do not reflect true material properties which is the "*golden rheological standard*".

In an engineering setting, however, this constrain may be somewhat relaxed. As a matter of a fact, realistic fluid motion of microalgae suspensions in intensified photobioreactors occurs in the presence of wall slip. This is simply because the walls of photobioreactors need to be transparent to visible light and, consequently, they are slippery (typically either glass or acrylic made).

In the view of this rather simple and practical argument we believe that, although clearly

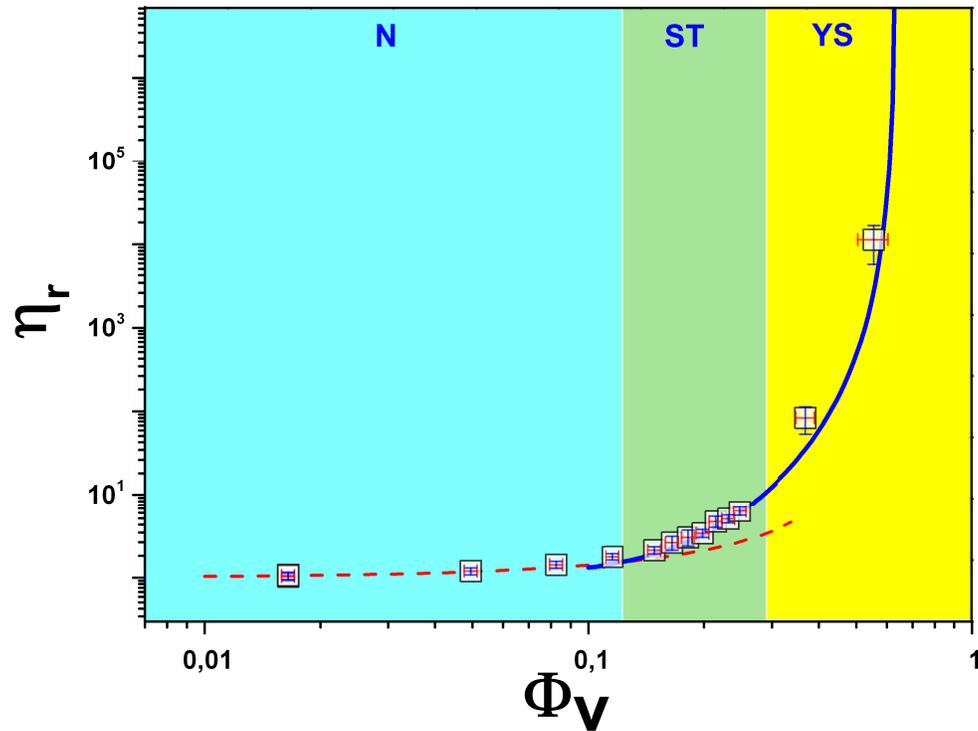


FIGURE 3.8 – Dependence of the relative viscosity of the microalgal suspension η_r on the volume fraction of the microalgae Φ_V . The dashed line is a fit according to the Quemada model (Quemada, 1997) and the full line is a fit according to the Simha model, (Simha, 1952). The labels indicate the experimentally observed rheological regimes : **N** - Newtonian, **ST** - shear thinning, **YS** - yield stress. Within the **ST** and **YS** regimes, the relative viscosity has been measured at a fixed stress, $\tau = 1Pa$. The same data is re-plotted in the inset versus $1 - \frac{\Phi_v}{\Phi_v^m}$.

misleading from a fundamental rheological perspective (particularly if one aims assessing a material property which is beyond the scope of the present work), the viscosity measurements we present within the **YS** would be quite helpful and instructive in designing efficient photobioreactors based on a correct understanding of the in-situ hydrodynamics and rheology and of their practical impact on the mass productivity of the photobioreactors.

Although our rheological data do not suffice to reconstruct a full jamming diagram as proposed in Ref. (Liu and Nigél, 1998) and done in Ref. (Ikeda et al., 2012) which allows one to accurately decouple the jamming and the glass transition, we can obtain a constant temperature section of such a diagram. For this purpose, we turn our attention to the volume fraction dependence of the relative viscosity η_r within the various rheological regimes (**N**, **ST**, **YS**) identified above.

We monitor the dependence of the relative effective viscosity η_r of *Chlorella* microalgae suspensions measured at a constant applied stress $\tau = 1 Pa$ on the volume fraction Φ_v , Fig. 3.8. To facilitate the comparison of our relative viscosity measurements with previous works by others, we re-plot in the inset of Fig. 3.8 the same data versus $1 - \frac{\Phi_v}{\Phi_v^m}$.

Within the Newtonian volume fraction regime observed for dilute *Chlorella* suspensions (**N**) the volume fraction dependence of the relative viscosity η_r is often modelled by the Quemada model, (Quemada, 1997) :

$$\eta_r = \left(1 - \frac{\Phi_v}{\Phi_v^m}\right)^{-2} \quad (3.6)$$

The equation above with $\Phi_v^m = 0.637$ can reliably describe the viscosity measurements in the range $\Phi_v \leq 0.115$ (the dotted line in Fig. 3.8).

Within the concentrated and the highly concentrated regimes (**ST**, **YS**) the volume fraction dependence of the relative viscosity is no longer accurately predicted by the Quemada model. According to the Simha's cellular model (Simha, 1952) which has proven its ability to describe the rheological behaviour of the highly concentrated suspensions, the relative viscosity of the suspension should satisfy :

$$\lim_{\Phi_v \rightarrow \Phi_v^m} \eta_r = 1 + \frac{54}{5} f^3 \frac{\Phi_v^2}{\left(1 - \frac{\Phi_v}{\Phi_v^m}\right)^3} \quad (3.7)$$

where f is a semi-empirical parameter and Φ_v^m is the maximum packing fraction.

The dependence of the relative viscosity measured at a constant applied stress $\tau = 1 Pa$ within the **ST** and **YS** regimes can be fitted by Eq. 3.7 with $f = 1.2$ and $\Phi_v^m = 0.637$ (the full line in Fig. 3.8). This value of the maximum packing fraction Φ_v^m matches closely the theoretical prediction for a *maximally random jammed state*.

The dependence of the onset of the shear thinning behaviour τ_0 and the yield stress τ_y on the volume fraction Φ_v is presented in Fig. 3.9.

Within the shear thinning regime **ST** a non monotone dependence of τ_0 on the volume fraction Φ_v is observed with a local maximum corresponding to $\Phi_v^c \approx 0.18$ and the corresponding

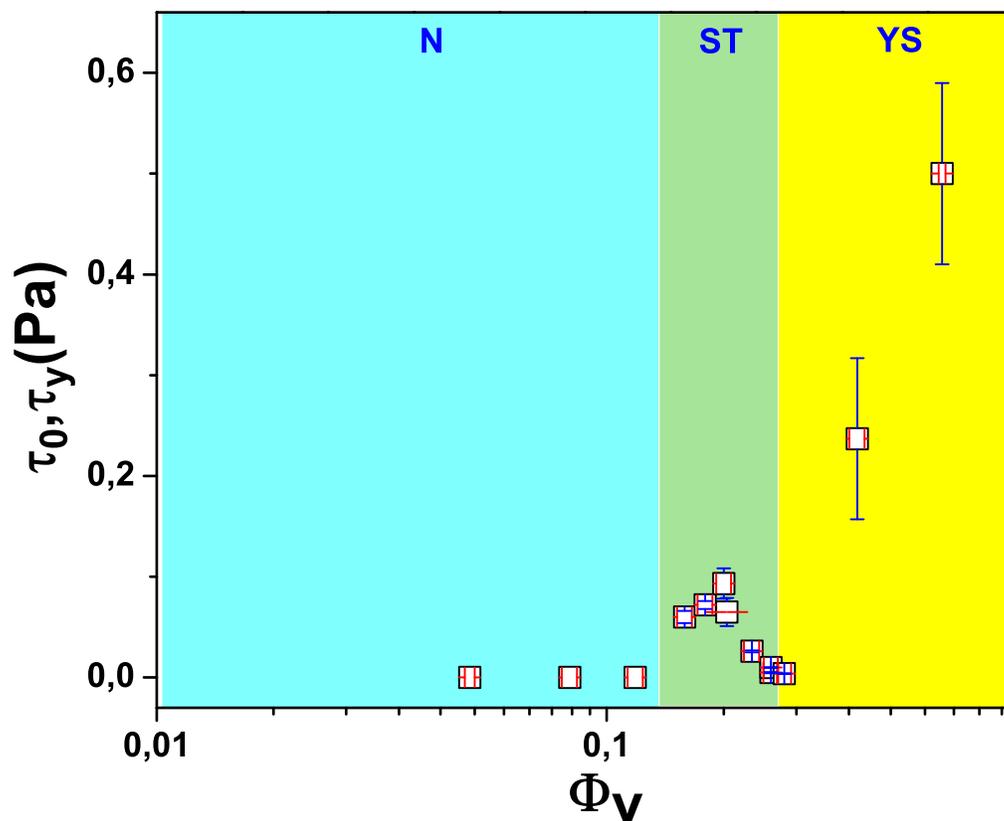


FIGURE 3.9 – Dependence of the onset of the shear thinning behavior τ_0 measured within the **ST** regime and of the apparent yield stress τ_y on the volume fraction Φ_V . The labels indicate the experimentally observed rheological regimes : **N** - Newtonian, **ST** - shear thinning, **YS** - yield stress .

stress value is $\tau_0^c \approx 0.51\Phi_V^c$.

The measurements presented in Fig. 3.9 are in a good qualitative agreement with the measurements of Kruif and his coworkers, Ref. (Kruif et al., 1985). According to Ref. (Kruif et al., 1985) and (Krieger and Dougherty, 1959) the maximum stress value τ_0^{max} reached within the **ST** concentration regime is related to the average cell size via $\tau_0^{max} = \frac{k_b T}{b \bar{r}_0^3}$ where b is the Krieger constant which is independent on the volume fraction. Using $\bar{r}_0 = 1.98 \mu m$ (see the distribution of cell size in Fig. 3.1(b)) and $\tau_0^{max} = 0.09 Pa$ (see Fig. 3.9) one obtains $b \approx 0.82$ which is of the same order of magnitude with the theoretical value predicted by Krieger ($b = 2.32$), (Krieger and Dougherty, 1959). The factor of 2 difference between the value we found and the theoretical prediction may be explained by the fact that the *Chlorella* suspension is not mono disperse (see the statistical distribution presented in Fig. 3.1(b)).

The similarities of these experimental findings with the rheological behaviour of suspensions at various volume fractions confirms our initial hypothesis that the rheological behaviour of *Chlorella* suspensions may be approached from the perspective of suspensions of rigid particles.

It is known that systems that exhibit a yield stress behaviour may also exhibit irreversibility of the deformation states upon an increase/decrease of the externally applied forcing (thixotropic effects) as well as time dependence of the rheological properties. The next section is dedicated to the investigation of such effects within the **ST** and **YS** regimes identified and characterised through this section.

Reversibility of the deformation states at various microalgae volume fractions

To probe the reversibility of the deformation states, linear (in time) controlled stress flow ramps are performed for both increasing and decreasing stresses. Each of the explored stress values is maintained constant for a time t_0 referred to as the *characteristic forcing time* (see Fig. 3.3(b)).

The reversibility of the deformation states within the intermediate concentration regime (the **ST** regime) has been probed by comparing viscosity measurements performed on increasing and decreasing stress ramps for several characteristic forcing times t_0 , Fig. 3.10.

Regardless the value of the characteristic forcing time, on the increasing branch of the stress ramp (the squares (\square) in Fig. 3.10) two deformation regimes are observed :

1. A Newtonian like regime characterized by a viscosity plateau at low values of the applied stresses. According to (Quemada, 1997), this regime may be understood in terms of a mesoscopic organization of single cells into flocs of cells.
2. An entirely de-structured regime at high values of the applied stresses. Within this regimes the cells mesostructures are destroyed by shear which translates into a lower viscosity plateau.

Upon a decrease of the applied stresses (the circles (\circ) in Fig. 3.10), the deformation states are recovered only within the entirely de-structured (fluid) regime. For each value of the characteristic forcing time t_0 investigated, the system does not return to a mesoscopic floc structure but collapses into a large scale cell network characterised by a viscosity which diverges

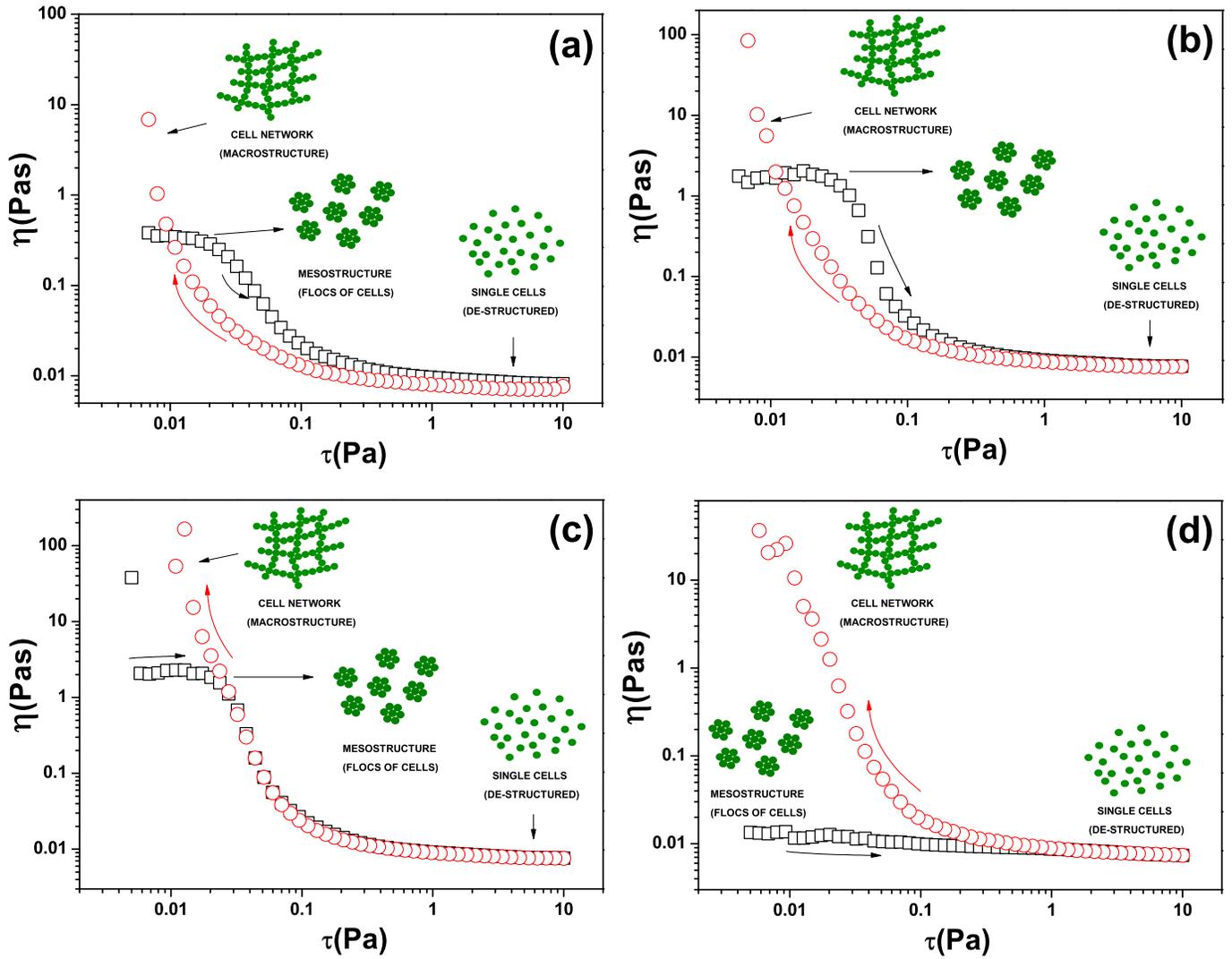


FIGURE 3.10 – Viscosity measurements within the intermediate concentration regime at a volume fraction $\Phi_v = 0.148$ (ST, see Fig. 3.8) for both increasing (\square) and decreasing (\circ) stress ramp and several values of the characteristic forcing time : (a) $t_0 = 5$ s (b) $t_0 = 10$ s (c) $t_0 = 15$ s (d) $t_0 = 30$ s.

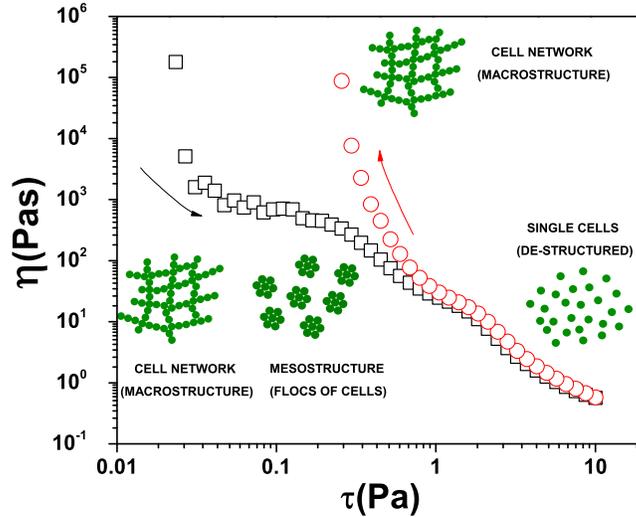


FIGURE 3.11 – Viscosity measurements within the highly concentrated regime at a volume fraction $\Phi_v = 0.556$ (the **YS** regime, see Fig. 3.8) for both increasing (\square) and decreasing (\circ) stress ramp. The characteristic forcing time was $t_0 = 15s$.

at low stresses. Bearing in mind that this range of microalgae volume fractions lies significantly below the maximum packing fraction Φ_v^m and thus individual *Chlorella* cells do not jam (see panels (b,c) in Fig. 3.2), the observation of a viscosity divergence on the decreasing stress branch and at low applied stresses appears to us quite puzzling and deserves a brief discussion. Within the intermediate range of volume fractions the average inter-cell distance may become of the same order of magnitude with the Debye length and thus, an effective repulsive force network leads to the viscosity divergence in a range of low applied stresses observed in Fig. 3.10. It remains, however, to be clarified by future investigations why such a viscosity divergence is observed only on the decreasing branch of the stress ramp.

Viscosity measurements performed on a microalgae suspension with a volume fraction $\Phi_v = 0.556$ (within the **YS** regime, see Fig. 3.8) for an increasing and a decreasing linear stress ramp are presented in Fig. 3.11.

As already illustrated in Fig. 3.4 and discussed above, within the highly concentrated regime **YS** a viscosity divergence is observed in a range of small stresses on both the increasing branch of the stress ramp (the squares (\square) in Fig. 3.11) and the decreasing one (the circles (\circ) in Fig. 3.11). The viscosity divergence can be understood in terms of a jammed particle network extended over the entire sample. This behaviour is consistent with the micro structural information presented in Fig. 3.2 (d) which clearly indicates that neighbouring *Chlorella* cells come into contact.

As the applied stress is increased along the increasing branch of the stress ramp, a gradual transition towards liquid states (the microalgae suspension is completely de-structured) is observed. The cell network responsible for the yield stress behaviour depicted in Fig. 3.11 breaks down into a suspension of flocs of cells (mesoscopic cell structure). Within this intermediate

state, a viscosity plateau is observed, similar to the low stress Newtonian plateau observed at intermediate volume fractions within the **ST** rheological regime. As the applied stress is increased even further, the flocs of cells break down and a shear thinning fluid state is observed.

Upon a decrease of the applied stresses (the "down" branch of the stress ramp) the deformation states are recovered only within the fluid regime. We note that no intermediate viscosity plateau is observed on the decreasing stress branch : the system passes directly from a de-structured state to a cell network state characterised by a divergent viscosity. A similar irreversible solid-fluid transition has been recently observed for a PMMA suspension by Heymann and Aksel, (Heymann and Aksel, 2007). As stated in Ref. (Heymann and Aksel, 2007), the emergence of a hysteresis clearly indicates that the static and dynamic structures of cells are quite different at the same low applied stress of the up and down branches of the flow curve.

Individual inspection of various increasing/decreasing flow ramps measured within both the **ST** and **YS** regimes indicates that there exists an onset of irreversibility of the deformation states which, most probably, corresponds to the complete breakdown of cell structures (flocs). Unfortunately, for the case of *Chlorella* microalgae, we are not aware of a theoretical framework able to describe this by accounting not only for the hydrodynamic interactions but for the electrostatic repulsions as well.

The irreversible (hysteretic) solid-fluid transition of the highly concentrated *Chlorella* microalgae suspension under shear also bears some similarities with the solid-fluid transition recently observed in a shear thinning physical gel (Carbopol), (Putz and Burghilea, 2009). We note, however, that the solid behaviour visible in Fig. 3.11 is not necessarily related to elasticity, as it was the case for the physical gel studied in (Putz and Burghilea, 2009).

A irreversible flow behaviour strikingly similar to that depicted in Fig. 3.11 has been observed by Malkin and his coworkers, (Malkin et al., 2004), on an super-concentrated water in oil (WO) emulsion. They interpret the viscosity increase on the decreasing stress branch in the range of low shear rates as a rheopectic effect induced by the ageing of the emulsion.

These unexpected similarities between the yielding scenario in various micro structurally different systems suggest that the solid-fluid transition in soft materials may follow a universal pattern related to the competition between formation and destruction of flow units.

The irreversibility of deformation states is usually associated with thixotropic or time dependent effects in the rheological behaviour. To explore this, we focus on the dependence of the viscosity measured at a fixed applied stress on the characteristic forcing time t_0 . The results of such measurements for three values of the volume fraction Φ_v corresponding to the **ST** regime are presented in Fig. 3.12.

Up to a critical value of the characteristic forcing time $t_0 \approx 15$ s which is of the same order of magnitude with the characteristic time scale associated with the Brownian motion t_{br} (or $De \approx 1$)⁴, the zero shear viscosity (the empty symbols in Fig. 3.12) increases almost an order of magnitude. This viscosity increase in conjunction with the micro structural picture illustrated in Fig. 3.2(d) indicates that smaller the Deborah number is, larger is the characteristic

4. Note that if one takes into account the measured average cell radius and its standard deviation one obtains $t_{br} \in [16.4, 65.7]$ s (see Fig. 3.1 and the discussion in Sec. 3.2.4).

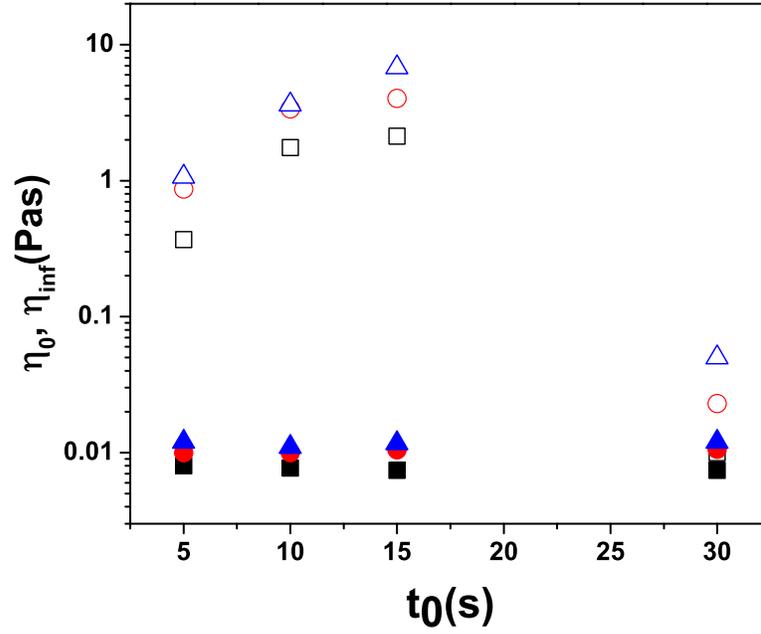


FIGURE 3.12 – Dependence of the zero shear viscosity η_0 (empty symbols) and the terminal viscosity η_{int} (full symbols) measured within the **ST** regime on the increasing branch of the stress ramp on the characteristic time of forcing t_0 . The symbols refer to different volume fractions of the microalgae : (□, ■) - $\Phi_v = 0.148$, (○, ●) - $\Phi_v = 0.165$, (△, ▲) - $\Phi_v = 0.181$.

size of structured flocs of *Chlorella* cells. For values of t_0 larger than t_{br} a drop of nearly two orders of magnitude of the zero shear viscosity is observed indicating for large waiting times the rate of formation of flocs of cells is overcome by the rate of destruction induced by the shear. Although we have checked the reproducibility of this effect during subsequent experiments performed on different batches of suspensions, we are unable at this point to provide a full physical interpretation of this effect.

Measurements of the high shear plateau viscosity η_{int} (the full symbols in Fig. 3.12) indicate no dependence on the characteristic forcing time t_0 which indicates that in a fully de-structured deformation regime no time dependent effect are present. This finding is fully consistent with the reversibility of the deformation states observed in a range of large applied stresses, Fig. 3.10.

Measurements of the viscosity of a highly concentrated microalgae suspension (the regime **YS** in Fig. 3.8) at a given applied stress as a function of the characteristic forcing time t_0 are presented in Fig. 3.13.

Depending on the value of the applied stress, two behaviours with respect to the characteristic forcing time are found. For $\tau = 10 Pa$ which corresponds to the reversible fluid deformation regime (see Fig. 3.11), no significant variation of the viscosity with t_0 can be observed (the full symbols in Fig. 3.13). This indicates that, corresponding to this value of the applied stress the entire sample is in a liquid state and no re-structuration of the microalgae suspension occurs. This conclusion is consistent with the reversibility of the flow curved observed within the fluid regime, Fig. 3.11.

The dependence of the viscosity on the characteristic forcing time is significantly different,

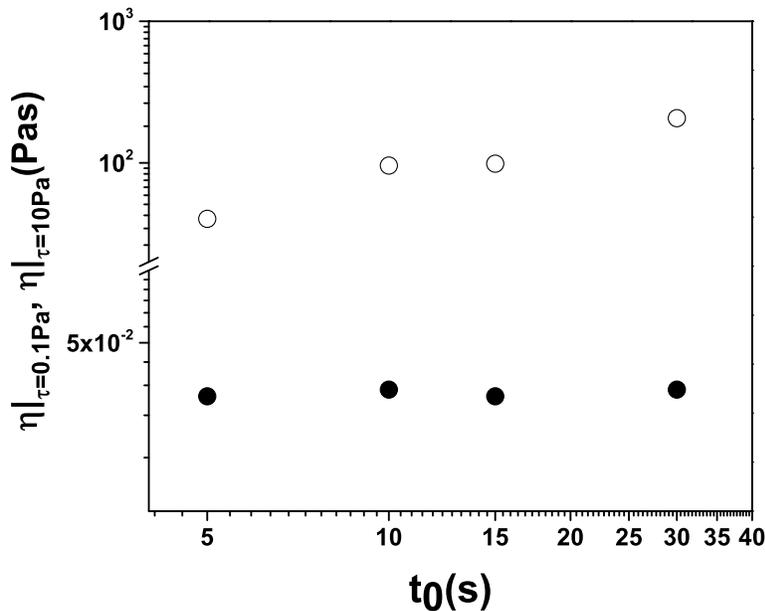


FIGURE 3.13 – Dependence of the viscosity of a highly concentrated suspension (within the **YS** rheological regime,) measured at a fixed stress on the characteristic forcing time. The symbols refer to stress value : (○) - $\tau = 0.1 Pa$, (●) - $\tau = 10 Pa$.The volume fraction is $\Phi_v = 0.37$.

however, for a low value of the applied stresses ($\tau = 0.1 Pa$). Within this deformation regime, a monotone increase of the viscosity with the characteristic forcing time is observed (the empty symbols in Fig. 3.13).

This observation, in conjunction with the visualisation of the rigid plugs formed by large scale agglomerations of individual cells presented in Fig. 3.7 indicates that average size of these agglomerations decreases monotonically with the Deborah number, De . In other words, steadier the flow is, more likely is that the *Chlorella* cells form large plug-like zones gradually leading to a *maximally random jammed state* manifested by a divergence of the apparent viscosity.

A similar time dependent rheological behaviour has recently been observed by Schmidt and Münstedt (Schmidt and Münstedt, 2002) for concentrated monodisperse suspensions. They have observed a strong dependence of the rheological properties (zero shear viscosity and dynamic moduli) of the suspensions on the pre-shear time. The zero shear viscosity was found to increase with increasing pre-shear time which they interpret by structuring effects. In contrast to the loss modulus, which has not been influenced significantly by pre-shear, the storage modulus increased substantially with increasing pre-shear times at low angular frequencies. This was interpreted as a transition from a liquid-like to a solid-like viscoelastic structure of the particle network.

3.2.6 Conclusions, outlook

A systematic study of the rheological behaviour of suspensions of non-swimming microalgae is presented. Depending on the microalgae volume fraction, three distinct rheological regimes are observed. At low volume fractions ($\Phi_v < 0.115$) a Newtonian regime (**N**) is observed :

the viscosity is independent on the applied stress and the flow curves are reversible upon an increase/decrease of the applied stresses.

At larger volume fractions ($0.115 < \Phi_v < 0.25$), a shear thinning **ST** regime is observed. At low values of the applied stresses a Newtonian viscosity plateau is observed. We interpret this plateau in terms of a meso-structure of *Chlorella* cells (flocs). As the applied stress exceeds a critical value, a strong shear thinning behaviour is observed, which corresponds to a progressive breakdown of the meso-structure. A complete destruction of the mesostructure in a range of large applied stresses results in a second viscosity plateau, η_{inf} .

The microscopic scale picture responsible for the observation of a low shear viscosity plateau is demonstrated by visualisation of the *Chlorella* suspension. Using the Voronoi triangulation technique, we have demonstrated in the absence of flow ($\tau \rightarrow 0$) the formation of flocs of small cells and the occurrence of voids around the larger ones, Fig. 3.5.

This somewhat unexpected microscopic scale organisation of individual *Chlorella* cells can be explained in terms of repulsive interactions due to their negative superficial charge which is proportional to the square of the cell's radius. The large cells carry a larger superficial charge and repel strongly the smaller ones creating voids around them. Consequently, the smaller cells are organised in flocs.

A similar observation is made in the presence of shear for stress values corresponding to the low shear viscosity plateau $\tau < \tau_0$, Fig. 3.6.

For the highest volume fractions investigated ($\Phi_v > 0.25$) a apparent yield stress regime **YS** characterised by a divergence of the viscosity at low stresses is observed. The emergence of an apparent yield stress behaviour is interpreted in terms of the formation of large scale cell aggregates which, in the limit of small applied stresses, behave as rigid plugs leading to a viscosity divergence, Fig. 3.7. The time series of velocity field acquired within this range of volume fractions and applied stresses indicates that these plug-like zones persist over significant times.

