



Effets quantitatifs et qualitatifs de la lumière sur la croissance des microalgues en culture dense et sur leur production de molécules d'intérêt : vers l'optimisation des procédés de production de microalgues

Charlotte Combe

► To cite this version:

Charlotte Combe. Effets quantitatifs et qualitatifs de la lumière sur la croissance des microalgues en culture dense et sur leur production de molécules d'intérêt : vers l'optimisation des procédés de production de microalgues. Océanographie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066120 . tel-01395588

HAL Id: tel-01395588

<https://theses.hal.science/tel-01395588>

Submitted on 11 Nov 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

École doctorale des Sciences de l'Environnement d'Ile de France - ED 129

Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer



Effets quantitatifs et qualitatifs de la lumière sur la croissance des microalgues en culture dense et sur leur production de molécules d'intérêt

Vers l'optimisation des procédés de production de microalgues

Thèse de doctorat d'Océanographie

Par **Charlotte COMBE**

Présentée et soutenue publiquement le 9 mai 2016, devant le jury composé de :

Dr. Claude Aflalo	<i>Rapporteur</i>
Pr. Yannick Huot	<i>Rapporteur</i>
Dr. Jean-Paul Cadoret	<i>Examineur</i>
Dr. Bruno Sialve	<i>Examineur</i>
Dr. Olivier Bernard	<i>Co-directeur</i>
Dr. Sophie Rabouille	<i>Co-directrice</i>
Dr. Antoine Sciandra	<i>Directeur</i>
Pr. Paul Nival	<i>Président du jury</i>

*À ma mère,
pour son soutien indéfectible.*

*“L'élève dit à ses maîtres que le temps s'écoulera toujours trop vite pour tout ce qui lui
reste à apprendre.”*

Denis Diderot (1713-1784)

Remerciements

“La reconnaissance est la mémoire du cœur.”

Hans Christian Andersen (1805-1875)

Je tiens à remercier en premier lieu Claude Aflalo et Yannick Huot, qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Jean-Paul Cadoret et Bruno Sialve d'avoir accepté d'assister en qualité d'examineurs à sa soutenance. Je vous remercie par avance pour tous les commentaires qui viendront enrichir ce travail.

Merci à Paul Nival d'avoir accepté de présider ce jury; c'est à mes yeux un privilège.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à mes trois directeurs de thèse, Antoine Sciandra, Sophie Rabouille et Olivier Bernard qui m'ont patiemment guidée et qui m'ont permis de découvrir l'univers captivant de ces organismes microscopiques qui ont tant à nous apporter. Je vous remercie d'avoir accepté de m'encadrer et pour la liberté et la confiance que vous m'avez accordées. Merci à vous pour votre vision scientifique, votre soutien, votre disponibilité et votre optimisme inébranlable. Merci de m'avoir insufflé l'enthousiasme nécessaire pour tenir la distance !

Antoine, je vous adresse mes plus vifs remerciements. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir fait partager vos compétences et votre savoir en océanographie. Merci pour votre efficacité et votre sympathie. Merci de m'avoir soutenue dans mes projets, même les plus singuliers. Je vous suis également très reconnaissante pour votre relecture minutieuse des différents chapitres, qui m'a sans nul doute permis de préciser et de synthétiser mon propos.

Sophie, merci pour le regard bienveillant et éclairé que tu as porté sur mon travail. Merci pour ton aide, ta rigueur scientifique, tes conseils, ton réconfort mais également pour ta gentillesse et ta générosité.

Olivier, ton investissement tout au long de ma thèse a été infiniment précieux. L'originalité de tes idées, ton enthousiasme et tes qualités scientifiques et humaines sont pour moi un exemple à suivre. Merci pour toutes ces heures passées à répondre à mes - très nombreuses - questions et à apaiser mes craintes. Je ne saurais te remercier assez pour tes suggestions et les corrections que tu as apportées à l'ensemble du manuscrit. Merci pour ta patience (que j'ai

mise à rude épreuve), tes encouragements et ton soutien sans faille durant ces trois années. Merci de m'avoir tirée vers le haut. Je n'en oublierai rien.

Je ne pouvais espérer meilleur encadrement que celui que vous m'avez offert. J'espère avoir été à la hauteur de vos espérances.

Je remercie le Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer pour son accueil et les conditions de travail privilégiées qui m'ont été offertes. Un grand merci aux gestionnaires Corinne, Linda, Anne et Isabelle pour leur réactivité et leur bonne humeur.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance envers Amélie Talec et Eric Pruvost pour leur aide dans la réalisation de mes expériences, leurs conseils et leur assistance si précieuse ! C'est une réelle chance et un vrai plaisir de travailler avec vous.

Merci à Martin Laviale pour son expertise sur la photosynthèse et pour avoir permis à ces expériences colorées innovantes de voir le jour.

Merci aux membres de l'équipe BIOCORE pour ces échanges scientifiques et humains. Je remercie en particulier chaleureusement Francis Mairet de m'avoir permis de découvrir le monde complexe de la modélisation mathématique.

Enfin, une thèse est également une aventure humaine riche en rencontres. Je tiens donc à remercier mes collègues et amis.

J'adresse ainsi une pensée particulière et émue à tous les doctorants et post-doctorants, compagnons de voyage. Merci à Philipp Hartmann et Anthony Dron qui furent de parfaits aînés. Merci pour votre aide, vos conseils avertis et votre douce folie. Merci à Hubert Bonnefond qui a su animer mon quotidien dans le terrier. Je remercie également Quentin Béchet pour son écoute et sa gentillesse. Un merci particulier à Ghjuvan Grimaud, qui a partagé cette aventure (et bien d'autres) à mes côtés et qui m'a toujours soutenue (une figue à la main).

Une pensée spéciale pour ces 'LOVers' de passage, qui ont enrichi cette aventure scientifique de réelles amitiés. Merci à Jennifer, Lisa, Margaux, Philippe, Nicolas, Cissou, Méline, Anne, Yann, Noémie, Paul, Thibaud, Andréas, Stéphanie, Florent, Loan, Maxime et Tiphaine pour leur affection maintes fois renouvelée et les rires partagés. Merci également à Magali Siaut pour m'avoir fait bénéficier de son expérience mais aussi pour sa gentillesse et sa bonne humeur (et les crêpes à l'heure du goûter bien sûr).

Une pensée pour Johanna, Pierre et Gabriel, mes compères Parisiens, qui ont rendu les chocs thermiques moins douloureux.

Quant à ma famille et mes proches, attentifs qu'ils ont été aux doutes et aux joies produites par cette recherche, ils savent mieux que quiconque ce que je leur dois.

À mes grands-parents, à tout jamais, merci.

À ma mère, qui a soutenu ce projet (et tant d'autres !) depuis le début et qui a toujours su trouver les mots pour me motiver, comme tout au long de ma scolarité. Elle a excellé ici dans le rôle de coach de ce 'marathon' de trois années.

À mon père, pour m'avoir fait partager son amour de la mer.

Merci à ma grande sœur pour ses conseils avisés et surtout pour son amour.

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	13
I- ÉTAT DE L'ART	19
1. Introduction	22
2. Les microalgues ? Des micro-organismes à macro potentiel	22
2.1 Une immense diversité mal connue et à peine exploitée	23
2.2 Un réservoir de molécules innovantes pour de nombreuses applications	25
2.3 Les pigments : des molécules aux multiples propriétés	27
2.4 Systèmes de culture	28
2.4.1 Les systèmes ouverts, à grande échelle	29
2.4.2 Les systèmes fermés	30
3. Microalgues d'étude	32
3.1 <i>Dunaliella salina</i> , la pépite des salins	32
3.2 <i>Tisochrysis lutea</i> , une espèce riche en lipides	33
4. La photosynthèse oxygénique	34
4.1 Les membranes photosynthétiques	35
4.2 Principe de fonctionnement	36
4.3 Aspects structuraux et fonctionnement des photosystèmes	37
4.3.1 Aspects fonctionnels du photosystème II	38
4.3.2 La photolyse de l'eau à la surface luminale du centre réactionnel du PSII	39
4.3.3 Aspects fonctionnels du photosystème I	40
5. L'étonnante plasticité de l'appareil photosynthétique des microalgues face aux variations de l'intensité lumineuse	42
5.1 Réponse biologique des micro-organismes photosynthétiques à l'intensité lumineuse	43
5.1.1 La photoinhibition	44
5.1.2 Comment survivre dans un environnement changeant ?	45
5.1.3 Les mécanismes de photoprotection, à court terme	47
5.2 Les systèmes de culture industriels : des variations de lumière à haute fréquence	51
5.2.1 Rôle de l'hydrodynamique	51
5.2.2 Des régimes fluctuants générés par l'hydrodynamique	51
5.2.3 Effet des régimes fluctuants sur la croissance photosynthétique	53
5.2.4 Des flashes à l'histoire lumineuse	56
6. Réponse de l'appareil photosynthétique aux variations du spectre lumineux	57
6.1 La naissance de la théorie des couleurs. De Newton à Einstein	57
6.2 Modification du spectre lumineux dans la colonne d'eau	58
6.3 Utilisation du spectre lumineux par les microalgues : une riche variété de pigments photosynthétiques	59

6.4 Atténuation de la lumière en fonction de la profondeur dans un photobioréacteur	63
6.5 Effet de la lumière colorée sur les pigments et la croissance des micro-organismes photosynthétiques	64
6.5.1 Premières approches de l'impact de la couleur sur la croissance des microalgues et la bioaccumulation de molécules d'intérêt	66
6.5.2 Comment les organismes perçoivent-ils les radiations lumineuses ? Une question d'actualité chez les eucaryotes unicellulaires	68
6.5.3 Les mécanismes de photoréception et de photoorientation chez <i>Dunaliella</i>	70
II- MATÉRIEL ET MÉTHODES	71
1. Espèces considérées	73
1.1 Conservation des souches	73
1.2 Milieu de culture	73
2. Des systèmes de culture innovants.	74
2.1 Dispositifs expérimentaux de culture	74
2.1.1 Le photobioréacteur cylindrique	74
2.1.2 Le photobioréacteur plan	76
2.2 Descriptif et originalité des systèmes d'éclairage et de leur mode de pilotage	78
2.2.1 Systèmes d'éclairage en lumière blanche	78
2.2.2 Modification du spectre de la lumière	81
2.2.3 Dispositifs de pilotage des LED	82
2.3. Conditions de culture	83
2.3.1 Les cultures en batch	83
2.3.2 Les cultures semi-continues et continues	84
2.4 Pilotage automatique des cultures et calibrations	90
2.4.1 Pilotage automatique des cultures par le logiciel ODIN	90
2.4.2 Phases de calibration	91
3. Méthodes d'analyse et de mesure	94
3.1 Suivis de croissance en taille et en nombre	94
3.2 Analyses pigmentaires	95
3.2.1 Spectrophotométrie : mesure par extraction des pigments	95
3.2.2 Absorption in vivo par spectrophotométrie	96
3.3 Dosage du carbone et de l'azote particuliers	97
3.4 Quantification des lipides neutres par la méthode Nile Red	97
3.5 Quantification des nitrates	98
III- RÉPONSE DE <i>DUNALIELLA SALINA</i> À DES SIGNAUX LUMINEUX HAUTE FRÉQUENCE	100
<i>Long-term adaptive response to high-frequency light signals in the unicellular photosynthetic eukaryote Dunaliella salina</i>	
Abstract	104

1. Introduction	105
2. Materials and Methods	108
2.1 Algae, growth medium and pre-cultivation conditions	108
2.2 Experimental design	108
2.3 Culture conditions	109
2.4 PAM measurements	111
2.5 Cell size and abundance	112
2.6 Pigment extraction and analysis	112
2.7 Elemental stoichiometry	112
2.8 Lipid analysis	112
3. Results	114
3.1 Specific growth rate of <i>Dunaliella salina</i> as a function of flash modulation frequency	114
3.2 Chlorophyll content	115
3.3 Carbon and nitrogen stoichiometry	117
3.4 Total lipid content	118
4. Discussion	119
4.1 Effect of light flashes frequency on cellular growth of <i>Dunaliella salina</i>	119
4.2 Effect of flash frequency on pigment content and on the biomass production	122
4.3 Effect of flash frequency on the total lipid content	124
4.4 Upscaling to Real Systems and Future Work	124
5. Conclusion	126
 IV- RÉPONSE DE <i>DUNALIELLA SALINA</i> À DES SIGNAUX LUMINEUX RÉALISTES	 128
<i>Experimental reconstruction of the light pattern induced by hydrodynamics in an algal pond: towards more realistic experiments</i>	
Abstract	133
1. Introduction	134
2. Reconstruction of dynamical light patterns using a hydrodynamical modelling	136
2.1 The hydrodynamical model	136
2.2 Generation of Lagrangian trajectories	137
2.3 Choice of a paragon of the trajectory set	137
3. Experimental set-up	139
4. Results and discussion	140
4.1 Growth rate	140
4.2 Acclimation mechanisms	141
5. What drives photoacclimation ?	143
6. Can we caricature the light pattern?	145
6.1 Light distribution in a perfectly mixed cultivation system	145
6.2 Relevant discretisation into two layers does not exist	146
6.3 Alternative choice for caricatural signal	147

6.3.1 Variance computation	147
6.3.2 Signal with realistic variance	147
6.3.3 Switching between I_E and 0.	149
6.3.4 Switching between I_0 and I_D	150
6.4 Towards realistic experiments.	150
7. Conclusion	151
 V- EFFETS DE LA COMPOSITION SPECTRALE SUR LA CROISSANCE ET LES MÉCANISMES D'ACCLIMATATION DE <i>DUNALIELLA SALINA</i>	 153
Préambule	155
1. Introduction	157
2. Matériels et méthodes	160
2.1 Microalgue et conditions de culture	160
2.2 Traitements lumineux	160
2.3 Conditions de pré-culture	164
2.4 Suivis de croissance en taille et en nombre	164
2.5 Extraction et analyse des pigments	165
2.6 Spectrophotométrie d'absorption <i>in vivo</i>	165
2.7 Détermination de la contribution relative des pigments non-photosynthétiques à l'absorption : 'PUR épuré'	166
2.8 Stœchiométrie élémentaire	167
2.9 Quantification des lipides par la méthode Nile Red	167
2.10 Statistiques	167
3. Résultats	169
3.1 Taux de croissance de <i>Dunaliella salina</i>	169
3.1.1 PUR équivalent	169
3.1.2 Effet de la variation du PUR.	169
3.1.3 Expérience complémentaire	170
3.2 Contenu pigmentaire.	171
3.2.1 PUR équivalent	171
3.2.2 Effet de la variation du PUR.	174
3.3 Carbone et azote particuliers	175
3.4 Contenu en lipides neutres	176
3.4.1 PUR équivalent	176
3.4.2 Effet de la variation du PUR.	176
3.5 Evolution de l'absorption et du PUR.	176
4. Discussion	180
4.1 Effet de la composition spectrale sur la croissance cellulaire de <i>Dunaliella salina</i>	181
4.2 Effet du PUR et de la composition spectrale sur le cortège pigmentaire.	185
4.2.1 Effet de l'évolution du PUR sur le cortège pigmentaire.	185

4.2.2 Effet de la composition spectrale : mise en évidence d'une stratégie d'acclimatation chromatique chez <i>Dunaliella salina</i>	186
4.3 Effet de la composition spectrale sur le contenu en lipides neutres	189
4.4 Le PUR dans la littérature	190
5. Conclusion et perspectives	192
VI- EFFETS DE LA COMPOSITION SPECTRALE EN CULTURES À HAUTE DENSITÉ : LES SURPRENANTES PROPRIÉTÉS DE LA LUMIÈRE VERTE	195
1. Introduction	197
2. Matériels et méthodes	199
2.1 Microalgues et conditions de culture	199
2.2 Traitement lumineux	199
2.3 Conditions de pré-culture	201
2.4 Paramètres standards	202
2.5 Mesures de respiration : capteur fluorescent par méthode non invasive	202
2.6 Statistiques	203
3. Modélisation de la croissance des microalgues sous différents spectres lumineux	204
3.1 Développement du modèle	204
3.2 Calibration du modèle	205
4. Résultats et discussion	207
4.1 Simulation du modèle et comparaison aux données expérimentales	207
4.1.1 Effet de la qualité de la lumière sur la croissance des microalgues	207
4.1.2 Evolution de la lumière en sortie des photobioréacteurs	210
4.1.3 Physiologie des cellules	213
4.2 Estimation de la productivité. Des données expérimentales aux prédictions mathématiques: les surprenantes propriétés de la lumière verte	220
5. Conclusion & perspectives	226
VII- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	228
BIBLIOGRAPHIE	236
ANNEXES	i

Nomenclature

A	Absorbance	[adimensionnel]
a	Coefficient d'absorption	[m ⁻¹]
a^*	Coefficient d'absorption spécifique	[m ² .mg ⁻¹]
D	Taux de dilution	[jour ⁻¹]
I	Intensité lumineuse	[μmol photons.m ⁻² .s ⁻¹]
r	Taux de respiration	[jour ⁻¹]

Lettres grecques

μ	Taux de croissance	[jour ⁻¹]
λ	Longueur d'onde	[nm]

Abréviations, sigles

ACC	Adaptation chromatique complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
C	Carbone
Car	Caroténoïdes
Chl	Chlorophylle
CO ₂	Dioxyde de carbone
COP	Carbone organique particulaire
CV	Coefficient de variation
Cyt b ₆ /f	Cytochrome b ₆ /f
<i>D. salina</i>	<i>Dunaliella salina</i>
DHA	Acide docosahexaénoïque
EPA	Acide éicosapentaénoïque
Fd	Ferrédoxine
IR	Infrarouge
Fig.	Figure
L/D	Light/Dark
LED	Diodes électroluminescentes (" <i>Light-Emitting Diodes</i> ")
LHC	Complexe pigments-protéines collecteur de lumière (" <i>Light-Harvesting Complex</i> ")
MS	Matière sèche
N	Azote
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NOP	Azote organique particulière
NO ₂ ⁻	Nitrites
NO ₃ ²⁻	Nitrates
NPQ	Quenching non-photochimique (" <i>Non-Photochemical Quenching</i> ")
O ₂	Dioxygène
OCP	Orange Carotenoid Protein
P	Photosynthèse
P680	Centre réactionnel du photosystème II
P700	Centre réactionnel du photosystème I
PAM	Pulse Amplitude Modulation
PAR	Radiations photosynthétiquement actives (400 - 700 nm) (" <i>Photosynthetically Active Radiation</i> ")
PBR	Photobioréacteur
PC	Plastocyanine
PEB	Phycoérythrobiline
PFD	Densité du flux de photons
Phéo	Phéophytine
PQ	Plastoquinone
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
PSI et II	Photosystèmes I et II
PUB	Phycourobiline
PUR	Radiations photosynthétiquement utilisables (" <i>Photosynthetically Usable Radiation</i> ")
Q	Quinone
qP	Quenching photochimique (" <i>Photochemical quenching</i> ")
ROS	Espèces réactives à l'oxygène (" <i>Reactive Oxygen Species</i> ")
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
TAG	Triglycéride/Triacylglycérol
T-Iso	<i>Tisochrysis lutea</i>
UV	Ultraviolet
3D	Trois dimensions

Introduction générale

Les voies de la couleur ne sont pas impénétrables (...) Il est temps de vous montrer qu'il y a quelques trois milliards d'années, avec pour créateurs le Hasard et la Nécessité, un processus de "séduction" mettant en œuvre couleurs et parfums s'organisait chez des organismes microscopiques qui, grignotant les rayons du soleil, inventaient la photosynthèse.

Claude Gudin – La vie nous en fait voir de toutes les couleurs (1998)

Depuis trois milliards et demi d'années, les microalgues¹ ont colonisé la quasi-totalité des écosystèmes de la planète : des océans aux glaciers, en passant par les lacs hyper-salés, les sols, les roches et les arbres. Ces micro-organismes photosynthétiques unicellulaires, qui utilisent la lumière comme source d'énergie pour fixer le carbone inorganique (CO₂), jouent un rôle primordial dans le fonctionnement des écosystèmes marins et façonnent le climat en modulant le CO₂ atmosphérique (Riebesell *et al.*, 2007). Dans l'océan actuel, le phytoplancton (du grec *phyton*, plante et *planktos*, errant), premier maillon des réseaux trophiques, participe à part égale avec les plantes terrestres à la production primaire mondiale et contribue substantiellement au cycle du carbone (Field, 1998). Près de 50 gigatonnes de carbone organique sont ainsi formées chaque année par ces organismes, dont 8 à 15 gigatonnes sont exportées vers l'océan profond (Falkowski *et al.*, 1998; Geider *et al.*, 2001 ; Guidi *et al.*, 2015). Ces organismes constituent ainsi le point d'entrée biologique principal du carbone inorganique et de l'énergie dans l'écosystème marin. L'énergie solaire est convertie par la photosynthèse en énergie chimique de liaison. Toutes les formes de vie dans la mer bénéficient, directement ou indirectement, de ce processus unique de conversion de l'énergie lumineuse (Richmond, 2008).

Au-delà de leur contribution au cycle du carbone et à la production d'oxygène, les microalgues sont porteuses de promesses d'avenir. A l'heure où, en raison des dérèglements climatiques et de la raréfaction des ressources pétrolières (Höök & Tang, 2013), l'utilisation des combustibles fossiles comme source majeure d'énergie est largement contestée, ces micro-organismes font l'objet d'une attention croissante dans le domaine des bioénergies (Chisti, 2008; Wijffels & Barbosa, 2010). Leur forte productivité, des taux de croissance élevés (le temps de doublement peut être de seulement 3,5 heures (Gordon & Seckbach,

¹ Le terme de microalgue, quelque peu abusif, désigne ici l'ensemble des micro-organismes unicellulaires photosynthétiques, procaryotes et eucaryotes.

2012)) et largement supérieurs à ceux des plantes terrestres, ainsi qu'une capacité, pour certaines espèces, à stocker d'importantes quantités de lipides, les ont positionnés comme une source prometteuse de biocarburants dits de troisième génération (Mata *et al.*, 2010).

L'intérêt des microalgues réside également dans l'étendue de la palette de molécules qu'elles peuvent produire, telles que les antioxydants, les pigments, les acides gras polyinsaturés à longues chaînes ou les vitamines. Cette diversité s'exprime à travers un grand nombre d'applications et de nombreux marchés en devenir. Les microalgues offrent ainsi un formidable potentiel d'innovation encore peu exploré.

Néanmoins, malgré un intérêt croissant pour la valorisation des microalgues depuis la moitié du 20^{ème} siècle, leur exploitation industrielle reste limitée. En effet, de nombreux verrous technologiques subsistent, qu'il faut lever afin d'augmenter les rendements, réduire les coûts, et assurer ainsi la viabilité économique de la filière. Notamment, les procédés de culture actuels impliquent une dépense énergétique importante à toutes les étapes du procédé : agitation du milieu pour assurer l'homogénéité des cultures et maintenir les algues en suspension, injection de CO₂, récolte, séchage et extraction. Par conséquent, le bilan net énergétique reste déficitaire (Collet *et al.*, 2014). L'enjeu pour l'avenir consiste donc à trouver des solutions permettant d'améliorer l'efficacité de chacune de ces étapes, afin que le bilan énergétique du procédé soit positif dans sa globalité. Réduire l'énergie d'agitation, en diminuant la vitesse de circulation des cellules dans les raceways de 0,5 à 0,3 m.s⁻¹, par exemple, permettrait une baisse moyenne des coûts énergétiques de 26 % (Norsker *et al.*, 2011).

Ce travail s'est donc principalement focalisé sur la physiologie des microalgues croissant dans un milieu caractéristique des cultures de production intensive. Notre premier objectif a été d'analyser et comprendre comment l'agitation turbulente, qui conditionne le régime lumineux des cellules au sein des cultures denses, affecte leur croissance et la productivité du procédé.

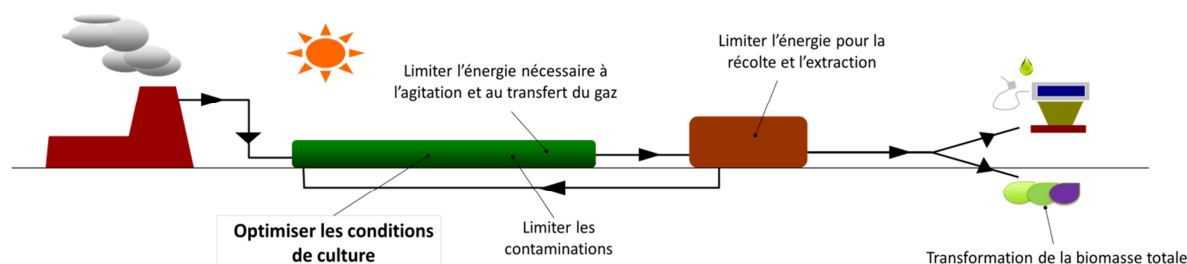


Figure A-1 : Schéma de production de la filière microalgues mettant en évidence les différents verrous associés à chaque étape du procédé.

Le régime lumineux joue en effet un rôle essentiel sur la croissance de ces organismes, soit directement, *via* la photosynthèse, soit indirectement, du fait des conditions de température variables qu'il induit (Ras *et al.*, 2013). Ceci est d'autant plus crucial que les systèmes de culture industriels sont caractérisés par une distribution hétérogène de l'énergie photonique, due à l'absorption et à la diffusion de la lumière par les cellules en suspension. Les fortes biomasses caractéristiques de ces systèmes génèrent un gradient de lumière extrêmement marqué au sein du milieu : une grande partie des photons incidents, majoritairement absorbés par les cellules proches de la source lumineuse, ne parviennent pas à pénétrer en profondeur dans la culture (Sorokin & Krauss, 1958 ; Cornet, 2010). Schématiquement, cela revient à considérer que le volume de culture se répartit en deux zones : une zone fortement éclairée, en surface, où le flux de photons est potentiellement saturant, voire inhibant, et une zone sombre, en profondeur, où ce flux limite la photosynthèse (Phillips & Myers, 1954 ; Richmond, 2000). Ainsi, en raison de leur mise en circulation, les cellules sont soumises à des cycles intermittents de lumière/obscurité lors du passage d'une zone à l'autre, selon un régime qui dépend de l'intensité de l'agitation. Cette spécificité des cultures denses soulève une question essentielle : comment les microalgues s'adaptent-elles à ces successions rapides de phases lumineuses et obscures ? Pour optimiser leur photosynthèse dans un environnement variable, les microalgues ont développé de nombreuses stratégies permettant, entre autres, de minimiser les photo-dommages (Richardson *et al.*, 1983 ; Havelková-Doušová *et al.*, 2004). Elles présentent ainsi la capacité de modifier leur cortège pigmentaire ou certaines caractéristiques structurales de leur appareil photosynthétique en réponse aux variations de l'intensité lumineuse (Falkowski & Owens, 1980 ; Falkowski & LaRoche, 1991 ; Herzig & Dubinsky, 1992). Ces processus de photoacclimatation ont largement été étudiés pour des niveaux lumineux maintenus stables (Herzig & Dubinsky, 1992 ; Garcia-Camacho *et al.*, 2012) ainsi que pour des régimes lumineux photopériodiques (Bruyant *et al.*, 2005) ou caractéristiques de la dynamique de la couche de mélange océanique (Marra, 1978 ; Litchman, 2000), mais très peu pour des régimes lumineux variant à haute fréquence. Une meilleure compréhension de l'impact du flux de photons sur la réponse photosynthétique des microalgues est donc essentielle à deux égards : améliorer la productivité globale du système et optimiser la quantité d'énergie perdue pour l'agitation.

Si la majorité des études concernant la lumière s'est concentrée sur l'effet de son intensité, sa composante spectrale joue également un rôle crucial sur les processus physiologiques comme l'efficacité photosynthétique, et affecte de ce fait la croissance des microalgues. En effet, la

photosynthèse n'utilise pas de manière identique tous les photons du spectre solaire. Les pigments absorbent différemment les photons selon leur longueur d'onde (Kirk, 1994 ; Falkowski *et al.*, 2004). Les radiations rouges et bleues du spectre lumineux sont majoritairement absorbées, à l'inverse des radiations vertes. Le spectre de la lumière incidente est ainsi progressivement modifié au cours de son absorption dans l'épaisseur de la culture : les photons rouges et bleus vont être rapidement absorbés et seuls les photons verts atteindront les couches plus profondes du système de culture. Les microalgues doivent alors s'adapter à ces variations qualitatives de la lumière. Certaines espèces de cyanobactéries, par exemple, peuvent modifier leur composition pigmentaire selon le spectre lumineux incident (Gaidukov, 1902; Tandeau de Marsac, 1977; Kehoe & Gutu, 2006). Cette remarquable adaptation chromatique² leur permet ainsi d'optimiser l'absorption de la lumière ambiante (Senger & Bauer, 1987). En revanche, les stratégies d'acclimatation chromatiques sont encore peu connues chez les autres taxons.

Ce travail de thèse va donc s'intéresser aux impacts à la fois quantitatifs et qualitatifs de la lumière sur la photosynthèse des microalgues.

Le fait qu'une partie du spectre lumineux soit peu, voire pas, absorbée a conduit à l'émergence du projet Purple Sun, qui vise à exploiter la part complémentaire de ce spectre pour produire de l'électricité "décarbonée". L'idée fondatrice de ce projet, dans lequel s'inscrit une partie de ce travail, est de combiner production photosynthétique et production photovoltaïque à l'aide de panneaux solaires semi-transparents d'un nouveau genre, la part photovoltaïque pouvant produire l'énergie nécessaire au procédé de production de biomasse (Moheimani & Parlevliet, 2013).

En retenant une partie des photons incidents, ces panneaux offrent en outre la possibilité de limiter les effets résultant de l'excès d'énergie lumineuse et les phénomènes de surchauffe des cultures, délétères pour le rendement photosynthétique des microalgues. La question du partage optimal des longueurs d'ondes réservées aux micro-organismes et aux panneaux photovoltaïques est donc capitale et a fait l'objet d'une partie importante de notre travail. Evaluer finement l'impact de la composition spectrale sur le cortège pigmentaire et la productivité des microalgues constitue ainsi notre second objectif.

² Nous privilégierons le terme d'acclimatation chromatique, plus approprié pour qualifier ce phénomène. La différence entre adaptation et acclimatation est précisée en page 45 (Chapitre I, §5.1.2).

Organisation du manuscrit

En combinant des approches expérimentales et théoriques, cette thèse a pour ambition d'améliorer notre compréhension de la réponse des microalgues aux variations rapides de la lumière, d'une part, et à sa composition spectrale, d'autre part, ceci dans la perspective d'optimiser leur productivité et la bioaccumulation de molécules à haute valeur ajoutée. Le travail que nous présentons ici, qui se situe à l'interface entre recherches fondamentale et appliquée, s'articule autour de sept chapitres.

Après une présentation du potentiel biotechnologique des microalgues et des différents dispositifs de production, le **premier chapitre** fournit un bilan des connaissances sur l'effet de l'intensité lumineuse et de la composition spectrale sur la croissance et les mécanismes d'acclimation des microalgues. Une description de la photosynthèse oxygénique (son origine et son fonctionnement) est également proposée.

Le **second chapitre** expose les différentes méthodes et techniques de mesure mises en œuvre au cours de cette étude. Une attention particulière est portée aux systèmes de culture et d'éclairage spécifiquement développés pour ce travail.

Le **troisième chapitre**, constitué d'un article publié dans le journal *Biotechnology and Bioengineering*, est consacré aux effets d'un régime lumineux intermittent sur la réponse photosynthétique et les processus de photoacclimation de *Dunaliella salina*. Le **quatrième chapitre** a pour objectif d'examiner la réponse de *Dunaliella salina* à des signaux lumineux réalistes, reproduisant les fluctuations de l'éclairement réellement perçues par les microalgues dans les systèmes de cultures industriels.

Les **cinquième et sixième chapitres** traitent de l'influence de la qualité spectrale sur la croissance et les propriétés physiologiques des microalgues. Dans le **cinquième chapitre**, nous analysons la réponse de *Dunaliella salina* à des lumières de différentes compositions spectrales. Nous insistons notamment sur l'originalité de nos recherches par rapport aux travaux publiés. De manière analogue à l'étude présentée au troisième chapitre, les expériences y sont conduites en mode turbidostat³, à faible concentration cellulaire, afin d'assurer des conditions stables de croissance - non limitées par les ressources nutritives - et une distribution homogène de la lumière au sein des cultures.

³ Les descriptions du mode turbidostat et du "chémostat photolimité" sont présentées en page 87 (Chapitre II, §2.3.1).

Dans le **sixième chapitre**, nous étudions les effets interdépendants de la qualité spectrale et de l'auto-ombrage sur la croissance de *Dunaliella salina* et de *Tisochrysis lutea*, cultivées à haute densité de biomasse, condition caractéristique des systèmes de culture industriels. Des expériences en « chémostat photolimité »³ sont mises en œuvre afin que les cultures ne soient limitées que par le flux de photons auto-ombré. Dans un second temps, nous présentons le modèle mathématique construit à partir des données obtenues. Enfin, des simulations sont effectuées dans une plus large gamme de conditions environnementales afin de comprendre et de prédire les effets de la composition spectrale sur la productivité des cultures denses de microalgues.

Finalement, dans le **septième** et dernier chapitre, nous mettons en évidence l'importance des résultats obtenus pour la compréhension de l'impact de la lumière, tant en termes d'intensité que de composition spectrale, sur la croissance des microalgues et leur bioaccumulation de molécules d'intérêt. Les implications industrielles y sont également mises en perspective.

Chapitre I –Etat de l’art

*“It’s not love or money that makes the world go round, it’s **photosynthesis**.”*

Masojidek



Is. Newton

Timbre allemand (1993) et signature d’Isaac Newton. Sur le timbre, nous pouvons voir la décomposition spectrale de la lumière, dont il est, entre autres, question dans ce chapitre.

Où sont présentés :

- Le potentiel biotechnologique des microalgues et leurs dispositifs de culture
- Les deux espèces d’intérêt de cette étude : *Dunaliella salina* et *Tisochrysis lutea*
- Le processus de photosynthèse oxygénique
- Les effets des **variations de l'intensité lumineuse** et de la **composition spectrale** sur la croissance et les mécanismes d’acclimatation des microalgues

Sommaire

1. Introduction	22
2. Les microalgues ? Des micro-organismes à macro potentiel	22
2.1 Une immense diversité mal connue et à peine exploitée.....	23
2.2 Un réservoir de molécules innovantes pour de nombreuses applications	25
2.3 Les pigments : des molécules aux multiples propriétés	27
2.4 Systèmes de culture	28
2.4.1 Les systèmes ouverts, à grande échelle.....	29
2.4.2 Les systèmes fermés	30
3. Microalgues d'étude	32
3.1 <i>Dunaliella salina</i> , la pépite des salins	32
3.2 <i>Tisochrysis lutea</i> , une espèce riche en lipides	33
4. La photosynthèse oxygénique	34
4.1 Les membranes photosynthétiques.....	35
4.2 Principe de fonctionnement.....	36
4.3 Aspects structuraux et fonctionnement des photosystèmes	37
4.3.1 Aspects fonctionnels du photosystème II.....	38
4.3.2 La photolyse de l'eau à la surface luminale du centre réactionnel du PSII	39
4.3.3 Aspects fonctionnels du photosystème I.....	40
5. L'étonnante plasticité de l'appareil photosynthétique des microalgues face aux variations de l'intensité lumineuse	42
5.1 Réponse biologique des micro-organismes photosynthétiques à l'intensité lumineuse.....	43
5.1.1 La photoinhibition.....	44
5.1.2 Comment survivre dans un environnement changeant ? La photoacclimatation, une réponse à long terme	45
5.1.3 Les mécanismes de photoprotection, à court terme	47
5.2 Les systèmes de culture industriels : des variations de lumière à haute fréquence	51
5.2.1 Rôle de l'hydrodynamique	51
5.2.2 Des régimes fluctuants générés par l'hydrodynamique.....	51
5.2.3 Effet des régimes fluctuants sur la croissance photosynthétique.....	53
5.2.4 Des flashes à l'histoire lumineuse	56
6. Réponse de l'appareil photosynthétique aux variations du spectre lumineux	57
6.1 La naissance de la théorie des couleurs. De Newton à Einstein.....	57
6.2 Modification du spectre lumineux dans la colonne d'eau	58
6.3 Utilisation du spectre lumineux par les microalgues : une riche variété de pigments photosynthétiques.....	59

6.4 Atténuation de la lumière en fonction de la profondeur dans un photobioréacteur	63
6.5 Effet de la lumière colorée sur les pigments et la croissance des micro-organismes photosynthétiques.....	64
6.5.1 <i>Premières approches de l'impact de la couleur sur la croissance des microalgues et la bioaccumulation de molécules d'intérêt</i>	66
6.5.2 <i>Comment les organismes perçoivent-ils les radiations lumineuses ? Une question d'actualité chez les eucaryotes unicellulaires.....</i>	68
6.5.3 <i>Les mécanismes de photoréception et de photoorientation chez Dunaliella</i>	70

1. Introduction

Ce chapitre introduit tout d'abord le potentiel biotechnologique des microalgues ainsi que les différents systèmes de culture. Les deux espèces de microalgues utilisées au cours de cette étude sont ensuite présentées. Dans une troisième partie, une description du processus de photosynthèse oxygénique est proposée. Finalement, les deux dernières sections dressent un état des connaissances actuelles sur l'effet de l'intensité lumineuse et de la composition spectrale sur la croissance et les mécanismes d'acclimatation des microalgues.

2. Les microalgues ? Des micro-organismes à macro potentiel

Le terme de microalgue désigne, abusivement, l'ensemble polyphylétique, mais morpho-fonctionnel, constitué par les micro-organismes unicellulaires photoautotrophes, procaryotes et eucaryotes. Les micro-organismes photosynthétiques procaryotes sont représentés par les cyanobactéries (parfois appelées « algues bleu-vert »). Les micro-organismes photosynthétiques eucaryotes constituent un groupe diversifié, regroupant de nombreuses classes (Fig. I-1).

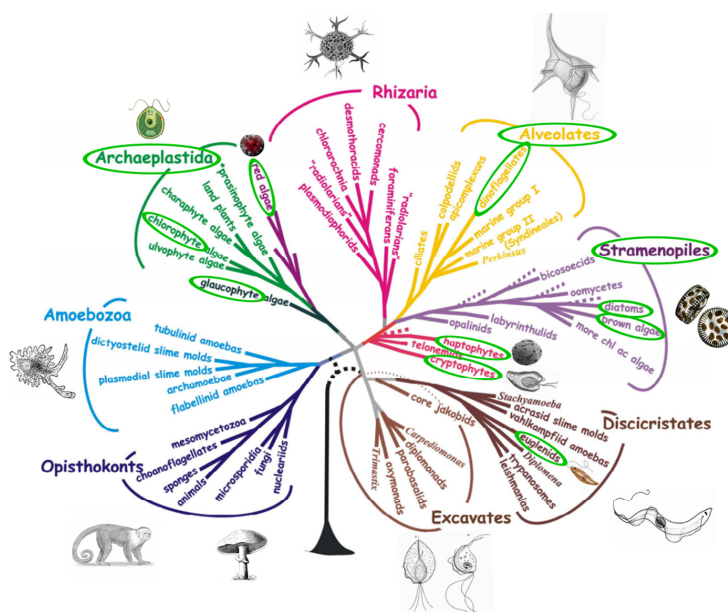


Figure I-1 : Arbre phylogénétique présentant les principales lignées eucaryotes. Les taxons de microalgues sont indiqués en vert. D'après Baldauf, 2008 (modifié).

2.1 Une immense diversité mal connue et à peine exploitée

Les microalgues constituent un groupe hétérogène d'une extrême diversité, supérieure à celle des plantes terrestres. Cette diversité se reflète par une riche variété de comportements (mobiles, planctoniques ou sessiles), de morphologies (e.g. sphériques, cylindriques, ovoïdes et même pyramidales), de couleurs et de tailles. Ces organismes mesurent de quelques microns à plusieurs centaines de microns (Cadoret & Bernard, 2008). Alors qu'elles sont généralement libres, un certain nombre de microalgues vivent en association symbiotique avec d'autres organismes (Richmond, 2008).

De par cette diversité, associée à une importante plasticité métabolique, les microalgues sont des organismes ubiquistes qui occupent la quasi-totalité des écosystèmes de la planète (Mata *et al.*, 2010). Peuplant principalement les environnements aquatiques, saumâtres et dulcicoles, elles ont su également conquérir les sols et une vaste gamme de supports terrestres (Macedo *et al.*, 2009 ; Hannon *et al.*, 2010). Preuve de la diversité de leurs habitats, certaines espèces ont colonisé des écosystèmes hostiles, tels que les lacs hyper-salés, les glaciers, les déserts et même les sources hydrothermales (Bougaran & Saint-Jean, 2014).

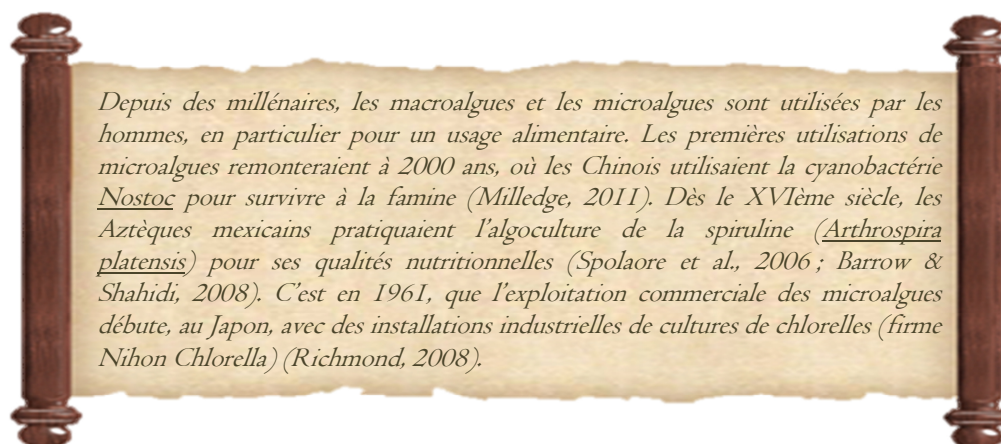
De plusieurs centaines de milliers à quelques millions d'espèces vivraient actuellement sur la planète, dont quelques dizaines de milliers seulement sont référencées (Andersen *et al.*, 1997 ; Sharma & Rai, 2011). La classification taxonomique (voir tableau I) de cette diversité demeure complexe et est sujette à de fréquentes modifications. Elle est actuellement basée sur diverses propriétés comme la pigmentation, la nature chimique des produits de stockage, l'organisation des membranes photosynthétiques ou encore sur des caractères morphologiques tels que la présence de flagelles (Richmond, 2008).

Malgré un intérêt croissant pour la valorisation des microalgues depuis la moitié du 20^{ème} siècle, seule une dizaine d'espèces sont aujourd'hui produites à l'échelle industrielle (Degen *et al.*, 2001 ; Mata *et al.*, 2010).

Tableau I: Classification simplifiée des algues eucaryotes et procaryotes. Les Prymnesiophycées et les Chlorophycées, dans lesquelles se classent respectivement *Tisochrysis lutea* et *Dunaliella salina*, sont indiquées en couleur. D'après Margulis & Schwartz, 1998 et Barsanti & Gualtieri, 2014.

Règne	Embranchement	Classe
Procaryotes	Cyanophyta (Cyanobacteria)	Cyanophyceae
	Glaucomphyta	Glaucomphyceae
	Rhodophyta	Bangiophyceae
		Floriophyceae
		Rhodophyceae
	Ochromphyta	Chrysophyceae
		Xanthophyceae
		Eustigmatophyceae
		Bacillariophyceae (diatomées)
		Raphidophyceae
Eucaryotes		Dictyochophyceae
		Phaeophyceae
	Haptophyta	Prymnesiophyceae
	Cryptophyta	Cryptophyceae
	Dinophyta	Dinophyceae (dinoflagellés)
	Euglenophyta	Euglenophyceae
	Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae
	Chlorophyta	Prasinophyceae
		Chlorophyceae
		Ulvophyceae
	Charophyta	Charophyceae

2.2 Un réservoir de molécules innovantes pour de nombreuses applications



La diversité des microalgues, encore peu exploitée, constitue un réel potentiel pour la recherche et l'industrie. Leur utilisation à des fins commerciales et le nombre de publications dans le domaine des applications industrielles se sont multipliés ces dernières décennies. A titre d'exemple, plus de deux cents projets industriels sur la production de microalgues à vocation énergétique ont été répertoriés et plus de 2 milliards d'euros ont été investis, en particulier aux Etats-Unis (De Rosbo & Bernard, 2014).

La production mondiale de microalgues est actuellement estimée à un peu plus de 15 000 tonnes de matière sèche par an (Bougaran & Saint Jean, 2014). *Arthrospira (Spirulina) platensis* (3000 t/an) est l'espèce la plus cultivée à l'échelle industrielle, suivie par *Chlorella* sp. (2000 t/an), *Dunaliella salina* (1200 t/an), *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis* sp., *Odontella aurita* et *Isochrysis galbana* (Spolaore *et al.*, 2006 ; Mata *et al.*, 2010) (voir tableau II).

Les microalgues peuvent produire une grande diversité de molécules à haute valeur ajoutée telles que les protéines, les acides aminés, les carbohydrates, les polysaccharides, les vitamines, les antioxydants, les pigments, ou encore les acides gras polyinsaturés à longues chaînes comme le DHA (acide docosahexaénoïque) et l'EPA (acide éicosapentaénoïque) (Mata *et al.*, 2010).

De par cette richesse intrinsèque, les micro-organismes photosynthétiques offrent un potentiel d'innovation pour de nombreux marchés en pleine expansion, notamment dans les domaines de la cosmétique, de la pharmaceutique, de la nutraceutique, de l'énergie, de la nutrition humaine et animale (aquaculture) ou encore de la bioremédiation (Bougaran & Saint Jean, 2014) (Fig. I-2).

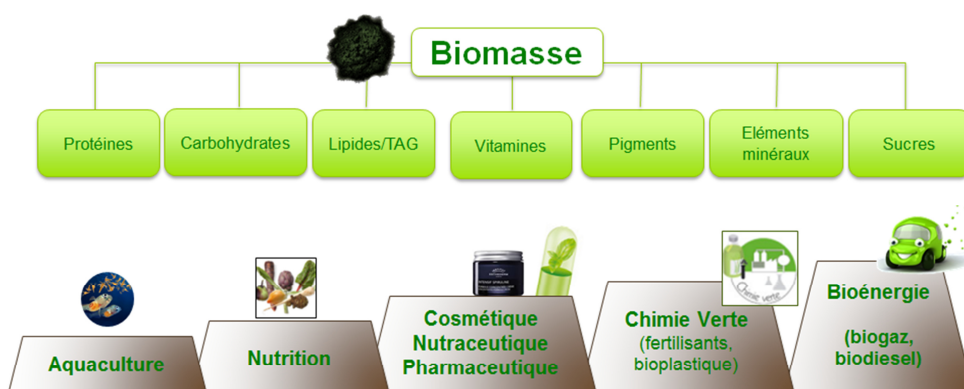


Figure I-2 : Composition des microalgues et applications industrielles.

Le domaine de la nutrition humaine constitue la première voie de commercialisation des microalgues. Selon les applications, la biomasse peut être utilisée dans son intégralité ou faire l'objet d'extraction, de transformation et de conditionnement de composés à haute valeur ajoutée. Ce marché est en constante expansion depuis les 40 dernières années. Les espèces de microalgues sont utilisées comme complément alimentaire en raison de leur composition riche en protéines, en acides gras polyinsaturés (oméga 3, $\omega 3$ et oméga 6, $\omega 6$), en pigments, en vitamines et en sels minéraux, ou comme colorant alimentaire naturel (Spolaore, 2006). Leurs qualités nutritionnelles leur confèrent également des applications dans l'industrie de la nutrition animale, en particulier en aquaculture (Benemann, 1992 ; Borowitzka, 1997 ; Marchetti *et al.*, 2012) où les microalgues sont utilisées comme source d'alimentation pour le bon développement des stades larvaires des mollusques bivalves, pour les crustacés ou encore pour certains alevins de poissons (Cardozo *et al.*, 2007). L'industrie cosmétique apparaît ensuite comme l'un des secteurs les plus lucratifs pour la vente de produits à base de microalgues. Les molécules bioactives issues de ces micro-organismes entrent dans la composition de produits de maquillage, de soins anti-âge et hydratants, de produits solaires ou encore de soins capillaires (Spolaore *et al.*, 2006). La chimiodiversité des microalgues offre également la possibilité de développer de nouveaux principes actifs et médicaments. De nombreuses molécules ont des vertus anti-tumorales ou antivirales et présentent des effets protecteurs vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (Skulberg, 2000 ; Laurienzo, 2010).

Ces dernières années, les microalgues ont également fait l'objet d'une attention particulière dans le domaine des bioénergies (Chisti, 2008; Wijffels & Barbosa, 2010). Leur forte productivité, des taux de croissance élevés et largement supérieurs à ceux des plantes terrestres, ainsi qu'une capacité, pour certaines espèces, à stocker d'importantes quantités de lipides, les ont positionnées comme une source potentielle clé de biocarburants, dits de 3^{ème} génération (Mata *et al.*, 2010). En particulier, certaines espèces peuvent accumuler de grandes quantités de triglycérides (TAG)

(jusqu'à 50 % de leur poids sec (Amaro *et al.*, 2011)), en réponse à une carence en nutriment ou à une exposition à une forte intensité lumineuse (Rodolfi *et al.*, 2009). En outre, leur production, qui ne nécessite pas de sols fertiles et ne rentre donc pas en compétition avec la production agricole, leur confère un fort potentiel de mitigation du CO₂ d'origine industrielle (Gouveia & Oliveira, 2009).

2.3 Les pigments : des molécules aux multiples propriétés

“Les caroténoïdes, plus qu'une classe de pigments, sont des substances aux caractéristiques très remarquables qu'aucun autre groupe de molécules ne possède.”

Britton (1995)

Outre la chlorophylle (Chl), pigment capable de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique par la photosynthèse (voir §6.3), les microalgues possèdent une large gamme de pigments 'accessoires': les caroténoïdes et les phycobiliprotéines.

Les caroténoïdes sont des pigments au fort pouvoir antioxydant qui présentent de nombreuses applications (Guedes *et al.*, 2011). Parmi eux, le β -carotène, qui est un pigment orange liposoluble, offre de nombreuses utilisations en pharmacologie, en cosmétique ainsi que dans l'industrie agroalimentaire (Bauernfeind, 1981 ; Raposo *et al.*, 2001 ; Chidambara-Murthy *et al.*, 2005 ; Lamers *et al.*, 2010 ; Tang & Suter, 2011). C'est un précurseur de la vitamine A (provitamine A), essentielle pour la vision et le bon fonctionnement du système immunitaire (Tanumihardjo, 2002). Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence l'effet du β -carotène sur la prévention de plusieurs types de cancers, de l'athérosclérose ou encore de maladies cardiaques (Poppel & Goldbohm, 1995 ; Ben-Amotz & Levy, 1996 ; Rao & Agarwal, 1998 ; Raposo *et al.*, 2013). L'astaxanthine, un autre caroténoïde également antioxydant, est un anti-inflammatoire commercialisé dans l'industrie pharmaceutique, pour son action contre les douleurs musculaires par exemple, mais aussi comme complément alimentaire ou comme colorant rose en aquaculture (Pulz & Gross, 2004 ; Ohr, 2005 ; Cerón *et al.*, 2007). D'autres caroténoïdes, tels que la lutéine, la zéaxanthine et la canthaxanthine sont également employés comme colorants alimentaires ou à des fins pharmaceutiques (Pulz & Gross, 2004).

Les phycobiliprotéines (e.g. phycocyanine, phycoérythrine) sont présents chez les cyanobactéries et les rhodophytes. Ces pigments sont utilisés pour des applications alimentaires, cosmétiques et également pharmaceutiques (Pulz & Gross, 2004 ; Mao *et al.*, 2005). L'action des phycocyanines dans la défense du système immunitaire et comme agent anti-inflammatoire a récemment été mise en évidence (Datla, 2011).

Tableau II : Production mondiale des trois principales espèces de microalgues commercialisées et de *Tisochrysis lutea*. Production annuelle, pays producteurs, productions & applications principales et contenu lipidique. D'après 1- Spolaore *et al.*, 2006, 2- Amaro *et al.*, 2011 ; 3- Tang & Suter, 2011, 4- Wu *et al.*, 2005, 5- Danesi *et al.*, 2011, 6- Gouveia *et al.*, 1996 ; 7- Borowitzka, 1990 ; 8- Oren, 2005 ; 9- García *et al.*, 2007, 10- Borowitzka, 1997, 11- Marchetti *et al.*, 2012. (-)=non renseigné.

Espèces	Production annuelle (tonnes de masse sèche)	Pays producteurs	Productions principales	Applications	Contenu lipidique (% masse sèche)	Références
<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	3000	Asie (Chine, Inde, Japon), USA, Birmanie	Phycocyanine β-carotène Protéines (60% de la matière sèche) Vitamines	Nutrition humaine et animale, cosmétiques, pharmaceutiques, complément alimentaire	4 - 16.6	1, 2, 3, 4, 5
<i>Chlorella</i> sp.	2000	Taiwan, Allemagne, Japon	Caroténoïdes Amidon Protéines Vitamines Fer	Nutrition humaine, aquaculture, complément alimentaire, cosmétiques	10 - 48	1, 2, 3, 6
<i>Dunaliella salina</i>	1200	Australie, Israël, USA, Chine	Caroténoïdes (β-carotène, lutéine, astaxanthine, zéaxanthine)	Nutrition humaine, cosmétiques, pharmaceutiques	6 - 25	1, 2, 3, 7, 8, 9
<i>Tisochrysis lutea</i> (T-iso)	-	-	Acide gras	Aquaculture	7 - 40	2, 10, 11

2.4 Systèmes de culture

L'intérêt croissant pour les microalgues a entraîné une diversification des systèmes de culture qui doivent être adaptés à l'espèce cultivée et aux molécules d'intérêt. Pour l'étude ou la valorisation d'une espèce, les paramètres de production et le choix du dispositif de culture représentent des critères essentiels. Ces derniers sont également déterminants pour la rentabilité économique des productions; la productivité et les coûts étant inhérents au type de système de culture utilisé.

La production de microalgues fait traditionnellement appel à deux grandes familles de systèmes de culture, utilisées à l'échelle laboratoire ainsi qu'à l'échelle industrielle : les bassins à haut rendement (aussi appelés « open ponds » ou « raceways » par analogie avec la forme des champs de course) et les photobioréacteurs (PBRs) (Grobbelaar & Kurano, 2003), chacun possédant avantages et inconvénients (Del Campo *et al.*, 2007 ; Grobbelaar, 2009). Les raceways, ouverts sur l'extérieur, sont faiblement contrôlables mais présentent un coût réduit à l'investissement et une grande facilité de mise en œuvre et de maintenance (Brennan & Owende, 2010). Au contraire,

les PBRs sont des systèmes clos beaucoup plus onéreux, mais qui permettent un meilleur contrôle des conditions de culture. Le choix du système de production, dépend, en particulier, du degré de contrôle de l'environnement physico-chimique et biologique nécessaire à la production du composé valorisable (Apt & Behrens, 1999).

2.4.1 Les systèmes ouverts, à grande échelle

Durant les dernières décennies, les systèmes ouverts ont été majoritairement exploités pour les cultures de microalgues à grande échelle (van Harmelen & Oonk, 2006). Malgré l'existence de lagunes naturelles, les structures artificielles de type raceways ont été les plus utilisées depuis leur développement dans les années 1950 (Christenson & Sims, 2011) (Fig. I-3). Les raceways sont des bassins de faible profondeur (entre 10 et 50 cm), agités mécaniquement à l'aide de roues à aubes (Benemann *et al.*, 1987 ; Del Campo *et al.*, 2007). Considérés à ce jour comme des systèmes rentables (Langley *et al.*, 2012) malgré leur faible productivité (environ 20 à 25 gMS.m⁻².j⁻¹ pour une biomasse inférieure à 0,6 gMS.L⁻¹ (Tredici, 2004 ; Norsker *et al.*, 2011)), les raceways sont cependant difficilement contrôlables. Exposés directement à l'atmosphère, ils sont sujets à contamination, ce qui a d'ailleurs motivé la culture d'espèces extrémophiles, comme *Dunaliella salina* et *Spirulina platensis*, respectivement capables de se multiplier dans des conditions hypersalines et hyperalcalines (Lee, 2001). Par ailleurs, ils subissent les variations quotidiennes et saisonnières de la température et de l'éclairement (Apt & Behrens, 1999), et ce d'autant plus facilement qu'ils sont peu profonds. De grosses pertes d'eau par évaporation sont également observées dans ce type de système (Chisti, 2007). Finalement, le faible brassage des cultures diminue l'accès des cellules à la lumière (Razzak *et al.*, 2013).

A titre d'exemple, *Dunaliella salina*, qui est majoritairement produite au sein de systèmes ouverts, principalement localisés dans des régions au climat chaud et ensoleillé, présente des productivités pouvant atteindre entre 5 et 10 gMS.m⁻².j⁻¹ (Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009).

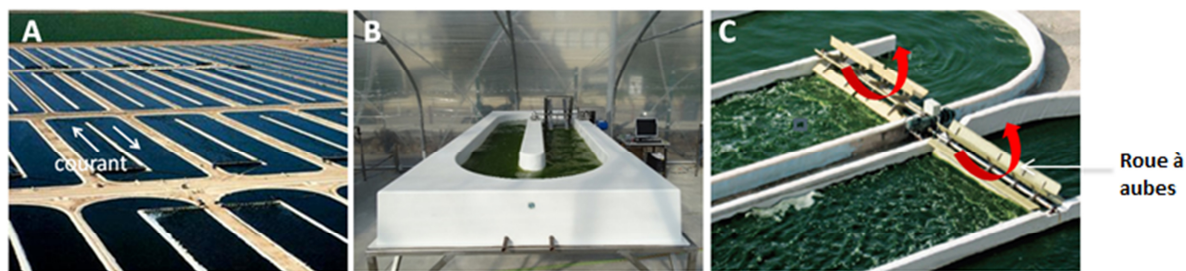


Figure I-3 : Systèmes ouverts de culture de microalgues à différentes échelles. (A) Champs de raceways pour la culture de spiruline à grande échelle (bassins ouverts de 0,4 ha chacun), Calipatria, Californie (Andersen, 2005) ; (B) Raceway pilote (6,4 m²), pour l'étude de *Dunaliella salina* sous serre, Villefranche-sur-Mer, France ; (C) Système mécanique de type roue à aubes permettant le mélange des cultures.

2.4.2 Les systèmes fermés

Verticaux, horizontaux, plans, annulaires, cylindriques, tubulaires, toriques, en spirale, de type colonne à bulle, en forme de dôme ou encore de pyramide, les PBRs adoptent une grande variété de géométries, décrites dans la littérature (Makareviciene, 2013) (Fig. I-4). Les PBRs sont définis comme des systèmes fermés, fabriqués à partir de matériaux transparents. Offrant un environnement clos, ils préservent les cultures des contaminations. Les PBRs sont illuminés de façon interne ou externe, par une lumière naturelle (solaire) ou artificielle. Leur design cherche à optimiser la distribution de la lumière et à améliorer l'efficacité du mélange. Ils permettent de contrôler finement les paramètres de croissance (lumière, température, nutriments, pH, volume de culture, niveau de biomasse, distribution en gaz (air, CO₂)), afin de maximiser la productivité. En particulier, les PBRs de type plan, apparus dans les années 1950, sont caractérisés par une faible épaisseur, généralement inférieure à 10 cm (Chisti, 2007), ce qui permet d'améliorer l'exploitation de la lumière par la culture en limitant la zone d'ombrage (Pulz & Scheibenbogen, 1998 ; Degen *et al.*, 2001). Ces systèmes sont aussi utilisés dans la recherche qui nécessite des conditions axéniques et hautement contrôlées. Les PBRs, qui permettent des productivités supérieures à 1,3 gMS.L⁻¹.j⁻¹ (Pulz, 2001), sont considérés comme les dispositifs les plus productifs (Hosseini & Shariati, 2009). Néanmoins, les coûts de production, incluant les coûts énergétiques ainsi que ceux liés à la fabrication et à la maintenance de ces dispositifs sont importants.

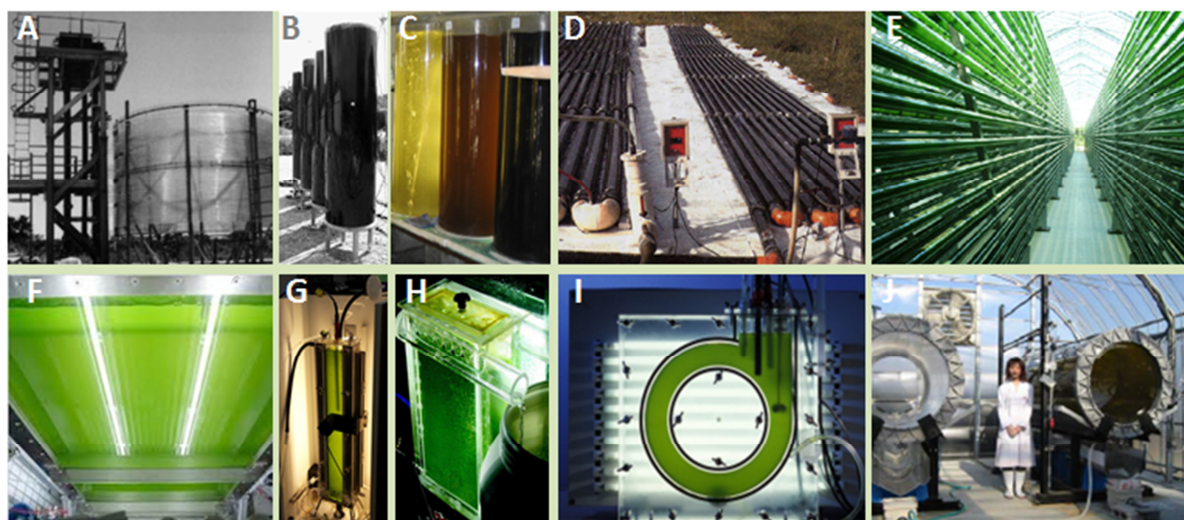


Figure I-4 : Exemples de géométries de photobioréacteurs pour la culture de microalgues.

Photobioréacteurs (A) « Biocoil » (Richmond, 2000), inventé par L. Robinson (1987) ; (B) Annulaires verticaux (Zittelli *et al.*, 2006) ; (C) De type colonne à bulles (Scolabiti) ; (D) Tubulaires, disposés sur une surface réfléchissante (Tredici & Materassi, 1992), (E) Tubulaires horizontaux (Demirbas & Demirbas, 2010) ; (F, G, H) Plans, développés respectivement au laboratoire de Génie des procédés, environnement, agro-alimentaire (GEPEA), Nantes ; au laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer (LOV) et à l'Université de Wageningen, Pays-Bas ; (I) Torique, mis au point par les laboratoires IFREMER et GEPEA (Pruvost *et al.*, 2006) ; (J) « Pipe photobioreactor » (PBR tubulaire délimité par un volume cylindrique annulaire fermé) de la société Yamaha Motor Co.

3. Microalgues d'étude

3.1 *Dunaliella salina*, la pépite des salins

Dunaliella salina (Dunal) Teodoresco, 1905⁴ (Chlorophyta, Chlorophyceae) est une Chlorophycée appartenant à l'ordre des Chlamydomonadales et à la famille des Dunaliellaceae (Polle *et al.*, 2009). Elle mesure entre 10 et 12 μm de long pour 8 μm de large (García *et al.*, 2007). Comme *Chlamydomonas reinhardtii*, dont elle est très proche, elle se déplace à l'aide de deux flagelles ou *undulipodia*⁵ et ne dispose que d'un unique chloroplaste cupuliforme. La paroi cellulosique est absente, remplacée par une fine couche glycoprotéique qui facilite son polymorphisme (Teodoresco, 1905) (Fig. I-5).

Cette espèce est responsable d'une part importante de la production primaire dans les environnements hypersalins où elle tend à dominer dans les premiers centimètres sous la surface (Borowitzka & Borowitzka, 1988 ; Oren, 2005). Dans les salins du midi, par exemple, *Dunaliella salina* tolère une large gamme de salinités (entre 0,5 et 5,5 M (Karni & Avron, 1988)), contrairement à nombre de compétiteurs et de prédateurs potentiels (Ben-Amotz *et al.*, 1991 ; García *et al.*, 2007).

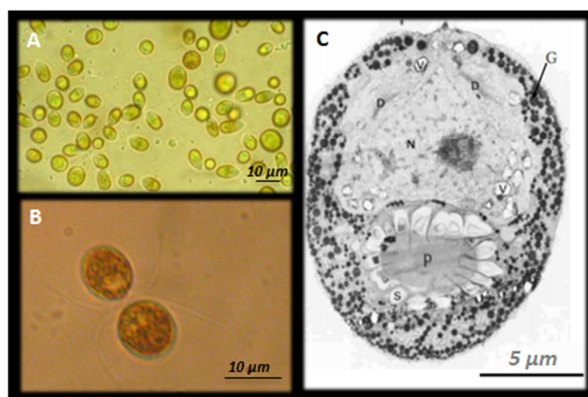


Figure I-5 : Photographies de *Dunaliella salina*. Observations au microscope inversé de cellules (A) normales et (B) stressées. (C) Coupe longitudinale en microscopie électronique à transmission (Leonardi & Cáceres, 2004). D=dictyosome, G=granule de β -carotène, N=noyau, P=pyrénoïde, S= amidon, V=vacuole.

Ces qualités ont motivé sa production industrielle dans diverses régions (e.g. eaux marines ou saumâtres), d'autant qu'elle offre de nombreux avantages en termes de produits commercialisables. En effet, cette espèce est connue pour sa capacité de stockage de caroténoïdes, tels que le β -carotène et la lutéine⁶ (Spolaore, 2006). Plus précisément, *Dunaliella salina* peut, en conditions de stress lumineux ou nutritif par exemple, accumuler de grandes quantités de β -carotène, jusqu'à 14 % de son poids sec, au sein de vésicules lipidiques (Ben-Amotz & Avron, 1983 ; Mendoza *et al.*, 1999 ; García *et al.*, 2007 ; Lamers *et al.*, 2010). Cette espèce résiste aussi

⁴ *Dunaliella salina* a été découverte en 1838 dans des marais salants situés près de Montpellier (France) par Michel Felix Dunal, qui lui donna le nom d'*Haematococcus salinus*. En 1905, Emmanuel Constantin Teodoresco classa cette microalgue dans un nouveau genre : *Dunaliella* (Ben-Amotz & Avron, 1992).

⁵ Nom donné aux flagelles des organismes eucaryotes.

⁶ *D. salina* produit également d'autres caroténoïdes tels que de l' α -carotène, de la zéaxanthine et de la néoxanthine (Ben-Amotz *et al.*, 1982 ; Denery *et al.*, 2004).

à la photoinhibition (Herrmann *et al.*, 1996), grâce à la fonction photoprotectante du β -carotène ou à sa capacité à ajuster la taille des antennes du photosystème II (PSII, Borowitzka & Borowitzka, 1988). L'abondance des vésicules lipidiques est responsable du changement de couleur des cellules qui peuvent passer du vert à l'orange. Cette espèce produit également des triglycérides (de 10 à 20 % de son poids sec) utilisables pour la production de biocarburant (Griffiths & Harrison, 2009), ainsi que du glycérol, un osmo-régulateur lui permettant de résister aux pressions osmotiques aux fortes salinités.

3.2 *Tisochrysis lutea*, une espèce riche en lipides

Tisochrysis lutea (anciennement *Isochrysis affinis galbana*)⁷ (T-Iso) (Haptophyta, Prymnesiophyceae) est un flagellé appartenant à la classe des Prymnesiophycées et à l'ordre des Isochrysidales. D'une couleur brun-doré, T-Iso a un diamètre compris entre 4 et 6 μm (Bougaran *et al.*, 2014) (Fig. I-6). Son taux de croissance élevé (de 1 à 2 doublements de la biomasse par jour) et sa tolérance à une large gamme de conditions physico-chimiques la positionnent comme une espèce clé de l'aquaculture moderne (Caperon, 1968 ; Sukenik & Livne, 1991 ; Bendif *et al.*, 2013). En particulier, sa haute teneur en acides gras essentiels (ω -3 & ω -6) en fait une source d'alimentation de qualité pour les premiers stades larvaires des poissons et des mollusques (Bougaran *et al.*, 2012). Par ailleurs, T-Iso peut accumuler d'importantes quantités de lipides, notamment neutres (de 7 à 40 % de son poids sec (Amaro *et al.*, 2011)).

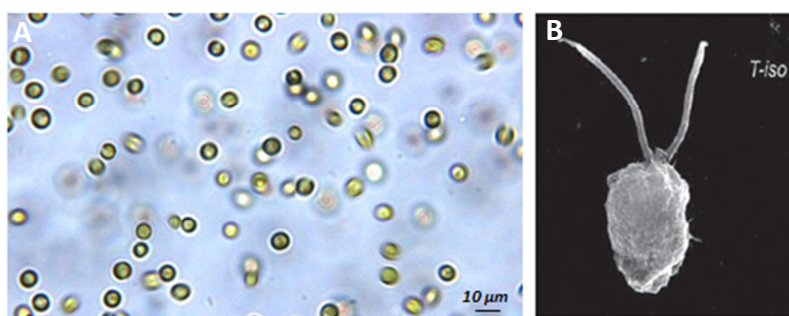


Figure I-6 : *Tisochrysis lutea* (A) Observation au microscope inversé ; (B) Observation au microscope électronique à balayage, réalisée par Chrétiennot-Dinet (2004).

⁷ *Isochrysis affinis galbana* a été découverte en 1977 par K.C Haines à Tahiti (Polynésie Française). La taxonomie a ensuite été modifiée par Bendif *et al.* (2013), qui ont renommé la souche *Tisochrysis lutea*.

4. La photosynthèse oxygénique

« J'avais pris un pot de terre cuite. J'y avais placé 200 livres de terre, séchée dans un four, arrosée d'eau ensuite, et j'y avais planté une bouture de saule pesant 5 livres. Cinq ans après, l'arbre qu'elle était devenue pesait 169 livres et 3 onces. Finalement, je séchai à nouveau la terre du pot, je trouvai qu'elle pesait 200 livres moins 2 onces : 169 livres de bois, écorce et racines, avaient donc été produites à partir de l'eau seule »

Baptiste van Helmont (1579-1644)

La lumière est la source d'énergie qui contrôle la quasi-totalité des écosystèmes de notre planète (Huisman *et al.*, 2002). Elle est le carburant énergétique d'un des mécanismes les plus importants de la Terre : la photosynthèse. En effet, toutes les formes de vie sur Terre dépendent, directement ou indirectement, de ce processus unique de conversion de l'énergie lumineuse (Richmond, 2008). Le processus de photosynthèse permet aux organismes photoautotrophes de fixer le carbone atmosphérique ou dissout dans l'eau, à partir de l'énergie lumineuse, pour la synthèse de molécules organiques complexes utilisées dans les processus vitaux et pour la reproduction de ces organismes.

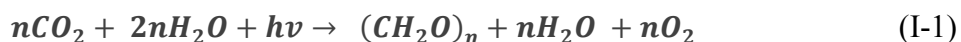
Dans le contexte actuel d'intensification des effets d'origine climatique et anthropique qui affectent les écosystèmes marins, l'étude des organismes photosynthétiques et des mécanismes d'adaptation de leurs capacités photosynthétiques apparaît donc essentielle.

Dans cette partie, nous traitons de la photosynthèse des microalgues à croissance oxygénique⁸. Ce processus, à la base de l'énergétique cellulaire, est essentiel pour la compréhension de la croissance de ces organismes. Apparu il y a environ trois milliards et demi d'années (Falkowski & Raven, 2007), il a permis l'oxygénation progressive de la biosphère.

La conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique s'accompagne d'un dégagement d'oxygène dû à la photolyse de l'eau, permettant la réduction du CO₂. La photosynthèse oxygénique peut ainsi être exprimée comme la réaction d'oxydoréduction au cours de laquelle le dioxyde de carbone (CO₂) et l'eau (H₂O) sont convertis en sucres (C₆H₁₂O₆) avec une libération

⁸ Certaines bactéries photosynthétiques (les bactéries vertes sulfureuses, filamenteuses, les bactéries pourpres et les héliobactéries) possèdent une photosynthèse dite anoxygénique (sans dégagement d'oxygène). Contrairement à la photosynthèse oxygénique, qui nécessite la coopération de deux photosystèmes, la photosynthèse anoxygénique ne fonctionne qu'avec un seul des deux photosystèmes (Schubert *et al.*, 1988). Les organismes pratiquant la photosynthèse anoxygénique sont classés en plusieurs types (Beja *et al.*, 2002). Les bactéries dites pourpres non sulfureuses (e.g. *Chloroflexus*, *Rhodospseudomonas*, *Roseobacter*) utilisent un photosystème analogue au PSII des organismes photoautotrophes (voir ci-après) (Michel & Deseinoffer, 1988). Les bactéries vertes sulfureuses et les héliobactéries (*Hellobacter*, *Chlorobium* etc.) utilisent un photosystème analogue au PSI de la photosynthèse oxygénique (Pierson & Olson, 1989 ; Fyfe *et al.*, 2002).

d'oxygène (O₂) et d'eau. Ce processus peut être résumé par l'équation globale suivante (Van Niel, 1931 ; Whitmarsh & Govindjee, 1999) :



Bien que les micro-organismes photosynthétiques présentent une variabilité dans les processus de conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, les mécanismes fondamentaux de la photosynthèse demeurent relativement inchangés d'une espèce à l'autre. L'absorption de l'énergie lumineuse et sa conversion en énergie chimique s'effectuent au sein de complexes pigments-protéines, les antennes collectrices de lumière et les centres réactionnels.

4.1 Les membranes photosynthétiques

La photosynthèse se déroule, chez les eucaryotes photosynthétiques, au sein d'organites intracellulaires spécialisés, les **chloroplastes**. Les chloroplastes possèdent une double membrane lipidique composée d'une membrane externe⁹ perméable (double couche formée de phospholipides et de protéines), qui permet les échanges entre le chloroplaste et les autres compartiments de la cellule, et d'une membrane interne peu perméable. Ces deux membranes sont séparées par un espace inter-membranaire étroit (Staehelin, 1975).

Dans le milieu intra-chloroplastique, un espace rempli d'un liquide dense, le **stroma** (Laetsch & Stetler, 1965), contient des structures membranaires aplaties nommées **thylakoïdes** (du grec *thylakos*, sac), qui constituent le siège des réactions chimiques et du transfert d'électrons de la photosynthèse (voir §4.2). Les membranes des thylakoïdes sont composées d'une bicouche de lipides (mono galactosyl diacyl glycerol (MGDG) et digalactosyl diacyl glycerol (DGDG)), qui délimite un compartiment appelé **lumen** (ou espace intra-thylakoïdien), lequel est le site de l'oxydation de l'eau et par conséquent de la production d'oxygène. Les thylakoïdes sont accolés et forment des empilements membranaires dénommés *grana*. Certains thylakoïdes, souvent un sur deux, s'étalent dans le stroma au-delà des *grana* sans être empilés (lamelles stromatiques ou intergranaires) formant ainsi un réseau d'interconnexions entre les *grana* (Hopkins, 2003; Mustárdy & Garab, 2003).

⁹ La présence de cette membrane externe, similaire à celle des cyanobactéries, est à l'origine de la théorie de l'**endosymbiose primaire**. Selon cette théorie, une cellule de procaryote (ressemblant à la cyanobactérie moderne) aurait été phagocytée par un organisme unicellulaire eucaryote hétérotrophe. La membrane externe est interprétée comme provenant d'un reliquat de la vacuole d'endocytose, fusionnée avec la membrane externe du symbionte. La membrane interne proviendrait de la membrane interne de la cyanobactérie. Développée par le biologiste russe Mereschkowsky dès 1910, cette théorie est définitivement adoptée à partir des années 1970 (Woese, 1977 ; Kutschera & Niklas, 2005).

Les cyanobactéries, qui ne possèdent pas de systèmes cloisonnés par des membranes, sont dépourvues de chloroplastes. Les thylakoïdes isolés et situés dans le cytosol à la périphérie de la cellule, ne sont donc pas entourés par une enveloppe.

La membrane thylakoïdale contient quatre types de complexes pigments-protéines responsables de la capture, de la transformation et du transport de l'énergie lumineuse dans le but de produire des molécules organiques (Dekker & Boekema, 2005) :

- **Le photosystème I (PSI),**
- **Le photosystème II (PSII),**
- **Le complexe plastoquinone-plastocyanine oxydoréductase** (ou cytochrome b6/f),
- Un complexe protéique enzymatique, **l'ATP synthase**, permettant la synthèse d'ATP (Adénosine triphosphate) par un flux de photons entre le lumen et le stroma (Abrahams *et al.*, 1994).

Ces complexes protéiques sont reliés par les composants mobiles que sont le pool de plastoquinones (PQ), la plastocyanine (PC) et la ferrédoxine (Fd).

4.2 Principe de fonctionnement

La photosynthèse est un processus complexe qui se déroule en deux phases distinctes (Fig. I-7). C'est en 1905 que le physiologiste anglais F.F. Blackman, en étudiant l'impact des facteurs limitants de la photosynthèse, mit en évidence l'existence de ces deux phases, l'une photosensible et donc photochimique, et l'autre chimique, catalysée par des enzymes.

La **phase claire** est constituée par un ensemble de réactions photochimiques qui dépendent de la lumière. Elle a lieu dans la membrane thylakoïdale et permet la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Les réactions photochimiques sont liées à un transport de protons et d'électrons permettant la production de molécules de NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) à fort pouvoir réducteur et de molécules énergétiques d'ATP. Cette phase nécessite l'oxydation de l'eau, ce qui conduit à l'émission d'oxygène.

Durant cette phase, l'énergie lumineuse est captée par deux complexes pigments-protéines, le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII). Ces photosystèmes, qui fonctionnent en série, sont connectés par une chaîne de transfert d'électrons représentée selon un schéma « en Z » (Hill & Bendall, 1960) (Fig. I-9). La chaîne de transfert d'électrons est une suite d'oxydoréductions qui s'effectuent de proche en proche, de l'eau au NADP^+ . L'énergie fournie par les deux photosystèmes permet de pomper des électrons contre un potentiel de 1,2 eV (différence de potentiel d'oxydoréduction entre l'eau et le NADP^+). En parallèle, l'ATP synthase utilise le

gradient de protons transthylakoïdal pour produire de l'ATP à partir d'ADP (Adénosine diphosphate).

La seconde phase, appelée **phase sombre** ou **biochimique**, a lieu dans le stroma des chloroplastes. Cette phase, mise en évidence par Calvin et Benson (1962), est entièrement enzymatique et indépendante de la lumière. Elle correspond au cycle de Calvin, au cours duquel les molécules énergétiques (ATP et NADPH) produites lors de la phase claire, sont utilisées pour la réduction du CO_2 en molécules organiques. Les molécules de CO_2 sont fixées en particulier par les enzymes du cycle de Calvin, dont la Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) (Fig. I-7).

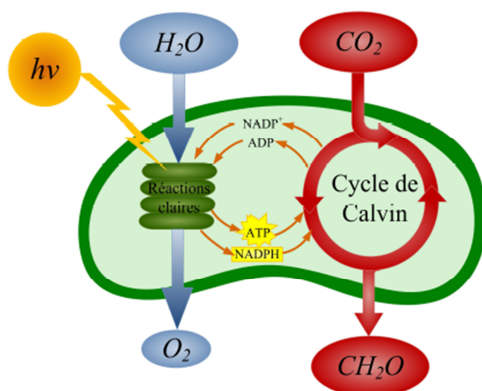


Figure I-7 : Réactions globales du processus de photosynthèse. La photosynthèse oxygénique est divisée en deux étapes : la phase claire (réactions claires) et la phase sombre. La phase claire est constituée par un ensemble de réactions photochimiques qui dépendent de la lumière. Elle comprend l'absorption de la lumière, le transfert des photons et la translocation des protons et représente la fixation des électrons, entraînant la production de NADPH, d'ATP et d' O_2 . Durant la phase sombre, phase entièrement enzymatique, l'ATP et le NADPH_2 produits durant la phase claire sont utilisés pour la réduction du CO_2 en molécules organiques.

4.3 Aspects structuraux et fonctionnement des photosystèmes

En 1943, le biophysicien R. Emerson étudia l'impact de différentes radiations monochromatiques isoquantiques (même flux de photons) sur l'activité photosynthétique. Il remarqua que l'utilisation simultanée de radiations de longueurs d'ondes 680 nm et 700 nm conduisait à une activité photosynthétique supérieure à la somme des activités obtenues avec chaque radiation émise individuellement. Ce que l'on appelle « l'effet Emerson » conduisit les chercheurs à conclure que la photosynthèse impliquait, dans la membrane des thylakoïdes des chloroplastes, l'interaction de deux photosystèmes : le PSI, absorbant préférentiellement vers

700 nm ou moins et le PSII, fonctionnant grâce aux lumières de longueurs d'ondes inférieures à 680 nm (Lodish *et al.*, 2000).

Chaque photosystème est constitué de deux parties : un **système d'antennes collectrices de lumière ou Light-Harvesting Complex (LHC)** (composé de pigments associés à des protéines membranaires permettant la capture des photons et leur transfert vers le centre réactionnel) et un **centre réactionnel** (où s'effectuent les réactions photochimiques primaires à partir de l'énergie d'excitation transférée par les antennes collectrices). Les micro-organismes photosynthétiques diffèrent dans la nature et l'agencement des antennes collectrices de photons. Ces complexes présentent des pigmentations (Chls, caroténoïdes, phycobilines) et des localisations (extrinsèque/intrinsèque) différentes¹⁰.

4.3.1 Aspects fonctionnels du photosystème II

Le PSII, situé dans la membrane thylakoïdale, est le premier complexe protéines/pigments de la chaîne de transport des électrons.

Les antennes collectrices sont composées de chaînes de polypeptides contenant un grand nombre de pigments (Chl *a*, Chl *b* et caroténoïdes). Le système d'antennes comprend une **antenne proximale** (interne) et une **antenne périphérique** (ou distale), contenant des Chl *a* et *b*, dont le rôle est d'élargir quantitativement et qualitativement l'absorption de la lumière. Le centre réactionnel du PSII, de structure dimérique (Loll *et al.*, 2005), est formé de deux sous-unités protéiques, D1 et D2 (de 32 à 34 kDa, codées respectivement par les gènes chloroplastiques *psbA* et *psbD*) portant tous les cofacteurs nécessaires à la séparation de charges et à sa stabilisation. Le cœur du centre réactionnel est une paire spéciale de Chl *a* qui possède une absorption maximale de la lumière à 680 nm (P680) (Govindjee & Coleman, 1990).

Les antennes photosynthétiques de plusieurs Chlorophycées telles que *Dunaliella* sp. (Tanaka & Melis, 1997 ; Masuda *et al.*, 2003) et surtout *Chlamydomonas reinhardtii* (Delepelaire & Chua, 1981, Nakajima *et al.*, 2001), ont été caractérisées par leur grande variété en caroténoïdes.

Les pigments des antennes collectrices du PSII capturent la lumière correspondant à leur longueur d'onde d'absorption spécifique. L'absorption d'un photon par un pigment, en environ 1 fs, induit son passage d'un état énergétique fondamental à un état excité, possédant un plus haut niveau

¹⁰ Deux classes majeures de complexes pigments-protéines collecteurs de lumière peuvent être identifiées. La majorité des micro-organismes photosynthétiques possède un complexe inter-membranaire composé de caroténoïdes et de Chl, associés à différents polypeptides. Chez les cyanobactéries et les rhodophytes (ou 'algues rouges'), le complexe collecteur de lumière du PSII, appelé **phycobilosome**, est extrinsèque à la membrane thylakoïdale. Il est constitué par un ensemble de phycobiliprotéines hydrophiles et de polypeptides de liaison. Par ailleurs, le PSI des cyanobactéries ne possède souvent pas d'antenne externe propre (Moerschel, 1991).

d'énergie. L'énergie d'excitation moléculaire des pigments, appelée exciton, est transférée par résonance d'une molécule de Chl à l'autre, au sein du complexe antennaire, jusqu'au centre réactionnel (P680). Ce dernier passe d'un état stable à un état excité (P680*). La première réaction photochimique est la séparation de charges : le P680*, excité, cède un électron à un accepteur primaire, la phéophytine (Phéo) (molécule de Chl sans magnésium), qui devient Phéo⁻. La séparation de charges est un phénomène réversible ; l'énergie d'excitation peut ainsi revenir à l'antenne et être réémise sous forme de fluorescence ou de chaleur (Schatz *et al.*, 1988). Il n'y a cependant fluorescence que si l'énergie lumineuse est absorbée par des molécules de Chl.

Les électrons sont ensuite transmis à une molécule de plastoquinone (PQ) liée à une protéine, Q_A, laquelle, à son tour, donne son électron à une autre quinone, Q_B. Le transfert des électrons *via* Q_B et les PQ est lié au transport de protons membranaires. Dans cette réaction, Q_B accepte deux électrons de Q_A. Les deux charges négatives Q_B²⁻ sont neutralisées par deux protons en provenance du stroma. Q_B est alors complètement réduite sous la forme d'un quinol, Q_BH₂. Cette molécule se dissocie et diffuse en transportant dans ses liaisons chimiques une partie de l'énergie des photons qui avait excitée P680.

Les molécules de PQH₂ (plastoquinone QBH₂ intégrée au pool de PQ membranaire), libérées des protons, diffusent les électrons vers le complexe du cytochrome b6/f (complexe protéique à 4 sous-unités composés de plusieurs groupements prosthétiques). Les électrons, par une chaîne d'oxydoréduction, sont transmis aux plastocyanines (PC). Au niveau du complexe b6/f, les transferts d'électrons, qui sont réalisés dans le sens des potentiels croissants, ont donc lieu spontanément. L'énergie ainsi libérée par les réactions d'oxydoréduction est convertie en un gradient de protons.

La réoxydation de la PQ libère deux protons dans le lumen. La PC (petite protéine majoritairement hydrophile, contenant un atome de cuivre) est le donneur d'électrons du centre réactionnel (P700) du second photosystème, le PSI.

4.3.2 La photolyse de l'eau à la surface luminale du centre réactionnel du PSII

Au niveau du PSII, s'opère une étape majeure de la photosynthèse : la photolyse de l'eau. A chaque fois que le PSII est photo-oxydé, l'eau lui fournit un électron afin de compenser la perte qu'il vient de subir. L'eau apparaît ainsi comme le donneur primaire d'électrons de la photosynthèse oxygénique. La lumière permet l'oxydation de la molécule d'eau.

L'oxydation de l'eau, effectué par un système enzymatique complexe de dégagement d'oxygène (CDO) situé à côté du lumen du PSII, composé d'un tétramère (« cluster » de manganèse) et de trois polypeptides extrinsèques, permet ainsi de libérer une molécule d'O₂, 4 e⁻ et 4 H⁺. Le cluster

de manganèse a un fonctionnement cyclique à 5 états permettant de libérer les électrons un par un, évitant ainsi la formation d'intermédiaires toxiques.

Les électrons sont capturés par le PSII. Ces derniers permettent à la Chl P680⁺ de revenir rapidement à son état stable, P680. Les protons s'accumulent dans l'espace intra-thylakoïdien pour participer au gradient de protons et l'oxygène est libéré.

4.3.3 Aspects fonctionnels du photosystème I

Le PSI¹¹ a été mis en évidence par Louis N.M. Duysens en 1961. Comme pour le PSII, il comprend un système d'antennes et un centre réactionnel. Ce dernier, de structure dimérique, est formé de deux sous-unités protéiques, de 50 à 70 kDa. Le donneur primaire d'électrons, le P700, constitué d'une paire spéciale de molécules de Chl *a* possédant un maximum d'absorption à 700 nm, est situé entre ces deux protéines.

L'énergie absorbée par un pigment antennaire est transmise par résonance, en quelques picosecondes, au P700, alors excité (P700*). Ce dernier perd un électron au profit d'un accepteur primaire, une molécule de Chl (A₀) semblable à la phéophytine du PSII, puis d'une phylloquinone (A₁) et de trois clusters Fer-Soufre (F_a, F_b, F_x). Ceux-ci transfèrent finalement l'électron à la ferrédoxine associée à une flavoprotéine, la ferrédoxine-NADP réductase, qui facilite le passage des électrons depuis la ferrédoxine jusqu'au NADP⁺.

L'énergie générée par la photosynthèse n'est pas seulement emmagasinée sous forme de NADPH, mais aussi sous forme de molécules d'ATP, qui fournissent l'énergie nécessaire à l'assimilation du CO₂ dans le cycle de Calvin-Benson. Les réactions photosynthétiques claires conduisent à l'acidification du lumen. L'ATP synthase utilise ce gradient électrochimique de protons à travers la membrane thylakoïdale (différence de pH de part et d'autre de la membrane) pour synthétiser de l'ATP par la phosphorylation de l'ADP (stroma) et de phosphate inorganique (Pi) provenant du stroma du chloroplaste. Le transfert d'électrons s'achève par la formation du NADPH (Fig. I-8).

¹¹ Le PSI, nommé ainsi car il a été découvert en premier, est également le plus ancien phylogénétiquement (Ben-Shem *et al.*, 2003).

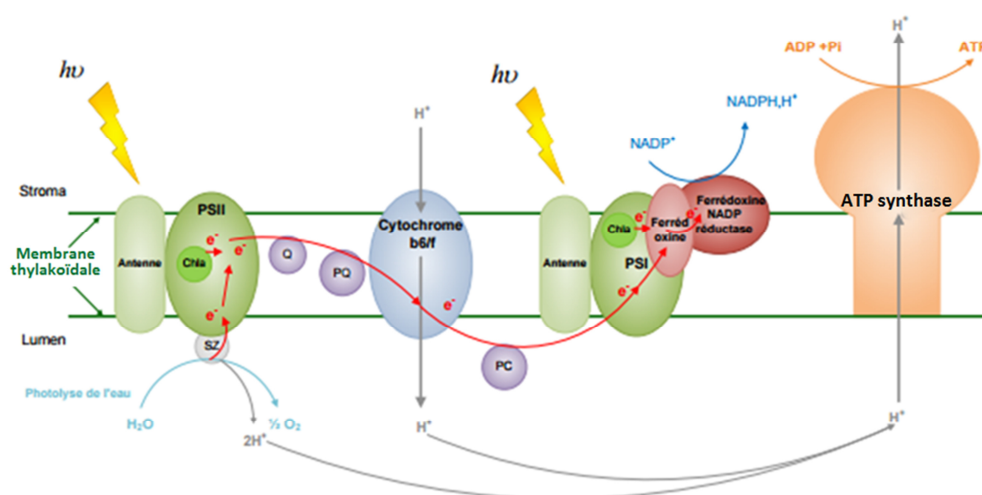


Figure I-8 : Représentation schématique des transporteurs d'électrons dans la membrane du thylakoïde. La phase claire de la photosynthèse requiert de l'énergie lumineuse pour fonctionner et s'effectue grâce à des complexes moléculaires situés au niveau de la membrane thylakoïdale des chloroplastes : les photosystèmes II et I (PSII et PSI), le cytochrome b6/f et l'ATP synthase.

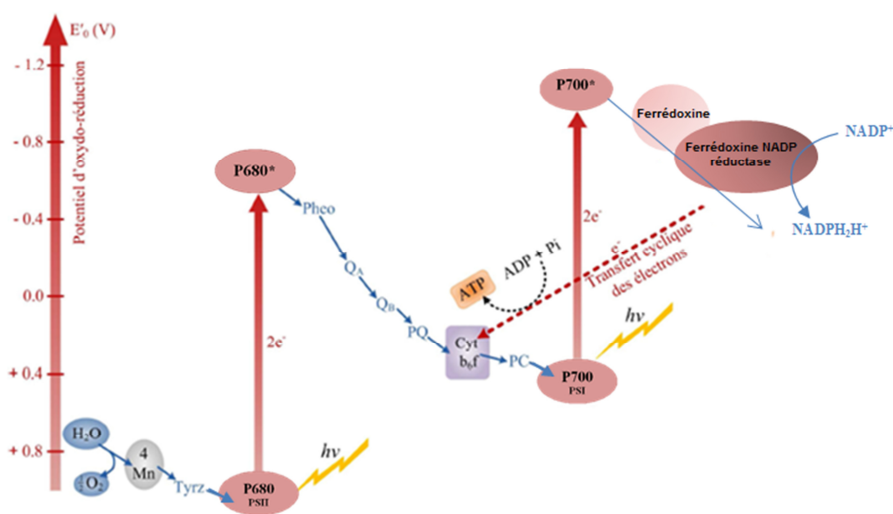


Figure I-9 : Schéma en « Z » des réactions de transfert acyclique des électrons en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction. Par le jeu intégré des deux photosystèmes, le transfert des électrons se réalise de l'eau (H_2O) à l'accepteur final, le NADP^+ . Thermodynamique moléculaire.

PSII : photosystème II ; PSI : photosystème I ; P680, P700 : centres réactionnels du PSII et du PSI ; P680*, P700* : états excités du P680 et du P700 après absorption de l'énergie lumineuse ; Mn : manganèse ; Tyrz : tyrosine de PSII ; Pheo : phéophytine, accepteur d'électrons primaire du PSII ; Q_A, Q_B : quinones ; PQ : plastoquinone ; Cyt b₆f : complexe protéique cytochrome ; PC : plastocyanine.

5. L'étonnante plasticité de l'appareil photosynthétique des microalgues face aux variations de l'intensité lumineuse

La photosynthèse est un processus complexe faisant intervenir de nombreuses étapes qui sont différemment affectées par les facteurs environnementaux. La lumière joue un rôle prépondérant sur la réponse photosynthétique des organismes et, de ce fait, sur leur croissance. L'énergie solaire reçue par l'écosystème conditionne la température des eaux ainsi que la lumière disponible pour le phytoplancton.

Les organismes phytoplanctoniques sont exposés à un environnement dynamique, variable dans l'espace et dans le temps. Cette variabilité environnementale des océans apparaît comme une force structurante importante au sein des communautés écologiques (Litchman, 2000). Les couplages étroits entre les forçages physiques et les réponses biologiques régissent la dynamique des écosystèmes, car ils conditionnent de nombreux phénomènes intervenant dans la production : distribution des éléments nutritifs, flux de carbone fixé, stockage énergétique, dynamique compétitive des populations de bactéries et de phytoplancton, migration, etc. (Steele, 1985). En particulier, l'hydrodynamique, qui affecte la distribution des micro-organismes photosynthétiques sur la verticale, agit sur la quantité de lumière qu'ils reçoivent. La lumière étant très rapidement atténuée avec la profondeur, la production primaire ne s'effectue que dans les eaux de surface. Cette couche dite euphotique, où l'intensité lumineuse est suffisante pour la photosynthèse, présente une épaisseur variable (conditionnée par la concentration en matières en suspension). Sa limite inférieure est définie arbitrairement par la profondeur à laquelle parvient 1 % de l'intensité lumineuse de surface (Javlov, 1968).

Dans un tel environnement, où la turbulence agit à différentes échelles spatiales et temporelles, les organismes sont soumis à des variations de lumière allant de l'obscurité totale, au sein des zones aphotiques, à des intensités lumineuses supérieures à $1500 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à la surface (Denman & Gargett, 1983 ; Falkowki & Raven, 1997 ; Litchman, 2000). Ces variations de lumière induisent des phénomènes d'adaptation, leur permettant d'optimiser leurs capacités photosynthétiques en fonction du flux de photons ambiant, mais aussi de résister à des situations extrêmes de photoinhibition ou de carence lumineuse prolongée (voir §5.1).

5.1 Réponse biologique des micro-organismes photosynthétiques à l'intensité lumineuse : photoinhibition, photoacclimatation et photoprotection

"Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis."

Barber & Andersson (1992)

Dans les océans aussi bien que dans les systèmes artificiels, la croissance des microalgues est étroitement liée à l'efficacité photosynthétique et, de ce fait, à l'accessibilité à la lumière. Néanmoins, cette situation soulève un paradoxe. En effet, d'un côté la capture de photons doit être suffisante pour permettre la croissance des organismes. De l'autre, un excès de lumière conduit à des phénomènes de photosaturation voire de photoinhibition, tendant à réduire leur efficacité photosynthétique (Henley, 1993; Molina Grima *et al.*, 1996; Serôdio *et al.*, 2012).

Dès la fin du 19^{ème} siècle, de nombreuses études ont été menées afin de quantifier et de formaliser la réponse des organismes photosynthétiques à différentes intensités lumineuses. En 1883, le botaniste Allemand J. Reinke fut l'un des premiers à étudier et décrire cette réponse. Il mit en exergue l'augmentation linéaire de l'activité photosynthétique en fonction de l'éclairement, pour des intensités lumineuses faibles et moyennes, jusqu'à un certain niveau, appelée intensité de saturation. Cette intensité de saturation se situe généralement autour de 200 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, soit 10 % de l'éclairement typiquement reçu en été sous un ciel dégagé (Torzillo *et al.*, 2003).

Treize ans plus tard, le botaniste britannique A.J. Ewart mit en évidence une réduction de l'activité photosynthétique au-delà de cette intensité de saturation, appelée « photoinhibition » (Ewart, 1896).

La réponse de la photosynthèse (P) à l'intensité lumineuse (I) est formalisée par une 'courbe PI', telle qu'illustrée en figure I-10. Traditionnellement, le taux de photosynthèse est déterminé à partir de la production d'oxygène (Janssen *et al.*, 2003 ; Richmond, 2008). La variation d'O₂ dans le milieu résulte des termes de production, due la photosynthèse, et de consommation, due à la respiration. L'intensité "de compensation" est celle pour laquelle la respiration équivaut à la photosynthèse. Pour des intensités supérieures, P commence à croître linéairement avec I. A ce niveau, la vitesse d'absorption des photons détermine le taux de transport d'électrons car chaque photon supplémentaire absorbé est utilisé avec le même rendement. Pour des intensités encore plus élevées, s'approchant de I_k ou supérieures (Fig. I-10), le rendement photosynthétique décroît (e.g. fluorescence, pertes thermiques au niveau des antennes collectrices) jusqu'à atteindre un plateau où la limitation est imposée par le pool enzymatique cellulaire. Si le flux de photons dépasse un certain seuil, I_{inhib} , il devient photo-inhibant et la photosynthèse décline (Camacho Rubio *et al.*, 2003 ; Vonshak & Torzillo 2004).

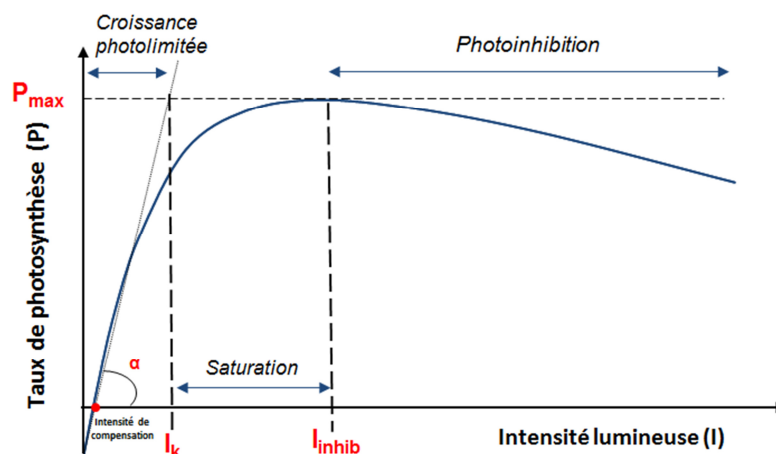


Figure I-10 : Courbe de réponse du taux de photosynthèse P à l'intensité lumineuse I .

α , rendement photosynthétique; I_k , intensité à laquelle la pente α intercepte le taux de photosynthèse maximal P_{max} et I_{inhib} , l'intensité au-delà de laquelle la photosynthèse est inhibée.

5.1.1 La photoinhibition

Lorsque les microalgues sont soumises à un excès de photons, des dommages de l'appareil photosynthétique, et en particulier des centres réactionnels, entraînent une diminution des capacités photosynthétiques. Ce phénomène, appelé photoinhibition, est commun à tous les organismes photosynthétiques oxygéniques (Kok, 1956).

Cet état de stress physiologique est lié à la fois à l'intensité lumineuse mais également à la durée d'exposition à cette intensité (voir revue Zavafer *et al.*, 2015). En 1965, B. Kok et ses collaborateurs ont suggéré que la photoinhibition était un phénomène affectant essentiellement le photosystème II. En effet, la photoinhibition résulte d'un déséquilibre entre les vitesses de réparation et de photo-dommages du PSII (Murata *et al.*, 2007). Elle se traduit, au niveau cellulaire, par la dégradation de la protéine D1 du centre réactionnel du PSII (Kim *et al.*, 1993 ; Baroli & Melis, 1996 ; Takahashi & Murata, 2008), ce qui se manifeste par une réduction du taux de photosynthèse (Trebst, 1995 ; Li *et al.*, 2009), un déclin de la fluorescence et de la réaction de Hill (Šetlík, 1990). Ces dommages ne sont toutefois pas irréversibles et des processus de réparation deviennent efficaces si l'éclairement est réduit (Neidhardt *et al.*, 1998 ; Lazár, 1999 ; Murata *et al.*, 2007 ; Melis, 2009 ; Nixon *et al.*, 2010).

Il n'existe cependant à ce jour aucun consensus concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans les phénomènes de photoinhibition. La théorie selon laquelle les espèces réactives de l'oxygène (ERO, en anglais 'reactive oxygen species' ROS), produites en excès sous une forte intensité lumineuse, endommagent le photosystème est actuellement la plus acceptée.

Néanmoins, d'autres études ont émis l'hypothèse que les ROS inhibaient la réparation du PSII *via* l'inactivation de la synthèse *de novo* de la protéine D1 (Murata *et al.*, 2007; Tyystjärvi, 2008).

5.1.2 Comment survivre dans un environnement changeant ? La photoacclimatation, une réponse à long terme

L'adaptation de l'appareil photosynthétique est un phénomène complexe aussi bien au niveau de la diversité des processus intracellulaires que de leur séquence et leur interaction dans le temps. Pour optimiser leur photosynthèse dans un environnement variable et dynamique, les microalgues ont développé de nombreuses stratégies, notamment pour minimiser les photo-dommages (Richardson *et al.*, 1983 ; Havelková-Doušová *et al.*, 2004). En 1991, Falkowski et LaRoche ont proposé le terme de photoacclimatation pour décrire ces ajustements phénotypiques survenant en réponse aux variations de l'éclairement. Ces modifications physiologiques, provisoires et réversibles, résultent de l'activation ou de la désactivation de voies métaboliques déjà en place. Au contraire, le terme de photoadaptation se réfère à des changements du génotype impliquant des mutations ou des modifications dans la distribution des allèles.

Le système photosynthétique des microalgues présente une grande plasticité. C'est ainsi que la photoacclimatation, qui prend place à des échelles de temps allant des heures aux jours, conduit à des changements de la pigmentation, du nombre d'unités photosynthétiques, de la taille des antennes du PSII ou encore de la quantité et de l'activité de la Rubisco, enzyme fixatrice du carbone (Falkowski & Owens, 1980 ; Falkowski & LaRoche, 1991 ; Herzig & Dubinsky, 1992). Sous faible éclairement, les cellules augmentent la quantité de pigments photosynthétiques afin d'augmenter la capture des photons, permettant une meilleure utilisation de la lumière lorsque celle-ci est rare (Falkowski, 1980 ; Anderson & Eiserling, 1986 ; Herzig & Dubinsky, 1992 ; Danesi *et al.*, 2004; Havelková-Doušová *et al.*, 2004). Inversement, sous forte lumière, le cortège pigmentaire est réduit afin de minimiser la quantité de photons absorbés et, en conséquence, les processus de photo-oxydation (Richardson *et al.*, 1983 ; MacIntyre *et al.*, 2002) (Fig. I-11). A titre d'exemple, le passage d'une faible ($50 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) à une forte (environ $1500 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) intensité lumineuse, entraîne, chez la diatomée *Skeletonema costatum*, une diminution de la concentration en Chl *a* d'un facteur 4 (Anning *et al.*, 2000).

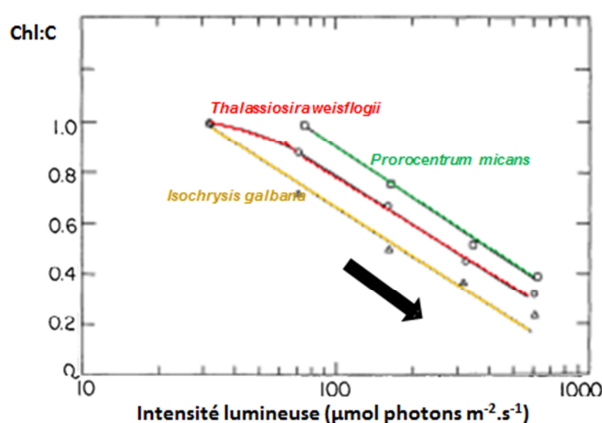


Figure I-11 : Evolution du rapport Chl : C en fonction de l'intensité lumineuse reçue pour trois espèces de microalgues : *Thalassiosira weissflogii*, *Prorocentrum micans* et *Isochrysis galbana*. D'après Falkowski *et al.*, 1985 (modifié).

Aux faibles intensités lumineuses, davantage de thylakoïdes sont produits par chloroplaste et les rapports grana : stroma et PSI : PSII sont supérieurs à ceux mesurés à forte intensité (Melis, 1991). Au contraire, les antennes collectrices sont plus petites à forte intensité lumineuse (Polle *et al.*, 2003 ; Melis, 2009 ; Kirst *et al.*, 2012).

Chez la cyanobactérie *Synechococcus* sp., plusieurs auteurs ont observé une diminution du nombre de thylakoïdes concentriques à haute intensité lumineuse (Allen, 1968 ; Vierling & Alberte, 1980 ; Kana & Gilbert, 1987), laquelle s'accompagne d'une réduction des phycobiliprotéines et de la Chl *a*, et donc de leur absorption. Le rapport caroténoïdes/Chl *a* est aussi généralement accru sous une haute intensité lumineuse. Les caroténoïdes tels que les xanthophylles ou le β -carotène sont des pigments photoprotectants qui agissent pour protéger les cellules d'un excès de lumière (Sukenik *et al.*, 1987) [voir encart n°1]. Une augmentation de l'intensité lumineuse de 150 à 650 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ provoque, chez *Dunaliella salina*, une augmentation de la concentration en β -carotène de plus de 350 % (Lamers *et al.*, 2010). Neidhardt *et al.* (1998) ont également montré que *D. salina*, acclimatée à une intensité de 2000 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, était moins sujette à la photoinhibition que lorsqu'elle était acclimatée à une intensité lumineuse plus faible, de 200 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Cela se traduit par une efficacité d'utilisation des photons 9 fois supérieure à fort éclaircissement.

5.1.3 Les mécanismes de photoprotection, à court terme

Le flux de photons peut varier plus rapidement que les processus de synthèse de pigments et de protéines, dépassant les capacités de régulation précitées. Dans des conditions de très haute lumière, la question n'est donc plus l'adaptation, mais la survie. La formation de ROS comme les radicaux libres peut être toxique pour la cellule (Niyogi *et al.*, 1997, Niyogi, 1999). Pour se protéger du stress oxydatif, les organismes photosynthétiques ont développé des mécanismes photoprotecteurs qui se mettent en place en quelques secondes, plusieurs dizaines de minutes, voire quelques heures (Falkowski & Raven, 2007) (Fig. I-12).

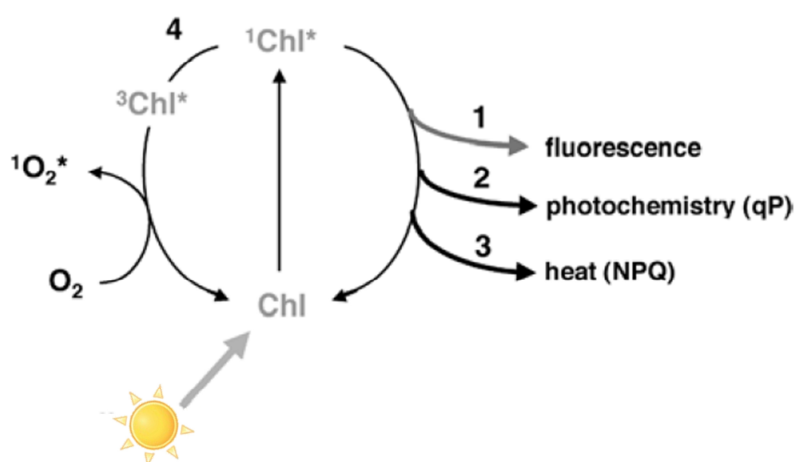


Figure I-12 : Voies de désactivation de la Chl^* . L'énergie d'excitation peut être dissipée par l'émission de fluorescence (1), transmise de proche en proche jusqu'au centre réactionnel (photochimie) (qP) (2), dissipée sous forme non photochimique (chaleur) (NPQ) (3) ou entraîner la production de triplets de Chl ($^3\text{Chl}^*$), capables de réagir avec l' O_2 et de former des espèces oxygéniques toxiques ($^1\text{O}_2^*$) (4). D'après Müller *et al.*, 2004 (modifié).

Afin de protéger l'appareil photosynthétique d'un excès d'énergie lumineuse, une partie de l'énergie absorbée par les antennes collectrices peut être dissipée sous forme non-photochimique, en chaleur ou par fluorescence¹² (réémission d'un photon de moindre énergie), menant à des rendements de conversion de l'énergie lumineuse plus faibles (Demmig-Adams & Adams, 2006 ; Niyogi, 2000 ; Müller *et al.*, 2001).

¹² La dissipation d'énergie sous forme de fluorescence a été découverte en 1931 par Kautsky et Hirsch (1931). L'émission de fluorescence a été utilisée dans les dernières décennies comme outil d'investigation des réactions photochimiques et du transport d'électrons associés aux PSII et PSI.

Le terme de "quenching" désigne l'ensemble des mécanismes qui conduisent à une diminution du rendement de la fluorescence (Krause & Weis, 1991). Il existe deux types de quenching :

1. Le quenching photochimique (qP : Photochemical quenching), qui est associé aux réactions photochimiques (transfert d'électrons),
2. Le quenching non-photochimique (NPQ : Non-Photochemical Quenching), qui correspond aux mécanismes aboutissant à la dissipation de l'excès d'énergie sous forme de chaleur (Ting & Owens, 1994 ; Müller *et al.*, 2001).

Au sein des photosystèmes, le NPQ constitue la principale voie de régulation de l'énergie. Il peut prendre différentes voies selon les conditions environnementales et l'espèce considérée (Horton *et al.*, 1996 ; Demmig-Adams & Adams, 2006). En général, ce quenching dépend de variations dans les interactions pigment-pigment, de changements conformationnels de protéines (Krüger *et al.*, 2011) ou de modifications structurelles et/ou chimiques rapides des pigments (Niyogi & Truong, 2013).

Quelle est l'origine du quenching ? Le cycle des xanthophylles joue un rôle déterminant dans le NPQ (Yamamoto, 1979 ; Demmig-Adams, 1990 ; Müller *et al.*, 2001). Mis en évidence en 1962 par H. Yamamoto, ce cycle correspond à un ensemble de transformations affectant trois xanthophylles (Yamamoto & Bassi, 1996). Lorsque l'intensité lumineuse est excessive, une translocation de protons plus importante entraîne la formation d'un gradient de pH à travers la membrane thylakoïdale. Chez les chlorophytes, l'acidification du lumen catalyse la dé-époxydation (perte de deux époxydes) de violaxanthine en zéaxanthine. Cette réaction se fait en deux étapes, produisant d'abord une forme mono-époxyde intermédiaire, l'anthéroxanthine (Niyogi, 1999 ; Jin *et al.*, 2001 ; Müller *et al.*, 2001 ; Hopkins, 2003). La zéaxanthine est connue pour 'quencher' les molécules de Chl* excitées (Baroli & Niyogi, 2000 ; Franck *et al.*, 2000). Sous une faible lumière, les cellules accumulent de la violaxanthine et présentent un faible niveau de zéaxanthine. Le système enzymatique à l'origine de la transformation des xanthophylles comprend une dé-époxydase liée au thylakoïde, localisée dans le lumen et active à bas pH (sous éclaircissement), ainsi qu'une époxydase située dans le stroma, fonctionnant à pH plus élevé (à l'obscurité). La zéaxanthine peut accepter l'énergie d'excitation des Chls des antennes collectrices, menant à la dissipation thermique de l'énergie (Demmig-Adams *et al.*, 1996). La liaison de la zéaxanthine avec les complexes protéiques du PSII se fait grâce à la participation de la protéine *PsbS*, essentielle à la régulation du NPQ (Niyogi & Truong, 2013). Cette transformation est réversible à l'obscurité. En cas de stress lumineux, le NPQ augmente rapidement puis se relaxe sous une faible lumière parallèlement à la synthèse de xanthophylles. Le passage d'une forte à une faible lumière entraîne, en 15 minutes, une augmentation des transcrits. Tous ces partenaires de régulation fonctionnent rapidement pour protéger l'appareil

photosynthétique de l'excès d'énergie lumineuse. Au niveau moléculaire, une hypothèse récente a été formulée, selon laquelle co-existeraient deux sites de quenching, dont l'un correspondrait au détachement de l'antenne. D'après cette étude, réalisée sur des diatomées, une forte lumière s'accompagnerait d'une accumulation de diatoxanthine (xanthophylle dé-époxydée) et stimulerait la synthèse de protéines *Lhcx*, impliquées dans la photoprotection mais dont le rôle exact est encore peu compris (Lavaud *et al.*, 2007 ; Barnett *et al.*, 2015).

Un autre mécanisme de photoprotection a récemment été découvert chez les cyanobactéries. Celui-ci met en jeu un mécanisme moléculaire dont l'élément clé est une protéine soluble photoactive : l'*Orange Carotenoid Protein* (OCP), contenant un caroténoïde. Après absorption de la lumière, le caroténoïde effectue un changement de position et de conformation à l'intérieur de la protéine OCP. Il passe ainsi d'une forme orange inactive à une forme rouge active : ce mouvement entraîne un changement de conformation de la protéine OCP, et permet de protéger les cellules des stress oxydatifs (Leverenz *et al.*, 2015).

Encart n°1 - La caroténogénèse chez les chlorophytes

En plus de leur rôle dans les processus de capture de l'énergie lumineuse en tant que pigment accessoire (voir §6.3), **les caroténoïdes primaires** assurent un rôle connexe de **photoprotection** de l'appareil photosynthétique contre les dommages photo-oxydatifs, en dissipant l'excès d'énergie lumineuse sous forme de chaleur (Siefermann-Harms, 1987 ; Rise *et al.*, 1994). Ces caroténoïdes sont des composants structurels et fonctionnels des antennes collectrices de lumière, situées dans la membrane thylakoïdale (Lichtenthaler, 1987).

L'exposition à un stress écophysiological provoque, chez certaines espèces, la synthèse, en quelques heures, de **caroténoïdes** dits **secondaires**, accumulés au sein de gouttelettes lipidiques (Vechtel *et al.*, 1992; Aflalo *et al.*, 2007). A titre d'exemple, sous certaines conditions environnementales spécifiques (e.g. haute intensité lumineuse, carence azotée, limitation en nutriments, haute salinité, températures extrêmes), *Dunaliella salina* peut accumuler de grandes quantités de β -carotène dans des globules intraplastidiaux (plastoglobules β C) (Ben-Amotz *et al.*, 1982 ; Ben-Amotz & Avron, 1983 ; Borowitzka, 1990 ; Vorst *et al.*, 1994 ; Ben-Amotz, 1996 ; Marín *et al.*, 1998 ; Jin *et al.*, 2003 ; Oren, 2005 ; Sánchez-Estudillo *et al.*, 2006 ; García *et al.*, 2007 ; Coesel *et al.*, 2008 ; Hadi *et al.*, 2008 ; Jin & Polle, 2009 ; Lamers *et al.*, 2010 ; Lamers *et al.*, 2012 ; Park *et al.*, 2013). Ces globules sont des structures protéolipidiques composées de triglycérides et de deux isomères de β -carotène (Ben-Amotz *et al.*, 1988). Cette surproduction de β -carotène (caroténogénèse) procurerait à la cellule, en particulier, **une résistance significative à la photoinhibition**, en absorbant l'excès d'énergie lumineuse (Ben-Amotz *et al.*, 1989). En condition de stress lumineux, la caroténogénèse est corrélée à l'accumulation de triglycérides (Lamers, 2010).

5.2 Les systèmes de culture industriels : des variations de lumière à haute fréquence

5.2.1 Rôle de l'hydrodynamique

Le couplage entre hydrodynamique et production primaire est encore plus étroit lorsque les microalgues se développent au sein de systèmes agités mécaniquement, dans des dispositifs industriels. Mais, malgré son importance, les effets qui en résultent sont encore mal appréciés. La réponse de la photosynthèse à des variations de lumière dans l'océan diffère probablement de celle qui s'exprime dans des cultures agitées, car, bien qu'il s'agisse des mêmes organismes et des mêmes facteurs, ils ne sont pas exposés à des forçages de même fréquence.

A l'exception des rares applications pour lesquelles les cellules microalgales sont immobilisées et doivent se développer sur un substrat solide, le mélange des cultures en suspension est essentiel pour éviter la sédimentation des cellules et la formation de biofilms. L'agitation facilite également la diffusion des éléments nutritifs et des gaz (transfert du CO₂ et dégazage de l'O₂ induit par la photorespiration et le stress oxydatif). Mais dans les cultures denses caractérisées par un fort gradient lumineux, son rôle le plus important est certainement d'améliorer l'accès à la lumière des cellules (Pulz & Scheibenbogen, 1998), en limitant les temps d'exposition à des niveaux de lumière photo-inhibants en surface, ou au contraire photo-limitants en profondeur. L'augmentation de la vitesse de mélange permet d'équilibrer la distribution de lumière aux cellules. Toutefois, les modifications des conditions hydrodynamiques dans les PBRs augmentent les contraintes de cisaillements.

5.2.2 Des régimes fluctuants générés par l'hydrodynamique

Dans les raceways, le mélange mécanique des cultures, à l'aide d'une roue à aubes, crée un courant turbulent amenant à une hydrodynamique complexe.

Les PBRs et les raceways sont caractérisés par un champ de rayonnement hétérogène, dû à l'absorption et à la diffusion de la lumière par les cellules en suspension. Les fortes biomasses caractéristiques de ces systèmes (de 1 à 10 gMS.L⁻¹ en PBR (Pulz, 2001) et de 0,1 à 0,5 gMS.L⁻¹ dans les raceways) génèrent un gradient de lumière marqué au sein des cultures : une grande partie des photons incidents, majoritairement absorbés par les cellules en périphérie (PBRs) ou à la surface (raceways), ne parvient pas à pénétrer en profondeur dans la culture (phénomène d'auto-ombrage) (Sorokin & Krauss, 1958 ; Cornet, 2010). Les microalgues sont ainsi exposées à

des intensités lumineuses variables. Les cellules en périphérie (surface) reçoivent une forte intensité lumineuse (surexposition lumineuse) tandis que celles en profondeur sont soumises à une lumière faible, voire nulle, si la culture est très dense (sous-exposition lumineuse) (Phillips & Myers, 1954 ; Richmond, 2000) (Fig. I-13).

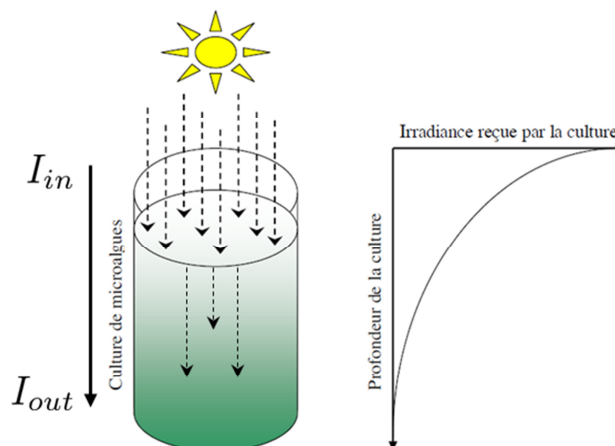


Figure I-13 : Représentation schématisée de l'atténuation de la lumière dans une culture de microalgues. Avec I_{in} l'intensité lumineuse incidente, I_{out} l'intensité lumineuse au fond du réacteur.

Le mélange turbulent confère aux microalgues une trajectoire lagrangienne dans le gradient de lumière. La lumière est ainsi perçue, à l'échelle de la cellule, comme une succession rapide de phases lumineuses et de phases obscures (Fig. I-14). Les microalgues doivent alors en permanence adapter leur système photosynthétique à une lumière qui fluctue en fonction de leur position, de la turbidité du milieu et de l'intensité lumineuse incidente (Fig. I-14). Ces fluctuations peuvent être très rapides, avec des constantes de temps allant de la milliseconde (PBR) à la dizaine de minutes (raceway) (Pulz, 2001).

La photoacclimatation a été principalement étudiée pour des régimes lumineux continus (Herzig & Dubinsky, 1992 ; MacIntyre *et al.*, 2002 ; Garcia-Camacho *et al.*, 2012), voire des cycles diurnes (Bruyant *et al.*, 2005), mais très peu pour des régimes lumineux variant à haute fréquence. La compréhension de l'impact de la vitesse de mélange sur le régime lumineux des microalgues et sur leur capacité à s'y adapter apparaît essentielle afin de prédire et d'améliorer la productivité des cultures. Au sein des raceways, les fluctuations de lumière vécues par les cellules sont étroitement liées à la vitesse de rotation de la roue à aubes.

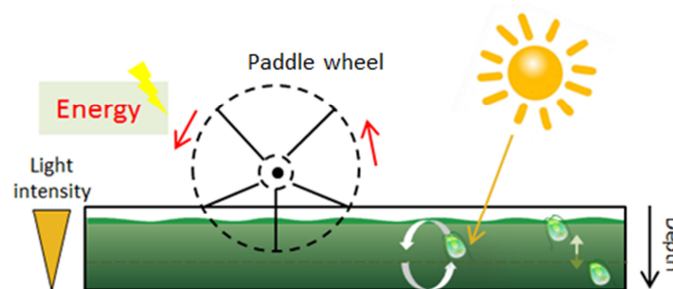


Figure I-14 : Représentation schématique d'un raceway. Dans ces systèmes agités mécaniquement à l'aide d'une roue à aubes, les cellules sont exposées à un éclairage fluctuant en fonction de leur profondeur.

Ce régime fluctuant de lumière a été largement étudié et décrit dans la littérature (Burlew, 1953 ; Grobbelaar *et al.*, 1996 ; Janssen *et al.*, 1999, 2001 ; Litchman, 2000 ; Richmond, 2004 ; Perner-Nochta & Posten, 2007 ; Vejrazka *et al.*, 2011 ; Sforza *et al.*, 2012 ; Boulanger *et al.*, 2013 ; Abu-Ghosh *et al.*, 2015 ; Takache *et al.*, 2015 ; Abu-Ghosh *et al.*, 2016). Il est connu sous le terme de cycles de lumière : obscurité ou « Light:Dark cycles » (L:D cycles).

La majorité de ces études a été menée afin de reproduire les fluctuations de lumière perçues par les cellules au sein des PBRs. Dans ces systèmes, les signaux lumineux sont caractérisés par des fréquences pouvant atteindre 1 kHz (Perner-Nochta & Posten, 2007). En revanche, l'effet des fluctuations de lumière dans les raceways est beaucoup moins documenté.

5.2.3 Effet des régimes fluctuants sur la croissance photosynthétique

Deux approches peuvent être envisagées pour générer une lumière intermittente : soit l'utilisation d'une source lumineuse permettant de reproduire des signaux lumineux flashés, soit l'emploi d'un dispositif de culture présentant une partie illuminée et une partie sombre (Wu & Merchuk, 2001). Avant le développement des diodes électroluminescentes (LED), l'obtention de conditions d'éclairage dynamiques constituait un véritable challenge.

L'étude de l'influence d'une lumière flashée sur la croissance photosynthétique a débuté en 1905 avec les travaux de H.T Brown et F. Escombe sur les feuilles des plantes supérieures. Les expériences ont été réalisées à l'aide d'une source lumineuse surmontée d'un disque rotatif sectionné, permettant le passage contrôlé de la lumière. Les auteurs ont mis en évidence que le taux de photosynthèse restait inchangé, que les feuilles soient éclairées à l'aide d'une lumière continue ou avec une lumière générée de manière intermittente, d'une intensité 25 % plus faible. Quelques années plus tard, O. Warburg (1919, 1920) éclaira *Chlorella* sp. à l'aide d'un dispositif

similaire, permettant de générer des cycles de lumière : obscurité de durées égales (L:D = 1:1) mais de fréquences variables. L'auteur montra que le quotient photosynthétique dépendait de la fréquence d'éclairement. En comparaison avec une exposition continue, le quotient augmentait de 10 % pour une fréquence de 0,0667 Hz (période de 15 secondes) et de 100 % pour une fréquence de 133 Hz (période de 7,5 millisecondes).

A cette même époque, les études traitant de l'effet d'un régime fluctuant de la lumière sur la croissance des microalgues se sont poursuivies avec les expérimentations de R. Emerson et W. Arnold (1932) sur la chlorophyte *Chlorella pyrenoidosa*, puis de S. Weller et J. Franck (1941) et de F.F Rieke et H. Gaffron (1942) sur la chlorophyte *Scenedesmus* sp.

Ces premières études, dont les conclusions ont été confortées par une abondante littérature, ont montré qu'une alternance rapide de périodes lumineuses (de forte intensité) et d'obscurité permettait d'améliorer l'efficacité photosynthétique des organismes et entraînait, de ce fait, une meilleure croissance, notamment pour les cycles courts (Phillips & Myers, 1954 ; Richmond & Vonshak, 1978 ; Laws, 1986 ; Kim *et al.*, 2006 ; Gordon & Polle, 2007 ; Grobbelaar, 2010 ; Vejrazka *et al.*, 2011 ; Xue *et al.*, 2011 ; Sforza *et al.*, 2012). Cette amélioration de la conversion photosynthétique avec l'augmentation de la fréquence des flashes (10 Hz voire plus) est appelée le « ***flashing light effect*** » (Kok & Burlew, 1953; Phillips & Myers, 1954 ; Kok, 1956 ; Terry, 1986) [voir encart n°2].

Encart n°2 – Définitions clés

Flashing light effect : une fois absorbé (l'absorption est considérée comme virtuellement instantanée (10^{-11} s, (Vonshak, 1997)), l'exploitation du photon par la chaîne de transfert d'électrons (schéma « en Z ») requiert un certain temps (environ 10 ms (Falkowski & Raven, 1997 ; Malcata, 2011)) durant lequel le système est réduit et ne peut donc pas exploiter d'autres photons. Si de nouveaux photons sont absorbés durant cette période, l'excès d'énergie est dissipé sous forme de chaleur. Si la fréquence d'absorption des photons est synchrone avec la fréquence caractéristique de la chaîne de transport d'électrons, chaque photon capturé sera ainsi utilisé pour la croissance (Matthijs *et al.*, 1996). Les cellules exposées à une lumière flashée avec une période proche de 10 ms perdent ainsi moins d'énergie que celles exposées à une lumière continue. L'augmentation de l'efficacité photosynthétique résultant de l'exposition des cellules à une lumière flashée est nommée le *flashing light effect*.

Intégration temporelle complète (« full light integration ») (Terry, 1986) : pour des cycles lumière : obscurité rapides (< 10 ms), la réponse aux fluctuations de lumière conduit à l'*intégration temporelle complète* (Terry, 1986). La croissance est le résultat de la quantité d'énergie moyenne reçue par la cellule : la lumière flashée peut être ainsi exploitée avec la même efficacité qu'une lumière continue (même dose moyenne de photons reçus) (Kok & Burlew, 1953 ; Phillips and Myers, 1954; Kok, 1956 ; Terry, 1986; Grobbelaar, 1989, 1994, 2010 ; Grobbelaar *et al.*, 1996 ; Matthijs *et al.*, 1996 ; Nedbal *et al.*, 1996).

Falkowski et Raven (2007) ont suggéré deux processus physiologiques pour expliquer le *flashing light effect* : i) l'impact de la respiration post-illumination et ii) le déséquilibre entre le transport des électrons et le cycle de Calvin.

Le processus de respiration augmente avec l'intensité lumineuse, mais également avec la durée d'illumination (Raven & Beardall, 1981 ; Falkowski & Raven, 2007). L'augmentation de la fréquence des flashes se traduit par une diminution du temps passé à la lumière. Les organismes présentent ainsi un taux de respiration plus faible et de ce fait un taux de croissance plus important. La seconde hypothèse implique le Cycle de Calvin. Pour des flashes suffisamment courts, la quantité d'ATP produite durant la phase claire de la photosynthèse est suffisante pour alimenter le cycle de Calvin durant la phase sombre et permettre ainsi son fonctionnement continu.

D'autres mécanismes, présentés ci-avant, peuvent également contribuer au *flashing light effect* tels que la photoinhibition (limitée par la réduction des périodes d'exposition à forte irradiance (Wu & Merchuck, 2001), la dissipation thermique ou encore le cycle des xanthophylles (Iluz *et al.*, 2012).

Janssen et ses collaborateurs (1999, 2001) ont étudié l'effet de cycles de lumière : obscurité (de 6 à 87 secondes), ayant des fréquences proches de celles rencontrées en PBRs, sur la croissance de

différentes espèces de microalgues (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana* et *Dunaliella tertiolecta*). Les auteurs ont montré que les effets des cycles lumineux appliqués dépendaient de l'espèce de microalgues considérée, cela se traduisant en général par une altération de la conversion photosynthétique et donc une diminution de la croissance en lumière flashée par rapport à un éclairage continu. Grobbelaar *et al.* (1996) ont ainsi supposé qu'une amélioration était observée seulement lorsque les fréquences appliquées étaient supérieures à 1 Hz.

5.2.4 Des flashes à l'histoire lumineuse

Le régime lumineux d'une cellule en réacteur et en raceway est complexe et se caractérise par des cycles de lumière : obscurité de différentes fréquences et amplitudes dépendant de la vitesse de mélange. La caractérisation de ces cycles nécessite une étude hydrodynamique, qui permette de déterminer la trajectoire des cellules et, de ce fait, de reconstruire leur histoire lumineuse (intensité et fréquence d'éclairement). Jusqu'à présent, les trajectoires des cellules dans les raceways n'ont été que très peu documentées (Bernard *et al.*, 2013). En revanche, quelques études ont été réalisées en PBR (Perner & Nochta, 2007 ; Pruvost *et al.*, 2008), mais sont peu concluantes, du fait de la dépendance de ces cycles à la fois à l'écoulement et au champ de rayonnement, chacun étant un problème difficile à résoudre. Toutes ces raisons expliquent que, dans la littérature, les effets de l'hydrodynamique sur la croissance sont le plus souvent étudiés de manière caricaturale. Par ailleurs, d'un point de vue technique, la reproduction de l'histoire lumineuse des cellules nécessite la mise au point de systèmes d'éclairage complexes.

6. Réponse de l'appareil photosynthétique aux variations du spectre lumineux

6.1 La naissance de la théorie des couleurs. De Newton à Einstein

La lettre du 6 février 1672 constitue la première publication des découvertes d'Isaac Newton sur la décomposition de la lumière blanche, par un prisme, en un spectre de couleurs visibles. Newton conçoit ainsi la lumière solaire comme composée de rayons de différentes couleurs, réfractés sous des angles différents en passant par le prisme (Fig. I-15).

Plus de 200 ans plus tard, le professeur Theodor W. Engelmann utilisait cette propriété du prisme pour éclairer une algue filamenteuse, *Spirogyra*. Il établissait ainsi le spectre d'action de la lumière sur le processus de photosynthèse en démontrant que des régions du spectre lumineux étaient préférentiellement utilisées pour la photosynthèse (Engelmann, 1882).

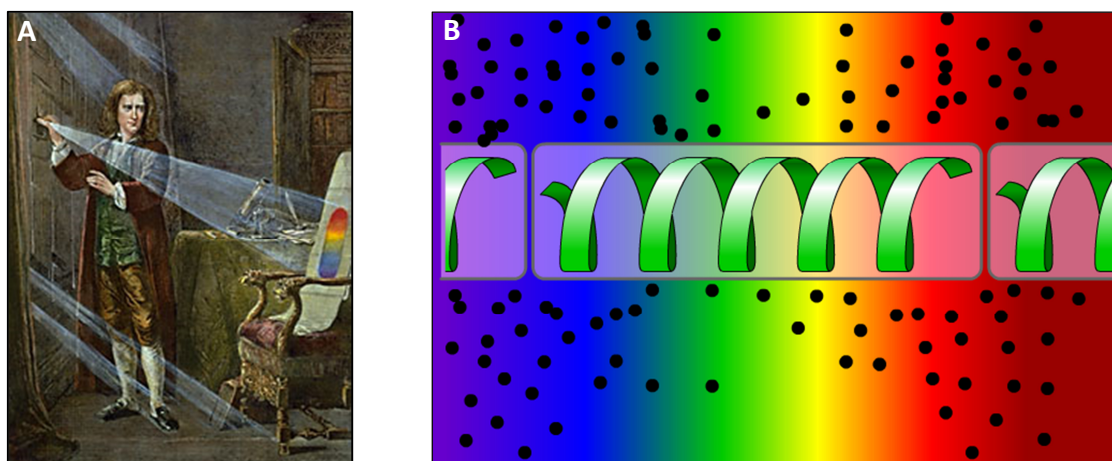


Figure I-15 : Composition spectrale et utilisation pour la photosynthèse. (A) Dessin représentant l'expérience réalisée par I. Newton (1672). Le prisme en verre est placé contre le trou de la porte et la figure oblongue formée par les couleurs dispersées est observée sur le dossier du fauteuil. La forme équivalait à la somme d'une infinité d'images circulaires, correspondant aux différentes couleurs réfractées par le prisme.

Isaac Newton utilisera ensuite un second prisme (*l'experimentum crucis*) pour étudier les rayons issus d'une partie seulement des rayons réfractés par le premier spectre : les rayons traversant le second prisme conservent leur couleur et leur degré de réfrangibilité. Newton en conclut que les couleurs sont des « propriétés originelles et innées différentes suivant les rayons » dont le « mélange » produit des « transmutations » apparentes de couleurs. **(B) Utilisation du spectre lumineux par l'algue filamenteuse *Spirogyra*, d'après le test bactérien d'Engelmann (1883).** La culture est éclairée au travers d'un prisme qui décompose la lumière. Les bactéries se trouvant dans le milieu sont attirées (aérotactisme) par l'oxygène formé par la photosynthèse. Cette attraction est d'autant plus forte que l'activité photosynthétique de la zone du spectre considéré est grande. On obtient ainsi directement, d'une certaine manière, un spectre d'activité photosynthétique. Ces résultats demeurent qualitatifs et non quantitatifs.

La lumière ne représente qu'une mince bande d'un vaste spectre continu de radiations, le spectre électromagnétique (Fig. I-16). En 1905, Albert Einstein proposa le modèle corpusculaire de la

lumière. Selon la théorie du *quantum*, la lumière est délivrée sous forme de particules d'énergie (lots de corpuscules) appelés photons (ou *quanta* de lumière) d'énergie $h\nu$ ¹³. L'énergie transportée par un photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. Les radiations du visible les plus courtes, dans le violet/bleu (400 nm), sont ainsi presque deux fois plus énergétiques qu'un photon de lumière rouge (700 nm).

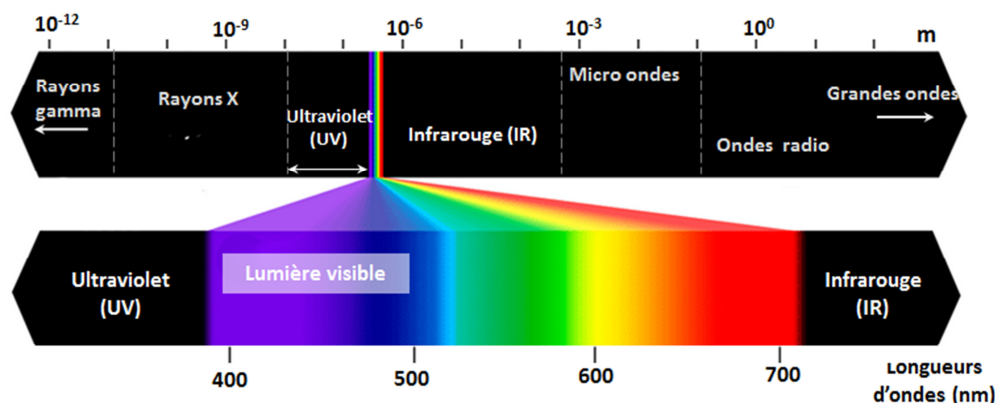


Figure I-16 : Spectre électromagnétique et spectre de la lumière visible. Les longueurs d'ondes de la lumière visible (400 – 700 nm) constituent la gamme photosynthétiquement active ou PAR (*Photosynthetically Active Radiation*).

6.2 Modification du spectre lumineux dans la colonne d'eau

Quelle lumière est disponible pour la croissance des micro-organismes photosynthétiques ?

L'eau de mer apparaît comme un milieu particulièrement variable (instable) du point de vue de ses propriétés optiques. Dans cet environnement aqueux, les caractéristiques de la lumière incidente sont modifiées – tant en intensité (atténuation) qu'en qualité (composition spectrale) – par les propriétés de l'eau elle-même, mais aussi par les matières dissoutes et particulaires en présence. Un tel milieu agit comme un filtre qui, dès les premiers mètres, voire centimètres, de profondeur (en fonction de la turbidité du milieu), atténue la quantité de lumière disponible et en modifie la qualité spectrale sous l'effet de la diffusion et de l'absorption par les molécules d'eau et les matières organiques en suspension (Brandt & Koch, 2003). Toutes les longueurs d'ondes du spectre solaire ne pénètrent pas également en profondeur. Les longueurs d'ondes les plus longues sont les plus rapidement absorbées par l'eau. Ainsi, les radiations rouges et le rayonnement infrarouge sont très rapidement absorbés et, au fur et à mesure que l'on pénètre dans la colonne

¹³L'énergie d'un photon est exprimée comme le produit de sa fréquence et de la constante de Planck, i.e. $h\nu$. Avec $h = 6.626 \times 10^{-34} \text{ J.s}^{-1}$

d'eau, les radiations disponibles pour la photosynthèse tendent vers le bleu et ou/le vert en fonction de la turbidité des eaux (Fig. I-17) (Jerlov, 1976). Cette variation du spectre avec la profondeur explique en partie la répartition des organismes photosynthétiques dans la colonne d'eau (Dring, 1971 ; Kirk, 1983). L'hydrodynamique, qui induit des mouvements verticaux, conditionne la trajectoire des micro-organismes photosynthétiques et de ce fait la qualité de la lumière qu'ils reçoivent et à laquelle ils doivent s'adapter.

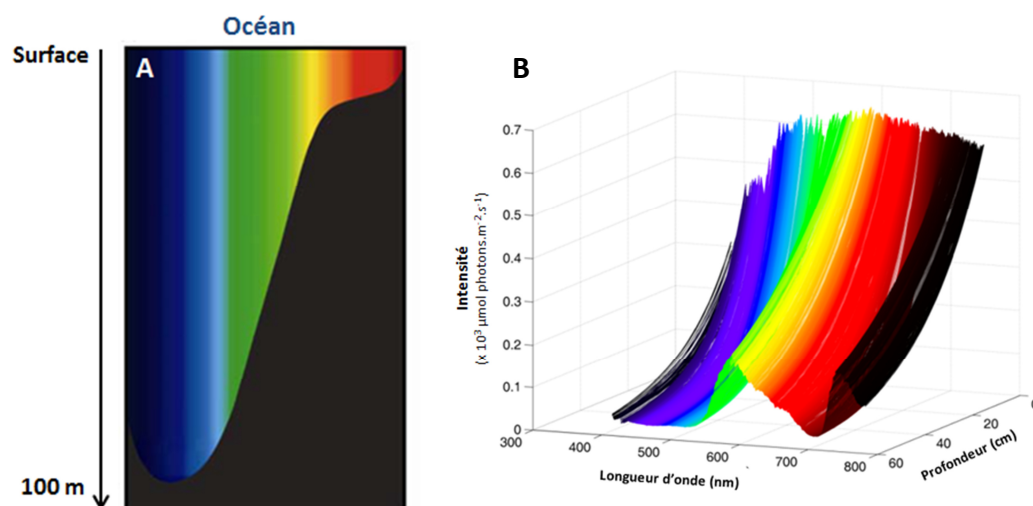


Figure I- 17 : Evolution de la composition du spectre solaire en fonction de la profondeur dans (A) les océans ; (B) un raceway contenant une culture de *D. salina* (0,5 gMS.L⁻¹) (graphique 3D).

6.3 Utilisation du spectre lumineux par les microalgues : une riche variété de pigments photosynthétiques

Les radiations photosynthétiquement actives (communément appelées PAR pour *Photosynthetically Active Radiation*) se situent dans la bande visible (400-700 nm) du spectre électromagnétique. Seuls **35 à 45 %** des photons solaires sont ainsi exploités pour la photosynthèse, la majorité des organismes autotrophes absorbant préférentiellement les radiations rouges et bleues du spectre lumineux (Fig. I-18) (Kirk, 1983).

Les microalgues captent les photons à l'aide de diverses familles de pigments (Kirk, 1994; Falkowski & Raven, 1997; Falkowski *et al.*, 2004). Stomp *et al.* (2007) ont avancé l'hypothèse que les pigments seraient apparus au cours de l'évolution pour absorber la lumière aux longueurs d'ondes non absorbées par l'eau pure. Ces pigments, nombreux, absorbent au sein de régions

spécifiques du spectre lumineux, tout en diffusant les photons non absorbés, ce qui détermine alors leur couleur. La variété de pigments permet ainsi aux microalgues d'utiliser différentes longueurs d'ondes (Engelmann, 1883 ; Bricaud *et al.*, 1983 ; Wood, 1985 ; Kirk, 1994 ; Falkowski *et al.*, 2004). La combinaison des pigments constitutifs d'une espèce détermine alors les parties du spectre lumineux qu'elle peut utiliser, que l'on peut connaître en mesurant son spectre d'absorption, et, de ce fait, les photons -non absorbés- disponibles pour les autres cellules (Carvalho *et al.*, 2011). A titre d'exemple, *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) présente deux zones d'absorption prédominantes, entre 430 et 470 nm (lumière bleue) et entre 650 et 700 nm (lumière rouge) et une zone d'absorption minimale, dans la partie verte du spectre lumineux (550 - 600 nm), d'où sa couleur verte (Fig. I-18).