The volume fraction dependence of the viscosity measured at a fixed applied stress (within the fluid deformation regime) follows the Quemada correlation within the **ST** regime and the Simha correlation within the **YS** regime, Fig. 3.8. As both above mentioned theoretical models refer to suspensions of non-interacting particles and bearing in mind that the repulsive interactions among individual *Chlorella* is not negligible the rather unexpected agreement of our relative viscosity data with their prediction is certainly worth being further investigated by both macro and micro rheology approaches.

The dependencies of the onset of the shear thinning behavior τ_0 and the apparent yield stress τ_y presented in Fig. 3.9 are consistent with the previous results obtained for suspensions of hard spheres, (Kruif et al., 1985, Tropea et al., 2007).

This indicates that, quite surprisingly and in spite of the relative poly-dispersity and the inter-cell repulsive interactions, the rheological behaviour of microalgal suspensions of *Chlorella* can be approached (at least formally) within the framework of non-Brownian suspensions of rigid and non-interacting particles.

Within the semi-concentrated **ST** and the highly concentrated **YS** volume fraction regimes

the deformation regimes are not reversible upon increasing/decreasing the applied stresses (except in a range of large applied stresses where the *Chlorella* suspension is fully de-structured), Figs. 3.10, 3.11. This rather unexpected (and, to our best knowledge, insufficiently documented by previous studies) thixotropic like behaviour suggests that before realistic numerical simulations of the hydrodynamic behaviour in photobioreactors could be carried on, new rheological models need to be developed. For such models to be successfully developed a better understanding of the mesoscopic scale interactions and organisation of *Chlorella* cells under shear is needed.

Simultaneously with the thixotropic-like behaviour observed within the **ST** and **YS** regimes a time dependence of the viscosity measured at a fixed applied stress is observed, Figs. 3.12, 3.13. This finding as well calls for future investigations from both a theoretical and a experimental perspective.

To conclude, our experimental study has presented a detailed account of the dependence of the rheological behaviour of a *Chlorella* suspensions on the Péclet number Pe (controlled by the rate of shear $\dot{\gamma}$), the Deborah number De (controlled by the characteristic forcing time t_0) and the volume fraction Φ_v .

The reach phenomenology observed by varying the volume fraction in a broad range should certainly call for future studies targeting both a new theoretical framework and the microscopic origins of the experimentally observed features. Based on such studies, the ultimate goal would be to develop suitable numerical codes able to predict the productivity of photobioreactors in relation to both various illumination conditions (fluxes, spectral content, incidence angles) and flow conditions.

3.2.7 Acknowledgements

This work was supported by the PERLE 2 (Pôle Émergent pour la Recherche Ligérienne en Énergie) program generously funded by the *Pays de la Loire* district.

We gratefully acknowledge the technical support of Dr. Philippe Sierro and Mr. Etienne Roussel from Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany for the calibration of the nano-torque module installed on the Mars III rheometer and for the optimisation of the Rheoscope module.

T. B. gratefully acknowledges enlightening discussions with Miguel Moyers-Gonzalez.

A. S., J. P. and J. L. are grateful to M. Frappart for providing a large quantity of algae suspensions and to D. Grizeau for his precious insights on the algae structure.

Last but not least, we are particularly indebted to the anonymous referees for their enlightening comments, remarks and suggestions.

3.3 Écoulement microscopique de suspensions de *Chlorella vulgaris*

3.3.1 Introduction

Après avoir constaté de la forte dépendance de la viscosité de suspensions de *C. vulgaris* avec la fraction volumique et les conditions d'écoulement (traduit ici par les nombres de Péclet (Pe) et Déborah (De)), l'étape suivante a été d'étudier le comportement des mêmes suspensions dans des conditions d'écoulement plus proches de ce qui peut être rencontré en PBR intensifié (milieu confiné).

Partant d'une étude très intéressante menée par Degré *et al.* sur la rhéologie de fluides complexes par PIV (Particle Image Velocimetry) en micro-canaux (Degré *et al.*, 2006), il est ainsi possible d'utiliser un micro-canal comme un rhéomètre. Dans ce cas, l'évolution de la vitesse moyenne de l'écoulement avec la pression différentielle, appliquée entre l'entrée et la sortie du microcanal, est liée à l'évolution de la viscosité du fluide. La technique développée par ces auteurs permet par ailleurs de mettre en évidence le caractère non newtonien du fluide s'écoulant. Pour un fluide newtonien, l'évolution de la viscosité avec la pression appliquée est linéaire, ce qui n'est plus le cas lorsque la rhéologie du fluide change.

L'objectif principal de ce travail est donc d'étudier l'impact de la rhéologie sur l'hydrodynamique locale d'une suspension de microalgues mise en circulation dans ce micro-canal. Cette partie présentera, après la description du banc expérimental, les principaux résultats obtenus. Ces résultats seront discutés ainsi que leurs impacts potentiels sur le développement futur de nouvelles technologies de PBR.

3.3.2 Matériels et méthodes

Comme schématisées sur la figure 3.14, les expérimentations ont été menées dans un micro-canal en verre borosilicate (Micronit, Hollande), de section rectangulaire. La profondeur du canal est de $50\mu m$, la largeur de $150\mu m$ et sa longueur de $5cm$.

Le micro-canal est placé sous un microscope droit (AxioscopeA1, Zeiss, Allemagne), comme schématisé sur la figure 3.14(a). Le microscope est équipé d'un objectif de grossissement par vingt (Zeiss EC Plan Neofluar) d'une profondeur de champ de $5,8\mu m$.

L'écoulement est éclairé par des LED blanches (L) émettant à travers un panneau diffusant (LD). La suspension estensemencée avec $250ppm$ de micro-sphères fluorescentes (fluoresbrite multi fluorescent, Polisciencences Inc. U. S. A.). La fluorescence émise par les micro-sphères est collectée à travers un filtre epi-fluorescent, séparant ainsi le signal émis par les LED de la fluorescence des micro-sphères. Le signal collecté est dirigé vers la caméra couleur (CCD) 12 bits et d'une résolution de 1,4 Mpixel (Axio Cam MRc, third version).

L'entrée et la sortie de l'échantillon sont reliées à des récipients en plastique rigide, fixés sur des rails verticaux. Le débit est contrôlé via la différence de pression hydrostatique résultant de la différence de hauteur entre les récipients d'entrée et de sortie.

Afin de relier les propriétés microscopiques de l'écoulement aux travaux menés sur la déter-

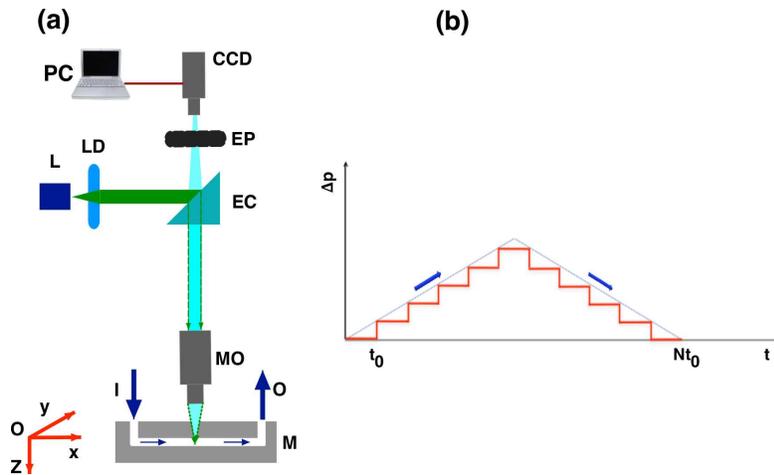


FIGURE 3.14 – (a) Représentation schématique du banc expérimental : **M** - micro-canal, **I** - entrée du micro-canal, **O** - sortie du micro-canal, **MO** - objectif du microscope, **EP** - lentille, **EC** - filtre épi-fluorescent, **L** - Panneau de diode électroluminescente (LED), **CCD** - caméra digitale, **PC** - ordinateur (b) Représentation schématique des rampes de pressions hydrostatiques. t_0 est le temps caractéristique de forçage (le temps moyen par palier de contrainte) et N est le nombre total de paliers.

mination des propriétés rhéologiques de suspensions de *C. vulgaris*, des rampes montantes et descendantes de pression différentielle contrôlées ont été appliquées, comme schématisé sur la figure 3.14(b).

La différence de pression entre l'entrée et la sortie de l'écoulement a été maintenue constante pendant chaque mesure sur les rampes allant de $t_0 = 6$ s jusqu'au temps dénommé ici comme le temps caractéristique de forçage. La différence de pression a été fixée pour chaque palier par ajout d'une quantité (et donc d'une hauteur) contrôlée de suspension soit dans le récipient d'alimentation (pour augmenter la pression différentielle), soit dans celui de sortie (pour diminuer la pression différentielle). Étant donné le rapport de diamètre entre celui du récipient et celui du canal, il est possible d'approximer que la précision de la pression différentielle appliquée est uniquement fonction de la précision du volume de suspension ajouté, ici inférieur à 1%.

Pour chaque valeur de pression différentielle appliquée, une séquence de cent images de l'écoulement a été acquise. Avant l'analyse d'image, la non-uniformité de la distribution de luminosité a été corrigée pour chaque image et leur contraste a été augmenté numériquement. Cela permet alors une meilleure visualisation des particules et améliore donc la détection par les codes numériques de suivi de particules.

L'acquisition des séquences d'images de l'écoulement et leur traitement via un algorithme standard de digital "multi-pass" de suivi de particule (DPIV) (voir Scarano et Rhiethmuller ou Raffel *et al.* pour une description complète de la méthode (Scarano and Rhiethmuller, 2001, Raffel *et al.*, 2007)) ont permis une mesure *in-situ* des distributions de vitesses. Ces dernières ont été utilisées pour caractériser les champs d'écoulement, évaluer le phénomène de glissement à la paroi et, indirectement, étudier la formation de micro-structures de cellules de *C. vulgaris* tel

qu'étudié dans la partie précédente (Souliès et al., 2013).

3.3.3 Résultats

L'étude rhéologique ayant permis d'identifier trois zones de comportements rhéologiques distincts, trois concentrations différentes (une par zone) ont été étudiées.

A faible concentration (cf. figure 3.15a, $\Phi_V = 0,02 - C_x = 5,04g.l^{-1}$), les profils obtenus pour trois pressions différentielles différentes sont cohérents avec un profil type Poiseuille, caractéristique d'un écoulement de fluide newtonien (**N**). Les profils de vitesses obtenus étant établis en écoulement laminaire dans un canal de section rectangulaire pour un fluide newtonien, ils peuvent être modélisés par la solution analytique obtenue pour des faibles nombres de Reynolds et pour un fluide newtonien sans glissement à la paroi, tel que le présente l'équation 3.8 (Cuming, 1955).

$$U(y, z = H/2) = -\frac{4H^2\Delta p}{\pi^3\eta L} \sum_{n, \text{odd}}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left[1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi y}{H}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi W}{H}\right)} \right] \quad (3.8)$$

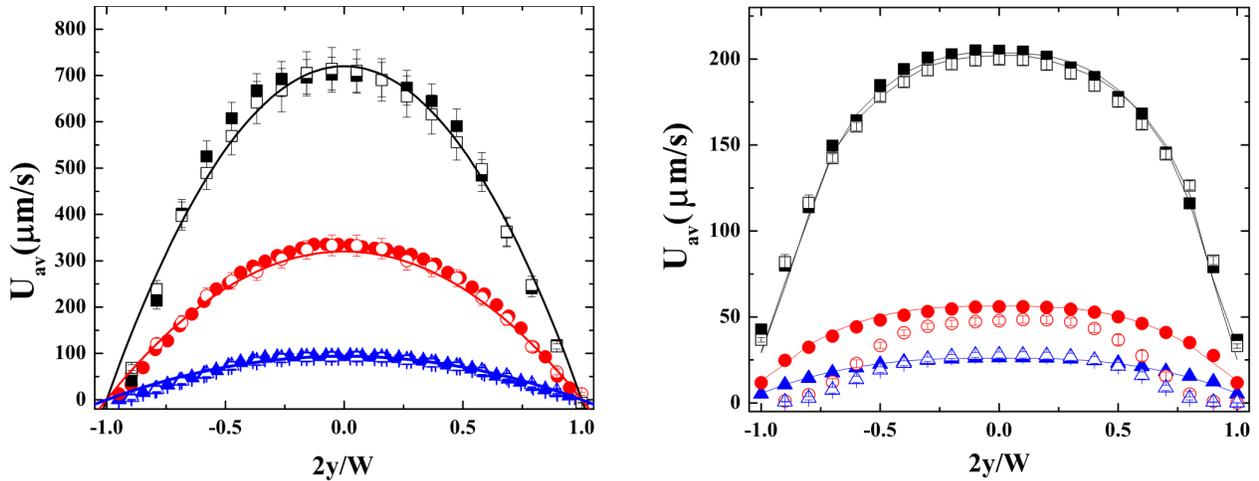
Dans l'équation 3.8, U représente la vitesse, H la hauteur du canal, Δp la pression différentielle entre l'entrée et la sortie du canal, η la viscosité du fluide et W la profondeur du canal. De plus, aucun glissement à la paroi n'est observable et l'écoulement est parfaitement réversible. A cette concentration, les cellules n'ont pas d'effet mesurable sur l'écoulement, puisque la suspension peut être assimilée à un fluide newtonien, avec une viscosité apparente proche de celle de l'eau. En augmentant la concentration à $\Phi_V = 0,12 - C_x = 30,2g.l^{-1}$ (cf. figure 3.15b), les profils de vitesses s'aplatissent au centre de la conduite. A cette concentration, les mesures rhéologiques ont montré que la suspension a un comportement rhéo-fluidifiant (*Shear Thinning*, **ST**). C'est également dans cette zone que la thixotropie est apparue, lors des mesures rhéologiques. Cela se traduit dans le cas présent par une irréversibilité de l'écoulement. Un glissement à la paroi est également observé.

A ces concentrations, l'équation 3.8 n'est plus valable puisque la suspension ne montre plus un comportement newtonien. Les profils de vitesses sont alors modélisés par la loi semi-empirique d'Ostwald de Waele (Schechter, 1961). Valable pour les fluides non newtoniens ne présentant pas de contrainte seuil, cette loi permet de représenter l'aplatissement du profil en prenant en compte un indice n de rhéo-fluidification (Schechter, 1961) et la vitesse moyenne de l'écoulement (U_0). De façon à modéliser le glissement à la paroi de notre suspension, le choix a été fait d'ajouter une vitesse non nulle à la paroi, U_s , correspondante au glissement à la paroi. Ce terme n'apparaît pas dans l'équation d'origine.

$$U(y, z = H/2) = U_s + U_0 \left[1 - \left| \frac{2y}{W} \right|^{\frac{n+1}{n}} \right] \quad (3.9)$$

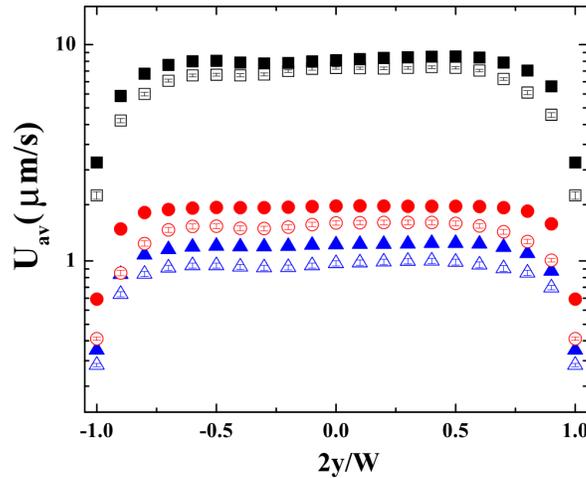
A très haute concentration cellulaire (donc à très haute fraction volumique, $\Phi_V > 30\% - C_x > 76g.l^{-1}$), les mesures rhéologiques ont montré un comportement fortement non newtonien, avec

apparition d'une contrainte à seuil. Il est à noter que, pour ce comportement rhéologique, il existe une solution analytique obtenue par Midoux (Midoux, 1985) pour un écoulement établi entre deux plans parallèles. Cependant cette solution ne prend pas en compte le glissement à la paroi. Comme le montre la figure 3.15c, pour une concentration mesurée à $\Phi_V = 0,57 - C_x = 144g.l^{-1}$, la forme du profil de vitesse obtenu se rapproche fortement de celui d'un type bouchon. Dans cette zone de concentration, le glissement en paroi ainsi que l'irréversibilité de l'écoulement deviennent clairement non négligeables.



(a) Profil de vitesse mesurée pour $\Phi_V = 0,02$ et $\Delta P = 3,8 Pa$ ($\blacktriangle, \triangle$), $25 Pa$ (\bullet, \circ) et $50 Pa$ (\blacksquare, \square)

(b) Profil de vitesse mesurée pour $\Phi_V = 0,12$ et $\Delta P = 10 Pa$ ($\blacktriangle, \triangle$), $16,7 Pa$ (\bullet, \circ) et $46,7 Pa$ (\blacksquare, \square)



(c) Profil de vitesse mesurée pour $\Phi_V = 0,57$ et $\Delta P = 25 Pa$ ($\blacktriangle, \triangle$), $41,7 Pa$ (\bullet, \circ) et $116,8 Pa$ (\blacksquare, \square)

FIGURE 3.15 – Évolution des profils de vitesses avec la fraction volumique pour des rampes montantes (symboles pleins) et descendantes (symboles vides)

L'ensemble des résultats obtenus par mesure des profils de vitesses à différentes concentrations confirme les résultats présentés dans l'étude rhéologique (Souliès et al., 2013). Les trois

zones de comportement rhéologique (newtonien (**N**), rhéo-fluidifiant (**ST**) et visco-plastique (**YS**)) sont en effet en accord avec la forme du profil de vitesse observé.

Les différents comportements rhéologiques peuvent être plus facilement identifiés sur la figure 3.16, où les moyennes des vitesses mesurées sont tracées en fonction de la différence de pression.

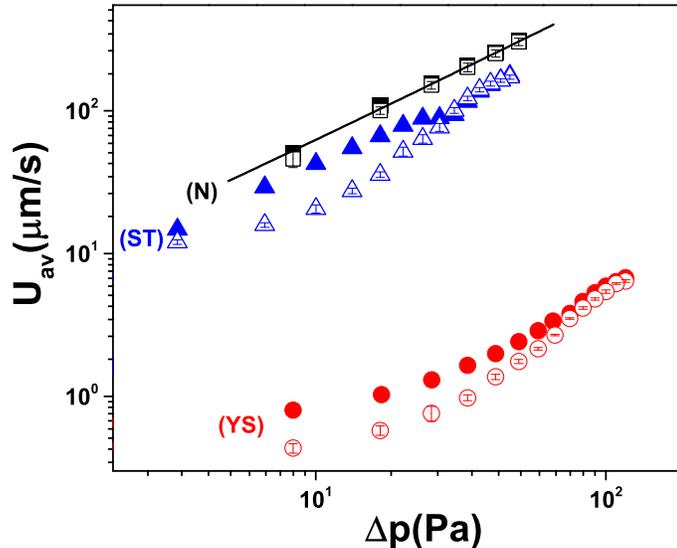


FIGURE 3.16 – Evolution de la vitesse moyenne pour $\Phi_V = 0,02$ (■, □), $\Phi_V = 0,12$ (▲, △) et $\Phi_V = 0,57$ (●, ○) pour des rampes montantes (symboles pleins) et descendantes (symboles vides)

Dans ce cas, le comportement newtonien est retrouvé, traduit comme sur la figure 3.16, par une linéarité et une réversibilité de la vitesse d'écoulement avec la pression différentielle. Avec l'augmentation de la fraction volumique, la moyenne des vitesses mesurées chute, du fait de l'augmentation de la viscosité apparente de la suspension. D'autre part, l'écoulement est de plus en plus irréversible lorsque la rhéologie passe du régime newtonien au régime visco-plastique.

Pareillement à l'étude rhéologique, et plus particulièrement sur la présence d'agrégats, une visualisation instantanée de l'écoulement d'une suspension de *C. vulgaris* à $\Phi_V = 0,57$ est présentée sur la figure 3.17a) où on observe qu'un agrégat cellulaire bouche quasiment entièrement le canal.

La figure 3.17b) représente le champ de vitesse calculé à partir de l'image de gauche. Il a été coloré artificiellement (bleu foncé = vitesse nulle) de façon à mettre en évidence l'hétérogénéité du champ de vitesse au sein du canal à cette concentration. Ainsi, le bouchon observé est clairement identifiable puisqu'il correspond à la zone où la vitesse est nulle.

La création des structures de type agrégats pose une vraie problématique hydrodynamique en augmentant la résistance à l'écoulement, comme le présente la figure 3.18. En effet, en regardant l'évolution de la résistance à l'écoulement (*i.e.* le rapport entre la pression différentielle et la vitesse moyenne d'écoulement de la suspension, celle-ci étant définie par analogie électrohydrodynamique comme traduisant l'énergie nécessaire à la mise en écoulement de la suspension) avec la fraction volumique (cf. figure 3.18), les mêmes conclusions apparaissent : la résistance

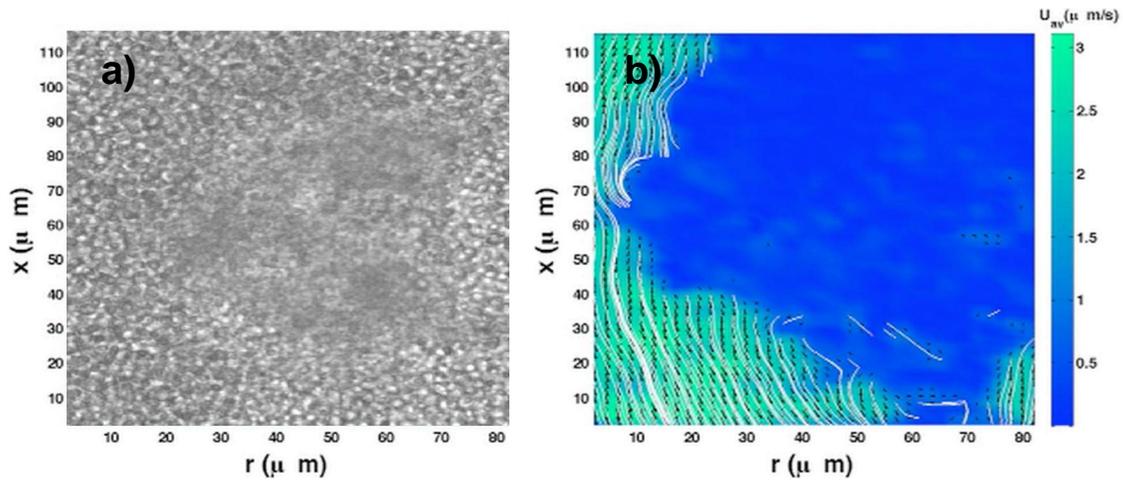


FIGURE 3.17 – Visualisation d'un agrégat de cellules en écoulement à forte densité cellulaire ($\Phi_V = 0,57$ – $C_x = 144g.l^{-1}$)

à l'écoulement augmente fortement avec la fraction volumique, due à l'augmentation de la viscosité de la suspension. De plus, la résistance à l'écoulement est systématiquement plus importante lors des rampes descendantes de pressions différentielles. Cela est toujours en accord avec les constatations faites lors de l'étude rhéologique où l'interprétation des résultats a mené à soupçonner plusieurs états d'agrégation, allant d'une suspension totalement agrégée à une suspension de cellules individuelles. Les irréversibilités constatées sur les figures 3.16 et 3.18 sont alors probablement dus à la formation / déformation des agrégats cellulaires.

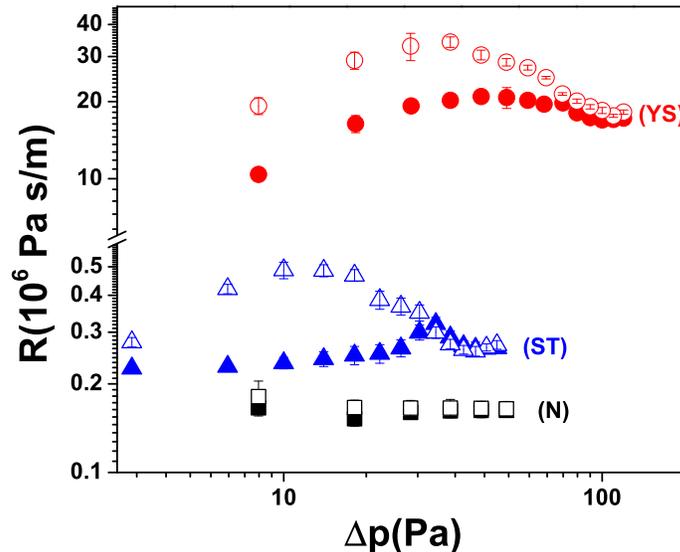


FIGURE 3.18 – Evolution de la résistance à l'écoulement pour $\Phi_V = 0,02$ (■, □), $\Phi_V = 0,12$ (▲, △) et $\Phi_V = 0,57$ (●, ○) pour des rampes montantes (symboles pleins) et descendantes (symboles vides)

Pour les suspensions correspondantes aux régimes rhéo-fluidifiant et visco-plastique, il est possible de repérer une valeur limite de Δp à partir de laquelle l'hydrodynamique limite l'agrég-

gation cellulaire. Cette valeur est de $\Delta p = 20Pa$ pour $\Phi_V = 0,12$ et de $\Delta p = 40Pa$ pour $\Phi_V = 0,57$. Ces valeurs sont les valeurs critiques au delà desquelles les forces hydrodynamiques deviennent prépondérantes sur les forces d'interactions au sein de la suspension. En augmentant la pression différentielle (et donc la contrainte) à 2,5 fois les valeurs critiques, les forces d'interactions deviennent négligeables par rapport aux forces hydrodynamiques (et donc du cisaillement). La conception des PBR intensifiés doit alors tenir compte de ces valeurs afin de maintenir la suspension dans un état homogène, *i.e.* uniquement composée de cellules individuelles.

3.3.4 Conclusion et discussion sur l'écoulement microscopique de *C. vulgaris* et ses conséquences sur un procédé de culture intensifié

Cette partie a permis d'étudier l'écoulement d'une suspension de *C. vulgaris* dans des conditions proches de celles rencontrées en PBR intensifié, à savoir une haute densité cellulaire et un milieu confiné.

L'étude de l'écoulement d'une suspension de *C. vulgaris* à trois concentrations (correspondantes aux trois zones de comportements rhéologiques présentées dans l'étude rhéologique) a permis, dans un premier temps, de retrouver les mêmes comportements que ceux constatés lors de l'étude rhéologique.

La mesure des champs de vitesses au sein de l'écoulement a été réalisée par la méthode DPIV et a permis de suivre l'évolution de la vitesse moyenne de l'écoulement avec la concentration et la pression différentielle entre l'entrée et la sortie du canal. La méthode DPIV a également donné accès à la visualisation des agrégats cellulaires dans le canal, agrégats pouvant parfois atteindre la taille de la section du canal. La formation de ces agrégats semble due aux interactions électro-statiques favorisées par la forte proximité des cellules dans le cas des fractions volumiques élevées. Comme cela a été montré par Ahmad *et al.*, la mobilité électrophorétique des cellules de *Chlorella sp.* (proportionnelle à la charge ionique) est ainsi d'environ $-2,5\mu m.cm/Vs$ à un pH de 7,5 (Ahmad et al., 2012). En complément, dans le cas de cultures intensifiées, le risque d'agrégation des cellules pourrait également être favorisé par la présence d'un précipité de phosphate de calcium (globalement chargé positivement) (Uduman et al., 2010), dû aux concentrations importantes en éléments nutritifs. L'ensemble de ces observations tend à montrer le rôle (et le risque) majeur de formations d'agrégats dans les conditions de culture intensifiées.

Pour éviter cela, il est possible de jouer sur l'écoulement. L'importance d'une mise en écoulement suffisante pour la destruction des agrégats a ainsi été mise en avant par une étude de la résistance à l'écoulement. En effet, il est apparu une valeur limite de la pression différentielle entre l'entrée et la sortie du canal au delà de laquelle la résistance est linéaire avec Δp . Au dessus de 2,5 fois ces valeurs ($\Delta p = 20Pa$ pour $\Phi_V = 0,12$ et $\Delta p = 80Pa$ pour $\Phi_V = 0,57$), les forces liées à l'écoulement (et donc au cisaillement), sont très largement supérieures à celles dues aux interactions électro-statiques au sein de la suspension. Cela conduit donc à garantir une suspension homogène de cellules individuelles (pas d'agrégats) et ainsi d'éviter d'éventuels impacts sur la productivité du système.

Dans cette étude, le nombre de Reynolds maximal mesuré est faible (< 1). Cela peut paraître en inadéquation avec ceux rencontrés en PBR ($500 > Re > 3000$, selon que la technologie employées). Néanmoins, l'importance de la maîtrise de l'hydrodynamique en PBR intensifié peut toutefois être discutée au regard des renseignements obtenus dans cette étude. Du fait de la géométrie d'un PBR, la contrainte de cisaillement est grandement variable dans l'espace, créant ainsi de grandes hétérogénéités au sein de la culture. Les zones où le cisaillement est faible sont alors favorables à la création d'agrégats cellulaires qui perturberont la mise en écoulement et l'efficacité des transferts. D'autre part, l'augmentation de la surface spécifique due à l'intensification du procédé va entraîner une baisse du nombre de Reynolds ($1000 < Re$, puisque le diamètre hydraulique diminue et la viscosité augmente du fait de l'augmentation en concentration). Il est donc au final probable qu'en pratique des zones soient rencontrées où les conditions seront favorables à la formation d'agrégats.

Une solution consiste à augmenter le niveau de contrainte dans l'écoulement. Cela aura pour conséquence cependant d'augmenter l'énergie de mise en circulation, sachant également que, comme l'ont montré Scarsella *et al.* (Scarsella et al., 2012), suite à l'utilisation d'équipement pour la culture à grande échelle de microalgues (pompes notamment), il existe une contrainte limite à partir de laquelle les cellules de *C. vulgaris* sont endommagées (Scarsella et al., 2012). La conception de nouvelles technologies doit donc impliquer une hydrodynamique la plus efficace possible de façon à limiter le plus possible la formation d'agrégats (néfastes au rendement global du procédé) sans induire une lyse cellulaire.

Pour *C. vulgaris*, la valeur limite de cisaillement, au delà de laquelle il y a lyse cellulaire, n'est pas identifiée. Néanmoins, cette valeur est suffisamment élevée pour appliquer des vitesses d'écoulements importantes au sein d'une culture. Ceci n'est pas valable pour toutes les espèces. Aussi, pour la culture de microorganismes fragiles, des solutions technologiques seront à trouver. Une solution pourrait être d'utiliser un réacteur basé sur le principe de l'advection chaotique comme alternative pour certains types de cultures. On parle d'advection chaotique si, dans un système déterministe, pour des conditions initiales très proches, les trajectoires de deux particules divergent. Le régime d'écoulement chaotique peut être obtenu dans un écoulement en 2D dépendant du temps, ou 3D stationnaire, tout en restant à chaque fois en écoulement laminaire. Ce type de procédé est souvent rencontré dans le domaine du transfert de chaleur : l'advection chaotique permet alors d'augmenter les performances de transfert de chaleur (Mokrani et al., 1997). Concrètement, cela implique de travailler en régime laminaire (système déterministe, $Re < 1000$) et, dans le cas des systèmes tridimensionnels, de jouer sur la géométrie pour permettre de générer le chaos spatial, au sein de l'écoulement (Mokrani et al., 1997). Dans ce cas, le mélange obtenu en régime laminaire est comparable à celui qui pourrait être obtenu en régime turbulent. Par rapport au régime turbulent, en régime d'advection chaotique les particules (cellules microalgales dans notre cas) sont alors soumises à un cisaillement moindre, pouvant permettre d'assurer l'intégrité cellulaire. De plus, étant donné que la nature de l'écoulement permet une modélisation de l'hydrodynamique relativement simple (écoulement monophasique) cela permet d'avoir

accès à la position des cellules au cours du temps, facilement reliable au modèle de transfert radiatif. Cela peut permettre alors de contrôler (ou d'étudier) les effets induits par les régimes fluctuants de lumière (light/dark cycles) sur la productivité d'une culture (Takache et al., 2010).

3.4 Conclusion

Ce chapitre était dédié à l'étude rhéologique puis hydrodynamique d'une suspension de *C. vulgaris*. Dans un premier temps, l'étude rhéologique a montré la nature complexe d'une suspension concentrée de microalgues. Il a aussi été identifié un comportement fortement non newtonien pour les suspensions concentrées de *C. vulgaris*, supérieure à $\Phi_V = 0,10$ soit $C_x = 30g.l^{-1}$. Entre $\Phi_V = 0,10$ et $\Phi_V = 0,30$ la suspension présente un comportement rhéo-fluidifiant, puis, entre $\Phi_V = 0,30$ et $\Phi_V = \Phi_{V_{max}}$ (représentant la fraction maximale d'empilement, soit 74% dans le cas de sphères rangées), le comportement rhéologique de la suspension est assimilable à un comportement visco-plastique. A ces comportements sont liées des contraintes critiques à partir desquelles la suspension s'écoule et converge vers un comportement réversible.

Le tracé de ces contraintes critiques avec la fraction volumique présente une non monotonie de la courbe. Cette non monotonie a été mise en corrélation avec les conclusions de Kruif *et al.* (Kruif et al., 1985) qui a obtenu un comportement très similaire pour une suspension de particules rigides de PMMA. Cela a conduit à assimiler la suspension de cellules de *C. vulgaris* à une suspension de particules rigides.

Grâce à un montage permettant de faire des mesures simultanées en micro PIV et rhéoscopie, l'étude a montré que la suspension était fortement hétérogène dans l'espace, avec présence d'agrégats cellulaires lors de l'écoulement. Cette caractéristique a également été relevée en observation statique. Cela a conduit, par l'utilisation de la méthode de géométrie computationnelle de Voronoï, à mettre en évidence la constitution de ces agrégats : du fait de la charge de surface des cellules, les grosses cellules (étant plus chargées) repoussent les plus petites. Ces petites cellules sont alors à une telle proximité que les forces d'attraction prennent le pas.

L'irréversibilité de l'évolution de la viscosité suivant le sens d'application de la contrainte, a pu être expliquée par la formation / déformation de ces agrégats. A faibles contraintes, le même comportement que lors des observations statiques est constaté. Ensuite, les agrégats se décomposent en agrégats de plus petites tailles pour aller vers une suspension de cellules individuelles. Ce travail a également mis en évidence l'impact du temps de forçage sur la stationnarité de l'écoulement (impact du nombre de Deborah). En effet, pour le régime rhéofluidifiant, un temps d'exposition critique de la suspension à une contrainte donnée a pu être montré. Au delà de ce temps, la viscosité de la suspension est égale à celle qu'aurait la suspension si elle était exposée pendant un temps infini à une contrainte, montrant ici le rôle de la destruction progressive des agrégats formés lorsque la contrainte est appliquée pendant suffisamment longtemps.

L'ensemble de ces résultats est en accord avec l'équation proposée par Krieger et Dougherty (Krieger and Dougherty, 1959). Dans cette équation, ces auteurs proposent une triple dépen-

dance de la viscosité relative d'une suspension de particules sphériques rigides avec :

- la fraction volumique,
- le nombre de Péclet (traduisant la compétition entre le phénomène d'advection et de diffusion),
- le nombre de Déborah (traduisant l'impact sur la réponse de la stationnarité du forçage).

L'étude rhéologique a été complétée par une étude de l'écoulement en micro-canal de suspensions de *C. vulgaris* à trois concentrations, correspondant aux trois régimes rhéologiques identifiés. L'objectif était ici de représenter des conditions hydrodynamiques plus proches de ce qui pourrait être rencontré en PBR intensifié, *i.e.* un écoulement confiné combiné à une haute densité cellulaire de la suspension.

La mesure des profils de vitesses pour les trois concentrations choisies ($\Phi_V = 0,02$, $\Phi_V = 0,12$ et $\Phi_V = 0,57$) a montré clairement un effet de la présence des cellules. A faible concentration, un profil de type Poiseuille a été constaté, typique d'un écoulement d'un fluide newtonien. Par la suite, un aplatissement progressif du profil de vitesse est remarqué. Enfin, à très haute concentration, le profil de vitesse mesuré est caractéristique d'un écoulement type bouchon d'un fluide visco-plastique. Avec l'augmentation de la concentration cellulaire, une forte irréversibilité de l'écoulement est apparue.

Ces expérimentations ont également permis l'observation de la suspension en écoulement. La formation d'agrégats cellulaires a pu alors être observée et confirmée par le calcul du champ de vitesse : une vitesse nulle étant obtenue à l'endroit où l'agrégat est observé.

Il a été observé que la formation de ces agrégats se fait à faible pression différentielle (faible contrainte) mais augmente la résistance à l'écoulement d'un facteur deux. Cependant, en étudiant l'évolution de la résistance à l'écoulement de la suspension avec la pression différentielle, une valeur critique a pu être déterminée. Cette valeur est la valeur au-delà de laquelle les forces d'interactions entre cellules deviennent minoritaires devant l'écoulement, permettant un passage des agrégats.

L'ensemble de ces travaux démontre l'importance de la maîtrise de l'hydrodynamique au sein d'un PBR intensifié, et en particulier du niveau de contrainte au sein de la suspension. Un trop faible taux de cisaillement (correspondant à une vitesse d'écoulement trop faible) permettra, à haute densité cellulaire, la formation d'agrégats qui diminueront l'efficacité des transferts (lumière notamment) et perturberont la mise en écoulement. *A contrario*, un trop fort cisaillement pourra conduire à la destruction cellulaire. La conception de PBR intensifié, conduisant obligatoirement à diminuer les épaisseurs de cultures pour travailler avec des épaisseurs de quelques millimètres (voire moins), devra donc tenir compte, pour garantir une hydrodynamique et un mélange optimisé, du comportement rhéologique observé dans ce chapitre. Celui-ci s'est révélé au final complexe, allant bien au-delà d'une simple augmentation de viscosité comme cela avait été supposé jusque là (Le Borgne, 2011).

Chapitre 4

Étude et modélisation d'un photobioréacteur à haute productivité volumique sous conditions spécifiques d'éclairement

Sommaire

4.1	Introduction	124
4.2	Propriétés radiatives	125
4.2.1	Introduction	125
4.2.2	Détermination de l'indice de réfraction complexe de <i>C. vulgaris</i>	125
4.2.3	Détermination des propriétés radiatives	128
4.2.4	Résultats	136
4.2.5	Conclusion sur la détermination des PR	138
4.3	Modélisation cinétique de la croissance de <i>C. vulgaris</i>	140
4.3.1	Obtentions des points expérimentaux de croissance	140
4.3.2	Calage du modèle cinétique	144
4.3.3	Conclusion sur la modélisation cinétique de la croissance de <i>C. vulgaris</i> en PBR	147
4.4	Application à un photobioréacteur à haute productivité volumique sous conditions spécifiques d'éclairement	149
4.4.1	Introduction de la problématique du transfert radiatif en conditions solaires	149
4.4.2	Montage expérimental	151
4.4.3	Pré-analyse théorique de l'impact de conditions spécifiques d'éclairement	152
4.4.4	Transmission de la lumière en maquette froide	155
4.4.5	Analyse expérimentale des résultats	157
4.5	Conclusion	160

4.1 Introduction

Dans le premier chapitre, il a été montré l'importance de la lumière pour la culture de microorganismes photosynthétiques. Bien qu'il soit aisé de caractériser la source de lumière (notamment d'un point de vue spectre et intensité), la caractérisation de l'impact sur la culture l'est beaucoup moins. Cela passe dans un premier temps par une bonne prise en compte du transfert radiatif dans le volume de culture, lui-même dépendant des propriétés radiatives des cellules. Or, ces propriétés sont très sensibles à plusieurs paramètres tels que la concentration et la composition du contenu pigmentaire de la cellule, ainsi qu'à leur taille et leur forme. De nombreux travaux ont été menés sur les méthodes de détermination des propriétés radiatives des microalgues, notamment par Cornet et Dauchet (Cornet, 2007, Dauchet, 2012). Ces travaux vont être repris ici et appliqués à la détermination des propriétés radiatives de *C. vulgaris*. Les résultats théoriques seront ensuite comparés à des mesures expérimentales de transmissions, permettant ainsi de valider les résultats obtenus.

Afin de pouvoir prédire les performances en termes de production d'une culture de microalgue, il est nécessaire en seconde étape de lier le transfert radiatif à un modèle cinétique de croissance. Un modèle de connaissance a été déjà développé par Takache (Takache, 2010) pour la microalgue *C. reinhardtii*. Ce modèle sera étendu ici à *Chlorella vulgaris*. A partir de résultats expérimentaux établis en PBR torique, les paramètres liés notamment à la respiration et à la sensibilité de la microalgue à la lumière seront calés. Le modèle servira ensuite d'appui théorique pour étudier en détails l'effet de conditions particulières d'éclairage sur la productivité volumique de la culture, cela constituant la dernière partie de ce mémoire.

Les conditions spécifiques d'éclairage qui seront étudiées ont été choisies pour représenter des aspects particuliers rencontrés lors de l'éclairage sous flux solaire. Comme il sera présenté dans la partie 4.4.1, en fonction du moment d'une journée, le spectre lumineux reçu par la Terre n'est ainsi pas constant. Le matin et le soir, du fait du fort angle entre la surface de la Terre et le rayonnement solaire, la quantité de photons émis dans les faibles longueurs d'onde du PAR est plus faible, alors que celle des photons émis dans le rouge (haute longueur d'onde du PAR) est plus importante. D'autre part, du fait de la rotation de la Terre autour du Soleil, l'angle d'incidence du rayonnement lumineux n'est que très rarement normal à la surface du PBR collectrice du flux.

Pour cela, des cultures de *C. vulgaris* ont été réalisées en PBR pour deux angles d'incidence et deux spectres d'émissions différents. Les résultats obtenus en terme de transmission et de productivité ont ensuite été confrontés aux prédictions des modèles théoriques, afin d'appréhender si les modèles existants sont aptes à bien représenter les effets induits par ces conditions non classiques d'éclairage, et étudier en détail la conséquence de ces conditions particulières d'éclairage sur la culture en PBR.

4.2 Propriétés radiatives

4.2.1 Introduction

Comme il a déjà été vu dans la section 1.5.2, les propriétés radiatives (PR) des cellules sont des données essentielles du fait de leur impact direct sur le transfert de lumière au sein d'une culture. Les propriétés radiatives nécessaires au modèle radiatif à deux flux regroupent trois coefficients : le coefficient d'absorption (Ea), le coefficient de diffusion (Es) et le coefficient de rétro-diffusion ($\overline{b_{2\lambda}}$). Les deux premiers sont obtenus en divisant les sections efficaces correspondantes (notée σ_{sca} pour la diffusion et σ_{abs} pour l'absorption) par la masse moyenne d'une cellule (ce qui conduit à les exprimer en $m^2.kg^{-1}$) et le dernier par intégration de la fonction de phase. Les sections efficaces traduisent la probabilité d'interaction entre l'onde lumineuse et la particule.

La détermination des PR peut se faire de façon théorique (Dauchet, 2012) à partir des propriétés radiatives des cellules (indice de réfraction complexe), ainsi que l'analyse de taille et de forme (déjà déterminée précédemment cf. paragraphe 2.2.2). La méthode de détermination de l'indice de réfraction a déjà été validée sur plusieurs microorganismes dont *Chlamydomonas reinhardtii* par Pottier (Pottier, 2005). La partie imaginaire (représentant l'absorption de la lumière) est déterminée par convolution des spectres de chaque pigment présent dans la cellule. La partie réelle de l'indice de réfraction (traduisant la diffusion) est plus difficile à obtenir et nécessite un important investissement théorique. A partir de l'indice de réfraction et de l'analyse de taille et de forme, le calcul des PR sera fait en utilisant deux approches différentes, développées à l'Institut Pascal (IP) de Clermont-Ferrand, chacune établie sur une hypothèse différente :

- la solution de Lorenz-Mie, traduisant une hypothèse sur la forme des cellules (forme sphérique)
- l'approximation de diffraction anormale (ADA), renvoyant à une hypothèse sur l'électromagnétisme : la diffusion d'un photon est supposée se faire dans une direction très proche de la direction incidente.

Cette partie a pour objectif de décrire la méthodologie à suivre pour la caractérisation des aspects absorbant ($\sigma_{abs}; Ea$) et diffusant (σ_{sca} et $p_{\lambda}(\theta, \theta')$; Es et $\overline{b_{2\lambda}}$) d'une cellule. Les deux hypothèses présentées avant seront de plus confrontées aux résultats obtenus par la mesure normal-hémisphérique du spectre de transmission d'une suspension de *C. vulgaris*. L'ensemble des résultats a été obtenu dans le cadre d'une collaboration étroite avec l'IP de Clermont-Ferrand (Pr. J-F. Cornet et Dr. J. Dauchet) qui a déjà développé l'ensemble des méthodes ici employées. Pour plus de détails, voir les travaux de Dauchet (Dauchet, 2012) et de Cornet (Cornet, 2007).

4.2.2 Détermination de l'indice de réfraction complexe de *C. vulgaris*

L'indice de réfraction est à la base du transfert de rayonnement en milieu particulaire puisque c'est lui qui va définir la capacité des cellules à diffuser la lumière et/ou à l'absorber. Dans le cas des microorganismes photosynthétiques (ou plus généralement, toutes les particules absor-

bantes), cet indice est complexe : la partie réelle reflète la diffusion de la lumière par les cellules et la partie imaginaire, l'absorption du rayonnement. Il est à noter que la détermination de l'indice de réfraction repose sur l'hypothèse d'une particule homogène (même capacité d'absorption et de diffusion en tous points de la cellule), ce qui n'est pas forcément le cas pour les microalgues dont les pigments sont situés dans le chloroplaste. Cette hypothèse s'explique par le fait que seule l'absorption ou la diffusion des photons par la cellule importe, les phénomènes intracellulaires n'étant pas considérés, et que l'utilisation des PR pour calculer ensuite le transfert de rayonnement dans la culture implique de passer à l'échelle d'une population de microalgues. L'importance d'une bonne représentation au niveau individuel est alors réduite par l'effet de moyenne induit par la prise en compte d'une population.

Détermination de la partie imaginaire

La partie imaginaire de l'indice de réfraction (ou coefficient d'extinction, κ_λ) est fonction du type et de la concentration des espèces responsables de l'absorption de la lumière. Dans le cas des microalgues, il s'agit des pigments. κ_λ est relié au coefficient linéique d'absorption intracellulaire ($a_{ic,\lambda}$, différent du coefficient d'absorption de la cellule) par la relation 4.1. Cette relation fait état de la grande dépendance de κ_λ avec la longueur d'onde, cette dernière pouvant faire varier κ_λ de plusieurs ordres de grandeurs sur le PAR. Pour obtenir une bonne résolution, il sera nécessaire d'avoir une bonne résolution sur le PAR, tous les nanomètres par exemple (intervalle utilisé pour les calculs par la suite).

$$a_{ic,\lambda} = \frac{4\pi\kappa_\lambda}{\lambda_0} = \sum_{i=1}^N Ea_{pig,i}(\lambda) \cdot C_{pig,i} \quad (4.1)$$

En remplaçant la concentration en pigment i ($C_{pig,i}$, cf. équation 4.2) par sa teneur massique $w_{pig,i}$, cela conduit à l'expression de κ_λ de l'équation 4.3.

$$C_{pig,i} = w_{pig,i}\rho_D(1 - x_w) \quad (4.2)$$

$$\kappa_\lambda = \frac{\lambda_0}{4\pi}\rho_D \frac{(1 - x_w)}{x_w} \sum_{i=1}^N Ea_{pig,i}(\lambda) \cdot w_{pig,i} \quad (4.3)$$

En partant de données bibliographiques (Bidigare et al., 1990) l'équipe de Cornet de l'IP a pu constituer une base de données de principaux pigments participant à la photosynthèse (Cornet, 2007). Dans le cas de *C. vulgaris*, les pigments pris en compte sont les chlorophylles a et b, ainsi que les PPC (Photo Protective Carotenoids).

Comme le montre l'équation 4.1, la détermination de κ_λ est obtenue par convolution des spectres des pigments purs (Cornet, 2007). Cette méthode, facile d'utilisation, ne prend pas en compte d'éventuels effets d'ombrage (ou effet packaging) dus à la présence simultanée de l'ensemble des pigments dans la cellule (Mercado et al., 1996). Dans ce cas, le phénomène d'absorption

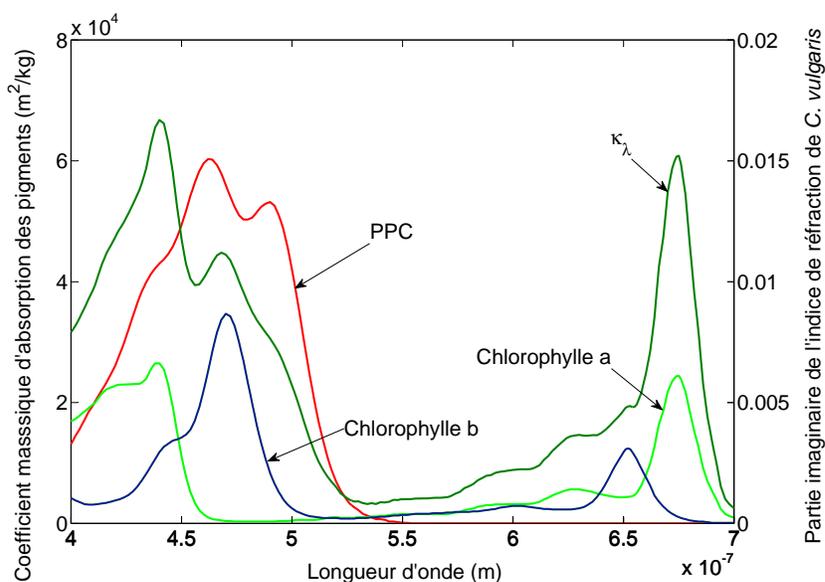


FIGURE 4.1 – Reconstitution de la partie imaginaire de l'indice de réfraction de *C. vulgaris* en photolimitation stricte à partir des coefficients d'absorption des pigments présents dans la cellule pour $q_{\square} = 200 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

peut être surestimé puisque tous les pigments ne "voient" pas la même quantité de photons. Cette surestimation reste néanmoins minime, d'autant plus sous flux incident important (où la disponibilité de l'énergie radiante est accrue) et en culture photolimitée (où les cultures, en mouvement constant, auront globalement le même accès à la lumière). D'autre part, pour affiner la reconstitution de la partie imaginaire de l'indice de réfraction, il peut être envisagé de remplacer une partie des PPC par des caroténoïdes photosynthétiques. Cela permet surtout d'améliorer les prédictions pour les faibles valeurs de longueurs d'onde du PAR (correspondant au bleu) ainsi qu'aux environs de 600nm. Cependant, il est difficile d'affirmer la présence de cette catégorie de pigment uniquement par dosage spectrophotométrique. De même que pour le dosage de l'ensemble des pigments, l'obtention de valeurs fiables et précises nécessite un lourd investissement analytique de type chromatographie liquide haute performance (HPLC). Dans ce travail, les valeurs de pigments ont été obtenues par dosage spectrophotométrique.

A partir des spectres d'absorption des pigments purs et connaissant la teneur massique en chacun des trois pigments considérés (Chlorophylle a, b et PPC, mesurée selon la méthode définie dans la section 2.2.6), la partie imaginaire de l'indice de réfraction d'une cellule de *C. vulgaris* a pu être reconstituée pour chaque condition opératoire en PBR. Un exemple de résultats est présenté sur la figure 4.1 pour une teneur massique de 0,88% en PPC, 3,27% en chlorophylle a et 0,99% en chlorophylle b. Ces teneurs ont été mesurées en condition de photolimitation stricte en PBR torique pour une densité de flux incidente de $200 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Détermination de la partie réelle

A contrario de la partie imaginaire qui, moyennant l'hypothèse d'une particule homogène, permet de rendre compte de l'absorption à partir de mesures expérimentales, la partie réelle est beaucoup plus complexe à déterminer. En effet, l'obtention de cette dernière par méthode directe nécessiterait de connaître la fraction massique en chaque constituant subcellulaire (organite) ainsi que leurs indices de réfraction propres. Si certains auteurs ont réalisé de très bonnes mesures d'indice de réfraction chez des microorganismes procaryotes (Wyatt, 1972), ce n'est pas le cas pour les organismes eucaryotes. Afin de résoudre en partie le problème, Dauchet (Dauchet, 2012) a proposé une méthode de calcul de la partie réelle de l'indice de réfraction (n_ν^{eff}) basée sur la relation de Kramers-Krönig, dont la formulation exacte est présentée dans l'équation 4.4.

$$n_\nu^{eff} = 1 + \frac{2}{\pi} \mathcal{P} \int_0^\infty \frac{\nu' \kappa_{\nu'}}{\nu'^2 - \nu^2} d\nu' \quad (4.4)$$

Dans l'équation 4.4, \mathcal{P} désigne la valeur principale de Cauchy, qui doit être considérée pour le cas particulier où $\nu' = \nu$, ν la fréquence de rayonnement (*i.e.* le rapport entre la célérité de la lumière dans le vide et la longueur d'onde) et ν' une valeur sur la plage de fréquence de rayonnement étudiée. Cependant, un des problèmes majeurs de cette méthode vient du fait que la détermination de n_ν se fait de 0 à $+\infty$ alors que κ_λ ne l'est seulement que sur le PAR. La technique utilisée par Dauchet (Dauchet, 2012) est l'approximation de Kramers-Krönig soustractive à point d'ancrage (n_{ν_p}). Elle consiste à soustraire à l'équation 4.4 cette même équation pour une valeur particulière de ν (ν_p) pour laquelle l'indice de réfraction de la cellule n_{ν_p} est connu. L'équation 4.4 devient alors l'équation 4.5.

$$n_\nu = n_{\nu_p} + \frac{2(\nu^2 - \nu_p^2)}{\pi} \mathcal{P} \int_{\nu_{min}}^{\nu_{max}} \frac{\nu' \kappa_{\nu'}}{(\nu'^2 - \nu^2)(\nu'^2 - \nu_p^2)} d\nu' \quad (4.5)$$

Dans l'équation 4.5, ν_p doit être dans une partie du spectre où il n'y a pas d'absorption ($\kappa_\lambda = 0$), et où, par le fait, l'indice de réfraction de la cellule est égale à n_{ν_p} . En introduisant cette valeur dans l'équation 4.5 le spectre de n_ν passera forcément par ce point d'ancrage.

Un exemple de reconstruction de la partie réelle est présenté à la figure 4.2 pour une valeur de point d'ancrage de 1,44 à 820nm. Cette valeur, obtenue par Dauchet, est la même que celle obtenue pour *C. reinhardtii* par Takache (Takache, 2010).

4.2.3 Détermination des propriétés radiatives

Paramètre de taille

Connaissant l'indice de réfraction complexe des cellules ainsi que la taille et la forme des cellules (cf. paragraphe 2.2.2), il reste, pour en déduire les propriétés radiatives, à définir les hypothèses applicables au cas particulier du transfert radiatif en culture microalgale, afin de diminuer les temps de calculs associés à la détermination des grandeurs qui nous intéressent :

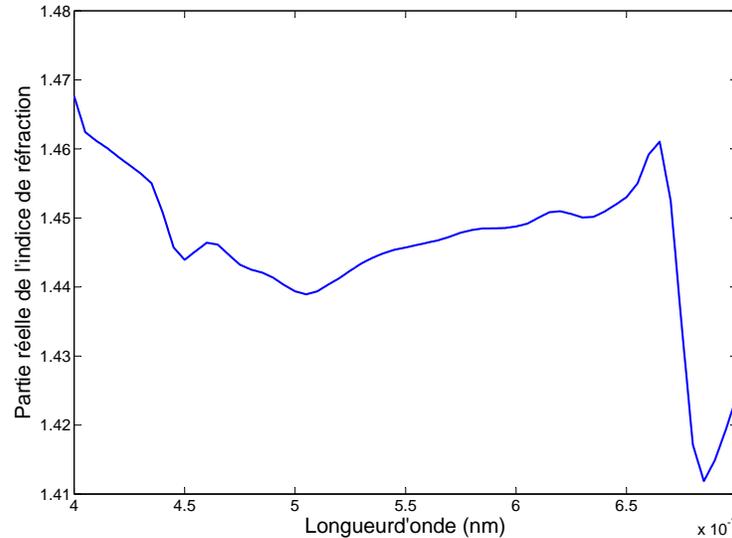


FIGURE 4.2 – Reconstruction de la partie réelle de l'indice de réfraction de *C. vulgaris* en photolimitation stricte à partir des coefficients d'absorption des pigments présents dans la cellule

les coefficient d'absorption, de diffusion et la fraction rétrodiffusée.

Dans un premier temps, on peut définir le paramètre de taille ξ qui va traduire le rapport entre la taille de la particule et la longueur d'onde du rayonnement selon l'équation 4.6.

$$\xi = \frac{\pi d}{\lambda} \cdot n_m \quad (4.6)$$

Dans l'équation 4.6, d est le diamètre moyen de la cellule et n_m l'indice de réfraction du milieu. Trois cas sont à distinguer :

- $\xi \ll 1$: le diamètre de la cellule est largement inférieur à la longueur d'onde considérée. Les propriétés radiatives pourront être déterminées à partir de la théorie de la diffusion de Rayleigh (diffusion élastique), cas limite de la théorie de Mie.
- $\xi \approx 1$: le diamètre cellulaire est du même ordre de grandeur que la longueur d'onde considérée, et la théorie de la diffusion de Rayleigh n'est plus applicable. La solution de Lorenz-Mie est alors appliquée.
- $\xi \gg 1$: le diamètre cellulaire est largement supérieur à la longueur d'onde considérée et la réfraction peut être traitée par les lois de l'optique géométrique.

Le cas de *C.vulgaris* se situe entre les deux derniers items avec un diamètre $d \approx 4\mu m$ et donc un paramètre de taille moyen $\bar{\xi} \approx 30$ sur le PAR. La résolution est donc possible soit par la solution de Lorenz-Mie soit par l'optique géométrique.

Solution de Lorenz-Mie

La solution de Lorenz-Mie, développée par G Mie et L. Lorenz en 1908, est une résolution particulière des équations de Maxwell valable pour des particules sphériques, homogènes et iso-

tropes en suspension dans un milieu non-absorbant.

La valeur du paramètre de taille ainsi que les constats faits sur la forme (étudiée chapitre 2 section 2.2.2, et dont on a vu qu'elle se rapprochait grandement de celle d'une sphère), permettent d'avancer l'hypothèse que l'obtention des sections efficaces d'absorption, de diffusion et la fonction de phase (et donc Ea_λ , Es_λ et $\overline{b_{2\lambda}}$) peut se faire par cette solution.

Approximation de la diffraction anormale, ADA

Une autre approximation couramment utilisée pour la résolution du transfert radiatif en culture microalgale est l'ADA. Il s'agit d'une approximation sur l'électromagnétisme, introduite par Van de Hulst (Van De Hulst, 1981). Elle définit les sections efficaces d'absorption et de diffusion pour les petits angles de diffusion, *i.e.* pour les directions comparables à celles du rayonnement incident. Cette approximation est utilisable sans faire d'hypothèse sur la forme de la cellule et revient à négliger la réflexion de la cellule. Cette hypothèse est basée sur le fait que, vu le rapport de taille entre la cellule et le rayonnement ($\xi \gg 1$), la réfraction peut être calculée par les lois de l'optique géométrique. Le rayon ne subira pas de déviation puisque l'indice de réfraction relatif tend vers 1 (Cornet, 2007). Dans ce cas, l'amplitude du rayonnement n'est pas modifiée mais seulement la phase.

Présentation de la chaîne de calcul

Ce premier paragraphe a pour but de reprendre les différentes étapes décrites précédemment et de les présenter brièvement de manière intégrée.

La détermination des propriétés radiatives de manière semi-prédictive peut se décomposer en cinq étapes :

1. La première étape consiste à déterminer les données d'entrée. Il s'agit donc de réaliser une analyse de taille et de forme fiable, une analyse quantitative des espèces pigmentaires et de réaliser une mesure de transmission normal-hémisphérique (par sphère intégrante cf. paragraphe 2.2.10) pour chaque suspension à analyser. Cette dernière mesure va permettre de déterminer le point d'ancrage.
2. A partir du spectre d'absorption des pigments purs *in vivo* (pas en suspension dans un solvant), la partie imaginaire de l'indice de réfraction est reconstituée.
3. En utilisant l'approximation de Kramers-Krönig soustractive à point d'ancrage, la partie réelle de l'indice de réfraction complexe des cellules peut être calculée.
4. Connaissant la taille, la forme et les indices de réfraction des cellules et du milieu environnant, les sections efficaces et la fonction de phase peuvent être déterminées. Les propriétés radiatives (Ea , Es , $\overline{b_{2\lambda}}$) sont alors déduites. Cela peut se faire moyennant une approximation soit sur la forme (particule sphérique \rightarrow solution de Lorenz-Mie) soit sur l'électromagnétisme (le rayonnement est diffusé majoritairement dans une direction proche de celle incidente \rightarrow ADA).

- En résolvant l'ETR, la transmission du rayonnement est calculée et comparée aux mesures par sphère intégrante. Si besoin le point d'ancrage est ajusté (étape 1). Il est à noter qu'à ce stade, il est possible de comparer les valeurs obtenues à une mesure expérimentale, telle que celle utilisée par exemple par L. Pilon (UCLA, USA) (cf. partie 1.5.2).