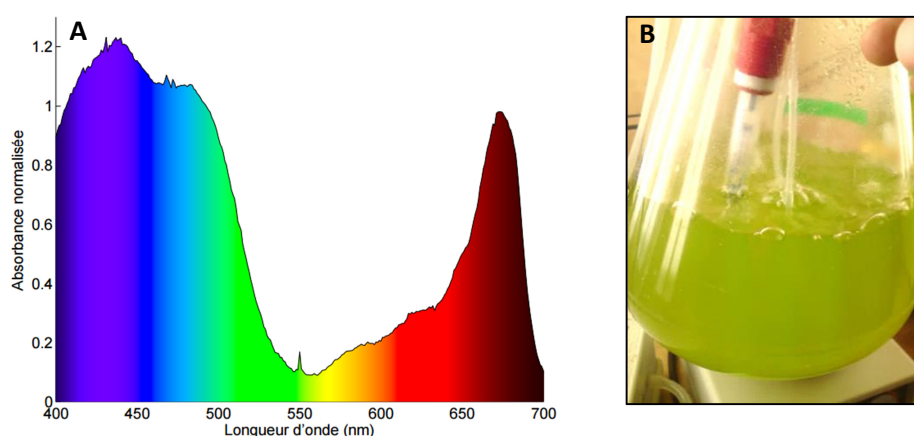


Figure I-18 : Caractéristiques optiques de *Dunaliella salina* (anciennement dénommée « algue verte »). (A) Spectre d'absorption d'une culture en suspension, (B) Photographie d'une culture de *D. salina*, mettant en évidence sa couleur verte, qui traduit la part du spectre solaire qui n'est pas absorbée.

La composition pigmentaire des antennes collectrices, en particulier de l'antenne périphérique du PSII, présente une importante variabilité selon les espèces. Les organismes photoautotrophes oxygéniques possèdent comme pigment principal la Chl *a*, capable de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique par la photosynthèse. Ce pigment vert se caractérise par deux pics maximaux d'absorption, dans la partie bleue (environ 430 nm) et la partie rouge (environ 680 nm) du spectre (Fig. I-19). La Chl *a*, qui constitue le cœur des centres réactionnels, est associée à d'autres pigments dans les antennes collectrices. Ces pigments, dits « accessoires » comme la Chl *b*, la Chl *c*, les caroténoïdes ou les phycobiliprotéines permettent d'étendre la gamme d'absorption de la lumière et d'accroître ainsi les capacités photosynthétiques des organismes (Govindjee & Govindjee, 1974). Ces pigments, dont les structures moléculaires et les spectres d'absorption sont présentés en figure I-19, absorbent la lumière dans des bandes complémentaires de celles de la Chl *a*, à laquelle ils peuvent transférer l'énergie absorbée. Les caroténoïdes ont une

gamme d'absorption comprise entre 400 et 550 nm. Plus particulièrement, le β -carotène, pigment orange, présente deux pics d'absorption à 450 et 475 nm. Chez les cyanobactéries et les rhodophytes, les antennes collectrices, appelées phycobilosomes, contiennent des phycobiliprotéines. On distingue trois sortes de phycobiliprotéines : la phycocyanine (pigment bleu), qui absorbe la lumière rouge à 620-630 nm, la phycoérythrine (pigment rouge), qui absorbe la lumière verte à 560-570 nm et enfin l'allophycocyanine (pigment bleu turquoise), qui absorbe la lumière rouge à 650 nm. Alors que les pigments chlorophylliens et les caroténoïdes sont lipophiles et associés dans des complexes protéines-Chl, les phycobiliprotéines sont hydrophiles (Green & Durnford, 1996). En plus de leur implication dans les processus de capture de l'énergie lumineuse, les caroténoïdes jouent un rôle de photo-protection des mécanismes de photosynthèse, contre le rayonnement solaire excessif et les effets connexes [voir encart n°1]. Les caroténoïdes contribuent également à la stabilisation des protéines antennaires (Havaux, 1998).

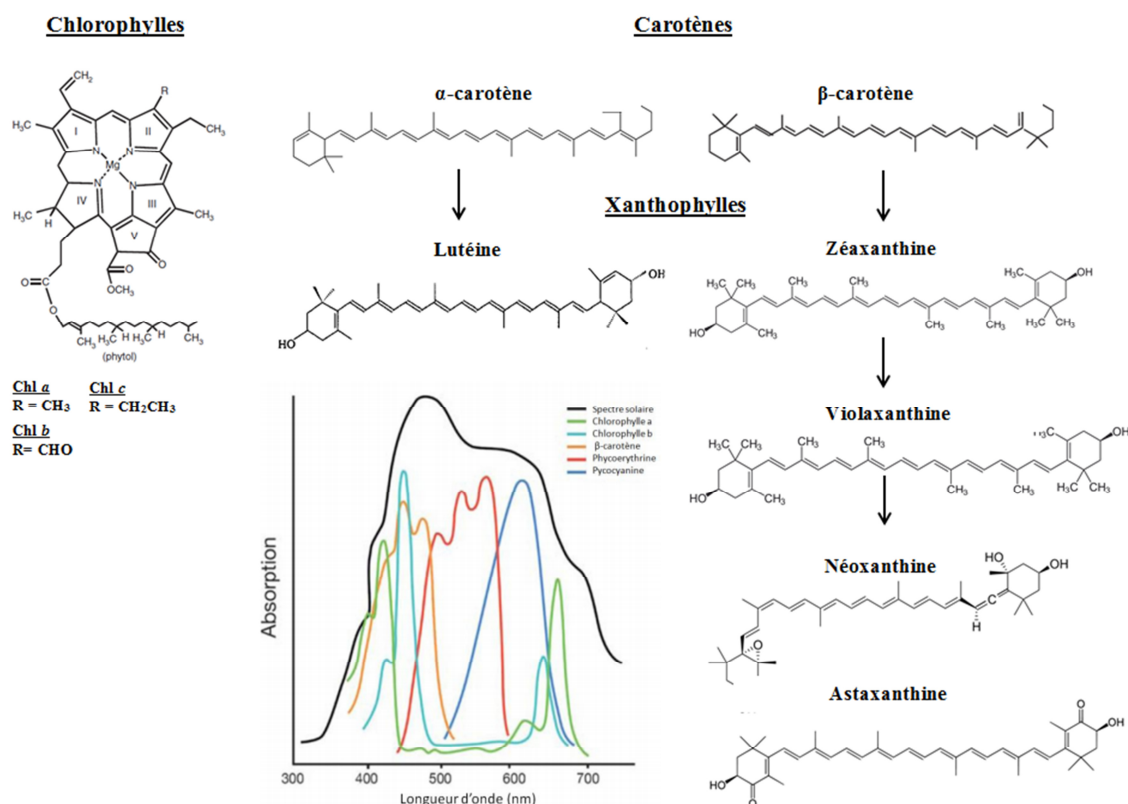


Figure I-19: Structures moléculaires des Chls et des caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) ainsi que leur spectre d'absorption (d'après Williams & Laurens, 2010). Les voies métaboliques de la synthèse des différents caroténoïdes sont également présentées. Cette famille regroupe les carotènes (molécules hydrocarbonées) et les xanthophylles (molécules hydrocarbonées possédant une ou plusieurs molécules d'oxygène). Bien que très diversifiés, les caroténoïdes (tétraterpénoïdes) ont pour point commun leur squelette comprenant 40 atomes de carbone. Les différents types de molécules de Chls (Chl *a*, Chl *b* et Chl *c*) diffèrent quant à eux structurellement par les groupements associés à l'anneau porphyrine.

Le spectre lumineux est un facteur majeur qui détermine la répartition des micro-organismes photosynthétiques (Montesinos *et al.*, 1983 ; Bèjà *et al.*, 2001 ; Rocap *et al.*, 2003 ; Stomp *et al.*, 2004). Les chlorophytes ('algues vertes') ou encore les cyanobactéries vertes dominent en surface et dans les eaux turbides dans lesquelles la lumière rouge est présente, alors que les rhodophytes ('algues rouges') ou les cyanobactéries rouges dominent dans les eaux claires et en profondeur où pénètre la lumière verte (Pick, 1991 ; Vörös *et al.*, 1998 ; Wood *et al.*, 1998 ; Stomp *et al.*, 2007) (Fig. I-20).

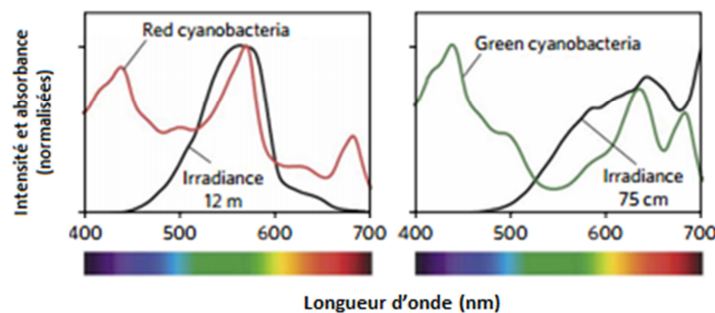


Figure I-20 : Spectres d'absorption d'organismes photosynthétiques (en couleur) et spectres de la lumière disponible dans leurs habitats spécifiques (noir) dont la profondeur est indiquée. D'après Croce & Van Amerongen, 2014 (modifié).

6.4 Atténuation de la lumière en fonction de la profondeur dans un photobioréacteur

Dans les raceways ou les PBRs, la lumière disponible à une profondeur donnée dépend, au premier ordre, de son atténuation par les microalgues et la matière dissoute.

Les photons absorbés par les organismes présents à une profondeur donnée sont perdus pour les autres cellules. La lumière disponible, ainsi que son spectre, est donc fonction de l'espèce, de sa concentration et de son état physiologique, comme par exemple la quantité de chlorophylle par cellule. En première approximation, l'atténuation lumineuse au sein d'un PBR peut être représentée par la loi de Beer-Lambert spectrale.

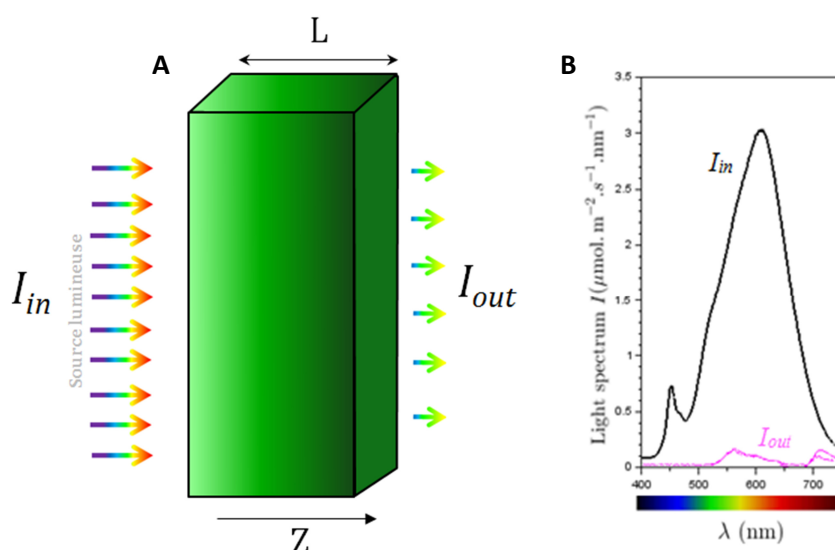


Figure I-21 : (A) Représentation schématique de l'atténuation de la lumière par une culture de microalgues dans un PBR plan éclairé d'un seul côté par une source lumineuse (vue de côté d'un PBR plan de largeur L) ; (B) Spectres d'émission de la lumière (intensité I de la lumière en fonction de la longueur d'onde λ) à l'entrée et à la sortie d'une culture de *Dunaliella salina* éclairée par une lumière blanche. On distingue un maximum d'intensité de la lumière sortante pour des longueurs d'ondes comprises entre 540 et 575 nm. Le spectre en sortie traduit l'atténuation de la lumière, due à l'absorption et à la diffusion des photons par les cellules. Avec I_{in} , l'intensité de la lumière incidente et I_{out} , l'intensité de la lumière sortante.

Nous considérons un PBR plan parfaitement mélangé dont la concentration en biomasse est notée x . Étant donné $I_{in}(\lambda)$ le spectre de lumière incidente ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1}$) et K le coefficient d'atténuation (m^{-1}), l'intensité lumineuse au sein du réacteur à une distance z de la source lumineuse est donnée par :

$$I(\lambda, x, z) = I_{in}(\lambda) \exp[-(A(\lambda) + d)xz - Kz] \quad (\text{I-2})$$

avec $A(\lambda)$, le spectre d'absorption *in vivo* de la microalgue considérée, normalisé par le biovolume ($\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$), et d , le coefficient de diffusion ($\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$), que l'on suppose indépendant de la longueur d'onde λ .

Le nombre de photons absorbés, γ , sur la gamme du PAR par une cellule située à une profondeur z peut alors être quantifié comme (Sathyendranath & Platt, 1989) :

$$\gamma(z, x) = \int_{400}^{700} I(\lambda, x, z) A(\lambda) d\lambda \quad (\text{I-3})$$

Encart n°3 - Notion de PUR

$\gamma(z, x)$ correspond à la notion de PUR (de l'anglais, *Photosynthetically Usable Radiation* ; Morel, 1978), correspondant à l'énergie incidente réellement absorbée par une cellule microalgale et qui dépend de son cortège pigmentaire (Morel, 1978 ; Gostan *et al.*, 1986).

Il est à noter que le rendement quantique, défini comme le nombre de molécules d'oxygène synthétisées par photon absorbé, est quasiment indépendant de la longueur d'onde (Morel & Lazzara, 1987). En termes de métabolisation, une fois captés par les cellules, les photons issus d'une lumière de longueur d'onde peu absorbée (ex : photons verts chez les chlorophytes) ont la même efficacité que les photons issus d'une lumière dont la longueur d'onde est fortement absorbée (ex : photons rouges chez les chlorophytes).

6.5 Effet de la lumière colorée sur les pigments et la croissance des micro-organismes photosynthétiques

Les processus physiologiques (métabolisme carboné, composition pigmentaire, activités enzymatiques), l'efficacité photosynthétique et, de ce fait, la croissance des microalgues peuvent être affectés par la composition spectrale de la lumière (Voskresenskaya, 1972 ; Wilhelm *et al.*, 1985 ; Gostan *et al.*, 1986 ; Glover *et al.*, 1987 ; Morel *et al.*, 1987 ; Rivkin, 1989 ; Falkowski & LaRoche, 1991 ; Nielsen & Sakshaug, 1993 ; Schellenberger Costa *et al.*, 2013 ; Brunet *et al.*, 2014 ; Jungandreas *et al.*, 2014 ; Valle *et al.*, 2014).

La réponse des microalgues à différents spectres lumineux a ainsi fait l'objet de diverses études menées sur plusieurs espèces appartenant à des groupes taxonomiques différents (chlorophytes, cyanobactéries, diatomées, rhodophytes, haptophytes, dinophytes) (voir annexe 1).

Les cyanobactéries, ont fait, en particulier, l'objet de nombreux travaux sur le phénomène de photoacclimatation en réponse à une modification du spectre lumineux. L'acclimatation de l'appareil photosynthétique aux changements de la qualité de la lumière incidente affecte le cortège pigmentaire des organismes (quantité et proportion de Chl *a* et de pigments accessoires majeurs) afin d'optimiser l'absorption de la lumière ambiante (Senger & Bauer, 1987).

Plus précisément, de nombreuses espèces de cyanobactéries peuvent modifier l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des phycobilosomes et remanier la composition qualitative de ces derniers (Bennett & Bogorad, 1973 ; Kehoe & Gutu, 2006). Ce processus, connu sous le terme d'adaptation chromatique complémentaire¹⁴ (ACC), traduit une forme spectaculaire de plasticité phénotypique chez ces espèces (Gaidukov, 1902 ; Boresch, 1921 ; Tandeau de Marsac, 1977 ; Ohki *et al.*, 1985 ; Prézelin *et al.*, 1989 ; Hauschild, 1991 ; Grossman *et al.*, 1993, Markager & Vincent, 2001 ; Stomp *et al.*, 2004 ; Kehoe & Gutu, 2006 ; Stomp *et al.*, 2007). Cette forme d'adaptation chromatique complémentaire est caractérisée par la modification réversible du rapport de deux phycobiliprotéines : la phycocyanine et la phycoérythrine (Tandeau de Marsac, 1977). Exposées à de la lumière verte, les cellules synthétisent de la phycoérythrine (les phycobilosomes sont alors composés d'un hexamère simple de phycocyanine et de trois hexamères de phycoérythrine), qui capture spécifiquement cette couleur, et deviennent rouges. Sous une lumière rouge, elles synthétisent de la phycocyanine (les cellules ne contiennent presque plus de phycoérythrine et jusqu'à trois hexamères de phycocyanine) et deviennent bleues-vertes. La cellule produit ainsi des pigments qui absorbent préférentiellement les photons de la lumière à laquelle elle est exposée. Par conséquent, elle prend une couleur 'complémentaire' à celle de la lumière incidente [voir encart n°4].

Les différentes études menées chez les autres taxons, dont les principales conclusions sont exposées dans une revue présentée en annexe de cette thèse (voir annexe 1), présentent des résultats divergents. Ces contradictions peuvent résulter du spectre lumineux testé, du type de lumière utilisé ou encore des variabilités inter- et intra-spécifiques (Vesk & Jeffrey, 1977 ; Fu *et al.*, 2013). Par ailleurs, la majorité des travaux qui visent à comparer l'effet de différentes longueurs d'ondes sur le contenu pigmentaire et la croissance des microalgues sont menés à intensité lumineuse incidente (PAR) constante (voir annexe 1, tableau A1-II). Les espèces absorbant différemment les longueurs d'ondes du PAR, ce type de protocole expérimental induit un biais car les cultures ne disposent pas de la même quantité de photons. Les résultats observés peuvent ainsi être le reflet de l'effet combiné des variations de l'intensité lumineuse reçue et de la

¹⁴ D'un point de vue sémantique, le terme « d'acclimatation chromatique complémentaire » serait plus approprié pour qualifier ce phénomène.

qualité spectrale. Il est alors préférable de comparer des cultures ayant absorbé la même quantité de photons, c'est-à-dire à PUR constant.

6.5.1 Premières approches de l'impact de la couleur sur la croissance des microalgues et la bioaccumulation de molécules d'intérêt

La majorité des études menées à PUR constant traitent de l'impact du spectre lumineux sur la croissance, la synthèse de pigments et les mécanismes de photoprotection chez les diatomées (Gostan *et al.*, 1986 ; Rivkin, 1989 ; Nielsen & Sakshaug, 1993 ; Schellenberger Costa *et al.*, 2013 ; Brunet *et al.*, 2014 ; Jungandreas *et al.*, 2014 ; Valle *et al.*, 2014). Ces travaux mettent en particulier en évidence l'effet de la lumière bleue-verte sur ces espèces et leur capacité à modifier leur spectre d'absorption dans le rouge lointain. Les gènes codant pour les protéines impliquées dans la photoprotection et les réparations du PSII apparaissent dépendants de la lumière bleue. Les processus de photoprotection rapides, tels que le cycle des xanthophylles, exigent ainsi de la lumière rouge pour être initiés et de la lumière bleue pour être activés (Brunet *et al.*, 2014 ; Valle *et al.*, 2014). Selon Ruyters (1984), en plus de son implication dans la photosynthèse, la lumière bleue interviendrait dans la régulation de la transcription de certains gènes et dans l'activation des enzymes. Des cellules endommagées peuvent être réparées en étant exposées à des intensités très faibles de lumière bleue.

Les chlorophytes ont également fait l'objet de nombreuses études. Néanmoins, seule une minorité d'entre elles a été réalisée à PUR constant. En 1985, Wilhelm et ses collaborateurs ont étudié l'impact de différentes longueurs d'ondes sur la structure de la membrane thylakoïdale et les caractéristiques physiologiques de *Chlorella fusca*. En lumière bleue, cette espèce présente un contenu en Chl *a* et un rapport PSII : PSI plus faibles qu'en lumière rouge. Les radiations bleues, en comparaison avec la lumière rouge, entraînent un grossissement des cellules, un amincissement de leurs parois cellulaires ainsi qu'une réduction de leur pool d'amidon. De même, en lumière bleue, les cellules sont caractérisées par un taux de photosynthèse supérieur ainsi qu'une concentration plus élevée en cytochrome *b₆/f*. En outre, la lumière bleue stimule la synthèse des protéines solubles et des carbohydrates. Quelques années plus tard, Rivkin (1989) obtenait des conclusions différentes de celles de Wilhelm *et al.*, en rapportant que *Dunaliella tertiolecta* présente des teneurs cellulaires en Chl *a* supérieures en lumières bleue et blanche, comparé à une lumière rouge. Il montre aussi que les lumières rouge et bleue favorisent la synthèse de protéines, l'assimilation de carbone, le contenu lipidique ainsi que le taux de respiration de cette espèce. En revanche, le taux de division cellulaire n'est pas affecté par la couleur de la lumière dans cette étude (Rivkin, 1989).

Encart n°4 - L'adaptation chromatique des cyanobactéries (compléments)

La majorité des cyanobactéries du genre *Synechococcus* ne présentent pas de variations de leur quantité relative de phycoérythrine et de phycocyanine en fonction de la qualité de la lumière (Waterbury *et al.*, 1986). Toutefois, Palenik (2001) a décrit un nouveau type d'adaptation chromatique chez certaines souches de *Synechococcus*, qu'il nomme 'adaptation chromatique complémentaire de type IV' (ACC4).

Sous une lumière verte, ces cellules synthétisent des pigments qui capturent spécifiquement les photons de cette couleur. Lorsque l'environnement lumineux est modifié et remplacé par une lumière bleue, elles peuvent, en moins d'une semaine, modifier leur cortège pigmentaire afin d'absorber cette nouvelle longueur d'onde. L'ACC4 est caractérisée par une modification réversible du rapport de deux chromophores liés à la phycoérythrine II : la phycourobiline (PUB) (chromophore absorbant dans le bleu) et la phycoérythrobiline (PEB) (chromophore absorbant la lumière verte). Le ratio PUB : PEB est plus élevé sous une lumière bleue et plus faible en lumière verte (Ong & Glazer, 1991 ; Everroad *et al.*, 2006). Lors du passage d'une lumière verte à une lumière bleue, l'ACC4 implique le remplacement de trois molécules de PEB par un nombre équivalent de molécules de PUB. Une enzyme spécifique, baptisée *MpeZ*, modifie la proportion entre les pigments de l'antenne (Shukla *et al.*, 2012). Les PUB prédominent chez *Synechococcus* dans les zones de l'océan ouvert, pauvres en nutriments, où la lumière bleue pénètre plus profondément que les autres couleurs (Morel *et al.*, 2007).

6.5.2 Comment les organismes perçoivent-ils les radiations lumineuses ? Une question d'actualité chez les eucaryotes unicellulaires

Encart n°5 - Définitions clés

Chromoprotéine : protéine associée à un groupement prosthétique coloré, le chromophore.

Chromophore (du grec *phoros*, porter) : partie tétrapyrrolique de la chromoprotéine, responsable de l'absorption de la lumière (Hopkins, 2003).

Phytochrome : photorécepteur découvert en 1952 par H.A Borthwick et S.B Hendrix dans le hyaloplasme des plantes supérieures. Il s'agit d'une chromoprotéine, dont le chromophore est une phytochromobiline présente sous deux formes isomères photoconvertibles, l'une absorbant la lumière rouge (P660), l'autre absorbant la lumière rouge lointain (P730) (Forest, 2014).

Cryptochrome (littéralement, pigment caché) : flavoprotéine réceptrice des proches ultraviolets (UV) et de la lumière bleue, caractérisée pour la première fois chez *Arabidopsis thaliana* où elle joue un rôle clé dans la croissance et le développement. Découverts ensuite chez des espèces procaryotes et de nombreux eucaryotes, les cryptochromes présentent des fonctions de régulation de l'horloge circadienne (Small *et al.*, 1995 ; Sancar, 2000 ; Chaves *et al.*, 2011).

Phototropine : Protéine membranaire responsable de la réception des photons bleus et des UV-A, ayant un rôle important dans la photoréception et le phototropisme des plantes supérieures (Huang *et al.*, 2002).

La transduction de la lumière permet d'initier une voie de signalisation : la perception de l'environnement. Les photorécepteurs constituent un outil de perception essentiel des changements de lumière chez les micro-organismes photosynthétiques (Möglich *et al.*, 2010). La nature utilise un nombre limité de molécules organiques pour former des photorécepteurs sensoriels qui contrôlent le développement et les processus visuels. Différents photorécepteurs (les protéines jaunes photoactives, les cryptochromes, les phototropines, les phytochromes ou encore les rhodopsines) qui absorbent différentes longueurs d'ondes selon le chromophore présent dans la protéine, ont évolué dans différentes branches évolutives en fonction des besoins des organismes (Hegemann, 2008). Ces photorécepteurs permettent de réguler le cycle cellulaire, le mouvement et le développement des chloroplastes, la photosynthèse, la photomorphogénèse, le phototropisme ou encore le réglage de l'horloge circadienne (Hegemann, 2008). La lumière absorbée est convertie en signaux biochimiques qui modulent l'activité biologique des cellules et des organismes (Möglich *et al.*, 2010). Alors que les photorécepteurs ont fait l'objet de multiples études chez les plantes supérieures, les travaux sur leur présence et leurs effets chez les microalgues n'en sont qu'à leur début.

La lumière rouge/rouge lointain est détectée par des phytochromes, qui jouent un rôle fondamental dans la photoréception de l'environnement lumineux, pour la croissance et le

développement des plantes supérieures (Strasser *et al.*, 2010). Ces phytochromes apparaissent néanmoins moins utiles aux micro-organismes aquatiques, les rayonnements rouge et rouge lointain étant très rapidement absorbés dans la colonne d'eau. A titre d'exemple, le phytochrome est absent chez la rhodophyte *Chondrus crispus* (Bird *et al.*, 1983) tout comme chez la chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (Duanmu *et al.*, 2013). Plus généralement, aucun gène codant pour la synthèse de phytochromes n'a, jusqu'à présent, été mis en évidence chez les chlorophytes (Schulze *et al.*, 2014). A la place, un cryptochrome serait le récepteur rouge de cet embranchement, bien que ce dernier semble ne pas détecter la lumière rouge lointain (Beel *et al.*, 2012). Cependant, des études génomiques récentes révèlent la présence de gènes phytochrome au sein de nombreuses lignées évolutives. Des phytochromes classiques, récepteurs à la lumière rouge-rouge lointain, ont été identifiés chez des espèces de charophytes (Kidd & Lagarias, 1990 ; Jorissen *et al.*, 2002) et de diatomées (Armbrust *et al.*, 2004 ; Bowler *et al.*, 2008).

Une étude biochimique récente, menée par Rockwell et ses collaborateurs (2014) sur sept espèces de microalgues a révélé l'existence de phytochromes absorbant une grande partie du spectre lumineux : du bleu (434 nm) au proche infra-rouge (734 nm) (Fig. I-22). Néanmoins, à ce jour, aucun lien n'est établi entre la présence de ces photorécepteurs et les réponses photobiologiques des organismes étudiés (Forest, 2014 ; Rockwell *et al.*, 2014).

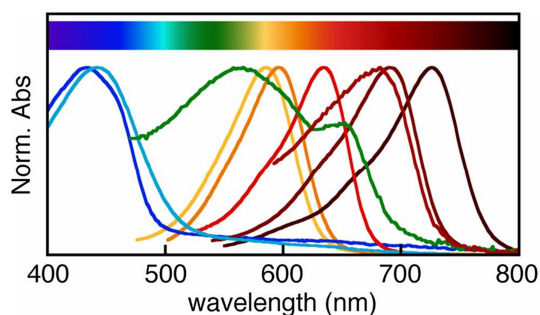


Figure I-22 : Spectres d'absorption normalisés des différents phytochromes mis en évidence par Rockwell *et al.* (2014).

Les réponses des organismes à la lumière bleue ont été les premières caractérisées (Darwin, 1881) mais ces phénomènes demeurent encore peu compris en photobiologie. La lumière bleue influence l'expression de gènes et de nombreuses voies métaboliques chez les microalgues *via* des photorécepteurs tels que des cryptochromes, des phototropines, des auréochromes ou des néochromes (Ruyters, 1984 ; Beel *et al.*, 2012 ; Costa *et al.*, 2013). La lumière bleue, probablement *via* les photorécepteurs comme les phototropines, semble induire l'accumulation de pigments chez de nombreuses espèces de chlorophytes (Katsuda *et al.*, 2004 ; Pazos & Izquierdo,

2011 ; Fu *et al.*, 2013 et revue en annexe 1). Les diatomées possèdent des photorécepteurs sensibles à la lumière bleue (auréochromes et cryptochromes), qui sont impliqués dans les processus d'acclimatation et le déclenchement des processus de photoprotection (Falcioro *et al.*, 2014 ; Valle *et al.*, 2014 ; Wilhelm *et al.*, 2014). Par ailleurs, nombre de processus physiologiques clés comme la photomorphogénèse (Huysman *et al.*, 2013), les mouvements du chloroplaste (Shihira-Ishikawa *et al.*, 2007) ou encore la division cellulaire (Cao *et al.*, 2013) sont régulés, chez les diatomées, par la lumière bleue.

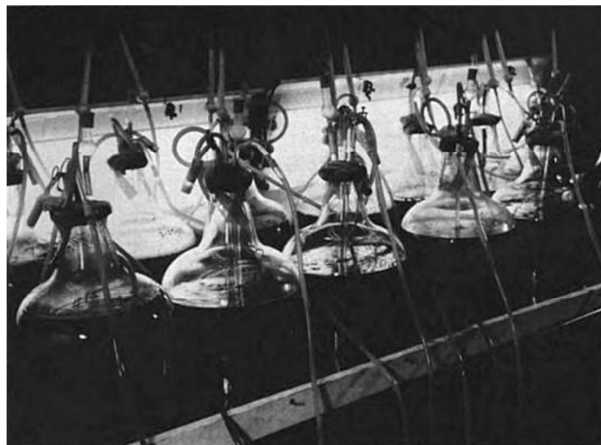
6.5.3 Les mécanismes de photoréception et de photoorientation chez *Dunaliella*

Des réponses phototactiques ont été observées chez différentes espèces algales, incluant les chlorophytes et les dinoflagellés (Foster & Smyth, 1980). La phototaxie (du grec *phôtos*, lumière et *taxis*, arrangement), caractérise la réaction d'orientation d'organismes mobiles par rapport à la lumière. De nombreuses espèces de chlorophytes flagellées (e.g. *C. reinhardtii*, *D. salina*) sont guidées par leurs « yeux » (de l'anglais eyespot), qui leur permettent de détecter la direction de la lumière incidente et de se déplacer vers des conditions optimales de photosynthèse. Ce système visuel rudimentaire, appelé stigma (ou parfois 'tache oculaire') est composé, chez *Dunaliella salina*, d'un cluster de β -carotène contenant des gouttelettes lipidiques organisées en plusieurs couches, entre les membranes granaires du chloroplaste (Häder & Lebert, 2009 ; Kreimer, 2009). Cet organite photorécepteur, d'1 μm de diamètre, joue un rôle actif dans le phototactisme (Foster *et al.*, 1984; Braune & Ekelund, 1990). La perception du signal lumineux, par le biais d'une transduction de signal chimique, modifie le battement des flagelles de manière asymétrique, permettant à la cellule d'effectuer une rotation afin de s'orienter vers la source lumineuse (phototaxie positive) ou de s'en éloigner, en cas d'une illumination trop importante (phototaxie négative) (Posudín *et al.*, 2010). Chez le genre *Dunaliella*, le spectre d'action de la phototaxie se situe entre 400 nm et 520 nm (*maxima* à 410-415 nm et 465-475 nm) (Posudín *et al.*, 1991). Dans une étude récente, Davidi *et al.* (2015) ont émis l'hypothèse que les globules de β -carotène plastidique de *Dunaliella bardawil* et *Dunaliella salina* auraient évolué du stigma.

Chapitre II – Matériel et méthodes

“Le célèbre inventeur de la méthode de philosopher, le grand Descartes, s'il est besoin de le nommer, avait-il soupçonné que, pour anatomiser la lumière, il ne fallut qu'en faire tomber un rayon sur un prisme ou observer une bulle de savon ?”

Charles Bonnet (1720 - 1793)



Ancien dispositif de culture de microalgues (d'après Stein, 1979).

L'étude de l'impact de la fréquence d'éclairement et de la composition spectrale a nécessité le développement de systèmes de culture et d'éclairage innovants et originaux auxquels une partie significative de ce travail a été consacrée.

Ce chapitre présente les dispositifs de culture et les différentes méthodes et techniques de mesure mis en œuvre dans cette étude, ainsi que les souches et le milieu de culture utilisés.

Les protocoles opératoires spécifiques à chaque expérience sont détaillés dans les différents chapitres.

Sommaire

1. Espèces considérées	73
1.1 Conservation des souches.....	73
1.2 Milieu de culture	73
2. Des systèmes de culture innovants	74
2.1 Dispositifs expérimentaux de culture.....	74
2.1.1 Le photobioréacteur cylindrique.....	74
2.1.2 Le photobioréacteur plan.....	76
2.2 Descriptif et originalité des systèmes d'éclairage et de leur mode de pilotage.....	78
2.2.1 Systèmes d'éclairage en lumière blanche	78
2.2.2 Modification du spectre de la lumière	81
2.2.3 Dispositifs de pilotage des LED.....	82
2.3. Conditions de culture	83
2.3.1 Les cultures en batch.....	83
2.3.2 Les cultures semi-continues et continues	84
2.4 Pilotage automatique des cultures et calibrations	90
2.4.1 Pilotage automatique des cultures par le logiciel ODIN®.....	90
2.4.2 Phases de calibration.....	91
3. Méthodes d'analyse et de mesure	94
3.1 Suivis de croissance en taille et en nombre.....	94
3.2 Analyses pigmentaires.....	95
3.2.1 Spectrophotométrie : mesure par extraction des pigments.....	95
3.2.2 Absorption in vivo par spectrophotométrie.....	96
3.3 Dosage du carbone et de l'azote particuliers	97
3.4 Quantification des lipides neutres par la méthode Nile Red	97
3.5 Quantification des nitrates.....	98

1. Espèces considérées

Les expériences ont été menées avec la chlorophyte *Dunaliella salina* souche CCAP 18/19 - BIOCORE0101 et l'haptophyte *Tisochrysis lutea* souche CCAP 927/17.

La souche de *Tisochrysis* utilisée est issue d'un travail de sélection réalisé par l'Ifremer de Nantes. Elle produit, en condition de carence azotée, deux fois plus de lipides de réserve que la souche sauvage (Bougaran *et al.*, 2012). Elle sera nommée T-Iso 2X dans la suite de cette étude.

1.1 Conservation des souches

Les souches de *Dunaliella salina* et de T-Iso 2X ont été maintenues au laboratoire en phase exponentielle de croissance, par repiquages successifs (tous les 7 jours) au sein de flasques de polycarbonate contenant 20 mL de milieu nutritif f/2 (Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975) (voir annexe 2).

Les flasques ont été conservées dans un incubateur (SANYO MLR-351) à 27°C, sous un régime lumineux jour/nuit (12 h/12 h), à une intensité d'environ 300 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

1.2 Milieu de culture

Les milieux de culture sont préparés à partir d'eau de mer (38 g.L^{-1}) prélevée en surface à la sortie de la rade de Villefranche-sur-Mer (Point B : 43°41'10''N - 7°18'94''E). Préalablement dépourvue de ses plus grosses particules juste après son prélèvement, à l'aide d'une cartouche de filtration Millipore (1 μm), l'eau de mer est ensuite conservée plusieurs semaines à l'obscurité dans des bonbonnes de polyéthylène de 60 L afin de permettre l'épuisement des éléments nutritifs résiduels. Lors de la préparation du milieu nutritif, l'eau de mer préalablement vieillie est à nouveau filtrée sur filtre Millipore 0,1 μm dans des bidons de polycarbonate (Nalgene) de 10 L ou 20 L, dans lesquels elle est autoclavée 30 minutes à 120°C. Après refroidissement, des solutions de phosphates, nitrates, métaux traces et vitamines sont ajoutées de manière axénique (à travers un filtre 0,22 μm), en suivant la composition du milieu f/2 (Guillard & Ryther, 1962 ; Guillard, 1975). Les bidons sont utilisés pour le rinçage et le remplissage initial des photobioréacteurs, préalablement stérilisés avec de l'acide chlorhydrique (HCl 10 %) durant 1 heure, puis pour renouveler les cultures en continu en « milieu frais ».

2. Des systèmes de culture innovants

De nouveaux dispositifs ont dû être développés afin de contrôler avec précision l'environnement physico-chimique et biologique des cultures, en particulier l'intensité, la fréquence et la composition spectrale de la lumière.

2.1 Dispositifs expérimentaux de culture

Un premier type de photobioréacteur, cylindrique, a été employé dans le but d'assurer des conditions lumineuses homogènes - tant en termes de composition spectrale que d'intensité - et précisément contrôlées, au sein de cultures faiblement concentrées. Un second type de photobioréacteur, dont la géométrie plane facilite la modélisation du transfert radiatif, a été utilisé pour le suivi de cultures denses, caractéristiques des conditions de production industrielle.

2.1.1 Le photobioréacteur cylindrique

Les expériences présentées dans les chapitres III, IV et V ont été menées au sein de photobioréacteurs cylindriques en verre borosilicate ($\varnothing$ 77 mm), munis d'une double paroi externe, d'une capacité effective de 500 mL (SCHOTT DURAN). Les photobioréacteurs sont fermés hermétiquement par un couvercle de polycarbonate muni d'un joint torique en silicone. Une série de canules en verre traverse le couvercle. L'une d'elle, dédiée aux prélèvements pour analyses, atteint le fond du photobioréacteur et est reliée, *via* un tuyau souple en silicone, à un raccord de prélèvement pour seringues. Un clamp en plastique est placé sur le tuyau souple afin d'empêcher le retour du volume mort dans la culture après les prélèvements et d'éviter les risques de contamination. Ce volume mort est purgé avant chaque prélèvement. Deux canules portent un filtre à air (Sartorius 0,2 μ m) et assurent les échanges gazeux stériles. Une première atteint le fond du photobioréacteur et permet le bullage d'air et de CO₂, une seconde, très courte, sert d'évent. Enfin, deux canules permettent l'enrichissement de la culture et le contrôle du volume.

Les photobioréacteurs, disposés au sein de boîtes expérimentales équipées de compartiments indépendants ventilés, sont ainsi soustraits de toute perturbation lumineuse externe. L'ensemble du dispositif permet de mener des expériences simultanées dans des conditions de lumière distinctes (Fig. II-1).

Contrôle de l'environnement physico-chimique

Température

De l'eau thermostatée par un cryostat (Lauda Proline BP845) circule dans la double paroi externe des photobioréacteurs afin de maintenir une température constante de 27°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$), optimale pour la croissance de *Dunaliella salina* (García *et al.*, 2007).

Homogénéité des cultures

L'agitation des cultures est nécessaire pour assurer des conditions homogènes de croissance (répartition des nutriments, de la biomasse et donc de la lumière) et le dégazage de l'O₂ produit, toxique à forte concentration. Elle est assurée par un barreau aimanté (agitateur magnétique, Heidolph MR Hei-Mix S, 150 rpm), ainsi que par un léger bullage d'air filtré (Whatman 0,2 μm), lesquels atténuent également le développement de dépôts de microalgues (biofilms) sur les parois et le fond des photobioréacteurs.

Régulation du pH

L'équilibre du système des carbonates dans la culture est modifié par la croissance des microalgues. La fixation photosynthétique du CO₂ dissous, qui est en équilibre chimique avec les espèces carbonate et bicarbonate, entraîne une augmentation du pH. Afin de maintenir le pH constant, une sonde (Mettler ingold®) placée au centre de chaque culture l'enregistre en continu, et commande une injection contrôlée de CO₂ gazeux pour le maintenir à 8,3 ($\pm 0,1$) (Sciandra *et al.*, 2003), valeur à laquelle la concentration en CO₂ dissous n'est pas limitante pour la photosynthèse.

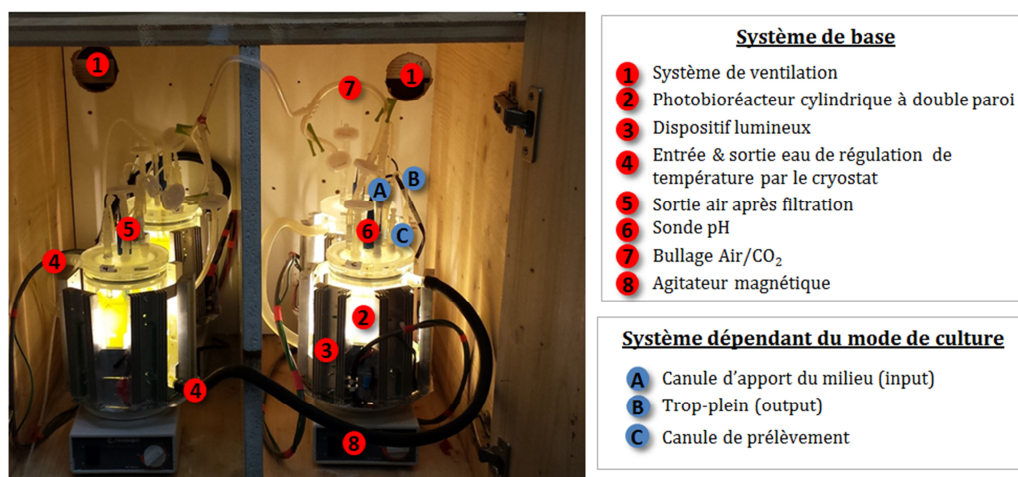


Figure II-1: Présentation de l'agencement des photobioréacteurs cylindriques en verre (diamètre interne 77 mm), disposés au sein d'une boîte expérimentale possédant deux compartiments équipés d'une ventilation propre.

2.1.2 Le photobioréacteur plan

Une nouvelle génération de photobioréacteurs hautement automatisés et à géométrie plane a été conçue et réalisée dans le but de contrôler un plus grand nombre de paramètres et de permettre une modélisation aisée et fiable du transfert radiatif au sein des cultures. Ces dispositifs ont été utilisés pour les expériences présentées dans le chapitre VI.

Spécifications techniques

Le photobioréacteur plan (60 mm x 60 mm x 550 mm) présente une capacité utile de 1900 mL. Ses faces avant et arrière sont constituées par deux parois amovibles en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) fixées sur une embase métallique en acier inoxydable (inox 316L, qualité marine). Un joint torique en silicone permet d'assurer l'étanchéité du dispositif. Le photobioréacteur est hermétiquement fermé sur sa partie supérieure par un couvercle de PMMA également pourvu d'un joint torique. L'embase présente deux orifices permettant le prélèvement de la culture ainsi que le bullage d'air et de CO₂ (Fig. II-2).

Chaque photobioréacteur est placé dans un caisson en mélaminé blanc qui permet d'isoler les cultures les unes des autres. Chaque caisson est ainsi totalement autonome et équipé de ses propres appareillages.

Mesures et contrôles

Température, pH

La température de la culture est maintenue constante à 27 ou 28°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) par la circulation d'un fluide caloporteur au sein de la structure creuse du photobioréacteur, thermostaté par un cryostat (LAUDA Proline RP 845).

Une régulation du pH à 8,0 ($\pm 0,1$), suivant le principe décrit précédemment, est assurée par une sonde pH (Mettler ingold®) reliée à un transmetteur pH/Redox avec contrôleur PID intégré (Mettler Toledo ®). En outre, le transmetteur permet d'enregistrer le pH et la température des cultures en continu.

Homogénéité des cultures

L'homogénéité est assurée par un agitateur magnétique et par un bullage d'air contraint le long des parois avant et arrière, qui permet de lutter contre la formation de biofilms.

Les effets indésirables du biofilm sur la pénétration de la lumière dans les cultures ont été estimés par des mesures du flux de photons en sortie des photobioréacteurs vides, en début et fin d'expérience. Une atténuation maximale de la lumière de 8 % a ainsi pu être mesurée après deux mois de culture.

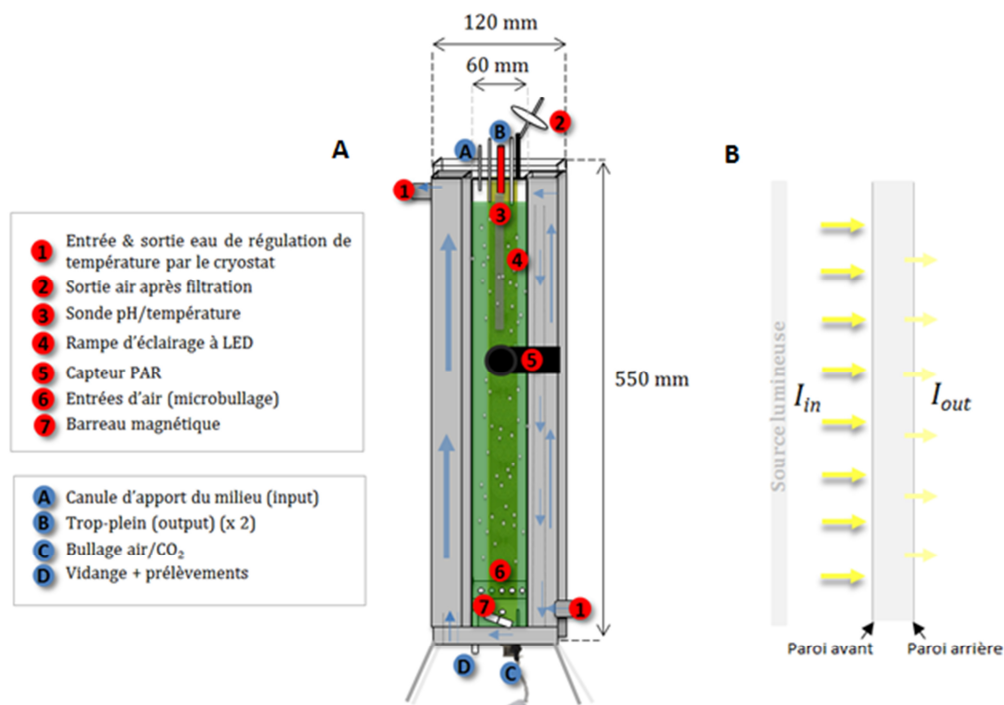


Figure II-2 : Représentations schématiques du photobioréacteur plan utilisé au cours de cette étude. (A) Vue de la face arrière, (B) Vue de côté. Avec I_{in} , l'intensité lumineuse incidente et I_{out} , l'intensité lumineuse en sortie du réacteur.

2.2 Descriptif et originalité des systèmes d'éclairage et de leur mode de pilotage

Nous avons également conçu des dispositifs d'éclairage novateurs, constitués de diodes électroluminescentes (DEL, en anglais : *Light-Emitting Diodes*, LED), permettant de moduler avec précision l'intensité, la fréquence et le spectre de la lumière émise. Les LED présentent, sur les tubes fluorescents traditionnels, les avantages d'une puissance accrue, d'une consommation en énergie et d'un rayonnement de chaleur plus faibles, d'une durée de vie plus longue (environ 5 ans) et d'une meilleure stabilité doublée d'une inertie quasi-nulle. L'énergie lumineuse (W.m^{-2}) et la durée de vie des LED sont respectivement 5 et 10 fois supérieures aux lampes classiquement utilisées (Carvalho *et al*, 2011). Par ailleurs, l'éclairage unidirectionnel des LED permet une distribution des photons plus homogène que les lampes fluorescentes (Posten, 2009).

Les spécifications des régimes lumineux utilisés pour répondre aux différentes questions sont détaillés dans les chapitres correspondants.

2.2.1 Systèmes d'éclairage en lumière blanche

Avant de finaliser le développement de ces dispositifs complexes, une série de tests préliminaires (comparaison des taux de croissance) a été réalisée sur *Dunaliella salina* afin de s'assurer que cette espèce pouvait croître avec des LED et, le cas échéant, de déterminer les types de LED les plus favorables à sa croissance. Ces résultats sont présentés en annexe 3 de cette thèse.

Deux modules de LED blanches à haute puissance (435-735 nm) ont finalement été utilisés pour les cultures de *Dunaliella salina* et de T-Iso 2X : un module rectangulaire (50 mm x 7 mm x 1,9 mm) à 12 LED blanches (LED SmartArray, à 12 LED Nichia NFSW157AT, 6W, Lumitronix) et un module circulaire ($\varnothing$ 40 mm) à 7 LED (Nichia NVSL219BT). Ces deux modules seront nommés respectivement « LED de type 1 » et « LED de type 2 » dans la suite de ce chapitre.

Ces LED, qui présentent un large spectre d'émission (Fig. II-3), ont aussi été sélectionnées pour leur grande taille, qui favorise la diffusion de la lumière.

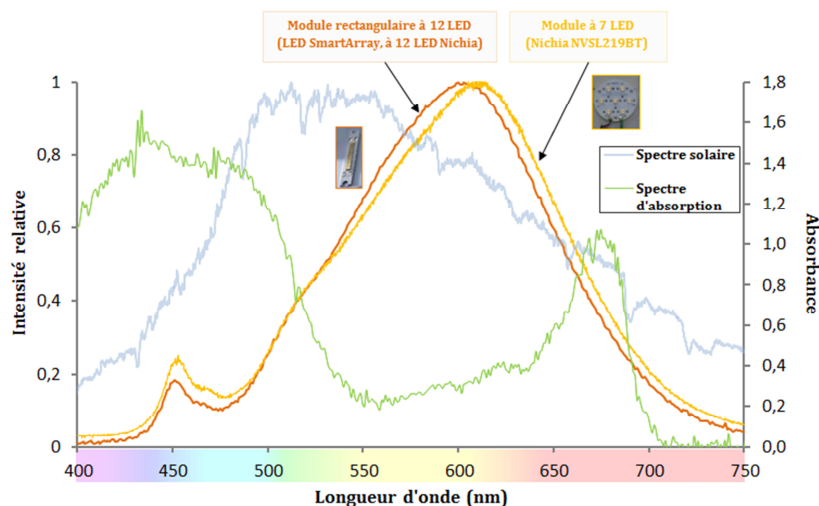


Figure II-3 : Spectre solaire (bleu clair), spectres d'émission des deux modules de LED, normalisés (orange et rouge), mesurés à l'aide du radiospectromètre OCEAN OPTICS USB4000-UV-VIS (logiciel SpectraSuite) et spectre d'absorption *in vivo* d'une suspension de *Dunaliella salina* (vert). Les spectres des LED recouvrent les longueurs d'ondes de la lumière visible (400 – 700 nm), qui constituent les « radiations photosynthétiquement actives » ou PAR (de l'anglais *Photosynthetically Active Radiation*), utilisées par les microalgues pour assurer leur croissance.

Le photobioréacteur cylindrique

Chaque photobioréacteur cylindrique est éclairé par trois modules de LED de type 1 (d'un angle de rayonnement de 120°) positionnés symétriquement afin d'assurer une distribution homogène de la lumière au sein des cultures (Fig. II-4). Chaque module est fixé au centre d'un dissipateur thermique (ou radiateur) en aluminium (Lumitronix, 130 mm x 42,7 mm x 12,5 mm) permettant d'améliorer l'évacuation de la chaleur. Ce dispositif d'éclairage a été utilisé pour produire des variations de lumière à haute fréquence, telles qu'elles sont perçues par les cellules dans les cultures de type raceway. Il permet ainsi d'exposer des cultures à des doses de photons équivalentes, mais distribuées avec différentes fréquences (voir chapitre III).

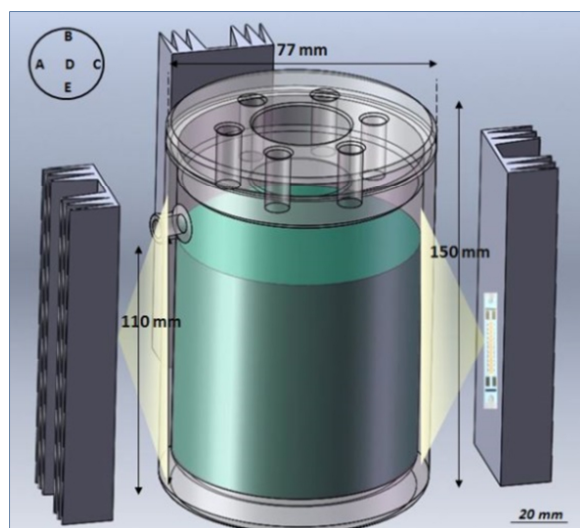


Figure II-4 : Représentation schématique en 3D d'un photobioréacteur cylindrique (logiciel SolidWorks). Chaque photobioréacteur est entouré de trois modules de LED fixés sur des radiateurs, assurant un champ lumineux homogène au sein des cultures. Le cercle en haut à gauche représente une vue de dessus des photobioréacteurs dans lesquels l'intensité lumineuse est mesurée en cinq points (A-E).

Afin de générer une lumière plus intense et d'améliorer l'homogénéité du champ lumineux, ce premier dispositif a évolué vers un second système plus puissant, muni de six modules de LED disposés sur un châssis circulaire de 120 mm de diamètre (Fig. II-5) (voir chapitres IV et V). Ce système offre une gamme d'intensités plus importante, et permet, outre les spécifications du premier, d'intercaler des filtres colorés pour modifier la composition spectrale de la lumière incidente (voir §2.2.3).

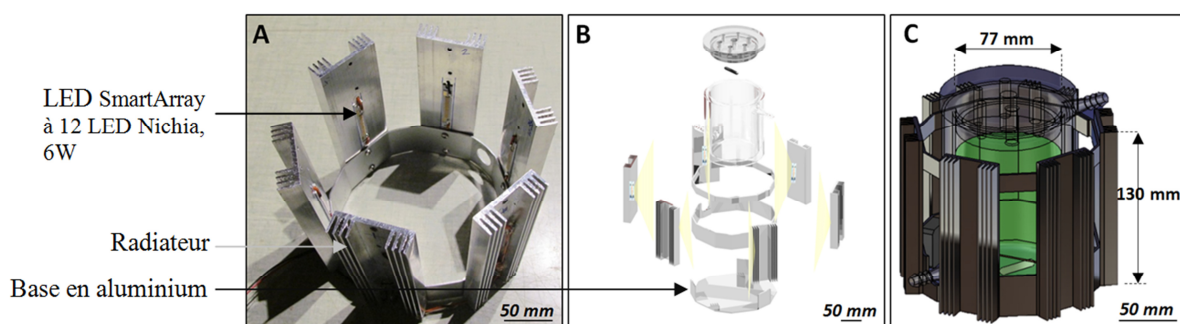


Figure II-5 : Dispositif lumineux sous forme de châssis circulaire. Des dissipateurs thermiques sont maintenus entre eux à l'aide de pièces d'inox 316L, résistant à la corrosion. Les LED sont fixées au centre de chaque radiateur. Les châssis lumineux sont collés sur une base en aluminium permettant le positionnement des agitateurs. Chaque photobioréacteur est ainsi éclairé, de manière homogène, à l'aide de six modules de LED. (A) Photographie du dispositif expérimental avant mise en place du photobioréacteur et (B, C) Représentations schématiques 3D (logiciel Catia).

Le PAR est mesuré dans les cultures, avec une précision de 5%, en immergeant la sonde d'un quantamètre 2π sphérique (Biospherical Instruments QSL-100) préalablement stérilisée, en cinq points de chaque photobioréacteur.

Le photobioréacteur plan

Le photobioréacteur plan est plus adapté à des mesures optiques et permet une modélisation fine du champ lumineux. Spécialement conçu pour que les photons traversent la culture de gauche à droite, similairement au dispositif décrit par Huisman (2002), ce réacteur entretient un gradient de lumière continu et monotone entre ses parois avant et arrière.

Le flux de photons est délivré par une rampe d'éclairage démontable composée de dix modules de LED de type 2, positionnés à l'arrière du photobioréacteur, sur le caisson (Fig. II-2). Les modules sont disposés verticalement et espacés de 1 cm afin d'éclairer l'intégralité de la façade du photobioréacteur de manière homogène (Fig. II-6). La rampe d'éclairage est dotée d'un système de refroidissement à air, équipé d'une coupure thermique en cas de défaillance. Ce système à haute puissance permet de générer des intensités lumineuses allant jusqu'à $4500 \mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$ à l'entrée du photobioréacteur (voir §2.4.2).

Le PAR incident est mesuré, avant inoculation, sur la face interne de la paroi avant du photobioréacteur à l'aide d'un capteur plan (SKYE SKP 215). Ce dernier, fixé sur la face arrière du photobioréacteur durant les expériences, assure également une acquisition continue du PAR en sortie du photobioréacteur.

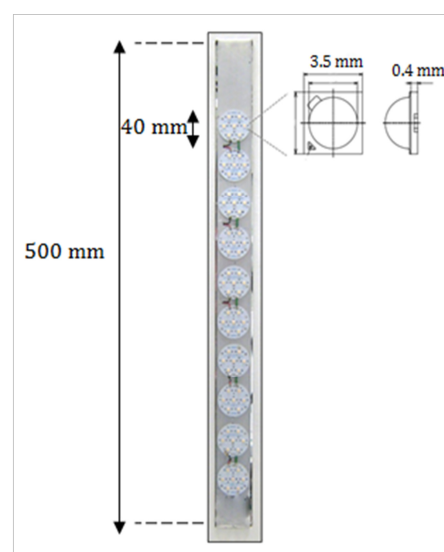


Figure II-6 : Photographie de la rampe d'éclairage, composée de 10 platines de LED blanches, utilisée avec les photobioréacteurs plans.

La taille de chaque LED est indiquée sur le schéma de droite (vue de face, vue de côté).

2.2.2 Modification du spectre de la lumière

La modularité de notre dispositif permet de modifier aisément le spectre des LED blanches par l'ajout de filtres colorés en polyester (Eurofilter) de transmittances (i.e. fractions du flux lumineux traversant les filtres) spécifiques. Chaque système pouvant être isolé, les filtres sont disposés entre les LED et le photobioréacteur, sans entraîner de perturbations sur les cultures

adjacentes. L'emploi de LED haute puissance (voir §2.4.2) permet d'utiliser des filtres de faible transmittance tout en conservant des valeurs de PAR identiques dans tous les réacteurs. Les spectres des différentes lumières sont mesurés à l'aide d'un radiospectromètre (OCEAN OPTICS USB4000-UV-VIS).

2.2.3 Dispositifs de pilotage des LED

Plusieurs dispositifs de pilotage des LED, progressivement améliorés durant nos recherches, et dont une première version a été réalisée dans le cadre de la thèse de P. Hartmann (2014), ont été utilisés afin de répondre aux questions scientifiques de cette étude. Tous les dispositifs comprennent une interface de communication contrôlant un driver (interface de puissance) permettant le pilotage des LED en courant continu (Fig. II-7).

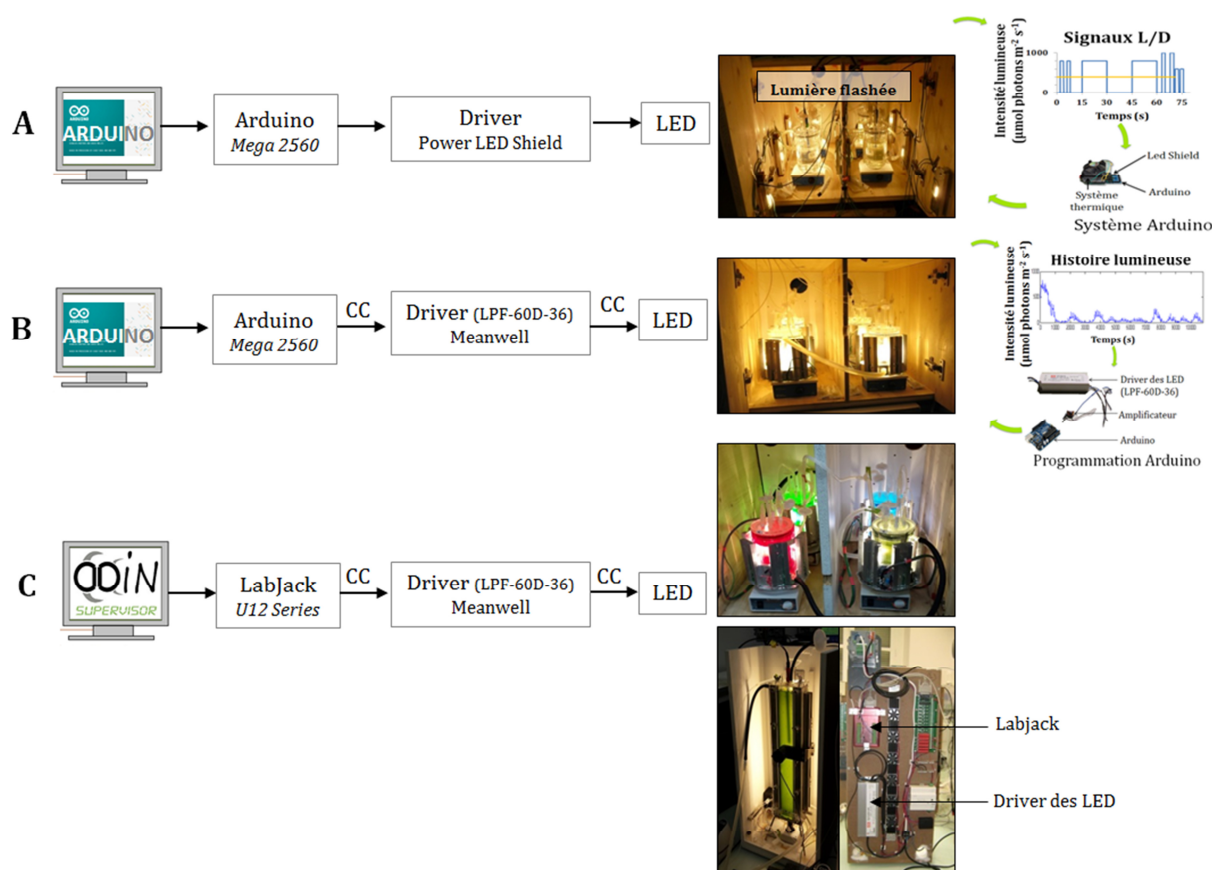


Figure II-7 : Représentation schématique des différents dispositifs de pilotage des systèmes d'éclairage à LED. (A) Les LED sont alimentées en courant continu (CC) par un driver (Power LED Shield) fixé à un système de refroidissement. Le driver est contrôlé par une plateforme open-source de prototypage électronique Arduino Mega 2560 (interface de communication) programmé par ordinateur (*via* port USB). Ce système permet de contrôler avec précision le flux de photons en intensité et en fréquence, **(B)** Utilisation d'un driver de LED (LPF-60D-36 MDW Meanwell) plus performant (puissance, stabilité) et résistant, **(C)** Développement d'un troisième dispositif permettant une maîtrise plus fine du signal lumineux. Utilisation d'une interface de communication

semi professionnelle LabJack U12 (contrôlée par le logiciel ODIN®) contrôlant les drivers (LPF-60D-36 Meanwell) en courant continu.

2.3. Conditions de culture

Aussi petite soit-elle, une microalgue n'en reste pas moins un organisme d'une grande complexité. L'étude de l'écophysiologie, forme émergente de la biologie intégrative, permet de comprendre l'influence de facteurs environnementaux, biotiques et abiotiques, sur le comportement et la physiologie des organismes.

L'écophysiologie expérimentale offre une approche réductionniste qui s'appuie sur l'étude d'un ou plusieurs facteurs bien définis et contrôlables afin d'en déterminer les effets avec précision. Cette stratégie implique que les autres facteurs soient maintenus constants afin de s'affranchir de leurs effets cumulés sur les organismes.

En écophysiologie des algues, les cultures utilisées sont de type fermé (batch) ou de type ouvert.

2.3.1 Les cultures en batch ou discontinues

La culture en batch, dite « fermée » ou « discontinue », est souvent privilégiée pour les études en écophysiologie en raison de sa facilité de mise en œuvre. Ce mode de culture consiste en un réacteur clos dans lequel les sels nutritifs, ajoutés uniquement lors de l'inoculation, sont progressivement épuisés tandis que les cellules s'accumulent dans le milieu, ainsi que les métabolites qu'elles produisent.

Une culture en batch est caractérisée par quatre phases, au cours desquelles les propriétés biochimiques, physiologiques et morphologiques des cellules changent (Fig. II-8). Après une **phase de latence** durant laquelle les cellules s'adaptent et ne se divisent généralement pas, on observe une **phase de croissance exponentielle** au cours de laquelle le temps de génération est, par définition, constant (l'augmentation du nombre de cellules par unité de temps est proportionnelle au nombre de cellules présentes). Cette période, où les conditions de croissance sont optimales, est la seule durant laquelle le taux de croissance maximal (pour les conditions en vigueur) peut être estimé. La phase exponentielle perdure jusqu'à ce qu'un facteur de l'environnement devienne limitant. Cela peut provenir soit de l'épuisement d'un élément nutritif, soit d'une baisse de l'intensité lumineuse par auto-ombrage, soit de l'effet négatif de métabolites toxiques excrétés dans le milieu. La croissance ralentit alors progressivement pour s'annuler, et la culture entre dans une **phase stationnaire**, durant laquelle la biomasse n'augmente plus. Finalement, la culture atteint une **phase de déclin**, où la mortalité l'emporte sur la croissance.

Ce mode de culture ne permet donc pas de maintenir durablement des conditions de croissance constantes et optimales.

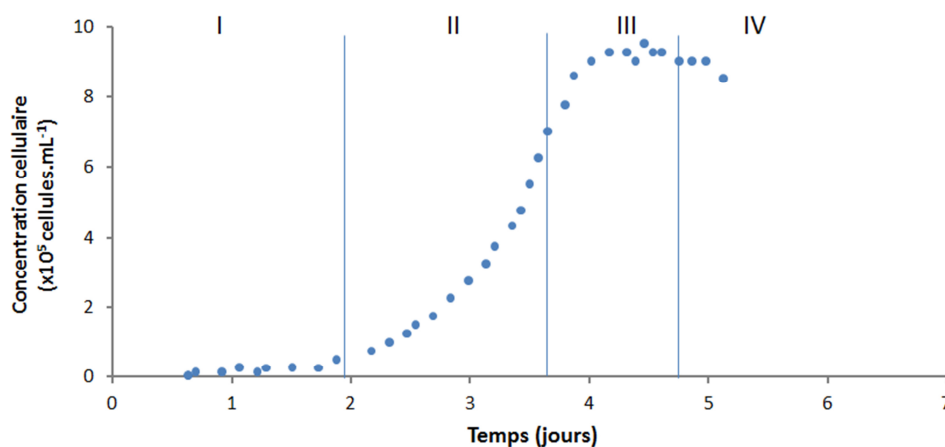


Figure II-8 : Exemple de l'évolution de l'abondance cellulaire d'une culture de *Dunaliella salina* en batch : phase de latence (I), phase de croissance exponentielle (II), phase de plateau ou stationnaire (III) et phase de déclin (IV).

2.3.2 Les cultures semi-continues et continues

Pour faire face aux limitations inhérentes au mode batch évoquées précédemment, des cultures « ouvertes » (semi-continues et continues), ont été développées, dans lesquelles les conditions de croissance sont optimisées par le renouvellement du milieu de culture. En théorie, ce dispositif permet de maintenir indéfiniment une population en phase de croissance exponentielle. Les cultures ouvertes constituent ainsi un outil privilégié pour l'étude des microalgues. Au cours de notre étude, les espèces ont été cultivées en fed-batch, en turbidostat et en « chémostat photolimité ».

Le fed-batch

Le mode fed-batch ou « semi-continu » consiste à renouveler par intermittence une partie de la culture afin de prolonger la phase de croissance exponentielle. Pratiquement, dans cette étude, une fraction de la culture a été remplacée tous les 8 jours par du milieu frais (voir chapitre IV). Plus facile à mettre en place que le mode continu, le fed-batch reste néanmoins moins performant et ne permet généralement pas d'atteindre un véritable état d'équilibre.

Dans le mode continu, le milieu frais est introduit continuellement dans le réacteur, dont le volume est maintenu constant par un système de trop-plein qui évacue une quantité égale de culture par unité de temps.

Deux modes de culture en continu ont été utilisés durant cette étude et sont détaillés dans les paragraphes suivants.

Le chémostat, un modèle d'écosystème contrôlé

Introduit en 1950 (Monod, 1950 ; Novick & Szilard, 1950) pour l'étude de la croissance bactérienne, le chémostat sera utilisé pour la première fois sur une algue unicellulaire en 1956 par Fujimoto et ses collaborateurs (effets de la lumière et du taux de dilution sur la croissance de *Chlorella ellipsoidea*). Depuis, ce système de culture a considérablement contribué à des études en écophysiologie et au développement de théories écologiques sur la croissance en substrat limité et la compétition (Monod, 1950 ; Droop, 1974 ; Smith & Waltman, 1995). Il a en outre permis d'éclaircir les relations trophiques entre espèces (Pengerud *et al.*, 1987 ; Rainey *et al.*, 2000) et d'étudier l'évolution de certains traits phénotypiques (Dykhuizen, 1990 ; Velicer & Lenski, 1999).

Le chémostat "traditionnel" est un réacteur alimenté à taux constant avec du milieu de culture contenant en excès tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance sauf un, le facteur limitant (Fig. II-9). Le taux de croissance est déterminé par le taux d'apport de cet élément, alors que la biomasse atteinte à l'équilibre est proportionnelle à la concentration de cet élément dans le milieu d'enrichissement. La culture en chémostat permet alors d'étudier l'influence de ce seul élément sur la croissance. Le chémostat est ainsi un système de culture contrôlé grâce auquel il est possible de quantifier précisément les relations entre un élément et un organisme. Sa dynamique riche en fait également un très bon outil pour étudier des phénomènes transitoires liés à la croissance.

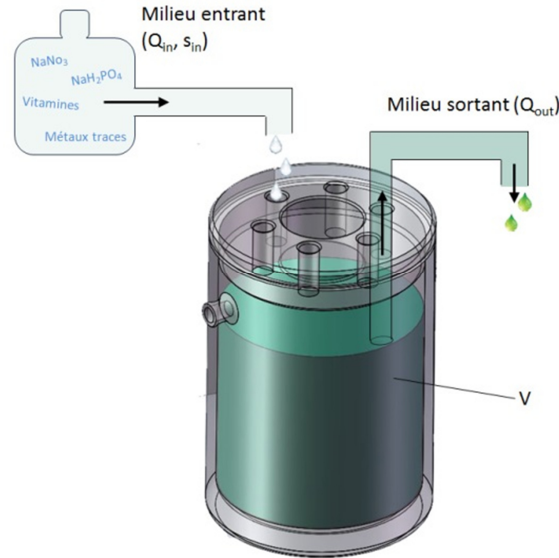


Figure II-9 : Représentation schématique d'une culture en chémostat. Le milieu frais d'enrichissement contient un élément nutritif dont la concentration S_{in} est limitante par rapport celle des autres nutriments. Il est introduit en continu dans la culture grâce à une pompe, à un taux D (jour^{-1}), appelé taux de dilution. Les débits entrant Q_{in} et sortant Q_{out} (L.jour^{-1}) sont en moyenne égaux pour que le volume du chémostat V (L) reste constant. On définit $D = Q_{in} / V$. A noter que si $D = 0$ ($Q_{in} = Q_{out} = 0$), ce dispositif correspond au mode batch.

Les différentes variables en interaction dans le chémostat peuvent être représentées par un système d'équations différentielles.

Monod a développé, pour les bactéries, un modèle pionnier où le taux de croissance μ (jour^{-1}) dépend de la concentration en élément nutritif limitant résiduel dans la culture S (g.L^{-1}). Si l'on fait l'hypothèse qu'il n'y a pas d'excrétion de la ressource nutritive limitante par les microalgues, les dynamiques de la biomasse X (cellules.L^{-1}) et de l'élément nutritif limitant S , s'écrivent :

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = \mu X - DX \\ \frac{dS}{dt} = -\mu X + D(S_{in} - S) \end{cases} \quad \text{soit, à l'équilibre } \frac{dX}{dt} = \frac{dS}{dt} = 0 : \quad \begin{cases} \mu = D \\ X = S_{in} - S \end{cases}$$

Avec D (jour^{-1}), le taux de dilution, et S_{in} (g.L^{-1}), la concentration en élément limitant dans le milieu frais¹⁵.