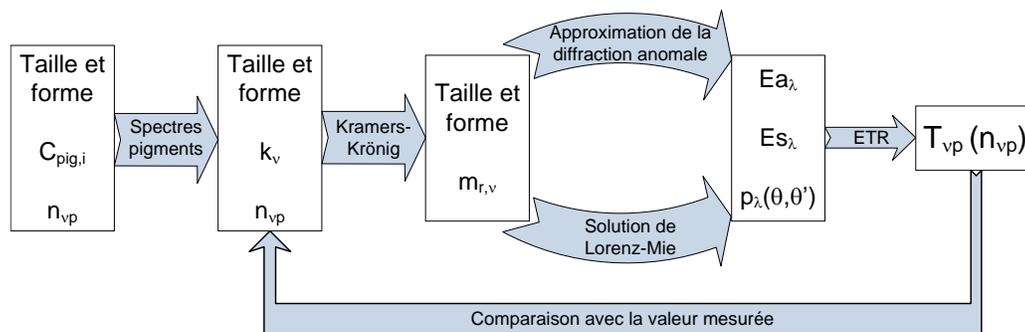


FIGURE 4.3 – Représentation schématique de la procédure de calcul des propriétés radiatives (Dauchet, 2012)

Pour *C. vulgaris* la distribution de taille a été considérée comme constante pour l'ensemble des calculs, étant donné que les conditions de culture n'imposaient aucune carence nutritive mais uniquement une limitation photonique. L'indice de réfraction du milieu été approximé à celui de l'eau (Thormählen et al., 1985), étant donné la faible teneur en sel du milieu de culture. La masse moyenne d'une cellule, indispensable pour passer de la section efficace au coefficient massique d'absorption ou de diffusion ($Ea_\lambda = \frac{\sigma_{a,\lambda}}{m_{cellule}}$ et $Es_\lambda = \frac{\sigma_{s,\lambda}}{m_{cellule}}$) est de $8,76 \cdot 10^{-14} kg$. Cela a été calculé d'après les grandeurs mesurées dans la section 2.2.

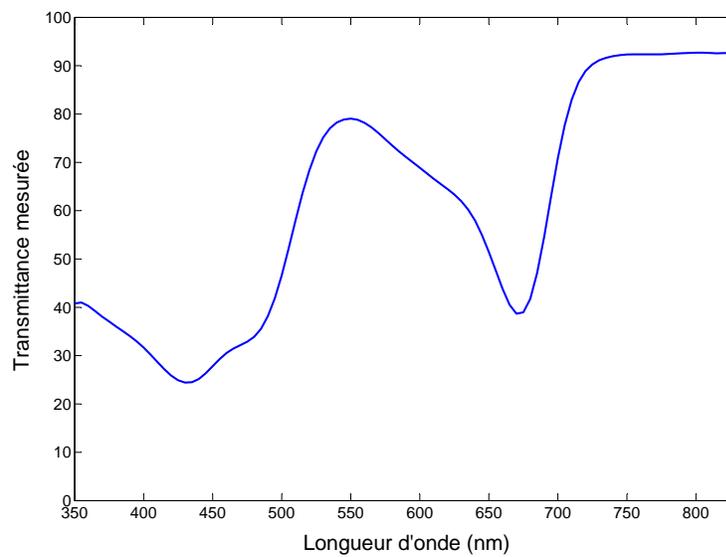
Mesure du spectre de transmission

La mesure du spectre de transmission, nécessaire pour obtenir le point d'ancrage, a été réalisée avec l'appareil décrit dans le paragraphe 2.2.10. La suspension de *C. vulgaris* utilisée pour cette mesure avait les caractéristiques présentées dans le tableau 4.1. Les mesures de concentrations en matière sèche et en chaque pigment ont été réalisées dix fois chacune sur l'échantillon avant mesure du spectre de transmission. Le spectre de transmission (présenté sur la figure 4.4) a été mesuré entre 350 et 830nm par pas de 5nm avec une bande passante de 10nm. Un gain de 40 a été appliqué sur le signal. Chaque mesure est une moyenne sur deux secondes de la lecture du signal.

A partir de ce spectre, la valeur du point d'ancrage peut être déterminée. Dans le cas présent, il s'agit d'une valeur prédictive, obtenue par analogie à l'étude menée sur *C. reinhardtii*. Cette valeur a été calculée à 1,44. Étant donné qu'elle ne dépend pas de la teneur en pigments (mesurée lorsque $\kappa_\lambda = 0$), elle sera considérée constante pour la suite.

TABLE 4.1 – Caractéristique de la suspension de *C. vulgaris*, utilisée pour les mesures en sphère intégrante

	Moyenne	Intervalle de confiance	
		Valeur	%
C_x (g/l)	0,19	0,01	4,55
C_{Chla} ($\mu\text{g/l}$)	7,28	0,21	2,8
w_{Chla} (%)	3,76	0,11	
C_{Chlb} ($\mu\text{g/l}$)	1,58	0,14	8,9
w_{Chlb} (%)	0,82	0,07	
C_{PPC} ($\mu\text{g/l}$)	2,03	0,04	2,1
w_{PPC} (%)	1,05	0,02	
$C_{pigtotal}$ ($\mu\text{g/l}$)	15,71	0,41	2,6
$w_{pigtotal}$ (%)	8,12	0,21	

FIGURE 4.4 – Spectre de transmission d'une suspension à 0,19g/l de *C. vulgaris*

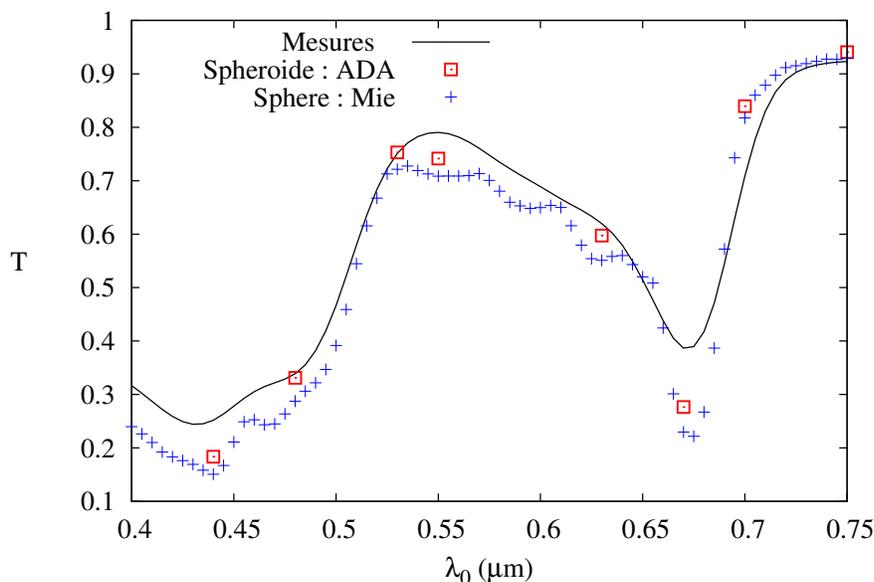


FIGURE 4.5 – Comparaison du spectre de transmission mesuré par sphère intégrante avec les valeurs calculées par la solution de Lorenz-Mie et par l’ADA

Validation de la méthode de calcul

Sur la base des travaux menés à l’IP, notamment par Dauchet (Dauchet, 2012), plusieurs comparaisons ont été faites sur les différentes hypothèses possibles de calcul, notamment entre les résultats obtenus par l’ADA et la solution de Lorenz-Mie. Cette comparaison, présentée dans la figure 4.5, a été faite pour la suspension caractérisée dans le tableau 4.1. Pour rappel, le rayon moyen (mesuré sur 2872 cellules) est de $1,94\mu m$ et l’écart type de $1,218\mu m$.

De cette comparaison, plusieurs déductions peuvent être faites. Premièrement, les deux modèles permettent de reproduire la transmission avec une déviation standard inférieure à 5% (3,65% pour la résolution en sphéroïde avec l’ADA et 3,95% pour la résolution avec la solution de Lorenz-Mie). Même si les deux théories semblent s’accorder, il est important de prendre en compte le temps de calcul nécessaire à l’obtention des propriétés radiatives, l’idée étant d’appliquer par la suite cette méthode pour chaque condition de culture étudiée. Or, comme la différence de points sur la figure 4.5 le suggère, l’obtention de résultats avec l’ADA est beaucoup plus longue qu’avec la solution de Lorenz-Mie. Cette dernière, offrant de bons résultats, sera donc retenue par la suite pour le calcul des PR.

Quelle que soit la méthode, on constate qu’au niveau des pics, la transmission modélisée est sous-évaluée, *i.e.* l’absorption est surestimée. L’étape suivante a donc consisté à analyser la sensibilité de la réponse aux erreurs potentielles sur l’analyse de taille (cf. figure 4.6) ainsi que sur la concentration en microalgues dans la suspension (cf. figure 4.7).

En premier lieu, l’impact d’une variation de +10% sur la valeur moyenne du rayon (cf. figure 4.6) a été étudié. Comme le montre très clairement la figure 4.6, une erreur de 10% est

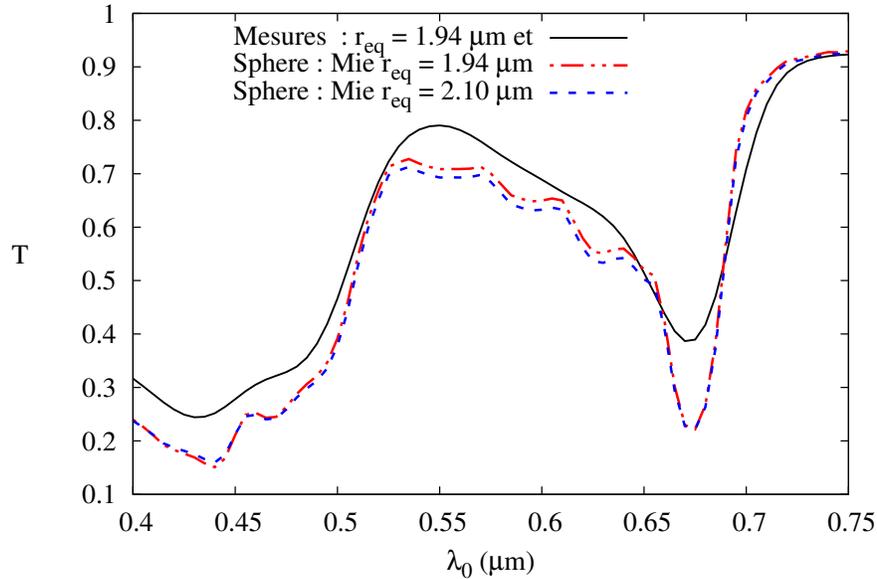


FIGURE 4.6 – Influence d’une erreur de +10% sur la mesure du rayon moyen des cellules sur la prédiction de la transmission par la solution de Lorenz-Mie

acceptable puisque la déviation standard varie de moins de 0.5% (3,95% pour un rayon de $1,94\mu m$ contre 4,33% pour un rayon de $2,10\mu m$). En revanche, la figure 4.7 met en évidence la grande dépendance de la valeur de la concentration en matière sèche sur la prédiction de la transmission. Dans ce cas, une variation de $\pm 10\%$ par rapport à la valeur moyenne a été testée, faisant passer la valeur de la déviation standard de 2,73% à 5,55% (déviation standard obtenue pour une valeur moyenne de concentration : 3,95%). Cela prouve l’importance d’être précis sur la mesure de la concentration en biomasse sèche. Il est important de souligner que, derrière la mesure de la concentration en biomasse sèche, se trouve le calcul de la teneur massique en pigments. Ces teneurs sont à la base de la reconstitution de la partie imaginaire de l’indice de réfraction (et donc de l’absorption) et sont donc également essentielles à ce niveau.

Cette première analyse tend à montrer que la mesure de taille et des concentrations en matière sèche, bien que sensibles, n’explique pas la différence observée sur les pics d’absorption. Une autre explication possible est une erreur sur la mesure des pigments et de la Chla notamment, vue sa grande proportion. Il a ainsi été remarqué qu’une diminution de 20 à 30% de la teneur en Chla permettrait de diminuer considérablement la déviation standard entre la mesure et la théorie, comme le présente la figure 4.8.

Dans ce cas, bien que la valeur prédite par la théorie pour le pic d’absorption ($665nm$) soit très proche de celle mesurée, un écart nettement plus important est alors observé lorsque les phénomènes de diffusion sont majoritaires. Néanmoins, cela permet d’améliorer la prédiction de la transmission du rayonnement sur le PAR. Cette réduction sera donc retenue pour traiter les résultats expérimentaux par la suite. Cette erreur de 30% est en effet explicable par le fait que l’utilisation de coefficients génériques pour le dosage par spectrophotométrie des pigments de l’ensemble des microalgues d’une même classe (*Chlorophycæ* dans notre cas) paraît être une

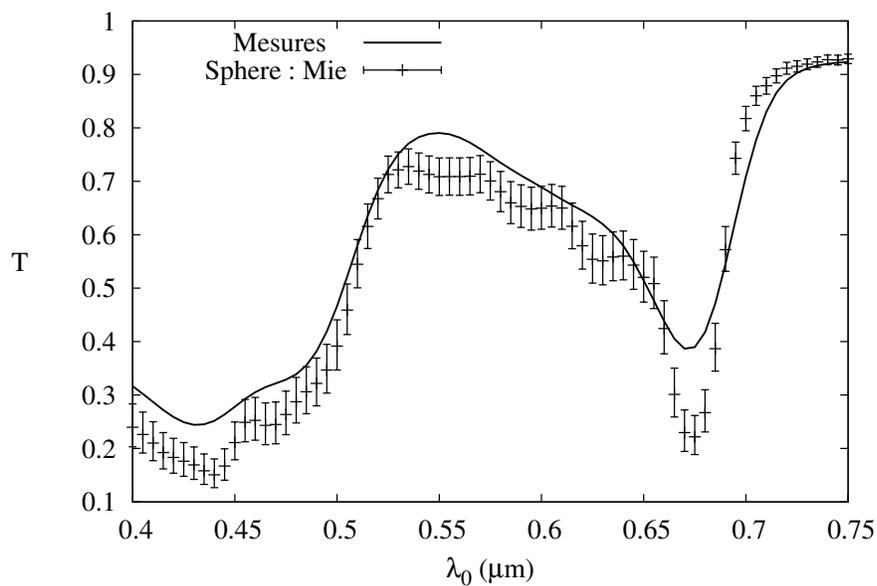


FIGURE 4.7 – Influence d’une erreur de $\pm 10\%$ sur la mesure de la concentration en MS microalgale dans la suspension sur la prédiction de la transmission par la solution de Lorenz-Mie

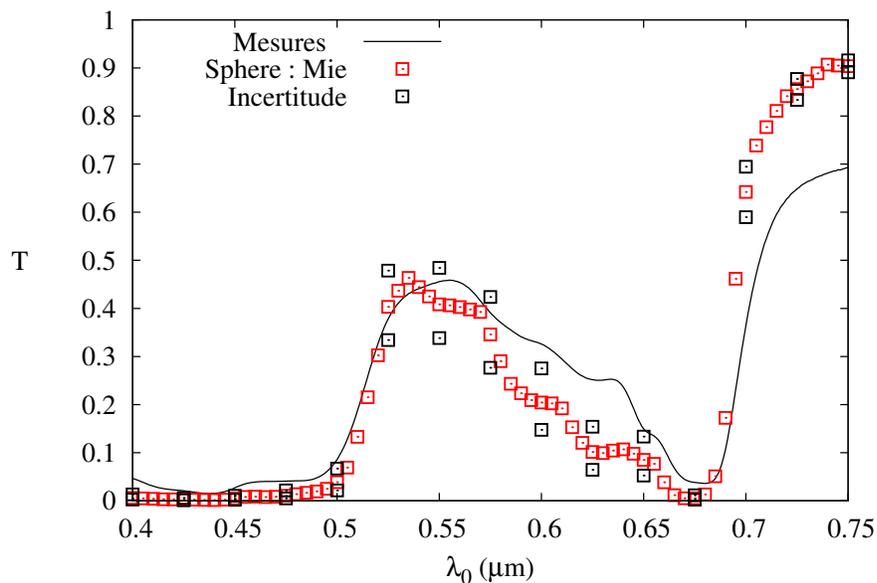


FIGURE 4.8 – Comparaison du spectre de transmission mesuré et du spectre de transmission modélisé par la solution de Lorenz-Mie avec un ajustement de -30% en Chla

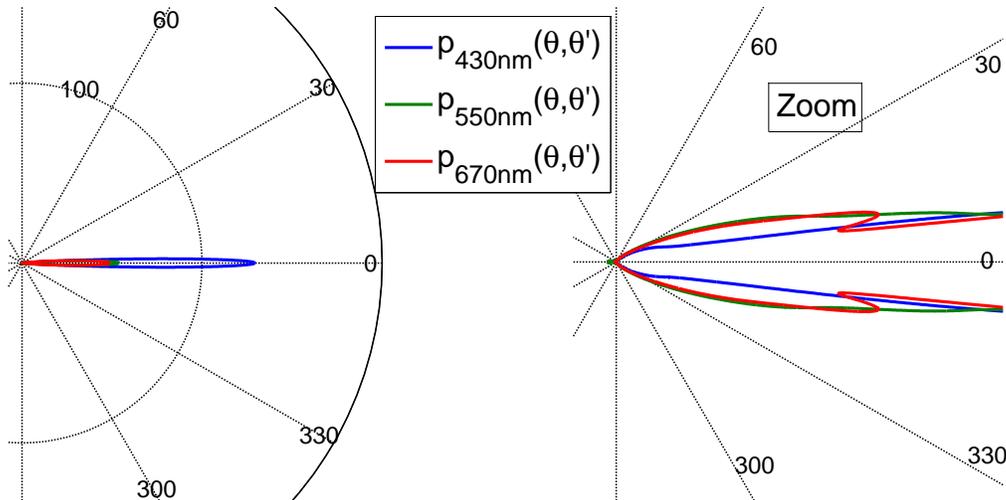


FIGURE 4.9 – Fonction de phase à 430, 550 et 670nm calculée pour une suspension de *C. vulgaris* (cf. tableau 4.1)

hypothèse assez simpliste étant donné la grande diversité biologique. Les coefficients accessibles dans la littérature le sont probablement pour une espèce différente de celle utilisée dans cette étude.

Pour clarifier ce point, il pourrait être intéressant à terme de quantifier les pigments par une technique plus fiable telle que la chromatographie liquide haute performance (HPLC) par exemple.

4.2.4 Résultats

Fonction de phase

La fonction de phase est la représentation de la fraction de puissance qui est diffusée dans l'angle solide élémentaire dans une direction donnée. Ici, la direction de référence est celle du rayonnement incident collimaté. Elle est dépendante de la longueur d'onde comme le montre la figure 4.9. Quelle que soit la longueur d'onde de calcul, la fonction de phase de *C. vulgaris* est toujours dirigée vers l'avant. Ceci signifie que la majorité du rayonnement diffusé l'est dans une direction proche de celle du rayonnement incident. Ce résultat vient conforter la possibilité d'utiliser l'hypothèse de l'ADA, comme l'a également observé Dauchet (Dauchet et al., 2012). L'obtention du coefficient de rétro-diffusion utilisé dans le modèle à deux flux (cf. paragraphe 1.5.2) se fait par intégration de la fonction de phase ainsi que le montre l'équation 4.7.

$$\overline{b_{2\lambda}} = \frac{1}{2} \int_{\pi/2}^{\pi} p_{\lambda}(\theta, \theta') \sin(\theta) d\theta \quad (4.7)$$

L'intégration de la fonction de phase donne alors le résultat présenté dans la figure 4.10. Cette figure montre une allure similaire à celle du coefficient de diffusion. Dans un souci de clarté, la figure 4.9 fait apparaître les valeurs du coefficient $\overline{b_{2\lambda}}$ jusqu'à une longueur d'onde de 695nm.

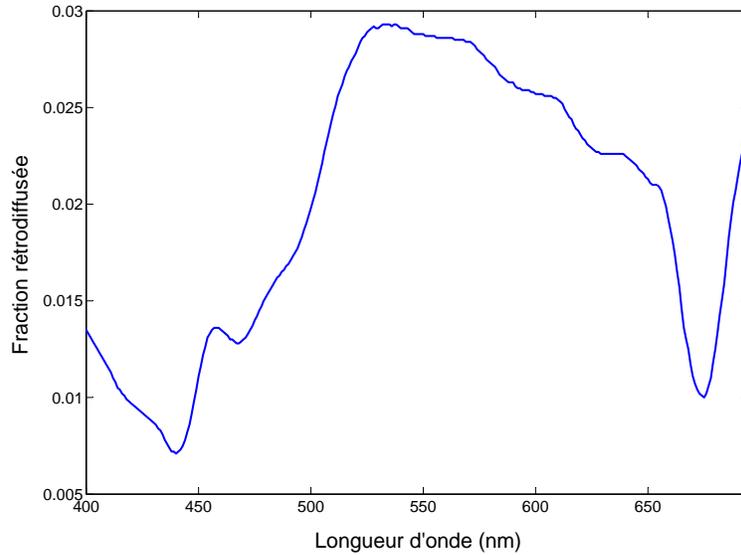


FIGURE 4.10 – Évolution du coefficient de rétro-diffusion avec la longueur d'onde

Après cette valeur, la cellule se comporte comme une particule non-absorbante et la valeur du coefficient de rétro-diffusion devient très élevée.

La valeur moyenne obtenue pour *C. vulgaris* dans les conditions décrites dans le tableau 4.1 est $\overline{b_{2\lambda}} = 0,0213$. Pour *C. reinhardtii*, Takache (Takache, 2010) a montré que la valeur moyenne de $\overline{b_{2\lambda}}$ était environ $\overline{b_{2\lambda}} = 0,008$. Même si une valeur plus élevée est obtenue pour *C. vulgaris*, les valeurs calculées restent faibles. Il est à noter qu'en première approche pour la modélisation du transfert radiatif en PBR, ce coefficient pourrait être pris égal à zéro. Dans ce cas, l'équation 1.18 pour un PBR plan, sans paroi réfléchissante et pour un angle d'incidence du rayonnement normal (rappelé dans l'équation 4.8 pour une longueur d'onde moyenne), se simplifie considérablement pour se rapprocher du modèle de Beer-Lambert (cf. paragraphe 1.5.2) dont le coefficient d'extinction serait uniquement égal au coefficient massique d'absorption (cf. équation 4.9).

$$G(z) = 2 \cdot q_0 \frac{(1 + \alpha) \exp^{\delta(L-z)} - (1 - \alpha) \exp^{-\delta(L-z)}}{(1 + \alpha)^2 \exp^{\delta L} - (1 - \alpha)^2 \exp^{-\delta L}} \quad (4.8)$$

$$\alpha = \sqrt{\frac{Ea}{(Ea + 2\overline{b_{2\lambda}}Es)}} \quad ; \quad \delta = \alpha \cdot C_x \cdot (Ea + 2\overline{b_{2\lambda}}Es)$$

$$G(z) = q_0 \cdot \exp^{-EaC_x z} \quad (4.9)$$

Coefficients massiques d'absorption (Ea_λ) et de diffusion (Es_λ)

Après l'obtention des sections efficaces d'absorption et de diffusion, les coefficients massiques d'absorption (Ea_λ) et de diffusion (Es_λ) sont déterminés. La figure 4.11 présente les résultats

obtenus pour la suspension caractérisée dans le tableau 4.1.

L'allure spectrale générale de $E_{a\lambda}$ et $E_{s\lambda}$ restera toujours la même dans la suite de l'étude, due à une répartition des pigments quasi-constante sur l'ensemble des expérimentations réalisées (65% en Chla, 18% en Chlb, 17% en PPC). Les valeurs moyennes sont ici de $E_a \approx 445m^2.kg^{-1}$ et $E_s \approx 2630m^2.kg^{-1}$. A titre de comparaison, les valeurs obtenues pour *C. reinhardtii* par Takache (Takache, 2010) pour des flux incidents comparables (*i.e.* $> 200\mu mol_{h\nu}.m^{-2}.s^{-1}$) étaient de $E_a \approx 200m^2.kg^{-1}$ et $E_s \approx 850m^2.kg^{-1}$. Cela illustre la grande variabilité des PR des microalgues.

L'absorption plus importante peut ici s'expliquer par une concentration pigmentaire plus élevée chez *C. vulgaris* (pour *C. reinhardtii* le taux global de pigment et de l'ordre de 5% alors que dans le cas présent, pour *C. vulgaris*, ce même taux est de 8,12%). Au sujet de la diffusion, on peut citer les travaux de Blanc *et al.* (Blanc *et al.*, 2010) qui ont montré que *C. vulgaris* produisait de la chitine dans sa paroi cellulaire. Or Azofeifa *et al.* (Azofeifa *et al.*, 2012) ont étudié l'indice de réfraction de la chitine et ont obtenu une valeur moyenne sur le PAR de l'ordre de 1,52. Suivant les proportions de chitine dans la paroi cellulaire (restant à doser par ailleurs), ceci pourrait alors expliquer la différence importante au niveau des coefficients de diffusion de *C. vulgaris* et *C. reinhardtii*.

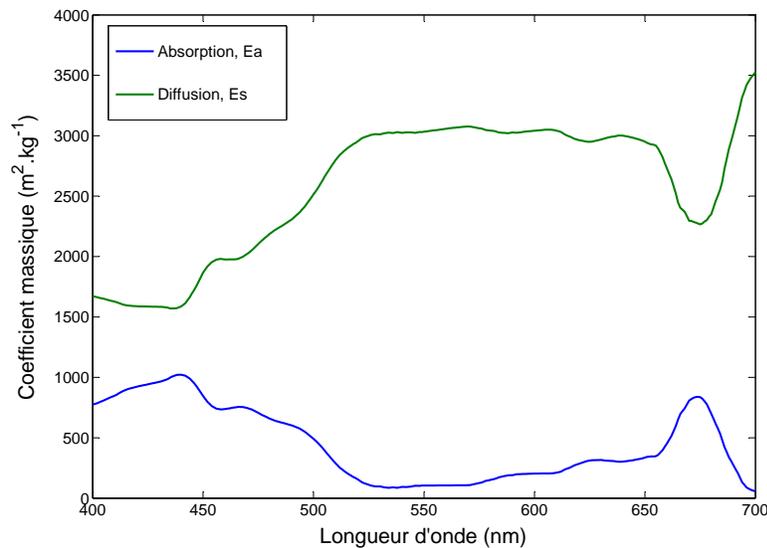


FIGURE 4.11 – Évolution des coefficients massiques d'absorption et de diffusion avec la longueur d'onde pour une suspension de *C. vulgaris* (cf. tableau 4.1)

4.2.5 Conclusion sur la détermination des PR

Comme il a été vu dans cette première partie de chapitre, la détermination des PR de microorganismes photosynthétiques, bien qu'essentielle, est loin d'être facile. Il faut tenir compte

à la fois du contenu cellulaire et des phénomènes d'interaction onde/particule.

La première étape consiste à identifier les espèces pigmentaires présentes dans le microorganisme et à les quantifier. Cette étape analytique peut conduire à des erreurs importantes sur la détermination des PR. La partie réelle peut ensuite se déterminer de deux manières : soit tous les constituants de la cellule (organites) sont connus, ainsi que leurs indices de réfraction (et ces données font défaut chez les organismes eucaryotes), soit elle peut être déterminée à partir d'une mesure de transmission d'une suspension microalgale à une longueur d'onde précise, où les particules seront non-absorbantes. Cette méthode dite à point d'ancrage fait intervenir la théorie de Kramers-Krönig et a été utilisée ici.

Une fois que l'indice de réfraction complexe des cellules est reconstitué, moyennant une hypothèse soit sur l'électro-magnétisme (approximation de diffraction anormale) soit sur la forme (solution de Lorenz-Mie), les sections efficaces d'absorption et de diffusion ainsi que la fonction de phase sont déterminées, permettant ensuite d'en déduire les PR recherchées (E_a , E_s , $\overline{b_{2\lambda}}$). Il a été montré ici que la solution de Lorenz-Mie donnait de bons résultats, du fait de la taille et de la forme quasi sphérique de *C. vulgaris*.

Une fois les PR déterminées, il est possible d'effectuer une validation par mesure de transmission. Même si à l'heure actuelle il reste encore des marges d'amélioration (notamment sur la quantification des pigments), pour *C. vulgaris* les valeurs obtenues sont assez proches de la mesure. Il a été mis en évidence qu'une erreur de 10% sur la mesure du rayon influençait très peu le résultat alors que la même erreur sur la concentration en biomasse sèche pouvait faire doubler l'écart entre la théorie et la mesure.

En conclusion, la méthode prédictive avec l'utilisation de l'approximation sphérique, permettant la résolution à l'aide de la solution de Lorenz-Mie a été validée et retenue pour la détermination des PR dans la suite de ce chapitre. L'ensemble de cette méthodologie a permis d'établir une base de données de PR (dont les valeurs moyennes sont reportées dans le tableau 4.2) pour *C. vulgaris*, à partir des mesures des taux de pigments obtenus lors des cultures en PBR torique. Pour ces calculs, deux cas ont été étudiés : l'un pour une répartition constante de 68% en Chla, 16% en Chlb et 16% en PPC, et l'autre concernant un ajustement de -30% en Chla, avec une nouvelle répartition de 58% en Chla, 21% en Chlb et 21% en PPC. Cet ajustement a pour but de pallier la différence entre la transmission mesurée et celle modélisée comme il a été expliqué (cf. paragraphe 4.2.3).

TABLE 4.2 – Valeurs des PO calculées pour différents teneurs en pigments totaux, avec et sans ajustement du taux de Chla. Les calculs ont été réalisés avec la partie réelle de l'indice de réfraction présentée dans le paragraphe 4.2.2

Avec ajustement			Sans ajustement		
$w_{pig_{total}}$ (%)	\overline{Ea} ($m^2.kg^{-1}$)	\overline{Es} ($m^2.kg^{-1}$)	$w_{pig_{total}}$ (%)	\overline{Ea} ($m^2.kg^{-1}$)	\overline{Es} ($m^2.kg^{-1}$)
3,0	264	2790	3,0	273	2817
3,5	297	2752	3,5	311	2773
4,0	328	2716	4,0	338	2742
4,5	357	2683	4,5	368	2707
5,0	384	2651	5,0	394	2675
5,5	410	2621	5,5	420	2644
6,0	434	2592	6,0	444	2615
6,5	456	2565	6,5	467	2587
7,0	478	2539	7,0	487	2561
7,5	498	2514	7,5	507	2536
8,0	517	2491	8,0	526	2512

4.3 Modélisation cinétique de la croissance de *C. vulgaris*

4.3.1 Obtentions des points expérimentaux de croissance

Montage expérimental

Pour étudier l'impact d'une variation du spectre lumineux, et plus précisément l'utilité d'un spectre rouge absorbées préférentiellement par les photosystèmes par rapport à un spectre complet blanc, un banc expérimental a été mis en place (cf. figure 4.12). Il comporte deux PBR toriques alimentés parallèlement en milieu de culture par une pompe péristaltique commune, avec une régulation thermique identique pour les deux systèmes. Cette mise en place permet de garantir des conditions similaires sur chaque PBR, seul le spectre incident était alors différent. Chaque PBR torique est éclairé par un panneau de LED émettant un rayonnement soit rouge (figure 2.10b) soit blanc (figure 2.10a). Les cultures ont été réalisées à même densité de flux de photons de $200\mu mol_{hv}.m^{-2}.s^{-1}$.