¹⁵ Dans ce modèle simple, l'unité de masse est identique pour la biomasse algale et l'élément nutritif, et se définit en fonction de ce dernier. Par exemple, s'il s'agit de nitrate NO_3 , l'unité de masse sera des g N.L^{-1} .

Le « chémostat photolimité »

Les expériences présentées dans le chapitre VI ayant été menées pour étudier le seul effet de la lumière (Huisman, 2002), les cultures ont été alimentées avec un milieu nutritif dépourvu d'élément limitant afin que seul le flux de photons auto-ombré puisse constituer le facteur limitant. Un taux de dilution fixe est imposé grâce à un débit maintenu constant de la pompe d'injection. Les flux entrant et sortant des cultures sont respectivement assurés par une pompe doseuse (Simdos 02) et une pompe péristaltique de précision (Gilson). Le débit, qui détermine seul le taux de dilution, est contrôlé régulièrement par pesée du milieu entrant, dérivé de l'entrée du chémostat pendant un temps précis (Fig. II-10).

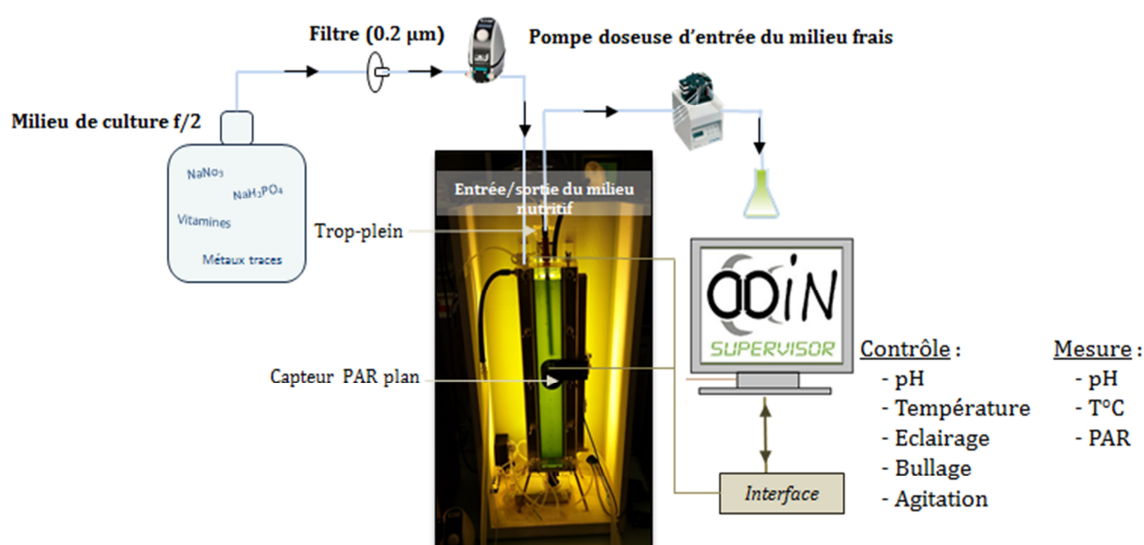


Figure II-10 : Schéma synoptique et photographie du système de culture en continu au sein d'un photobioréacteur plan. Les nutriments arrivent dans le réacteur au goutte à goutte par un capillaire situé sur le couvercle (input). Cet apport est rapidement homogénéisé dans la culture grâce à l'agitation. Le volume est maintenu constant à 1,9 L par un système de trop-plein constitué par deux fines canules (capillaires) traversant le couvercle, par lesquelles est évacué le milieu de culture excédentaire (output).

Fonctionnement continu en turbidostat

Le turbidostat est un mode de culture continue où la concentration cellulaire, estimée d'après la turbidité de la culture, est maintenue à un niveau choisi en diluant la culture avec du milieu frais à un taux égal à son taux de croissance. Contrairement au mode précédent, le niveau de biomasse choisi est fixé pour que les cellules ne soient pas limitées par la lumière. N'étant

limitées ni par un élément nutritif, ni par la lumière, les microalgues croissent à un taux qui répond uniquement au régime lumineux appliqué.

Pratiquement, ce mode de culture a été opéré de deux manières : soit manuellement, en corrigeant quotidiennement le taux de dilution afin de maintenir la biomasse constante (*stricto sensu*, ce mode de culture constitue un turbidostat semi-continu (voir chapitre III)), soit en utilisant un automate. Un capteur de turbidité, développé spécifiquement pour cette étude, a été fixé sur l'embase du châssis des photobioréacteurs. Ce système utilise un émetteur (laser infrarouge 850 nm) et un récepteur (capteur photodiode) dans une longueur d'onde spécifique, non perturbée par des bactéries ou des pigments par exemple. La photodiode, située en face du laser, reçoit plus ou moins de signal en fonction de la turbidité du milieu. Le laser offre un faisceau linéaire non diffracté pour obtenir une linéarité du signal constant (Fig. II-11).

Lorsque la turbidité dépasse une valeur de consigne, la culture est diluée par ajout de milieu frais pour que la turbidité décroisse : le taux de dilution est ainsi ajusté (voir §2.4.1). Le milieu frais filtré (cartouche Sartorius 0,2 μm) est apporté dans le photobioréacteur par une pompe doseuse (Simdos 02). Le flux sortant est assuré par une pompe péristaltique de précision (Gilson minipuls 3) fonctionnant en continu (Fig. II-12). Le débit des pompes est contrôlé quotidiennement par pesée du milieu entrant.

Dans nos expériences, les concentrations cellulaires à l'équilibre étaient maintenues suffisamment basses (entre $2 \cdot 10^5$ cellules. mL^{-1} et $3 \cdot 10^5$ cellules. mL^{-1}) pour éviter les phénomènes d'auto-ombrage et assurer une lumière homogène durant toute la durée des expériences (voir chapitres III et V).

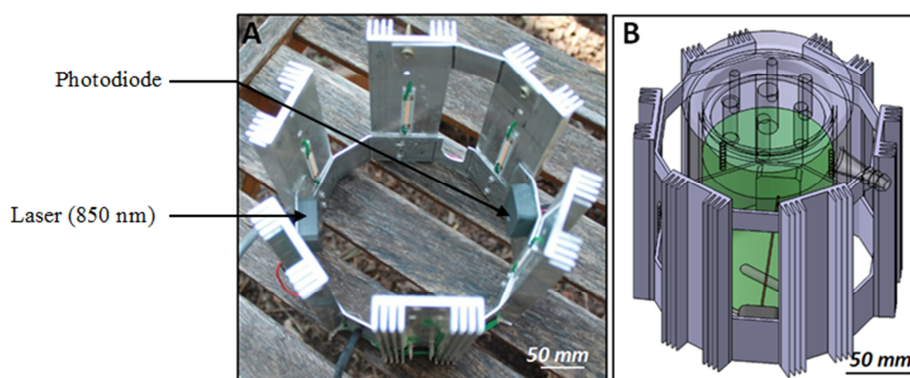


Figure II-11 : (A) Photographie du dispositif et (B) schéma du système de lumière en châssis doté du capteur de turbidité (laser + photodiode).

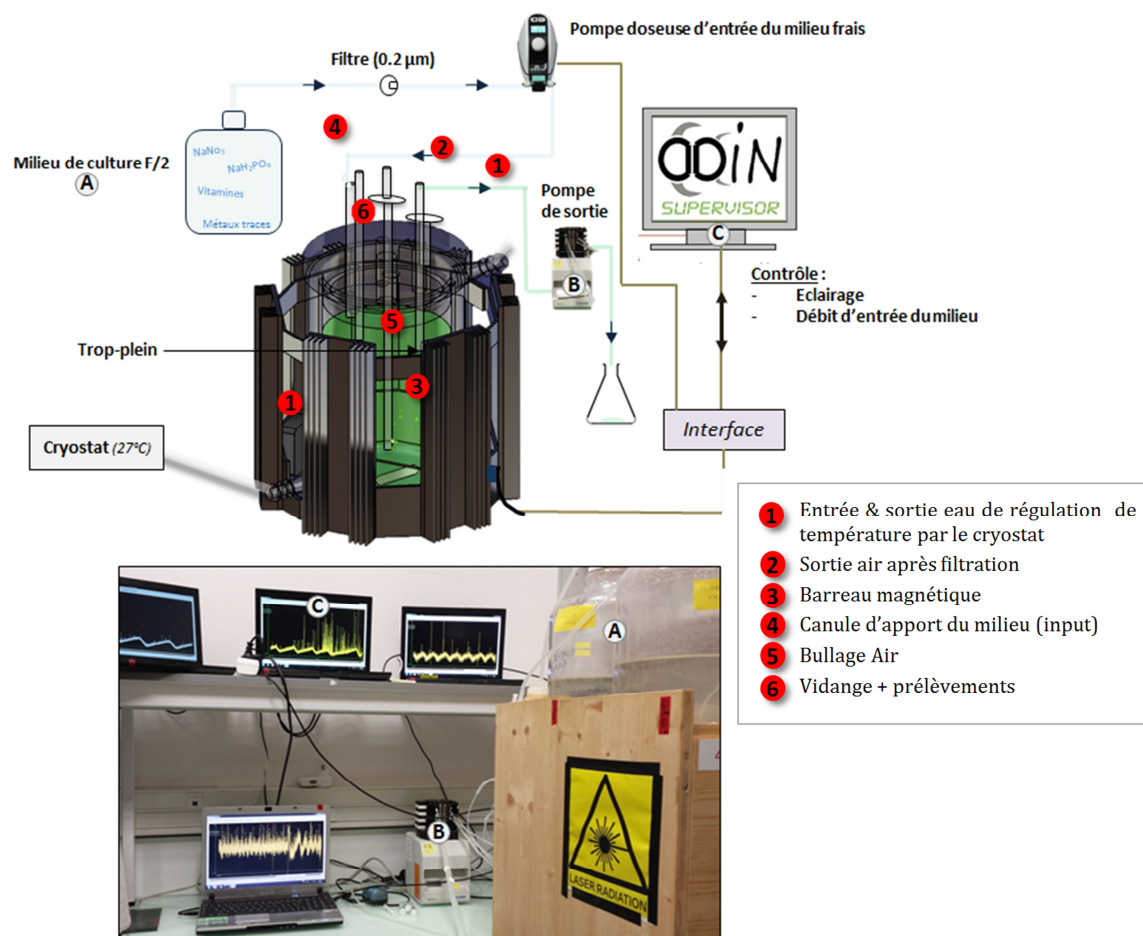


Figure II-12 : Schéma synoptique et photographie du système de culture en turbidostat. Les lettres A, B et C désignent respectivement le milieu frais, la pompe de sortie du milieu et la fenêtre du logiciel ODIN[®] avec contrôle de la turbidité.

2.4 Pilotage automatique des cultures et calibrations

2.4.1 Pilotage automatique des cultures par le logiciel ODIN®

Le pilotage des conditions de culture ainsi que l'enregistrement des données présentées dans les chapitres V et VI de ce travail sont réalisés par la plateforme logicielle ODIN®, développée à l'Institut National de Recherche en Informatique et en Automatique (INRIA-BIOCORE). Cette plateforme centralise les mesures des capteurs (ainsi que les mesures hors ligne) et supervise le fonctionnement des photobioréacteurs grâce à des algorithmes de contrôle dédiés. D'un point de vue plus technique, ODIN® est composé de divers modules, développés en C++, interagissant par le biais du protocole CORBA. Un interpréteur prend en charge la partie calcul scientifique.

ODIN® enregistre à haute fréquence (0,2 Hz) les mesures des capteurs du photobioréacteur plan (pH, température, intensité lumineuse) et du photobioréacteur cylindrique (intensité lumineuse, turbidité), que l'on peut visualiser en temps réel *via* une interface utilisateur. En fonction des valeurs acquises et des consignes paramétrées à l'avance, il décide de l'action à mener et déclenche à bon escient les actionneurs (e.g. bullage de CO₂, mise en route de la pompe de dilution) (Fig. II-13).

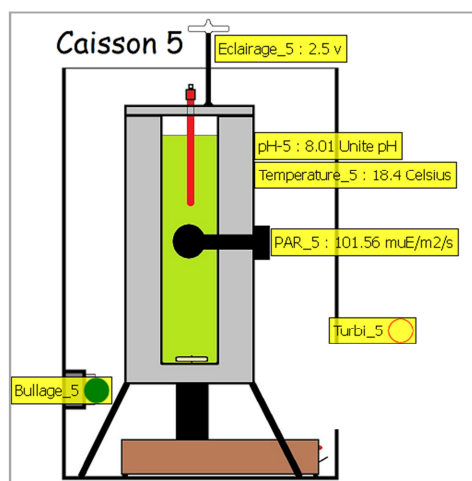


Figure II-13 : Capture d'écran du logiciel ODIN® pour le contrôle des séquences de pilotage du photobioréacteur plan.

Contrôle de la turbidité dans les photobioréacteurs cylindriques

Les données mesurées par le capteur de turbidité sont retransmises à ODIN® en pourcentage de saturation du capteur photodiode. Le système de la photodiode fonctionne sur une atténuation du signal. Ainsi, plus la culture est concentrée moins la photodiode reçoit de photons¹⁶. Pour faciliter la lecture, nous avons considéré que la saturation du capteur augmentait avec la densité cellulaire. Le pourcentage de saturation du capteur a été calibré entre 0 % (mesure obtenue avec du milieu de culture sans microalgues) et 100 % (mesure obtenue avec un obturateur du capteur). Le développement d'un algorithme sur la plateforme ODIN® a ainsi permis un contrôle fin de la pompe d'entrée de milieu et donc de la turbidité. L'analyse du signal reçu en continu permet d'actionner, quand nécessaire, la pompe d'apport du milieu nutritif et de diluer la culture afin de maintenir la biomasse à la valeur de consigne. *A contrario*, l'algorithme arrête la pompe lorsque la turbidité passe en dessous de cette valeur de consigne. Le voltage envoyé par ODIN® à la pompe est également enregistré.

Enregistrement des données sur les photobioréacteurs plans

Le logiciel ODIN enregistre le PAR mesuré en face arrière du photobioréacteur. Le pH et la température des cultures sont également enregistrés en continu. Ces deux paramètres, théoriquement constants, ne sont généralement pas analysés. Néanmoins, lorsqu'un problème survient sur les cultures, il est possible d'en consulter les enregistrements et de déterminer si ces paramètres en sont à l'origine.

2.4.2 Phases de calibration

Le capteur de turbidité et les dispositifs d'éclairage ont été calibrés avant chaque expérience.

Calibration de la turbidité

Chaque capteur de turbidité a été préalablement calibré afin d'établir la relation entre le pourcentage de saturation du capteur photodiode mesuré par ODIN® (turbidité) et la concentration cellulaire au sein du photobioréacteur (Fig. II-14). Cette relation a servi à définir la valeur de consigne fournie au logiciel de chaque turbidostat afin de maintenir la biomasse

¹⁶ Le capteur est dit « saturé » par la lumière. Ainsi, la saturation diminue lorsque la densité cellulaire augmente (eq. diminution du flux de photons reçu)

souhaitée et a permis de suivre, en temps réel, l'évolution des populations de microalgues. Ces courbes de calibration se sont révélées robustes au fil des expérimentations.

Le débit des pompes a également été calibré en fonction du voltage envoyé, ce qui nous a permis d'enregistrer en continu le taux de dilution appliqué. Ces données sont très importantes car elles permettent de déterminer le taux de croissance des microalgues.

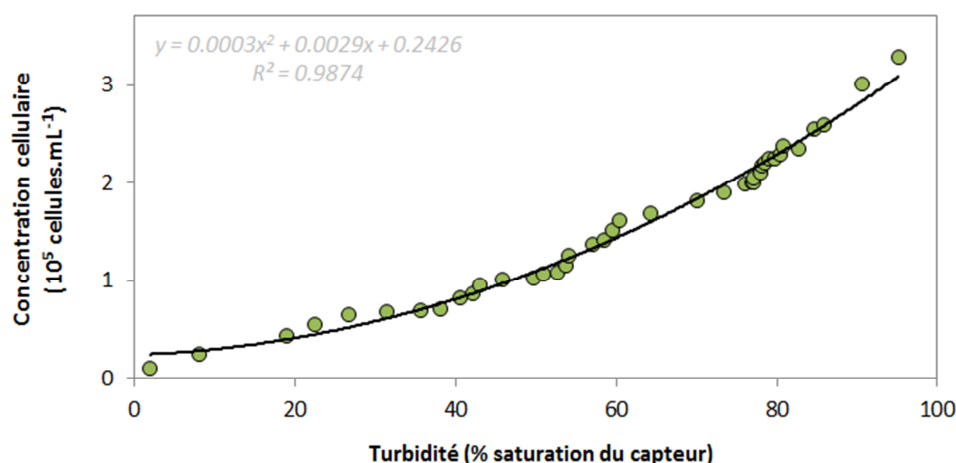


Figure II-14 : Exemple de courbe de calibration d'un capteur de turbidité permettant d'établir la relation entre le pourcentage de saturation du capteur photodiode (turbidité) mesuré par ODIN® et la concentration cellulaire mesurée par comptage (voir §3.1).

Calibration de la lumière

Dans le photobioréacteur cylindrique

Les sources lumineuses ont été calibrées en mesurant le PAR à l'aide d'un quantamètre 2π sphérique (Biospherical Instruments QSL-100, précision de 5 %) immergé au centre de chaque photobioréacteur contenant de la culture. La courbe de calibration obtenue permet de déterminer le voltage à appliquer pour obtenir l'intensité désirée (Fig. II-15). La consigne a été vérifiée et ajustée avant chaque expérience par mesure directe du PAR dans la culture.

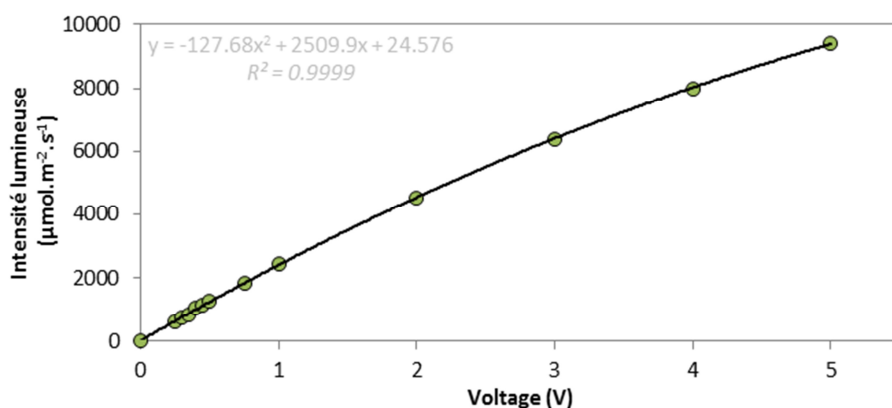


Figure II-15 : Exemple de courbe de calibration d'un dispositif de lumière en châssis. Le système à haute puissance permet d'atteindre de très hautes intensités lumineuses (jusqu'à 9400 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) au sein du photobioréacteur cylindrique.

Dans le photobioréacteur plan

Avant chaque expérience, des mesures de PAR ont été effectuées à l'aide d'un capteur plan placé sur la face interne de la paroi avant des photobioréacteurs. Pour chaque valeur de voltage envoyée aux LED, l'intensité lumineuse a été mesurée en 18 points répartis sur toute la hauteur d'eau. Une courbe de calibration permet de connaître l'intensité lumineuse incidente moyenne (moyenne des 18 mesures) dans la culture en fonction du voltage envoyé (Fig. II-16).

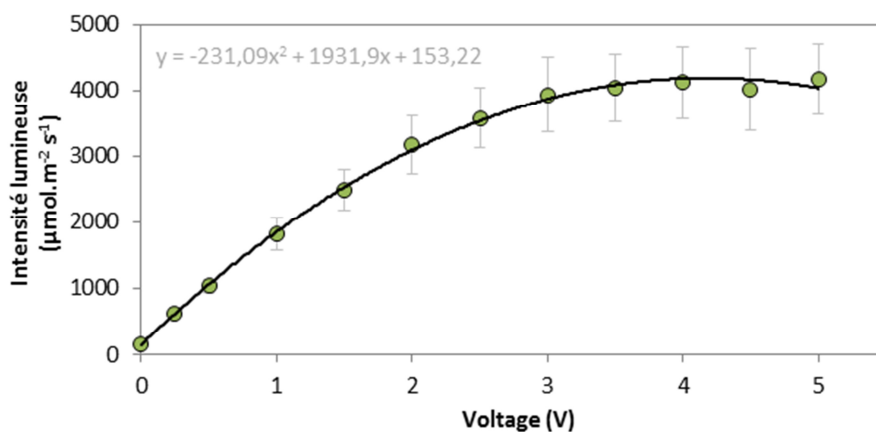


Figure II-16 : Courbe de calibration d'une rampe de LED blanches permettant d'établir une relation entre le voltage envoyé aux LED et l'intensité lumineuse moyenne incidente I reçue par les cellules ($\pm$ SD, $n=18$). Le système à haute puissance permet d'atteindre jusqu'à 4500 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à l'entrée du photobioréacteur plan.

3. Méthodes d'analyse et de mesure

3.1 Suivis de croissance en taille et en nombre

L'abondance et la taille des cellules ont été mesurées quotidiennement à l'aide de deux appareils distincts.

Les microalgues sont comptées à l'aide du compteur de particules **Coulter Counter** (Beckman Counter Multisizer 3). Cet appareil permet d'obtenir le spectre de taille de particules mesurant de 0,4 à 1200 μm . Son principe repose sur le changement d'impédance électrique provoqué par les cellules placées dans un champ électrique. La résistance est mesurée entre deux électrodes situées de part et d'autre d'un orifice calibré (sonde de 50 μm) à travers lequel les particules sont aspirées. Le passage d'une particule à travers l'orifice génère un signal proportionnel à son volume et indépendant de sa forme et de son orientation. Le diamètre fourni par l'appareil est donc celui d'une sphère de volume équivalent à celui de la particule. Trois aliquotes de 50 μL du même échantillon sont comptées pour vérifier la qualité du comptage. Le coefficient de variation des mesures est de l'ordre de 3 %. L'appareil a été calibré avec de billes de latex certifiées de $6,992 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (1 % CV, Duke Scientific, Palo Alto, CA, USA).

Les cellules sont également dénombrées et mesurées avec le compteur optique **HIAC/ROYCO** 9700 Pacific Scientific Instruments (High Accuracy Products Southern California). Son principe repose sur l'atténuation d'un faisceau laser (HRLD-400) partiellement occulté par une particule le traversant perpendiculairement. L'amplitude du signal étant proportionnelle à la surface projetée de la particule, l'appareil fournit la mesure du diamètre d'un disque de surface équivalente à la surface de la particule. Le signal de taille est plus variable que celui acquis avec le Coulter car la surface projetée de la particule dépend de son orientation dans le faisceau (Fig.II-17). Afin d'éviter les problèmes de coïncidence et de saturation du capteur optique ($< 1.10^4 \text{ cellules.mL}^{-1}$), une dilution préalable de l'échantillon est nécessaire avant chaque mesure. Les mesures comprennent trois blancs effectués à l'eau de mer filtrée (0,2 μm) utilisée pour la dilution et des triplicats pour chaque échantillon. La variabilité entre triplicats est généralement inférieure à 5 %.

Les distributions de taille obtenues par ces deux compteurs permettent de calculer le diamètre cellulaire moyen de la population (μm), ainsi que la concentration de son biovolume ($\mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}$).

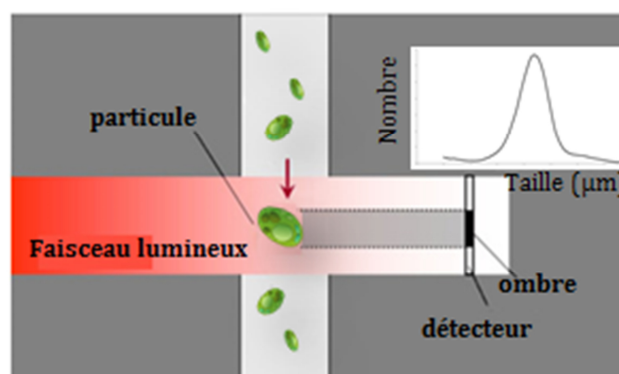


Figure II-17 : Schéma de principe du compteur de particules HIAC/ROYCO. La surface de l'ombre projetée des particules traversant le faisceau est mesurée, ce qui permet d'estimer leur diamètre équivalent sphérique.

Le taux de croissance μ (jour^{-1}) est calculé, toutes les 24 heures, à partir des densités cellulaires mesurées aux temps t_1 et t_2 , selon la relation suivante :

$$\mu = \frac{\ln(X_{t_2}) - \ln(X_{t_1})}{t_2 - t_1} + D \quad (\text{II-1})$$

avec X_t , les densités cellulaires (cellules.mL^{-1}) aux temps t_1 et t_2 , et D , le taux de dilution (jour^{-1}).

3.2 Analyses pigmentaires

3.2.1 Spectrophotométrie : mesure par extraction des pigments

Des duplicats ou triplicats de 2 à 6 mL de culture (suivant la concentration cellulaire) sont prélevés puis filtrés sur filtres GF/C (Whatman) et transférés au sein de microtubes immédiatement plongés dans de l'azote liquide avant d'être conservés à -80°C jusqu'à l'extraction et l'analyse par spectrophotométrie. Le jour de l'analyse, les filtres sont placés dans des tubes en verre de 10 mL enveloppés de papier d'aluminium, afin de les protéger de la lumière et d'éviter ainsi le phénomène de photo-blanchiment (Lichtenthaler, 1987).

Un second protocole, présenté au chapitre III, a également été utilisé. Contrairement à celui-ci, l'analyse est réalisée sur une suspension cellulaire non filtrée.

Extraction de la chlorophylle et des caroténoïdes totaux

Les pigments sont extraits à l'aide de 2 à 6 mL (en fonction du nombre de cellules, afin de rester dans la gamme de détection du spectrophotomètre) d'acétone à 90 % durant 1 heure à 4°C. Les tubes sont ensuite centrifugés à 2000 tours/min durant 5 minutes, avant mesure de l'absorption du surnageant.

Analyse spectrophotométrique

Les mesures d'absorbance des pigments extraits sont réalisées en duplicats ou triplicats à l'aide d'un spectrophotomètre (Perkin Elmer, US/VIS, Lambda 2). Le surnageant est versé dans une cuvette en quartz d'1 centimètre de chemin optique. Les mesures sont acquises à quatre longueurs d'ondes (470 nm, 644,8 nm, 661,6 nm et 750 nm) correspondant respectivement, pour les trois premières, aux *maxima* des spectres d'absorption des caroténoïdes, de la chlorophylle *b* et de la chlorophylle *a*. La valeur d'absorbance obtenue à 750 nm, normalement très proche de 0, permet de contrôler l'efficacité de la centrifugation ; l'absorbance à cette longueur d'onde étant uniquement due à la présence de particules et non aux pigments. Avant de réaliser les mesures, un blanc est effectué à l'acétone à 90 %, qui permet de régler le zéro de l'appareil. La variabilité des triplicats est inférieure à 7 %.

Les concentrations en chlorophylle *a* (C_a), chlorophylle *b* (C_b) et en caroténoïdes totaux (C_{x+c}) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), sont calculées à partir des équations développées par Lichtenthaler (1987) :

$$[C_a] = 11,24A_{661,6} - 2,04A_{644,8}$$

$$[C_b] = 20,13A_{644,8} - 4,19A_{661,6}$$

$$[C_{x+c}] = 1000A_{470} - 1,90C_a - 63,14C_b / 214$$

Les concentrations sont ensuite normalisées par la densité cellulaire.

3.2.2 Absorption *in vivo* par spectrophotométrie

Les spectres d'absorption des microalgues sont acquis entre 380 et 750 nm, avec un incrément du pas d'acquisition de 1 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible (Varian DMS1005 UV Visible; Intelligent Instrumentation) à double faisceau, équipé d'une sphère d'intégration. Les mesures sont réalisées sur des échantillons de culture *in vivo*, à une concentration finale de 2.10^5 cellules.mL⁻¹ (*Dunaliella salina*) ou 5.10^5 cellules.mL⁻¹ (T-Iso 2X), dans une cuvette en quartz d'1 centimètre de chemin optique. Un spectre final est obtenu en

soustrayant à la moyenne de trois spectres cultures, celle de trois blancs (filtrat de la culture). Le coefficient de variation moyen d'un triplicat est typiquement de 3,5 %.

L'utilisation d'une sphère d'intégration, dont la surface interne est recouverte de sulfate de baryum, permet théoriquement de récupérer la lumière diffusée par l'échantillon (Bricaud *et al.*, 1983), de sorte que l'atténuation mesurée ne soit due qu'à de l'absorption. Néanmoins, une atténuation non négligeable est observée à 750 nm (à cette longueur d'onde, il n'y a pas d'absorption par les pigments). Ce signal peut être attribué à des photons diffusés hors de l'angle du collecteur de la sphère. Afin de corriger la diffusion résiduelle, l'absorbance à 750 nm a été systématiquement retranchée de la mesure spectrale (Stramski & Reynolds, 1993).

3.3 Dosage du carbone et de l'azote particuliers

Les quotas cellulaires en carbone et en azote particuliers (pmol.cell^{-1}) ont été déterminés à partir de duplicats de 2 à 6,8 mL de culture (suivant la concentration cellulaire). Les aliquotes de culture sont filtrées sur des filtres en fibre de verre GF/F (Whatman), préalablement calcinés à 450°C durant 4 heures, afin d'éliminer toute trace de matière organique. Les échantillons filtrés, placés dans des tubes en verre également pré-calcinés, sont conservés dans une étuve à 60°C jusqu'à leur analyse, réalisée à l'aide d'un analyseur élémentaire CHN (2400 Series II CHNS/O – Perkin Elmer) selon le principe d'oxydoréduction. Des blancs machine sont effectués par mesure de filtres GF/F vierges calcinés, qui sont soustraits aux valeurs de carbone et d'azote mesurées dans les échantillons. Les erreurs relatives pour les mesures de carbone et d'azote sont respectivement inférieures à 3 et 5 %.

3.4 Quantification des lipides neutres par la méthode Nile Red

L'analyse conventionnelle des lipides phytoplanctoniques nécessite de grands volumes de culture et demeure longue et fastidieuse. Elle requiert une séparation de la biomasse algale de la phase aqueuse, une extraction de la phase lipidique ainsi qu'une quantification des classes de lipides. Cette technique d'analyse, utilisée à une reprise au cours de cette étude, est décrite dans le chapitre III (§III-2.8).

Une autre méthode fréquemment utilisée pour l'estimation des lipides est le marquage au Nile Red (ou Rouge du Nil). Cette méthode repose sur la propriété du Nile Red à fluorescer en présence de lipides. Le Nile Red¹⁷ (*9-diethylamino-5Hbenzo[a]phenoxazine-5-one*) (Fig. II-18) est un

¹⁷ Le Nile Red est produit à partir de Nile Blue porté à ébullition et mélangé à de l'acide sulfurique

fluorochrome lipophile couramment utilisé pour l'étude des structures lipidiques, qui fluoresce dans un environnement hydrophobe et peu dans l'eau (Greenspan *et al.*, 1985). Bonne sonde hydrophobe, cette molécule s'insère bien dans les structures lipidiques de la cellule (e.g. gouttelettes lipidiques, membranes).

Le Nile Red présente une grande sensibilité à la polarité de son environnement (Deye *et al.*, 1990 ; Elsey *et al.*, 2007) : il émet dans le rouge quand il s'insère dans des membranes phospholipidiques polaires et dans le jaune/orange quand il est en contact avec des triglycérides neutres ou triacylglycérides (TAG) (son rendement quantique augmente lorsque la polarité diminue et le spectre d'émission est déplacé vers le bleu). Pour estimer les TAG dans les cultures marquées, la fluorescence d'un échantillon excité à 530 nm est mesurée à 580 nm. Cette fluorescence est proportionnelle à la quantité de TAG dans l'échantillon (Rumin *et al.*, 2015).

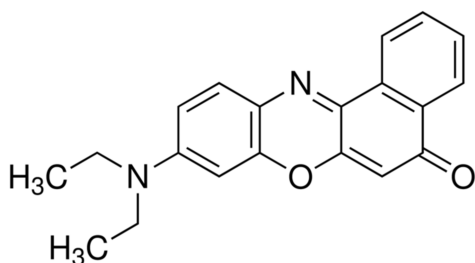


Figure II-18 : Structure de la molécule de Nile Red

Avant chaque mesure, réalisée en triplicats, les aliquotes de culture sont diluées avec de l'eau de mer filtrée (0,2 μm) afin d'obtenir une concentration finale d'environ 7.10^4 cellules. mL^{-1} . 1 μL de solution de Nile Red - à 250 ng.mL^{-1} dans l'éthanol - prélevé à l'aide d'une seringue Hamilton, est ajouté par mL de culture diluée. Après un temps d'imprégnation de 10 min (Lacour, 2010), la fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Varian, Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer).

3.5 Quantification des nitrates

Afin de s'assurer du caractère non limitant des nitrates résiduels dans les cultures, les nitrates (NO_3^{2-}) et les nitrites (NO_2^-) sont mesurés par dosage colorimétrique à l'aide d'un auto-analyseur à flux continu (Technicon® AutoAnalyzer II) couplé à un système d'acquisition automatique des données (Malara & Sciandra, 1991).

Dans ce système, les ions nitrates sont réduits en ions nitrites (d'une manière stœchiométrique) par passage dans une colonne réductrice cadmium-cuivre. Les ions nitrites réagissent avec le sulfanilamide en milieu acide, puis avec le N-(1-naphthyl)éthylènediamine pour donner un

complexe de couleur rouge, dosé colorimétriquement par son absorbance entre 520 et 540 nm. Le dispositif comprend deux voies. Chaque échantillon est ainsi partagé en deux, l'un seulement passant par la colonne de réduction. La double mesure des nitrites (voie sans colonne) et de la somme des nitrites et nitrates réduits en nitrites (voie avec colonne de réduction) permet, par différence, de quantifier les nitrates ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Chapitre III

Analyse expérimentale de la réponse de *Dunaliella salina* à des signaux lumineux haute fréquence

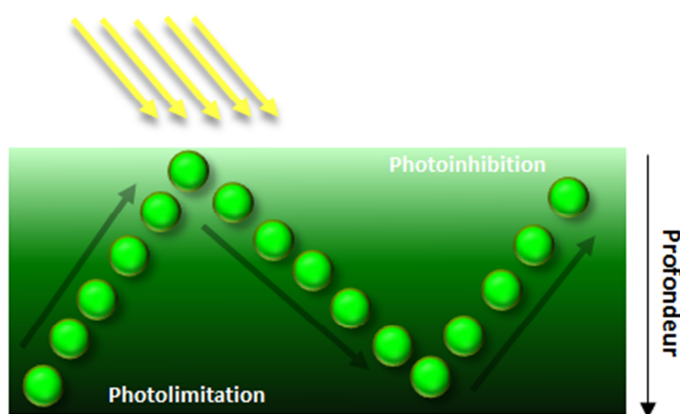
“La clarté, c'est une juste répartition d'ombres et de lumière.”

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

C. COMBE, P. HARTMANN, S. RABOUILLE, A. TALEC, O. BERNARD et
A. SCIANDRA

Publié dans **Biotechnology and Bioengineering**¹⁸

“Long-term adaptive response to high-frequency light signals in the unicellular photosynthetic eukaryote *Dunaliella salina*”



Représentation schématique de la trajectoire d'une cellule microalgale au sein d'un raceway.

¹⁸ Biotechnology and Bioengineering (2015)

DOI: 10.1002/bit.25526; Impact Factor (2014): 4.126; Received 2 June, 2014; Revised 24 November, 2014; Accepted 17 December, 2014.

Présentation du chapitre

L'étude décrite dans ce chapitre a été publiée dans le journal *Biotechnology and Bioengineering* [Combe *et al.* 2015] et présentée au *ASLO Aquatic Sciences Meeting* en février 2015. La méthodologie ayant déjà été présentée dans le chapitre II et le contexte général préalablement introduit dans le premier chapitre, des fragments de la publication originale ont été modifiés ou retirés afin d'éviter les redondances.

Les interactions entre hydrodynamique et biologie jouent un rôle essentiel au sein des cultures de microalgues industrielles car elles influencent de nombreux phénomènes intervenant dans la fixation de carbone et le stockage cellulaire de ses formes énergétiques. Mais malgré leur importance, les effets qui en résultent sont encore mal élucidés.

La productivité des microalgues est étroitement liée à l'activité photosynthétique et, de ce fait, à la lumière disponible au sein de la culture. L'hydrodynamique, qui détermine la trajectoire des organismes dans la colonne d'eau, conditionne la lumière qu'ils reçoivent individuellement. Dans les systèmes de culture à grande échelle (raceways), agités à l'aide de roues à aubes, les cellules sont soumises à une alternance rapide de lumière et d'obscurité (« Light:Dark cycles » ou L:D cycles) selon un régime qui dépend de l'intensité de l'agitation. Pour améliorer la production d'énergie du procédé dans sa globalité, il est nécessaire d'optimiser celle qui est produite par les microalgues (lipides) tout en minimisant celle qui est investie dans l'agitation des cultures. Plus précisément, le rapport entre la productivité et les coûts énergétiques liés à l'agitation doit être maximal pour une intensité lumineuse donnée. La compréhension de l'impact de la vitesse de mélange sur le régime lumineux et sur la capacité des microalgues à s'y adapter est donc une étape essentielle pour prédire et améliorer la productivité des cultures.

Dans cette étude, nous avons mis au point un dispositif d'éclairage novateur à base de diodes électroluminescentes (LED) qui permet d'appliquer à des cultures de laboratoire les régimes d'éclairement typiquement perçus par des microalgues brassées au sein d'un raceway. Afin de déterminer l'effet de ces fluctuations sur la croissance et les mécanismes d'acclimatation de *Dunaliella salina* (Chlorophyceae), des cultures de cette espèce ont été exposées à des régimes lumineux différant en fréquences, mais générant la même dose moyenne de photons. L'effet d'un éclairage intermittent, caractérisé par des flashes lumineux de différentes durées

(0,1 à 30 s) et des périodes d'obscurité de durées variables ($0,67 \leq L:D \leq 2$), correspondant à des fréquences comprises entre 0,017 et 5 Hz, a été comparé à celui d'un éclairage continu. Le taux de croissance, le contenu pigmentaire, la productivité en lipides et la composition élémentaire ont été déterminés pour chaque régime lumineux. Les expériences ont été conduites en mode turbidostat, à faible concentration cellulaire, pour maintenir des conditions de croissance stables et s'affranchir des effets d'auto-ombrage afin de caractériser le seul impact du régime lumineux.

Cette étude a permis de mettre en évidence que l'efficacité photosynthétique et le taux de croissance de *D. Salina* augmentent avec la fréquence du signal lumineux, et ceci sans modification significative des teneurs en chlorophylle et en carbone. Ainsi, dans la gamme de fréquences testées, les cellules s'acclimatent à l'intensité lumineuse moyenne, indépendamment des fluctuations. Ce point fort de l'étude supporte l'hypothèse que les processus d'acclimation seraient trop lents à se mettre en place pour pouvoir répondre au signal lumineux quand celui-ci varie rapidement. En outre, le contenu en lipides totaux semble positivement corrélé au taux de croissance de cette espèce.

Sommaire

1. Introduction	105
2. Materials and Methods	108
2.1 Algae, growth medium and pre-cultivation conditions	108
2.2 Experimental design	108
2.3 Culture conditions	109
2.4 PAM measurements.....	111
2.5 Cell size and abundance	112
2.6 Pigment extraction and analysis	112
2.7 Elemental stoichiometry	112
2.8 Lipid analysis.....	112
3. Results	114
3.1 Specific growth rate of <i>Dunaliella salina</i> as a function of flash modulation frequency	114
3.2 Chlorophyll content	115
3.3 Carbon and nitrogen stoichiometry	117
3.4 Total lipid content.....	118
4. Discussion	119
4.1 Effect of light flashes frequency on cellular growth of <i>Dunaliella salina</i>	119
4.2 Effect of flash frequency on pigment content and on the biomass production	122
4.3 Effect of flash frequency on the total lipid content	124
4.4 Upscaling to real systems and future work.....	124
5. Conclusion	126

Abstract

Productivity of microalgal cultivation processes is tightly related to photosynthetic efficiency, and therefore to light availability at the cell scale. In an agitated, highly turbid suspension, the light signal received by a single phytoplankton cell moving in a dense culture is a succession of flashes. The growth characteristics of microalgae under such dynamic light conditions are thus fundamental information to understand nonlinear properties of the photosynthetic process and to improve cultivation process design and operation. Studies of the long term consequences of dynamic illumination regime on photosynthesis require a very specific experimental set-up where fast varying signals are applied on the long term. In order to investigate the growth response of the unicellular photosynthetic eukaryote *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) to intermittent light exposure, different light regimes using LEDs with the same average total light dose were applied in continuous cultures. Flashing light with different durations of light flashes (Δt of 30 s, 15 s, 2 s and 0.1 s) followed by dark periods of variable length ($0.67 \leq L:D \leq 2$) yielding flash frequencies in the range 0.017-5 Hz, were compared to continuous illumination. Specific growth rate, photosynthetic pigments, lipid productivity and elemental composition were measured on two duplicates for each irradiance condition. The different treatments of intermittent light led to specific growth rates ranging from 0.25 to 0.93 day⁻¹. While photosynthetic efficiency was enhanced with increased flash frequency, no significant differences were observed in the particular carbon and chlorophyll content. Pigment analysis showed that within this range of flash frequency, cells progressively photoacclimated to the average light intensity.

1. Introduction

Microalgae are generally cultivated in open pond raceway systems or closed photobioreactors (PBRs). Raceway ponds are shallow, artificial culture systems (about 10–40 cm depth). Paddle wheels create a turbulent flow leading to a complex hydrodynamical mixing. High levels of absorbing biomass currently reached in such culture systems have two major consequences: (i) Phytoplankton growth is limited by light energy, and (ii) due to the strong light gradients generated by the high optical density and the intense turbulence, algal cells are exposed to time varying light intensities (Pulz, 2001), with time constants ranging from milliseconds to tens of minutes. Hydrodynamics determines the cell trajectories in the medium. Therefore, given the light conditions at the surface pond, hydrodynamics conditions the regime of light experienced by each cell: individual cells move back and forth from high light to relative darkness. The light experienced by a single cell is thus a succession of rapid L:D-changes (Litchman, 2000; Perner–Nochta & Posten, 2007; Vejrazka *et al.*, 2011; Boulanger *et al.*, 2013). In thoroughly mixed photobioreactors, light signals experienced by cells were characterized by fluctuation rates of up to 1 kHz (Perner–Nochta & Posten, 2007). Few studies have so far been carried out in open ponds, for which realistic trajectories of cells have less been investigated (Bernard *et al.*, 2013).

To compete with fossil fuels, the use of microalgae has to reach high productivity at a low cost. Research efforts are thus necessary to reduce the energy required for mixing while improving productivity. The link between productivity and mixing, through its effect on light supply at the cell scale, must then be elucidated as the pattern of light delivery controls photosynthetic efficiency (Richmond, 2004; Posten, 2009). This effect is even more important when dealing with photoinhibition occurring for outdoor cultures potentially exposed to high light intensities. Peak intensities from sunlight can be as high as $1500 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Litchman, 2000). High light intensities saturate photosystems, resulting in a decrease in photosynthetic yield and a potential damage of reaction centers. One of the known causes of photoinhibition is the production of highly reactive oxygenic species and byproducts that induce photo-oxidative damages (Murata *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). This inhibiting effect can be counteracted by a repair process, albeit at a slower pace (Murata *et al.*, 2007; Nixon *et al.*, 2010).

Microalgae photoacclimate in order to adapt their light harvesting efficiency to the available light. Photoacclimation operates through physical adjustment of the photosynthetic system at

the time scale of cell growth. Such adaptation involves changes in cell pigmentation or in structural characteristics such as the number and/or the size of light-harvesting antennas (Falkowski & Owens, 1980; Falkowski & LaRoche, 1991; Herzig & Dubinsky, 1992). An increase in cellular photosynthetic pigment content (such as chlorophyll) is for instance commonly observed in strains grown under low irradiances. Conversely, pigment content decreases in cells exposed to high irradiances in order to minimize light absorption and thereby photo-oxidation processes (Richardson *et al.*, 1983; MacIntyre *et al.*, 2002). While photoacclimation has already been studied and documented in continuous light (Herzig & Dubinsky, 1992; MacIntyre *et al.*, 2002; Garcia–Camacho *et al.*, 2012), acclimation mechanisms of the photosynthetic apparatus operating in fast and dynamic light conditions have not been investigated experimentally. One critical question is whether algae, when exposed to flashing or fluctuating light, acclimate to the peak intensity or to an intermediate value. In raceways, irradiance fluctuations experienced by cells are closely related to the rotation speed of the paddle wheel. Hence, the knowledge of the photosynthetic response to fluctuating lights will clarify the relation between the energy invested to move the paddle wheels and the system productivity.

Data from the literature suggest that a rapid alternation of light and darkness is beneficial to photosynthetic efficiency (Gordon & Polle, 2007; Grobbelaar, 2010; Vejrazka *et al.*, 2011; Sforza *et al.*, 2012). The way algae respond to flashing light is still unclear and most probably species-specific. In some cases of fast cycles, full light integration has been shown, meaning that cells use flashing light and continuous light (of equal average intensity) with the same efficiency (Phillips & Myers, 1954; Kok, 1956; Terry, 1986; Grobbelaar *et al.*, 1996; Matthijs *et al.*, 1996; Nedbal *et al.*, 1996). Nevertheless, the threshold for this full light integration is not well defined as flash frequencies from 5 Hz to 1 kHz have been reported (Kok, 1956; Terry, 1986; Matthijs *et al.*, 1996). This range of time scales is representative of photobioreactors conditions, and the effect of light fluctuation within a less intensively agitated raceway is less documented. To date, available data on the response of algae growth to flashing light either relate to the effect of flashes on short term photosynthetic oxygen evolution (Kok, 1956; Nedbal *et al.*, 1996; Brindley *et al.*, 2011), or on unacclimated growth (Vejrazka *et al.*, 2011), in particular when in short-term batch cultures are used (Sforza *et al.*, 2012).

In this study, we investigated the effect of light modulation on the growth of *Dunaliella salina*. Experiments were performed to understand if, for a given light dose, the pattern of light exposure impacts the growth rate and several physiological properties such as pigments, lipids and nitrogen quota. Turbidostat cultures were used to monitor the long term response to continuous or intermittent light regimes with different frequencies. We then analyzed and compared the photosynthetic response and photoacclimation processes observed under each condition.

2. Materials and Methods

2.1 Algae, growth medium and pre-cultivation conditions

Laboratory experiments were conducted with the chlorophyte *Dunaliella salina* strain CCAP 18/19 from the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), in a sterile f/2 medium (Guillard & Ryther, 1962).

The strain was maintained and propagated in the same medium, at 27°C and in a 12:12 light-dark regime at 300 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Pre-cultures were thereby maintained in the exponential growth phase during 15 days for at least 10 generations before the experiment.

2.2 Experimental design

Cultures were performed in 8 aseptic, cylindrical double-walled borosilicate glass photobioreactors with an effective capacity of 500 mL (see §II-2.1.1). The LED modules have been positioned to ensure light homogeneity. Cultures were thermoregulated at 27°C, a value reported to be optimal for the growth of this strain (García *et al.*, 2007). pH was maintained at 8.3 using a CO₂ controller connected to pH sensors in each culture (Sciandra *et al.*, 2003). The same conditions were applied to both vessels in each compartment in order to duplicate the experiment. Photobioreactors were illuminated with white LEDs (see §II-2.2.1). Six LEDs were symmetrically set up in each compartment on both sides of the two duplicate cultures (Fig. III-1) and connected to an open-source electronics prototyping platform Arduino to generate continuous light (CL) and flashed illumination (FL) at the desired intensities and frequencies. In each experiment, one set of duplicates was exposed to continuous light (CLA and CLB) as reference while all other photobioreactors were exposed to flashing light (FLA and FLB).

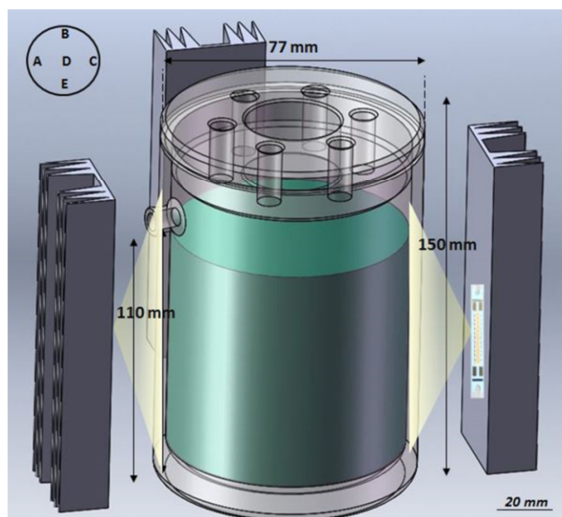


Figure III-1: Representation of a photobioreactor. Vessels are 77 mm in diameter and are equipped with a double wall for temperature control. Each vessel is surrounded by three ramps of LEDs mounted on radiators, thereby insuring an homogeneous light field within the culture. The top left circle represents a top view of the culture vessels with irradiance measured on five (A to E) positions

2.3 Culture conditions

Turbidostat experiments were performed using the computer driven culturing system described in Le Floch *et al.* (2002), in which the original fluorescent tubes light device was replaced by a freely programmable LED system. Culture medium was renewed with a peristaltic pump to insure a constant culture volume, set at 500 mL. These experiments were designed to analyze the effects of different dynamic light signals on the growth rate and several physiological properties. A semi-continuous turbidostat mode implies daily adjustments of the dilution rate to maintain constant cell density. Thus, the same irradiance conditions are sustained through time within the culture. The dilution rate D ranged from 0.28 j^{-1} (800₃₀₋₃₀) to 0.99 j^{-1} (400cont). Indeed, coefficients of variation (CV) of the dilution rates during the entire experiment were below 8%. All nutrients (such as N, P and micronutrients) were provided in excess, so that algae growth was limited only by light availability. Cultures were kept at a low density (between $2.10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$ and $3.10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$) in order to reduce shelf-shading and insure a constantly homogeneous light distribution during the entire experiment. It was crucial that light modulation only results from the LED system, and not from any light gradient within the culture. Photosynthetically active radiation (PAR) was monitored on five positions in each photobioreactor during the experiments using a 2π light sensor (Biospherical Instruments QSL-100) (Fig. III-1). Light intensity at these five locations differed by less than 5% and was stable along the experiments.

Two experiments were conducted, in which different light regimes with an equal average total light dose were applied (Table I). In the first one, the intermittent light regime consisted of equal light (with $I = 800 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and dark intervals (L:D = 1:1), and was compared with continuous light of equal mean irradiance ($I = 400 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Flashed light signals with a duration of lighting flash Δt of 30 s ($f = 0.017 \text{ Hz}$), 15 s ($f = 0.033 \text{ Hz}$) and 2 s ($f = 0.25 \text{ Hz}$) were applied for 17 days. In the second experiment, flashed light with Δt of 0.1 s ($f = 5 \text{ Hz}$) and signals with different L:D ratios were applied: 2 s of light phase ($I = 1000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) with 3 s of dark phase (L:D = 2:3) and 2 s of light phase ($I = 600 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) with 1 s of dark phase (L:D = 2:1) were applied for 16 days. The average light $\bar{I} = 400 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ was defined according to the hypothesis of Muñoz-Tamayo *et al.* (2013). The typical incident light in summer conditions for the considered case, in the South of France, was $I_0 = 1300 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ which corresponded to a mean intensity $\bar{I}$ of $388 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Consistently with PAM (Pulse Amplitude Modulation) measurements (Fig. III-2) and previous studies (García *et al.*, 2007) these light intensities did not lead to inhibitory effect on *Dunaliella salina* growth. The tested light regimes are summarized in Table I.

The biological parameters (cell size, abundance, pigment content, elemental composition and lipid content), are detailed hereafter. They were measured daily, starting on day 1 for cell size and abundance, and on day 4 for all the others.

Table I: Light regimes applied to semi-continuous cultures of *Dunaliella salina*. Cycles of alternating light and dark phases all show the same integrated irradiance (average light dose of $400 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Light was provided as pulses with precise duration of flashes (Δt_{light}) and dark phases (Δt_{dark}). Each flash mode was investigated on duplicates cultures.

Experiment	Condition code	Light intensity ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	f (Hz)	Flash time (Δt_{light}) (s)	Dark time (Δt_{dark}) (s)
1 (17 days)	800 ₂₋₂	800 $\pm$ 19.3	0.25	2	2
	800 ₁₅₋₁₅	800 $\pm$ 25.4	0.033	15	15
	800 ₃₀₋₃₀	800 $\pm$ 20.1	0.017	30	30
	400-cont1	400 $\pm$ 21.5	-	∞	-
2 (16 days)	800 _{0.1-0.1}	800 $\pm$ 25.4	5	0.1	0.1
	1000 ₂₋₃	1000 $\pm$ 20.1	0.2	2	3
	600 ₂₋₁	600 $\pm$ 19.3	0.33	2	1
	400-cont2	400 $\pm$ 21.5	-	∞	-

2.4 PAM measurements

Light-response (PI) curves of relative PSII electron transport rate (rETR) of *Dunaliella salina* pre-acclimated (15 days) under three different irradiance conditions (continuous light, 800₃₀₋₃₀ and 800_{0.1-0.1}) were recorded using a MULTI-COLOR PAM (WALZ) (Schreiber *et al.*, 2011). Measuring, actinic and saturating light were provided by a blue LED-lamp (440 nm). Prior to start, microalgae were dark-acclimated for 10 min. Samples were then exposed to 10 increasing PAR irradiance levels, from 0 to 2339 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, with light step duration of 60 s under each actinic level. rETR_{max} (maximum relative electron transport rate), α (initial slope of the light curve) and I_{opt} (light intensity above which photosynthesis is photo-inhibited) were estimated by fitting the model of Eilers & Peeters (1988).

The different PI curves showing no significant differences (maximum relative standard deviation between the curves was 4%), the average of the parameters obtained for each of the three PI curves was computed ($\pm$ SD, n=3) (Fig. III-2). The analysis of the curves provided a value for $I_{opt} = 866 \pm 12 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and therefore, the choice for the average light $I = 400 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ was below this inhibition threshold and thus not saturating.

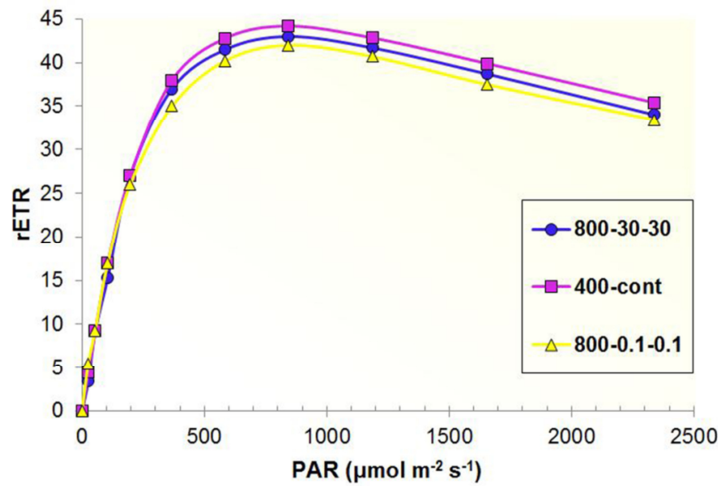


Figure III-2: Photosynthesis-Irradiance (PI) curves showing relative electron transport rates (rETR) of *Dunaliella salina* pre-acclimated (15 days) to three different irradiance conditions (see Table I for the definition of codes). Maximum relative standard deviation between the curves is 4%. $\alpha = 0.20 \pm 0.02$, $I_{opt} = 866 \pm 12 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and $rETR_{max} = 42.9 \pm 1.10 \mu\text{mol e}^{-}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (mean $\pm$ SD, n=3).

2.5 Cell size and abundance

After inoculation, the changes in population density and mean diameter were monitored in triplicates, using a Coulter Counter (Beckman Multisizer 3). At the equilibrium, daily averages of the cell abundances in the turbidostat cultures remained stable throughout the experiment (see §II-3.1).

2.6 Pigment extraction and analysis

Pigments were extracted from algae collected after 4 days cultivation. Samples of 3 mL cell suspension were taken from the reactors once a day and transferred to 10 mL tubes wrapped with aluminum paper to prevent photobleaching (Lichtenthaler, 1987). Extraction was done using 6 mL of 90% acetone per tube. Absorbance was measured in duplicate for each culture with a UV/Vis spectrophotometer (see §II-3.2.1).

Pigment composition is presented as the average of the values obtained during 5 days, once equilibrium has been reached ($n=20$, $n=40$), for the two duplicates (four replicates for continuous light).

Concentrations of chlorophyll *a* (C_a), chlorophyll *b* (C_b) and of total carotenoids (C_{x+c}) were calculated from the equations according to Lichtenthaler (1987).

2.7 Elemental stoichiometry

Samples (6.8 mL) from the 5 days at equilibrium were first filtered onto pre-combusted (4h at 450°C) GF/C filters and then dried at 60°C before analysis with a CHN analyzer (see §II-3.3). Cellular Nitrogen (pmol-N.cell^{-1}) and carbon (pmol-C.cell^{-1}) were estimated using the cell abundance measured at the time of sampling.

2.8 Lipid analysis

Total lipid concentration at the end of the experiment was quantified according to the Bligh and Dyer's method (Bligh & Dyer, 1959). Samples of 200 mL cell suspension were centrifuged at 2000 rpm for 10 min. Then, cell pellets were frozen and stored at -80°C waiting for extraction. Two successive extractions were realized with a monophasic mixture of chloroform:methanol:salt water (1:2:0.8 v/v). Chloroform and water were then added for phase separation (2:2:1.8 v/v). The chloroform phase was evaporated and total lipids (TL)

were stored at -80°C under nitrogen atmosphere to avoid oxidation, until analysis. Results of Lipids:C ratio were provided as average values between the two duplicate cultures at the end of the experiment.

3. Results

Under all light conditions, experiment showed strongly consistent results between the two duplicate cultures. Hence, unless otherwise specified, results are provided as average values between these duplicates.

3.1 Specific growth rate of *Dunaliella salina* as a function of flash modulation frequency

Growth rates obtained under the different light regimes can be found in Table II. The specific growth rate increased with the cycle frequency, with a highest value of 1.03 ± 0.048 day⁻¹ (n=52) observed under continuous illumination. Under intermittent light, when flash frequency increased from 0.017 Hz to 5 Hz, *Dunaliella salina* presented specific growth rates ranging from 0.25 ± 0.03 to 0.93 ± 0.03 day⁻¹ in average (n=26), i.e. from 1.1 to 4 times lower than that observed under continuous light (Fig. III-3). A Tuckey test showed that each condition leads to a growth rate value which is significantly different from all other conditions with a 95% confidence level ($\alpha=0.05$; $F_{0.05,3,8}=4.07$, $F=14.49$, $P=0.001$, ANOVA and Tuckey HSD test). Besides, no significant differences in cell diameter (n=32, n=34) were observed during the time course of the experiments under different light conditions (Table II).

Table II: Specific growth rate (day⁻¹) and average cell diameter (μm) recorded in all cultures. Values are provided $\pm$ standard deviation, as described in the Materials and Methods section. Each culture condition is identified by the light intensity applied during the flash and the duration of light and dark phases.

-cont: continuous light. The corresponding flashes frequency (Hz) is also indicated.

Condition code	f (Hz)	μ (day ⁻¹)	Cell diameter (μm)
800 ₃₀₋₃₀	0.017	0.25 $\pm$ 0.03	10.2 $\pm$ 0.61
800 ₁₅₋₁₅	0.033	0.44 $\pm$ 0.01	9.94 $\pm$ 0.34
1000 ₂₋₃	0.2	0.65 $\pm$ 0.04	9.75 $\pm$ 0.50
800 ₂₋₂	0.25	0.73 $\pm$ 0.02	10.1 $\pm$ 0.64
600 ₂₋₁	0.33	0.78 $\pm$ 0.03	9.66 $\pm$ 0.56
800 _{0.1-0.1}	5	0.93 $\pm$ 0.03	9.91 $\pm$ 0.74
400-cont	–	1.03 $\pm$ 0.05	10.5 $\pm$ 0.49

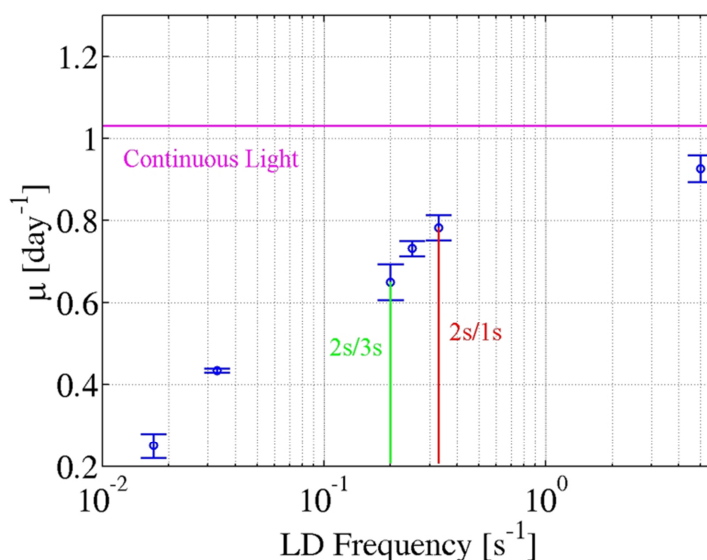


Figure III-3: Specific growth rate μ observed as a function of the frequency of light flashes applied in the different experiments. The rate reported for each light regime is the average value between the two duplicate cultures ($\pm$ SD). The reference growth rate, observed under continuous light, is represented by a horizontal line.

3.2 Chlorophyll content

Photosynthetic pigments (Chl *a*, Chl *b* and β -carotene), carbon content and total lipids:C ratio are summarized in Table III.

In all treatments, Chl *a* cell content increased for nine days before stabilizing at 4.21 ± 0.24 pg.cell⁻¹ in average (n=80) (Fig. III-4). *Dunaliella salina* showed Chl *a* contents ranging from 4.08 ± 0.24 (n=20) (600₂₋₁) to 4.54 ± 0.29 pg.cell⁻¹ (n=40) in continuous light (Fig. III-5A). An ANOVA test showed that there was no significant difference between all conditions ($\alpha=0.05$; $F_{0.05,6,63}=2.25$, $F=2.12$, $P=0.012$). Chl*a*:C ratio ($\mu\text{gC}:\mu\text{Chl}a$) ranged from 26.2 ± 7.15 (800₃₀₋₃₀) to 33.7 ± 6.01 in continuous light.

Table III: Overview of cellular composition in the different culture treatments: photosynthetic pigments (Chl *a*, Chl *b* and β -carotene), carbon content and total lipids:C ratio. Results are provided as average values ($\pm$ SD, n=20, n=40) between the two duplicate cultures. All but the lipids:C ratio and the total lipid per cell were recorded at equilibrium. The Lipids:C ratio and total lipid per cell were measured at the end of the experiment.

f (Hz)	Chl <i>a</i> (pg cell ⁻¹)	Chl <i>b</i> (pg cell ⁻¹)	β -carotene (pg cell ⁻¹)	Carbon (pmol cell ⁻¹)	Lipids:C (μ gLipids/ μ gC)	Lipid per cell (pgLipids cell ⁻¹)
0.017	4.14 $\pm$ 0.20	0.44 $\pm$ 0.26	2.32 $\pm$ 0.51	11.6 $\pm$ 0.99	0.19	19.0
0.033	4.24 $\pm$ 0.23	0.79 $\pm$ 0.48	2.27 $\pm$ 0.60	10.2 $\pm$ 1.32	0.16	22.2
0.2	4.34 $\pm$ 0.20	1.04 $\pm$ 0.41	3.17 $\pm$ 0.85	9.96 $\pm$ 1.37	0.23	18.5
0.25	4.36 $\pm$ 0.22	0.90 $\pm$ 0.89	2.55 $\pm$ 0.42	10.7 $\pm$ 1.11	0.24	24.8
0.33	4.08 $\pm$ 0.24	0.41 $\pm$ 0.29	2.09 $\pm$ 0.74	11.0 $\pm$ 0.84	0.47	30.8
5	4.49 $\pm$ 0.22	0.94 $\pm$ 0.36	2.41 $\pm$ 0.63	11.8 $\pm$ 1.22	0.52	22.8
cont	4.54 $\pm$ 0.29	1.02 $\pm$ 0.46	3.46 $\pm$ 1.16	11.8 $\pm$ 0.91	0.76	33.7

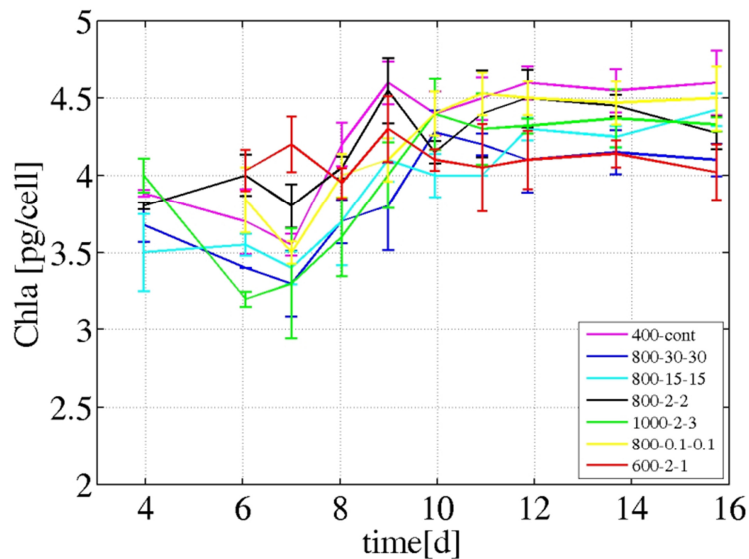


Figure III-4: Evolution of the chlorophyll *a* content (pg.cell⁻¹) of *Dunaliella salina* cultivated in semi-continuous reactors and exposed to different irradiance conditions (see Table I for the definition of codes). Results are provided as average values ($\pm$ SD, n=4, n=8) between the two duplicate cultures.

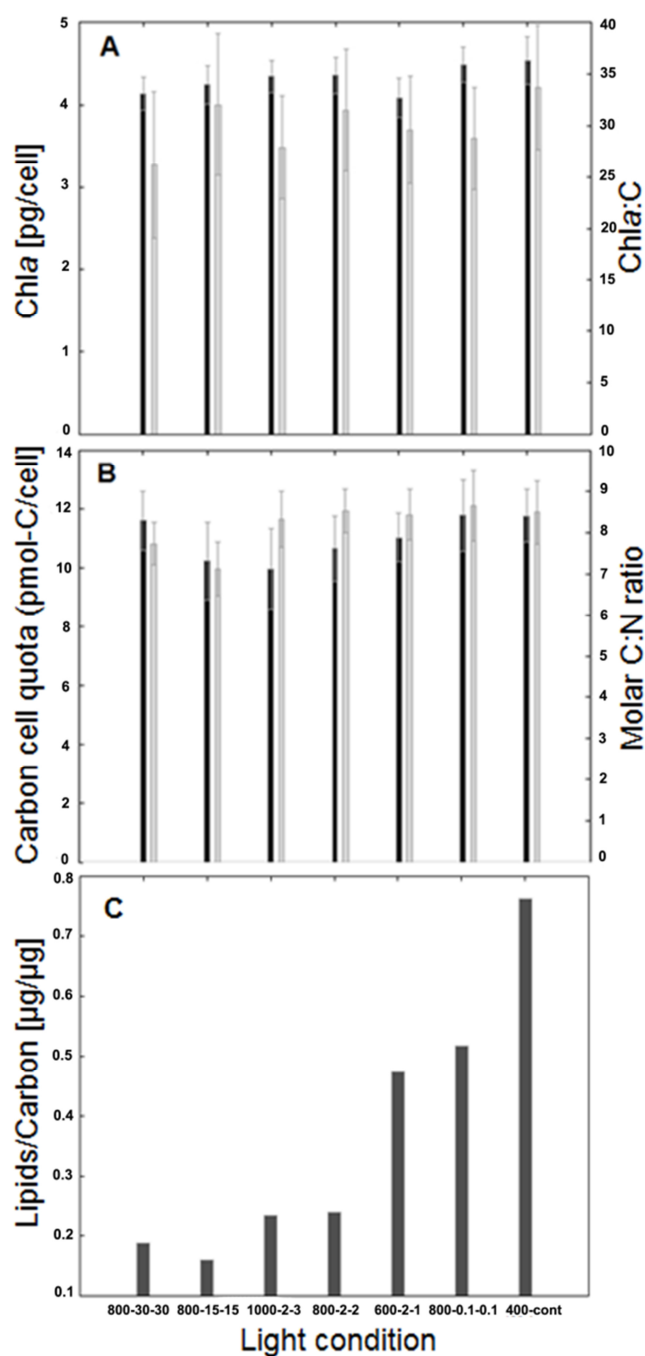


Figure III-5: (A) Chlorophyll *a* cell content ($\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$) (left ordinate, black bar plots) and Chl *a*:C ratio (right ordinate, grey bar plots), (B) carbon cell content ($\text{pmol}\cdot\text{C}\cdot\text{cell}^{-1}$) (left ordinate, black bar plots) and molar C:N ratio (right ordinate, grey bar plots) and (C) lipids:C ($\mu\text{gLipids}/\mu\text{gC}$) ratio (C) observed in *Dunaliella salina* exposed to different light regimes. Results are provided as average values ($\pm$ SD, $n=20$, $n=40$) between the two duplicate cultures, over 5 days at equilibrium (A, B) and at the end of the experiment (C).

3.3 Carbon and nitrogen stoichiometry

The same trend is observed in carbon and nitrogen cells content (Fig. III-5B). Carbon cell content ranged from 9.96 ± 1.37 (1000_{2-3}) to 11.8 ± 1.22 ($800_{0.1-0.1}$) $\text{pmol}\cdot\text{C}\cdot\text{cell}^{-1}$ ($n=20$).

The molar C:N ratio of *Dunaliella salina* presented values from 7.73 ± 0.51 (800₃₀₋₃₀) to 8.64 ± 0.85 (800_{0.1-0.1}). ANOVA tests showed that there was no significant difference between irradiance conditions.

3.4 Total lipid content

Figure III-5C presents the lipid:C ($\mu\text{gLipids}/\mu\text{gC}$) ratio of *Dunaliella salina* exposed to the different light regimes. The total lipid content increased with the flash frequency, with a highest value of $0.76 \mu\text{gLipids}/\mu\text{gC}$ observed under continuous illumination. The total lipid content increased from 0.19 to $0.24 \mu\text{gLipids}/\mu\text{gC}$ between 0.017 Hz (800₃₀₋₃₀) and 0.2 Hz (800₂₋₂). Between 0.33 Hz (600₂₋₁) and 5 Hz (800_{0.1-0.1}), cells contained 0.47 to $0.52 \mu\text{gLipids}/\mu\text{gC}$. The lipid:C ratios at the end of the experiment are summarized in Table III and Fig. III-5. Total lipid per cell ($\text{pg Lipids.cell}^{-1}$) ranged from $18.5 \text{ pg.cell}^{-1}$ (1000₂₋₃) to $33.7 \text{ pg.cell}^{-1}$ in continuous light.

4. Discussion

The data presented in this study unravel how important physiological characteristics of *Dunaliella salina* such as growth rate, pigment and lipid content change when cells are exposed to flashed irradiances. We carried out the experiments with semi- continuous cultures in turbidostat mode, allowing, in contrast to batch mode, to maintain constant growth conditions and low cell density (i.e. homogeneous light field) in the cultures throughout the experiment duration (two weeks). Carrying out such experiments in batch mode would have been impossible since variations in cell density, and hence in light distribution within cultures, would have affected the results. Since photoacclimation takes more than a week to proceed, running cultures in semi-continuous mode is essential to maintain cells in an exponential growth phase and to track physiological changes and adaptations in a constant light environment.

4.1 Effect of light flashes frequency on cellular growth of *Dunaliella salina*

A first clear effect of the light frequency on *Dunaliella salina*, at a given light dose, is observed on the division rate. In semi continuous cultures maintained at similar cell densities, the specific growth rate increases with increasing flash frequencies (from 0.25 to 0.93 day⁻¹), with continuous light yielding the highest growth rate (1.03 day⁻¹). This maximum growth rate is, besides, higher than commonly reported in the literature (generally less than 0.7 day⁻¹ for this species (García *et al.*, 2007; Mendoza *et al.*, 2008)).

Flash frequency both affects the short term photosynthetic efficiency and the long term growth of microalgae. Terry (1986) described such improved photosynthetic efficiency with increased light flash frequency as the result of a “*light integration effect*”.

Electron turnover processes are an important mechanism conditioning the efficiency of photosystems II. First step in the electron transport chain, these processes operate cycles between the photon-induced excitation of the reaction centers and the subsequent electron separation, which results in de-excitation. After de-excitation, the reaction centers are ready for the absorption of a new photon. If new photons are absorbed during the phase of de-excitation, the excess energy has to be dissipated thermally. The turnover efficiency is optimal if the reaction centers always receive photons only shortly after de-excitation, but none while in the excited state. Electron turnover has a time scale of about 10 ms (Falkowski &

Raven, 1997; Malcata, 2011). For light cycles much shorter than 10 ms, full light integration can be expected. In case of full light integration, the growth rate obtained under the L:D signal equals that observed under a continuous light with the same average (non-inhibitory) light intensity. In our study, full light integration was not achieved, but cells exposed to the highest frequencies approximate this condition. In case of light cycles much longer than the electron turnover time, the increase in growth rate cannot be explained by the light integration effect alone. One possible mechanism under lower frequencies is the storage of excess energy from the flash in electron pools, which are part of subsequent dark reactions. This energy pool can be a combination of the plastoquinone pool, NADPH or reduced compounds of the Calvin cycle (Vejrazka *et al.*, 2011) and gets filled during the light phase. During the dark phase, the slower dark reactions also synthesize ATP and fix CO₂ using the stored energy. Furthermore, short term photoprotective mechanisms such as the xanthophyll cycle might intensify efficiency improvements from flashing light. Last, extended exposure to higher light intensities for lower cycle frequencies can lead to increased thermal dissipation rates and thus lower the photosynthetic efficiency (Casper-Lindley & Bjrkman, 1998; Iluz *et al.*, 2012). Therefore, a deeper analysis of the photosynthetic yield and non photochemical quenching would be necessary to conclusively identify the physiological mechanism behind the observed increase in growth rate at lowest frequencies.

Mathematical modelling can also help understanding the response to light frequency. Simple models describing the state of the PSU in a caricatural way (open, closed, inhibited) have been developed (Eilers & Peeters, 1988; Han, 2001). The transition between these theoretical states is straightforwardly related to the incident photon flux. Mathematical analysis of these models reveals that photosynthetic efficiency increases with the frequency of light supply (Hartmann *et al.*, 2014). To get a more mathematical intuition of reasons for such increase, two extreme cases can be considered. The first one is an extremely fast alternation between dark and light intensity I , so that the cells cannot make the difference with continuous light. This explains why the growth rate, when frequency is very high, tends to the one obtained with continuous light at the average light intensity $\bar{I} = \frac{I}{2}$. The growth rate (denoted $\mu(I)$ for a constant light intensity I) is then $\mu(\bar{I})$. At very low frequencies, the situation is reversed. Let's consider a very slow alternation of equal light and dark phases, for example with light duration in the range of hours. The transient period between these two phases can be assumed to be negligible compared to light period. During the light phase, growth rate is $\mu(I)$ while it is

zero in the dark phase. Therefore, the average growth rate is $\frac{\mu(I)}{2}$. This is the lower limit of the growth rate for very low frequencies. Finally, because of the convexity of the growth response $\mu(I)$ (considering non inhibiting light), the property $\frac{\mu(I)}{2} \leq \mu\left(\frac{I}{2}\right)$ can be verified (Hartmann *et al.*, 2014). This explains why the slow varying regime is less favourable to growth.

This analysis demonstrates how the static growth response to light can explain the observed increase in average growth with cycling frequency. This argument is based on a mathematical viewpoint, and should be revisited, especially for low light frequencies, if a light/dark cycle is superimposed, imposing a simultaneous nycthemeral dynamics. More work should however be done in this direction.

Another way of explaining this, is to consider the yield of light use, defined by $\eta(I) = \frac{\mu(I)}{I}$. Assuming that the growth rate $\mu(I)$ can be represented by a Haldane model (Bernard, 2011), changes in the photosynthesis yield follow the trend depicted on Fig. III-6. This yield is constant (and maximum) for low light, and then it decreases with the light intensity. Colored lines in the figure indicate the yields obtained during the light phase under the tested light conditions. In all cases, the yield expected under flashing conditions is lower than that expected with continuous light (magenta). The present results demonstrate that doubling the photon flux ($2I = 800 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) for 50% of the time is less efficient for growth than a photon flux which is equally distributed on the time interval with a continuous illumination ($I = 400 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$): $\eta(2I) < \eta(I)$. As a consequence, the average growth rate $\mu(I) = \eta(I)I$ is lower for the flash mode:

$$\frac{1}{2}\eta(2I)2I = \eta(2I)I < \eta(I)I$$

Analogously, a light signal of average $\bar{I}$ where a fraction p of the time is illuminated, leads to a light phase intensity $I = \frac{\bar{I}}{p}$. The average growth rate is thus:

$$\bar{\mu} = \frac{1}{p}\eta\left(\frac{\bar{I}}{p}\right)p\bar{I} = \eta\left(\frac{\bar{I}}{p}\right)\bar{I}$$

For constant average light $\bar{I}$, $\bar{\mu}$ is thus an increasing function of the proportion p of the time when light is on. As a consequence, the signal 1000₂₋₃ should lead to a lower growth rate than the signal 600₂₋₁. Unfortunately, the experiment 1000₂₋₃ can only be compared to the experiment 600₂₋₁ which both is at faster frequency and shows higher yield: the higher yield

for this 600_{2-1} is explained by these factors which both contribute to photosynthesis enhancement.

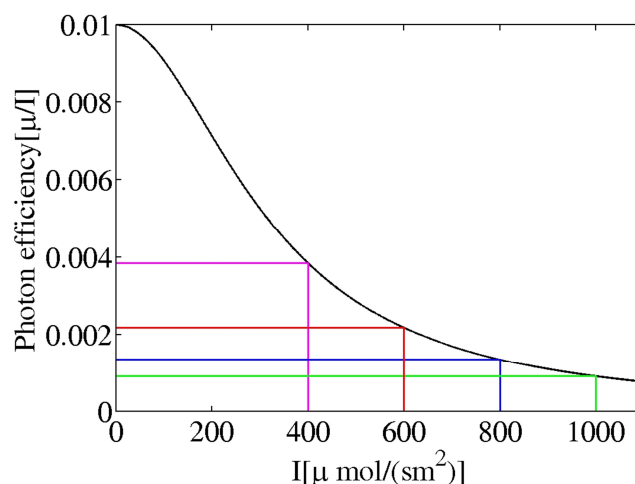


Figure III-6: Caricatural representation of the photon efficiency as a function of light intensity following the Haldane model. The different experimental culturing conditions are indicated as lines cont. (magenta), 2s:1s (red), 2s:3s (green) and conditions with L:D phases of equal length (blue).

4.2 Effect of flash frequency on pigment content and on the biomass production

In the natural environment, light variations induce a physiological response of the photosynthetic system to optimize the light harvesting efficiency of photosynthetic organisms. Photoacclimation describes phenotypic changes of algae to light variations (Falkowski & LaRoche, 1991). Cells are thus known to actively modify their pigmentation, elemental composition (such as chlorophyll to carbon (Chl:C) and carbon-to-nitrogen (C:N) ratios) or structural characteristics such as the number and size of photosynthetic units, when irradiance is constant for hours to days (Falkowski & Owens, 1980; Herzig & Dubinsky, 1992). An increase in cellular photosynthetic pigment content (such as chlorophyll) is commonly observed in strains grown under low irradiances. Conversely, pigment content decreases in cells exposed to high irradiances in order to minimize photo-oxidation processes (MacIntyre *et al.*, 2002; Havelková-Doušová *et al.*, 2004). The cellular content in photosynthetic pigment is thus a main indicator of the light acclimation state of cells. This phenomenon has already been documented in continuous irradiance conditions (Herzig & Dubinsky, 1992; MacIntyre

et al., 2002). Nonetheless, acclimation mechanisms of the photosynthetic apparatus under flashing light were unreported so far.

From a dynamical perspective, the results of the present experiments highlight temporal adaptation in microalgae. A nineday acclimation period was observed until the equilibrium pigment content was reached in all light conditions (Fig. III-4). This acclimation has, to the best of our knowledge, never been described before for a comparative number of different cycle frequencies.

From a static perspective, we did not observe any immediate effect of the L:D cycle frequency on the pigment content and therefore on the final state of acclimation after equilibrium, for a given total light dose. Chlorophyll *a* cell content and Chl:C prove independent of light frequency. It can therefore be assumed that for fast varying light signals, only the average light dose matters to the final acclimation state. When exposed to flashing light, cells sluggishly acclimate to the average light intensity, whatever the light fluctuations. Such phenomenon had been predicted by dynamical models (Bernard, 2011) and finds first experimental verification in the present results. Acclimation processes were too slow to follow the light signal. Indeed, genetic regulation of pigment synthesis are processes working on time scales which are much slower (hours to days) than the frequencies used in this study (Kana *et al.*, 1997).

Acclimation to average light intensity is also confirmed by the intracellular concentrations of carbon, whose values are independent from light variations after equilibrium. Light is a major determinant not only for C-fixation, but also for the cellular content of major elements like nitrogen (Hessen & Anderson, 2008). C:N ratio is used as an indicator of phytoplankton physiological state (Redfield, 1963; Pahlow, 2000). The molar C:N ratio of *Dunaliella salina* was not affected by variations in the light frequency in our study. This result is coherent with model predictions indicating that this ratio is constant and expressed as a static function of the mean light intensity (Fasham *et al.*, 1990; Doney *et al.*, 1996; Faugeras *et al.*, 2003).

Furthermore, this similar acclimation for all the experimental conditions is corroborated by the PAM measurements. The PI curves obtained on cultures pre-acclimated to continuous and flashing light showed no significant discrepancy. Such identical responses highlight the fact that the photoacclimation process was rather similar for the different experimental conditions.

4.3 Effect of flash frequency on the total lipid content

The relationship between light availability and lipid storage is complex, and many parameters influence the ability of algae to produce lipids. While the effect of nitrogen deprivation on lipid synthesis is well documented (Lacour *et al.*, 2012), the influence of flashing lights remains a more widely open question. It seems that total lipid content is directly correlated to the actual division rate (cf. Fig. III-7). Highest lipid content is obtained under continuous light, and to a smaller extent with high frequency light variations (0.1s:0.1s). The slowest L:D alternation provided both the lowest lipid amount and the lowest growth rate. A direct consequence of this point is that optimizing lipid productivity, which is the product of lipid content and growth rate, should be carried out in this spirit: the metabolic stress derived from change in light condition is expected to enhance photosynthesis efficiency. In this study, total lipid content was measured. It will be interesting to analyze specifically the response of the neutral lipids.

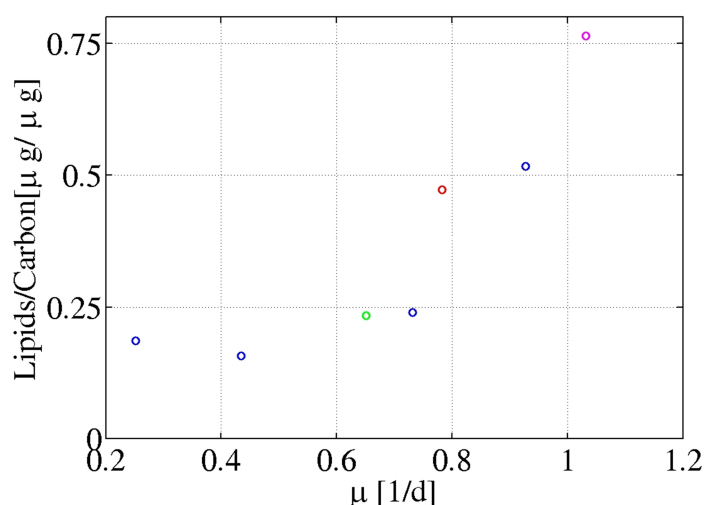


Figure III-7: Lipids:C ($\mu\text{gLipids}/\mu\text{gC}$) ratio of *Dunaliella salina* as a function of the growth rate μ . Applied light regimes are color-based: 50% illumination (blue), continuous light (magenta), 2s:3s (green), 2s:1s (red).

4.4 Upscaling to Real Systems and Future Work

Throughout the experiments, L:D cycles were used in order to mimic the effect of mixing in large scale culturing systems. In this framework, the cycling frequency is supposed to reflect the mixing speed of the medium. Even though sketchy, this representation helps to

understand the complex dynamical processes of photoinhibition and photoacclimation. But it is probably risky to extrapolate to real, smoother light signals perceived by a single cell.

Hence, such results indicate that increasing the mixing rate may enhance the photosynthetic yield. However, this increase remains moderate since typical velocities in a raceway are between 0.1 and 0.5 m.s⁻¹. Extrapolation of the response curve on Fig. III-3 for L:D in the range of minutes, predicts that multiplying the frequency by e.g 5, would lead to a maximum increase in the growth rate by less than 30%. However, multiplying the velocity by 5 involves a much higher energy consumption (energy loss is often assumed to be proportional to the cube of the fluid velocity). Given the present results, enhanced hydrodynamics appears to be a poor choice to increase energetic productivity in raceways.

5. Conclusion

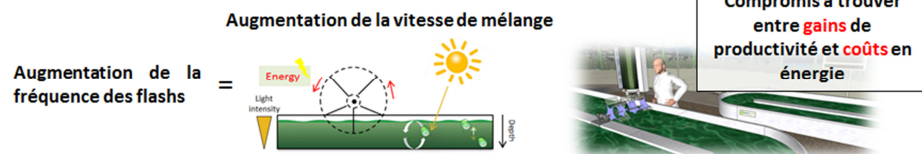
Data characterizing the long term response of photosynthesis to dynamic light signal are scarce. Such processes are often described along a single factor, such as light intensity, pre-acclimation state, or biomass concentration. This study reveals that understanding of the global picture requires simultaneous consideration of these factors.

Also, the response to light pattern must be addressed in a three dimensional state space (acclimation state, light dose, L:D cycle frequency). While coverage of all possible signals in this framework with ordinary growth experiments is hardly conceivable, the task becomes infinitely complex when using more realistic light signals, i.e. derived from hydrodynamic simulations (Perner–Nochta & Posten, 2007) or adding day-night cycles. For the understanding of dynamical effects on photosynthesis, it is thus essential to couple experimental works to a modelling approach. Indeed, once models have been calibrated (Hartmann *et al.*, 2014), it becomes imaginable to explore this 3D space through extensive simulation, and infer inherent properties of the cell photosynthetic efficiency when faced to realistic dynamic light signals.

Que faut-il retenir ?

- En cultures semi-continues menées à faible densité cellulaire, le **taux de croissance** de *Dunaliella salina* **augmente** en réponse à l'augmentation de la fréquence des flashes (de **0,24** à **0,93 jour⁻¹**) pour atteindre un **maximum** en **lumière continue** (**1,03 jour⁻¹**).

⇒ L'augmentation de la vitesse de mélange dans les raceways peut améliorer le rendement photosynthétique des microalgues.



- Le contenu cellulaire en **Chl *a*** n'est **pas affecté** par la fréquence d'éclairement. Les cellules **s'acclimatent à l'intensité lumineuse moyenne**, indépendamment des fluctuations dans la gamme de fréquences testée.
- Une **période d'acclimatation de 9 jours** est observée avant que le contenu pigmentaire atteigne un équilibre.

- Les cellules soumises à la **fréquence d'éclairement la plus lente** contiennent la **plus faible quantité de lipides** et présentent le taux de croissance le plus faible.

Chapitre IV

Des flashes à l’histoire lumineuse. Etude de la réponse de *Dunaliella salina* à des signaux lumineux réalistes

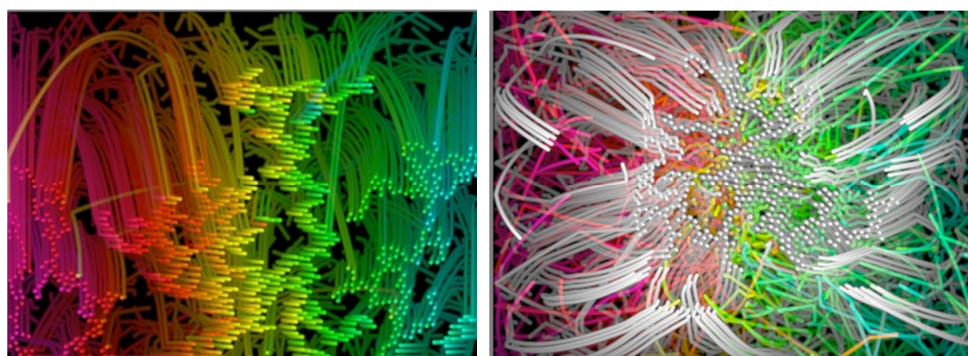
“Le poète achemine la connaissance du monde dans son épaisseur et sa durée, l’envers lumineux de l’histoire qui a l’homme pour seul témoin.”

Edouard Glissant (1928-2011)

C. COMBE, D. DEMORY, P. HARTMANN, A. TALEC, E. PRUVOST, R. HAMOUDA, M.O. BRISTEAU, J. SAINTE-MARIE, S. RABOUILLE, A. SCIANDRA et O. BERNARD

Prochainement soumis à **Proceedings of the Royal Society B**¹⁹

“Experimental reconstruction of the light pattern induced by hydrodynamics in an algal pond: towards more realistic experiments”



Trajectoires des particules d'agrégats fractals bidimensionnels lors de leurs collisions, dans un champ de gravitation central attractif. D'après Jean-François Colonna (2000).

¹⁹ Impact Factor (2014): 5.051

Présentation du chapitre

L'étude décrite dans ce chapitre sera prochainement soumise au journal *Proceedings of the Royal Society B*.

Les expériences menées afin de mieux comprendre la dynamique de la photosynthèse dans les procédés de culture de microalgues se sont le plus souvent concentrées sur l'effet de flashes lumineux. Dans ce type d'expériences "classiques", les organismes sont généralement soumis à des signaux lumineux caricaturaux, où la lumière fluctue à différentes fréquences entre une faible et une forte intensité lumineuse. Déterminer dans quelle mesure la réponse de la photosynthèse à ces conditions caricaturales est différente de celle qui serait induite par des *stimuli* lumineux plus réalistes est donc une question cruciale.

L'objet de ce chapitre est d'étudier la réponse des microalgues évoluant dans un environnement expérimental "réaliste", en reproduisant au laboratoire des signaux lumineux issus de simulations numériques.

Ainsi, en utilisant des microcontrôleurs Arduino, il a été possible de reconstruire au laboratoire l'histoire lumineuse qu'une cellule de microalgue pourrait rencontrer dans un procédé de production industriel. Ces expériences de nouvelle génération ont été réalisées à dose de lumière constante et pour des *stimuli* lumineux traduisant différentes vitesses d'agitation du milieu. Les gammes de lumière explorées conduisent les algues à expérimenter, à des échelles de temps différentes, des phases de photoinhibition et des phases de faible lumière.

Il convient d'insister sur le fait que ce travail est le fruit d'une approche pluridisciplinaire. En collaboration avec l'équipe ANGE (Analyse Numérique, Géophysique et Ecologie) de l'INRIA, nous avons développé des approches innovantes, d'une part pour caractériser les signaux lumineux réellement perçus par une cellule transportée dans un milieu très turbide (simulation avec le logiciel Freshkiss3D développé par l'INRIA) et, d'autre part, pour reproduire expérimentalement ce signal afin d'en étudier l'effet sur des populations de microalgues. Ma contribution à cette étude a consisté à développer le protocole expérimental, à réaliser les expériences lagrangiennes et à analyser le comportement des microalgues dans cet environnement complexe.

Nous avons ainsi pu montrer que les cycles de lumière/obscurité habituellement utilisés ne sont pas cohérents avec la distribution de la lumière, ni avec l'hydrodynamique au sein des cultures. En effet, l'histoire lumineuse d'une cellule en photobioréacteur et en raceway est complexe et se caractérise par des cycles de lumière/obscurité dont la variabilité est directement liée au gradient de lumière. La grande majorité des signaux lumineux utilisés jusqu'à présent au laboratoire ne respecte pas ces lois simples et s'écarte donc structurellement des *stimuli* qu'une cellule pourrait percevoir dans une culture dense.

Nous avons également mis en évidence que la réponse de *Dunaliella salina* soumise à ce type de *stimulus* diffère sensiblement de ce qui avait pu être rapporté jusqu'ici dans la littérature. En effet, des réponses complexes apparaissent, qui ne sont pas simplement corrélées à la fréquence du signal lumineux. Il semble notamment que la photoacclimatation soit différente en fonction de la période principale du signal appliqué. Les mécanismes de dissipation d'énergie par les cycles des xanthophylles pourraient jouer un rôle déterminant pour expliquer les différences entre les taux de croissance observés aux différentes fréquences d'éclairement.

Ces expériences de deuxième génération apparaissent comme une étape obligatoire pour caractériser la réponse dynamique de la photosynthèse dans des conditions réalistes. Néanmoins, pour en comprendre les ressorts, il faudra encore utiliser des protocoles expérimentaux jour/nuit caricaturaux, en les perfectionnant. En effet, ces signaux lumineux simples doivent satisfaire des propriétés statistiques plus représentatives des alternances jour/nuit typiques de ces milieux denses. Nous proposons ainsi de nouvelles expériences caricaturales, en cohérence avec la physique du procédé. Ces expériences plus simples permettront dans un premier temps de mieux cerner, dans un cadre épuré, les mécanismes à l'œuvre dans nos expériences.

Si les résultats mis en exergue par notre dispositif sophistiqué étaient confirmés, cela signifierait qu'il existe une vitesse d'agitation du milieu optimale, pour laquelle la synthèse de pigments est minimale. En conséquence, les algues plus transparentes conduiraient à une productivité globale plus élevée (voir chapitre VI). A l'inverse, certains régimes hydrodynamiques permettraient de stimuler la synthèse des caroténoïdes. Des expériences dans des cultures à haute densité devront par la suite confirmer ces résultats.

Finalement, cette étude met en évidence le bénéfice fondamental d'une approche multidisciplinaire, où les progrès réalisés dans la modélisation de la dynamique des fluides ont conduit à une nouvelle génération d'expériences. Ce cadre expérimental innovant, qui

s'appuie sur la reconstruction de simulations lagrangiennes, permettra de révéler et d'élucider des mécanismes biologiques clés, qui n'apparaissaient pas, jusqu'à présent, avec les protocoles expérimentaux classiques, trop simplistes.

Sommaire

1. Introduction	134
2. Reconstruction of dynamical light patterns using a hydrodynamical modelling	136
2.1 The hydrodynamical model.....	136
2.2 Generation of Lagrangian trajectories	137
2.3 Choice of a paragon of the trajectory set.....	137
3. Experimental set-up	139
4. Results and discussion	140
4.1 Growth rate.....	140
4.2 Acclimation mechanisms.....	141
5. What drives photoacclimation ?	143
6. Can we caricature the light pattern?	145
6.1 Light distribution in a perfectly mixed cultivation system.....	145
6.2 Relevant discretisation into two layers does not exist.....	146
6.3 Alternative choice for caricatural signal.....	147
6.3.1 <i>Variance computation</i>	147
6.3.2 <i>Signal with realistic variance</i>	147
6.3.3 <i>Switching between I_E and 0</i>	149
6.3.4 <i>Switching between I_0 and I_D</i>	150
6.4 Towards realistic experiments.....	150
7. Conclusion	151

Abstract

Hydrodynamics in a high rate process for microalgae cultivation affects light history perceived by the cells. The interplay between cell movement and medium turbidity leads to a light pattern forcing photosynthesis dynamics. The hydrodynamics of high rate algal ponds, mixed by a paddle wheel, has recently been studied, but never with the purpose of understanding its impact on photosynthesis growth efficiency. The purpose of this multidisciplinary study is to reconstruct single cell trajectories in an open raceway and experimentally reproduce such high frequency light pattern to observe its effect on growth. We show that the frequency of such a realistic signal plays a very important role in the photosynthesis dynamics. An unexpected photosynthetic response was recorded for these complex signals when compared to the on/off signals usually applied. Indeed, the light signal received by a single cell contains from low to high frequencies which nonlinearly interact with the photosynthesis process and differentially stimulate the various time scale associated to energy dissipation. This study highlights the need for experiments with more realistic light *stimuli* in order to better understand microalgal growth at high cell density.

1. Introduction

The ratio of the produced energy over the total involved energy (net energy ratio (NER)) is a key criterion when producing biofuel. This ratio must be increased in order to reduce both the costs and the environmental footprint. Reducing the energy demand is now a crucial challenge to make microalgae sustainable (Lardon *et al.*, 2009), especially since energy is directly coupled to greenhouse gas (GHG) emissions. Energy is required at different stages of the microalgal production process (growth, harvesting, post-treatment), but the idea here is to focus on the microalgal growth phase. Indeed, the mixing process is highly energy consuming. There are two different processes for growing microalgae at industrial scale. The photobioreactor is closed, with a low optical path and a high cell density (from 1 to 10 g.L⁻¹). The open raceway pond, mixed by a paddle wheel, is more rustic, and more widespread for large scale algae production. In this paper, we focus on this simpler and cheaper system which might be more adapted for biofuel as for animal feed production (Benemann, 2013).

The function of mixing has been extensively discussed in the literature: avoiding cell sedimentation, ensure nutrient homogeneity, transfer CO₂ and remove the excess of oxygen to limit photorespiration and oxidative stresses (Cuello *et al.*, 2014). But agitation directly impacts light perception at the cell scale in a mixed turbid environment (Perner-Nochta & Posten, 2007). A closer look at the cell scale shows that, due to cell motion, the light perceived by a cell is a rapid succession of light spikes, reflecting the motion of individual cells (bio-catalysts) in the variable light field within the culturing process upon mixing. The critical interplay of (i) light absorption and diffusion within the culture, (ii) cell density, and (iii) cell motion, makes the dynamics of the light received at the single cell scale quite complex. On top of this, the photosynthetic machinery is a nonlinear dynamical system processing the photons captured by the antennae. The reaction centres excited by photons present significant de-excitation dynamics. If they receive additional photons while being still excited they get damaged, leading thus to a decrease in efficiency (photoinhibition). These processes are reduced at high light by photoacclimation strategies modulating pigment content. In particular, carotenoids involved in the xanthophyll cycles are also controlled, and the thermal resulting dissipation of the energy excess (Lunch *et al.*, 2013) can therefore be adapted. These Non Photochemical Quenching (NPQ) mechanisms have been shown to be highly dynamical and strongly influenced by the ratio of high light to low light (Abu-Ghosh *et al.*, 2015).

The impact of high frequency light fluctuation on both photosynthesis and photoacclimation is still poorly understood but it appears to play an important role on photosynthesis and could be used to enhance productivity. It has been widely studied (Vejrazka *et al.*, 2011, 2012; Sforza *et al.*, 2012; Abu-Ghosh *et al.*, 2015) on the basis of a caricature on/off experimental light signal. These studies have shown the role of the signal frequency on photosynthesis (flashing effect), while increasing the light/dark alternation rate (light frequency) enhanced photosynthesis. The work of Zarmi *et al.* (2013) has highlighted the dynamical mechanisms involved in photon harvesting and use, represented with mathematical models taking into account the damaging and repair dynamics for some key proteins. Such models explain the increase of yields for higher frequencies, especially at high light.

However, most of these works have focused on photobioreactors with time scales much faster than the second. In a raceway, light variations are slower, and, as discussed in Chapter III, these processes have not been much studied (Combe *et al.*, 2015). Moreover, these caricatural approaches are far from realistic light patterns, and growth in a realistic light field, with more gradual light evolution has, to the best of our knowledge, never been studied before. More generally, the compatibility of the used light signal with the light actually received by a cell has not been considered beyond its typical frequency. The objective of our study is to decipher the effect of mixing rate on photosynthesis, when considering a realistic light pattern.

Our multidisciplinary approach consisted first in reconstructing a realistic light signal, using an hydrodynamical model simulating the cell-scale Lagrangian trajectories. These dynamical light patterns were then analysed, and a paragon (the most representative of the group) was selected representing a possible realistic light signal. An Arduino based experimental device was then developed to submit a low-density population of microalgae to this light signal. Thus, each cell in the experimental vessel received the same light, and the population behaviour reflects the state of each single cell. The experiments were carried out on a long enough time window, so that photoacclimation can take place and its dynamics can be accounted for. The observed response turns out to be more complex than what was so far reported in the literature. We then discuss experimental strategies to study photosynthesis in more realistic conditions, including more realistic caricature signals.

2. Reconstruction of dynamical light patterns using a hydrodynamical modelling

2.1 The hydrodynamical model

The dynamics of an incompressible water system can be accurately described by the Navier-Stokes equations. However, in the case of a raceway system, a mathematical modelling should also describe the interface with air at the surface of the raceway. These free surface systems are more difficult to represent and involve a higher computational cost. Several studies have described the hydrodynamics in a raceway pond, often with the objective of predicting dead zones or improving the design to reduce the agitation cost (Hadiyanto *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2013). However, the impact of the hydrodynamics on light access and on the productivity was never studied. Most of the works have been carried out using a commercial software such as 'Fluent' which proposes an automated scheme for the 3-D resolution of the Navier-Stokes equations. But, given the numeric difficulties and the computational cost to approximate the Navier-Stokes solutions, especially in the free-surface case, we use a recent and more efficient approach. The so-called multilayer Saint-Venant system with mass exchanges (Audusse *et al.*, 2011b; Bernard *et al.*, 2013) turns out to be an efficient approximation of the Navier-Stokes equations. The accuracy and the stability properties of the multilayer approach have been demonstrated in Audusse *et al.* (2011a, 2011b).

Moreover, the multilayer model has been successfully confronted with analytical solutions of the hydrostatic Euler and Navier-Stokes systems with free surface (Boulanger *et al.*, 2013). The multilayer model consists in Galerkin-type approximations along the vertical axis of the Navier-Stokes system. It results in a set of partial differential equations with hyperbolic features. The system is numerically solved by considering a 2D triangular mesh of the ground surface, the layers defined by the water depth giving the third spatial dimension. The discretisation technique used a finite volume scheme based on a kinetic interpretation of the equations. A specific forcing term mimicking the effect of the paddle wheel was added (Bernard *et al.*, 2013). The impact of the wheel on the fluid is considered as a normalized force applied by the wheel's blade and equal to the square of the velocity at each point. Here, a 3D extension to the model presented in Bernard *et al.* (2013) was used.

A mesh for the raceway pond of the Laboratory of Environmental Biotechnology (LBE, INRA Narbonne) (Fig. IV-1) mixed with a paddle wheel (Hreiz *et al.*, 2014) was developed. The water column (0.3 m) has been divided into 20 layers. The simulation starts with static non-agitated medium, and the paddle wheel is immediately set on. The raceway model has been run for 15 000 seconds, and the first 3600 seconds of simulation were disregarded, in order to reach a stabilization period. The velocity field together with a single cell trajectory is represented on figure IV-1.

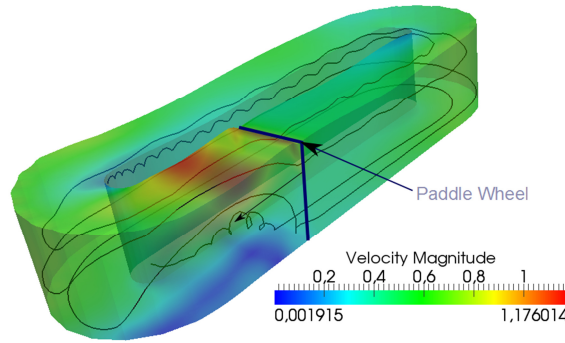


Figure IV-1: Numerical simulation of the raceway hydrodynamics with the multilayer Saint-Venant approach. 3D representation of the water volume and the velocity field. A particular trajectory is also represented.

2.2 Generation of Lagrangian trajectories

Lagrangian trajectories of 10 000 particles are reconstructed by integrating the velocity field for various initial positions of the particles. In addition, a Brownian motion model is applied to better represent the local diffusion effect.

2.3 Choice of a paragon of the trajectory set

The 20 layers used for the multilayer Saint-Venant discretisation were considered. For each trajectory, knowing its layer i at time t , we built a transition matrix by computing the probability to be at layer j at time $t + dt$. Then, a correspondence analysis (CA) was carried out from this transition matrix. In the CA referential, we differentiate four sets of trajectories by doing a hierarchical ascendant clustering (Ward classification with Euclidian distances) in order to select a group where particles move homogeneously in the water column. We choose a paragon trajectory (Fig. IV-2) by calculating: $y_i = \min[(A_i - \bar{A})^2]$ where A_i is the probability matrix of the trajectory i , and $\bar{A}$, the average matrix probability of the interest's

group. The selected pattern was periodically repeated to get an infinite periodic trajectory. The period of the signal is then $T = 3.2$ hours.

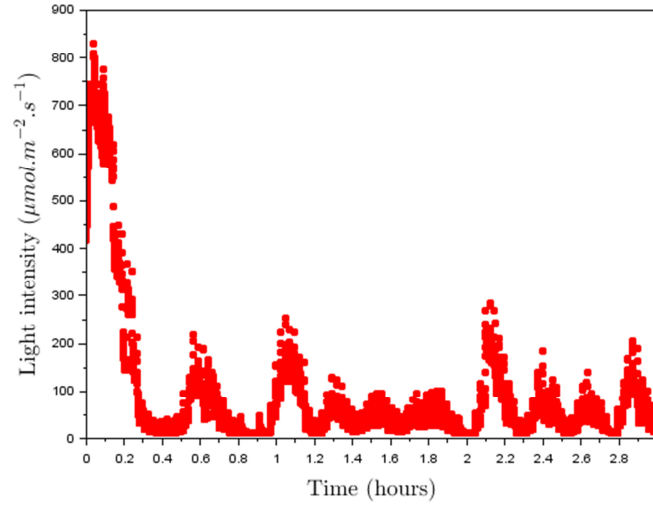


Figure IV-2: Light pattern of the paragon trajectory.

Finally, the light received by the particle has been computed with a Beer-Lambert exponential attenuation:

$$I(t) = I_0 \exp(-kz) \quad (\text{IV-1})$$

where I_0 is the light at the surface (here $I_0 = 850 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), and the extinction rate k is computed from I_L , the light at the bottom of the raceway (here $I_L = 0.01 I_0$): $k = \frac{1}{L} \ln \frac{I_0}{I_L}$.

This light pattern is the one experimentally applied to the microalgal culture in photobioreactor. Different mixing rates could have been simulated with the hydrodynamical model. However, comparing light patterns resulting from various hydrodynamical regimes turned out to be very complex, and the choice of different specific trajectories each associated to a given mixing rate could make the results interpretation very tricky. The choice was then made to caricature the effect of increasing or reducing the paddle wheel velocity by simply accelerating or slowing down the initial trajectory, assuming that the hydrodynamical regime is not structurally modified.

This approach is therefore more focused on the frequency effect. The initial trajectory, after periodization, was then accelerated (the considered periods were then $T/3$ and $T/2$) or slowed down (the considered periods were then $2T$ and $3T$).

This computational choice for reproducing several wheel velocities makes the experiments easier to compare, while, not representing nonlinear effects in hydrodynamics, it probably induces biases in the cell scale light signal.

3. Experimental set-up

The Chlorophyceae *Dunaliella salina* (CCAP 18/19) was grown axenically in a f/2 medium within cylindrical double-walled borosilicate glass photobioreactors with an effective capacity of 500 mL (see §II-2.1.1). The circulation of water within their double walls regulated the temperature at 27°C in the cultures. Experiments were carried out with simultaneous duplicates in fed-batch. Cultures were diluted with fresh sterile medium every 8 days. Only 10 to 15% of the initial volume was kept, in order to restart cultures with an initial cell density of $5 \cdot 10^4 \text{ cell.mL}^{-1}$.

Photobioreactors were illuminated with arrays of six white LEDs installed on an aluminium frame (see §II-2.2.1). LEDs were connected to a single-board microcontroller Arduino MEGA 2560 to apply the light history pattern. The LED drivers (LPF-60D-36) command the signal to the Arduino, which is amplified for the LEDs (Fig. II-7).

The different light patterns were applied to the cultures, and an additional control was carried out with a constant light equal to the average light intensity ($82.2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

4. Results and discussion

4.1 Growth rate

The average growth rates (AGR) for the various light patterns is represented on figure IV-3. With continuous light, AGR is higher than for the T -paragon trajectory by 136%, while at high period ($3T$) growth rate is reduced by 70%. A light/dark signal with reduced period is known to stimulate photosynthesis and to induce higher growth rate (Vejrazka *et al.*, 2012; Combe *et al.*, 2015). Surprisingly, here we do not observe a decrease of AGR with signal period. Furthermore, the fastest $T/3$ -light signal, leads to a very weak biomass growth. This experiment was restarted three times, also after using another reactor associated to another light set up, but the results were eventually very replicable. There is also an apparent paradoxical response for the signal with period $3T$ where growth rate is 55% higher than the T -paragon, while it was expected to be less favourable for growth. In agreement with the results of Combe *et al.* (2015) (see Chapter III), intracellular carbon and nitrogen content do not reflect a significant change between the different conditions. In the same way, there is no significant difference in the C/N composition ($P=0.22$).

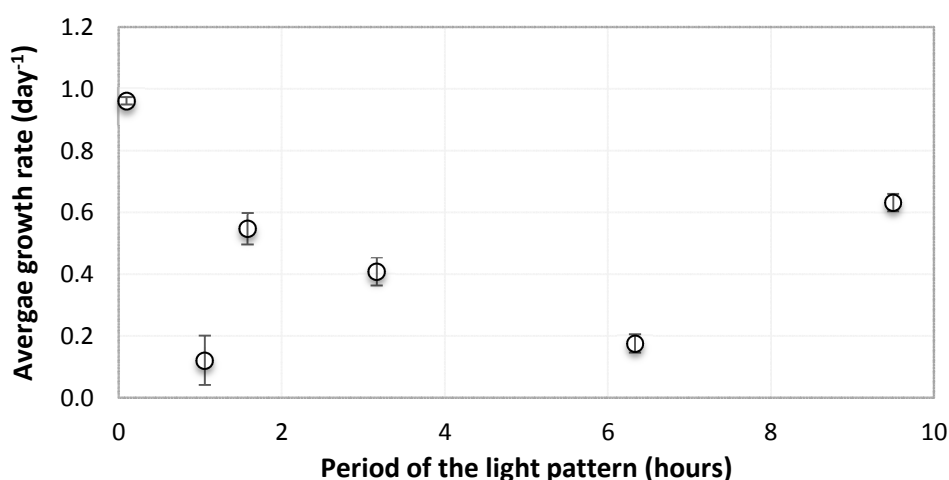


Figure IV-3: Average growth rate μ as a function of the period of the light pattern applied in the different experiments. The rate reported for each light regime is the average value between the two duplicate cultures ($\pm$ SD).

4.2 Acclimation mechanisms

On the contrary to previous results obtained for faster signal frequencies and reported in Chapter III (Combe *et al.*, 2015), chlorophyll *a* (Chl:C) and carotenoids (Car:C) per carbon seem affected by the changes in light pattern (Fig. IV-4). Indeed, cells submitted to continuous light contain 65% more Chl *a* and 36% more Chl *b* than the paragon. Carotenoids show a similar pattern: cells under continuous illumination contain 92% more carotenoids than the paragon. There is however no clear relationship between pigment and light signal main period over the set of tested conditions.

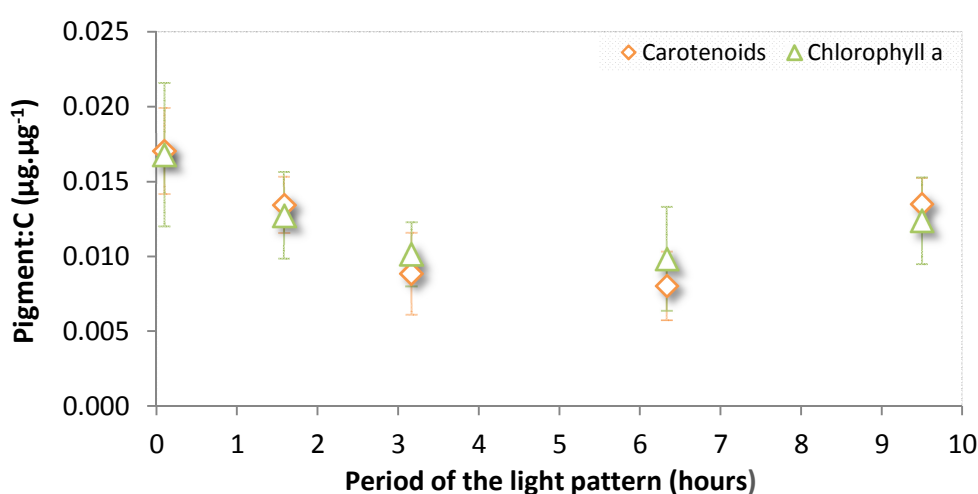


Figure IV-4: Chlorophyll *a*:carbon ratio (Chl *a*:C ; $\mu\text{g}.\mu\text{g}^{-1}$) (green triangles) and carotenoids:carbon ratio (Car:C; $\mu\text{g}.\mu\text{g}^{-1}$) (orange diamonds) of *Dunaliella salina* as a function of the period of the light pattern.

Surprisingly the pigment content turns out to be strongly correlated with growth rate (Fig. IV-5) ($r^2=0.91$, $N=5$). This relationship is classical for chlorophyll, due to its central role in photosynthesis (at high light however, an excess of chlorophyll may lead to photoinhibition). Nevertheless, it was expected that an increase in the photoprotectant pigments would reduce growth rate. Indeed, the role of the carotenoids (mainly β -carotene for *D. salina*) consists in dissipating the excess of energy and protecting the cells from free radicals (Lamers *et al.*, 2008). At low light, carotenoids are expected to dissipate light energy, and thus penalize growth. This drawback turns into an advantage at high light, by protecting the photosynthetic apparatus. Since the light pattern consists of less than 10% of time with light larger than $300 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, it would be expected that the outcome of a high carotenoid

content is mainly detrimental to growth. This analysis therefore highlights a different cell strategy depending on the signal period.

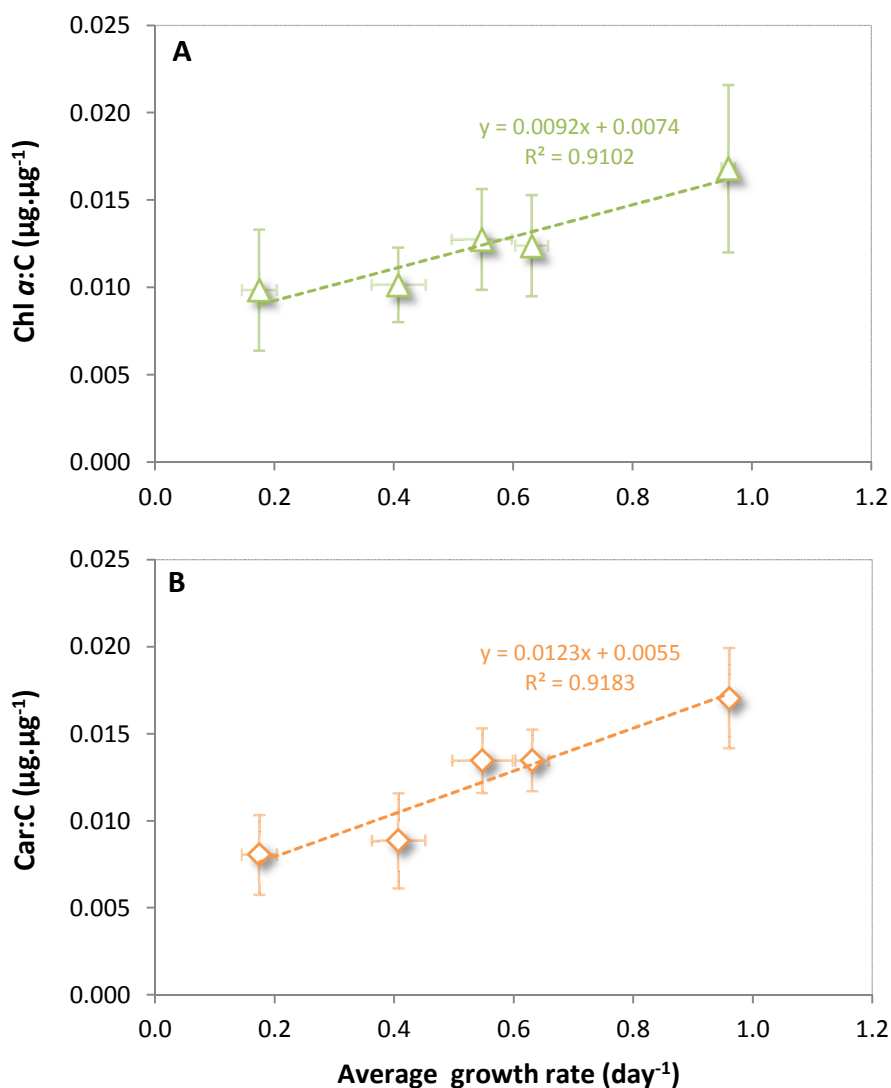


Figure IV-5: (A) Chl *a*:C ratio ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) and (B) Car:C ratio ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) of *Dunaliella salina* as a function of average growth rate (day^{-1}).

Now, after a closer look at the Car:Chl *a* ratio, this ratio does significantly change ($P < 0.05$). It seems that both pigment classes do not evolved with the same trend. More precisely, carotenoids seem to increase faster than chlorophyll per carbon unit (and also by cell) with average growth rate. This would mean that the strategy consisting in higher photoprotection is more efficient to deal with the considered light pattern. The xanthophyll cycles may act differentially for dissipating energy especially during the high light periods. We therefore conjecture that this unexpected difference in cell photoacclimation explains partially the difference in growth rate.

The ratio Car:Chl has often been considered as a stress indicator for this species (this point will be further discussed in Chapter V). This would mean that some signal periods have induced a higher cell stress, resulting in a large difference in growth rate. These observations need to be confirmed with additional experiments, but they highlight the strong role played by the photoacclimation dynamics. The mechanisms regulating the carotenoid and chlorophyll syntheses have not been elucidated yet. The challenge now consists in discovering the element in the different light patterns triggering a different photoacclimation strategy. In the next paragraph, we analyse more extensively the difference between the different light patterns.

5. What drives photoacclimation ?

These results, when considering a realistic signal, highlight a response more complex than what was so far observed with a caricatural light. The reconstructed trajectory is a complex dynamical signal embedding several time scales which all potentially resonate with the different time scales of photosynthesis, photoprotection and photoacclimation. The fastest frequencies are associated to the Brownian motion added to the Lagrangian signal. At slower time scale, two key periodic events generate the observed dynamics. First, each time a cell goes through the paddle wheel, it is rapidly advected and ends up at a different depth. The paddle wheel therefore clearly acts as the main process periodically redistributing the cell depth and thus actively contributing to distributing light access between the microalgae. When going through the paddle wheel, cells experiment an abrupt light change during 12 seconds on average. This rather long time is due to the counter current below the wheel, which generates negative horizontal velocities. A cell can therefore be trapped under the wheel before being released beyond the wheel. On top of this phenomenon, the cells going through the raceway bends change their altitude due to an helicoidal movement triggered by the horizontal velocity gradient between the fast external line and the slow inner trajectories. These two movements induce an inherent signal period of 1.5 minutes (average time to accomplish a full turn) for the paragon. Finally, it is important to keep in mind that the signal periodicity, T , is itself artificial since it results from the periodisation process. The signal therefore contains a mix of subfrequencies which all may impact the photosystem so as the photoacclimation dynamics. It is possible that some of these time scales have a higher influence on the yield of photon harvesting and processing (Hartmann *et al.*, 2015). They also induce different response in the

mechanisms of energy dissipation. Especially, at high light, the xanthophyll cycle is a way to dissipate the excess of light through non photochemical quenching. For chlorophytes, the violaxanthin cycle (VC) is a key player in NPQ, exerting a photoprotective effect *via* the accumulation of Zea-facilitating thermal dissipation of the excessive light energy. As shown for *Dunaliella salina* by Abu-Ghosh *et al.* (2015), this process has a strong dynamics, and its efficiency is highly related to the light dynamics, including the rate of high and low light succession. However, these acclimation mechanisms have generally been studied at fast time scales (for frequencies faster than 10Hz), while we are considering slower processes characterising the raceway dynamics. Such dissipation strategies involving xanthophyll cycles are likely to be affected by light fluctuations at lower frequencies. By accelerating or slowing down the signal, all these frequencies have shifted and some of them may eventually reveal less (for the $T/3$ -pattern) or more (the $3T$ -pattern) efficient for photosynthesis. Beyond signal frequency, the shape of the signal itself has been shown to have an impact on photosynthesis. When considering, for the same frequency, a caricature signal containing different fractions of high and low light, the growth rate is also affected (Combe *et al.*, 2015). However, these inherent signal properties are in principle not affected when stretching or contracting the light signal, and more generally, neither the average light nor its standard deviation do change. While a light/dark signal did not significantly affect photoacclimation (Combe *et al.*, 2015), the response is different in our study. This unexpected behaviour when a complex signal is applied therefore reveals some nonlinear processes which are probably active in a real raceway. More investigations are needed to better understand and separate these different effects. Working with realistic light signal turns out to be crucial. Nevertheless, in order to more deeply understand and separate these different effects, and better isolate the photoacclimation processes, experiments with caricature light must still be carried out. However, the light signal should respect some key structural properties to be more likely to trigger the mechanisms that are hidden behind the response observed for realistic signals. The following paragraph proposes a design of caricature pattern respecting some central physical properties.

6. Can we caricature the light pattern?

6.1 Light distribution in a perfectly mixed cultivation system

The main difference between the tested light pattern and the ones which were so far reported in the literature is the coherency of light distribution with physics. Indeed, most of the mechanically agitated systems generate a homogeneous cell distribution in space. Particle iso-distribution results from fluid incomprehensibility while cells are iso dense to water. In some cases, however cells are not iso-distributed along the culturing device. For example, dead zones lead to local accumulation of particles which settle down, increasing the particle density close to the reactor bottom. As a consequence, the cells are no more equidistributed along depth. This behavior has been numerically simulated, and some authors (James & Boriah, 2010; Hadiyanto *et al.*, 2013) proposed advanced designs to generate a fluid circulation avoiding this source of productivity loss. Equidistribution is therefore reached in any ideally mixed system.

Simulating Lagrangian cell trajectories respecting this theoretical iso-distribution property is very challenging from a numerical point of view. Indeed, the numerical schemes, to compute Lagrangian trajectories from Eulerian velocity fields do not keep these theoretical properties. Especially, the "*particle rebound*" on the domain boundaries, may generate an artificial local particle accumulation. This often leads to non-homogeneous distributions which must be artificially corrected (Perner-Nochta & Posten, 2007).

Now, assuming cell equidistribution, means a theoretical constant probability density function associated to particle depth:

$$f_z = \frac{1}{L} \quad (\text{IV-2})$$

The probability density distribution for light intensity, assuming a simple Beer-Lambert exponential decrease (equation (IV-1)) from the surface light intensity I_0 to the intensity at the raceway bottom I_L , can be analytically derived from basic probability computation (Stirzaker, 2003):

$$f_I(I) = -\frac{1}{\ln(\eta)I} \quad (\text{IV-3})$$

where η denotes the fraction of light at the bottom: $\eta = I_L/I_0$.

As a consequence, the light probability distribution is a hyperbolic function simply depending on the fraction of light reaching the reactor bottom. The average light in the reactor is then:

$$\bar{I} = \int_{I_L}^{I_0} f_I(I) I dI = I_0 \frac{1 - \eta}{-\ln \eta} \quad (\text{IV-4})$$

The probability of a cell to be at an illumination rate higher than I_s can be computed as:

$$P(I > I_s) = \int_{I_s}^{I_0} f_I(I) dI = \frac{\ln I_s/I_0}{\ln \eta} \quad (\text{IV-5})$$

As a matter of illustration of this formulae, if 1% of the light can still be found at the reactor bottom, 50% of the reactor depth is illuminated with a light larger than 10% of the surface light, and 15% of the reactor is lighten with more than 50% of the original flux.

6.2 Relevant discretisation into two layers does not exist

Now, in most of the studies focusing on the flashing effect, light is often chosen as a caricatural on/off signal. Let us discuss the best option to caricature the light pattern, in agreement with light distribution, assuming that the light source switches between two intensities. In this framework, each intensity would represent the average light in a two layer discretisation of the raceway. The main challenge consists in determining the light intensities to be applied and the switching frequency in order that the caricature light respects some key properties derived from hydrodynamics.

Assuming an upper euphotic layer of depth h with average light intensity $\bar{I}_E$, and a lower dark layer with average light intensity $\bar{I}_D$, the question is to determine a realistic probability (or frequency if a periodic light signal is required) for the cell to switch between these layers. The two layers are characterized by their average irradiance. A desirable property would be to reconstruct a light signal commuting between $\bar{I}_E$ and $\bar{I}_D$ (i) in time proportions respecting the probability of a particle to be in each layer, (ii) with an average light intensity in agreement with the average light intensity in the process $\bar{I}$ and (iii) with light intensities $\bar{I}_E$ and $\bar{I}_D$ compliant with the average light distribution in each layer. Such a light pattern would ensure a first level of coherency between the biological *stimuli* and the physics of the process.

In supplementary information (Appendix 4-C) it is proven that such behaviour cannot be achieved for any discretisation. Indeed, the average value when commuting between $\bar{I}_E$ and $\bar{I}_D$

at the rate p ($p = h/L$ is the probability to be in the euphotic layer) cannot be the average light, unless the lower layer has a zero thickness ($p = 1$).

6.3 Alternative choice for caricatural signal

6.3.1 Variance computation

Instead of finding a framework representing the average light in each layer, we rather consider a criterion which may play a key role in the photosynthesis dynamics: the variance of the light signal. Indeed, light variance is also strongly constrained by the medium homogeneity and by light extinction rate. Computing the theoretical variance based on the pdf of I is straightforward (see Appendix 4-D):

$$\mathcal{V} = \int_{I_0}^{I_L} f_I(I)(I - \bar{I})^2 dI = \bar{I} \left[I_0 \frac{1 + \eta}{2} - \bar{I} \right] \quad (\text{IV-6})$$

It is worth remarking that the light variance is independent of the fluid velocity, but depends only on the light gradient through η .

It is worth noting that the simple on/off light pattern oscillating between I_0 and 0 at frequency p induces a much larger variance (2.7 times the actual variance on the example obtained for $\eta = 1\%$).

6.3.2 Signal with realistic variance

We propose therefore an alternative strategy. We thus relaxed the constrain (iii) on the realism of $\bar{I}_E$ and $\bar{I}_D$, and we replace it by (iiib) imposing the light intensity variance in agreement with the theoretical variance $\mathcal{V}$ given by equation (IV-6). In this new framework, I_E and I_D are no more assumed to represent the average light intensity within the discretisation layers.

There are infinite possibilities to compute I_E and I_D once p has been chosen (see Appendix 4-E), and we propose two possibilities.

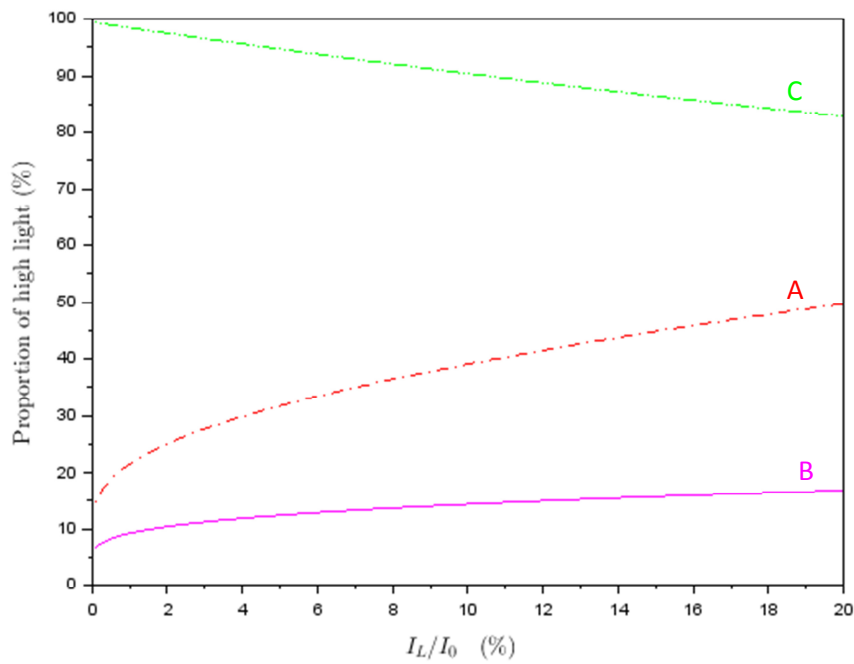


Figure IV-6: Proportion of high light (euphotic layer depth) with respect to $\eta=I_L/I_0$, for three different strategies. (A) Dash-dot red: strategy associated to commutation between I_0 and θ , (B) Continuous magenta: strategy with appropriate average light and standard deviation, with I_0 as maximum light (more adapted to study the energy dissipation mechanisms), and (C) Dotted green: in this case the depth of the dark layer (i.e. $1 - p$) is represented for a light pattern with appropriate average light and standard deviation, with 0 as lower light intensity.

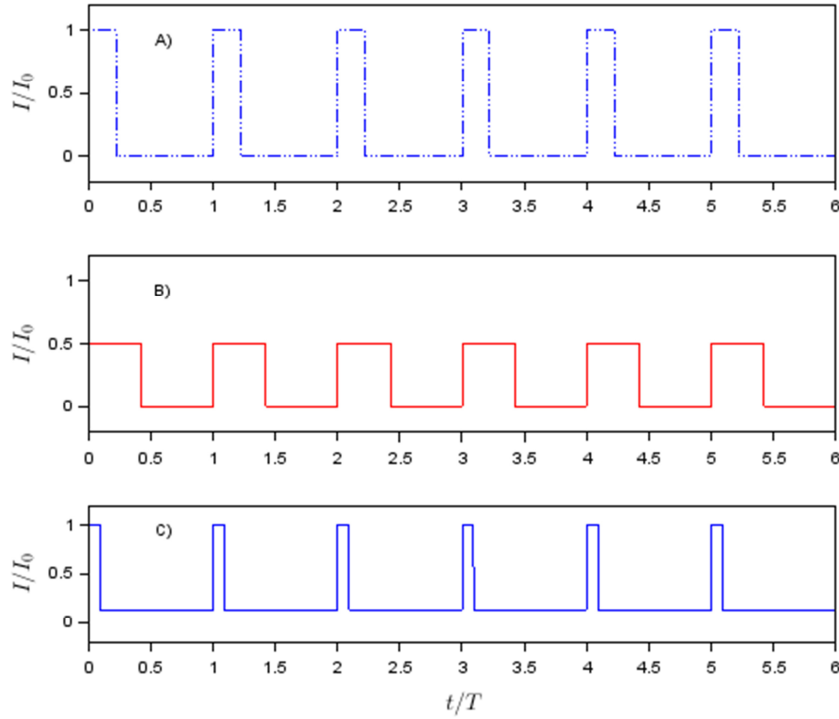


Figure IV-7: Caricature light pattern in agreement with actual light distribution for $I_L/I_0 = 0.01$. Three possible strategies are presented: **(A)** Simple strategy associated to a $I_0/0$ signal, with appropriate proportion of high light, **(B)** Light pattern with appropriate high light fraction, average light and standard deviation, with 0 as lower light intensity, and **(C)** Light pattern with appropriate high light fraction, average light and standard deviation, with I_0 as maximum light (more adapted to study energy dissipation through the xanthophyll cycles).

6.3.3 Switching between I_E and 0

For this first option, the upper light signal is taken as I_E . This approach is the simplest one since it corresponds to an on/off commutation. Here:

$$I_E = I_0 \frac{1 + \eta}{2} \text{ and } p = \frac{2\bar{I}}{I_0(1 + \eta)} \quad (\text{IV-7})$$

The resulting euphotic depth is presented on figure IV-6, and the typical light pattern appears on figure IV-7B.

6.3.4 Switching between I_0 and I_D

Here, the upper light signal is taken as I_0 . This approach is probably more relevant for experimental studies targeting photoinhibition studies stimulating the xanthophyll cycles since it faces the cells to the highest level that they may encounter. In this option:

$$I_D = -\frac{(1-\eta)^2}{2(1-\eta+\ln(\eta))}I_0 \text{ and } p = \frac{\bar{I} - I_D}{I_0 - I_D} \quad (\text{IV-8})$$

The resulting euphotic depth is presented on figure IV-6, and the typical light pattern appears on figure IV-7C. It is worth noting this approach generates duration of dark periods longer than what is generally carried out in classical light/dark experiments.

6.4 Towards realistic experiments

Lagrangian simulation is clearly the ideal route to study the effect of mixing on the efficiency of photon use. However, this requires a complex experimental set-up and makes experiments more difficult to run, combining fast light variation to long term experiments accounting for the cell photoacclimation. Moreover, better numerical schemes are expected to more accurately reconstruct the Lagrangian trajectory with a higher fidelity to the Navier-Stokes equations. Also, advanced nonlinear optics describing light field in a multidiffusive environment are expected to more accurately represent light distribution. The key challenge to decipher the link between productivity and mixing energy is to reconstruct the light pattern for different mixing intensities. The Lagrangian patterns must have inherent properties (average light, standard deviation) independent of the hydrodynamical regime. To date, no numerical model guarantees these properties when considering various mixing regimes. Using caricature light signal will thus still contribute to better understand photosynthesis in realistic conditions, provided that the high to low light exposure ratio is appropriately tuned with respect to the optical depth. Since this ratio strongly impacts NPQ through the xanthophyll cycles (Abu-Ghosh *et al.*, 2015), this could be an additional reason to work with denser cultures, where this ratio is lower.

7. Conclusion

The experiments, usually carried out with caricature piecewise constant light intensities, for studying the flashing effect in a dense culture are generally not coherent with the physics. There is no possibility to choose an appropriate combination between two light intensities respecting some key physical principles. In this approaches, the frequency of alternation between high and low light is both related to the underlying space discretisation and to the average fluid velocity. Reconstructing a realistic light pattern through a Lagrangian approach is therefore of the outmost importance to study microalgae in a laboratory environment coherent with the conditions that they will meet industrially. Such experiments for *Dunaliella salina* revealed complex behaviours, differing from previous on/off experiments and which are not explained by classical models. The trade-off between photosynthesis and photoprotection, through photoacclimation, seems to be differently triggered depending on the light signal period. More studies are therefore requested to understand the intracellular regulation mechanisms which appear in these highly variable environments. The chlorophyll content revealed highly depending on the rate of light change, and thus on fluid velocity. If such a result is confirmed, this would mean that there exists an optimal agitation rate, for which carotenoid production is enhanced. On the contrary, for some mixing regimes, cells may become more transparent. As a consequence it would lead to a higher biomass and thus a higher productivity (see Chapter VI). Experiments in high density cultures should now confirm these findings. This study highlights the original benefice of a multidisciplinary approach, where improving the fluid dynamics modelling will lead to a new generation of experiments emphasizing new acclimation mechanisms.

Que faut-il retenir ?



- Nous avons **reconstruit** un **motif typique de lumière** perçu par une cellule dans un raceway et avons soumis *Dunaliella salina* à ces signaux réalistes.
- La réponse du **taux de croissance** à un signal lumineux plus ou moins accéléré (représentant différentes vitesses de roue à aubes) **diffère de celle observée** avec des **cycles de lumière/obscurité caricaturaux**.



- Le **contenu pigmentaire** (chlorophylle *a* et caroténoïdes) est **positivement corrélé** au **taux de croissance**.
- Le compromis entre photoprotection et photosynthèse diffère en fonction des périodes du signal lumineux.



- Les mécanismes qui gouvernent la photoacclimation pour ces signaux réalistes devront être élucidés.
- Des signaux caricaturaux plus réalistes doivent être utilisés (proportion de forte lumière, moyenne, écart-type).



- Ces expériences originales devront être confirmées. **Elles illustrent toutefois l'intérêt de considérer des signaux lumineux réalistes**

Chapitre V

Effets de la composition spectrale sur la croissance et les mécanismes d'acclimatation de *Dunaliella salina*

“It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent, but rather the one most adaptable to change.”

Charles Robert Darwin (1809 – 1882)



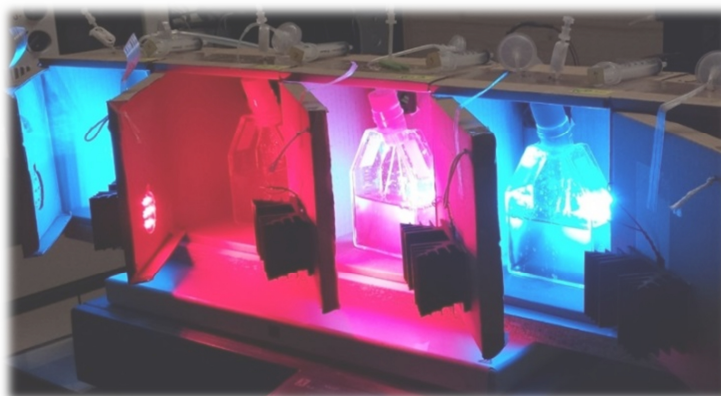
La compréhension de l'impact de la composition spectrale sur la croissance et, de ce fait, sur la productivité des microalgues revêt un enjeu important en vue d'optimiser leurs conditions de culture. Ce chapitre présente une analyse expérimentale de l'effet de la qualité spectrale sur la croissance et les mécanismes d'acclimatation de *Dunaliella salina*.

Sommaire

Préambule	155
1. Introduction	157
2. Matériels et méthodes	160
2.1 Microalgue et conditions de culture	160
2.2 Traitements lumineux	160
2.3 Conditions de pré-culture	164
2.4 Suivis de croissance en taille et en nombre	164
2.5 Extraction et analyse des pigments.....	165
2.6 Spectrophotométrie d'absorption <i>in vivo</i>	165
2.7 Détermination de la contribution des pigments non-photosynthétiques à l'absorption	166
2.8 Stœchiométrie élémentaire	167
2.9 Quantification des lipides par la méthode Nile Red	167
3. Résultats	169
3.1 Taux de croissance de <i>Dunaliella salina</i>	169
3.1.1 PUR équivalent.....	169
3.1.2 Effet de la variation du PUR	169
3.1.3 Expérience complémentaire	170
3.2 Contenu pigmentaire	171
3.2.1 PUR équivalent.....	171
3.2.2 Effet de la variation du PUR	174
3.3 Carbone et azote particuliers	175
3.4 Contenu en lipides neutres	176
3.4.1 PUR équivalent.....	176
3.4.2 Effet de la variation du PUR	176
3.5 Evolution de l'absorption et du PUR.....	176
4. Discussion	180
4.1 Effet de la composition spectrale sur la croissance cellulaire de <i>Dunaliella salina</i>	181
4.2 Effet du PUR et de la composition spectrale sur le cortège pigmentaire	185
4.2.1 Effet de l'évolution du PUR sur le cortège pigmentaire.....	185
4.2.2 Effet de la composition spectrale : mise en évidence d'une stratégie d'acclimatation chromatique chez <i>Dunaliella salina</i>	186
4.3 Effet de la composition spectrale sur le contenu en lipides neutres	189
5. Conclusion & perspectives	192

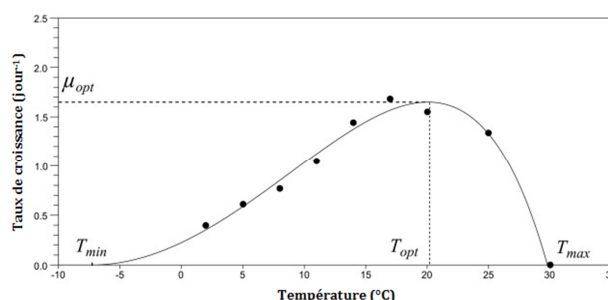
- Préambule -

Vers un projet biotechnologique : la culture sous serre photovoltaïque



La productivité des systèmes de culture de microalgues est étroitement liée à l'efficacité photosynthétique et, de ce fait, à l'accessibilité à la lumière. La lumière solaire est la source d'énergie la plus abondante et la plus distribuée sur terre. Lors de son trajet vers la Terre, le rayonnement solaire est partiellement absorbé en traversant l'atmosphère, pour atteindre une énergie moyenne annuelle de l'ordre de 170 W.m^{-2} à la surface du globe (Blankenship *et al.*, 2011). Les organismes photosynthétiques n'utilisent pas la totalité du spectre solaire pour leur croissance. Les radiations photosynthétiquement actives (communément appelées PAR pour *Photosynthetically Active Radiation*) se situent dans la bande visible (400–700 nm) du spectre électromagnétique. Seuls **35 à 45 %** des photons solaires sont exploités par la photosynthèse, la majorité des organismes autotrophes absorbant préférentiellement les **radiations rouges et bleues du spectre** (Kirk, 1983).

Malgré cela, le rayonnement incident distribué aux systèmes de culture 'classiques' de type raceway est parfois trop élevé en comparaison des capacités photosynthétiques des microalgues, ce qui conduit à des phénomènes de **photosaturation** voire de **photoinhibition**, qui tendent à réduire leur efficacité photosynthétique (Henley, 1993; Molina Grima *et al.*, 1996; Serôdio *et al.*, 2012). En outre, les fluctuations de température causées par les variations de l'intensité lumineuse reçue peuvent entraîner les microalgues loin de leur optimum de croissance et même induire une importante mortalité (Fig. A). Ces deux phénomènes réduisent les rendements photosynthétiques à seulement **2 ou 3%** de conversion de l'énergie solaire incidente, alors que le rendement maximum de la photosynthèse se situe plutôt autour de 10 % (Bernard & Rémond, 2012 ; Ras *et al.*, 2013).



Le projet Purple Sun

Ces considérations ont conduit à l'émergence du projet Purple Sun dans lequel s'inscrit la seconde partie de ce travail²⁰.

L'idée fondatrice de ce projet est d'optimiser l'utilisation du spectre solaire, en sélectionnant les photons utiles à la photosynthèse (grâce à des filtres photovoltaïques semi-transparentes) et en utilisant le rayonnement non utilisé par les microalgues pour la production d'énergie photo-électrique nécessaire au fonctionnement des cultures (Fig. B). La lumière filtrée ainsi distribuée aux bassins sous serre, réduite en intensité et dont la composition est adaptée aux besoins de la photosynthèse, devrait permettre de meilleurs rendements.