Obtention des productivités volumiques

Les mesures de concentration en biomasse sèche dans chacun des deux PBR ont été réalisées suivant le protocole décrit dans la partie 4.13b pour plusieurs états stationnaires (taux de dilutions différents). Chaque point représente un état stationnaire d'au moins trois jours. Les résultats bruts sont présentés dans le tableau 4.4 pour les points obtenus sous éclairage rouge et

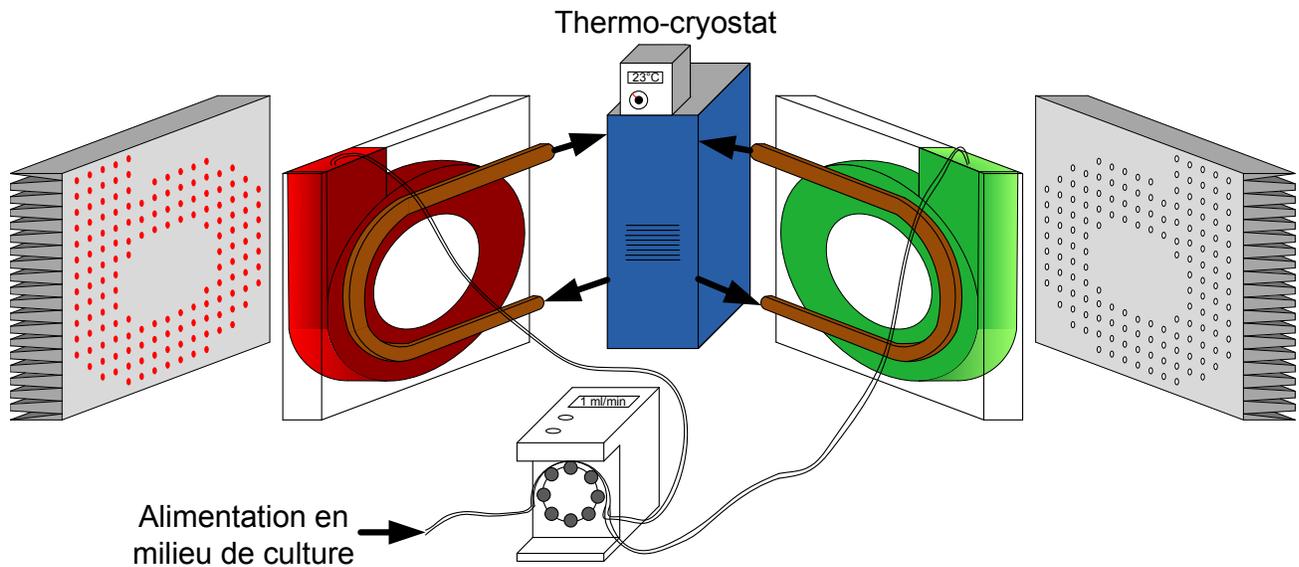


FIGURE 4.12 – Schéma simplifié du banc expérimental d'étude de l'influence du spectre incident

dans le tableau 4.5 pour ceux obtenus sous éclairage blanc. Les productivités volumiques sont définies comme le produit de la concentration en biomasse sèche avec le taux de dilution.

Comme le montre la figure 4.13a, la productivité volumique est fortement dépendante du taux de dilution. L'optimum de productivité est atteint aux alentours de $0,045 - 0,050 \text{ h}^{-1}$, soit un temps de séjour dans le PBR autour de $21h$. Pour des valeurs de taux de dilution au-delà de celle conduisant à l'optimum, la concentration faible en biomasse combinée à un excès de lumière (transmission) rend le système instable, avec un risque de perte rapide de la culture.

Il a été constaté que, sous irradiation rouge, la culture est cependant plus stable par rapport aux cultures sous irradiation blanche. De plus, l'optimum est atteint à un taux de dilution plus important sous irradiation rouge. Ces résultats sont en accord avec ceux exposés dans la partie bibliographique où il a été vu que plusieurs auteurs ont déjà constaté un impact du spectre incident. Notamment, les travaux de Fargès *et al.* (Farges et al., 2009), mené sur la cyanobactérie *A. platensis*, qui ont démontré une plus grande stabilité de la culture sous éclairage rouge, avec une modification du contenu pigmentaire de la cyanobactérie. Sur la figure 4.13b comme sur la figure 4.13a, on notera également qu'un croisement des deux courbes est visible un peu avant l'optimum. Le spectre incident a donc une influence sur les productivités obtenues, mais il semble que l'effet du spectre est différent suivant le taux de dilution appliqué. Ce point sera développé par la suite.

Évolution de la teneur massique en pigments

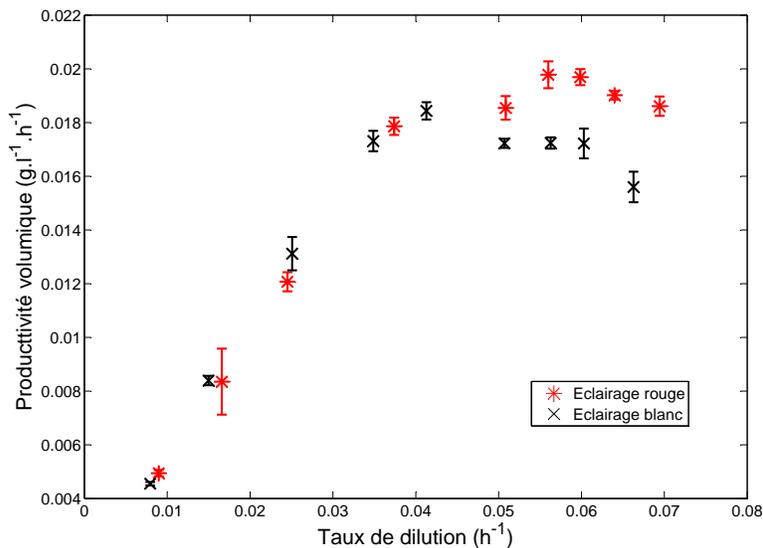
Comme il a déjà été vu, l'étude du transfert radiatif au sein d'une culture nécessite la mesure des teneurs massiques en pigments la composant. Ce suivi a été effectué, en même temps que les mesures de concentration en biomasse sèche, en utilisant le protocole décrit dans la partie 2.2.6.

TABLE 4.4 – Tableau de résultats des productivités volumiques obtenues sous éclairage rouge

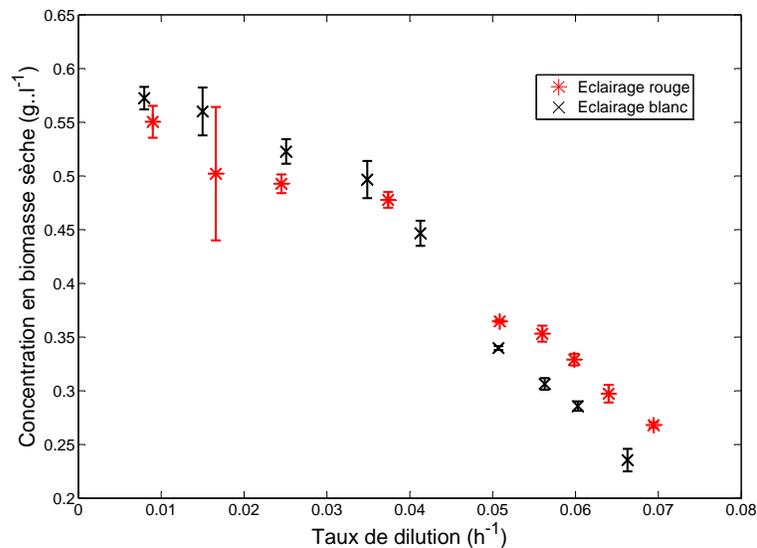
Taux de dilution, D (h^{-1})	Concentration en biomasse sèche, C_x ($g.l^{-1}$)	Intervalle de confiance sur C_x	Productivité volumique, r_x ($g.l^{-1}.h^{-1}$)	Intervalle de confiance sur r_x
0,0090	0,5505	0,0149	0,0049	0,0001
0,0166	0,5021	0,0621	0,0084	0,0012
0,0245	0,4927	0,0087	0,0121	0,0004
0,0374	0,4777	0,0074	0,0179	0,0003
0,0424	0,4879	0,0044	0,0207	0,0001
0,0509	0,3647	0,0011	0,0185	0,0004
0,0560	0,3532	0,0075	0,0198	0,0005
0,0599	0,3290	0,0054	0,0197	0,0003
0,0640	0,2973	0,0082	0,0190	0,0002
0,0694	0,2681	0,0026	0,0186	0,0004

TABLE 4.5 – Tableau de résultats des productivités volumiques obtenues sous éclairage blanc

Taux de dilution, D (h^{-1})	Concentration en biomasse sèche, C_x ($g.l^{-1}$)	Intervalle de confiance sur C_x	Productivité volumique, r_x ($g.l^{-1}.h^{-1}$)	Intervalle de confiance sur r_x
0,0079	0,5725	0,0105	0,0046	0,0001
0,0150	0,5601	0,0223	0,0084	0,0002
0,0251	0,5228	0,0115	0,0131	0,0006
0,0349	0,4697	0,0173	0,0173	0,0004
0,0413	0,4466	0,0117	0,0184	0,0003
0,0507	0,3398	0,0018	0,0172	0,0002
0,0563	0,3064	0,0054	0,0172	0,0002
0,0603	0,2857	0,0044	0,0172	0,0006
0,0663	0,2355	0,0105	0,0156	0,0006



(a) Évolution de la productivité volumique d'une culture de *C. vulgaris* sous éclairage rouge ou blanc ($q_0 = 200\mu\text{mol}_{h\nu}.m^{-2}.s^{-1}$) avec le taux de dilution



(b) Évolution de la concentration en biomasse sèche d'une culture de *C. vulgaris* sous éclairage rouge ou blanc ($q_0 = 200\mu\text{mol}_{h\nu}.m^{-2}.s^{-1}$) avec le taux de dilution

FIGURE 4.13 – Résultats du suivi de la concentration en biomasse sèche et de la productivité volumique en fonction du taux de dilution pour une culture sous éclairage rouge et une sous éclairage blanc

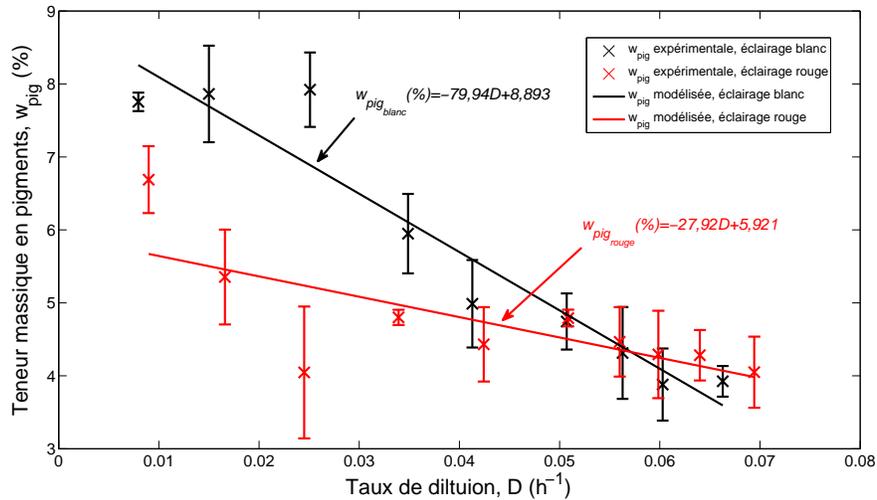


FIGURE 4.14 – Résultats du suivi de la pigmentation avec le taux de dilution blanc pour une culture sous éclairage rouge et une sous éclairage blanc ($q_0 = 200 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

Dans les deux configurations (éclairage blanc ou rouge), l'évolution de la teneur massique en pigments va dans la même direction : la teneur massique en pigments diminue avec le taux de dilution (cf. figure 4.14). Sur la plage de taux de dilution considérée (0 à $0,07 \text{h}^{-1}$), elle est divisée par deux pour la culture sous éclairage blanc et par 1,5 pour la culture sous éclairage rouge. Une évolution linéaire du contenu en pigments peut être proposée sur la plage de taux de dilution étudiée, comme le montre la figure 4.14.

La diminution de w_{pig} est beaucoup plus importante sous éclairage blanc que sous éclairage rouge. Cependant, la répartition entre les trois espèces pigmentaires mesurées reste quasiment constante pour les deux types d'éclairage et quel que soit le taux de dilution. Cette répartition est de $66 \pm 3\%$ en chlorophylle a, $17 \pm 3\%$ en chlorophylle b et $17 \pm 1\%$ en PPC.

Le fait que la répartition ne varie presque pas permet d'affirmer que la culture n'était pas stressée. En effet, lors d'un stress de la culture (carence notamment) une augmentation de la teneur massique en PPC est classiquement observée. Ces résultats montrent que *C. vulgaris* adapte fortement sa pigmentation en concentration (et non en composition) notamment vis à vis des conditions de transfert de rayonnement rencontrées. Cette adaptation est un paramètre clé qui sera à prendre en compte pour la modélisation de la croissance et du transfert radiatif dans les cultures de *C. vulgaris*.

4.3.2 Calage du modèle cinétique

Le calage du modèle cinétique s'est fait en deux étapes : la première a consisté à identifier les valeurs des paramètres restants du modèle cinétique vus dans la partie 2.4, et la seconde à vérifier la sensibilité de la modélisation à la variation pigmentaire, qui s'est révélée très forte pour *C. vulgaris*.

L'identification des paramètres a été réalisée en implémentant le modèle décrit dans la partie 2.4 sous Matlab®. Les paramètres du modèle cinétique restants à identifier sont le coefficient de demi-saturation de la photosynthèse ($K_{\mathcal{A}}$), la vitesse spécifique de régénération du cofacteur (J'_{NADH_2}) et la vitesse spécifique d'absorption des photons au point de compensation (\mathcal{A}_c , déterminé à partir de G_c selon l'équation 1.4). L'identification des paramètres manquants a été réalisée en partant d'un premier jeu correspondant à *C. reinhardtii* (déterminé par Takache (Takache, 2010) et repris par Dauchet (Dauchet, 2012)). Ces valeurs étaient de :

- $G_c = 10 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, soit une vitesse spécifique d'absorption des photons au point de compensation $\mathcal{A}_c = 1860 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ à $q_0 = 200 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.
- $J_{NADH_2} = 2,39 \text{mol}_{O_2} \cdot \text{kg}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.
- $K = 110 \pm 20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur doit être multipliée par la section efficace massique d'absorption (E_a) lorsque le modèle est exprimé avec \mathcal{A} au lieu de G . La valeur de $K_{\mathcal{A}} = 32000 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{kg}_x^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ est alors obtenue.
- $Kr \approx 5 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (paramètre d'inhibition de la respiration à la lumière, déterminé à partir de l'équation 2.27), soit $K_{r_{\mathcal{A}}} \approx 7500 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{kg}_x^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Il est à noter que la valeur de \mathcal{A}_c correspond à l'énergie reçue en fond de réacteur pour l'optimum de productivité.

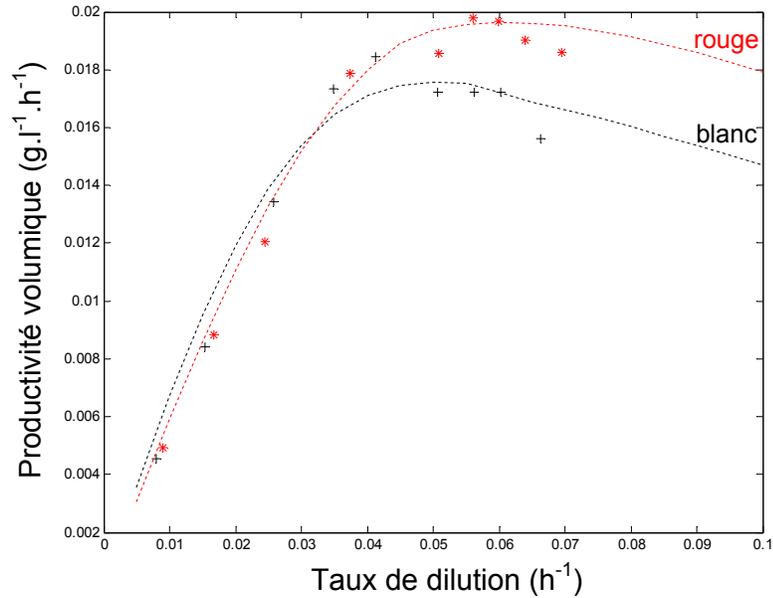
Les paramètres ont été ajustées de telle sorte que l'écart entre les points expérimentaux et la prédiction soit le plus faible possible. Pour cela, les propriétés radiatives spectrales moyennées sur l'ensemble des points expérimentaux obtenues pour chaque couleur (rouge et blanc) ont été utilisées avec une réduction de 30% de la teneur massique en chlorophylle a. Les grandeurs moyennes correspondantes sont $E_a = 422 \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$, $E_s = 2615 \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ sous éclairage blanc $E_a = 366 \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$, $E_s = 2623 \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ sous éclairage rouge. Le coefficient de rétrodiffusion reste constant ; $b = 0,02$.

Après ajustement (paramètres présentées dans le tableau 4.6), un écart entre les valeurs théoriques et expérimentales de l'ordre de 7,2% a été obtenu. Le tracé de comparatif du modèle et des points expérimentaux est présenté sur la figure 4.15.

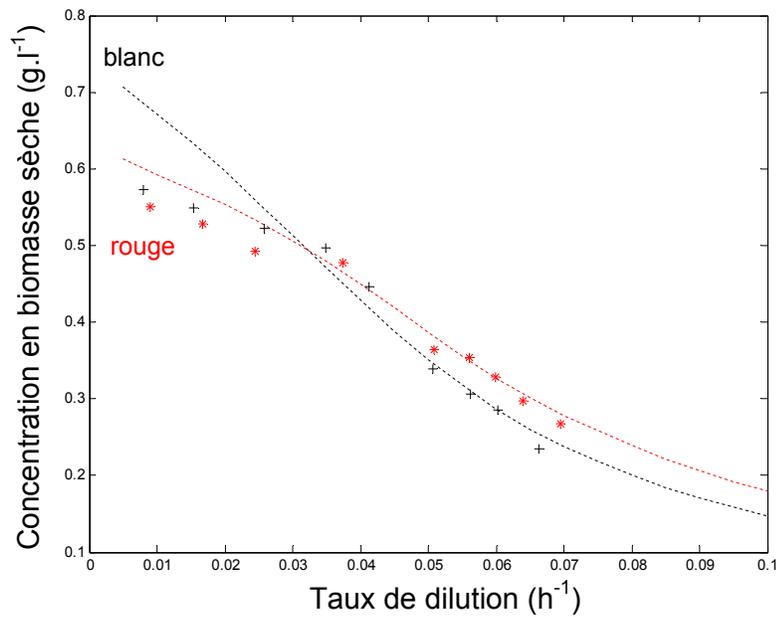
TABLE 4.6 – Valeurs des coefficients du modèle cinétique de croissance intrinsèque à *C. vulgaris* calés d'après les points expérimentaux

Paramètres	Valeurs	Unité	Paramètres	Valeurs	Unité
K	180 ± 10	$\mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	$K_{\mathcal{A}}$	65000	$\mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{kg}_x^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
G_c	3,5	$\mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	\mathcal{A}_c	1300	$\mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$
J_{NADH_2}	15	$\text{mol}_{O_2} \cdot \text{kg}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	-	-	-
Kr	0,20	$\mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	$K_{r_{\mathcal{A}}}$	78.7	$\mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{kg}_x^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

La figure 4.15b permet de mettre en avant une limite potentielle de la formulation du modèle pour les faibles valeurs du taux de dilution. En effet, on remarque qu'à $D < D_{opt}$ l'écart entre



(a) Modélisation de l'évolution de la productivité volumique de *C. vulgaris* sous éclairage blanc et rouge



(b) Modélisation de l'évolution de la concentration en biomasse sèche de *C. vulgaris* sous éclairage blanc et rouge

FIGURE 4.15 – Superposition des points expérimentaux avec les prédictions obtenues par modélisation de la croissance de *C. vulgaris* sous éclairage blanc et rouge en fonction du taux de dilution

la prédiction des concentrations en biomasse sèche et celles mesurées devient nettement plus important, d'autant plus sous éclairage blanc. La limite pourrait alors être portée sur une mauvaise représentation de l'effet de la zone sombre pour une microalgue. Cette question sera abordée dans la partie suivante (cf. partie 4.4.5).

D'autre part, il est intéressant de constater que, sur les figures 4.15a et 4.15b, une variation du spectre incident amène à une productivité volumique prédite différente. En effet, comme le montre spécifiquement la figure 4.15a, sous éclairage monochromatique rouge, la valeur du taux de dilution optimal est plus importante ainsi que celle de la productivité volumique maximale atteinte. De plus, il est à noter qu'à faible taux de dilution (inférieur au taux de dilution optimum), la productivité volumique obtenue avec la culture sous éclairage rouge est légèrement plus faible qu'en blanc. Ces prédictions, en accord avec l'expérience, seront approfondies par la suite afin de mieux expliquer cette différence.

Pour conclure, la dépendance des prédictions du modèle avec les propriétés radiatives a été testée. Toujours en gardant une réduction de 30% de la teneur massique en chlorophylle a, l'idée était de comparer l'influence de la prise en compte des PR obtenues pour chaque point expérimental par rapport à des PR moyennes calculées sur une teneur type en pigment (5%). La prise en compte d'une évolution linéaire de la pigmentation avec le taux de dilution (répartition entre les différentes espèces gardée constante) a permis ainsi de réduire l'écart entre les points expérimentaux et le modèle à 6%. En prenant en compte la teneur en pigment réelle, mesurée à chaque point, l'écart entre la théorie et l'expérience est alors de 5,9%. Pour la suite l'utilisation du modèle fera donc appel aux PR calculées en fonction du contenu pigmentaire mesuré w_{pig} (table des PR), en gardant une répartition entre les différentes espèces pigmentaires constantes.

4.3.3 Conclusion sur la modélisation cinétique de la croissance de *C. vulgaris* en PBR

Dans cette partie, l'intérêt a été porté sur la modélisation cinétique de croissance de la microalgue *C. vulgaris*, microalgue d'étude du présent travail. Pour ce faire, la formulation du modèle cinétique de croissance développé par Takache (Takache, 2010) pour la microalgue *C. reinhardtii* a été reprise. Certains de ces paramètres ont pu être déterminés théoriquement (notamment par analyse élémentaire de la biomasse et analyse détaillée du schéma en Z de la photosynthèse) et sont : $P/2e^-$, ν_{NADH_2} , $\bar{\phi}'$, $\bar{\phi}$ et ρ_M . Les paramètres restants (K , K_r , G_c et J_{NADH_2} ou leur équivalent exprimé en terme d'énergie utile $K_{\mathcal{A}}$, $K_{r,\mathcal{A}}$, $\mathcal{A}c$) ont permis d'ajuster le modèle sur deux séries de points expérimentaux, obtenues sous éclairage blanc et sous éclairage rouge.

Il est intéressant de comparer les valeurs de *C. vulgaris* avec celles obtenues par Takache pour une culture de *C. reinhardtii*. En effet, le coefficient $K_{\mathcal{A}}$ (coefficient de demi saturation de la photosynthèse) est plus élevé pour *C. vulgaris* (65000 au lieu de $32000 \mu mol_{h\nu}.kg_x^{-1}.s^{-1}$) ce qui traduit une moins grande sensibilité à la lumière de cette souche. L'énergie de compensation est, quant à elle, nettement plus faible, ce qui laisse à penser que *C. vulgaris* est plus sensible aux faibles intensités lumineuses. L'évolution significative de la teneur massique en pigments

(passant de 8 à 4% sur la plage de taux de dilution considérée) montre également clairement une forte adaptation du taux de pigments chez *C. vulgaris*. Enfin, le coefficient de régénération des cofacteurs est beaucoup plus important chez *C. vulgaris*. Cela implique donc que *C. vulgaris* respire plus que *C. reinhardtii*, d'où l'importance d'éviter les zones sombres lors de la conception de PBR.

Une fois les paramètres du modèle adaptés, l'écart entre les points expérimentaux et les valeurs de productivité volumique prédites par le modèle était de 7,2%, en prenant comme première approximation un jeu de PR type pour l'ensemble des données expérimentales. Par la suite, la comparaison a été faite en prenant en compte une table de PR (calculée pour une répartition constante des espèces pigmentaires) couplée à une prise en compte de l'évolution de la teneur massique en pigments en fonction des conditions de cultures. Cela a permis de réduire l'écart entre la partie expérimentale et théorique à 6%. Par ailleurs, l'utilisation des données expérimentales (calcul des PO pour chaque point expérimental) conduit à un écart entre la théorie et l'expérience de 5,9%. Pour la suite de l'étude, la base de données des PR sera utilisée en se servant du contenu pigmentaire déterminé pour chaque expérimentation.

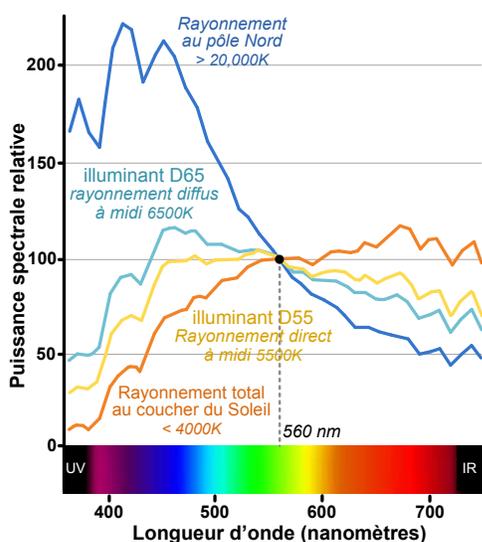
Il est intéressant de voir que, du point de vue productivité volumique, le modèle permet de prédire correctement l'ensemble de l'évolution avec le taux de dilution et ce, quel que soit le spectre incident. En effet, pour un spectre incident blanc ou rouge, le modèle prédit bien un taux de dilution et une productivité optimale plus importante pour une même densité de flux de photons rouge par rapport aux résultats obtenus sous éclairage blanc. Cependant, du point de vue prédiction de l'évolution de la concentration en biomasse sèche, le modèle semble avoir des difficultés à représenter le comportement mesuré à faible taux de dilution (et donc à une concentration importante en biomasse), même si la cohérence entre théorie et expérience à taux de dilution plus important est très bonne. Ce problème, déjà observé par Takache (Takache, 2010), peut être expliqué par une mauvaise formulation du modèle cinétique de croissance et, particulièrement, du phénomène de respiration, conduisant alors à surestimer la concentration en biomasse dans la culture. A noter que pour reformuler le terme lié à la respiration, il serait nécessaire d'approfondir l'étude du mécanisme métabolique mis en jeu.

Malgré cela et étant donné que l'écart reste inférieur à 10%, ce modèle sera utilisé par la suite comme base théorique pour expliquer l'effet du spectre incident et de l'angle d'incidence du rayonnement sur la productivité d'une culture de *C. vulgaris*.

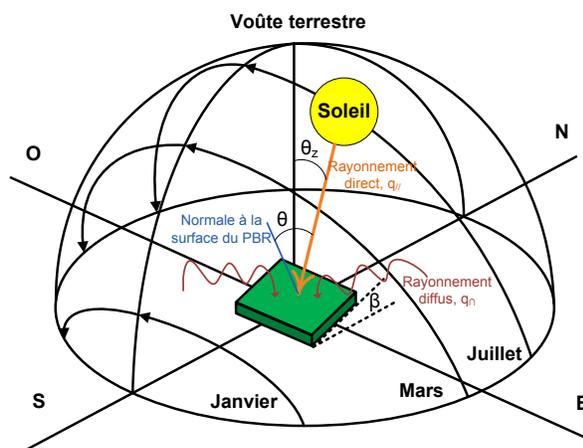
4.4 Application à un photobioréacteur à haute productivité volumique sous conditions spécifiques d'éclairement

4.4.1 Introduction de la problématique du transfert radiatif en conditions solaires

Bien que de nombreuses études aient déjà été menées sur l'influence du spectre incident sur la croissance et la pigmentation cellulaire notamment (cf. partie 4.3.1, et en particulier 1.2.6), elles impliquaient toutes une source lumineuse artificielle. Pour la production à grande échelle de biomasse microalgale, il est cependant intéressant d'envisager de travailler sous flux solaire. Néanmoins, l'utilisation du flux solaire comme source d'énergie lumineuse introduit de nouvelles problématiques.



(a) Variations spectrales de la lumière naturelle (Wyszecki and Stiles, 1982)



(b) Variations de l'angle d'incidence du rayonnement solaire (Pruvost et al., 2011)

FIGURE 4.16 – Évolution des conditions d'éclairement d'un PBR sous éclairage solaire

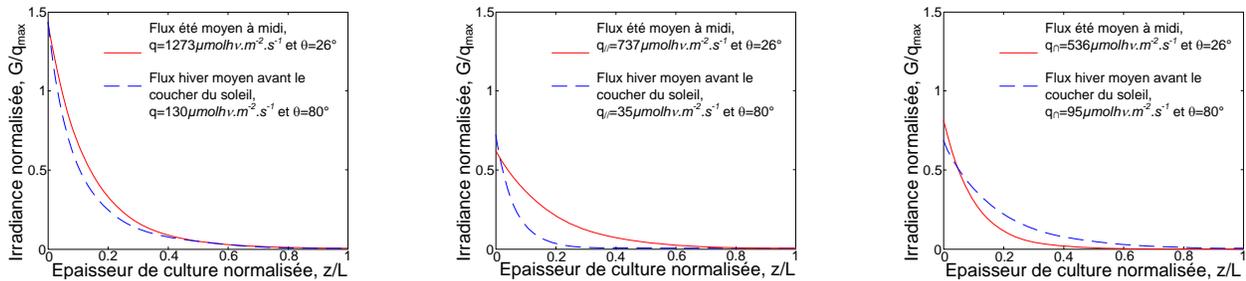
Le spectre de lumière solaire est ainsi composé énergétiquement de près de 50% de rayonnement infrarouge. Bien que ce rayonnement ne soit pas utile à la culture de microorganismes photosynthétiques, ce type de rayonnement a pour conséquence l'augmentation de la température de la culture.

D'autre part, le spectre d'émission n'est pas constant dans le temps. Du fait de la rotation de la Terre, le trajet optique s'allonge au lever et au coucher du Soleil, impliquant une augmentation de la diffusion du rayonnement. Ce phénomène impacte beaucoup plus le rayonnement bleu que rouge. Cela amène à une modification de spectre, tel que présenté par Wyszecki et Stiles (Wyszecki and Stiles, 1982) sur la figure 4.16a.

Le deuxième effet imposé par l'utilisation du flux solaire est la variation de l'angle d'incidence du rayonnement par rapport à la surface de captation du rayonnement. En effet, toujours du

fait de la rotation de la Terre, l'angle d'incidence est constamment modifié (cf. figure 4.16b). Cette modification mène à introduire deux aspects distincts : l'impact de la modification de l'angle d'incidence sur le transfert radiatif en culture microalgales et l'utilisation de l'énergie lumineuse par la biomasse en fonction de l'angle d'incidence imposé.