Ce projet requiert donc l'étude préalable de l'effet des longueurs d'ondes spécifiques sur la croissance des microalgues. Les conséquences de l'utilisation d'une lumière colorée ont encore été peu étudiées, bien que ce procédé présente un réel potentiel pour optimiser leur production.

L'une des premières étapes consiste en l'analyse de la capacité des micro-organismes photosynthétiques à croître sous une lumière spectralement filtrée.

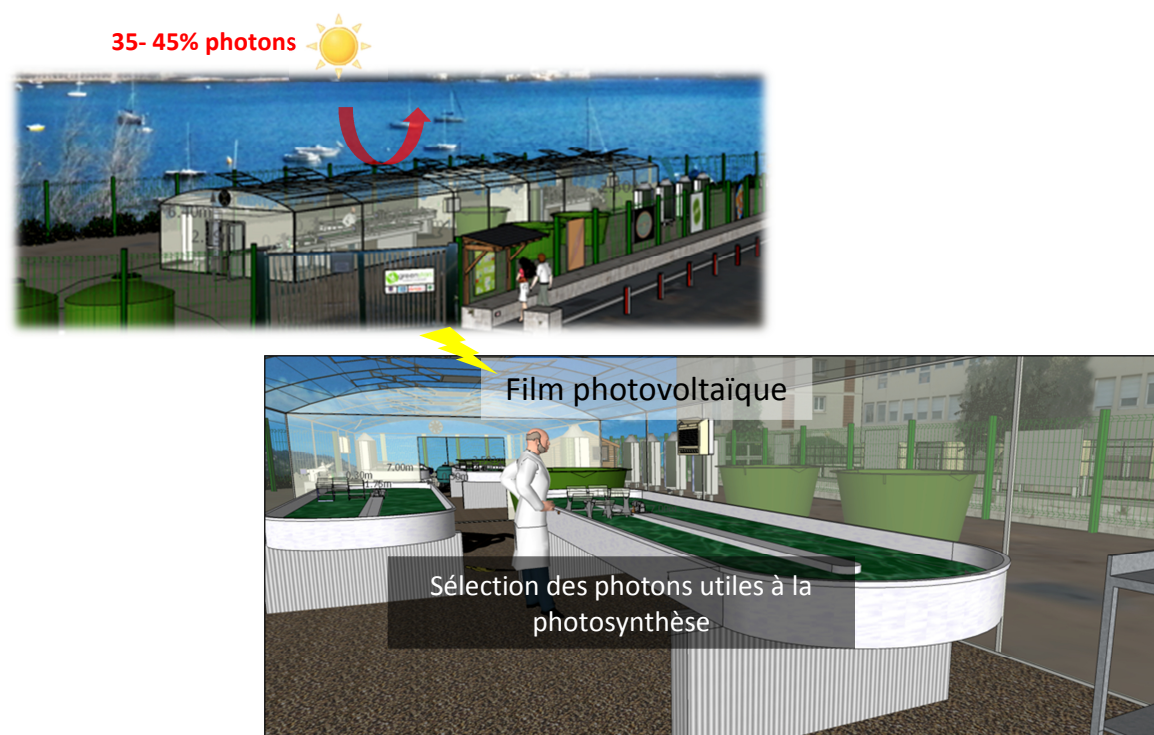


Figure B : Représentation schématique du système de culture sous serre photovoltaïque du projet Purple Sun. Dispositif envisagé pour la culture de microalgues permettant d'optimiser l'utilisation du spectre solaire en combinant la production de biomasse algale par photosynthèse et la production d'électricité photovoltaïque, pour un système à énergie positive. Représentations 3D réalisées par Mohamed Kahmla (2014).

²⁰ Une partie de ce travail a fait l'objet d'une communication grand public dans le journal Le Monde (avril 2014).

1. Introduction

De nombreux facteurs environnementaux, tels que la température (Geider, 1987 ; Berges *et al.*, 2002 ; Renaud *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2008), la disponibilité en nutriments (Ben-Amotz *et al.*, 1982 ; Lourenço *et al.*, 2002) ou encore la lumière (Reinke, 1883 ; Loeblich, 1982 ; Falkowski *et al.*, 1985 ; MacIntyre *et al.*, 2002) peuvent affecter de manière significative la physiologie des micro-organismes autotrophes et, au premier plan, leur photosynthèse. Bien que la majorité des études concernant la lumière se concentre sur l'effet de son intensité, le métabolisme des microalgues et leur croissance peuvent être affectés par sa composition spectrale (Wilhelm *et al.*, 1985 ; Morel *et al.*, 1987 ; Rivkin, 1989 ; Fu, 2012 ; Valle *et al.*, 2014).

Les microalgues captent les photons à l'aide de diverses familles de pigments (Kirk, 1994; Falkowski & Raven, 1997; Falkowski *et al.*, 2004), qui absorbent au sein de régions spécifiques du spectre lumineux. La variété de pigments permet donc aux microalgues d'utiliser différentes gammes de longueurs d'ondes (Engelmann, 1883 ; Bricaud *et al.*, 1983 ; Wood, 1985 ; Falkowski *et al.*, 2004). Le cortège pigmentaire d'une espèce détermine alors les parties du spectre lumineux qu'elle peut utiliser, que l'on peut définir en mesurant son spectre d'absorption.

Comme tous les micro-organismes photosynthétiques, *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) possède de la chlorophylle *a*, qui se caractérise par deux pics d'absorption, avec des *maxima* situés dans la région bleue (environ 430 nm) et la région rouge (environ 680 nm) du spectre lumineux. La chlorophylle *a* est associée, dans les antennes collectrices du photosystème II, à des pigments dits accessoires qui permettent d'étendre la gamme de lumière utilisable (Govindjee & Govindjee, 1974; Jahns & Holzwarth, 2012). *Dunaliella salina* contient de la chlorophylle *b*, qui absorbe à environ 470 nm et 660 nm, ainsi que des caroténoïdes, tels que du β -carotène et de la lutéine (Denery *et al.*, 2004), qui présentent une gamme d'absorption dans le bleu, entre 400 et 530 nm (Roy *et al.*, 2011). Outre leur rôle dans les processus de capture et de transfert de l'énergie lumineuse, les caroténoïdes assurent également un rôle de photoprotection de l'appareil photosynthétique afin de prévenir les dommages photooxydatifs (Siefermann-Harms, 1987 ; Rise *et al.*, 1994). En particulier, *Dunaliella salina* peut, en conditions de stress lumineux ou nutritif par exemple, accumuler de grandes quantités de β -carotène (jusqu'à 14% de son poids sec, au sein de vésicules lipidiques ; Ben-Amotz & Avron, 1983 ; García *et al.*, 2007 ; Lamers *et al.*, 2010). Cette surproduction confère à cette espèce une résistance significative à la photoinhibition (Ben-Amotz *et al.*, 1989).

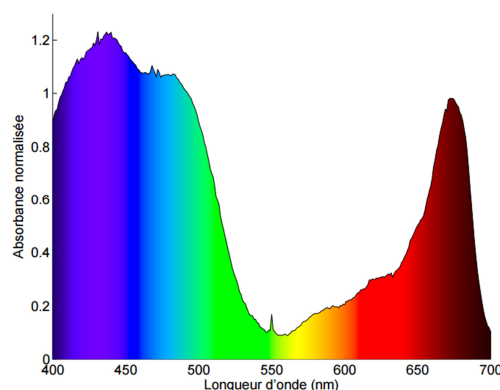


Figure V-1 : Spectre d'absorption *in vivo* (normalisé) d'une suspension de *Dunaliella salina*.

Ce contenu intracellulaire pigmentaire et leur proportion relative peuvent être influencés par l'intensité lumineuse (photoacclimatation (Falkowski & Laroche, 1991)) ainsi que par la composition spectrale. De nombreuses espèces de cyanobactéries modifient ainsi leur cortège pigmentaire en réponse à une modification du spectre lumineux, par un processus connu sous le terme d'adaptation chromatique dite complémentaire (Gaidukov, 1902 ; Boresch, 1921 ; Tandeau de Marsac, 1977; Grossman *et al.*, 1993; Kehoe & Gutu, 2006 ; Stomp *et al.*, 2007). Exposées à de la lumière verte, les cellules synthétisent de la phycoérythrine et deviennent rouges. Sous une lumière rouge, elles synthétisent de la phycocyanine et deviennent vertes. Mais nombreuses sont les études qui présentent des résultats divergents chez d'autres taxons (voir annexe 1). La majorité d'entre elles comparent les effets de différentes longueurs d'ondes sur le contenu pigmentaire et la croissance des microalgues cultivées à PAR constant. Ces études ne permettent donc pas de prendre en compte de manière rigoureuse la contribution des photons effectivement captés par les pigments. En effet, les espèces de microalgues absorbant différemment les longueurs d'ondes du PAR, il est préférable d'étudier les effets du spectre lumineux en considérant les photons réellement captés, c'est-à-dire en prenant en compte leur spectre d'absorption (Wilhelm *et al.*, 1985 ; Gostan *et al.*, 1986 ; Glover *et al.*, 1987 ; Morel *et al.*, 1987 ; Rivkin, 1989 ; Nielsen & Sakshaug, 1993 ; Schellenberger *et al.*, 2013 ; Brunet *et al.*, 2014 ; Jungandreas *et al.*, 2014 ; Valle *et al.*, 2014).

Dans cette étude, nous avons analysé la réponse de *Dunaliella salina* à des lumières de différentes compositions spectrales. Des cultures en turbidostat ont été utilisées pour suivre l'effet à long terme de lumières blanche, bleue, verte et rouge sur son taux de croissance et sur certaines de ses propriétés physiologiques, telles que sa teneur en pigments, sa productivité en lipides et sa composition élémentaire en azote et carbone. Les expériences ont été conduites avec des cultures faiblement concentrées, afin de limiter au maximum les phénomènes d'auto-

ombrage et les gradients lumineux. Le dispositif d'éclairage a été réglé de façon que, pour chaque couleur d'éclairement, les cultures absorbent une quantité similaire de photons. Au lieu d'appliquer un PAR constant, nous avons donc travaillé à PUR constant (de l'anglais, *Photosynthetically Usable Radiation* ; Morel, 1978). Enfin, nous avons défini un PUR dit "épuré" pour tenir compte des photons dont l'énergie, absorbée par les pigments photoprotectants et non transmise à la chlorophylle *a*, ne contribue pas à la photosynthèse (Butler, 1978). Pour chaque couleur d'éclairement, deux intensités lumineuses ont été appliquées pour en caractériser l'influence.

2. Matériels et méthodes

2.1 Microalgue et conditions de culture

Dunaliella salina (CCAP 18/19) a été cultivée au sein de quatre photobioréacteurs cylindriques (Fig. V-2). Le milieu de culture f/2 utilisé (Guillard & Ryther, 1962 ; Guillard, 1975) a été préparé selon le protocole décrit au chapitre II (§II-1.2), à une salinité de 38 g.L⁻¹. Les cultures ont été conservées à une température constante de 27°C (± 0,1°C) et leur homogénéité assurée par un barreau magnétique ainsi que par un bullage d'air. Le pH a été maintenu à 8,3 (± 0,1) par injection contrôlée de CO₂ suivant le protocole développé par Sciandra *et al.* (2003).

Les expériences ont été menées en mode turbidostat à faible concentration cellulaire (entre 2.10⁵ cellules.mL⁻¹ et 2,5.10⁵ cellules.mL⁻¹) afin d'assurer une distribution homogène de la lumière en intensité et en qualité au sein des cultures. Par ailleurs, ce mode de culture génère des conditions de croissance non limitées par les ressources nutritives. Un capteur de turbidité, développé spécifiquement pour cette étude, est connecté à un ordinateur qui contrôle le niveau de biomasse et maintient sa concentration constante par dilutions contrôlées de la culture avec du milieu frais. Ainsi, dès que la turbidité dépasse la valeur de consigne fixée, un signal actionne la pompe d'apport du milieu afin de diluer la culture et maintenir la turbidité constante.

Les descriptions détaillées du photobioréacteur cylindrique et du système de contrôle automatique de la turbidité, auquel une partie de ce travail a été consacrée, sont présentées respectivement aux paragraphes II-2.1.1 et II-2.3.2 du chapitre II.

Le taux de dilution D , contrôlé quotidiennement par pesée du milieu entrant, a varié de 0,26 jour⁻¹ (bleu) à 0,88 jour⁻¹ (rouge). Les coefficients de variation (CV) des taux de dilution durant l'intégralité de l'expérience ont été inférieurs à 9 %.

2.2 Traitements lumineux

Les photobioréacteurs ont été fixés au centre de dispositifs de lumière en châssis, composés de six modules de LED blanches à haute puissance (LED SmartArray, à 12 LED Nichia, 6W, Lumitronix) (voir §II-2.2.1). La lumière a été modifiée par l'ajout de filtres colorés en polyester (Eurofilter) disposés entre les LED blanches et le photobioréacteur.

Chaque culture a ainsi été éclairée de manière homogène par une lumière continue blanche, bleue, verte ou rouge.

La densité du flux de photons incident (PAR_{in} en $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a été mesurée dans la culture à l'aide d'un quantamètre 2π sphérique (Biospherical Instruments QSL-100) immergé en cinq points distincts de chaque photobioréacteur. La différence entre les intensités lumineuses mesurées à ces cinq localisations a été inférieure à 5%, attestant de la bonne homogénéité des conditions d'éclairement au sein des réacteurs. Ces intensités sont restées stables durant l'expérience. Les spectres des différentes lumières ($PAR_{in}(\lambda)$) ont été mesurés à l'aide d'un radiospectromètre (OCEAN OPTICS USB4000-UV-VIS) disposé contre la paroi interne de chaque photobioréacteur.

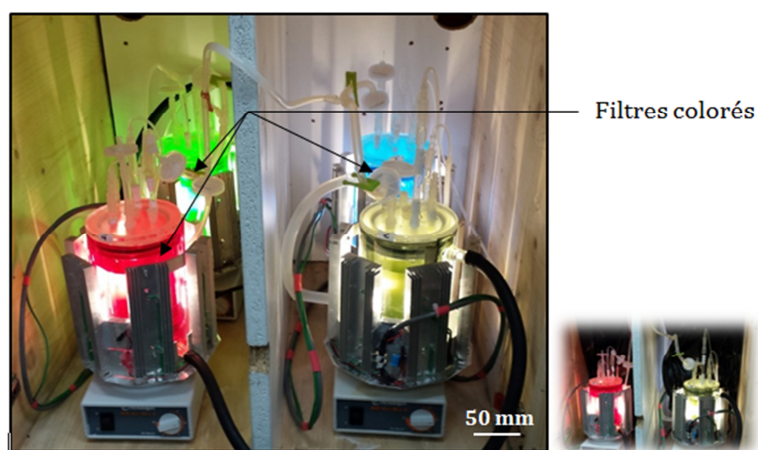


Figure V-2 : Dispositif de culture en lumières colorées. Les quatre photobioréacteurs cylindriques sont pourvus de filtres externes qui permettent d'obtenir des éclairagements homogènes de quatre couleurs : blanc, rouge, vert et bleu. Les LED sont connectées à une interface de communication (LabJack U12) qui contrôle un driver (LPF-60D-36, Meanwell) permettant de réguler l'intensité lumineuse (PAR_{out}). Une toile noire positionnée dans chaque compartiment de la boîte expérimentale, entre les photobioréacteurs, permet d'isoler chaque culture de toute perturbation lumineuse externe (photo de droite).

Pour chaque couleur testée, le PAR_{in} à appliquer a été déterminé afin que les cultures absorbent le même nombre de photons au début de l'expérience (T_0). Le voltage envoyé aux LED (PAR_{out}) a ensuite été ajusté pour chaque photobioréacteur afin d'atteindre cette valeur.

Le PUR, qui correspond à l'énergie incidente réellement absorbée par une cellule microalgale (Morel, 1978 ; Gostan *et al.*, 1986 ; Morel *et al.*, 1987), est défini par :

$$PUR = \int_{400}^{700} PAR_{in}(\lambda) A_n(\lambda) d\lambda \quad (V-1)$$

avec $PAR_{in}(\lambda)$, l'énergie délivrée par le spectre d'émission de la lumière incidente ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et $A_n(\lambda)$ (adimensionnel), une fonction de pondération décrivant la probabilité qu'un photon de longueur d'onde λ soit absorbé par la microalgue.

$A_n(\lambda)$ correspond ici au spectre d'absorption *in vivo* d'une suspension de 2.10^5 cellules.mL⁻¹ de *D. salina*, normalisé par le pic de chlorophylle *a* ($\lambda=680$ nm) fixé à 0,7. Cette valeur correspond au rapport entre l'absorbance mesurée à 440 nm et celle mesurée à 680 nm, traditionnellement observé chez cette espèce.

Pour définir les conditions d'éclairement dans les quatre expériences, le PUR théorique initial (PUR_{i0}) a été calculé pour toutes les couleurs d'éclairement au moyen d'un même et unique spectre d'absorption de *Dunaliella salina*, présenté en figure V-3B. Nous verrons plus loin que le PUR a pu varier différemment dans chaque expérience en raison d'un changement des compositions pigmentaires respectives. Des spectres d'absorption ont donc été mesurés quotidiennement à l'état d'équilibre pour chaque condition d'éclairement, lesquels ont permis de calculer, *a posteriori*, le PUR_{eq} (calculé selon l'équation (V-1)), correspondant au nombre de photons réellement absorbés par les microalgues à l'équilibre (tableau I).

Deux séries d'expériences ont été réalisées successivement, en duplicats et durant au moins neuf jours (tableau I). La première expérience a été menée avec un PUR équivalent pour les quatre conditions d'éclairement ($PUR_{i0} = 95 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) correspondant à des valeurs de PAR incident de 240, 159, 254 et 229 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ respectivement pour les lumières blanche, bleue, verte et rouge. La figure V-3A présente la distribution spectrale du $PAR(\lambda)$ et du PUR correspondant des quatre conditions chromatiques.

La seconde expérience a permis de tester l'effet d'autres valeurs de PUR pour chacune des quatre couleurs. Les cultures ont cette fois été soumises à des PUR_{i0} de 33, 322, 70 et 95 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ respectivement pour les lumières blanche, bleue, verte et rouge, correspondant à différentes valeurs de PAR. Les résultats de cette expérience sont présentés en fonction du pourcentage d'augmentation du PUR pour chaque couleur d'éclairement. La culture conduite avec la lumière rouge, s'étant déroulée dans les mêmes conditions que lors de la première expérience, sert de témoin pour mesurer la reproductibilité des résultats.

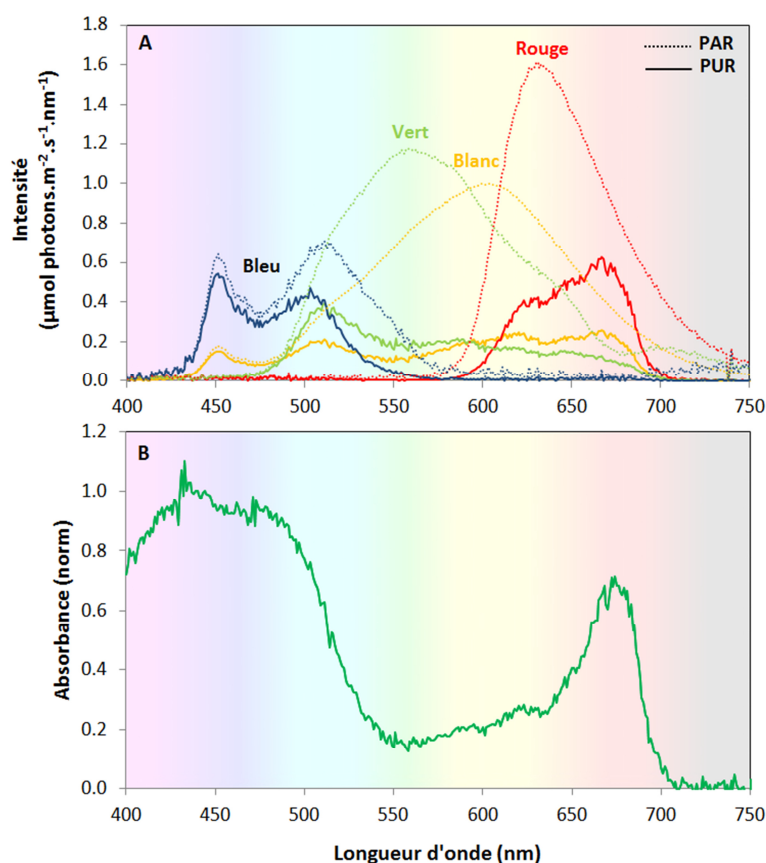


Figure V-3 : (A) Spectres d'émission des quatre lumières testées (blanc, bleu, vert, rouge) lors de l'expérience 1. Pour chaque couleur d'éclairement, les lignes continues représentent les spectres des radiations photosynthétiquement utilisables (PUR). Les valeurs intégrées (aires sous les courbes) sont équivalentes ($95 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) quelle que soit la couleur de la lumière. Les valeurs de $\text{PAR}(\lambda)$ correspondantes sont représentées par une ligne pointillée. Les rapports PAR : PUR (valeurs intégrées) sont de 2,53, 1,67, 2,67 et 2,41 pour la lumière blanche, bleue, verte et rouge respectivement. Ces rapports ont été déterminés à partir d'un $\text{PAR}(\lambda)$ initial, mesuré pour chaque couleur à l'intérieur de chaque photobioréacteur. **(B) Spectre d'absorption *in vivo*, normalisé ($(A_{\text{max}})_{680}=0,7$), de l'inoculum de *Dunaliella salina* ayant servi à inoculer les cultures.**

D. salina a préalablement été cultivée durant 15 jours sous une lumière blanche continue à une intensité (PUR) de $40 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ce spectre a été utilisé pour calculer le PUR.

Tableau I : Conditions lumineuses testées. *Dunaliella salina* a été éclairée à l'aide d'une lumière colorée générée de manière continue. Chaque condition lumineuse a été testée en duplicats. Avec PUR_{t0} , le PUR théorique initial et PUR_{eq} , le PUR moyen à l'équilibre ($\pm$ SD, n=24).

Expérience	Conditions lumineuses	Code	PAR ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	PUR_{t0} ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	PUR_{eq} ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
1	Blanc	Blanc ₉₅	240 ± 12	95	$104 \pm 8,12$
	Bleu	Bleu ₉₅	$159 \pm 7,9$	95	$106 \pm 4,92$
	Vert	Vert ₉₅	$254 \pm 12,7$	95	$100 \pm 8,5$
	Rouge	Rouge _{95a}	$229 \pm 11,5$	95	$99 \pm 8,86$
2	Blanc	Blanc ₃₃	$84 \pm 4,1$	33	$42 \pm 3,20$
	Bleu	Bleu ₃₂₂	$537 \pm 26,9$	322	$402 \pm 8,47$
	Vert	Vert ₇₀	$187 \pm 9,4$	70	$80 \pm 3,88$
	Rouge	Rouge _{95b}	$229 \pm 11,5$	95	$98 \pm 4,78$

2.3 Conditions de pré-culture

Les microalgues ont été préalablement acclimatées aux conditions expérimentales au sein du dispositif de culture décrit précédemment. Les pré-cultures ont été maintenues en phase exponentielle de croissance, durant 15 jours avant le début de l'expérience, en lumière continue blanche à une intensité (PAR) de $100 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($PUR \approx 40 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

2.4 Suivis de croissance en taille et en nombre

Après inoculation, l'abondance et la taille des cellules ont été mesurées en triplicats deux fois par jour (HIAC/ROYCO 9700 Pacific Scientific Instruments). A l'équilibre, les moyennes journalières des abondances cellulaires dans les cultures sont restées stables tout au long de l'expérience.

À l'état stable en turbidostat, le taux de croissance spécifique (μ , jour^{-1}) est égal au taux de dilution D . Le volume de la culture (mL) étant constant, le volume de milieu frais apporté chaque jour (i.e. débit du flux entrant Q_{in} (mL.jour^{-1})) a permis de calculer, toutes les 24 heures, le taux de dilution, selon la formule suivante :

$$\mu = D = \frac{Q_{in}}{V_{culture}} \quad (\text{V-2})$$

2.5 Extraction et analyse des pigments

Les concentrations en pigments (pg.cell^{-1}) ont été déterminées à partir de triplicats de 5 mL de culture. Les pigments retenus sur les filtres ont été extraits à l'aide de 4 mL d'acétone à 90%. Les absorbances ont été mesurées selon le protocole présenté au chapitre II (§II-3.2.1).

Une expérience préliminaire a été réalisée afin de déterminer la cinétique d'acclimatation de *Dunaliella salina* aux différentes conditions expérimentales (données non présentées). D'après cette expérience, une période d'acclimatation de 3 jours a été observée pour chaque condition d'éclairement avant que le contenu pigmentaire atteigne un équilibre. Le dosage des pigments a ainsi été effectué quotidiennement à l'équilibre, après 5 jours de culture, pour l'expérience 1. Lors de la seconde expérience, les temps d'acclimatation ont été vérifiés par le suivi de la cinétique d'accumulation de chlorophylle *a*, dès le premier jour de culture.

La composition pigmentaire est présentée sous forme de moyennes entre les réplicats expérimentaux, calculées sur 5 jours, une fois l'équilibre atteint ($n = 30$).

2.6 Spectrophotométrie d'absorption *in vivo*

Les mesures d'absorbance ont été effectuées en triplicats à une concentration finale de $2.10^5 \text{ cellules.mL}^{-1}$ dans une cuvette de 0,01 m de chemin optique suivant le protocole développé au chapitre II (voir §II-3.2.2).

Le coefficient d'absorption $a(\lambda)$ (m^{-1}) a été calculé à partir de l'absorbance $A(\lambda)$, mesurée sur un échantillon placé dans la cuvette de largeur l selon l'égalité suivante :

$$a(\lambda) = 2,303. A(\lambda)/l \quad (\text{V-3})$$

Le coefficient d'absorption spécifique des pigments, $a^*(\lambda)$ ($\text{m}^2.\text{mg}^{-1}$) a été calculé selon la formule suivante (Bricaud *et al.*, 1983 ; Cosgrove & Borowitzka, 2010) :

$$a^*(\lambda) = a(\lambda)/C \quad (\text{V-4})$$

Où C est la concentration du pigment dans l'échantillon (mg.m^{-3}).

2.7 Détermination de la contribution relative des pigments photosynthétiques et non-photosynthétiques à l'absorption : 'PUR épuré'

Dans un premier temps, les résultats de cette étude ont été analysés en fonction de la quantité de photons absorbés par les cellules (PUR). Dans un second temps, afin d'affiner l'interprétation des résultats, la part de l'absorption due aux pigments photoprotectants non photosynthétiques a été caractérisée pour chaque PUR afin de déterminer un PUR dit épuré. Notre calcul du PUR épuré suppose que la totalité des caroténoïdes sont uniquement photoprotectants (Bidigare *et al.*, 1987). Les caroténoïdes totaux sont représentés ici par le β -carotène.

$$PUR_{\text{épuré}} = \int_{400}^{700} PAR(\lambda) A_{\text{épuré}}(\lambda) d\lambda \quad (\text{V-5})$$

$$A_{\text{épuré}}(\lambda) = a(\lambda) - a_{\text{carot}}^*(\lambda) C_{\text{carot}} \quad (\text{V-6})$$

avec $a(\lambda)$, le coefficient d'absorption de l'échantillon (m^{-1}), a_{carot}^* , le coefficient d'absorption spécifique du β -carotène ($\text{m}^2.\text{mg}^{-1}$), calculé selon l'équation (V-4) et C_{carot} , la concentration des caroténoïdes dans l'échantillon ($\text{mg}.\text{m}^{-3}$). Ce calcul dépend de $A(\lambda)$ et peut donc changer avec l'acclimatation chromatique.

Un décalage existe entre les *maxima* d'absorption du β -carotène mesurés *in vivo* et *in vitro*. Son spectre d'absorption spécifique *in vivo* a ainsi été reconstruit d'après la formulation de Bidigare *et al.* (1990).

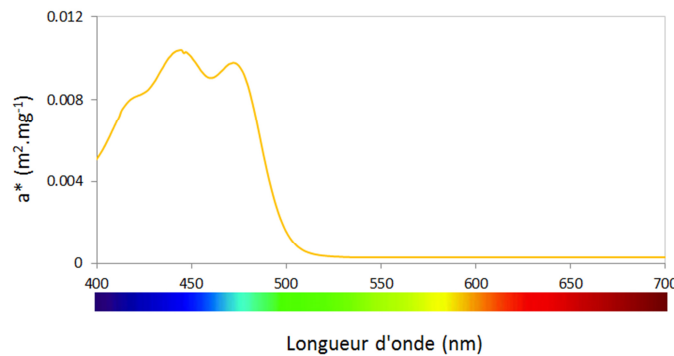


Figure V-4 : Spectre d'absorption spécifique a^* ($\text{m}^2.\text{mg}^{-1}$) du β -carotène *in vivo*.

2.8 Stœchiométrie élémentaire

Les quotas cellulaires (pmol.cell^{-1}) en carbone et en azote particuliers ont été déterminés quotidiennement à partir de duplicats de 5 mL, à partir du 5^{ème} jour de culture, à l'équilibre, selon le protocole présenté au chapitre II (§II-3.3). Les quotas sont présentés sous forme de moyennes entre les réplicats, calculées sur 5 jours, à l'état stable ($n=20$).

2.9 Quantification des lipides par la méthode Nile Red

Le contenu en lipides neutres (triglycérides) a été estimé quotidiennement en triplicats à partir du 5^{ème} jour, à l'équilibre, à l'aide de la technique de marquage au Nile Red décrite au chapitre II (§II-3.4).

2.10 Statistiques

Afin d'étudier l'impact de la composition spectrale, les données des quatre couleurs d'éclairement de PUR équivalent ont fait l'objet d'une analyse de variance à un critère de classification (ANOVA), suivie d'un test post-hoc HSD (honestly significant difference) de Tukey, après en avoir vérifié les conditions d'application. Pour chaque couleur d'éclairement, les deux PUR testés ont été comparés par un test t de Student. Les différences ont été considérées comme significatives pour $P < 0,05$.

Expérience complémentaire

Afin de tester des hypothèses supplémentaires concernant l'impact du spectre lumineux sur la croissance, une expérience complémentaire a été réalisée. *Dunaliella salina* a été cultivée dans du milieu f/2, en fed-batch, au sein de flasques de polycarbonate de 200 mL disposées dans des compartiments clos. Les flasques ont été éclairées à l'aide d'une, ou de deux platines circulaires (diamètre 40 mm) contenant 7 LED blanches (Nichia NVSL219BT, 435-735 nm), bleues (Luxeon Rebel, 470 nm) ou rouges (Luxeon Rebel, 680 nm). Les cultures ont ainsi été exposées à une lumière continue blanche, bleue, rouge ou violette (platine rouge + platine bleue) à une intensité (PAR) constante de $500 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig. V-5 et Fig. V-6). Des mesures quotidiennes de l'abondance cellulaire ont été effectuées durant 60 jours.

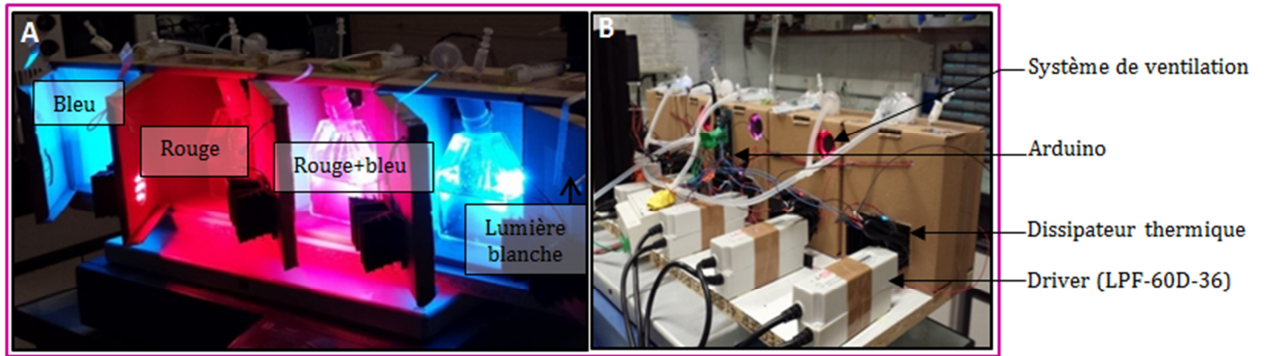


Figure V-5 : Dispositif expérimental (A) vue de face, (B) vue de dos. Les LED sont connectées à un microcontrôleur (Arduino Mega 2560) permettant de contrôler avec précision le flux de photons.

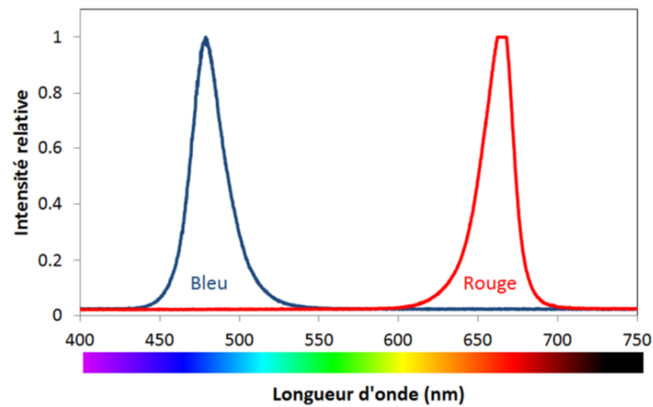


Figure V-6 : Spectres d'émission des LED bleues et rouges présentant des *maxima* respectivement à 470 et 680 nm.

3. Résultats

Pour chaque condition d'éclairement, les expériences ont montré une bonne reproductibilité entre les réplicats. Sauf indication contraire, les résultats sont présentés sous forme de moyennes entre ces réplicats.

3.1 Taux de croissance de *Dunaliella salina*

Les taux de croissance obtenus pour chaque condition lumineuse sont présentés dans le tableau II.

3.1.1 PUR équivalent

Sous les lumières rouge, blanche et verte, et pour un PUR similaire, le taux de croissance spécifique est respectivement de $0,46 \pm 0,049$, $0,48 \pm 0,038$ et $0,54 \pm 0,042$ jour⁻¹ (n=16) (i.e 1,6 à 2 fois plus élevés que celui observé en lumière bleue). Ces taux de croissance ne sont pas significativement différents entre eux. Par contre, *Dunaliella salina* présente un taux de croissance spécifique plus faible ($0,29 \pm 0,024$ jour⁻¹ (n= 16)), lorsqu'elle est éclairée par la lumière bleue. Ce taux de croissance est significativement inférieur, au seuil de 5%, à celui observé pour les autres spectres lumineux ($\alpha = 0,05$, $F_{0,05,3,61} = 3,49$, $F = 19,56$, $P < 0,05$). Les diamètres des cellules (n=16) ne sont pas significativement différents selon la couleur d'éclairement.

3.1.2 Effet de la variation du PUR

Pour chaque couleur, la croissance de *Dunaliella salina* a également été impactée par le nombre de photons absorbés. Les taux de croissance sous des lumières bleue, blanche et verte sont significativement différents selon le PUR ($t = 4,12$, $P < 0,05$). L'augmentation du PUR se traduit par une augmentation significative du taux de croissance, et ce pour les trois couleurs d'éclairement (Tableau II). Le taux de croissance mesuré en lumière rouge ne présente pas de différence significative entre les deux expériences, ce qui atteste de la robustesse des résultats.

Tableau II : Taux de croissance spécifique (μ , jour⁻¹) et diamètre cellulaire moyen (μ m) de *Dunaliella salina* en fonction de la qualité spectrale et du PUR calculé à l'équilibre (PUR_{eq}, μ mol photons.m⁻².s⁻¹). Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes entre les réplicats ($\pm$ SD, n=16). Les lettres a et b indiquent une différence significative entre les moyennes de PUR équivalent (ANOVA, test de Tukey, P<0,05). Les astérisques (*, **) indiquent une différence significative entre les deux PUR testés (test t, P<0,05).

Condition lumineuse	PUR _{eq} (μ mol photons.m ⁻² .s ⁻¹)	μ (jour ⁻¹)	Diamètre cellulaire (μ m)
Blanc ₉₅	104 $\pm$ 8,12	0,48 $\pm$ 0,04 ^{a,*}	8,13 $\pm$ 0,11 ^{a,*}
Bleu ₉₅	106 $\pm$ 4,92	0,29 $\pm$ 0,024 ^{b,*}	8,27 $\pm$ 0,13 ^{a,*}
Vert ₉₅	100 $\pm$ 12,5	0,54 $\pm$ 0,04 ^{a,*}	8,14 $\pm$ 0,10 ^{a,*}
Rouge _{95a}	99 $\pm$ 8,86	0,46 $\pm$ 0,05 ^{a,*}	8,07 $\pm$ 0,10 ^{a,*}
Blanc ₃₃	42 $\pm$ 3,20	0,38 $\pm$ 0,05 ^{**}	8,23 $\pm$ 0,17 [*]
Bleu ₃₂₂	402 $\pm$ 8,47	0,75 $\pm$ 0,05 ^{**}	8,50 $\pm$ 0,33 [*]
Vert ₇₀	80 $\pm$ 3,88	0,47 $\pm$ 0,04 ^{**}	8,29 $\pm$ 0,26 [*]
Rouge _{95b}	98 $\pm$ 4,78	0,45 $\pm$ 0,04 [*]	8,09 $\pm$ 0,21 [*]

3.1.3 Expérience complémentaire

La figure V-7 présente le taux de croissance spécifique de *Dunaliella salina* en fonction du PUR pour les différents éclairagements. Ce taux ne diffère pas significativement entre les lumières rouge, blanche et violette ($\alpha = 0,05$, $F_{0,05,2,15}=2,8$, $P=0,11$). En revanche, la lumière bleue, qui correspond au PUR le plus élevé, induit un taux de croissance significativement plus faible que les couleurs précédentes ($\mu=0,74 \pm 0,021$ jour⁻¹ (n=6)).

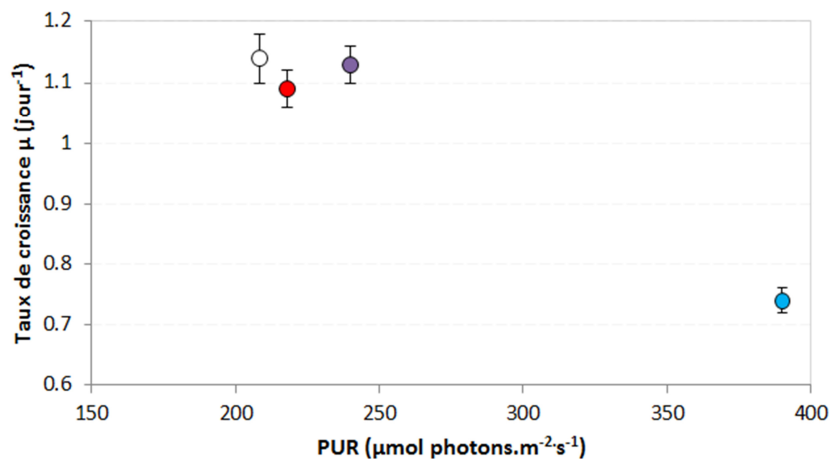


Figure V-7 : Evolution du taux de croissance de *Dunaliella salina* (jour⁻¹) en fonction du PUR (μ mol photons.m⁻².s⁻¹) pour les différentes couleurs testées. Les cultures ont été soumises à un même PAR (500 μ mol photons.m⁻².s⁻¹).

3.2 Contenu pigmentaire

Le tableau IV synthétise les principaux résultats des expériences de mesure de la composition cellulaire de *Dunaliella salina* : pigments, carbone et azote et rapports C : N, pigments : Chl *a*, pigments : C et lipides : C.

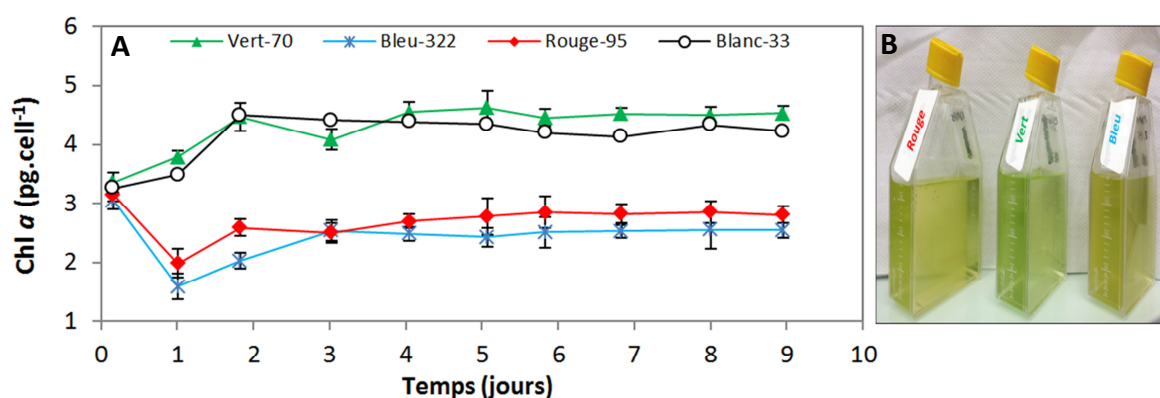


Figure V-8 : (A) Evolution du contenu en chlorophylle *a* (pg.cell⁻¹) de *Dunaliella salina* cultivée en turbidostat et exposée à différents spectres et intensités lumineuses (voir tableau I pour la définition des codes). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes entre les duplicats (±SD, n=6), (B) Photographie des cultures (après 10 jours de traitement sous des lumières rouge, verte et bleue) mettant en évidence leur couleur verte (lumière verte) ou orangée (lumières rouge et bleue).

Pour toutes les conditions d'éclairage, le contenu cellulaire en Chl *a* se stabilise après trois jours de culture (Fig.V-8).

3.2.1 PUR équivalent

Pour l'expérience menée à PUR équivalent, la teneur en Chl *a*, qu'elle soit exprimée par cellule ou par unité de carbone (Chl *a* : C), a été affectée par la couleur de la lumière (Fig. V-9A et V-9B).

A l'équilibre, le contenu cellulaire en Chl *a* est significativement supérieur en lumières verte et bleue (environ 4,4 pg.cell⁻¹) à celui observé sous une lumière blanche (3,56 ± 0,23 pg.cell⁻¹) ou rouge (2,87 ± 0,23 pg.cell⁻¹), à PUR équivalent. Sous une lumière rouge, le contenu en Chl *a* est significativement inférieur aux trois autres conditions lumineuses ($\alpha = 0,05$, $F_{0,05,3,27} = 4,07$, $F=85,6$, $P<0,05$). Sous des lumières verte et bleue, *Dunaliella salina* contient en moyenne 24% et 53% de Chl *a* en plus que sous des lumières blanche et rouge respectivement. En lumière rouge, les cellules contiennent 19 % de Chl *a* en moins que sous

une lumière blanche (Fig. V-9A). La même tendance est observée pour le rapport Chl *a* : C. Ce dernier varie de $0,029 \pm 0,0038$ (rouge) à $0,051 \pm 0,0026$ (bleu) (Fig. V-9B).

Les résultats présentés en figures V-9C et V-9D mettent également en évidence une différence du contenu en caroténoïdes par unité de carbone (Car : C) et par unité de chlorophylle *a* (Car : Chl *a*) selon les conditions d'éclairement. A l'équilibre, le rapport Car : C mesuré en lumière verte est statistiquement inférieur à celui des trois autres conditions lumineuses ($\alpha = 0,05$, $F_{0,05,3,27} = 4,07$, $F=390$, $P<0,05$). *D. salina* présente le rapport Car : Chl *a* le plus élevé sous une lumière rouge (i.e. 22%, 64% et 103% plus élevé que sous une lumière blanche, bleue et verte respectivement). En lumière verte, ce rapport est 40% plus faible que sous une lumière blanche (Fig. V-9D).

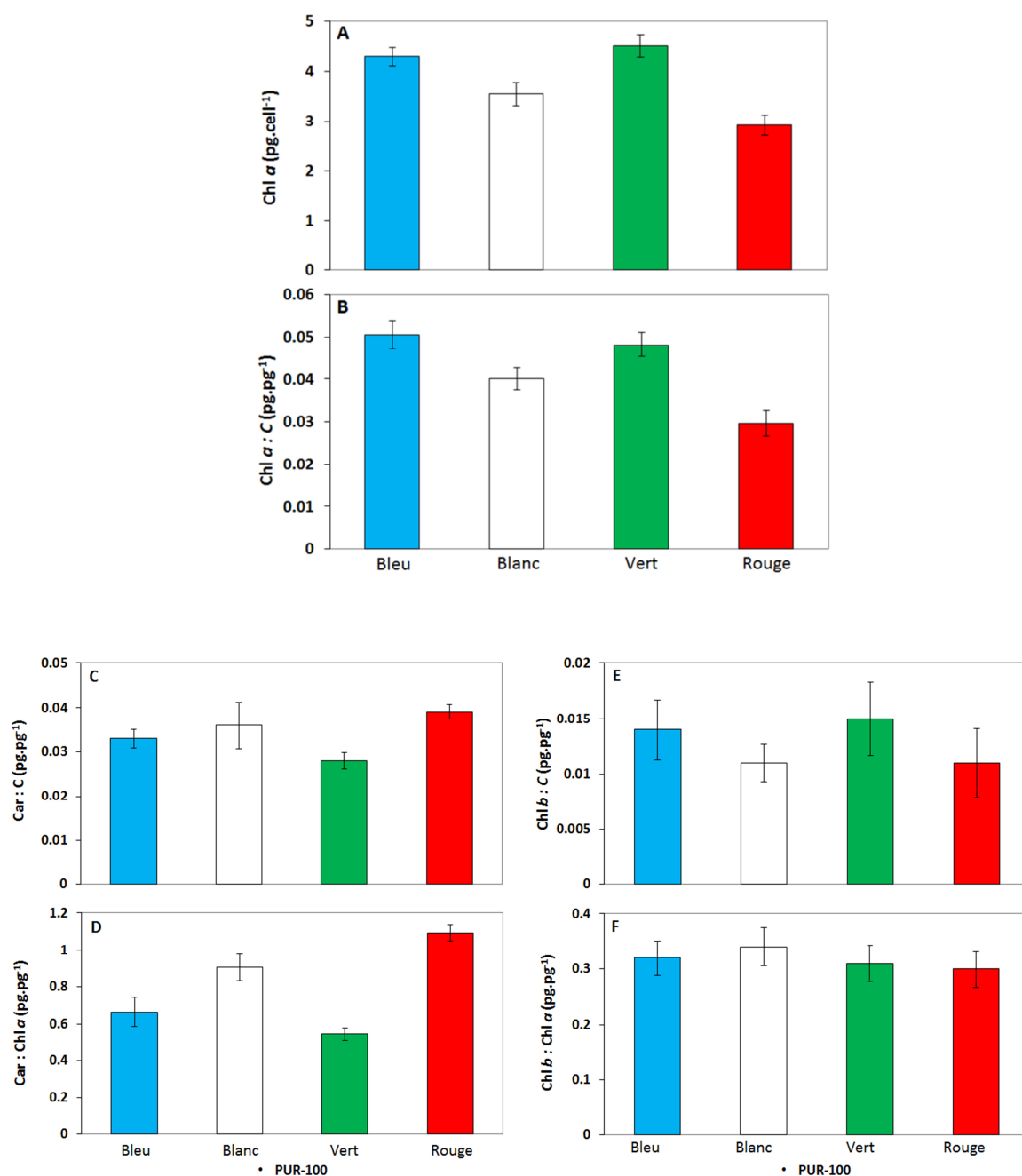


Figure V-9 : (A) Contenu cellulaire en chlorophylle *a* (Chl *a* ; pg.cell⁻¹), (B) rapport Chl *a* : carbone (Chl *a* : C ; pg.pg⁻¹), (C) rapport caroténoïdes : carbone (Car : C ; pg.pg⁻¹), (D) rapport Car : Chl *a* (pg.pg⁻¹), (E) rapport chlorophylle *b* : carbone (Chl *b* : C ; pg.pg⁻¹) et (F) rapport Chl *b* : Chl *a* (pg.pg⁻¹) de *Dunaliella salina* cultivée sous des lumières bleue, blanche, verte et rouge de PUR équivalent. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes entre les réplicats ($\pm$ SD, n=30), sur 5 jours à l'état stable.

3.2.2 Effet de la variation du PUR

Les résultats mettent en exergue un effet du PUR sur le contenu pigmentaire. Pour toutes les couleurs d'éclairement, l'augmentation du PUR se traduit par une diminution significative du rapport Chl *a* : C et une augmentation du rapport Car : C et, de ce fait, du rapport Car : Chl *a* (Fig. V-10A et V-10B). Sous une lumière blanche, lorsque le PUR augmente de 148%, le rapport Chl *a* : C diminue en moyenne de 23% alors que le rapport Car : C augmente de 56%. Le rapport Car : Chl *a* augmente ainsi de 100%. Lorsque le PUR augmente de 279%, sous une lumière bleue, le rapport Chl *a* : C diminue en moyenne de 53% et Car : C augmente de 33%. Le rapport Car : Chl *a* augmente alors de 158% (Fig. V-10).

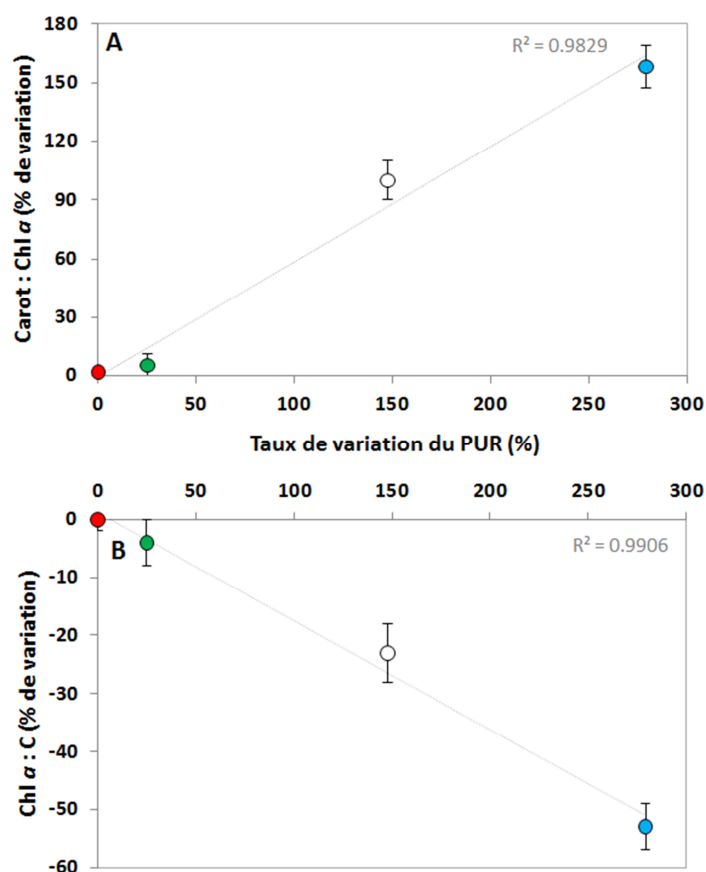


Figure V-10 : Pourcentage d'augmentation des rapports (A) Car : Chl *a* et (B) Chl *a* : C en fonction du taux de variation du PUR (%) chez *Dunaliella salina* cultivée sous des lumières bleue, blanche, verte et rouge.

Le contenu en chlorophylle *b* n'est pas affecté par le spectre lumineux ni par le PUR incident (Tableau IV et Fig. V-9E, F).

Le coefficient de variation des mesures du contenu pigmentaire des deux expériences réalisées sous une lumière rouge de même PUR (condition témoin) est inférieur à 5%.

3.3 Carbone et azote particuliers

A PUR équivalent, les quotas cellulaires en carbone et les rapports molaires C : N mesurés pour les différentes couleurs ne présentent pas de différence significative ($\alpha = 0,05$, $F_{0,05,3,27} = 4,07$, $F=1,29$, $P=0,34$). Les cellules contiennent entre $6,80 \pm 0,59$ (rouge) et $7,57 \pm 0,29$ (vert) pmol de carbone ($n=20$). Le rapport molaire C : N de *Dunaliella salina* présente des valeurs comprises entre $4,79 \pm 0,52$ (blanc) et $5,27 \pm 0,53$ (rouge).

En revanche, le contenu cellulaire en carbone semble répondre au PUR. Sous une lumière bleue, après une forte augmentation du PUR, le contenu cellulaire évolue de manière significative, de $7,13 \pm 0,54$ à $8,56 \pm 0,60$ pmol-C.cell⁻¹ ($t= 4,14$, $P<0,05$), soit une augmentation de 20% lorsque le PUR augmente de 279 % (tableau IV).

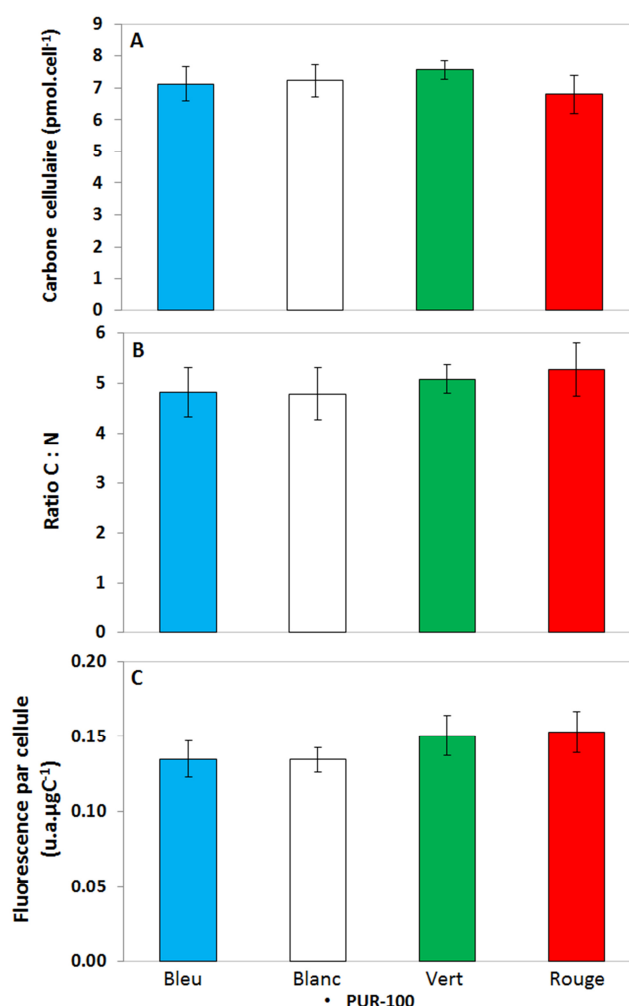


Figure V-11 : (A) Contenu cellulaire en carbone (pmol.cell⁻¹), (B) rapport molaire C : N (pmol/pmol) et (C) rapport lipides : C (u.a.µgC⁻¹) de *Dunaliella salina* cultivée sous des lumières bleue, blanche, verte et rouge de PUR équivalent. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes entre les réplicats, sur 5 jours, à l'état stable ($\pm$ SD, $n=20$).

3.4 Contenu en lipides neutres

3.4.1 PUR équivalent

La technique de marquage au Nile Red (Rumin *et al.*, 2015) a été utilisée pour estimer le contenu en triglycérides neutres (TAG) de *D. salina*. L'intensité de fluorescence du Nile Red est proportionnelle à la quantité de TAG dans l'échantillon. La figure V-11C présente l'intensité de fluorescence par unité de carbone (u.a.µgC⁻¹) de *Dunaliella salina* exposée à différents spectres d'éclairement de PUR équivalent. Le rapport lipides : C évolue de $0,134 \pm 0,008$ (blanc) à $0,153 \pm 0,014$ (rouge) et ne présente pas de différence selon le spectre lumineux ($\alpha = 0,05$, $F_{0,05,3,27} = 3,07$, $F = 1,29$, $P = 0,14$).

3.4.2 Effet de la variation du PUR

L'augmentation du PUR se traduit par une augmentation significative du contenu en lipides neutres, et ce pour toutes les couleurs d'éclairement. Sous une lumière blanche, les cellules contiennent environ 21% de lipides en plus lorsque le PUR augmente de 148%. Eclairés par une lumière bleue, les lipides neutres cellulaires augmentent de 29% lorsque le PUR augmente de 279%.

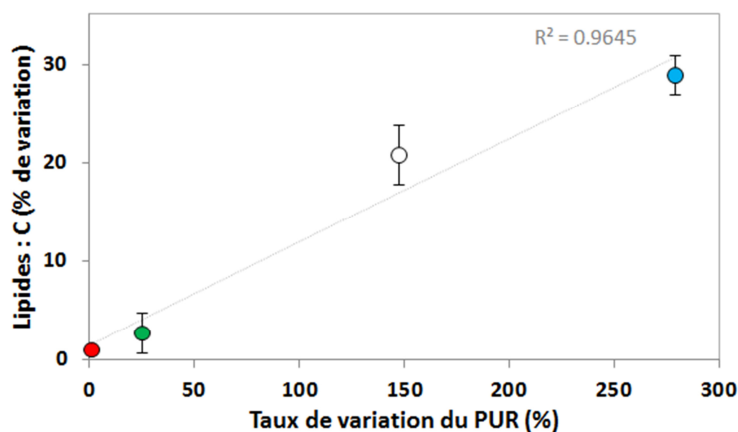


Figure V-12 : Pourcentage d'augmentation du contenu en lipides (u.a.µgC⁻¹) en fonction du taux de variation du PUR (%) de *Dunaliella salina* cultivée sous des lumières bleue, blanche, verte et rouge.

3.5 Evolution de l'absorption et du PUR

Les spectres d'absorption de *D. salina* et les valeurs spectrales de PUR(λ) au jour 0 et après 7 jours de culture sous des lumières verte, bleue, rouge et blanche de PUR₁₀ équivalent sont présentés en figure V-13. L'évolution du spectre d'absorption au cours du temps se

traduit par une légère augmentation du PUR, indicatrice d'une optimisation de l'énergie lumineuse sous ces conditions, pour chaque couleur d'éclairement (Fig. V-13 et Fig. V-14).

À l'équilibre, le PUR ($PUR_{\text{éq}}$) augmente en moyenne de 4,2 (rouge) à 11,6 % (bleue) par rapport au PUR théorique initial (PUR_{t0}), mais ne présente pas de différence significative selon les couleurs d'éclairement. Pour une lumière verte, blanche et bleue respectivement, le $PUR_{\text{épuré}}$ diminue d'environ 9, 14,4 et 31,1 % par rapport au PUR à l'équilibre. Ces valeurs correspondent au pourcentage d'absorption par les pigments photoprotectants.

Les résultats de la seconde expérience sont présentés dans le tableau III.

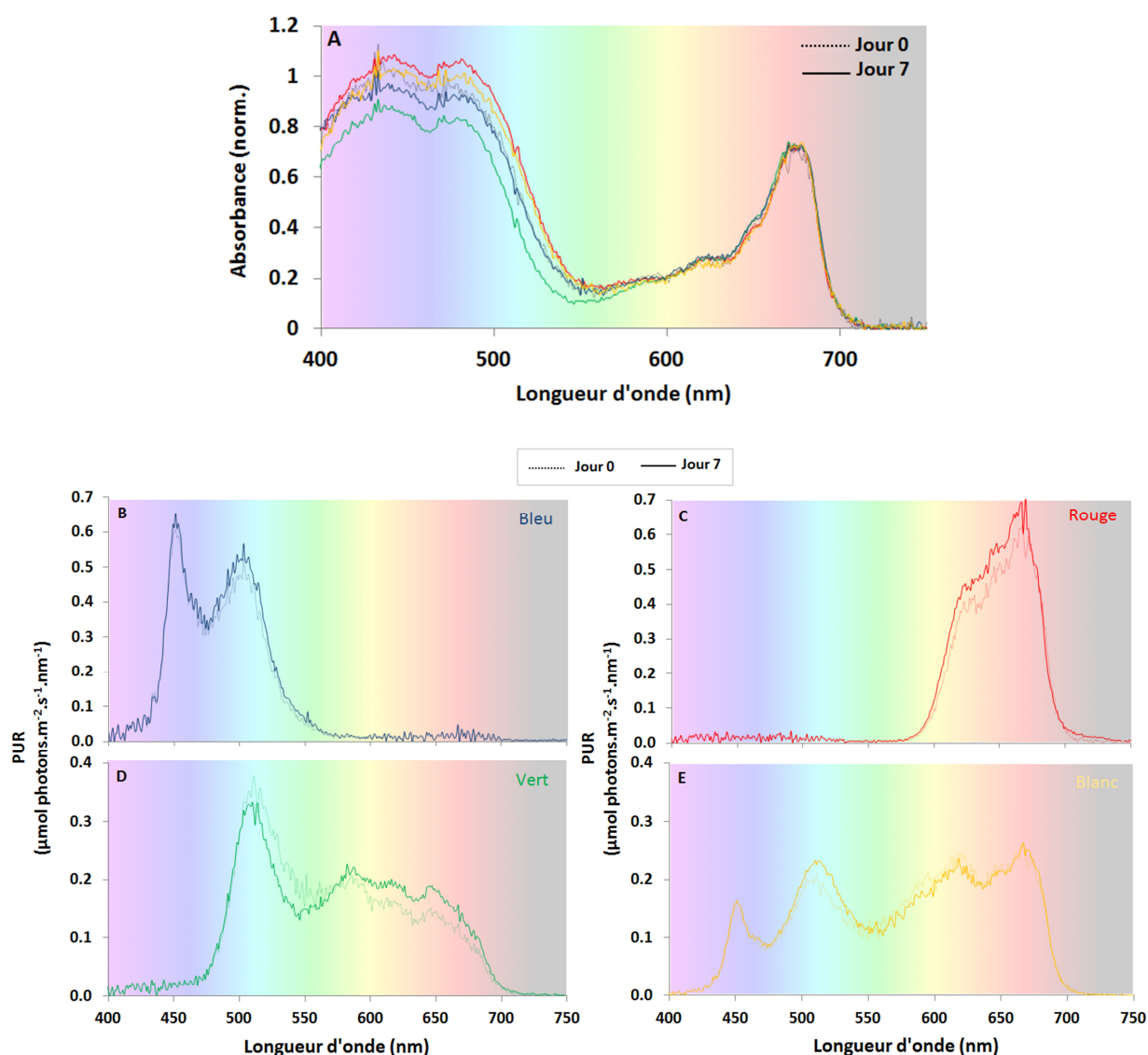


Figure V-13 : (A) Spectres d'absorption (normalisés) de *Dunaliella salina* et (B, C, D, E) valeurs spectrales du PUR(λ) au jour 0 (pointillés) et après 7 jours de culture (traits pleins) sous des lumière bleue, rouge, verte et blanche de PUR_{t0} équivalent.

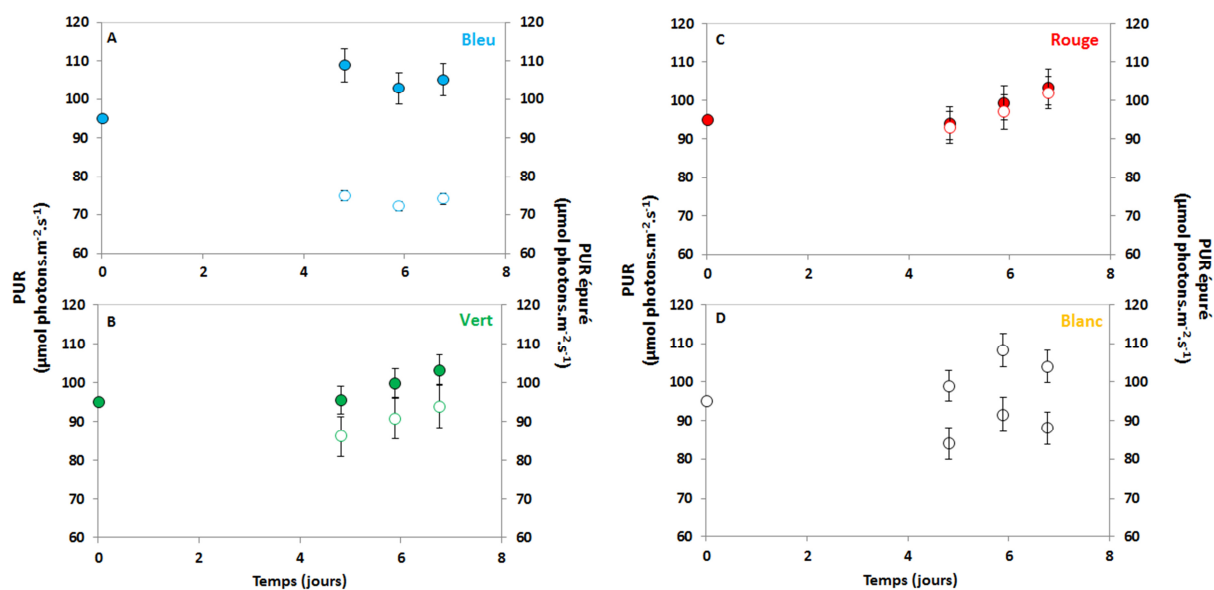


Figure V-14 : Evolution dans le temps du PUR (cercles colorés, ordonnée de gauche) et du PUR épuré (cercles vides, ordonnée de droite) sous des lumières (A) bleue, (B) verte, (C) rouge et (D) blanche.

Tableau III : Synthèse des conditions lumineuses testées.

Conditions lumineuses		PAR ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	PUR _{t0} ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	PUR _{éq} ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Variation (%)	PUR _{épuré} ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
1	Blanc	240 ± 12	95	104 ± 8,12	10,5	89 ± 8,25
	Bleu	159 ± 7,9	95	106 ± 4,92	11,6	73 ± 2,43
	Vert	254 ± 12,7	95	100 ± 8,5	5,3	91 ± 8,25
	Rouge	229 ± 11,5	95	99 ± 8,86	4,2	97 ± 6,04
2	Blanc	84 ± 4,1	33	42 ± 3,20	27,3	39 ± 2,15
	Bleu	537 ± 26,9	322	402 ± 8,47	25,2	252 ± 4,25
	Vert	187 ± 9,4	70	80 ± 3,88	14,3	76 ± 4,78
	Rouge	229 ± 11,5	95	99 ± 4,78	4,2	95 ± 5,02

Tableau IV : Composition cellulaire de *Dunaliella salina* en fonction de la couleur de l'éclairement, du PAR, du PUR théorique initial (PUR_{t0}) et du PUR mesuré à l'équilibre (PUR_{éq}). Contenus cellulaires en pigments (pg.cell⁻¹), rapports pigmentaires normalisés par la Chl *a* (pg.pg⁻¹), quotas cellulaires en carbone et en azote particuliers (pmol.cell⁻¹), rapports molaires C:N, rapports pigments : C (pg.pg⁻¹) et fluorescence du Nile Red par unité de carbone (u.a.µg⁻¹). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes entre les réplicats sur 5 jours, à l'équilibre. Les résultats obtenus en lumière rouge sont présentés sous forme de moyennes entre les quatre réplicats. Voir M&M pour le calcul des écarts-types. Les lettres a, b et c indiquent une différence significative entre les moyennes de PUR équivalent (ANOVA, test de Tukey, P<0,05). Les astérisques (*, **) indiquent une différence significative entre les deux PUR testés en lumières bleue, blanche et verte (Test t, P<0,05).

	Bleu	Blanc	Vert	Rouge	Bleu	Blanc	Vert
PAR	159	240	254	229	537	84	187
PUR_{t0}	95	95	95	95	322	33	70
PUR_{éq}	106	104	100	99	402	42	80
Pigment (pg.cell⁻¹)							
Chl <i>a</i>	4,29 ± 0,19 ^{a,*}	3,56 ± 0,23 ^{b,*}	4,51 ± 0,22 ^{a,*}	2,87 ± 0,37 ^c	2,56 ± 0,32 ^{**}	4,23 ± 0,17 ^{**}	4,61 ± 0,25 [*]
Chl <i>b</i>	1,37 ± 0,28 ^{a,*}	1,21 ± 0,22 ^{a,*}	1,42 ± 0,31 ^{a,*}	0,86 ± 0,27 ^b	0,79 ± 0,19 ^{**}	1,40 ± 0,41 [*]	1,52 ± 0,05 [*]
Car	2,86 ± 0,31 ^{ab,*}	3,13 ± 0,35 ^{a,*}	2,51 ± 0,05 ^{b,*}	3,20 ± 0,27 ^a	4,32 ± 0,74 ^{**}	1,86 ± 0,20 ^{**}	2,63 ± 0,30 [*]
Pigment : Chl <i>a</i> (pg.pg⁻¹)							
Chl <i>b</i>	0,32 ± 0,032 ^{a,*}	0,34 ± 0,035 ^{a,*}	0,31 ± 0,033 ^{a,*}	0,30 ± 0,033 ^a	0,31 ± 0,029 [*]	0,33 ± 0,025 [*]	0,33 ± 0,043 [*]
Car	0,67 ± 0,08 ^{a,*}	0,90 ± 0,07 ^{b,*}	0,54 ± 0,04 ^{c,*}	1,1 ± 0,04 ^d	1,73 ± 0,13 ^{**}	0,45 ± 0,03 ^{**}	0,57 ± 0,048 [*]
Matière particulaire (pmol.cell⁻¹)							
Carbone	7,13 ± 0,54 ^{a,*}	7,23 ± 0,51 ^{a,*}	7,57 ± 0,29 ^{a,*}	6,80 ± 0,59 ^a	8,56 ± 0,60 ^{**}	6,67 ± 0,22 [*]	7,53 ± 0,71 [*]
Azote	1,48 ± 0,37 ^{a,*}	1,51 ± 0,24 ^{a,*}	1,49 ± 0,11 ^{a,*}	1,29 ± 0,22 ^a	1,33 ± 0,12 [*]	1,24 ± 0,11 [*]	1,32 ± 0,16 [*]
C:N	4,82 ± 0,49 ^{a,*}	4,79 ± 0,52 ^{a,*}	5,08 ± 0,28 ^{a,*}	5,27 ± 0,53 ^a	6,43 ± 0,54 ^{**}	5,38 ± 0,10 [*]	5,70 ± 0,43 [*]
Pigment : C (pg.pg⁻¹)							
Chl <i>a</i>	0,051 ± 0,0026 ^{a,*}	0,040 ± 0,0026 ^{b,*}	0,048 ± 0,0029 ^{a,*}	0,029 ± 0,0038 ^c	0,024 ± 0,0031 ^{**}	0,052 ± 0,0028 ^{**}	0,050 ± 0,0032 [*]
Chl <i>b</i>	0,014 ± 0,0027 ^{a,*}	0,011 ± 0,0017 ^{a,*}	0,015 ± 0,0033 ^{a,*}	0,011 ± 0,0031 ^a	0,006 ± 0,0011 [*]	0,013 ± 0,0058 [*]	0,0017 ± 0,0027 [*]
Car	0,033 ± 0,0021 ^{a,*}	0,036 ± 0,0053 ^{ab,*}	0,028 ± 0,0008 ^{c,*}	0,039 ± 0,0017 ^b	0,044 ± 0,0027 ^{**}	0,023 ± 0,0028 ^{**}	0,030 ± 0,0017 [*]
Lipides (u.a.µgC ⁻¹)	0,135 ± 0,0122 ^{a,*}	0,134 ± 0,008 ^{a,*}	0,150 ± 0,0134 ^{a,*}	0,152 ± 0,0138 ^{a,*}	0,174 ± 0,0108 ^{**}	0,111 ± 0,012 ^{**}	0,148 ± 0,0121 [*]

... stress ... non-stress

4. Discussion

La littérature traitant de l'influence de la qualité de la lumière sur la croissance et la pigmentation des microalgues met en évidence une importante variabilité des réponses. La majorité de ces travaux a été menée à intensité lumineuse incidente constante (PAR constant). Les espèces absorbant différemment les longueurs d'ondes du PAR, ce type de protocole expérimental induit un biais car les cultures n'absorbent pas la même quantité de photons. Les résultats observés peuvent ainsi être le reflet de l'effet combiné des variations de l'intensité lumineuse reçue et de la qualité spectrale. En conséquence, il est difficile de comparer l'effet des différentes couleurs de lumière dans les études ne prenant pas en compte le spectre d'absorption des espèces.

Selon la loi fondamentale de la photochimie, dite de Grotthus-Draper, seules les radiations lumineuses absorbées produisent une réaction photochimique. Afin de s'affranchir de l'effet intensité pour ne tenir compte que de l'impact de la qualité spectrale sur le métabolisme cellulaire, la quantité de photons absorbés par les microalgues (i.e. PUR ; Morel, 1978) doit être identique pour chaque spectre d'éclairement (Yentsch, 1974). Peu d'études permettent ainsi de déterminer rigoureusement l'influence respective de l'intensité lumineuse et de la qualité de la lumière (Wilhelm *et al.*, 1985 ; Gostan *et al.*, 1986 ; Glover *et al.*, 1987 ; Morel *et al.*, 1987 ; Rivkin, 1989 ; Nielsen & Sakshaug, 1993 ; Schellenberger *et al.*, 2013 ; Brunet *et al.*, 2014 ; Jungandreas *et al.*, 2014 ; Valle *et al.*, 2014).

Dans la présente étude, pour la première fois à notre connaissance, l'impact de la composition spectrale sur les caractéristiques physiologiques de *Dunaliella salina*, tels que le taux de croissance, la composition pigmentaire ou encore le contenu lipidique, a été étudié à PUR équivalent pour chaque couleur d'éclairement.

Le mode de culture en continu utilisé, le turbidostat, a permis de maintenir des conditions de croissance constantes et optimales, ainsi qu'une faible densité cellulaire (i.e. champs lumineux homogène) durant toute la durée des expériences (au moins dix jours).

4.1 Effet de la composition spectrale sur la croissance cellulaire de *Dunaliella salina*

Les différents niveaux de PAR appliqués dans ces travaux, de 84 à 537 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ne sont pas photoinhibants pour *Dunaliella salina* (Fig. III-2).

La présente étude met en évidence un effet de la composition spectrale sur le taux de division de *D. salina* et donc sur son métabolisme. A PUR équivalent, le taux de croissance spécifique est significativement plus faible en lumière bleue (0,29 jour^{-1}) par rapport aux trois autres couleurs d'éclairement (environ 0,49 jour^{-1}).

La réponse du taux de croissance au PUR a été modélisée par un modèle de type Haldane²¹ (équation (V-7) ; Bernard & Rémond, 2012), dont les paramètres ont été identifiés en minimisant un critère des moindres carrés.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{PUR}{PUR + \frac{\mu_{\max}}{\alpha} \left(\frac{PUR}{PUR_{\text{opt}}} - 1 \right)^2} \quad (\text{V-7})$$

avec μ , le taux de croissance théorique (jour^{-1}) ; $\mu_{\max}$, le taux de croissance maximal atteint pour une valeur de PUR égale à PUR_{opt} et α , la pente à l'origine.

La figure V-15 montre que le modèle représente beaucoup mieux la croissance mesurée lorsque celle-ci est calculée en fonction du PUR (Fig. V-15B) que lorsqu'elle est calculée en fonction du PAR (Fig. V-15A), ce qui confirme logiquement que le PUR est plus discriminant que le PAR pour la croissance. Globalement, le taux de croissance de *Dunaliella salina* augmente en fonction du nombre de photons absorbés, quelle que soit la couleur d'éclairement. Il convient toutefois de remarquer que la lumière bleue induit une croissance nettement inférieure à celle prédite par le modèle. L'augmentation du taux de croissance en fonction de l'intensité lumineuse a classiquement été observée pour une seule couleur d'éclairement (Reinke, 1883 ; Sorokin & Krauss, 1958 ; Falkowski *et al.*, 1985 ; Bouterfas *et al.*, 2002 ; Meseck *et al.*, 2005 ; García *et al.*, 2007). Ce nouveau modèle ainsi calibré permet de prédire le taux de croissance de cette espèce en fonction de l'intensité du PUR pour une lumière rouge, blanche ou verte. Ces résultats confirment en outre la nécessité de comparer la croissance d'une espèce en considérant le nombre de photons qu'elle absorbe.

²¹ La calibration a été réalisée en choisissant le jeu de paramètres qui minimise la somme des carrés des résidus (SSR), définis comme : $SSR(\vartheta) = \sum_{i=1} (\mu_{\text{exp}}(PUR_i) - \mu(PUR_i, SR(\vartheta)))^2$ (V-8)

avec ϑ , le vecteur paramètre ; μ_{exp} , les taux de croissance expérimentaux (jour^{-1})

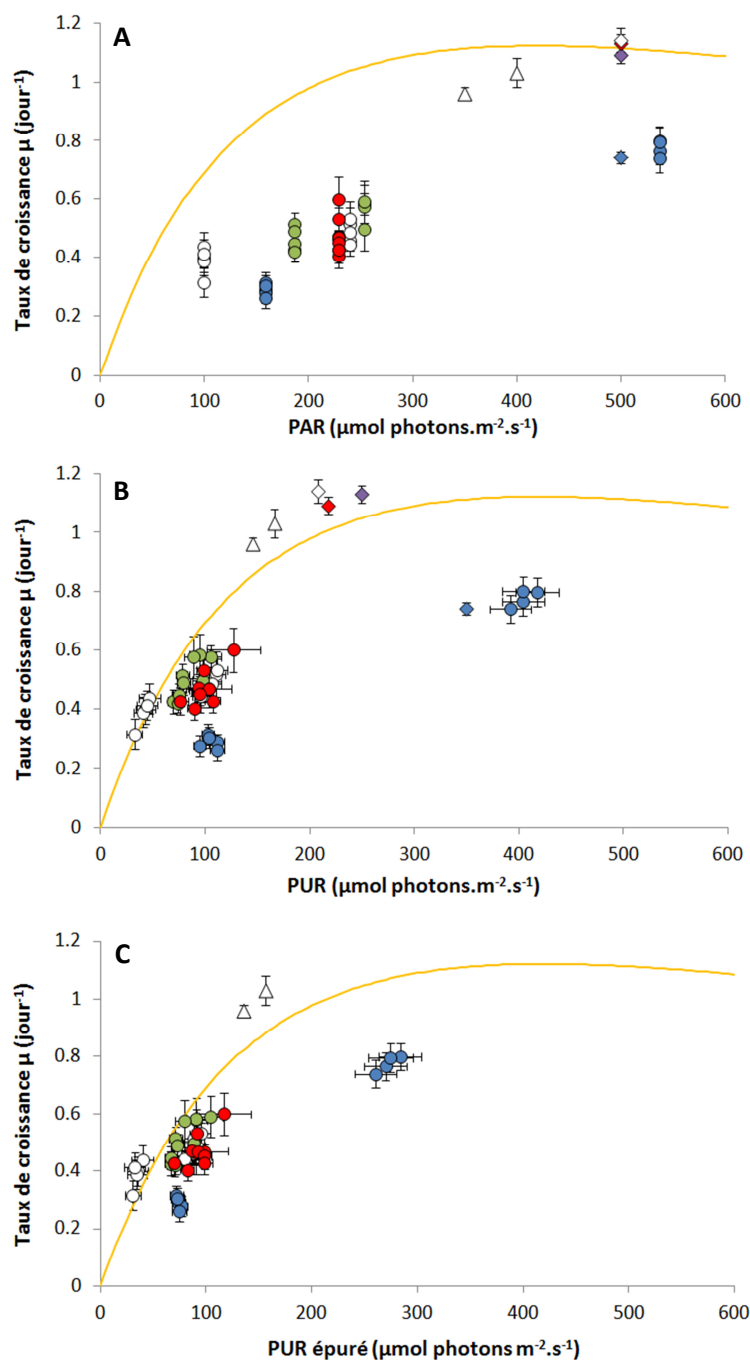


Figure V-15 : Evolution du taux de croissance spécifique (jour⁻¹) de *Dunaliella salina* en fonction (A) du PAR, (B) du PUR à l'équilibre (PUR_{éq}) et (C) du PUR épuré pour chaque couleur d'éclairement.

Le PUR a été recalculé quotidiennement à l'équilibre pour chaque condition expérimentale. Pour chaque PUR, le taux de croissance μ correspondant a été calculé. Pour chaque graphe, les résultats de la présente étude sont représentés par des cercles (expériences 1 et 2) et des losanges colorés (expérience complémentaire). Les triangles correspondent aux résultats des expériences menées en lumière continue blanche, présentées dans les chapitres III et IV. La courbe jaune représente les prédictions du modèle présenté (équation (V-7)).

Avec $\mu_{\text{max}} = 2,3 \text{ jour}^{-1}$, $\alpha = 0,01$, $\text{PUR}_{\text{opt}} = 600 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Les différences de croissance observées en lumière bleue peuvent trouver une explication au niveau moléculaire. Le spectre d'absorption *in vivo* de *Dunaliella salina* surestime la capacité des cellules à utiliser la lumière bleue, une part significative de l'absorption dans cette région étant due aux pigments photoprotectants. Ces pigments ne transmettent pas l'énergie lumineuse reçue au centre réactionnel et ne participent donc pas à la photosynthèse (Butler, 1978 ; Kirk, 1994). *Dunaliella salina* produit, en particulier, de grandes quantités de β -carotène, qui présente deux *maxima* d'absorption dans le bleu du spectre lumineux, à environ 450 et 475 nm. Le calcul du PUR épuré, qui permet de prendre en compte la contribution des caroténoïdes photoprotectants à l'absorption, ne permet néanmoins pas d'expliquer la croissance plus faible obtenue sous une lumière bleue, qui apparaît donc résulter d'un effet de la couleur et non du PUR (Fig. V-15C).

Les cultures ont été éclairées à l'aide de lumières spectralement filtrées, présentant de larges spectres d'émission. Ainsi, l'éclairement vert, pour lequel *Dunaliella salina* présente peu d'absorbance, émet également des photons bleus et rouges. Les résultats de la littérature concernant l'influence de la lumière colorée sur la croissance sont discordants. Dans cette étude, l'ajout d'une lumière rouge améliore la croissance générale de *Dunaliella salina* à faible et forte intensité lumineuse. L'effet positif de cette couleur sur le taux de croissance des microalgues a été mis en exergue dans la littérature. La lumière rouge stimule la croissance des chlorophytes *Dunaliella salina* (Zachleder *et al.*, 1989), *Chlorella vulgaris* (Fu *et al.*, 2012 ; Hultberg *et al.*, 2014), *Tetraselmis suecica* (Abiusi *et al.*, 2013) et *Scenedesmus obliquus* (Cepák *et al.*, 2006), de la cyanobactérie *Spirulina platensis* (Wang *et al.*, 2007), ainsi que de la rhodophyte *Porphyra umbilicalis* (Figueroa *et al.*, 1995) cultivées en lumière bleue ou rouge. Néanmoins, ces études ont été menées à PAR constant. Les travaux prenant en compte le PUR mettent en évidence des résultats distincts. Sous une lumière bleue, la chlorophyte *Chlorella fusca* est caractérisée par un taux de photosynthèse supérieur, comparé à une lumière rouge ou blanche (Wilhelm *et al.*, 1985). De la même manière, la lumière bleue favorise la croissance de la cyanobactérie *Synechococcus* spp. (Glover *et al.*, 1986) et de la diatomée *Pseudo-nitzschia multistriata* (Brunet *et al.*, 2014). Rivkin (1989) obtient des conclusions différentes en rapportant que les taux de division cellulaire de *Dunaliella tertiolecta* ne sont pas affectés par la couleur pour des valeurs de PUR comparables à celles testées dans notre étude.

Les effets de la lumière colorée apparaissent spécifiques du contenu pigmentaire - de ce fait du taxon étudié -, de la taille des microalgues, du spectre d'éclairement, de l'intensité

lumineuse appliquée et des photorécepteurs de chaque espèce, qui jouent un rôle déterminant dans la croissance et les mécanismes d'acclimatation des organismes (Vesk & Jeffrey, 1977 ; Glover *et al.*, 1987 ; Mouget *et al.*, 2004 ; Chory, 2010 ; Fu *et al.*, 2013). Les différents photorécepteurs ayant évolué chez les micro-organismes photosynthétiques sont responsables de la grande variété de réponses à des *stimuli* lumineux (Hegemann, 2008). Cependant, à ce jour, les connaissances dans ce domaine sont encore partielles et imparfaites et ne permettent pas de décrire un fonctionnement général (Klein, 1992 ; Cepàk *et al.*, 2006).

D'après les résultats obtenus dans la présente étude, nous suggérons l'hypothèse d'une modulation de routes métaboliques, probablement régulées par un senseur de la lumière rouge. La lumière rouge/rouge lointain est détectée par des phytochromes, qui jouent un rôle fondamental dans la photoréception de l'environnement lumineux pour la croissance et le développement des plantes supérieures (Strasser *et al.*, 2010). Si aucun gène codant pour la synthèse de phytochromes n'a, jusqu'à présent, été mis en évidence chez les chlorophytes (Schulze *et al.*, 2014), un cryptochrome est considéré comme le photorécepteur rouge chez cet embranchement (Beel, 2012). L'effet positif de la lumière rouge sur la croissance de *Dunaliella salina* revêt en outre un sens écologique. En effet, cette espèce domine dans les eaux de surface, dans lesquelles le rayonnement rouge est présent (Pick, 1991).

Dans notre étude, la taille des cellules n'est pas influencée par la couleur de l'éclairement. Un résultat similaire a été obtenu chez la chlorophyte *Tetraselmis gracilis* dont le taux de croissance le plus élevé est observé en lumière rouge sans modification du diamètre des cellules (Aidar *et al.*, 1994). Par ailleurs, des auteurs mettent en évidence l'effet de la qualité de la lumière sur le cycle cellulaire. Des expériences menées sur *Dunaliella salina* (Zachleder *et al.*, 1989), *Chlamydomonas reinhardtii* (Oldenhof *et al.*, 2006) et *Scenedesmus obliquus* (Cepàk *et al.*, 2006) suggèrent que la division cellulaire, retardée en lumière bleue par rapport à une lumière rouge, est accompagnée d'une synthèse d'ADN et d'une augmentation de l'activité des kinases cycline-dépendantes (de l'anglais, CDKs) retardées. L'activation des CDKs est responsable de la transition entre les différentes phases du cycle cellulaire (Nigg, 1995). Ces mécanismes sont en accord avec le taux de croissance plus faible observé en lumière bleue dans cette expérience.

4.2 Effet du PUR et de la composition spectrale sur le cortège pigmentaire

Pour répondre aux variations du régime lumineux (intensité lumineuse, composition spectrale, photopériode) dans la colonne d'eau, les microalgues ont développé de nombreuses stratégies pour optimiser la capture de photons et minimiser les photo-dommages (Richardson *et al.*, 1983 ; Havelková-Doušová *et al.*, 2004).

4.2.1 Effet de l'évolution du PUR sur le cortège pigmentaire

Dans notre expérience, le contenu pigmentaire a été affecté par l'intensité du PUR. Pour chaque couleur d'éclairement, le rapport chlorophylle *a* : carbone (Chl *a* : C) diminue en fonction du PUR alors que le rapport caroténoïdes : chlorophylle *a* (Car : Chl *a*) présente une tendance opposée. Ce phénomène, bien étudié et documenté dans la littérature, est connu sous le terme de photoacclimatation (Falkowski & Laroche, 1991). La photoacclimatation, qui décrit les ajustements phénotypiques survenant en réponse aux variations de l'éclairement (Falkowski & LaRoche, 1991), conduit à des changements de la pigmentation (quantité et proportion de Chl *a* et de pigments accessoires majeurs) ou des caractéristiques structurales comme le nombre ou la taille des antennes photosynthétiques (Falkowski & Owens, 1980 ; Falkowski & LaRoche, 1991 ; Herzig & Dubinsky, 1992). Une augmentation du contenu en pigments photosynthétiques (tels que la Chl *a*) est communément observée chez les espèces cultivées sous un faible éclairement, afin d'augmenter la capture de photons. A l'inverse, sous une forte lumière, le contenu en pigments est réduit afin de minimiser la quantité de photons absorbés et les processus de photo-oxydation (Loeblich, 1982 ; Richardson *et al.*, 1983 ; Anning *et al.*, 2000 ; MacIntyre *et al.*, 2002).

Le rapport Car : Chl *a* est un indicateur du niveau de stress des microalgues (Young & Beardall, 2003). *Dunaliella salina* et *Dunaliella bardawil*, considérée comme une possible sous-espèce de *D. salina* (Lamers *et al.*, 2008 ; Assunção *et al.*, 2012), font partie des espèces les plus riches en β -carotène naturel. Sous certaines conditions environnementales spécifiques (e.g. forte intensité lumineuse, carence azotée, haute salinité, températures extrêmes), *Dunaliella salina* peut accumuler du β -carotène, jusqu'à 14% de son poids sec, au sein de globules intraplastidiaux (plastoglobules β C) (Ben-Amotz & Avron, 1983). Il est admis dans la littérature que l'intensité lumineuse constitue un facteur clé d'accumulation de β -carotène chez *D. salina* (Ben-Amotz *et al.*, 1982 ; Lamers *et al.*, 2012). Cette accumulation, à

de hautes intensités lumineuses, constitue une adaptation nécessaire afin de protéger l'appareil photosynthétique contre les dommages photo-oxydatifs (Ben-Amotz *et al.*, 1989 ; Neidhard *et al.*, 1998). Le β -carotène permet de capturer l'énergie lumineuse excédentaire pour la photosynthèse (entre 330 et 500 nm) avant qu'elle ne devienne dommageable pour la machinerie photosynthétique (Lamers *et al.*, 2008).

4.2.2 Effet de la composition spectrale : mise en évidence d'une stratégie d'acclimatation chromatique chez *Dunaliella salina*

Certaines espèces présentent la capacité de modifier leur cortège pigmentaire en réponse à une modification du spectre lumineux afin d'optimiser l'absorption de la lumière ambiante (Vesk & Jeffrey, 1977 ; Senger & Bauer, 1987 ; Mouget *et al.*, 2004). Cette forme de plasticité, mise en évidence de manière spectaculaire chez de nombreuses espèces de cyanobactéries (Gaidukov, 1902 ; Tandeau de Marsac, 1977 ; Olaizola & Duerr, 1990 ; Stomp *et al.*, 2004 ; Kehoe & Gutu, 2006) est connue sous le terme 'd'adaptation chromatique' (nous privilégierons le terme d'acclimatation chromatique, plus approprié pour qualifier ce phénomène).

A PUR équivalent, la variation concomitante des rapports Chl *a* : C et Car : Chl *a* en fonction de la composition spectrale révèle une stratégie d'acclimatation chromatique chez *Dunaliella salina*. A notre connaissance, ce type de travaux n'avait, jusqu'à présent, jamais été mené chez cette espèce. Dans notre étude, le contenu en Chl *a* (par cellule et par carbone) est supérieur en lumières bleue et verte qu'en lumière blanche, à PUR équivalent. Le contenu en Chl *a* le plus faible est observé sous une lumière rouge (Fig. V-16). Des résultats identiques ont été mis en évidence chez les chlorophytes *Dunaliella tertiolecta* (Wallen & Geen, 1971), *Scenedesmus obliquus* (Humbeck *et al.*, 1988) et *Tetraselmis suecica* (Abiusi *et al.*, 2013), chez l'haptophyte *Tisochrysis lutea* (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015) ou encore chez la diatomée *Chaetoceros* sp. (Sánchez-Saavedra & Voltolina, 1994) qui présentent un contenu en Chl *a* supérieur en lumière bleue. Par ailleurs, le contenu en Chl *a* est supérieur en lumière verte, par rapport à une lumière blanche, violette, orange ou rouge, chez la cyanobactérie *Gloeotheca membranacea* (Mohsenpour *et al.*, 2012). Cependant, ces études ont été menées à PAR constant. Les études réalisées à PUR constant mettent en évidence des résultats variés. Alors que le cortège pigmentaire de la diatomée *Chaetoceros protuberans* (Morel *et al.*, 1987) n'est pas affecté par la couleur de la lumière à un PUR de 60 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, Rivkin

(1989) démontre que le contenu en Chl *a* de *Dunaliella tertiolecta* est inférieur en lumière rouge mais identique en lumières bleue et blanche pour différents PUR (12, 40 et 120 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

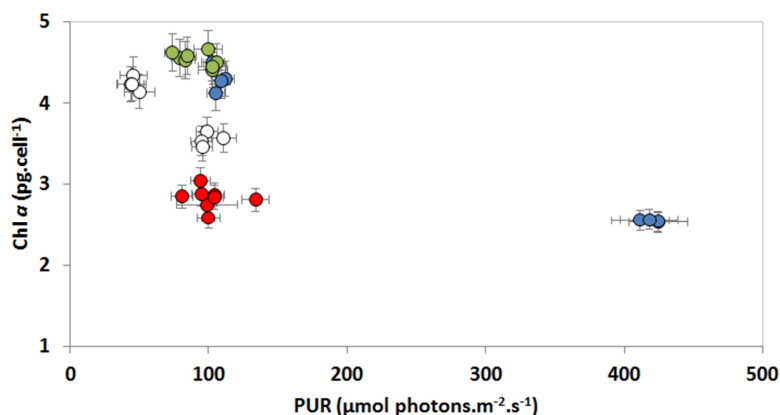


Figure V-16 : Evolution du contenu cellulaire en chlorophylle *a* (Chl *a* ; pg.cell⁻¹) de *Dunaliella salina* en fonction du PUR à l'équilibre pour chaque couleur d'éclairement.

La lumière joue un rôle majeur en gouvernant la composition pigmentaire des complexes pigments-protéines de l'appareil photosynthétique. Dans notre étude, l'éclairage vert utilisé émet davantage de photons que les LED blanches entre 485 nm et 590 nm (Fig. V-3) et l'éclairage bleu émet entre 430 et 570 nm. Plus précisément, les photons bleus représentent environ 3%, 34%, 48% et 88% du PAR des éclairages rouge, blanc, vert et bleu respectivement (Fig. V-17). Nous pouvons ainsi supposer que les photons bleus, entre 485 et 570 nm, stimuleraient la synthèse de Chl *a* chez *Dunaliella salina* pour les conditions testées. La lumière bleue revêt un rôle important dans la modulation de la synthèse de pigments chez les microalgues et les plantes vasculaires (Im *et al.*, 2006). Dans une étude récente, Schulze *et al.* (2014) suggèrent que l'accumulation de pigments en lumière bleue s'effectuerait *via* des photorécepteurs à la lumière bleue, telles que les phototropines (400 - 500 nm). Alors que cette hypothèse n'a pas été vérifiée chez *D. salina*, les phototropines sont responsables de la régulation transcriptionnelle des gènes de la voie de biosynthèse de la chlorophylle *a* et des caroténoïdes chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Im *et al.*, 2006).

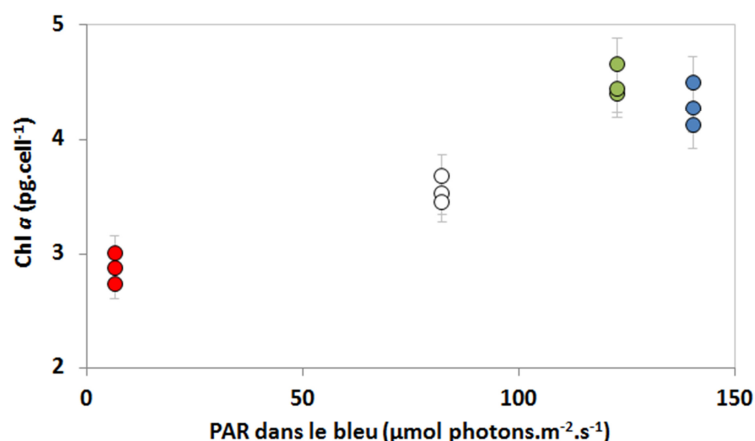


Figure V-17 : Evolution du contenu cellulaire en chlorophylle *a* (Chl *a* ; pg.cell⁻¹) de *Dunaliella salina* en fonction du PAR dans le bleu du spectre lumineux pour chaque couleur d'éclairement de PUR équivalent.

Les mécanismes de régulation de la synthèse du β -carotène par la lumière sont, à ce jour, encore mal connus (Lu & Li, 2008 ; Lamers *et al.*, 2010 ; Fu *et al.*, 2013).

Dans cette étude, le contenu en caroténoïdes (par cellule et par carbone) a été affecté par le spectre lumineux. *Dunaliella salina* présente le contenu en caroténoïdes le plus élevé en lumières rouge et blanche, et le plus faible en lumière verte, à PUR équivalent. Il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature, obtenus avec d'autres espèces. Cependant, une augmentation du contenu en β -carotène a été observée chez *Dunaliella bardawil* et *Dunaliella salina* cultivées sous une lumière blanche combinée avec des UV-A ou des UV-C, comparée à une lumière blanche seule de PAR équivalent (Jahnke, 1999 ; Salguero *et al.*, 2005 ; Lamers *et al.*, 2008 ; Mogedas *et al.*, 2009).

En effet, les stress environnementaux seraient détectés *via* des photorécepteurs tels que des photorécepteurs UV, déclenchant une transduction du signal selon un facteur intermédiaire comme un oxygène singulet (Shaish *et al.*, 1993) (Fig. V-18). Par ailleurs, l'ajout d'une lumière bleue de faible intensité, à une lumière rouge, induit une augmentation de l'accumulation de β -carotène et de lutéine chez *D. salina* (Fu *et al.*, 2013). La transduction du signal, différente selon les couleurs d'éclairement, pourrait être ainsi due à la présence de différents photorécepteurs.

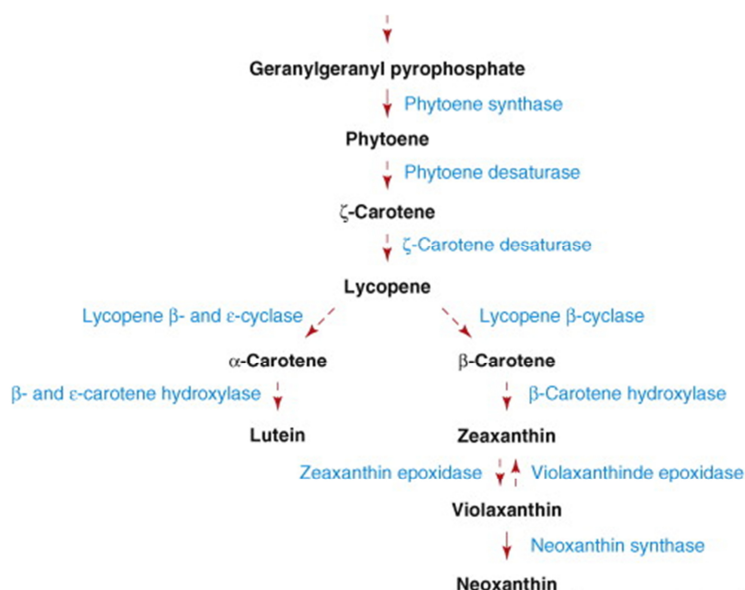


Figure V-18 : Voies métaboliques de la synthèse des différents caroténoïdes.

L'oxydation des lipides de la membrane du chloroplaste pourrait constituer un autre messager impliqué dans la cascade de transduction du signal, déclenchant l'activation des enzymes phytoène-synthase et désaturase. La formation des caroténoïdes dérive d'un jeu d'oxydation de la molécule de phytoène formée. D'après Lamers *et al.*, 2008.

4.3 Effet de la composition spectrale sur le contenu en lipides neutres

La relation entre la lumière et le stockage de lipides neutres est complexe car de nombreux paramètres influencent la capacité des microalgues à en produire. Alors que l'effet de la carence en azote (Lacour *et al.*, 2012) et de l'intensité lumineuse (Rodolfi *et al.*, 2009) sur leur synthèse est bien documenté, l'influence de la composition spectrale reste une question ouverte. Les triglycérides constituent les principaux lipides énergétiques des microalgues. Dans la présente étude, l'augmentation du PUR provoque, pour chaque couleur, une forte augmentation des triglycérides. L'accumulation de lipides neutres en réponse à une augmentation de l'intensité lumineuse est un phénomène connu chez les microalgues (Gordillo *et al.*, 1998 ; Vítová *et al.*, 2015). La synthèse de triglycérides nécessite d'importantes quantités d'ATP et de NADPH produites durant la phase claire de la photosynthèse. Par conséquent, la production de triglycérides peut aider à la dissipation de l'excès d'énergie lumineuse et prévenir les dommages photo-chimiques des microalgues (Seyfabadi *et al.*, 2011 ; Atta *et al.*, 2013).

Dans notre étude, le contenu en triglycérides n'est pas affecté par la composition spectrale à PUR équivalent. La figure V-19 met en évidence une corrélation entre le taux de croissance

de *D. salina* et le contenu lipidique, excepté en lumière bleue. A notre connaissance, l'impact de la qualité de la lumière sur la synthèse de lipides neutres n'avait, jusqu'à présent, pas été étudié chez *D. salina*.

Les différentes couleurs n'induisent pas non plus de différence notable des quotas en carbone et en azote. De ce fait, le rapport molaire C : N, utilisé comme un indicateur de l'état physiologique des cellules phytoplanctoniques (Redfield, 1963 ; Pahlow, 2000) n'est pas affecté par les variations du spectre lumineux. Contrairement à notre étude, les travaux menés chez les autres taxons mettent en évidence un effet du spectre lumineux sur leur contenu lipidique et leurs quotas en carbone (Voskresenskaya, 1972 ; Rivkin, 1989 ; Das *et al.*, 2011 ; Shu *et al.*, 2012 ; Hultberg *et al.*, 2014 ; Teo *et al.*, 2014 ; Sánchez-Saavedra *et al.*, 2015 et voir revue en annexe 1).

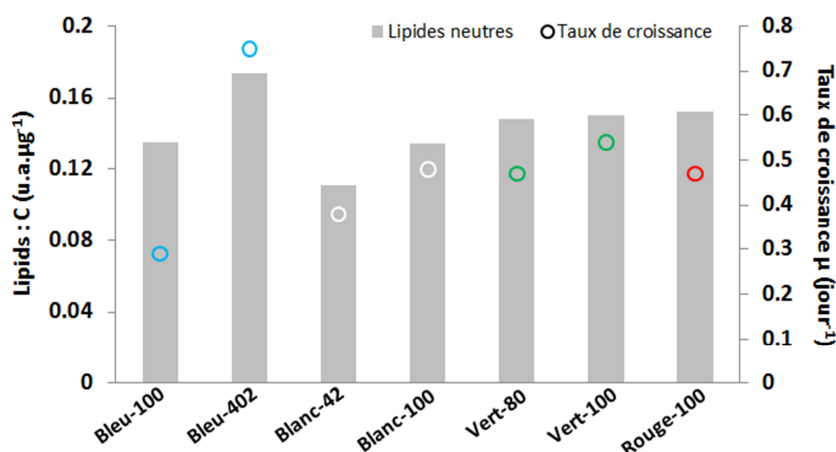


Figure V-19 : Rapport lipides : C (u.a.µgC⁻¹) (barres, ordonnée de gauche) et taux de croissance (jour⁻¹) (cercles, ordonnée de droite) de *Dunaliella salina* en fonction des conditions d'éclairement.

4.4 Le PUR dans la littérature

L'idée d'utiliser le PUR pour caractériser la photosynthèse apparaît pour la première fois dans les travaux de Morel et ses collaborateurs en 1978. Le calcul du PUR est en réalité dépendant d'un certain nombre de choix arbitraires, concernant en particulier la normalisation du spectre d'absorption de l'espèce considérée et la détermination des variables. Alors que certains auteurs (Morel *et al.*, 1978, 1987 ; Gostan *et al.*, 1986 ; Rivkin, 1989) utilisent un spectre d'absorption normalisé par son maximum (ainsi, $440 \text{ nm} \leq \lambda(a_{\max}) \leq 445 \text{ nm}$), d'autres emploient des variables $a(\lambda)$ distinctes, telles que le coefficient d'absorption

spécifique de la Chl *a* [a^* , $\text{m}^2.\text{mg}^{-1}$ Chl *a*] (Cosgrove & Borowitzka, 2010) ou encore le coefficient d'absorption [$a(\lambda)$, m^{-1}] (Brunet *et al.*, 2014). Dans notre étude, nous avons choisi de normaliser le pic d'absorption de la Chl *a* à 0,7. A titre d'exemple, si nous nous référons au calcul du PUR par Cosgrove & Borowitzka (2010), le PUR_{10} appliqué dans notre étude serait d'environ $79 \mu\text{mol photons}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Si d'un point de vue qualitatif le PUR présente la même définition quelles que soient les méthodes utilisées et permet de comparer entre eux les résultats d'une même étude, un consensus concernant son calcul - et de ce fait ses unités - serait nécessaire afin de pouvoir comparer les résultats de l'ensemble de la littérature de manière quantitative.

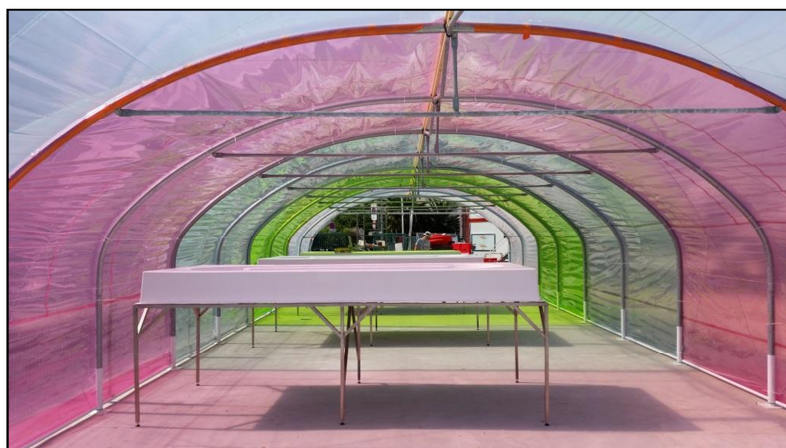
5. Conclusion et perspectives

Depuis des décennies, de nombreux travaux ont été menés afin de comprendre la réponse des microalgues aux variations de la qualité de la lumière qui se propage dans les océans. Plus récemment, ces mêmes questions ont été abordées dans un contexte industriel, afin d'optimiser la productivité des microalgues et la bioaccumulation de molécules à haute valeur ajoutée, telles que les lipides et les pigments.

Notre expérience est innovante dans la mesure où elle est la première à étudier l'adaptation de *Dunaliella salina* simultanément à différentes compositions spectrales et intensités lumineuses. Nous avons pu montrer que la qualité du spectre lumineux modifie la croissance et la composition pigmentaire de *D. salina* : la lumière rouge présente un effet positif sur sa croissance, la teneur en caroténoïdes est supérieure en lumières rouge et blanche, alors que la production de chlorophylle *a* est accrue par une lumière bleue. Ces résultats mettent ainsi en évidence une stratégie d'acclimatation chromatique chez *D. salina*.

Dans le cadre du développement de supports photovoltaïques semi-transparents, il apparaît donc judicieux de concevoir des films qui retiennent les photons bleus pour produire de l'électricité, et qui laissent passer les photons rouges pour la photosynthèse. La lumière bleue, ou contenant du bleu, est en outre à éviter si nous souhaitons rendre les microalgues plus transparentes (les avantages d'une souche transparente seront développés dans le chapitre suivant). La modification de la composition pigmentaire en réponse à un changement du spectre lumineux peut constituer un point de départ pour de futures études. En particulier, il serait intéressant de tester d'autres PUR pour chaque couleur d'éclairage afin de vérifier si l'effet de la couleur est confirmé pour différentes valeurs de PUR.

Par ailleurs, la composition spectrale ne semble pas avoir d'effets sur la productivité en lipides, ni sur la composition élémentaire de *D. salina*. D'une manière générale, le nombre de photons absorbés, indépendamment de leur couleur, apparaît comme le paramètre essentiel pour la croissance et l'accumulation de molécules d'intérêt chez cette espèce. Nous suggérons ainsi la nécessité d'optimiser l'intensité lumineuse reçue par les microalgues afin que l'éclairage soit suffisamment important pour permettre leur croissance mais pas trop élevé pour que les cultures ne soient pas photoinhibées.



**Figure C : Premier prototype de serre dotée de filtres colorés pour la culture de microalgues.
Villefranche-sur-Mer, France.**

Que faut-il retenir ?

- En cultures continues menées à faible densité cellulaire, le **taux de croissance** de *Dunaliella salina* est **inférieur** en **lumière bleue** à celui observé sous une lumière blanche, rouge ou verte, à PUR équivalent.
- Pour chaque couleur d'éclairement, l'**augmentation du PUR** se traduit par une **augmentation du taux de croissance**.

- Le contenu en **Chl *a*** (par cellule et par carbone) **diminue** en réponse à l'**augmentation du PUR**.
- Le contenu en caroténoïdes présente une dynamique opposée.

- *D. salina* présente un contenu en **Chl *a*** **plus élevé** en lumières **bleue** et **verte** par rapport à une lumière blanche ou rouge.
- Le rapport **Car : Chl *a*** est **supérieur** en lumières **rouge** et **blanche**.
=> **Acclimatation chromatique**

- Le contenu en **Chl *b***, en **carbone** et **azote** particuliers, le rapport molaire **C : N** et la quantité de **lipides neutres** ne sont **pas affectés** par la couleur de la lumière à un PUR donné.

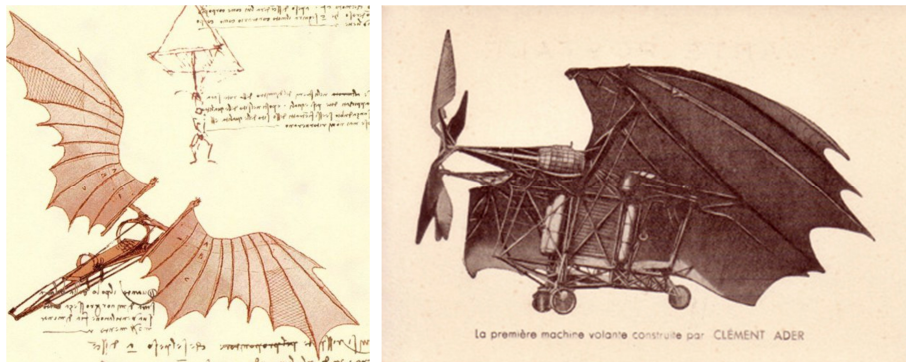
Chapitre VI

Effets de la composition spectrale en cultures à haute densité : les surprenantes propriétés de la lumière verte

- De la biologie expérimentale au modèle mathématique -

“Discovery consists of looking at the same thing as everyone else and thinking something different.”

Albert Szent-Györgyi (1893 - 1986)



La voilure de la roussette des Indes, une espèce de chauve-souris, a servi de modèle à Léonard de Vinci (XV^{ème} siècle) puis à Clément Ader (XIX^{ème} siècle) pour la construction de l'Éole, le premier prototype d'avion.

Ce chapitre présente une analyse expérimentale de l'effet de la qualité spectrale de la lumière sur la croissance de *Dunaliella salina* et *Tisochrysis lutea* cultivées à haute densité de biomasse, condition caractéristique des systèmes de culture à grande échelle. Un modèle a été développé sur les résultats expérimentaux afin de comprendre et de prédire l'effet de la composition spectrale sur la productivité des microalgues.

Sommaire

1. Introduction	197
2. Matériels et méthodes	199
2.1 Microalgues et conditions de culture	199
2.2 Traitement lumineux	199
2.3 Conditions de pré-culture	201
2.4 Paramètres standards	202
2.5 Mesures de respiration : capteur fluorescent par méthode non invasive.....	202
2.6 Statistiques	203
3. Modélisation de la croissance des microalgues sous différents spectres lumineux	204
3.1 Développement du modèle.....	204
3.2 Calibration du modèle	205
4. Résultats et discussion	207
4.1 Simulation du modèle et comparaison aux données expérimentales	207
4.1.1 <i>Effet de la qualité de la lumière sur la croissance des microalgues</i>	207
4.1.2 <i>Evolution de la lumière en sortie des photobioréacteurs</i>	210
4.1.3 <i>Physiologie des cellules</i>	213
4.2 Estimation de la productivité. Des données expérimentales aux prédictions mathématiques : les surprenantes propriétés de la lumière verte.....	220
5. Conclusion & perspectives	226

1. Introduction

Les systèmes de culture industriels sont caractérisés par de hautes densités de biomasse (typiquement entre 0,1 et 5 gMS.L⁻¹ ; Slade & Bauen, 2013), condition nécessaire pour assurer la viabilité économique de la filière de production. La croissance des microalgues est étroitement liée à leur activité photosynthétique et, de ce fait, à la lumière disponible au sein de la culture. L'optimisation des conditions d'éclairement des microalgues constitue un enjeu majeur afin d'améliorer leur productivité et leur rendement énergétique.

Le cortège pigmentaire d'une espèce détermine les parties du spectre lumineux qu'elle peut utiliser et, de ce fait, les photons, non absorbés, disponibles pour les autres cellules (Carvalho *et al.*, 2011). Chaque espèce présente une absorption minimale ainsi que deux pics d'absorption maximale dans une plage de longueurs d'ondes spécifiques du spectre lumineux. Les photobioréacteurs (PBRs) et les raceways sont ainsi caractérisés par une distribution hétérogène de l'énergie photonique, due à l'absorption et à la diffusion de la lumière par les cellules en suspension. L'intensité de la lumière disponible au sein de la culture, ainsi que son spectre, sont donc différents de ceux observés en surface (Fig. VI-1).

Une des caractéristiques des cultures denses de microalgues réside précisément dans une capacité d'absorption capable d'engendrer des gradients lumineux importants. En effet, une grande partie des photons incidents, majoritairement absorbés par les cellules en surface (raceways) ou à la périphérie (PBRs), ne parvient pas à pénétrer en profondeur dans la culture (Sorokin & Krauss, 1958 ; Cornet, 2010). Ce phénomène d'auto-ombrage constitue le principal facteur limitant la productivité des cultures denses (Molina-Grima *et al.*, 1996). Les microalgues sont ainsi exposées à des intensités lumineuses fortes en périphérie (surface) et faibles, voire nulles, en profondeur (Phillips *et al.*, 1954 ; Richmond, 2000). Les cellules sont ainsi potentiellement exposées à deux types de conditions lumineuses extrêmes et contre-productives. En surface ou en périphérie, l'excès de photons peut engendrer des mécanismes de dissipation de l'énergie excitonique sous forme de chaleur (quenching non-photochimique ; en anglais NPQ, *Non-photochemical quenching*) (Müller *et al.*, 2001) voire des phénomènes de photoinhibition, entraînant une baisse de l'efficacité photosynthétique et, de ce fait, de la productivité des systèmes (Neale, 1987 ; Henley, 1993 ; Molina *et al.*, 1996 ; Murata *et al.*, 2007). En profondeur

du système, la fixation de carbone par photosynthèse ne compense plus les pertes de carbone par respiration.

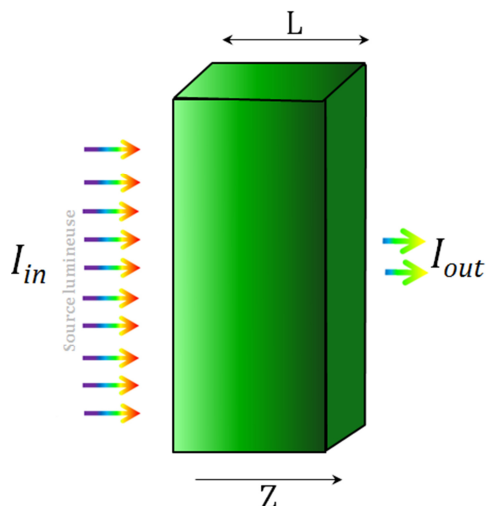


Figure VI-1 : Représentation schématique de l'atténuation lumineuse par une culture de microalgues dans un photobioréacteur (PBR) plan éclairé d'un seul côté par une source lumineuse (vue de côté d'un PBR plan de largeur L). Avec I_{in} , l'intensité lumineuse incidente et I_{out} , l'intensité lumineuse en sortie du réacteur.

Dans cette étude, nous avons analysé les effets interdépendants de la qualité spectrale et de l'auto-ombrage sur la croissance de *Dunaliella salina* et de *Tisochrysis lutea* en photolimitation. Pour cela, les espèces ont été cultivées à haute densité au sein de photobioréacteurs plans, pour suivre les effets d'une exposition à des lumières blanche, verte et rouge sur leur croissance, leur teneur en chlorophylle, leur productivité en lipides et leur composition élémentaire. Parallèlement, un modèle a été construit à partir de données expérimentales issues de cette étude et de résultats présentés au chapitre III. Des simulations ont ensuite été effectuées dans une gamme plus étendue de conditions environnementales afin de mettre en évidence les effets de la composition spectrale sur la productivité des microalgues.

2. Matériels et méthodes

2.1 Microalgues et conditions de culture

Dunaliella salina (CCAP 18/19) et *Tisochrysis lutea* (clone T-Iso 2X, CCAP 927/17) ont chacune été cultivées au sein de trois photobioréacteurs de type plan (Fig. VI-2A). Les cultures ont été maintenues à une température constante de 27°C (*D. salina*) ou de 28°C (T-Iso 2X) et à un pH de 8,0 ($\pm 0,1$) par injection contrôlée de CO₂ gazeux. L'homogénéité des cultures a été assurée par un barreau magnétique et un micro-bullage d'air permettant, en outre, de lutter contre la formation de biofilms sur les parois. Les expériences ont été menées en mode batch jusqu'à ce que les cultures atteignent une forte biomasse (1 à 10% de lumière transmise) puis en mode continu ('**chémostat photolimité**'; Huisman *et al.*, 2002). Les descriptions détaillées du photobioréacteur plan et du mode de culture utilisé sont présentées respectivement aux paragraphes II-2.1.2 et II-2.3.2 du chapitre II. Le taux de dilution D , constant, a été fixé à 0,1 jour⁻¹ afin de maintenir les cultures à forte densité. Afin de garantir l'absence de limitation par une ressource nutritive, les concentrations en nutriments du milieu frais ont été progressivement ajustées en fonction de la concentration cellulaire²². Les espèces ont ainsi été progressivement cultivées dans du milieu f, puis 2f, 3f et enfin 5f (10N, 16P) aux plus fortes biomasses (voir annexe 2 pour la composition des différents milieux).

2.2 Traitement lumineux

Une rampe d'éclairage composée de dix LED blanches à haute puissance (Nichia NVSL219BT) génère un flux de photons continu (voir §II-2.2.1). La lumière a été modifiée par l'ajout de filtres colorés disposés entre les LED blanches et le photobioréacteur. Les deux espèces ont ainsi été cultivées sous des lumières blanche, rouge ou verte à une intensité lumineuse incidente (I_{in}) de 700 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (PAR). Les intensités délivrées par les rampes de LED ont été déterminées en prenant en compte la transmittance spécifique des

²² Pour rappel, les expériences présentées dans ce chapitre ont été menées pour étudier le seul effet de la lumière. Les cultures ont ainsi été alimentées avec un milieu nutritif dépourvu d'élément limitant afin que seul le flux de photons auto-ombré puisse constituer le facteur limitant. Un milieu nutritif trop concentré pouvant entraîner des effets indésirables (e.g toxicité, précipitations de certains éléments), les quotas cellulaires en éléments nutritifs des deux espèces et l'étude préalable de l'impact de la concentration en éléments nutritifs sur la densité de population à l'état d'équilibre (*données non présentées*), ont permis de déterminer, et d'ajuster au cours du temps, les concentrations en nutriments du milieu frais.

différents filtres. La rampe pourvue du filtre présentant la plus faible transmittance (filtre rouge) permettait d'atteindre une intensité incidente maximale de $700 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en fonctionnement continu. Cette valeur a été choisie pour l'ensemble des expériences. Le PAR (I_{in}) a été mesuré avant inoculation sur la face interne de la paroi avant de chaque photobioréacteur à l'aide d'un capteur plan. Ce dernier a également permis de mesurer en continu le PAR en sortie des photobioréacteurs (I_{out}). Cette donnée a été relevée deux fois par jour dès l'inoculation. Les spectres des différentes lumières ($I_{in}(\lambda)$), présentés en figure VI-2B, ont été mesurés à l'aide d'un radiospectromètre (OCEAN OPTICS USB4000-UV-VIS). Par ailleurs, les spectres de la lumière sortant des photobioréacteurs ont été acquis quotidiennement en deux points distincts de leur face arrière.

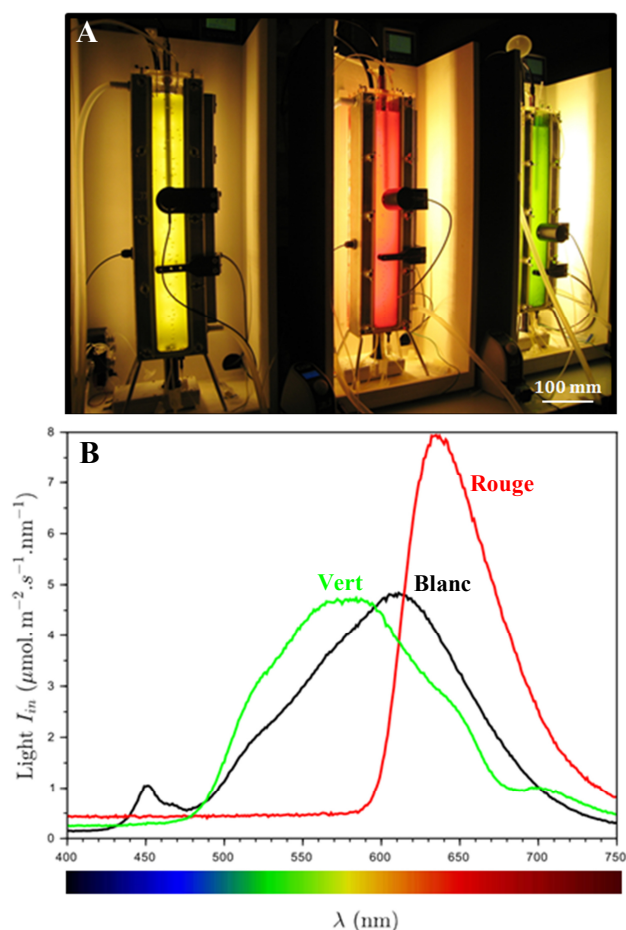


Figure VI-2: (A) Dispositif de culture en lumières colorées. Les trois photobioréacteurs plans sont éclairés à l'aide de trois couleurs différentes : lumière blanche (440 – 750 nm), lumière rouge (600 – 750 nm) et lumière verte (480 – 750 nm), (B) Spectres d'émission des trois lumières testées (blanc, vert, rouge) lors des expériences, menées à PAR équivalent ($I_{in} = 700 \pm 74,5 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (n=18)). Les filtres rouges et verts sont identiques à ceux utilisés lors de l'étude présentée au chapitre V.

2.3 Conditions de pré-culture

Les microalgues ont été préalablement acclimatées aux conditions du dispositif de culture décrit précédemment, en fed-batch, sous une lumière continue blanche dont l'intensité (PAR) a été progressivement augmentée, tous les 7 jours, de 300 à 700 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les pré-cultures ont ainsi été maintenues en phase exponentielle de croissance durant 28 jours, soit 15 générations au moins. 500 mL de pré-culture, d'une concentration de $6,3.10^6$ (*D. salina*) ou $1,5.10^7$ cellules. mL^{-1} (T-Iso 2X) ont été utilisés pour l'inoculation (Fig. VI-3).

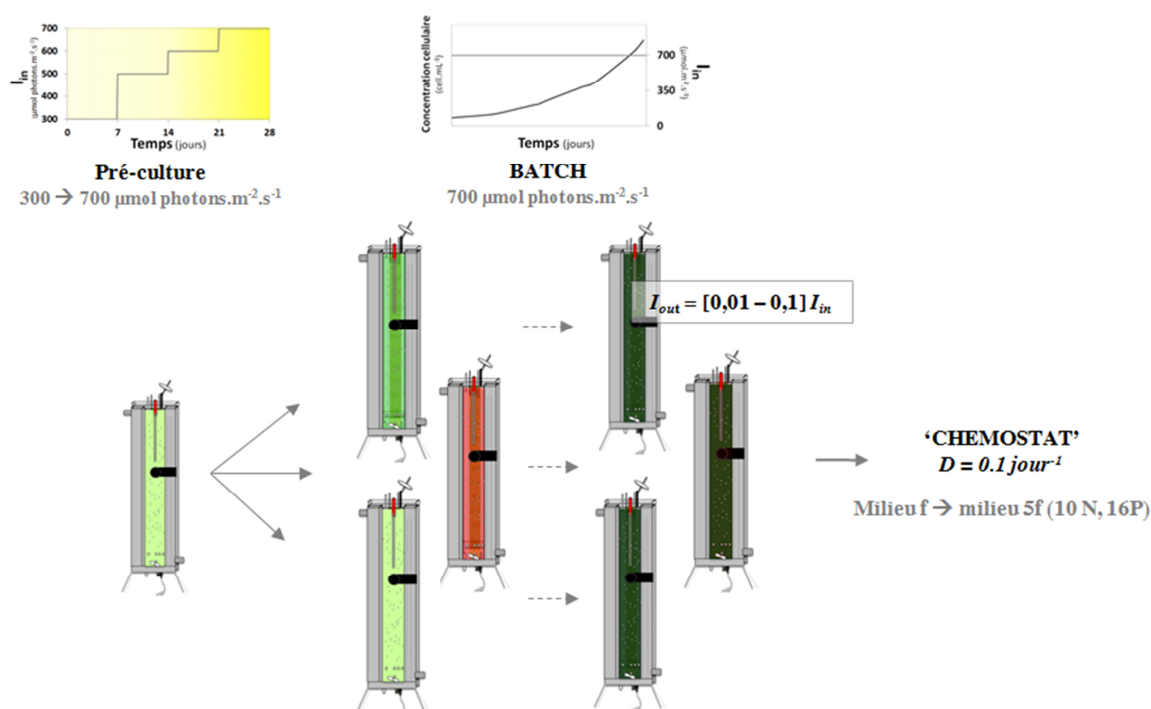


Figure VI-3 : Représentation schématique du protocole expérimental. La pré-culture, cultivée sous une lumière blanche continue dont l'intensité a été progressivement augmentée de 300 à 700 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a servi à inoculer les trois milieux de culture. Les cultures ont été maintenues en mode batch ($I_{in} = 700 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) jusqu'à ce qu'elles atteignent une forte biomasse (i.e. 1 à 10% de lumière transmise) puis en mode continu ('chémostat photolimité', $D = 0,1 \text{ jour}^{-1}$).

2.4 Paramètres standards

Les paramètres ci-dessous, dont les protocoles de mesure sont présentés dans le chapitre II, ont été suivis pour chaque culture :

- **Taille et abondance des cellules** (cf. §II-3.1)
- **Contenu en pigments** (cf. §II-3.2.1)
- **Spectre d'absorption *in vivo*** (cf. §II-3.2.2)
- **Quota cellulaire en carbone et en azote** (cf. §II-3.3)
- **Contenu en lipides neutres** (cf. §II-3.4)

2.5 Mesures de respiration : capteur fluorescent par méthode non invasive

Une pastille sensible à l'oxygène (diamètre 8 mm, Presens), qui fluoresce en fonction de l'oxygène dissous, a été fixée à l'intérieur de chaque photobioréacteur au niveau d'un orifice latéral, fermé du côté de la culture par une fenêtre transparente. Les pastilles ont été préalablement calibrées de 0 à 100% de saturation d'oxygène. L'oxygène a été mesuré en fin d'expérience à l'aide d'un oxymètre (OXY-4 mini, PreSens), relié à une fibre optique maintenue en face de la pastille, à l'extérieur de l'orifice latéral.

Afin de contrôler l'exactitude des résultats, potentiellement affectés par la formation d'un biofilm sur la pastille, des mesures supplémentaires ont été réalisées pour chaque condition lumineuse au sein d'un dispositif développé spécifiquement pour cette étude (Fig. VI-4). Des aliquotes de 20 mL de culture ont ainsi été utilisées pour les mesures de respiration (consommation d'oxygène), réalisées à l'obscurité à 27 (*D. salina*) ou 28°C ($\pm 0,2$ °C) (T-Iso 2X), durant 10 min. Le taux de respiration pouvant être affecté par l'activité métabolique, ces mesures, effectuées en triplicats, ont été répétées toutes les 4 heures durant 16 heures afin de déterminer un taux de respiration moyen (jour^{-1}).

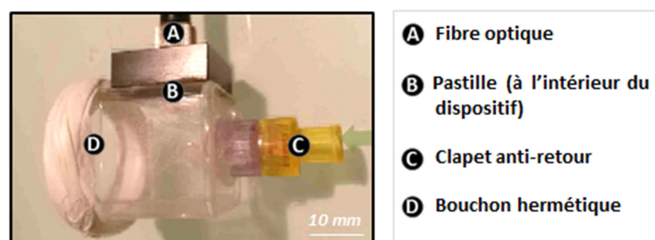


Figure VI-4 : Dispositif de mesure d'oxygène. Les aliquotes de culture sont transférées au sein du dispositif, hermétiquement fermé à l'aide d'un film plastique (Parafilm M®) (D), à travers un clapet anti-retour (C). La pastille sensible à l'oxygène est située à l'intérieur du dispositif transparent, en face de la fibre optique. Les mesures sont réalisées à l'aide du même oxymètre que celui utilisé pour les mesures au sein des photobioréacteurs. Le dispositif peut être disposé au sein d'un cryostat thermostaté afin de contrôler la température de l'échantillon.

2.6 Statistiques

Afin d'étudier l'impact de la composition spectrale, les données des trois couleurs d'éclairage ont fait l'objet d'une analyse de variance à un critère de classification (ANOVA), suivie d'un test post-hoc HSD de Tukey, après en avoir vérifié les conditions d'application. Les différences ont été considérées comme significatives pour $P < 0,05$.

3. Modélisation de la croissance des microalgues sous différents spectres lumineux

Nous proposons un modèle représentant l'effet du spectre lumineux sur la croissance des microalgues, cultivées à haute densité de biomasse. Ce modèle, dérivé des travaux de Stomp *et al.* (2004, 2007)²³, est construit dans le but de prédire et d'optimiser la productivité de cultures denses de microalgues. Ce modèle a été calibré avec les résultats expérimentaux obtenus en lumière blanche et validé avec les données acquises en lumières verte et rouge. Les variables et paramètres du modèle ainsi que leurs unités sont listés dans le tableau I.

3.1 Développement du modèle

Nous considérons un réacteur plan parfaitement mélangé dont la concentration en biomasse est notée x . L'atténuation lumineuse au sein du réacteur peut être représentée par la loi de Beer-Lambert spectrale. Les propriétés optiques de la biomasse sont données par le spectre d'absorption $A(\lambda)$ (qui correspond au spectre d'absorption normalisé par le biovolume) et le coefficient de diffusion d , que l'on suppose indépendant de la longueur d'onde λ . Etant donné $I_{in}(\lambda)$ le spectre de lumière incidente et K le coefficient d'atténuation (hors biomasse), l'intensité lumineuse au sein du réacteur à une profondeur z est donnée par :

$$I(\lambda, x, z) = I_{in}(\lambda) \exp[-(A(\lambda) + d)xz - Kz] \quad (\text{VI-1})$$

Nous considérons que le taux de croissance μ dépend de γ , le nombre de photons absorbés, quelle que soit leur couleur. Cette hypothèse clé considère que le rendement quantique, défini comme le nombre de molécules d'oxygène synthétisées par photon absorbé, est indépendant de la longueur d'onde, dans le spectre visible (Morel *et al.*, 1987). Contrairement à Stomp *et al.* (2007) qui utilisent une cinétique linéaire, nous représentons la photoinhibition en utilisant une cinétique de type Haldane, re-paramétrée de la manière suivante :

$$\mu_z = \mu_m \frac{\gamma(z, x)}{\gamma(z, x) + k_\gamma \left(\frac{\gamma(z, x)}{\gamma_{opt}} - 1 \right)^2} \quad (\text{VI-2})$$

²³ Dans leurs travaux, Stomp *et al.* ont développé un modèle de compétition pour le spectre lumineux, appliqué à deux espèces de cyanobactéries (*Synechococcus* sp. et *Tolypothrix tenuis*).

Le nombre de photons absorbés, γ , se calcule selon l'équation suivante (Sathyendranath & Platt, 1989) :

$$\gamma(z, x) = \int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{max}} I(\lambda, x, z) A(\lambda) d\lambda \quad (VI-3)$$

Le taux de croissance moyen au sein de la culture, $\mu(x)$, est obtenu en intégrant le taux de croissance sur toute la profondeur L :

$$\mu(x) = \frac{1}{L} \int_0^L \mu_z dz = \frac{\mu_m}{L} \int_0^L \frac{\gamma(z, x)}{\gamma(z, x) + k_\gamma \left(\frac{\gamma(z, x)}{\gamma_{opt}} - 1 \right)^2} dz \quad (VI-4)$$

Etant donné que nous nous plaçons dans le cadre d'une culture continue, la dynamique de la biomasse résulte du bilan entre production et dilution. Elle peut être décrite par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dx}{dt} = (\mu(x) - D - r)x \quad (VI-5)$$

avec D , le taux de dilution et r , le taux de respiration (supposé constant).

3.2 Calibration du modèle

Le spectre $A(\lambda)$ et le coefficient de diffusion d ont été calculés à partir des mesures réalisées au spectrophotomètre (voir §II-3.2.2). Etant donné L_s la largeur de la cuvette, x_s la concentration cellulaire et $a(\lambda)$ le spectre mesuré, nous obtenons :

$$A(\lambda) = \frac{[a(\lambda) - a(750)] \ln(10)}{x_s L_s} \quad \text{et} \quad d = \frac{a(750) \ln(10)}{x_s L_s} \quad (VI-6)$$

Le coefficient d'atténuation K a été déterminé à partir de la mesure de l'intensité lumineuse en sortie du réacteur en l'absence de biomasse I_{out}^0 :

$$K = \frac{1}{L} \ln \left(\frac{I_{in}}{I_{out}^0} \right) \quad (VI-7)$$

Les mesures du biovolume au cours du temps en lumière blanche ont été utilisées pour calibrer certains paramètres cinétiques, à savoir :

- μ_m pour l'expérience réalisée avec *Dunaliella salina*,
- $\mu_m, k_\gamma, \gamma_{opt}$ et r pour l'expérience menée avec T-Iso 2X.

Plus précisément, la calibration a été réalisée en choisissant les valeurs des paramètres permettant de minimiser la somme des carrés des écarts entre les mesures et le modèle. Pour ce faire, nous avons utilisé la fonction *fminsearch* (basée sur la méthode du simplex) sous le logiciel de calcul numérique Scilab.

Pour l'expérience menée avec *Dunaliella salina*, les valeurs des paramètres k_γ et γ_{opt} sont issues des résultats expérimentaux présentés au chapitre III (après conversion de l'intensité lumineuse en nombre de photons absorbés). Le taux de respiration a été déterminé à partir du suivi de l'oxygène dans un échantillon de culture placé dans l'obscurité (voir §2.5).

Tableau I : Valeurs et interprétation des paramètres.

Paramètres	Significations	Valeurs pour <i>D. salina</i>	Valeurs pour T-Iso 2X	Unités
Variable				
x	Concentration en biomasse			$\mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}$
Paramètres biologiques				
$A(\lambda)$	Spectre d'absorption	<i>Mesures spectrophotomètre</i>		$\text{m}^2.\mu\text{m}^{-3}$
d	Coefficient de diffusion	$3,0 \times 10^{-11}$	$7,1 \times 10^{-11}$	$\text{m}^2.\mu\text{m}^{-3}$
k_γ	Constante définissant la pente initiale	$1,2 \times 10^{-8}$	$4,8 \times 10^{-7}$	$\mu\text{mol.s}^{-1}.\mu\text{m}^{-3}$
γ_{opt}	nombre de photons absorbés optimal	$5,0 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-8}$	$\mu\text{mol.s}^{-1}.\mu\text{m}^{-3}$
μ_m	Taux maximum de croissance	1,82	0,16	jour^{-1}
r	Taux de respiration	0,1	0,01	jour^{-1}
Paramètres physiques				
D	Taux de dilution	<i>Voir §2.1.1</i>		jour^{-1}
K	Coefficient d'atténuation (hors biomasse)	10,2		m^{-1}
$I_{in}(\lambda)$	Spectre d'intensité lumineuse incidente	<i>Voir figure VI-2</i>		$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{nm}^{-1}$
I_{out}^0	Intensité lumineuse en sortie du réacteur en l'absence de biomasse	$440 \pm 30,5$		$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
L	Largeur du photobioréacteur	0,055		m
P	Productivité			$\mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}.\text{j}^{-1}$

4. Résultats et discussion

4.1 Simulation du modèle et comparaison aux données expérimentales

Le modèle a été simulé pour les différents spectres lumineux de PAR incident équivalent (le modèle a été calé grâce aux données de l'expérience en lumière blanche). Les taux de dilution mesurés ont également été simulés. Les résultats ont été comparés aux données expérimentales de *Dunaliella salina* et T-Iso 2X. Les valeurs des différents paramètres obtenus sont présentées dans le tableau I.

4.1.1 Effet de la qualité de la lumière sur la croissance des microalgues

La figure VI-5 présente l'évolution temporelle de la biomasse, exprimée en biovolume total, et du taux de croissance moyen de *Dunaliella salina* et de T-Iso 2X en fonction de la composition spectrale.

La dynamique de croissance est complexe en raison des effets conjugués et interdépendants du spectre d'éclairement et de l'auto-ombrage. Qualitativement, le modèle permet de représenter correctement l'évolution du biovolume total de *D. salina*, observée expérimentalement, pour chaque couleur d'éclairement alors qu'un seul paramètre (μ_m) a été ajusté sur les seules données de l'expérience en lumière blanche (Fig. VI-5A). En outre, la valeur du taux de croissance maximum obtenue ($\mu_m = 1,82 \text{ jour}^{-1}$) apparaît cohérente. En particulier, les expériences de validation (lumière rouge et verte) prédisent correctement les biomasses mesurées.

Le modèle prédit un biovolume total supérieur pour l'expérience en lumière verte à celui observé dans les conditions de lumières blanche et rouge, dès le 2^{ème} jour de culture. Les résultats expérimentaux mettent également en évidence une différence significative (au seuil de 5%) du biovolume entre les différentes couleurs d'éclairement, à partir du 12^{ème} jour de culture ($\alpha = 0,05$; $F_{0,05,2,39} = 3,23$, $F=3,64$, $P<0,05$). Le biovolume total atteint en fin d'expérience est supérieur en lumière verte (environ $4,14 \cdot 10^9 \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$) à celui observé sous une lumière blanche ($3,63 \cdot 10^9 \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$) ou rouge ($3,22 \cdot 10^9 \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$). Sous une lumière verte, le biovolume final de *D. salina* est ainsi 14% et 29% plus élevé que sous des lumières blanche et rouge respectivement.

Mais cet effet est avant tout expliqué par le fait que le taux de dilution de la culture éclairée par une lumière verte était en réalité 50% plus faible que celui attendu²⁴, générant ainsi une biomasse plus élevée.

Quelle que soit la couleur de l'éclairement, en début d'expérience, l'augmentation de la biomasse de *D. salina* induit une baisse de la lumière moyenne et une forte diminution du taux de croissance moyen dans le réacteur. En effet, avec l'augmentation de la biomasse, la lumière devient rapidement de plus en plus limitante, en raison de l'effet d'auto-ombrage ($I_{out} \approx 4 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ au jour 2 ; Fig. VI-7A). Le taux de croissance diminue ainsi d'autant plus fortement que la biomasse est importante. Le taux de croissance tend ensuite vers une valeur à l'équilibre, correspondant à la somme du taux de dilution, plus faible pour l'expérience en lumière verte, et du taux de respiration. Notons que l'expérience a duré suffisamment longtemps pour que le taux de croissance atteigne sa valeur d'équilibre.

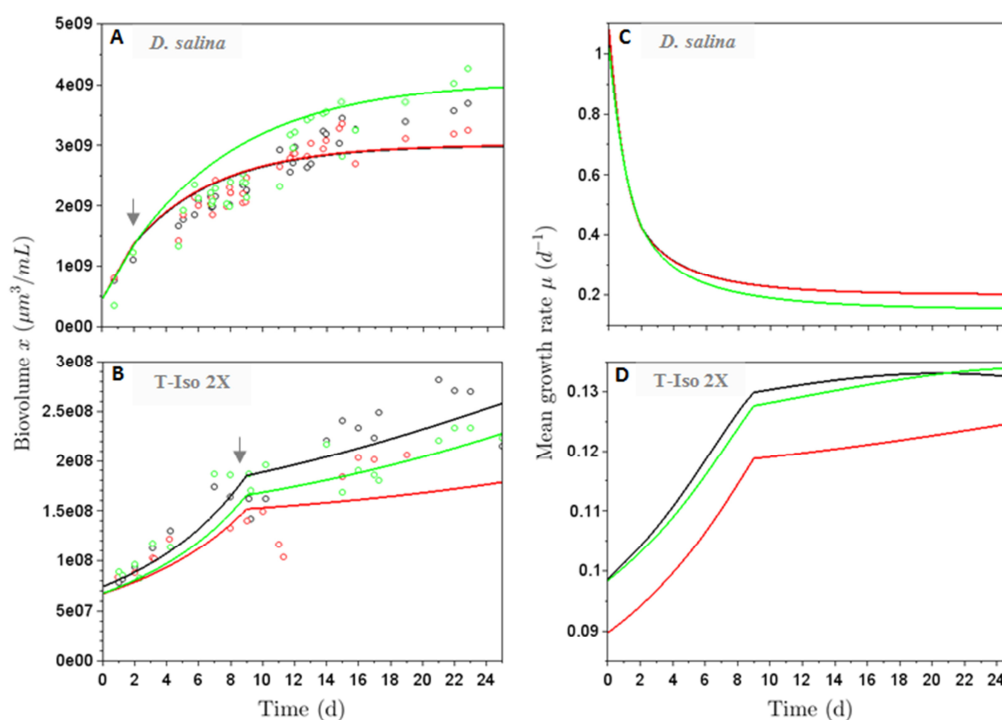


Figure VI-5 : (A, B) Comparaison du biovolume total ($\mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}$) prédit par le modèle (traits pleins) avec les données expérimentales (cercles colorés) et (C, D) taux de croissance brut moyenné sur la profondeur (jour^{-1}) (sorties du modèle) de *Dunaliella salina* (A, C) et T-Iso 2X (B, D) exposées à différents spectres lumineux de PAR_m équivalent. La mise en place du mode continu, au jour 2 (*D. salina*) et 9 (T-Iso 2X) est indiquée par une flèche ↓.