Le premier point, à savoir l'étude de l'impact sur le transfert radiatif, a déjà été analysé dans le cas des photobioréacteurs, notamment par Pruvost *et al.* (Pruvost et al., 2011). Ces auteurs ont utilisé le modèle à deux flux, exprimé pour un flux collimaté d'une part et un flux diffus d'autre part. Cela a permis de prédire le transfert de lumière pour une journée moyenne d'été et d'hiver. Comme le montre la figure 4.17, et en particulier la figure 4.17b, la variation de l'angle d'incidence impacte grandement l'atténuation de lumière au sein de la culture ; à angle d'incidence faible, la pénétration de la lumière est plus importante. D'après les simulations de productivités surfaciques faites par ces auteurs, la non prise en compte de cet effet sur le transfert de rayonnement mène à une surestimation des valeurs de productivité de 10 à 20%. Il en est de même si on ne considère pas spécifiquement la part diffuse du flux capté, qui pénètre différemment le volume de culture (angle d'incidence correspondant à un angle solide de 2π stéradian). En combinant les deux hypothèses (incidence normale et flux collimaté), la surestimation de la productivité surfacique peut atteindre jusqu'à 50%. A noter que ces deux hypothèses sont les cas les plus simples de représentation du transfert radiatif, et sont à ce titre largement utilisées dans la littérature.



(a) Atténuation du flux solaire total (collimaté + diffus)

(b) Atténuation de la partie collimatée du flux solaire

(c) Atténuation de la partie diffuse du flux solaire

FIGURE 4.17 – Comparaison de l'atténuation du flux solaire moyen d'été ($1273 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et $\theta = 26^\circ$) et d'hiver ($130 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et $\theta = 80^\circ$) d'après Pruvost *et al.* (Pruvost et al., 2011)

Cette partie sera dédiée à l'étude de ces deux aspects spécifiques (spectre et angle d'incidence du rayonnement) induits par l'utilisation du flux solaire pour la culture microalgale. Le premier objectif est d'étudier expérimentalement leurs impacts sur la croissance de la culture en photobioréacteur. Le second consiste à confronter les résultats expérimentaux au modèle à deux flux couplé au modèle cinétique de croissance pour étudier si un tel modèle est capable de bien représenter ces effets. Ensuite, l'utilisation de ce modèle apportera un niveau de compréhension supérieur de l'impact de ces phénomènes par analyse détaillée du transfert de rayonnement incident et du couplage à la cinétique de croissance.

4.4.2 Montage expérimental

Les expérimentations menées dans cette partie se sont déroulées en deux étapes. La première a consisté en une série de mesures de transmission en maquette froide, et la seconde en des cultures continues. Le but était d'obtenir une base de données suffisamment complète pour confronter le modèle de transfert radiatif utilisé (modèle à deux flux) aux données expérimentales.

Pour cela, le montage présenté sur la figure 4.18 a été utilisé. Il comporte :

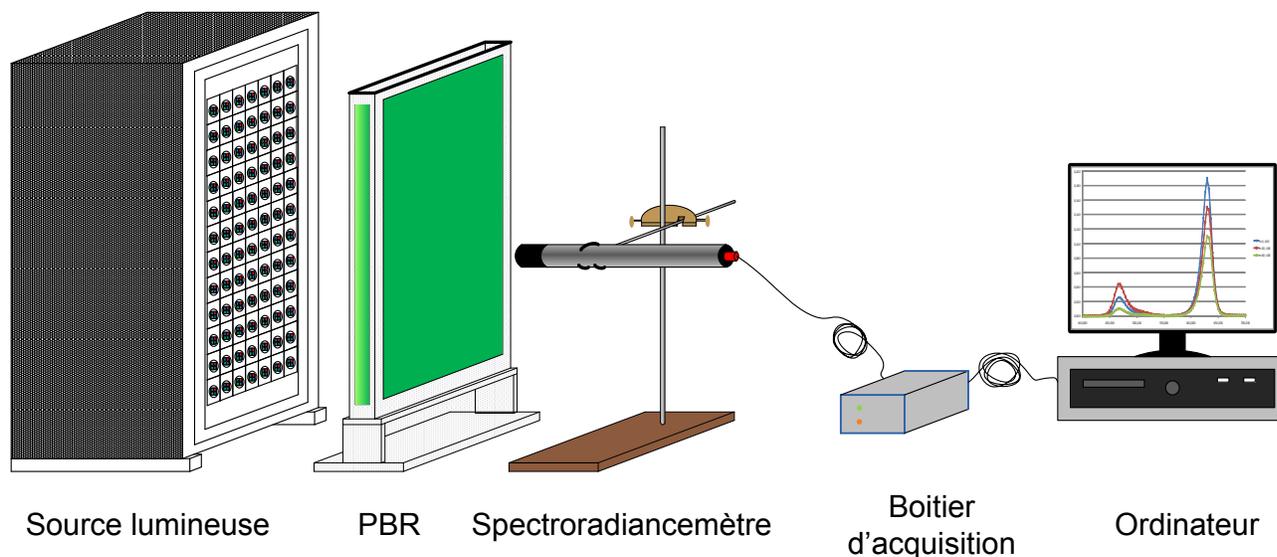


FIGURE 4.18 – Schématisation du montage expérimental d'étude de l'influence de l'angle d'incidence

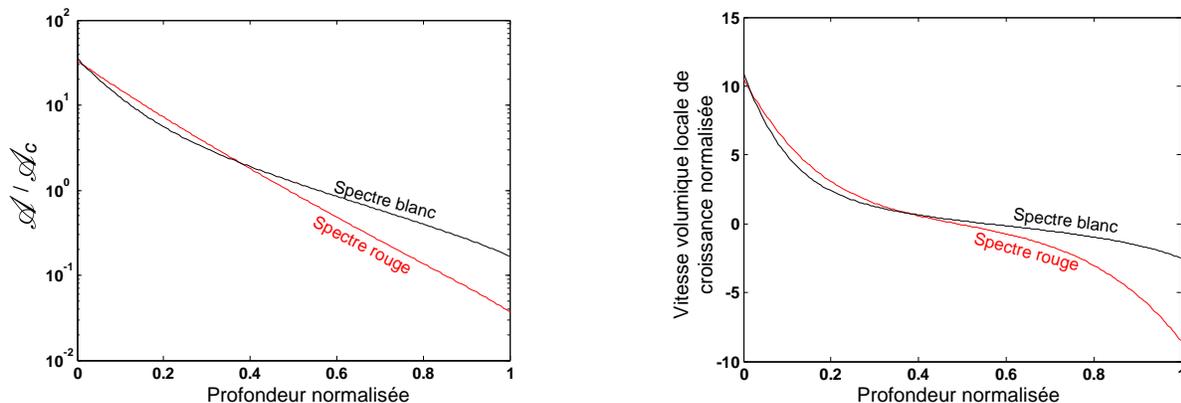
1. Le panneau éclairant constitué de LED tricolores (figure 2.10c) permettant d'assurer un flux incident toujours quasi-collimaté. Deux valeurs de PFD ont été testées : 100 et $1000 \mu\text{mol}_{hv} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Lors de la modification de l'angle d'incidence du rayonnement, le panneau était pivoté d'un angle connu, en s'assurant que le PBR soit toujours complètement dans le flux lumineux. Deux types de spectre ont été utilisés : un contenant les trois couleurs (bleu, vert et rouge) et l'autre avec uniquement du bleu et du rouge.
2. Le PBR du type Flat Panel (FP, cf. figure 2.2). Le PBR est espacé du panneau de LED d'une distance maintenue constante de dix centimètres entre le centre du PBR et le centre du panneau de LED. Pour éviter les effets de bords, une protection opaque a été placée autour du PBR. Pour réaliser les mesures de transmission en présence d'une culture de microalgues, une culture a été injectée avec une concentration de $0.9 \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ et une teneur totale en pigments de 5.4% (3.71% en chlorophylle a, 0.80% en chlorophylle b et 0.85% en PPC).
3. Le matériel de mesures, à savoir un spectroradiancemètre pour les mesures de spectres de transmission et un quantum mètre pour les mesures de flux transmis.

La deuxième partie concernait la mesure expérimentale de l'impact d'une modification de l'angle du rayonnement incident sur la productivité d'une culture intensifiée en mode continu. Pour

les cultures en continu, le même montage, complété par l'équipement nécessaire à la culture (pompes, régulation de température, ...) a été utilisé. Les spectres utilisés ont été du blanc reconstitué à partir des trois couleurs (bleu, vert et rouge) et uniquement du rouge.

4.4.3 Pré-analyse théorique de l'impact de conditions spécifiques d'éclairement

En préalable aux études réalisées dans cette partie, une analyse purement théorique des problématiques associées au transfert radiatif sous spectre ou angle incident particulier est réalisée. Le modèle proposé dans la partie précédente a ainsi été utilisé pour prédire l'impact sur la productivité volumique d'une culture de *C. vulgaris* en PBR intensifié. L'analyse a été faite pour une concentration en biomasse sèche fixe $C_x = 2,5g.l^{-1}$ et une teneur en pigments totaux $w_{pig} = 5\%$. Ces paramètres correspondent aux prédictions théoriques faites pour un spectre blanc d'incidence normale sur un PBR torique et pour un flux incident de $200\mu mol_{hv}.m^{-2}.s^{-1}$. En utilisant le modèle à deux, flux exprimé en spectral sur le PAR (cf. partie 1.5.2), et la définition de l'énergie utile, \mathcal{A} , le profil théorique d'atténuation de l'énergie radiante a été déterminé (cf. figure 4.19a). Connaissant la vitesse spécifique d'absorption des photons à chaque profondeur de la culture, la vitesse volumique locale de croissance correspondante (r_x) a été calculée pour un spectre rouge et un spectre blanc, et pour une incidence normale et de 60° .

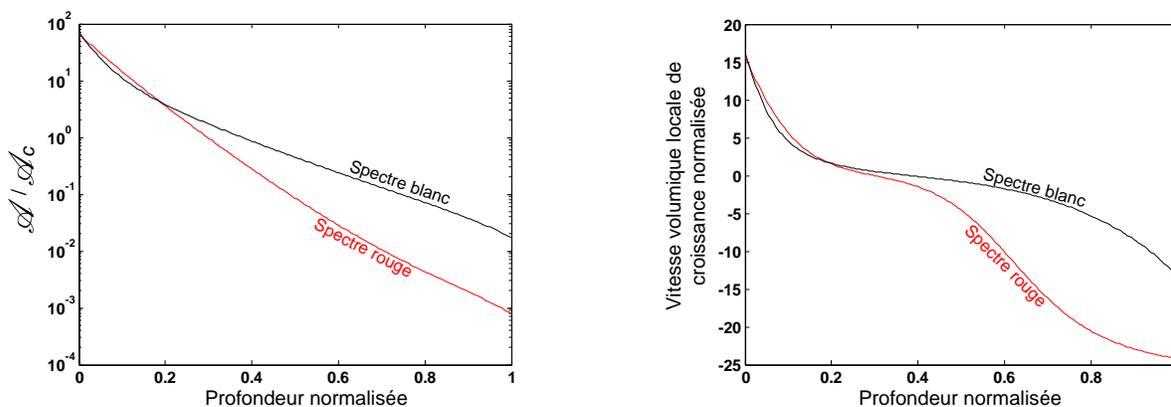


(a) Évolution de la vitesse d'absorption de l'énergie radiante dans la profondeur de culture pour $\theta = 0^\circ$

(b) Évolution de la productivité volumique normalisée avec la productivité moyenne de référence dans la profondeur de culture pour $\theta = 0^\circ$

FIGURE 4.19 – Évolution théorique de l'atténuation de l'énergie radiante et de l'évolution de la productivité volumique dans l'épaisseur de culture pour une incidence normale du rayonnement blanc ou rouge

La figure 4.19 donne les résultats pour un angle d'incidence normal et pour deux spectres différents. Les résultats sont présentés sous forme relative pour \mathcal{A} par rapport au point de compensation, \mathcal{A}_c , (cf. figure 4.19a), et pour la vitesse locale de croissance (cf. figure 4.19b) par rapport à la valeur obtenue en incidence normale et sous spectre blanc (valeur choisie comme



(a) Évolution de la vitesse d'absorption de l'énergie radiante dans la profondeur de culture pour $\theta = 60^\circ$

(b) Évolution de la productivité volumique normalisée avec la productivité moyenne de référence dans la profondeur de culture pour $\theta = 60^\circ$

FIGURE 4.20 – Évolution théorique de l'atténuation de l'énergie radiante et de l'évolution de la productivité volumique dans l'épaisseur de culture pour une incidence non normale ($\theta = 60^\circ$) du rayonnement blanc ou rouge

référence). A partir du calcul de \mathcal{A} , une légère différence est constatée, notamment en fond de culture. Jusqu'à environ la moitié de la profondeur du PBR, la vitesse spécifique d'absorption des photons est peu impactée par le spectre. Ensuite, on observe une diminution plus rapide de la vitesse d'absorption en spectre rouge. Cela s'explique par l'absorption spectrale de la culture dans cette gamme de longueur d'onde (pic d'absorption des chlorophylles). Pour une lumière blanche, du fait des longueurs d'ondes moins absorbées (notamment le vert), la pénétration de la lumière est plus profonde. Même si la pigmentation est moins favorable à l'absorption de ces longueurs d'ondes, cela se traduit en fond de culture par une vitesse d'absorption plus grande. Comme le montre la figure 4.19b, cette différence d'absorption joue un rôle sur la vitesse volumique locale de croissance puisque, même si dans la première moitié de la culture, les vitesses sous éclairage blanc et rouge sont proches, elles divergent ensuite et la vitesse de croissance sous éclairage rouge chute plus rapidement. Ceci s'explique une nouvelle fois par le fait qu'il y a moins d'énergie radiante disponible en fond de PBR sous éclairage rouge puisque celui-ci est absorbé très vite dans la première moitié de la culture. Il est à noter que la profondeur d'extinction est dans les deux cas très proche ($\gamma = 0,56$ en lumière blanche et $\gamma = 0,49$ en lumière rouge) mais, sous éclairage rouge, l'effet de la zone sombre est alors plus important avec des valeurs locales de \mathcal{A} plus faibles, impactant négativement la vitesse volumique locale de croissance de la culture.

La figure 4.20 donne les résultats pour une incidence du rayonnement de 60° . Dans le cas d'un éclairage en incidence forte, la divergence des profils d'absorption de l'énergie radiante entre un éclairage blanc et un éclairage rouge s'obtient à une profondeur beaucoup plus faible. Il en est de même pour la vitesse volumique locale de croissance et, en particulier, sous éclairage rouge où une décroissance rapide est observée dans le fond du PBR. Il y a donc un effet d'autant plus marqué du spectre que l'angle d'incidence est important. De manière générale, augmenter l'angle

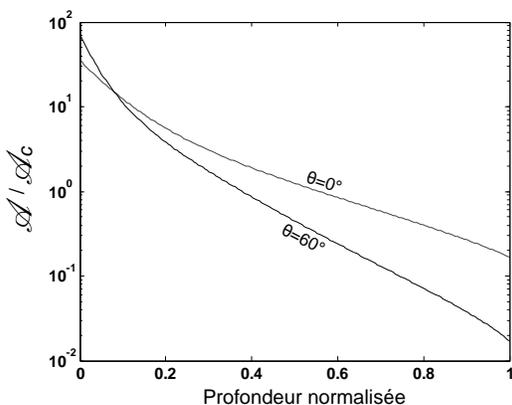
d'incidence du rayonnement revient à diminuer la distance d'absorption et donc à diminuer la fraction volumique éclairée pour un flux capté et des conditions d'absorptions identiques (*i.e.* concentration en matière sèche et teneur massique en pigments). Cela mène également à un profil de la vitesse spécifique d'absorption des photons beaucoup plus marqué, avec des effets accentués en spectre rouge du fait de l'absorption forte de cette gamme de longueur d'onde (cf. figure 4.19).

Cette différence de répartition de l'énergie disponible a un impact direct sur la vitesse volumique locale de croissance (cf. figures 4.21b et 4.21d). Le fait qu'il y ait moins d'énergie lumineuse disponible en fond de culture induit nécessairement une chute de la vitesse de production. Ce phénomène tend à être limité en incidence normale, avec au final un impact du spectre en défaveur du spectre rouge d'autant plus visible que l'angle d'incidence du rayonnement est important.

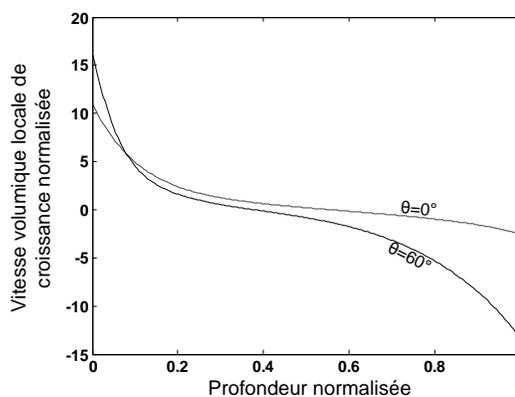
A partir des valeurs locales de vitesses volumétriques r_x , il est possible de calculer les vitesses moyennes de croissance dans le PBR, notées $\langle r_x \rangle$. Les données sont reportées dans le tableau 4.7. Les résultats confirment un effet du spectre mais surtout un effet majeur de l'angle d'incidence. Théoriquement, il est ainsi impossible d'avoir une production pour un angle d'incidence de $\theta = 60^\circ$ puisque les vitesses moyennes de production sont négatives pour cette condition. Cette pré-analyse des effets du spectre et de l'angle d'incidence permet donc de tirer quelques conclusions importantes. Ainsi, les modèles utilisés, par leur prise en compte précise du transfert de rayonnement et du couplage à la croissance, prévoient une influence directe sur les profils de vitesse d'absorption et de vitesse locale de croissance. Ceci s'explique par les effets combinés de l'absorption spectrale hétérogène des microalgues, et de l'angle d'incidence qui joue directement sur l'atténuation lumineuse. Il en ressort un couplage complexe à la croissance, notamment en fond de réacteur où les différences sont accentuées. De façon surprenante par rapport à une idée très répandue dans la littérature, un spectre blanc de lumière tend à diminuer l'influence négative de la zone sombre, avec, donc, un résultat au final positif sur la croissance globale. Ceci est d'autant plus vrai que l'angle d'incidence est élevé.

TABLE 4.7 – Productivité volumique moyenne théorique obtenue pour deux spectres (blanc et rouge) et deux angles d'incidence ($\theta = 0^\circ$ et 60°)

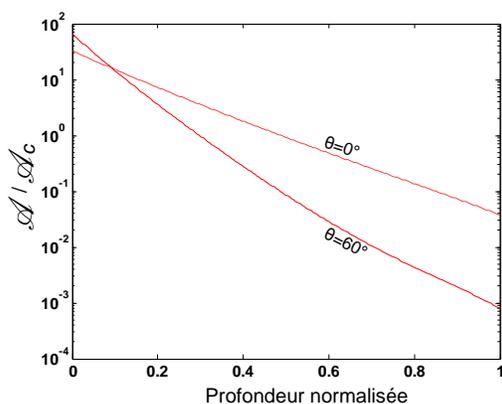
	Spectre blanc, $\theta = 0^\circ$	Spectre blanc, $\theta = 60^\circ$	Spectre rouge, $\theta = 0^\circ$	Spectre rouge, $\theta = 60^\circ$
Fraction volumique éclairée γ	0,56	0,38	0,49	0,30
$\langle r_x \rangle$ ($g.l^{-1}.h^{-1}$)	0,038	-0,047	0,005	-0,277



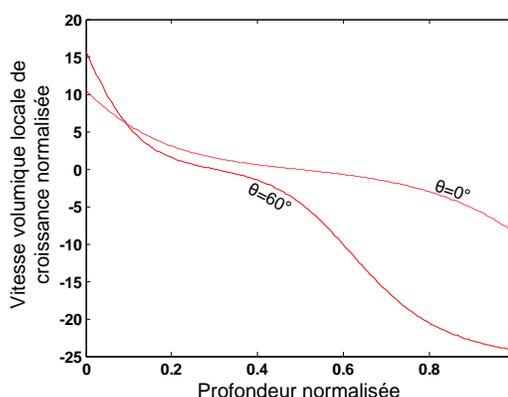
(a) Comparaison de l'atténuation théorique de l'énergie radiante avec l'angle d'incidence du rayonnement pour un spectre blanc



(b) Comparaison de la productivité volumique théorique en fonction de l'angle d'incidence du rayonnement pour un spectre blanc



(c) Comparaison de l'atténuation théorique de l'énergie radiante avec l'angle d'incidence du rayonnement pour un spectre rouge



(d) Comparaison de la productivité volumique théorique en fonction de l'angle d'incidence du rayonnement pour un spectre rouge

FIGURE 4.21 – Récapitulatif des résultats théoriques obtenus pour deux spectres incidents différents (blanc et rouge) et pour deux angles d'incidence du rayonnement ($\theta = 0^\circ$ et 60°)

4.4.4 Transmission de la lumière en maquette froide

La transmission d'un rayonnement blanc (reconstitué) et bleu + rouge a été mesurée pour deux densités de flux différentes. Les résultats sont répertoriés dans le tableau 4.10. A noter qu'entre 15% et 20% de l'absorption déterminée dans le tableau 4.10 est due uniquement à la face optique du PBR (absorption mesurée à vide). L'angle d'incidence a deux impacts sur le transfert radiatif.

Le premier effet est uniquement une conséquence de l'optique géométrique. Il impose que la densité de flux de photons reçue (q_1) à un angle θ de la direction normale du rayonnement d'une source est égale au produit de la luminance collimatée émise par la source (L_0) et du cosinus

TABLE 4.8 – Tableau de résultats obtenus en maquette froide

	Angle (°)	Densité de flux de photon incidente ($\mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Densité de flux de photon en sortie de PBR (vide) ($\mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Densité de flux de photon en sortie de PBR + culture ($\mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	% atténuation
Bleu + Vert + Rouge	0	100	88	24	76
		1000	885	251	75
	30	100	87	23	77
		1000	857	230	77
	60	100	85	21	79
		1000	818	115	89
Bleu + Rouge	0	100	89	19	81
		1000	893	147	85
	30	100	88	15	85
		1000	883	124	88
	60	100	82	11	89
		1000	816	100	90

de l'angle d'incidence du rayonnement, tel que le présente l'équation 4.10.

$$q_0 = L_0 \times \cos \theta \quad (4.10)$$

Le deuxième effet correspond à une modification du transfert de rayonnement au sein de la culture avec l'angle d'incidence du rayonnement. A ce titre, les valeurs présentées dans le tableau 4.10 montrent clairement que la densité de flux de photons transmise, pour une densité de flux de photon incidente identique, est variable en fonction de l'angle d'incidence. Pour des angles d'incidence élevés du rayonnement incident, la transmission chute en moyenne de près de 10% sous éclairage blanc (reconstitué) comme en bleu + rouge. A noter que l'absorption du rayonnement est plus faible en blanc qu'en bleu + rouge. Ceci est attendu car chaque longueur d'onde subit une atténuation différente, fonction de la capacité d'absorption de l'espèce dans le milieu. Dans le cas présent, les longueurs d'ondes autour de 550nm (correspondantes au vert) sont ainsi transmises. Dans le cas d'un éclairage de culture par une source de lumière blanche, donc polychromatique (majoritairement le cas en culture microalgale), cela conduit à reconsidérer la définition de l'obscurité dans une zone sombre du PBR, puisqu'en fond de réacteur, il subsiste des longueurs d'ondes faiblement absorbées (et notamment le vert), même à concentration en biomasse élevés. Il est à noter que dans la mesure où l'absorption de ces longueurs d'ondes par les cellules est faible mais pas nulle, cela justifie alors l'utilisation de la vitesse spécifique d'absorption des photons (\mathcal{A}) qui permet de considérer non plus l'énergie

disponible à la culture (irradiance G) mais l'énergie utile absorbée par celle-ci (tenant compte du spectre d'absorption de l'espèce considérée, cf. partie 1.2.7).

4.4.5 Analyse expérimentale des résultats

La seconde partie des expérimentations a consisté à quantifier l'impact d'une modification d'angle ou de spectre incident sur la productivité volumique mesurée en PBR opéré en chemostat, à taux de dilution fixe. A noter qu'il ne s'agit pas du taux de dilution optimale. Ce dernier à été choisi pour assurer un bon contrôle du système ; un taux de dilution trop important pouvant conduire à une instabilité de la culture. Les mesures ont été réalisées à une densité de flux reçue par la culture de $q_0 = 100 \mu\text{mol}_{h\nu} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, pour un spectre rouge et blanc, et pour une incidence normale et à 60° . Les résultats des mesures effectuées sont donnés dans le tableau 4.9. Comme lors de la pré-analyse, les productivités obtenues expérimentalement ont été ramenées à la productivité mesurée pour un angle incident normal et un spectre blanc (productivité de référence). Cette productivité est noté $r_{x_b, in}$.

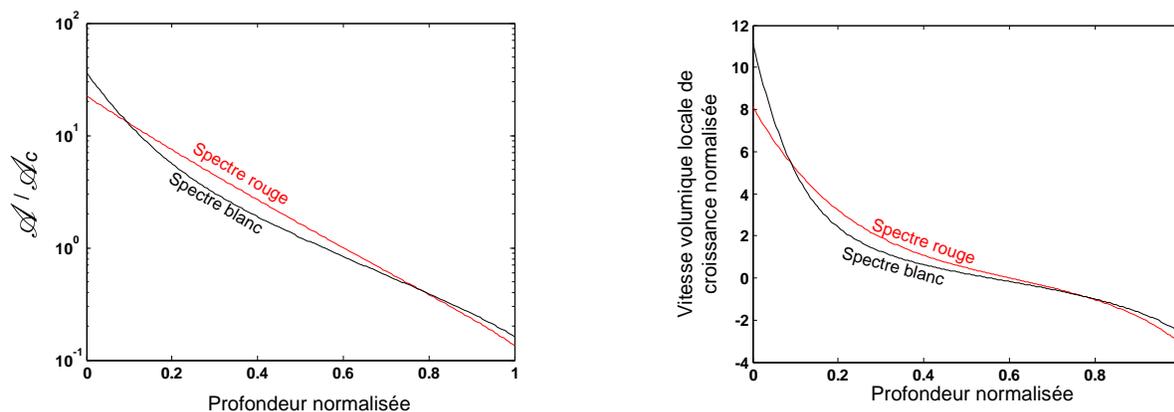
TABLE 4.9 – Tableau de résultats expérimentaux obtenus pour une culture de *C. vulgaris* sous différentes conditions d'éclairement à taux de dilution quasi constant

Résultats expérimentaux				
	Spectre blanc, $\theta = 0^\circ$	Spectre blanc, $\theta = 60^\circ$	Spectre rouge, $\theta = 0^\circ$	Spectre rouge, $\theta = 60^\circ$
D (h^{-1})	0,015	0,017	0,015	0,016
C_x ($g \cdot l^{-1}$)	2,52	1,69	2,33	1,56
ΔC_x ($g \cdot l^{-1}$)	0,05	0,02	0,07	0,02
w_{pig} (%)	5,72	8,12	4,33	5,25
r_x ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	0,0381	0,0290	0,0350	0,0250
Δr_x ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	0,0030	0,0008	0,0020	0,0018
$r_x/r_{x_b, in}$	1	0,76	0,92	0,76
Résultats théoriques (prédiction par modèle cinétique)				
C_x ($g \cdot l^{-1}$)	2,49	1,53	2,52	1,54
r_x ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	0,0373	0,0260	0,0400	0,0250
$r_x/r_{x_b, in}$	0,98	0,68	1,05	0,66

Les résultats obtenus montrent un effet prépondérant de l'angle d'incidence, le spectre de lumière affectant peu ($\theta = 0^\circ$) ou de façon négligeable ($\theta = 60^\circ$) la productivité obtenue. La différence observée sur la productivité est au maximum de l'ordre de 25%. Les essais expérimentaux montrent cependant un impact majeur sur la teneur en pigments, qui évolue quasiment d'un facteur deux sur l'ensemble des conditions testées.

En introduisant ces teneurs en pigments (cf. tableau 4.9) dans le modèle utilisé précédemment, on observe que celui-ci permet de prédire les productivités volumiques obtenues à, en moyenne 10% près, et les concentrations en biomasse sèche à 5% près. Il apparaît judicieux ici de s'appuyer sur ce modèle pour mieux expliquer les résultats expérimentaux.

Le modèle permet en effet d'avoir accès aux profils d'énergie radiante et de vitesses volumétriques locales de croissance. On observe ainsi qu'il y a peu de différences sur l'atténuation de la lumière et la vitesse de croissance, que ce soit en incidence normale (cf. figure 4.22a et 4.22b) ou à $\theta = 60^\circ$ (cf. figure 4.23a).



(a) Évolution de la vitesse d'absorption de l'énergie radiante dans la profondeur de culture pour $\theta = 0^\circ$

(b) Évolution de la productivité volumique normalisée avec la productivité moyenne de référence dans la profondeur de culture pour $\theta = 0^\circ$

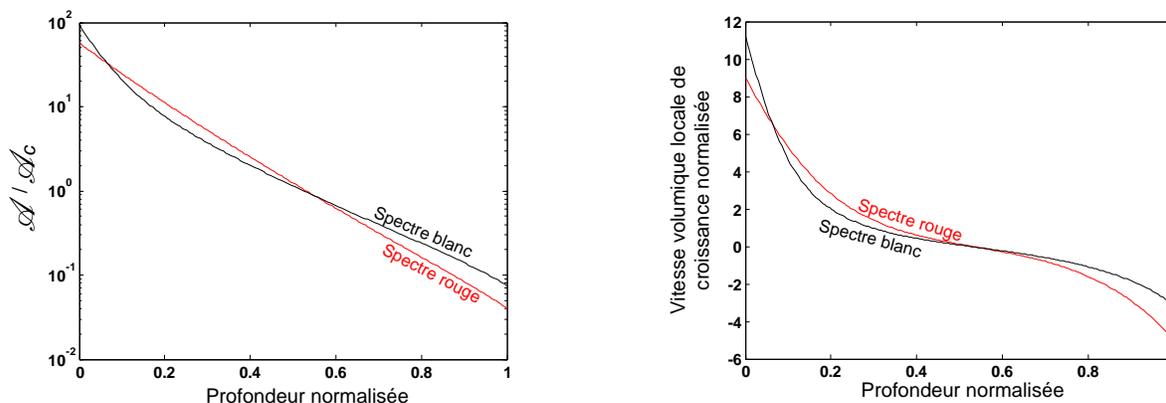
FIGURE 4.22 – Évolution expérimentale de l'atténuation de l'énergie radiante et de l'évolution de la productivité volumique dans l'épaisseur de culture pour une incidence non normale ($\theta = 0^\circ$) du rayonnement blanc ou rouge

Ces résultats apparaissent contradictoires par rapport à la pré-analyse théorique où un effet majeur avait été observé. Il faut toutefois rappeler que celle-ci a été faite pour une teneur en pigment fixe.

Cela met donc en évidence ici le rôle de l'adaptation pigmentaire. Cette adaptation joue ici un rôle extrêmement important puisqu'elle permet :

1. de moduler l'atténuation de la lumière dans la culture,
2. de jouer de façon rétroactive sur la concentration d'équilibre obtenue,
3. d'imposer finalement une productivité peu modifiée selon le spectre incident mais, également, de l'angle d'incidence.

Comme il a été montré de façon théorique, sans cette adaptation, les effets seraient fortement néfastes du point de vue productivité sous spectre monochromatique et incidence non normale. Le tableau 4.10 résume cela en présentant les résultats obtenus expérimentalement et ceux obtenus par modélisation sans adaptation pigmentaire.



(a) Évolution de la vitesse d'absorption de l'énergie radiante dans la profondeur de culture pour $\theta = 60^\circ$

(b) Évolution de la productivité volumique normalisée avec la productivité moyenne de référence dans la profondeur de culture pour $\theta = 60^\circ$

FIGURE 4.23 – Évolution expérimentale de l'atténuation de l'énergie radiante et de l'évolution de la productivité volumique dans l'épaisseur de culture pour une incidence non normale ($\theta = 60^\circ$) du rayonnement blanc ou rouge

Ces résultats montrent que, sans adaptation, la production de microalgues serait beaucoup plus sensible au rayonnement à angle d'incidence non normal. L'atténuation de la lumière sous éclairage blanc serait ainsi nettement plus importante à $\theta = 60^\circ$ et impliquerait une diminution de la profondeur d'atténuation de 32% sans adaptation alors que l'expérience (donc avec adaptation pigmentaire) montre une diminution seulement de 5%. Il en est de même sous éclairage rouge où, sans adaptation, la profondeur d'atténuation serait impacté négativement de 50%, alors que, expérimentalement, elle n'est impactée que de 12%.

Il est intéressant également d'analyser l'effet des différentes conditions sur les concentrations en biomasse sèche obtenues. En effet, si la productivité reste quasiment constante du fait d'une adaptation pigmentaire élevée, il en est tout autre pour la biomasse. Ainsi, en passant de $\theta = 0^\circ$ à $\theta = 60^\circ$, une diminution de la concentration de 45% est observée, que ce soit en éclairage blanc ou rouge. Il est donc tout à fait surprenant d'observer que l'adaptation pigmentaire, très forte dans le cas présent, tend à maintenir la productivité du PBR constante, et non la biomasse elle-même. Dans la mesure où cette biomasse joue directement sur l'atténuation de lumière, tout comme les pigments, le contraire aurait pu être attendu.

De la même façon, l'adaptation pigmentaire permet au final de limiter grandement l'effet du spectre, mais également de l'angle d'incidence. Sans adaptation, pour un angle d'incidence du rayonnement $\theta = 60^\circ$, il ne pourrait pas y avoir de production ; une productivité négative a ainsi été obtenue dans la pré-analyse théorique. Or, expérimentalement, les productivités obtenues pour un tel angle d'incidence sont impactées "seulement" de 36% sous éclairage blanc et de 10% sous éclairage rouge. Une grande partie de l'effet dû aux variations du spectre et de l'angle incident est atténuée par l'adaptation de la teneur massique en pigments dans la biomasse.

Les résultats obtenus dans cette partie amènent également quelques conclusions pertinentes sur l'intérêt de moduler le spectre pour optimiser la production en PBR. Cette idée, très répandue

TABLE 4.10 – Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux du transfert radiatif et de son impact sur la productivité de la culture pour deux spectres différents (rouge et blanc) et pour deux angles d'incidence différents (0° et 60°)

Résultats expérimentaux (avec adaptation pigmentaire)				
	Spectre blanc, $\theta = 0^\circ$	Spectre blanc, $\theta = 60^\circ$	Spectre rouge, $\theta = 0^\circ$	Spectre rouge, $\theta = 60^\circ$
γ	0,56	0,53	0,6	0,53
w_{pig} (%)	5,23	8,04	3,05	4,13
C_x ($g.l^{-1}$)	2,52	1,39	1,77	1,59
r_x ($g.l^{-1}.h^{-1}$)	0,038	0,024	0,029	0,026
$r_x/r_{x_{b,in}}$	1	0,80	1,09	0,66
Résultats théoriques (sans adaptation pigmentaire)				
γ	0,56	0,38	0,49	0,30
r_x ($g.l^{-1}.h^{-1}$)	0,038	-0,047	0,005	-0,277
$r_x/r_{x_{b,in}}$	1	-1,25	0,12	-7,38

dans la littérature, amène souvent à la conclusion d'une productivité améliorée en spectre rouge privilégiant l'absorption par les pigments. Comme cela a été montré, cela n'est pas systématique et dépend notamment des conditions d'absorption de lumière. Si celles-ci sont fortes (taux de dilution faible, concentration en biomasse élevée), la lumière blanche amènera à de meilleurs résultats. Pour des absorptions modérées (taux de dilution proche de l'optimum), la productivité obtenue en lumière rouge sera plus élevée. Il est à noter que ce raisonnement est valable si on raisonne en flux de photon identique. Si on considère l'aspect énergétique, l'énergie incidente sera donc différente puisque les spectres sont différents. Il y a ainsi 16% d'énergie disponible en moins dans le cas de l'éclairage rouge. En reprenant les courbes expérimentales de productivité volumique obtenues en PBR torique (cf. figure 4.13), cela permet d'estimer qu'au taux de dilution optimal, avec 16% d'énergie disponible en moins, une productivité supérieure de 13% et une concentration maximale supérieure de 11% seront obtenues sous éclairage rouge. La teneur en pigment sera par contre réduite de 13%.

4.5 Conclusion

Ce chapitre était dédié à l'étude et à la modélisation de la croissance de *C. vulgaris* en PBR. La première partie a consisté à résumer l'ensemble de la chaîne de détermination des propriétés radiatives (PR, coefficients d'absorption, de diffusion et la fraction rétrodiffusée) de la microalgue *C. vulgaris*. Ces coefficients définissent les phénomènes d'absorption et de diffusion dans la suspension et sont à la base de la modélisation du transfert radiatif. Leur détermination repose sur la méthode largement développée à l'Institut Pascal de Clermont-Ferrand et reprise récemment par Dauchet (Dauchet, 2012). Dans un premier temps, il est nécessaire de

déterminer l'indice de réfraction de *C. vulgaris*. Cet indice est un nombre complexe reflétant l'absorption (partie imaginaire) et la diffusion (partie réelle) d'un photon par la cellule. Bien que la partie imaginaire puisse être déterminée par simple convolution des spectres des pigments purs, la partie réelle nécessite une méthodologie nettement plus avancée. La méthode utilisée dans ce travail s'appuie sur les travaux de Dauchet (Dauchet, 2012) qui a utilisé la théorie de Kramers-Krönig soustractive à point d'ancrage. Cette méthode consiste à imposer une valeur mesurée à une longueur d'onde où l'absorption par les microorganismes est nulle, obligeant l'ensemble de l'évolution de la partie réelle de l'indice de réfraction à passer par cette valeur. Ensuite, la détermination des sections efficaces d'absorption et diffusion (et par extension les coefficients massiques d'absorption et de diffusion) nécessite de faire une hypothèse soit sur l'électro-magnétisme (approximation de la diffusion anormale) soit sur la forme (solution de Lorenz-Mie, applicable pour les sphères parfaites). Une fois les propriétés radiatives déterminées, le transfert de rayonnement dans la culture est ensuite résolu et les résultats peuvent être comparés à une mesure du spectre de transmission normal-hémisphérique.

Cette chaîne de détermination des PR a par la suite subi une analyse de sensibilité. Cette dernière a permis de mettre en évidence la nécessité d'avoir une mesure de biomasse sèche (nécessaire pour obtenir la teneur en pigment, et donc la partie imaginaire de l'indice de réfraction complexe des cellules) la plus précise possible. En effet, une variation de $\pm 10\%$ peut faire doubler l'écart entre la théorie et la mesure par rapport à la valeur de référence. Dans notre cas, il a été notamment mis en évidence une erreur due probablement à une mauvaise quantification de la concentration en pigments. En effet, une réduction de 30% de la teneur massique en chlorophylle a a permis d'améliorer les prédictions en terme de transmission du rayonnement. Cette diminution, bien qu'arbitraire, peut être justifiée par le fait que, lors des mesures des taux de pigments, des coefficients génériques ont été utilisés pour relier les absorbances mesurées aux concentrations en pigment. Une perspective à ce travail reste donc la mise en place d'un protocole de mesure fiable et précis du taux de pigmentation dans la cellule.

A partir de ces résultats, connaissant la répartition moyenne en chacune des trois espèces pigmentaires majoritairement présentes dans la biomasse, une base de données des coefficients massiques moyens d'absorption et de diffusion a été créée pour *C. vulgaris*.

La seconde partie de ce chapitre a traité de la modélisation cinétique de croissance de *C. vulgaris*. Ce modèle, développé par Takache sur la microalgue *C. reinhardtii* (Takache, 2010) se compose de deux termes : l'un lié à la croissance par photosynthèse et l'autre lié à la respiration. Il se base sur deux jeux de paramètres. Le premier peut être déterminé théoriquement et comporte : le rapport entre les flux cyclique et acyclique d'électrons ($P/2e^-$), le coefficient stœchiométrique de conversion du $NADH_2$ en biomasse (ν_{NADH_2}), le rendement quantique stœchiométrique massique ($\bar{\Phi}$) et molaire ($\bar{\Phi}'$). Le second est calé sur les points expérimentaux et définit les valeurs du coefficient de demi-saturation de la photosynthèse, l'irradiance de compensation, la vitesse spécifique de régénération du cofacteur et le coefficient d'inhibition de la respiration à la lumière. Une fois l'ensemble de ces paramètres déterminé, le modèle obtenu a permis de prédire les performances en terme de productivité volumique à en moyenne 10%

sur une large gamme de taux de dilution considéré ($0 - 0,07h^{-1}$), pour deux géométries de PBR différentes (Flat Panel et Torique) et des conditions d'éclairement différentes en spectres et angles d'incidence.

D'une façon générale, cela a validé la robustesse du modèle existant pour appréhender de nombreux cas, y compris ceux induits par l'utilisation solaire de technologie HPV. Il a néanmoins été observé la nécessité d'introduire précisément la teneur en pigment qui s'est révélée très variable chez *C. vulgaris*. La connaissance de cette grandeur a conduit à créer une table des propriétés radiatives, utilisée par la suite pour simuler les différents cas.

Une deuxième partie a consisté en l'étude détaillée de l'influence des conditions spécifiques d'éclairement, à savoir une variation de spectre (blanc reconstitué et rouge) et une variation de l'angle d'incidence du rayonnement lumineux. Ces conditions ont été retenues puisqu'elles sont essentielles à la compréhension de cultures sous flux incident solaire.

Dans un premier temps, des mesures de transmissions ont été réalisées. Le but était de démontrer un effet de l'angle d'incidence, à savoir une augmentation de l'absorption du rayonnement, du fait du trajet optique plus grand. Les résultats ont montré qu'effectivement, du fait d'une augmentation artificielle du trajet optique, les valeurs de transmissions sont plus faibles lorsque l'angle d'incidence est élevé. A partir de là, une pré-analyse théorique des résultats a pu être effectuée, en prenant en compte les résultats prédits par le modèle, pour des conditions d'atténuation (concentration en biomasse sèche et pigments) fixes. Les résultats de cette pré-analyse ont permis de mettre en avant un effet du spectre ainsi qu'un effet encore plus important de l'angle d'incidence sur les productivités à attendre en biomasse.

Vis-à-vis du spectre, le fait que les radiations vertes présentes dans l'éclairage blanc ne soient que très peu absorbées par la culture, induit une pénétration plus profonde du rayonnement. A l'opposé, les radiations rouges sont absorbées très rapidement. Cela impacte directement l'évolution des vitesses de productions locales puisque, dans ce cas où la concentration en biomasse et la teneur en pigment sont identiques, les vitesses obtenues en rouge montrent une chute importante due à une atténuation plus rapide du rayonnement. Du point de vue de l'angle d'incidence qui accentue cet effet, cette pré-analyse a ainsi montré que dans des conditions identiques de concentrations en biomasse et pigments, la production de microalgue est impossible à $\theta = 60^\circ$. Ces résultats ont par la suite été confrontés aux résultats obtenus expérimentalement. Cette comparaison a confirmé une très forte adaptation pigmentaire de *C. vulgaris*, qui s'est révélée avoir un effet bénéfique sur les productivités des systèmes de culture, en diminuant très fortement les effets négatifs de l'angle d'incidence et du spectre sur l'atténuation rapide de la lumière. Cette adaptation pigmentaire se révèle donc au final un phénomène majeur, et se révèle comme une perspective majeure des résultats obtenus. Actuellement, la teneur en pigments n'est pas prédite mais est une entrée du modèle. De plus, c'est un phénomène complexe au niveau biologique, et qui est très sensible comme on a pu l'observer dans nos expérimentations. Il a ainsi été montré l'influence du spectre incident, bien connu par ailleurs. D'autre part, de façon beaucoup plus surprenante, l'adaptation pigmentaire s'est révélée influencée par l'angle d'incidence du flux (lui même étant constant) sur le PBR. Dans les deux cas (spectre et angle d'incidence), l'adaptation pigmentaire, en jouant également sur la concentration d'équilibre obtenue, a eu

un effet bénéfique sur les performances du système en terme de productivité. On notera cependant que l'ensemble des expérimentations a porté sur des états stabilisés. En régime solaire, la photoadaptation sera à considérer de façon dynamique, ce qui introduit une problématique spécifique qui reste à étudier.

Conclusion

La culture pour la production de microorganismes photosynthétiques a subi un réel essor, notamment depuis 1990 (environ 20 articles publiés annuellement (google scholar) contre plus de 2000 en 2012). Il s'avère en effet que le champ potentiel d'applications des microorganismes photosynthétiques est très large, allant de l'agroalimentaire à la production de bio-énergies, en passant par la cosmétique et la pharmaceutique. La production de biomasse se fait dans des réacteurs, ouverts ou fermés, dont la taille et la géométrie varient selon l'application souhaitée. L'un des enjeux majeurs actuels réside dans la mise en place de technologies solaires et intensifiées de photobioréacteurs (PBR). En effet, les nombreux progrès réalisés ces dernières années en ingénierie des PBR, et en particulier en lumière artificielle, ouvrent des perspectives intéressantes sur le déploiement de ces technologies.

Ce travail de thèse s'est inscrit dans cette problématique, en visant à contribuer à la compréhension du comportement de culture de microorganismes photosynthétiques en PBR intensifiés (milieu confiné, haute densité cellulaire) et sous conditions singulières d'éclairage (spectre et angle d'incidence différents).

En premier lieu, l'étude a porté sur la rhéologie de suspensions de *Chlorella vulgaris* sur une large gamme de fractions volumiques. En effet, l'intensification de la culture de microalgues conduit à l'augmentation de la productivité volumique, et donc de la concentration en biomasse. Cela peut engendrer une perturbation de l'hydrodynamique, celle-ci revêtant pourtant un caractère essentiel si on veut maintenir les performances des systèmes lorsque les hautes productivités volumiques sont atteintes. L'objectif de cette première partie a donc été de caractériser la rhéologie de suspensions de microalgues concentrées. Cette étude a montrée que la rhéologie dépendait essentiellement de trois paramètres, à savoir la fraction volumique (correspondant à la concentration), l'intensité de la contrainte appliquée au fluide (traduit par le nombre de Péclet) et le temps d'application de cette contrainte (traduit par le nombre de Deborah). Concrètement, pour une fraction volumique supérieure à 11,5% (soit 29g.l^{-1} pour *C. vulgaris*), le comportement rhéologique devient fortement non newtonien, avec une forte dépendance temporelle ainsi qu'une thixotropie non-négligeable. Il a également été mis en évidence que la modification du comportement rhéologique est due à la formation d'agrégats cellulaires du fait de la proximité des cellules et de leur attraction mutuelle. L'application d'un niveau de contrainte suffisant permet de s'affranchir de ce phénomène.

La suite de l'étude s'est intéressée à l'écoulement de ces suspensions en milieu confiné, ici un

micro-canal, dans le but de se rapprocher des conditions rencontrées en PBR intensifiés qui imposent une mise en écoulement dans des géométries de faibles épaisseurs. Les profils de vitesses, obtenus par suivi numérique de particules (DPIV) au sein du micro-canal, ont permis de corroborer les résultats obtenus en terme de rhéologie. En effet, pour des fractions volumiques inférieures à 10%, les profils obtenus sont de type Poiseuille, caractéristiques d'un fluide newtonien. Pour des fractions volumiques supérieures, les profils s'aplatissent progressivement jusqu'à atteindre des écoulements de type bouchon. A noter qu'avec la montée en concentration des suspensions, l'irréversibilité des profils de vitesses s'accroît et un important glissement à la paroi apparaît. Cette étude a également confirmé par observation l'apparition d'agrégats cellulaires en écoulement.

L'utilisation de PBR intensifiés sous éclairage solaire implique des conditions d'illumination variables, notamment au niveau de l'angle d'incidence du rayonnement collimaté et du spectre d'émission. L'étude de l'impact de ces conditions sur la productivité volumique de la culture a constitué la seconde partie de ce travail de thèse. Elle a été réalisée en trois étapes.

Tout d'abord, les propriétés radiatives, nécessaires au calcul du transfert de rayonnement au sein de la culture, ont été déterminées. On notera ici que la méthode de calcul prédictif présentée reste perfectible, notamment au niveau de la détermination expérimentale de certaines données comme la teneur en pigment dont l'influence sur le calcul des propriétés radiatives se révèle extrêmement sensible. Des mesures supplémentaires sont en cours de réalisation pour vérifier ce point. Ceci a conduit à la production d'une base de données des propriétés radiatives pour différentes concentrations en pigments totaux, la répartition des trois espèces pigmentaires restant égale sur l'ensemble des expérimentations réalisées.

Ensuite, de façon à prédire les performances en culture, un modèle cinétique de croissance adapté à la souche microalgale étudiée a été mis en place, sur la base du modèle cinétique développé par Takache pour *Chlamydomonas reinhardtii* (Takache, 2010) et repris par Dauchet (Dauchet, 2012). Ce modèle a été calé sur les résultats expérimentaux obtenus en culture continue photolimitée. Ces résultats expérimentaux ont par ailleurs montré une très forte adaptation pigmentaire de *C. vulgaris* en fonction du taux de dilution, et donc des conditions d'atténuation de lumière dans le réacteur.

Enfin, grâce au modèle cinétique de croissance associé à la modélisation du transfert radiatif, l'impact des conditions spécifiques d'éclairement sur la productivité volumique de la culture en PBR intensifié a pu être étudié en détails. La modélisation s'est révélée en effet un atout moyen pour expliquer avec précision les expérimentations dédiées en photobioréacteur. Une pré-analyse théorique des résultats, réalisée pour une pigmentation identique dans chacun des quatre cas, a ainsi confirmé un impact significatif du spectre et de l'angle d'incidence. Pour un angle d'incidence de 60°, la production s'est révélée impossible théoriquement, du fait de la diminution importante de la pénétration de lumière par l'angle d'incidence élevé. Ce résultat a été contredit par l'expérience, où malgré un effet négatif sur la productivité (jusqu'à 34% de la valeur de référence obtenue en éclairage blanc, collimaté et incidence normale), une production de biomasse a été observée. Cela a été expliqué par l'adaptation pigmentaire qui joue sur la transmission

de l'énergie lumineuse au sein de la culture et tend alors à diminuer l'atténuation lumineuse en faveur des vitesses volumiques de croissance de sorte que, finalement, l'effet des conditions spécifiques d'éclairement soit atténué. L'introduction de ce phénomène d'adaptation pigmentaire a aussi permis de représenter l'ensemble des résultats obtenus, que ce soit sur l'influence du spectre ou de l'angle d'incidence, dans des photobioréacteurs conventionnels ou intensifiés.

Ce travail ouvre de nombreuses perspectives. Cela concerne en particulier le couplage entre la rhéologie et l'hydrodynamique où il serait intéressant de prolonger l'étude sur d'autres microorganismes, avec des formes et sensibilités au cisaillement différentes. Les résultats obtenus dans ce mémoire montrent également que l'optimisation hydrodynamique de PBR intensifiés, bien qu'importante, est un vrai défi. Cela nécessite en effet de bien appréhender des écoulements non newtoniens en milieu très confiné (quelques millimètres entre parois). Compte tenu des phénomènes observés (formation d'agglomérats, thixotropie), cela se révèle complexe à réaliser. A ce stade, on peut donner quelques pistes, comme contrôler le niveau de contrainte dans l'ensemble de la culture pour (i) éviter l'endommagement des cellules avec le cisaillement (limite restant à définir par ailleurs) et (ii) limiter la formation d'agrégats cellulaires lorsque les hautes densités cellulaires sont atteintes (typiquement, au delà de $60g.l^{-1}$) et qui ont alors un impact majeur sur l'écoulement en diminuant les performances de mélange. On peut également citer ici que la présence d'agrégats cellulaire au sein de l'écoulement perturbera aussi la transfert radiatif, et donc les performances globales des systèmes de culture.

De façon générale, les modèles existants, aussi bien en transfert de rayonnement que sur la cinétique de croissance, se sont révélés aptes à prédire correctement des conditions très particulières d'utilisation imposées par un usage solaire. On a pu toutefois observer que le modèle cinétique de croissance ne permettait pas de prédire très précisément la concentration en biomasse élevée atteinte pour des taux de dilution faibles. Une possibilité serait alors de reformuler le modèle, notamment la partie correspondante à la réaction de respiration. A noter que cet aspect avait déjà été identifié par Takache (Takache, 2010). Il reste donc à ce jour une problématique non résolue. Finalement, en perspective majeure, on peut citer que ce travail s'est focalisé sur des états stationnaires de fonctionnement des photobioréacteurs. Le raisonnement doit donc être étendu en dynamique, *i.e.* en tenant compte des variations d'angle et de spectre incident inhérent à un usage solaire. Cela passera en particulier par l'étude dynamique de l'adaptation pigmentaire au sein de cultures, permettant de connaître, d'une part, la réactivité d'une culture à un changement brusque de conditions d'éclairement et, d'autre part, son adaptation à des variations plus lentes telles que celles dues aux cycles solaires ou toute autre modification des conditions d'atténuation de lumière.



Nomenclature

\mathcal{A}	Vitesse volumétrique d'absorption des photons	$[\mu mol_{h\nu}.m^{-3}.s^{-1}]$
$\langle \mathcal{A} \rangle$	Vitesse volumétrique moyenne d'absorption des photons	$[\mu mol_{h\nu}.m^{-3}.s^{-1}]$
\mathcal{A}	Vitesse spécifique d'absorption des photons	$[\mu mol_{h\nu}.kg^{-1}.s^{-1}]$
A	Absorbance	[-]
a	Coefficient d'absorption volumique	[-]
a_S	Surface spécifique éclairée	$[m^2.m^{-3}]$
\bar{b}_2	Coefficient de rétro-diffusion	[-]
c	Célérité de la lumière dans le vide	$[m.s^{-1}]$
C_x	Concentration massique en biomasse sèche	$[kg.m^{-3}]$
D	Taux de dilution	$[h^{-1}]$
De	Nombre de Déborah	[-]
E	Énergie	[-]
Ea	Coefficient massique d'absorption de l'énergie radiante	$[m^2.kg_X^{-1}]$
Es	Coefficient massique de diffusion de l'énergie radiante	$[m^2.kg_X^{-1}]$
G	Irradiance	$[\mu mol_{h\nu}.m^{-2}.s^{-1}]$
h	Constante de Planck	$[J.s^{-1}]$
I	Intensité lumineuse	$[W.m^{-2}]$
IC	Intervalle de confiance	[-]
$\mathbf{J}_{E_{TOT}}$	Énergie volumique totale	[-]
k_B	Constante de Boltzmann	$[J.K^{-1}]$
K	Coefficient de demi-saturation de la photosynthèse	$[\mu mol_{h\nu}.m^{-2}.s^{-1}]$
K_S	Coefficient de demi-saturation en substrat considéré	[-]
L	Épaisseur de culture	[m]
m_a	Coefficient massique d'extinction	[-]
n	Degré de collimation du flux lumineux	[-]
n_ν	Partie réelle de l'indice de réfraction	[-]

N_p	Nombre de cellule par unité de volume	$[cell.l^{-1}]$
$p_\lambda(\theta, \theta')$	Fonction de phase	[-]
Pe	Nombre de Péclet	[-]
P_x	Productivité volumique	$[g.l^{-1}.h^{-1}]$
q	Densité de flux de photon	$[\mu mol_{hv}.m^{-2}.s^{-1}]$
q_Ω	Densité de flux de photon hémisphérique	$[\mu mol_{hv}.m^{-2}.s^{-1}]$
r	Rayon	[m]
R	Constante des gaz parfaits	$[J.mol^{-1}.K^{-1}]$
Re	Nombre de Reynolds	[-]
r_S	Productivité surfacique	$[kg_X.m^{-2}.h^{-1}]$
r_X	Vitesse volumique locale de croissance	$[kg_X.m^{-3}.h^{-1}]$
S	Substrat	$[kg.m^{-3}]$
t	temps	[s]
T	Température	[K]
$T_n(\epsilon)$	Polynôme de Tchebychev	[-]
V	Volume	$[m^3]$
w_λ	Spectre énergétique	$[W.m^{-1}]$
w'_λ	Spectre photonique	$[\mu mol_{hv}.m^{-1}.s^{-1}]$
w_{sec}	Fraction massique en matière sèche intracellulaire	[-]
x_w	Fraction volumique en eau intracellulaire	[-]
y	Ordre de déformation d'une particule de Tchabytchev	[-]
z	Cote dans l'épaisseur de culture	[m]

Lettres Grecques

α	Module linéique d'absorption	[-]
δ	Module linéique de diffusion	$[m^{-1}]$
ΔP	Différence de pression	[Pa]
ϵ	Paramètre de déformation d'une particule de Tchebychev	[-]
η	Viscosité	$[Pa.s]$
γ	Fraction volumique éclairée	[-]
$\dot{\gamma}$	Taux de cisaillement	$[s^{-1}]$
κ_λ	Partie imaginaire de l'indice de réfraction	[-]

λ	Longueur d'onde	$[nm]$
μ	Taux de croissance	$[h^{-1}]$
μ_m	Terme de maintenance	$[h^{-1}]$
ν	Fréquence de rayonnement	$[Hz]$
ω	Angle solide	$[sr]$
Ω	Vitesse angulaire	$[rad.s^{-1}]$
$\bar{\phi}$	Rendement stœchiométrique quantique massique	$[kg_X \cdot \mu mol_{h\nu}^{-1}]$
Φ_v	Fraction volumique en cellule	$[-]$
ρ	Masse volumique	$[kg.m^{-3}]$
ρ_M	Rendement photochimique maximum	$[-]$
ρ_r	Coefficient de réflectivité	$[-]$
$\dot{\rho}_U$	Densité massique interne d'énergie	$[-]$
σ	Section efficace	$[m^2]$
τ	Contrainte de cisaillement	$[Pa]$
θ	Angle	$[^\circ]$

Indices

0	Relatif à l'origine
abs	Relatif à l'absorption
br	Relatif au mouvement Brownien
c	Relatif au point de compensation
D	Relatif au caractère sec du produit
ic	Intracellulaire
l	Relatif à la limitation
max	Relatif au maximum
min	Relatif au minimum
moy	Relatif à la moyenne
opt	Relatif à l'optimum
p	Relatif à la particule (cellule)
r	Relatif
s	Relatif au point de saturation
sca	Relatif à la diffusion du rayonnement

w Relatif au caractère humide du produit

Exposants

* État excité
m Maximum
rms Root mean square
std Standard deviation

Abréviations

ADA Approximation de la Diffraction Anomale
ADP Adénosine Di-Phosphate
ATP Adénosine Tri-Phosphate
CCD Charge-Coupled Device (capteur photographique)
Chla Chlorophylle a
Chlb Chlorophylle b
DiCoFLuV Dilution Contrôlée du Flux Lumineux en Volume
EDTA Éthylène Diamine Tétracétique Acide
EPS Extracellular Polymeric Substances
FAD Flavine adéine dinucléotide, forme oxydée
FADH₂ Flavine adéine dinucléotide, forme réduite
Fd Ferrédoxine
FP Flat Plate photobioréacteur
FNR Enzyne Ferrédoxine NADP réductase
FODL Fibre Optique à Diffusion Latérale
G3P Glycéraldéhyde 3-phosphate
HectoR Hectolitre Réacteur
HPV Haute Productivité Volumique
L/D cycles Light/Dark cycles - régimes fluctuants de lumière
LED Diode Électro-Luminescente
LHCII Light Harvesting Complex II
MMC Méthode de Monte-Carlo

MS	Matière Sèche
NADP ⁺	Nicotiamine Adénine Dinucléotide Phosphate, forme oxydée
NADPH, H ⁺	Nicotiamine Adénine Dinucléotide Phosphate, forme réduite
P680	Centre réactionnel du PSII
P700	Centre réactionnel du PSI
PAR	Photosynthetically Active Radiations
PAV	PieAxial Vibrator
PBR	Photobioréacteur
PFD	Photon Flux Density
PIV	Particles Image Velocimetry
PMMA	PolyMéthAcrylate de Méthyle (en français) ou PolyMéthylMéthAcrylate (en anglais)
PPC	Photo-Protective Caroténoïdes
PQ	Plastoquinone
PSI	Photosystème I
PS II	Photosystème II
PTIV	Particles Tracking Image Velocimetry
Q	Ubiquinone, forme oxydée
QH ₂	Ubiquinone, forme réduite
Q _p	Quotient photosynthétique
Q _R	Rapport de vitesse entre la production d'une molécule de CO ₂ et la consommation d'une molécule de O ₂
QR _{CO₂}	Quantum Requirement for CO ₂ fixation
QR _{O₂}	Quantum Requirement for oxygen production
RuBisCO	Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase
ST	Shear-Thinning - Rhéo-fluidifiant
YS	Yield Stress - Visco-plastique



Bibliographie

- Adesanya, V. O., Vadillo, D. C., and Mackley, M. R. (2012). The rheological characterization of algae suspensions for the production of biofuels. *Journal of Rheology*, 56(4) :925–939.
- Agassant, J. F., Avenas, P., Sergent, J. P., and Carreau, P. (1977). *Polymer Processing. Principles and Modelling*. Hanser Publishing : Munich, Germany.
- Ahmad, A., Mat Yasin, N., Derek, C., and Lim, J. (2012). Crossflow microfiltration of microalgae biomass for biofuel production. *Desalination*.
- Alexandrov, G. A. and Yamagata, Y. (2007). A peaked function for modeling temperature dependence of plant productivity. *Ecological Modelling*, 200(1–2) :189 – 192.
- Allen, J., De Paula, W., Puthiyaveetil, S., and Nield, J. (2011). A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 16(12) :645–655.
- Andrews, J. F. (1968). A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 10(6) :707–723.
- Artu, A. (En cours). *Etude et développement de photobioréacteurs solaires pour la culture contrôlée de microalgues et cyanobactéries*. thèse de doctorat, Université de Nantes.
- Azofeifa, D. E., Arguedas, H. J., and Vargas, W. E. (2012). Optical properties of chitin and chitosan biopolymers with application to structural color analysis. *Optical Materials*.
- Basu, H., Vecchio, A., Flider, F., and Orthoeter, F. (2001). Nutritional and potential disease prevention properties of carotenoids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78 :665–675.
- Becker, W. (2007). *Microalgae in Human and Animal Nutrition*. Blackwell Publishing Ltd.
- Berberoglu, H. and Pilon, L. (2007). Experimental measurements of the radiation characteristics of *Anabaena variabilis* {ATCC} 29413-u and *Rhodospira rubra* {ATCC} 49419. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(18) :4772 – 4785.
- Bernard, O. and Rémond, B. (2012). Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. *Bioresource Technology*, 123(0) :520 – 527.
- Bidigare, R. R., Ondrusek, M. E., Morrow, J. H., and Kiefer, D. A. (1990). In-vivo absorption properties of algal pigments. *Proc. SPIE*, 1302 :290–302.
- Blanc, G., Duncan, G., Agarkova, I., Borodovsky, M., J. Gurnon, A. K., Lindquist, E., Lucas, S., Pangilinan, J., Polle, J., Salamov, A., Terry, A., Yamada, T., Dunigan, D., Grigoriev,

- I., Claverie, J.-M., and Etten, J. V. (2010). The *Chlorella variabilis* nc64a genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *The Plant Cell*, 22 :2943–2955.
- Buscall, R. (2010). Letter to the editor : Wall slip in dispersion rheometry. *Journal of Rheology*, 54(6) :1177–1183.
- Campbell, N. and Reece, J. (2004). Biologie. adaptation et révision scientifique de R. Mathieu.
- Capelli, B. and Cysewski, G. (2010). Potential health benefits of spirulina microalgae*. *Nutrition*, 9(2) :19–26.
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A., and Malcata, F. X. (2006). Microalgal reactors : A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*, 22(6) :1490–1506.
- Cassano, A., Martin, C., Brandi, R., and Alfano, O. (1995). Photooreactor analysis and design : fundamentals and applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 34(7) :2155–2201.
- Castelain, C., Berger, D., Legentilhomme, P., Mokrani, A., and Peerhossaini, H. (2000). Experimental and numerical characterisation of mixing in a steady spatially chaotic flow by means of residence time distribution measurements. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 43(19) :3687 – 3700.
- Castelain, C., Mokrani, A., Guer, Y. L., and Peerhossaini, H. (2001). Experimental study of chaotic advection regime in a twisted duct flow. *European Journal of Mechanics - B/Fluids*, 20(2) :205 – 232.
- Chandrasekhar, S. (1960). *Radiative transfer*. Dover Publications, New York.
- Chen, C.-Y., Kao, P.-C., Tsai, C.-J., Lee, D.-J., and Chang, J.-S. (2013). Engineering strategies for simultaneous enhancement of c-phycoerythrin production and CO₂ fixation with spirulina platensis. *Bioresource Technology*.
- Chu, C.-M. and Churchill, S. W. (1955). Numerical solution of problems in multiple scattering of electromagnetic radiation. *The Journal of Physical Chemistry*, 59(9) :855–863.
- Cogne, G., Gros, J.-B., and Dussap, C.-G. (2003). Identification of a metabolic network structure representative of arthrospira (spirulina) platensis metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(6) :667–676.
- Cornet, J.-F. (2005). Theoretical foundations and covariant balances for chemical engineering applications with electromagnetic field. *Chemical Engineering Communications*, 192(5) :647–666.
- Cornet, J.-F. (2007). *Procédés limités par le transfert de rayonnement en milieu hétérogène*. Habilitation à diriger des recherches, Université Blaise Pascal.
- Cornet, J.-F. (2010). Calculation of optimal design and ideal productivities of volumetrically lightened photobioreactors using the constructal approach. *Chemical Engineering Science*, 65(2) :985 – 998.

- Cornet, J.-F. and Dussap, C. (2009). A simple and reliable formula for assessment of maximum volumetric productivities in photobioreactors. *Biotechnol. Prog.*, 25 :424–435.
- Cornet, J.-F., Dussap, C., and Gros, J. (1994). Conversion of radiant light energy in photobioreactors. *AlChE J.*, 40(6) :1055–1066.
- Cornet, J.-F., Dussap, C., and Gros, J. (1995). A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors. *Chem. Eng. Science*, 50 :1489–1500.
- Cornet, J.-F., Dussap, C., and Gros, J.-B. (1998). Kinetics and energetics of photosynthetic micro-organisms in photobioreactors. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 59 :153–224.
- Cornet, J.-F., Favier, L., and Dussap, C. (2003). Modelling stability of photoheterotrophic continuous cultures in photobioreactors. *Biotechnol. Prog.*, 19 :1216–1227.
- Cross, M. M. (1965). Rheology of Non-Newtonian fluids : a new flow equation for pseudoplastic systems. *Journal of Colloid Science*, 20 :417 – 437.
- Csögör, Z., Herrenbauer, M., Schmidt, K., and Posten, C. (2001). Light distribution in a novel photobioreactor – modelling for optimization. *Journal of Applied Phycology*, 13(4) :325–333.
- Cuming, H. (1955). *The secondary flow in curved pipes*. HM Stationery Office.
- Dauchet, J. (2012). *Analyse radiative des photobioréacteurs*. thèse de doctorat, Université Blaise Pascal.
- Dauchet, J., Blanco, S., Cornet, J.-F., El Hafi, M., Eymet, V., and Fournier, R. (2012). The practice of recent radiative transfer monte carlo advances and its contribution to the field of microorganisms cultivation in photobioreactors. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*.
- Daudin, J., Robin, S., and Vuillet, C. (1999). *Statistique inférentielle : Idées, Démarches, Exemples*. Didact. Statistique. Presses universitaires de Rennes.
- Davies-Colley, R., Pridmore, R., and Hewitt, J. (1986). Optical properties of some freshwater phytoplanktonic algae. *Hydrobiologia*, 133(2) :165–178.
- De Berg, M., Cheong, O., van Kreveld, M., and Overmars, M. (2008). *Computational Geometry : Algorithms and Applications*. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH.
- Degré, G., Joseph, P., Tabeling, P., Lerouge, S., Cloitre, M., and Ajdari, A. (2006). Rheology of complex fluids by particle image velocimetry in microchannels. *Applied physics letters*, 89(2) :024104–024104.
- Degrenne, B. (2009). *Production d'hydrogène par Chlamydomonas reinhardtii en photobioréacteur : Analyse des conditions de culture et mise en place d'un protocole autotrophe*. thèse de doctorat, Université de Nantes.
- Dibble, C. J., Kogan, M., and Solomon, M. J. (2006). Structure and dynamics of colloidal depletion gels : Coincidence of transitions and heterogeneity. *Phys. Rev. E*, 74 :11.

- Doucha, J. and Livansky, K. (1999). Process of outdoor thin-layer cultivation of microalgae and blue-green algae and bioreactor for performing the process. Brevet n° US5981271.
- Doucha, J., Straka, F., and Livansky, K. (2005). Utilization of flue gas for cultivation of microalgae *Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 17 :403–412.
- Dussap, C. (1988). *Etude thermo et cinétique de la production de polysaccharides microbiens en limitation par le transfert d'oxygène*. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal.
- Falkowski, P., Dubinsky, Z., and Wyman, K. (1985). Growth-irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 30(2) :311–321.
- Farges, B., Laroche, C., Cornet, J.-F., and Dussap, C.-G. (2009). Spectral kinetic modeling and long-term behavior assessment of *arthrospira platensis* growth in photobioreactor under red (620 nm) light illumination. *Biotechnology progress*, 25(1) :151–162.
- Farineau, J. and Morot-Gaudry, J.-F. (2006). *La photosynthèse : Processus physiques, moléculaires et physiologiques*. INRA Paris.
- Figuerola, F. L., Aguilera, J., and Niell, F. X. (1995). Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *porphyra umbilicalis* (bangiales, rhodophyta). *European Journal of Phycology*, 30(1) :11–18.
- Fouchard, S., Pruvost, J., Degrenne, B., and Legrand, J. (2008). Investigation of h₂ production using the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* in a fully controlled photobioreactor fitted with on-line gas analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(13) :3302–3310.
- Genty, B., Briantais, J.-M., and Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990(1) :87–92.
- Grima, E. M., Fernández, F., Camacho, F. G., and Chisti, Y. (1999). Photobioreactors : light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, 70(1–3) :231 – 247. *Biotechnological Aspects of Marine Sponges*.
- Harris, E. (1989). *The Chlamydomonas Sourcebook : a comprehensive guide to biology and laboratory use*. Academic Press Inc. San Diego.
- Heinrich, J. M., Niizawa, I., Botta, F. A., Trombert, A. R., and Irazoqui, H. A. (2012). Analysis and design of photobioreactors for microalgae production ii : Experimental validation of a radiation field simulator based on a monte carlo algorithm. *Photochemistry and Photobiology*, 88(4) :952–960.
- Herschel, W. H. and Bulkley, R. (1926). Konsistenzmessungen von gummi-benzollösungen. *Kolloid Z.*, 39 :291–300.
- Hess, J. and Tolbert, N. (1967). Changes in chlorophyll a/b ratio and products of ¹⁴CO₂ fixation by algae grown in blue or red light. *Plant Physiology*, 42 :1123–1130.

- Heymann, L. and Aksel, N. (2007). Transition pathways between solid and liquid state in suspensions. *Phys. Rev. E*, 75 :9.
- Hsieh, C.-H. and Wu, W.-T. (2009). A novel photobioreactor with transparent rectangular chambers for cultivation of microalgae. *Biochemical Engineering Journal*, 46(3) :300 – 305.
- Ikeda, A., Berthier, L., and Sollich, P. (2012). Unified study of glass and jamming rheology in soft particle systems. *Phys. Rev. Lett.*, 109 :5.
- Jacob-Lopes, E., Lacerda, L. M. C. F., and Franco, T. T. (2007). Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nageli* in a bubble column photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 40 :27–34.
- Jaishankar, A., Sharma, V., and McKinley, G. H. (2011). Interfacial viscoelasticity, yielding and creep ringing of globular protein-surfactant mixtures. *Soft Matter*, 7 :7623–7634.
- Kandilian, R., Lee, E., and Pilon, L. (2013). Radiation and optical properties of nanochloropsis oculata grown under different irradiances and spectra. *Bioresource Technology*, 137(0) :63 – 73.
- Kapaun, E. and Reisser, W. (1995). A chitin-like glycan in the cell wall of a chlorella sp. (chlorococcales, chlorophyceae). *Planta*, 197 :577–582. 10.1007/BF00191563.
- Karp, P., Paley, S., Krummenacker, M., Latendresse, M., Dale, J., Lee, T., Kaipa, P., Gilham, F., Spauling, A., Popescu, L., Altman, T., Paulsen, I., Keseler, I., and Caspi, R. (2010). Pathway tools version 13.0 : integrated software for pathway/genome informatics and systems biology. *Briefings in Bioinformatics*, 11(1) :40–79.
- Kok, B. (1948). *A Critical Consideration of the Quantum Yield of Chlorella-photosynthesis*. W. Junk.
- Krieger, I. M. and Dougherty, T. J. (1959). A mechanism for non-newtonian flow in suspensions of rigid spheres. *Trans. Soc. Rheol.*, 3 :137.
- Kruif, C. G. D., van Iersel, E. M. F., Vrij, A., and Russel, W. B. (1985). Hard sphere colloidal dispersions : Viscosity as a function of shear rate and volume fraction. *The Journal of Chemical Physics*, 83(9) :4717–4725.
- Kumar, H., Yadava, P., and Gaur, J. (1981). Electrical flocculation of the unicellular green alga chlorella vulgaris beijerinck. *Aquatic Botany*, 11(0) :187 – 195.
- Kwak, J., Baek, S., Woo, Y., Han J.K. Kim B.G. Kim, O., and Lee, J. (2012). Beneficial immunostimulatory effect of short-term *Chlorella* supplementation : enhancement of natural killer cell activity and early inflammatory response (randomized, double-blinded, placebo-controlled trial). *Nutr J*, 53(11) :8.
- Le Borgne, F. (2011). *Développement d’un photobioréacteur solaire intensifié en vue de la production à grande échelle de biomasse microalgale*. thèse de doctorat, Université de Nantes.
- Le Gouic, B. (2013). *Analyse et optimisation de l’apport de carbone en photobioréacteur*. Thèse de doctorat, Université de Nantes, GEPEA - 37 bd de l’université - 44600 Saint Nazaire.

- Lee, C.-G. (1999). Calculation of light penetration depth in photobioreactors. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 4(1) :78–81.
- Lee, E., Heng, R.-L., and Pilon, L. (2013). Spectral optical properties of selected photosynthetic microalgae producing biofuels. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 114(0) :122 – 135.
- Lee, Y.-K., Ding, S.-Y., Low, C.-S., Chang, Y.-C., Forday, W., and Chew, P.-C. (1995). Design and performance of an α -type tubular photobioreactor for mass cultivation of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 7(1) :47–51.
- Lehr, F. and Posten, C. (2009). Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3) :280 – 285.
- Lemasson, C. (2011). Etude, modélisation et optimisation du comportement thermique des photobioréacteurs solaires. Rapport de stage de master gpea, 2^{me} année, Université de Nantes.
- Li, X. and Yang, N. (2013). Modeling the light distribution in airlift photobioreactors under simultaneous external and internal illumination using the two-flux model. *Chemical Engineering Science*, 88(0) :16 – 22.
- Litzler, S. (2010). Les algues sont-elles une ressource marine à exploiter pour développer durablement l'espace caribéen ? *Études caribéennes*, (15).
- Liu, A. J. and Nigel, S. R. (1998). Nonlinear dynamics : Jamming is not just cool any more. *Nature (London)*, 396 :21.
- Malkin, A. Y., Masalova, I., Slatter, P., and Wilson, K. (2004). Effect of droplet size on the rheological properties of highly-concentrated w/o emulsions. *Rheologica Acta*, 43 :584–591. 10.1007/s00397-003-0347-2.
- Mandalam, R. and B.O., P. (1998). Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 59(5) :605–611.
- Martzolff, A. (2013). *Analyse systémique du métabolisme carboné et énergétique de Chlamydomonas reinhardtii*. Thèse de doctorat, Université de Nantes, GEPEA - 37 bd de l'université - 44600 Saint Nazaire.
- Mata, T. M., Martins, A. A., and Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications : A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1) :217–232.
- Menten, F., Chèze, B., Patouillard, L., and Bouvart, F. (2013). A review of {LCA} greenhouse gas emissions results for advanced biofuels : The use of meta-regression analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26(0) :108 – 134.
- Mercado, J., Jiménez, C., NIELL, F., and FIGUEROA, F. (1996). Comparison of methods for measuring light absorption by algae and their application to the estimation of the package effect. *Scientia Marina*, 60(1) :39–45.

- Merchant, R. and Andre, C. (2001). A review of recent clinical trials of the nutritional supplement *Chlorella pyrenoidosa* in the treatment of fibromyalgia, hypertension, and ulcerative colitis. *Altern Ther Health Med*, 7(3) :79–91.
- Miao, X. and Wu, Q. (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*, 110(1) :85 – 93.
- Midoux, N. (1985). *Mécanique et rhéologie des fluides en génie chimique*. Technique et Documentation Paris.
- Mie, G. (1908). Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen. *Annalen der Physik*, 330(3) :377–445.
- Milledge, J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels : a brief review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10(1) :31–41.
- Moheimani, N. (2013). Long-term outdoor growth and lipid productivity of *tetraselmis suecica*, *dunaliella tertiolecta* and *Chlorella* sp (chlorophyta) in bag photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 25(1) :167–176.
- Mokrani, A., Castelain, C., and Peerhossaini, H. (1997). The effects of chaotic advection on heat transfer. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 40(13) :3089 – 3104.
- Molina, E., Fernández, J., Acién, F., and Chisti, Y. (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, 92(2) :113 – 131. Biochemical Engineering : Trends and Potentials.
- Monod, J. (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann & cie, Paris.
- Mouget, J.-L. and Tremblin, G. (2002). Suitability of the fluorescence monitoring system (fms, hansatech) for measurement of photosynthetic characteristics in algae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 74 :219–231.
- Mueller, S., Llewellyn, E. W., and Mader, H. M. (2010). The rheology of suspensions of solid particles. *Proceedings of the Royal Society A*, 466 :1201 – 1228.
- Muller-Feuga, A. (1999). Growth as a function of rationing : a model applicable to fish and microalgae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 236(1) :1 – 13.
- Nakano, S., Noquchi, T., Takekoshi, H., Suzuki, G., and Nakano, M. (2005). Maternal-fetal distribution and transfer of dioxins in pregnant women in japan, and attempts to reduce maternal transfer with *Chlorella* (*Chlorella pyrenoidosa*) supplements. *Chemosphere*, 61(9) :1244–1255.
- Northcote, D., H. and Goulding, K., J. (1958). The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyeroidosa*. *Biochemical Journal*, 70(3) :391–397.
- Olaizola, M. (2000). Commercial production of astaxanthin from *haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5) :499–506.
- Oncel, S. S. (2013). Microalgae for a macroenergy world. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26(0) :241 – 264.

- Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S. C., and Dussap, C. (2011). *Biofuels : Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, chapter 19. Academic Press.
- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., and Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae : biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, pages 1–16.
- Pilon, L., Berberoğlu, H., and Kandilian, R. (2011). Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 112(17) :2639 – 2660.
- Pottier, L. (2005). *Modélisation de photobioréacteurs pour la valorisation des microalgues*. thèse de doctorat, Université de Nantes.
- Pottier, L., Pruvost, J., Deremetz, J., Cornet, J.-F., Legrand, J., and Dussap, C. (2005). A fully predictive model for one-dimensional light attenuation by *Chlamydomonas reinhardtii* in a torus photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(5) :569–582.
- Pratt, R. (1941). Studies on *Chlorella vulgaris* iv : Influence of the molecular proportions of kno_3 , kh_2po_4 , and $mgso_4$ in the nutrient solution on the growth of *Chlorella*. *American Journal of Botany*, 28 :492–497.
- Pratt, R. (1943). Studies on *Chlorella vulgaris* vii : Influence of the age of the culture on the rates of photosynthesis and respiration. *American Journal of Botany*, 30 :404–408.
- Pratt, R. and Fong, J. (1940a). Studies on *Chlorella vulgaris* ii : Further evidence that *Chlorella* cells form a growth-inhibiting substance. *American Journal of Botany*, 27 :431–436.
- Pratt, R. and Fong, J. (1940b). Studies on *Chlorella vulgaris* iii : Growth of *Chlorella* and changes in the hydrogen-ion and ammonium-ion concentrations in solutions containing nitrate and ammonium nitrogen. *American Journal of Botany*, 27 :735–743.
- Prigogine, I. (1967). *Introduction to the thermodynamics of irreversible processes*. Interscience, New York.
- Pruvost, J. (2000). *Influence d'un écoulement tourbillonnaire sur l'accès à la lumière des microalgues : conception d'un photobioréacteur et modélisation de la croissance d'une culture de Porphyridium purpureum*. thèse de doctorat, Université de Nantes.
- Pruvost, J. and Cornet, J.-F. (2012). *Microalgal biotechnology : potential and production*, chapter 10 - Knowledge models for the engineering and optimization of photobioreactors. De Gruyter.
- Pruvost, J., Cornet, J.-F., Goetz, V., and Legrand, J. (2011). Modeling dynamic functioning of rectangular photobioreactors in solar conditions. *AIChE Journal*, 57(7) :1947–1960.
- Pruvost, J., Cornet, J.-F., and Legrand, J. (2008). Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors : An energetically consistent analysis. *Chemical Engineering Science*, 63(14) :3679 – 3694.
- Pruvost, J., Legrand, J., and Le Borgne, F. (2010). Thin-layer photobioreactor with high volume productivity. Brevet n° WO2011039354 (A2).

- Pruvost, J., Legrand, J., and Legentilhomme, P. (1999). Transfert photonique dans un photoréacteur à écoulement tourbillonnaire. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 77(5) :869–876.
- Pruvost, J., Pottier, L., and Legrand, J. (2006). Numerical investigation of hydrodynamic and mixing conditions in a torus photobioreactor. *Chemical Engineering Science*, 61(14) :4476 – 4489.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors : production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3) :287–293.
- Putz, A. M. V. and Burghilea, T. I. (2009). The solid-fluid transition in a yield stress shear thinning physical gel. *Rheologica Acta*, 48(6) :673–689.
- Quemada, D. (1997). Rheological modelling of complex fluids. i. the concept of effective volume fraction revisited. *The European Physical Journal - Applied Physics*, 1 :119–127.
- Quémada, D. (2006). *Modélisation rhéologique structurelle : dispersions concentrées et fluides complexes*. Tec & Doc Lavoisier.
- Rachlin, J. and Grosso, A. (1991). The effects of ph on the growth of *Chlorella vulgaris* and its interactions with cadmium toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 20(4) :505–508.
- Rafaï, S., Jibuti, L., and Peyla, P. (2010). Effective viscosity of microswimmer suspensions. *Phys. Rev. Lett.*, 104 :098102.
- Raffel, M., Willert, C. E., Wereley, S. T., and Kompenhans, J. (2007). *Particle Image Velocimetry : A Practical Guide (Experimental Fluid Mechanics)*. Springer ; 2nd edition.
- Richmond, A. (2004). Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors : an overview. In Ang, P. O. and Dumont, H. J., editors, *Asian Pacific Phycology in the 21st Century : Prospects and Challenges*, volume 173 of *Developments in Hydrobiology*, pages 33–37. Springer Netherlands.
- Richmond, A. and Cheng-Wu, Z. (2001). Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors. *Journal of Biotechnology*, 85(3) :259 – 269.
- Ritchie, R. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46(1) :115–126.
- Ritchie, R. and Raymond, J. (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis Research*, 89(1) :27–41.
- Satyanarayana, K. G., Mariano, A. B., and Vargas, J. V. C. (2011). A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*, 35(4) :291–311.
- Sayed, O. H. and El-Shahed, A. M. (2000). Growth, photosynthesis and circadian patterns in *Chlorella vulgaris* (chlorophyta) in response to growth temperature. *Cryptogamie Algologie*, 21(3) :283 – 290.

- Scarano, F. and Rhiethmuller, M. L. (2001). Advances in iterative multigrid piv image processing. *Exp. Fluids*, 29.
- Scarsella, M., Belotti, G., De Filippis, P., and Bravi, M. (2010). Study on the optimal growing conditions of chlorella vulgaris in bubble column photobioreactors. *CHEMICAL ENGINEERING*, 20.
- Scarsella, M., Torzillo, G., Cicci, A., Belotti, G., De Filippis, P., and Bravi, M. (2012). Mechanical stress tolerance of two microalgae. *Process Biochemistry*.
- Schechter, R. S. (1961). On the steady flow of a non-newtonian fluid in cylinder ducts. *AIChE Journal*, 7(3) :445–448.
- Schmidt, M. and Münstedt, H. (2002). Rheological behaviour of concentrated monodisperse suspensions as a function of preshear conditions and temperature : an experimental study. *Rheologica Acta*, 41 :193–204.
- Schuster, A. (1905). Radiation through a foggy atmosphere. *The astrophysical journal*, 21 :1.
- Scragg, A., Morrison, J., and Shales, S. (2003). The use of a fuel containing chlorella vulgaris in a diesel engine. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(7) :884 – 889.
- Shi, X.-M., Chen, F., Yuan, J.-P., and Chen, H. (1997). Heterotrophic production of lutein by selected chlorella strains. *Journal of Applied Phycology*, 9 :445–450.
- Simha, R. (1952). A treatment of the viscosity of concentrated suspensions. *Journal of Applied Physics*, 23 :1020 – 1024.
- Souliès, A., Pruvost, J., Legrand, J., Castelain, C., and Burghélea, T. (2013). Rheological properties of suspensions of the green microalga chlorella vulgaris at various volume fractions. *Rheologica Acta*, 52(6) :589–605.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2) :87 – 96.
- Strickland, J. and Parsons, T. (1970). *A practical handbook of seawater analysis*, volume 55. Ackademie Verlag, Berlin.
- Stucki, J. (1978). Stability analysis of biochemical systems - a practical guide. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 33 :99–187.
- Sueoka, N. (1960). Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in chlamydomonas reinhardi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 46(1) :83–91.
- Takache, H. (2010). *Caractérisation, modélisation de la croissance de Chlamydomonas reinhardtii en photobioréacteur et mise en évidence du couplage à l'hydrodynamique*. Thèse de doctorat, Université de Nantes, GEPEA - 37 bd de l'université - 44600 Saint Nazaire.
- Takache, H., Christophe, G., Cornet, J.-F., and Pruvost, J. (2010). Experimental and theoretical assessment of maximum productivities for the microalgae chlamydomonas reinhardtii in two different geometries of photobioreactors. *Biotechnology Progress*, 26(2) :431–440.
- Takeda, H. (1988). Classification of chlorella strains by means of the sugar components of the cell wall. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16(4) :367 – 371.

- Talero, E., Avila-Roman, J., and Motilva, V. (2012). Chemoprevention with phytonutrients and microalgae products in chronic inflammation and colon cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 18(26) :3939–3965.
- Taylor, S. (2011). *Marine Medicinal Foods : Implications and Applications, Macro and Microalgae*. Advances in food and nutrition research. Elsevier Science.
- Thormählen, I., Straub, J., and Grigull, U. (1985). *Refractive index of water and its dependence on wavelength, temperature, and density*. American Chemical Society and the American Institute of Physics for the National Bureau of Standards.
- Torquato, S., Truskett, T. M., and Debenedetti, P. G. (2000). Is random close packing of spheres well defined? *Phys. Rev. Lett.*, 84 :2064–2067.
- Tropea, C., Yarin, A. L., and Foss, J. S. (2007). *Handbook of experimental fluid dynamics*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M., and Hoadley, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures : a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of renewable and sustainable energy*, 2(1) :012701.
- Ugwu, C., Aoyagi, H., and Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10) :4021 – 4028.
- Van De Hulst, H. (1981). *Light Scattering by small particles*. Dover publications.
- Wagner, Norman J. Mewis, J. (2011). *Colloidal Suspension Rheology*. Cambridge University Press.
- Wallen, D. and Geen, G. (1971). Light quality in relation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae. *Marine Biology*, 10(1) :34–43.
- Wang, C.-Y., Fu, C.-C., and Liu, Y.-C. (2007). Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of spirulina platensis. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1) :21 – 25.
- Watanabe, Y. and Hall, D. (1996). Photosynthetic production of the filamentous cyanobacterium spirulina platensis in a cone-shaped helical tubular photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(6) :693–698.
- Wileman, A., Ozkan, A., and Berberoglu, H. (2011). Rheological properties of algae slurries for minimizing harvesting energy requirements in biofuel production. *Bioresource Technology*.
- Wu, Z.-Y. and Shi, X.-M. (2008). Rheological properties of *Chlorella pyrenoidosa* culture grown heterotrophically in a fermentor. *Journal of Applied Phycology*, 20 :279–282.
- Wyatt, P. J. (1972). Light scattering in the microbial world. *Journal of Colloid and Interface Science*, 39(3) :479 – 491.
- Wyszecki, G. and Stiles, W. S. (1982). *Color science*. Wiley New York.
- Zhang, K., Miyachi, S., and Kurano, N. (2001). Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation : effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(4) :428–433.

Zwietering, M., De Koos, J., B.E., H., De Witt, J., and Van't Riet, K. (1991). Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4) :1094–1101.

RÉSUMÉ ET MOT CLÉS

Contribution à l'étude hydrodynamique et à la modélisation des photobioréacteurs à haute productivité volumique

Résumé :

La technologie de culture en photobioréacteurs (PBR) est un procédé de plus en plus utilisé vu le potentiel applicatif des microalgues. Comme pour tout procédé la consommation en eau et en énergie doit être maîtrisée. C'est dans cette démarche que s'inscrivent les PBR dits intensifiés et en particuliers ceux à haute productivité volumique (HPV). Leur utilisation implique la réduction de l'épaisseur de culture et un fonctionnement à concentration en biomasse élevée perturbant l'hydrodynamique et le transfert radiatif dans le système. Cette thèse concerne ces deux derniers aspects, pour le cas de la microalgue *Chlorella vulgaris*.

La première partie a portée sur l'étude rhéologique de suspensions concentrées, montrant que le comportement rhéologique évolue d'un régime newtonien à rhéofluidifiant puis viscoplastique avec l'augmentation en concentration. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de l'écoulement en micro-canal, par mesures des profils de vitesses. Le phénomène d'agrégation cellulaire a été en particulier observé. L'utilisation de PBR-HPV sous flux solaire implique des conditions particulières d'utilisation, avec notamment un changement permanent de l'angle et du spectre lumineux incident. La seconde partie de ce travail a portée sur l'étude du transfert radiatif dans ces conditions et de son impact sur la productivité de la culture. Les propriétés radiatives et le modèle cinétique de croissance de *C. vulgaris* ont pour cela été déterminés. L'étude théorique et expérimentale a montrée que *C. vulgaris* adapte fortement sa pigmentation pour pallier les variations de spectre et d'angle d'incidence, ce comportement ayant un impact majeur sur la productivité du procédé.

Mots clés : *Chlorella vulgaris*, Photobioréacteur, Rhéologie, Intensification, Modélisation, Transfert radiatif, Solaire.

Hydrodynamical investigation and modeling of high volumetric productivity photobioreactor

Abstract :

Development of photobioreactor (PBR) for microalgal cultivation is actually of primary, considering the microalgae applicative potential. As well as any process, water and energy consumption have to be controlled. Intensified (PBR) appear here of great interest and especially high volumetric productivity PBR (PBR-HVP). These systems imply to reduce drastically culture depth and to work with high biomass concentration. This highly disturbs hydrodynamic and light transfer into the system. This thesis concerns the study of those two last aspects for the case of the microalga *Chlorella vulgaris*.

The first part concerns rheological study of concentrated suspensions, showing that rheological behaviour progress from a newtonian regime to a shear-thinning behaviour and finally a yield stress one with the concentration increase. This has been confirmed by a study of the flow in micro-channel by velocity profiles measurements. Cells aggregates formation has been especially observed, leading to a strong irreversibility of the flow.

Using PBR-HVP under solar conditions results in a time evolution of the incident angle and spectrum of light. The second part of this thesis investigated radiative transfer in these conditions and their impacts on biomass productivity. Radiative properties and kinetic model of *C. vulgaris* growth were determined. Both theoretical and experimental studies emphasize a strong pigment adaptation of *C. vulgaris* culture as a response to variations of incident angle and spectrum.

Keywords : *Chlorella vulgaris*, Photobioreactor, Rheology, Intensification, Modelisation, Radiative transfer, Solar.