²⁴ L'effet d'interférence entre les trois pompes a été détecté trop tardivement pour être corrigé durant l'expérience menée avec *Dunaliella salina*. En revanche, les taux de dilution étaient identiques lors de l'expérience avec T-Iso2X

Le modèle apparaît un peu moins précis pour T-Iso 2X. Les valeurs des paramètres qui ont été retenues font l'hypothèse d'une photoinhibition dans le réacteur (des courbes de réponse de T-Iso 2X à la lumière sont présentées en annexe 5). En effet, d'après le modèle et contrairement à *Dunaliella salina*, le nombre moyen de photons absorbés (γ_{mean}) est supérieur au nombre de optimal photons absorbés ($\gamma_{opt} = 1,0 \cdot 10^{-8} \mu\text{mol.s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) (Tableau II et Fig. VI-6). Cette photoinhibition est d'autant plus marquée en lumière rouge car les photons rouges sont davantage absorbés (Fig. VI-6B). Le taux de croissance moyen de T-Iso 2X présente alors une dynamique différente de celle de *D. salina* et augmente, pour toutes les couleurs d'éclairement, durant les 8 premiers jours, au fur et à mesure que la densité des cellules augmente et donc que l'intensité lumineuse moyenne décroît, réduisant ainsi la photoinhibition ($I_{out} \approx 100,5 \mu\text{mol photons.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ au jour 8 ; Fig. VI-7B). Il convient de remarquer que la valeur du taux de croissance maximum obtenue ($\mu_m = 0,16 \text{ jour}^{-1}$) est très faible et au moins 7 fois inférieure à celle observée dans la littérature pour des valeurs d'éclairement similaires (Lacour *et al.*, 2012 ; Marchetti *et al.*, 2012).

Il faut cependant noter que ces faibles taux de croissance pourraient également être dus à une quantité initiale trop importante de nutriments induisant une inhibition. Une telle hypothèse aurait des conséquences similaires à une photoinhibition, dans la mesure où l'effet tend à diminuer lorsque la biomasse augmente.

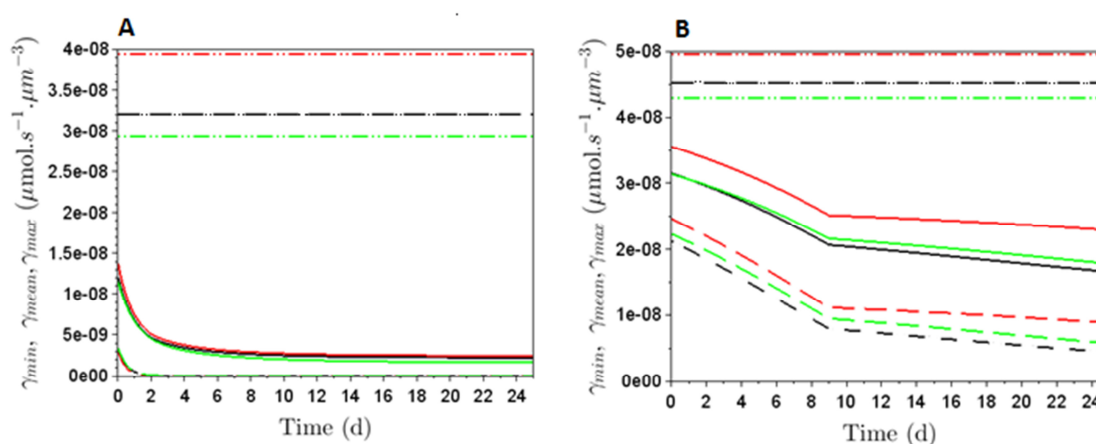


Figure VI-6 : Evolution du nombre minimum (γ_{min}) (lignes pointillées), moyen (γ_{mean}) (lignes continues) et maximum (γ_{max}) (tirets points) de photons absorbés par biovolume ($\mu\text{mol photons.s}^{-1} \cdot \mu\text{m}^{-3}$) par (A) *Dunaliella salina* et (B) T-Iso 2X, selon le spectre d'éclairement (sorties de modèle).

4.1.2 Evolution de la lumière en sortie des photobioréacteurs : effets du spectre d'éclairement sur l'auto-ombrage

Qualitativement, le modèle permet de représenter correctement l'évolution de l'intensité lumineuse en sortie des réacteurs - et de ce fait l'absorption de la lumière par les cellules - pour les deux espèces. En particulier, les expériences de validation (lumières rouge et verte) prédisent correctement les observations. Le modèle et les données expérimentales de *Dunaliella salina* mettent en évidence, dès le quatrième jour de culture, l'absence de lumière en sortie du réacteur ($I_{out} \approx 2,6 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1} \approx 0,3\% I_{in}$), quelle que soit la couleur d'éclairement (Fig. VI-7A). La totalité de la lumière est ainsi absorbée par les trois cultures en raison des très fortes biomasses atteintes dans le réacteur. Pour les cultures de T-Iso 2X, la lumière en sortie décroît conjointement à l'augmentation du biovolume total. D'après les données expérimentales, la quasi-totalité de la lumière est absorbée, pour les trois couleurs d'éclairement, à partir du 20^{ème} jour de culture ($I_{out} \approx 12,3 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1} \approx 1,75\% I_{in}$) (Fig. VI-7B).

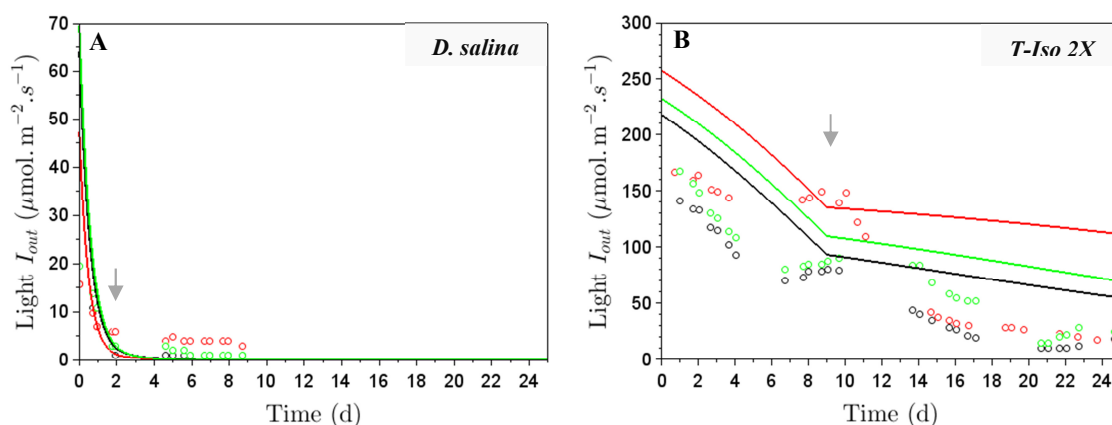


Figure VI-7 : Comparaison de l'intensité lumineuse en sortie des réacteurs (I_{out} , $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) prédite par le modèle (traits pleins) avec les données expérimentales (cercles colorés) de (A) *Dunaliella salina* et (B) T-Iso 2X exposées à différents spectres lumineux de PAR_{in} équivalent. La mise en place du mode continu, au jour 2 (*D. salina*) et au jour 9 (T-Iso 2X) est indiquée par une flèche . ↓

L'évolution du spectre lumineux en sortie du photobioréacteur est également qualitativement bien prédite par le modèle pour les deux espèces (Fig. VI-8). Pour chaque couleur d'éclairement, ce spectre traduit l'atténuation de la lumière, due à l'absorption et à la diffusion des photons par

les cellules. La lumière est très rapidement absorbée par *Dunaliella salina* pour les trois conditions d'éclairement, en raison des fortes biomasses au sein des réacteurs. Pour les lumières blanche et verte, nous distinguons un maximum d'intensité de la lumière sortante pour des longueurs d'ondes comprises entre 540 nm et 575 nm, correspondant aux longueurs d'ondes peu absorbées par *D. salina* (Fig. VI-9A et C). Le spectre en sortie des cultures éclairées par une lumière rouge décroît plus rapidement, les photons rouges étant davantage absorbés (Fig. VI-8B). En effet, les pigments des microalgues absorbant la lumière d'une manière hautement discriminatoire, chaque espèce présente une absorption minimale ainsi que deux pics d'absorption maximale dans une plage de longueurs d'ondes spécifique du spectre lumineux (Falkowski *et al.*, 2004). *Dunaliella salina* et T-Iso 2X présentent deux zones d'absorption prédominantes, entre 430 et 470 nm (lumière bleue) et entre 650 et 700 nm (lumière rouge) et une zone d'absorption minimale, dans la partie verte du spectre lumineux, comprise entre 550 et 600 nm, avec un point d'absorption minimale à 560 nm (*D. salina*) ou entre 550 et 650 nm, avec un point d'absorption minimale à environ 600 nm (T-Iso 2X) (Fig. VI-9). Ainsi, les cultures de T-Iso 2X présentent également un maximum d'intensité de la lumière sortante pour les longueurs d'ondes les moins absorbées, entre 560 et 640 nm.

En outre, nous observons, chez les deux espèces étudiées et pour chaque couleur d'éclairement, des pics de lumière au-delà de 700 nm, longueur d'onde au-delà de laquelle les microalgues n'absorbent plus de photons.

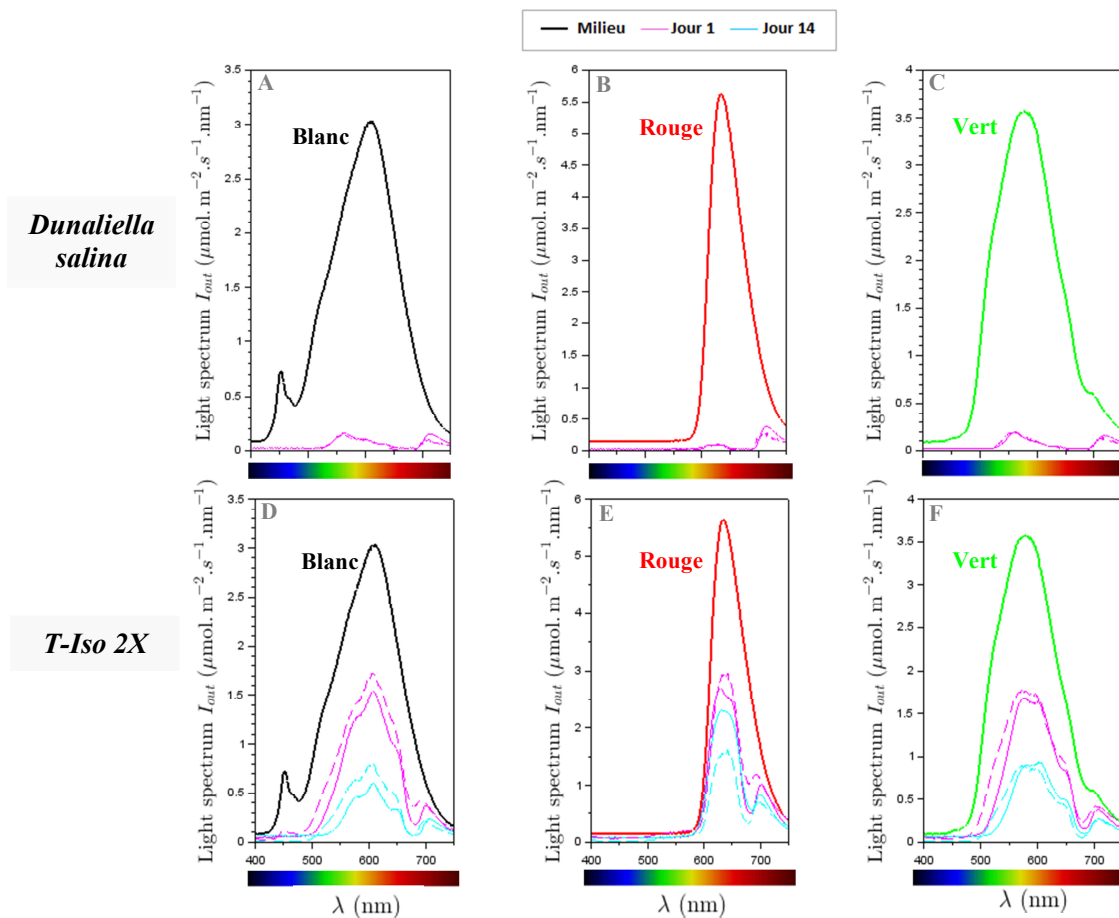


Figure VI-8 : Spectres de lumière en sortie du réacteur ($\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nm}^{-1}$) à $t=1$ (magenta) et $t=14$ (cyan) : comparaison des mesures (traits pleins) avec les simulations (pointillés) pour *Dunaliella salina* (A, B, C) et *T-Iso 2X* (D, E, F), exposées à différentes couleurs d'éclairage. En traits épais, les spectres de lumière en sortie de réacteur sans biomasse.

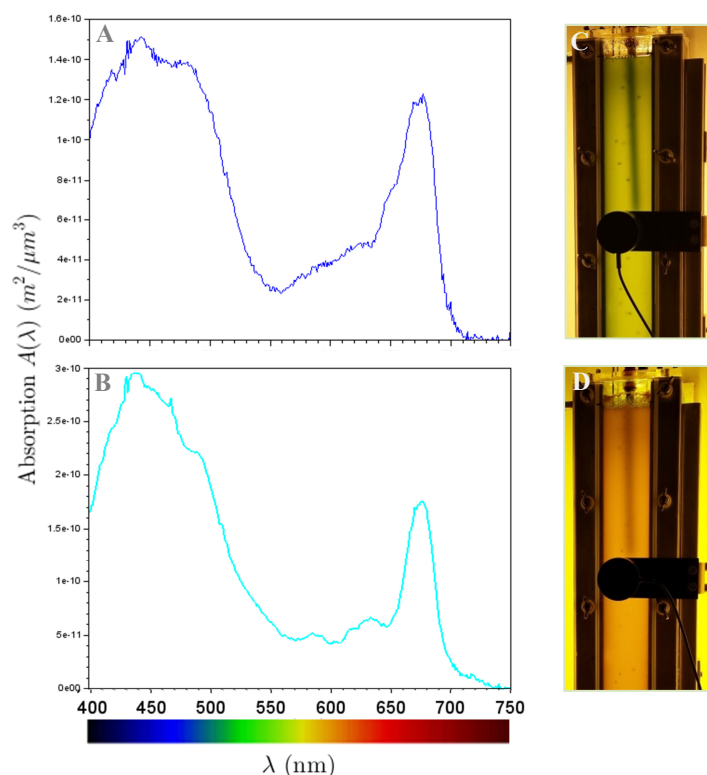


Figure VI-9 : Spectres d'absorption *in vivo*, normalisés par le biovolume ($m^2.\mu m^{-3}$), des cultures mères de (A) *Dunaliella salina* et (B) T-Iso 2X, ayant servi à inoculer les cultures. *D. salina* et T-Iso 2X présentent deux zones d'absorption prédominantes, entre 430 et 470 nm (bleu) et entre 650 et 700 nm (rouge) et une zone d'absorption minimale, comprise entre 550 et 600 nm (*D. salina*) ou entre 550 et 650 nm (T-Iso 2X). Photographie des cultures de (C) *D. salina* et (D) T-Iso 2X, mettant en évidence leur couleur respective, qui traduit la part du spectre solaire qui n'est pas absorbée : T-Iso est ainsi plus brune car elle absorbe moins dans le rouge et l'orange que *D. salina*.

4.1.3 Physiologie des cellules

Contenu pigmentaire

Dans l'expérience réalisée avec *Dunaliella salina*, le rapport Chl *a* : N ($pg.pg^{-1}$) mesuré à partir du second jour reste constant au cours du temps, quelle que soit la couleur d'éclairement (Fig. VI-12). Ce rapport ne diffère pas significativement entre les lumières blanche, rouge et verte ($\alpha = 0,05$, $F_{0,05,2,70} = 3,68$, $F=2,25$, $P=0,14$) et présente des valeurs moyennes comprises entre $0,38 \pm 0,017$ (vert) et $0,41 \pm 0,02$ (blanc) ($n=24$). Selon les sorties du modèle (Fig. VI-6A), la quantité moyenne de photons absorbés par les cellules de *D. salina* est similaire pour toutes les

couleurs, ce qui nous permet d'écarter l'hypothèse d'un effet conjugué de l'intensité et du spectre de la lumière sur les résultats observés. Ainsi, contrairement à l'étude réalisée en cultures diluées (voir chapitre V), l'acclimatation est ici identique pour les trois couleurs d'éclairement, et n'a, de ce fait, pas été représentée dans le modèle développé.

L'intensité lumineuse moyenne résiduelle dans les réacteurs $\bar{I}$, calculée selon l'équation (VI-8) (Bernard *et al.*, 2015), est d'environ $106 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, soit environ 15% de la lumière incidente (avec $I_{out} \approx 1 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

$$\frac{\bar{I}}{I_{in}} = \frac{\frac{I_{out}}{I_{in}} - 1}{\ln(\frac{I_{out}}{I_{in}})} \quad (\text{VI-8})$$

Nos travaux menés à faible densité de biomasse suggèrent que la lumière bleue stimulerait la synthèse de chlorophylle *a* chez *Dunaliella salina*. Si nous comparons ces résultats à ceux de la présente étude, les conditions d'éclairement moyen seraient ici favorables à une photoacclimatation vers davantage de chlorophylle *a* (Fig. VI-10). Néanmoins, dans la présente étude, le PAR dans le bleu étant très faible (de 2 à $10 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), nous émettons l'hypothèse que l'acclimatation pigmentaire n'a pas été déclenchée ici, ce qui explique la faible teneur en chlorophylle *a* (Fig. VI-10). Ainsi, la différence serait vraisemblablement plus marquée si nous avions éclairé les cultures à l'aide d'une lumière bleue.

D'une manière générale, les cellules microalgales qui présentent une teneur plus élevée en chlorophylle *a* captent davantage de photons mais favorisent les phénomènes d'auto-ombrage, limitant la croissance des cellules (Molina-Grima *et al.*, 1996). A l'échelle globale d'une culture, une forte pigmentation cellulaire apparait de ce fait contre-productive. L'absence - ou la très faible proportion - de lumière bleue présenterait un réel intérêt afin d'induire une réduction de la teneur en chlorophylle, et d'accroître ainsi la transparence des cellules. Des microalgues plus transparentes, en permettant une meilleure propagation de la lumière au sein du réacteur ainsi qu'une atténuation des processus de photosaturation et de photoinhibition en surface, devraient améliorer la productivité globale des systèmes de culture à haute densité (Fig. VI-11).

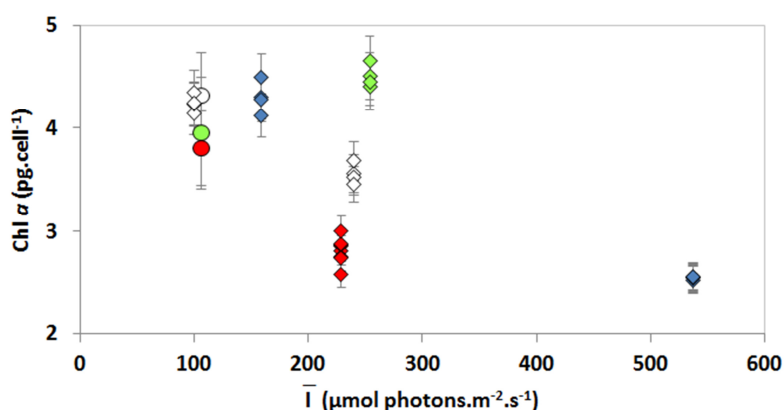


Figure VI-10 : Evolution du contenu cellulaire en chlorophylle a (Chl a ; pg.cell^{-1}) de *Dunaliella salina* en fonction de l'intensité lumineuse moyenne au sein du réacteur $\bar{I}$ ($\mu\text{mol photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) pour chaque couleur d'éclairement. Les résultats de la présente étude sont représentés par des cercles colorés. Les losanges correspondent aux résultats des expériences présentées dans le chapitre V.

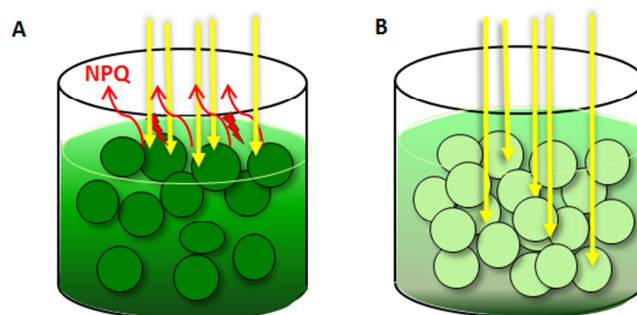


Figure VI-11 : Représentation schématique de l'effet d'une lumière bleue en cultures à haute densité. (A) Culture éclairée par une lumière solaire, contenant du bleu, (B) Culture éclairée à l'aide d'une lumière solaire spectralement filtrée, dépourvue de bleu. Dans ces conditions d'éclairement, les microalgues ont moins de chlorophylle a et sont ainsi plus transparentes. Individuellement, les cellules ont une probabilité moindre d'absorber les photons, ce qui permet i) une meilleure pénétration et une distribution plus uniforme de la lumière au sein du réacteur et ii) de réduire les phénomènes de dissipation non-photochimique (NPQ) et de photoinhibition, améliorant ainsi la productivité photosynthétique de la culture dans sa globalité.

Pour T-Iso 2X, le rapport Chl a : N en lumière rouge ($0,07 \pm 0,004$) est significativement inférieur à celui mesuré en lumière blanche ($0,11 \pm 0,006$) ou verte ($0,10 \pm 0,007$) ($n=12$) et ce jusqu'au 11^{ème} jour de culture (Fig. VI-12C). Sous lumière rouge, T-Iso 2X présente un rapport

Chl *a* : N en moyenne 1,5 fois inférieur à celui observé sous les deux autres conditions lumineuses.

La réponse de T-Iso 2X à la lumière rouge semble traduire un effet de l'intensité lumineuse. En effet, les microalgues s'acclimatent à l'intensité lumineuse moyenne perçue dans le réacteur (chapitre III ; Combe *et al.*, 2015). Ainsi, durant les 11 premiers jours, les cellules en lumière rouge reçoivent une intensité lumineuse moyenne $\bar{I}$, environ 10 à 15% plus élevée que celles exposées à des lumières verte et blanche respectivement, leur biomasse étant plus faible (Fig. VI-7B). Cette réduction de la concentration en Chl *a* permet de minimiser les capacités d'absorption de la cellule et en conséquence les processus de photo-oxydation (Loeblich, 1982 ; Richardson *et al.*, 1983 ; Anning *et al.*, 2000 ; MacIntyre *et al.*, 2002).

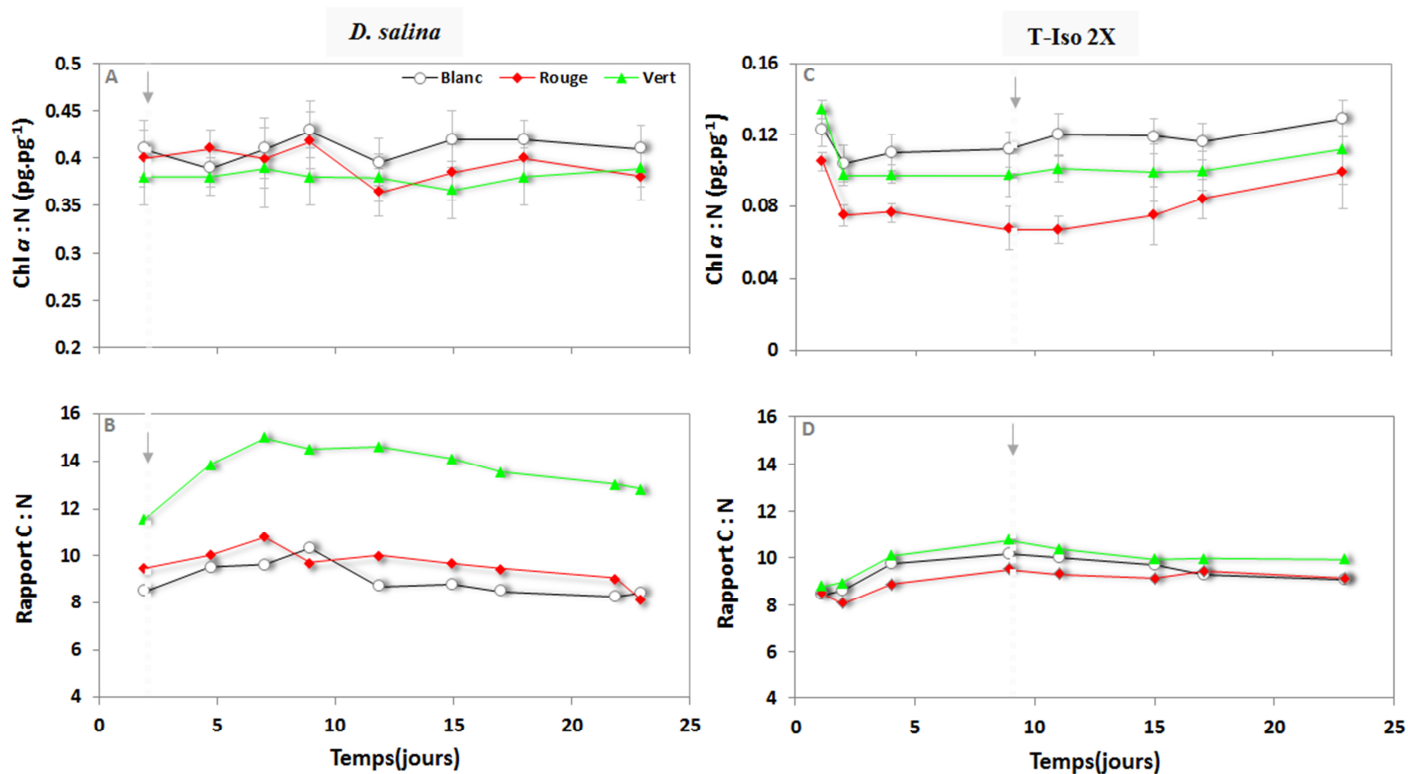


Figure VI-12 : Evolution des rapports (A, C) chlorophylle *a* : azote (Chl *a* : N ; pg.pg⁻¹) et (B, D) C : N (pmol.pmol⁻¹) de *Dunaliella salina* (A et B) et T-Iso 2X (C et D) cultivées sous des lumières blanche, rouge et verte, à PAR_m équivalent. La mise en place du mode chémostat, au jour 2 (*D. salina*) et 9 (T-Iso 2X) est indiquée par une flèche et une ligne pointillée.

Composition élémentaire de la biomasse

Nos résultats semblent mettre en évidence un effet du spectre lumineux sur le rapport molaire C : N et le quota cellulaire en carbone de *Dunaliella salina* (Fig. VI-12B et tableau II). Le rapport molaire C : N moyen en lumière verte ($13,61 \pm 0,75$ (n=14)) est significativement supérieur à celui observé en lumière blanche ($8,56 \pm 0,21$ (n=14)) ou rouge ($9,24 \pm 0,72$ (n=14)) ($\alpha = 0,05$, $F_{0,05,2,39} = 3,40$, $F=80,71$, $P<0,05$). Statistiquement, ce contenu ne diffère pas entre les lumières blanche et rouge. L'augmentation du rapport C : N résulte ici principalement d'une augmentation du quota cellulaire en carbone, significativement plus élevé en lumière verte ($9,23 \pm 0,59$ pmol.cell⁻¹ (n=14)) qu'en lumière blanche ($7,55 \pm 0,72$ pmol.cell⁻¹ (n=14)) ou rouge ($6,61 \pm 0,47$ pmol.cell⁻¹ (n=14)) ($\alpha = 0,05$, $F_{0,05,2,39} = 3,11$, $F=7,20$, $P<0,05$) (tableau II). En lumière verte, *Dunaliella salina* contient ainsi en moyenne 30% de carbone en plus que sous les deux autres spectres lumineux.

La taille des cellules est également influencée par la couleur de l'éclairement. Le volume cellulaire moyen des microalgues est plus élevé en lumière verte qu'en lumière blanche ou rouge (voir tableau II). Les cellules présentent le volume le plus faible en lumière rouge ($\alpha = 0,05$, $F_{0,05,2,75} = 3,11$, $F=60,49$, $P<0,05$). Le rapport C : biovolume (pmol-C.μm⁻³.mL⁻¹) n'est alors pas significativement différent selon les couleurs d'éclairement.

L'accumulation de carbone en lumière verte peut trouver une explication au niveau cellulaire. De nombreux auteurs mettent en évidence l'effet de la qualité de la lumière sur le cycle cellulaire. Plus particulièrement, des expériences menées sur *Dunaliella salina* et *Chlamydomonas reinhardtii* suggèrent que la division cellulaire est retardée en l'absence de lumière rouge avec pour conséquence une augmentation de la taille des cellules et du contenu en carbone de réserve (Zachleder *et al.*, 1989 ; Rüdiger & López-Figueroa, 1992 ; Oldenhof *et al.*, 2006).

Dans notre étude, l'éclairage vert utilisé émet moins de photons que les LED blanches entre 600 et 700 nm. Plus précisément, les photons rouges représentent 33%, 48% et 85% du PAR des éclairages vert, blanc et rouge, soit environ 35, 48 et 90 μmol photons.m⁻².s⁻¹ (avec $\bar{I} = 106$ mol photons.m⁻².s⁻¹). Nous pouvons ainsi supposer que la culture éclairée en lumière verte recevrait une trop faible proportion de photons rouges, ayant pour effet de retarder son cycle cellulaire. Néanmoins, la différence demeure très faible entre les lumières blanche et verte et il serait nécessaire de réitérer cette expérience pour confirmer cette hypothèse. Cet aspect n'a, de ce fait, pas été inclus dans le modèle développé.

En revanche, chez T-Iso 2X, les rapports molaires C : N et les quotas cellulaires en azote et en carbone mesurés pour les différentes couleurs ne présentent pas de différence significative ($\alpha = 0,05$, $F_{0,05,2,12} = 3,89$, $F=0,63$, $P=0,55$). Le rapport molaire C : N de T-Iso présente des valeurs moyennes comprises entre $9,27 \pm 0,39$ (rouge) et $10,07 \pm 0,42$ (vert). Les cellules contiennent en moyenne entre $1,42 \pm 0,045$ (blanc) et $1,55 \pm 0,14$ (rouge) pmol de carbone ($n=10$).

Tableau II : Quotas cellulaires en carbone et en azote particuliers (pmol.cell⁻¹), rapports molaires C : N (pmol.pmol⁻¹), volumes cellulaires (μm³), et rapports carbone : biovolume (pmol.μm⁻³.mL⁻¹) de *Dunaliella salina* et T-Iso 2X en fonction de la couleur de l'éclairement. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyennes, calculées à partir du jour 7 (*D. salina*) ou du jour 9 (T-Iso 2X). Pour chaque espèce, les lettres a, b et c indiquent une différence significative entre les moyennes (ANOVA, test de Tukey, $P < 0,05$).

	Condition lumineuse	Carbone (pmol.cell ⁻¹)	Azote (pmol.cell ⁻¹)	C : N (pmol.pmol ⁻¹)	Volume (μm ³)	Carbone : biovolume (pmol-C.μm ⁻³ .mL ⁻¹)
<i>Dunaliella salina</i>	Blanc	$7,55 \pm 0,72^a$	$0,88 \pm 0,08^a$	$8,56 \pm 0,21^a$	333 ± 10^a	$0,0230 \pm 0,0029^a$
	Rouge	$6,61 \pm 0,47^a$	$0,72 \pm 0,07^b$	$9,24 \pm 0,72^a$	301 ± 18^b	$0,0219 \pm 0,0016^a$
	Vert	$9,23 \pm 0,59^b$	$0,68 \pm 0,05^b$	$13,61 \pm 0,75^b$	355 ± 10^c	$0,0248 \pm 0,0028^a$
T-Iso 2X	Blanc	$1,42 \pm 0,045^a$	$0,15 \pm 0,021^a$	$9,66 \pm 0,40^a$	$29,5 \pm 2,2^a$	$0,049 \pm 0,003^a$
	Rouge	$1,55 \pm 0,14^a$	$0,17 \pm 0,012^a$	$9,27 \pm 0,39^a$	$32,4 \pm 4,0^a$	$0,051 \pm 0,006^a$
	Vert	$1,49 \pm 0,22^a$	$0,14 \pm 0,014^a$	$10,07 \pm 0,42^a$	$29,9 \pm 2,2^a$	$0,052 \pm 0,008^a$

Contenu en lipides neutres

La technique de marquage au Nile Red (Rumin *et al.*, 2015) a été utilisée pour estimer le contenu en triglycérides neutres (TAG) de *Dunaliella salina* et T-Iso 2X. La figure VI-13 présente l'intensité de fluorescence par unité de carbone (u.a.μgC⁻¹) de ces deux espèces exposées à différents spectres d'éclairement.

D. salina présente le rapport lipides : C le plus élevé sous une lumière verte (i.e. 2,1 et 3,1 fois plus élevé que sous une lumière rouge ou blanche respectivement). Ce rapport est par ailleurs environ 1,5 fois supérieur à celui observé pour la même couleur d'éclairement en cultures diluées, à une intensité de $187 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (voir §V-3.4).

T-Iso 2X a été choisie dans ces travaux pour sa capacité à surproduire des lipides neutres en condition de carence azotée (Bougaran *et al.*, 2012). Néanmoins, dans la présente étude, où il n'y a pas eu de carence azotée, les différentes couleurs n'induisent pas de différence notable du

contenu en TAG de cette espèce ($\alpha = 0,05$, $F_{0,05,2,52} = 5,14$, $F=2,62$, $P=0,15$). Le rapport lipides : C évolue de $1,11 \pm 0,069$ (blanc) à $1,31 \pm 0,26$ (rouge) ($n=18$).

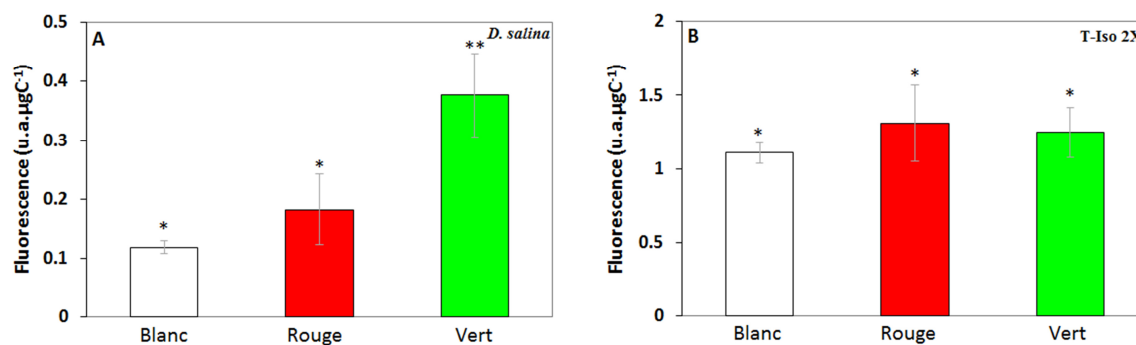


Figure VI-13 : Rapport lipides : C (u.a.µgC⁻¹) de (A) *Dunaliella salina* et (B) T-Iso 2X, cultivées sous des lumières blanche, rouge et verte, à PAR_{in} équivalent. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes calculées sur 6 jours, à l'état stable ($\pm$ SD, $n=18$). Pour chaque espèce, les astérisques (*, **) indiquent une différence significative entre les moyennes (ANOVA, test de Tukey, $P<0,05$).

4.2 Estimation de la productivité. Des données expérimentales aux prédictions mathématiques : les surprenantes propriétés de la lumière verte

“*Le rouge chante la gloire du vert*”

Charles-Pierre Baudelaire (1821-1867)

La lumière verte est habituellement considérée comme peu propice pour la culture de la majorité des espèces de microalgues car elle correspond à une partie du spectre visible peu absorbée (Katsuda *et al.*, 2004 ; Blanken *et al.*, 2013 ; Kim *et al.*, 2013 ; Schulze *et al.*, 2014).

La présente étude met en évidence, pour l'intensité lumineuse testée et à haute densité cellulaire, que la culture de *Dunaliella salina* éclairée par une lumière verte atteint une biomasse finale au moins équivalente à celle observée sous une lumière blanche ou rouge. De manière analogue, la croissance de T-Iso 2X n'est pas altérée par l'utilisation d'une lumière verte. Il convient néanmoins de remarquer que les spectres lumineux générés au laboratoire, à l'aide de filtres, sont assez étalés. Ainsi, l'éclairement vert émet également des photons rouges (33% des photons émis présentent une longueur d'onde dans le rouge entre 600 et 700 nm, et 35% dans le vert, entre 500 et 570 nm). Par ailleurs, la lumière blanche émise par les LED contient peu de bleu, et est donc moins absorbée qu'une lumière solaire. Finalement, cette lumière blanche présente un spectre très proche de celui de la lumière verte (45% des photons présentent une longueur d'onde dans le rouge, 25% dans le vert et 7 % dans le bleu). Ces premiers travaux peuvent constituer un point de départ pour de futures études. En particulier, il serait intéressant de reproduire l'expérience à l'aide de lumières monochromatiques mieux ségréguées et une lumière blanche proche du spectre solaire.

Les modèles mathématiques constituent des outils de recherche et de synthèse essentiels qui permettent de tester notre compréhension des phénomènes et de prédire le comportement des microalgues pour d'autres conditions. A partir du modèle développé, nous avons donc réalisé des simulations pour prédire ce qui pourrait être observé pour des spectres lumineux et d'intensités plus discriminants. Plus spécifiquement, nous avons étudié l'effet du spectre lumineux incident sur la productivité. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser les valeurs des paramètres de *Dunaliella salina*, dont l'étude a constitué le fil conducteur de ce travail.

Rappels mathématiques

Dans le cas d'une culture en lumière constante, la productivité à l'équilibre découle des équations suivantes :

Ainsi que mentionné plus haut, la dynamique de la biomasse s'exprime selon la formule :

$$\frac{dx}{dt} = (\mu(x) - D - r)x = 0 \quad (\text{VI-5})$$

L'équilibre (avec une biomasse non nulle) correspond donc à :

$$\mu(x) = D + r \quad (\text{VI-9})$$

La productivité à l'équilibre est ainsi donnée par :

$$P = Dx = (\mu(x) - r)x \quad (\text{VI-10})$$

En premier lieu, nous avons calculé et simulé, selon l'équation (VI-10) et à l'aide des paramètres du modèle, la productivité de *Dunaliella salina* en fonction de la concentration en biomasse - exprimée en biovolume - pour des spectres lumineux identiques à ceux utilisés dans cette étude (Fig. VI-14).

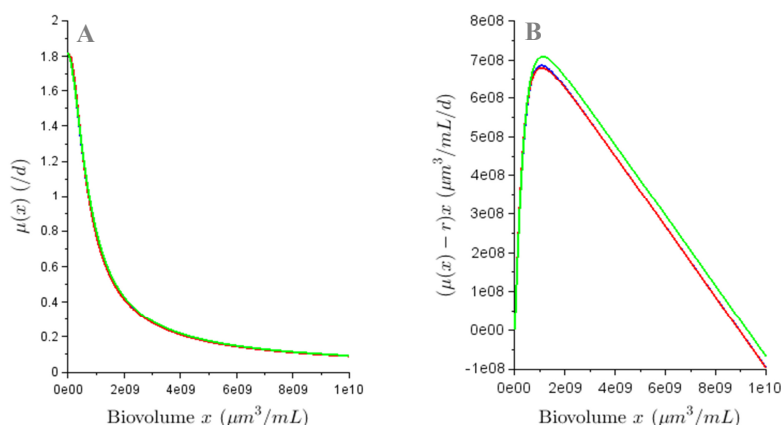


Figure VI-14 : Prédiction (A) du taux de croissance (jour⁻¹) et (B) de la productivité (μm³.mL⁻¹.jour⁻¹) de *Dunaliella salina* en fonction du biovolume pour une lumière blanche, verte et rouge, à PAR équivalent ($I_{in} = 700 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les spectres des différentes lumières testées sont présentées au §2.2.

Sur la figure VI-14, nous pouvons observer que la productivité de *D. salina* est très légèrement supérieure en lumière verte avec l'augmentation du biovolume. Comme mentionné précédemment, les spectres d'éclairement utilisés, et de ce fait le nombre de photons absorbés

par les cultures, sont proches entre les trois conditions d'éclairement. Nous avons alors simulé l'effet de lumières bleue, verte et rouge, caractérisées par des spectres plus étroits. Ces lumières sont comparées à une lumière solaire, pour trois niveaux de PAR incident (I_{in}): 100, 700 et 2000 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les différents spectres sont présentés en figure VI-15.

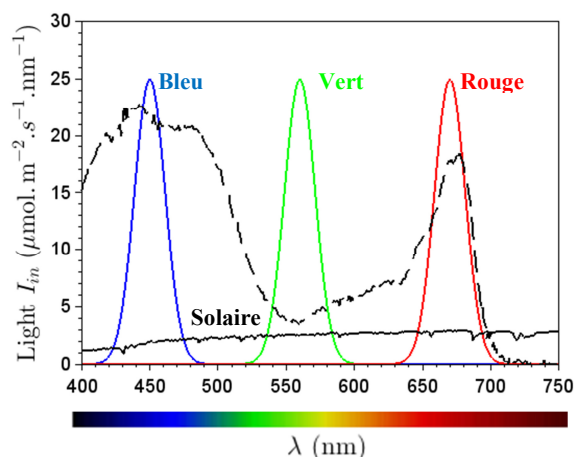


Figure VI-15 : Spectres d'émission des lumières utilisées pour prédire la productivité à l'aide du modèle : lumières bleue (410 – 480 nm), verte (530 – 590 nm), rouge (640 – 700 nm) et spectre solaire (courbe noire). Les valeurs intégrées (aires sous les courbes) sont équivalentes pour chacune des couleurs. Le spectre d'absorption d'une suspension de *D. salina* est représenté par une ligne pointillée. Les lumières bleue et rouge correspondent ainsi à des valeurs élevées d'absorption, contrairement à la lumière verte.

Sur la figure VI-16, nous pouvons observer qu'à faible biovolume, la lumière verte génère une croissance (Fig. VI-16A et VI-16C) et une productivité (Fig. VI-16B) inférieures à celles des autres spectres lumineux, en raison du faible nombre de photons absorbés. A l'inverse, pour une biomasse plus élevée, cette lumière permet d'obtenir la meilleure productivité (Fig. VI-16D et VI-16F). Dans ce cas, la totalité de la lumière verte est utilisée par les microalgues du fait de la forte densité, mais chaque cellule capte individuellement un nombre assez faible de photons, permettant une bonne efficacité globale. Dans le cas des lumières bleue et rouge, fortement absorbées, les cellules proches de la source lumineuse captent un nombre trop important de photons à haute intensité lumineuse, tendant à réduire l'efficacité photosynthétique et, de ce fait, de la productivité (Neale, 1987 ; Molina *et al.*, 1996; Murata *et al.*, 2007). Le modèle prédit donc un effet positif, à fort biovolume, de la lumière verte sur la productivité, intensifié par l'augmentation de l'intensité lumineuse incidente.

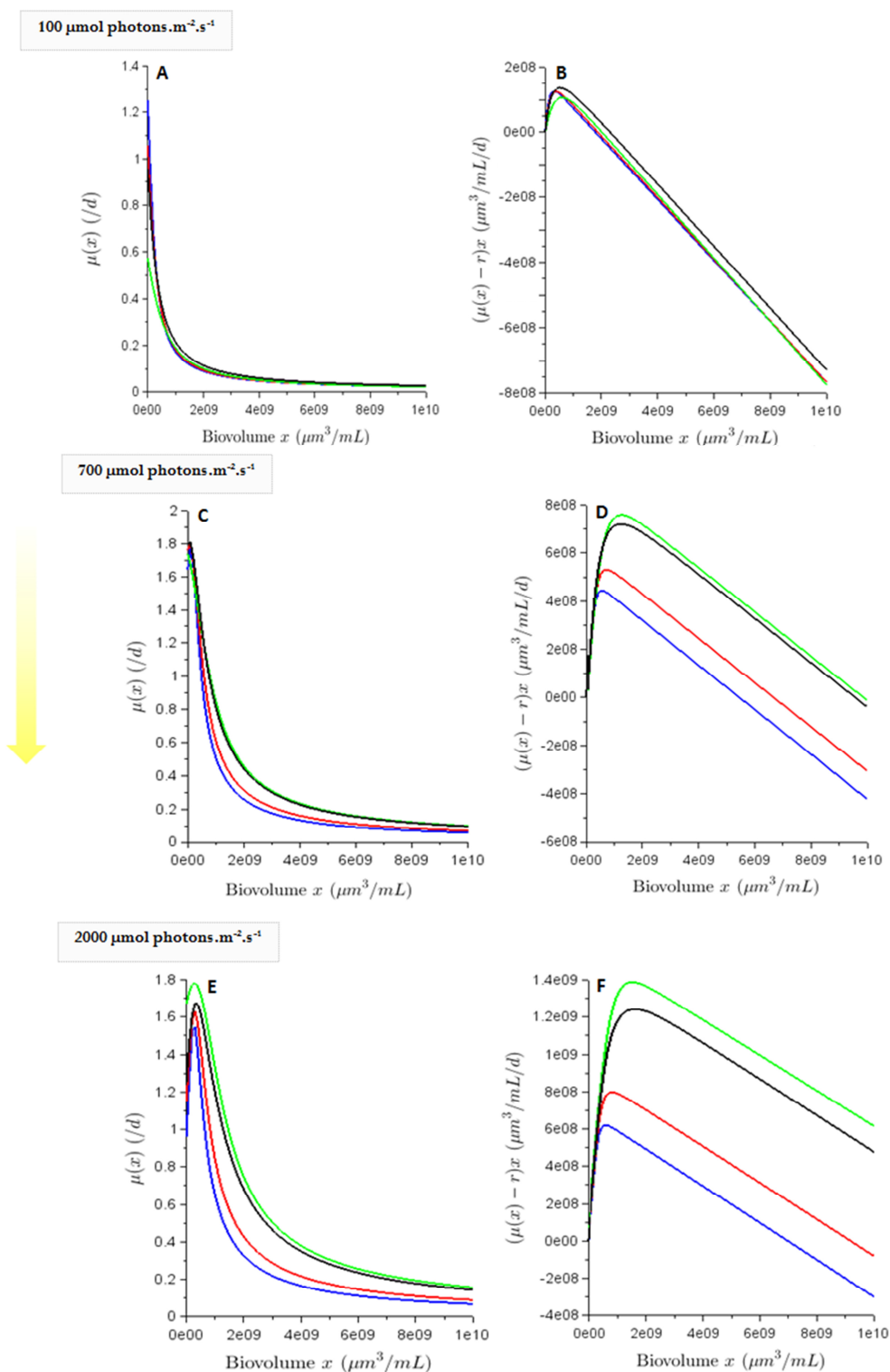


Figure VI-16 : Prédications (A, C, E) du taux de croissance (jour^{-1}) et (B, D, F) de la productivité ($\mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}.\text{jour}^{-1}$) de *Dunaliella salina* en fonction du biovolume pour 4 spectres différents de lumière (lumières bleue, verte et rouge et spectre solaire). Les 3 séries de graphes représentent différents niveaux de PAR incident (I_{in}) : 100 (A, B), 700 (C, D) et 2000 (E, F) $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Les simulations montrent ainsi, et ce de manière contre-intuitive, qu'à haute densité de biomasse, la lumière verte, pour laquelle *D. salina* présente peu d'absorbance, permettrait une meilleure répartition des photons au sein de la culture. En effet, la lumière verte, moins absorbée par cette espèce, pénètre davantage en profondeur - limitant l'effet d'auto-ombrage - et fournit ainsi de l'énergie aux cellules situées en profondeur. Une fois captés par les cellules, les photons issus d'une lumière de longueur d'onde peu ou fortement absorbée présentent la même efficacité (Falkowski *et al.*, 2013). Par ailleurs, une lumière moins absorbée conduit à une meilleure utilisation de chaque photon, avec une probabilité moindre qu'un centre réactionnel n'en reçoive un nombre trop important. Il s'ensuit que les effets de photosaturation et de photoinhibition sont atténués. En particulier, les phénomènes de dissipation de l'énergie sous forme non-photochimique, en chaleur (NPQ) et de destruction de protéines clé de la photosynthèse (telle que la protéine D1 du PSII) sont limités (Fig. VI-17).

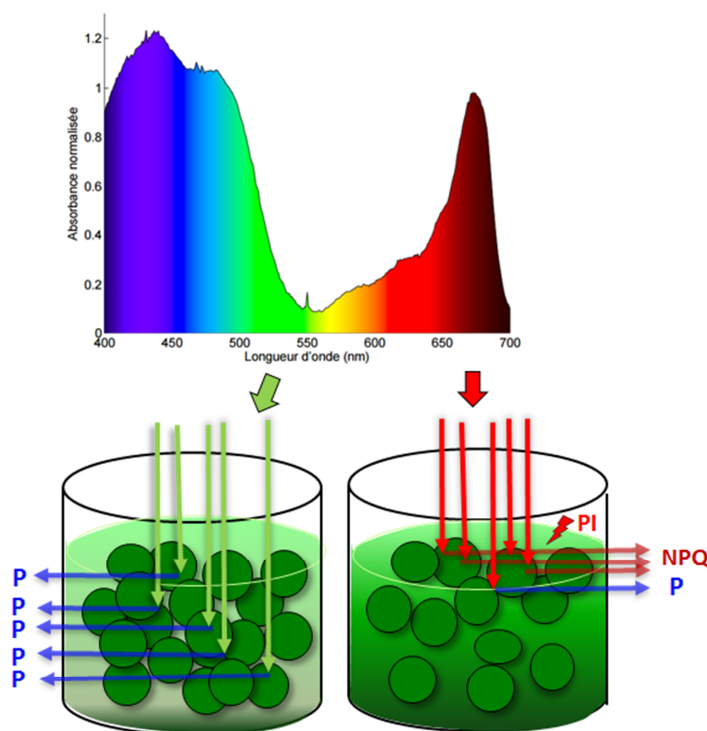


Figure VI-17 : Représentation schématique de l'absorption de lumières verte et rouge par *Dunaliella salina*, cultivée à haute densité de biomasse. La lumière verte, peu absorbée par cette espèce, pénètre dans l'ensemble du réacteur de manière uniforme (diminution de l'auto-ombrage) et permet de limiter les phénomènes de dissipation de l'énergie sous forme non-photochimiques (NPQ) et de photoinhibition (PI) en surface et d'accroître la productivité photosynthétique (P).

Les résultats acquis au cours de cette étude nous permettent toutefois de nuancer les prédictions du modèle. En effet, la lumière bleue accroît la capacité d'absorption des cellules en stimulant la production de chlorophylle *a*. Ainsi, la lumière pénètre moins profondément, ce qui devrait entraîner une plus faible croissance, accentuée par l'absence de lumière rouge. L'effet négatif de la lumière bleue sur la productivité globale du système est ainsi en réalité probablement renforcé. De manière similaire, le spectre solaire contient du bleu, ce qui devrait stimuler la synthèse de chlorophylle. La lumière verte simulée ne contient pas de rouge. Il est donc fort possible que le cycle cellulaire soit ralenti, et que les résultats expérimentaux aboutissent à une moindre productivité. Nous pouvons de ce fait supposer que les gains de productivité prédits par le modèle pour ces deux couleurs seront expérimentalement un peu plus faibles.

5. Conclusion & perspectives

L'hétérogénéité lumineuse au sein de cultures denses de microalgues constitue le principal facteur limitant leur productivité. Les recherches actuelles se concentrent sur le design de nouveaux dispositifs de culture et proposent à ce jour des systèmes dotés de sources lumineuses puissantes combinés à des outils de mélange performants, dont les coûts énergétiques associés restent élevés.

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence l'intérêt majeur des modèles mathématiques en complément de l'expérience. Dans le cadre d'une culture à grande échelle, il est nécessaire d'optimiser la croissance de la population globale, et non celle d'une cellule individuelle. Bien que cela paraisse, de prime abord, contre-intuitif, nous avons montré qu'une lumière faiblement absorbée par les microalgues, telle que la lumière verte dans notre étude, mais distribuée de manière plus efficace entre les cellules, apparaît comme une solution prometteuse pour limiter les phénomènes de photo-ombrage et améliorer la productivité des systèmes de culture à haute densité. En outre, une meilleure répartition des photons permettrait de limiter les besoins énergétiques associés à l'agitation de la culture. Enfin, ces travaux ont également mis en exergue les désavantages potentiels de la lumière bleue sur la productivité de *Dunaliella salina* ainsi que l'importance de la lumière rouge sur le cycle cellulaire.

Il apparaît ainsi pertinent de coupler la lumière solaire à des filtres photovoltaïques semi-transparentes qui laissent passer les photons verts et des photons rouges (filtres marrons) et qui retiennent les photons bleus, les plus énergétiques, pour la production d'électricité photovoltaïque. Les simulations ainsi que l'étude expérimentale d'une lumière marron sur la croissance nous permettraient de confirmer ces hypothèses.

Que faut-il retenir ?

- Le **modèle** construit permet de **représenter correctement** les **résultats expérimentaux** de cette étude.

- Une **faible proportion** de photons **bleus** permet de **limiter** l'accumulation de Chl *a*.

➡ cellules plus **transparentes**

- *D. salina* présente un contenu en **carbone** et en **lipides neutres plus élevé** en lumière **verte** par rapport à une lumière blanche ou rouge.

- À **haute densité de biomasse**, le modèle prédit un **effet positif de la lumière verte** sur la productivité globale de *Dunaliella salina* :
 - *Auto-ombrage* : ↘
 - *NPQ* : ↘

Chapitre VII

Conclusions et perspectives

“En toute chose, c’est la fin qui est essentiel.”

Aristote (384 av. J.-C - 322 av. J.-C)

Ce dernier chapitre résume l’ensemble des résultats obtenus au cours de mon travail de doctorat sur les impacts quantitatifs et qualitatifs de la lumière et élargit l’étude réalisée en présentant des applications de nos conclusions pour de futurs travaux et le développement de procédés innovants. Ces perspectives expérimentales et débouchés industriels visent à poursuivre les recherches abordées dans ce manuscrit.

Les microalgues sont soumises à un environnement variable, évoluant de manière dynamique dans l’espace et dans le temps. Pour faire face à cet environnement complexe, où la variabilité s’exprime à différentes échelles de temps, et optimiser leur croissance, les micro-organismes photosynthétiques ont su développer de remarquables stratégies adaptatives. Cette capacité d’acclimatation se traduit, en particulier, par d’importantes modifications de leur appareil photosynthétique en réponse aux changements de l’éclairement. Ces phénomènes de photoacclimatation et ‘d’adaptation chromatique’ leur permettent ainsi de maximiser l’absorption de la lumière ambiante et de minimiser les processus de photo-oxydation sous forte intensité lumineuse. Depuis plus d’un siècle, de nombreuses recherches fondamentales ont été menées afin de décrire, quantifier et modéliser la réponse des microalgues aux variations quantitatives et qualitatives de la lumière qui se propage dans les océans. Ce n’est que plus récemment que ces mêmes questions ont été abordées dans un contexte industriel, afin d’optimiser la productivité des microalgues et la bioaccumulation de molécules à haute valeur ajoutée. Il est intéressant de noter, à cet égard, que toute la connaissance fondamentale acquise au fil des décennies dans le seul but de comprendre et de documenter ces phénomènes est maintenant mise à profit d’une finalité beaucoup plus appliquée.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l’effet des variations rapides de la lumière, d’une part, et de la composition spectrale, d’autre part, sur la croissance et les mécanismes d’acclimatation de deux espèces de microalgues à fort intérêt biotechnologique,

Dunaliella salina et *Tisochrysis lutea* (T-Iso 2X). Notre double approche théorique et expérimentale, menée à l'aide de dispositifs expérimentaux originaux, a permis d'apporter un éclairage nouveau sur le rôle primordial joué par la lumière dans les systèmes de culture industriels.

Incidence de la fréquence d'éclairement

Nous avons mis au point un système d'éclairage innovant à base de diodes électroluminescentes, permettant de générer des créneaux de lumière contrôlés en fréquence et en intensité, reproduisant les variations de lumière à haute fréquence typiquement perçues par les microalgues brassées au sein des raceways. Les expériences ont été conduites en asservissant le taux de dilution à la turbidité (mode turbidostat). Ainsi, nous avons pu maintenir des cultures de microalgues peu concentrées dans des conditions de croissance stables et optimales, conditions nécessaires pour caractériser, à long terme, le seul effet du régime lumineux appliqué.

Ce mode expérimental innovant, qui permet d'aller bien au-delà des expériences en batch, a conduit à une meilleure compréhension de l'effet d'un régime lumineux intermittent sur la croissance et les processus de photoacclimatation des microalgues. Nous avons ainsi montré que l'augmentation de la fréquence du signal lumineux permet d'améliorer l'efficacité photosynthétique et, de ce fait, la croissance de la chlorophyte *Dunaliella salina*. Dans ces conditions d'éclairage intermittent, la teneur en lipides totaux est positivement corrélée au taux de croissance. Nous avons également observé que la fréquence d'éclairement ne présente pas d'effet sur le cortège pigmentaire, ni sur la composition élémentaire de *Dunaliella salina*. Dans la gamme de fréquences testées, cette espèce s'acclimate ainsi à l'intensité lumineuse moyenne perçue, indépendamment des fluctuations. Ce résultat fort supporte l'hypothèse que les processus d'acclimatation seraient trop lents pour pouvoir répondre au signal lumineux quand celui-ci varie rapidement. Sur le plan dynamique, une période d'acclimatation de neuf jours est observée avant que le contenu pigmentaire atteigne un équilibre. Cette cinétique d'acclimatation n'avait, à notre connaissance, jamais été décrite auparavant dans cette gamme de fréquences. Il est à noter que les nombreuses expériences réalisées au cours de ce travail de thèse mettent en évidence une variabilité des temps d'acclimatation. Néanmoins, ces résultats s'accordent à révéler l'importance de mener des expériences à long terme pour que les cellules aient assez de temps pour s'acclimater et atteindre leur état d'équilibre.

Le régime lumineux perçu par les microalgues dans un raceway est en réalité complexe et se caractérise par des cycles de lumière/obscurité de différentes fréquences et amplitudes dépendant de la vitesse de mélange. Nous avons donc poursuivi cette étude en reconstruisant expérimentalement l'histoire lumineuse des cellules à partir de trajectoires Lagrangiennes simulées par un modèle hydrodynamique. Cette approche expérimentale originale a permis de montrer qu'un régime lumineux réaliste engendre un comportement sensiblement différent de celui observé avec des signaux 'caricaturaux'. Si nos observations doivent encore être confirmées, elles illustrent toutefois la nécessité de considérer des signaux lumineux réalistes.

Effet de la composition spectrale de la lumière

Dans un second temps, cette thèse s'est focalisée sur l'influence de la qualité de la lumière. Une première série d'expériences a permis d'étudier la réponse de *Dunaliella salina* à différentes compositions spectrales et intensités lumineuses. Habituellement réalisée à PAR constant, l'étude de l'impact de la composition spectrale est ici menée en considérant le nombre de photons effectivement absorbés, c'est-à-dire le PUR. Des expériences à PUR équivalent pour chaque couleur d'éclairement ont alors été mises en œuvre. Pour cette étude, nous avons développé un système de contrôle automatique de la turbidité piloté par faisceaux lasers. Cette deuxième génération de turbidostat, qui a permis un contrôle fin et fiable de la biomasse, est désormais opérationnelle pour d'autres études au laboratoire.

Nous avons montré l'influence clé de la qualité de la lumière sur la croissance et la composition pigmentaire de *Dunaliella salina*. La mise en évidence de l'effet positif de la lumière rouge sur sa croissance nous a conduits à émettre l'hypothèse de la modulation de routes métaboliques, probablement régulées par un récepteur de la lumière rouge. Néanmoins, à ce jour, les connaissances dans ce domaine sont encore partielles et imparfaites et des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse. En outre, nous avons démontré que le flux de photons bleus agit sur la production de chlorophylle *a*, alors que la teneur en caroténoïdes est supérieure en lumières rouge et blanche. Ces résultats révèlent ainsi pour la première fois une stratégie d'acclimatation chromatique chez cette espèce. En revanche, la composition spectrale ne semble pas avoir d'effets sur la productivité en lipides neutres, ni sur la composition élémentaire de *D. salina*.

Cette étude a également confirmé le rôle majeur de la composante quantitative de la lumière sur les processus physiologiques des microalgues. Le flux de photons absorbés, davantage que le flux de photons reçus, apparaît ici comme un paramètre essentiel du contrôle de la

croissance et de l'accumulation de molécules d'intérêt, telles que les lipides ou les caroténoïdes.

Si les effets respectifs de l'intensité lumineuse et de la qualité de la lumière ont ainsi pu être déterminés de manière rigoureuse, une approche plus réaliste était nécessaire afin de mieux comprendre l'impact de la composition spectrale dans des systèmes de culture industriels, caractérisés par de forts gradients lumineux. Cette hétérogénéité lumineuse constitue le principal facteur limitant la productivité des microalgues. C'est pourquoi, nous avons combiné des outils expérimentaux et simulateurs pour identifier les effets interdépendants de la qualité spectrale et de l'auto-ombrage sur la croissance des microalgues. Pour cela, des cultures denses de *Dunaliella salina* et T-Iso 2X ont été mises en place et suivies au sein de photobioréacteurs plans, pour lesquels la distribution du champ lumineux est plus simple du fait de son unidirectionnalité. Parallèlement, un modèle spectral, dérivé des travaux de Stomp *et al.* (2004, 2007), a été développé et paramétré sur les résultats obtenus en lumière blanche puis comparé aux données expérimentales. Le biovolume de *D. salina* et T-Iso 2X et l'évolution de la lumière en sortie des réacteurs sont correctement prédits par le modèle pour des lumières rouges ou vertes.

Les longueurs d'ondes rouges et bleues, préférentiellement absorbées par les microalgues, sont habituellement privilégiées pour leur culture. Paradoxalement, nos simulations ont suggéré, et ce de manière inattendue et contre-intuitive, l'effet positif de la lumière verte sur la productivité de *Dunaliella salina*. En effet, la lumière verte, faiblement absorbée, pénètre davantage dans le photobioréacteur. Elle apparaît ainsi comme une solution prometteuse pour améliorer la productivité des systèmes de culture à haute densité, en réduisant les phénomènes d'auto-ombrage, de photosaturation et de photoinhibition. Finalement, ces travaux ont également mis en exergue l'importance de la lumière rouge sur le cycle cellulaire et les avantages potentiels de l'absence de lumière bleue sur la productivité de *Dunaliella salina*. En effet, sans photons bleus, les microalgues présentent une composition pigmentaire réduite et sont, de ce fait, plus transparentes. La lumière pénètre alors plus profondément et son efficacité en est améliorée.

Vers des applications industrielles

Nos expériences de laboratoire ont montré que la productivité des microalgues augmente avec la fréquence du signal lumineux incident. Dans des bassins de culture de type raceway, cette condition peut être obtenue en augmentant la vitesse des roues à aubes qui assurent le brassage des cultures, ce qui, en contrepartie, induit une dépense énergétique importante. Il apparaît donc nécessaire de trouver un compromis entre les gains de productivité engendrés par l'augmentation de la vitesse de mélange et les coûts en énergie.

Les recherches actuelles se concentrent sur le design de nouveaux dispositifs de culture et proposent à ce jour des systèmes aux géométries variées, dotés de sources lumineuses puissantes combinées à des outils de mélange performants. Certains photobioréacteurs plans comportent, par exemple, des chicane internes qui dévient l'écoulement pour amener les microalgues vers les parois (Degen, 2001 ; Zhang *et al.*, 2013). La création d'un mouvement tourbillonnaire dans des photobioréacteurs à géométrie annulaire ou torique est aussi utilisée dans le but de maximiser l'homogénéisation du milieu et d'augmenter la fréquence d'accès à la lumière (Puvost *et al.*, 2006). Dans un objectif similaire, des réacteurs en zig-zag sont également développés (Posten *et al.*, 2011 ; Levin, 2015). Toutefois, les frais de production, incluant les coûts énergétiques ainsi que ceux liés à la fabrication de ces dispositifs, restent élevés. Par ailleurs, la turbulence créée par ces systèmes augmente considérablement les contraintes de cisaillement, délétères pour de nombreuses espèces (Sánchez Mirón *et al.*, 2003 ; Barbosa *et al.*, 2004). Une autre approche consiste à réduire la taille des antennes collectrices de lumière des microalgues afin d'accroître leur transparence. Cependant, en raison de la complexité du système photosynthétique, seuls quelques travaux ont été menés dans ce but, à l'aide de méthodes de génie génétique complexes et coûteuses, telles que l'utilisation d'OGM ou de protocoles de mutagenèse (Nakajima & Ueda, 1997 ; Melis, 2009 ; Kirst *et al.*, 2012 ; Perin *et al.*, 2015).

Les conclusions de ce travail de thèse offrent ainsi des perspectives encourageantes pour améliorer le bilan énergétique des cultures de microalgues. Dans le cadre du projet Purple Sun, nous avons ainsi montré qu'il serait judicieux de filtrer la lumière solaire à l'aide de panneaux photovoltaïques semi-transparents marrons, laissant passer les photons verts et une partie des photons rouges. Les autres photons, essentiellement les bleus, les plus énergétiques, seront alors utilisés pour la production d'électricité. En permettant d'optimiser la productivité des microalgues et de réduire les coûts, cette nouvelle génération de panneaux photovoltaïques colorés apparaît comme une alternative pertinente aux systèmes de culture

actuels. Au-delà, elle pourrait également être étendue à d'autres cultures, notamment horticoles, qui, à l'échelle planétaire, couvrent plusieurs millions d'hectares. Mais les conclusions de nos travaux permettront également d'imaginer d'autres procédés innovants. Le développement de biofilms rotatifs (Gross *et al.*, 2013), en fixant les cellules sur un tapis roulant, constitue un exemple d'application possible des résultats acquis en lumière intermittente. Ainsi, ce type de procédé induit des variations rapides de la lumière, permettant de maximiser les rendements photosynthétiques, tout en diminuant les contraintes de cisaillement et en limitant l'énergie nécessaire, puisque seul le biofilm est déplacé. De surcroît, il facilite considérablement la récolte des microalgues.

Vers des expériences complémentaires et une amélioration du modèle

Cette étude, combinant des démarches expérimentales et théoriques, constitue une première étape vers la compréhension des effets quantitatifs et qualitatifs de la lumière sur la croissance et les mécanismes d'acclimatation des microalgues. A partir de nos résultats, plusieurs pistes peuvent désormais être explorées.

En particulier, les travaux sur l'effet de la couleur d'éclairement, conduites à l'aide de lumières spectralement filtrées, peuvent constituer un point de départ pour de futures études. En premier lieu, il conviendrait de réitérer les expériences réalisées en utilisant des lumières monochromatiques spectralement mieux ségréguées. De telles expériences permettront de préciser nos conclusions et de valider les prédictions du modèle de productivité développé. Dans ce cadre, il serait particulièrement intéressant de travailler avec des sources lumineuses plus proches du spectre solaire. En effet, la technologie LED, malgré son évolution rapide, ne permet pas encore de reproduire correctement le spectre de la lumière solaire. Les LED blanches actuellement proposées présentent un spectre très proche de celui d'une lumière verte avec un important déficit de lumière bleue par rapport au soleil. Ces expériences permettront, en outre, de mieux discriminer les longueurs d'ondes impliquées dans les différentes réponses observées et de clarifier l'impact de la couleur d'éclairement sur le contenu lipidique de *Dunaliella salina*. Une seconde démarche à entreprendre consisterait à tester d'autres combinaisons d'intensités lumineuses et de couleurs d'éclairement, sur des cultures denses et diluées, afin (1) de vérifier si l'effet de la couleur est confirmé pour différentes valeurs de PUR et (2) de valider les prédictions du modèle.

Nos observations ont souligné le rôle majeur de la qualité de la lumière sur le cycle cellulaire et ses conséquences sur les réponses physiologiques des microalgues. Une autre perspective

de ce travail serait d'affiner le modèle développé en y intégrant ces aspects essentiels. Par ailleurs, les effets de la lumière colorée étant spécifiques de l'espèce étudiée, il semblerait opportun d'étendre les investigations que nous avons menées sur *Dunaliella salina* et *Tisochrysis lutea*, à d'autres espèces de microalgues, de façon à évaluer dans quelle mesure les déterminismes que nous avons exposés sont généralisables à d'autres taxons. Ces expériences permettraient en outre d'intégrer les spécificités des espèces dans le modèle développé.

Alors que les influences respectives de la composition spectrale et de la fréquence d'éclairement sont désormais mieux caractérisées, leurs effets couplés restent une question ouverte. L'analyse de l'impact d'une lumière flashée colorée, à laquelle les cellules sont soumises dans les systèmes de culture éclairés par une lumière colorée, est également une direction de recherche à prospecter. Mais d'autres couplages s'opèrent dans les photobioréacteurs et les raceways, dont la compréhension demeure essentielle en vue d'optimiser les procédés de culture. En particulier, les fortes lumières correspondent généralement à des températures plus élevées. Si la température constitue un paramètre crucial de la croissance des microalgues, l'effet combiné de fortes températures et de hautes lumières a été peu étudié. En raison de leur non-linéarité, ces effets présentent une grande complexité (Ras *et al.*, 2013 ; Bonnefond *et al.*, 2016). Caractériser ce couplage afin d'en apprécier l'impact sur la croissance pourrait alors être envisagé. Ainsi, les fortes lumières devront certainement être appréhendées de manière différente en fonction de la température du milieu de culture. Ces clés de lecture permettront d'améliorer la productivité des microalgues.

Comprendre les effets qualitatifs et quantitatifs de la lumière nécessitera encore de nombreux travaux expérimentaux, qui devront s'envisager en cohérence avec les divers facteurs environnementaux dynamiques qui influencent la productivité, notamment aux périodes de forte insolation. La compréhension de ces mécanismes permettra progressivement de perfectionner les procédés de production de microalgues en améliorant leur productivité, tout en diminuant leur coût et leur impact environnemental.

*“Il faut être rameur avant de tenir le gouvernail, avoir gardé la proue et observé les vents
avant de gouverner soi-même le navire.”*

Aristophane – Les Cavaliers

#7

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abiusi F, Sampietro G, Marturano G, Biondi N, Rodolfi L, D'Ottavio M, Tredici MR. 2013.** Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. *Biotechnol Bioeng* 111(5): 956-964.
- Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE. 1994.** Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370(6491): 621-628.
- Abu-Ghosh S, Fixler D, Dubinsky Z, Solovchenko A, Zigman M, Yehoshua Y, Iluz D. 2015.** Flashing light enhancement of photosynthesis and growth occurs when photochemistry and photoprotection are balanced in *Dunaliella salina*. *Eur J Phycol* 50(4): 469-480.
- Abu-Ghosh S, Fixler D, Dubinsky Z, Iluz D. 2016.** Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresour Technol* 203: 357-363.
- Aflalo C, Meshulam Y, Zarka A, Boussiba S. 2007.** On the relative efficiency of two-vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Bioeng* 98(1): 300-305.
- Agarwal S, Rao AV. 1998.** Tomato lycopene and low-density protein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids* 33(10): 981-984.
- Aidar E, Giancesella-Galvão SMF, Sigaud TCS, Asano CS, Liang TH, Rezende KRV, Sandes MAL. 1994.** Effects of light quality on growth, biochemical composition and photosynthetic production in *Cyclotella caspia* Grunow and *Tetraselmis gracilis* (Kyllin) Butcher. *J Exp Mar Bio Ecol* 180(2): 175-187.
- Allen MM. 1968.** Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J Phycol* 4(1): 1-4.
- Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX. 2011.** Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy* 88(10): 3402-3410.
- Anderson LK, Eiserling FA. 1986.** Asymmetrical core structure in phycobilisomes of the cyanobacterium *Synechocystis* 6701. *J Mol Biol* 191(3): 441-451.
- Andersen R. 2005.** Algal culturing techniques. Elsevier. Academic press, Amsterdam.
- Anning T, MacIntyre HL, Pratt SM, Sammes PJ, Gibb S, Geider RJ. 2000.** Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnol Oceanogr* 45(8): 1807-1817.
- Apt KE, Behrens PW. 1999.** Commercial developments in microalgal biotechnology. *J Phycol* 35(2): 215-226.
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Brzezinski MA. 2004.** The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306(5693): 79-86.

- Assunção P, Jaén-Molina R, Caujapé-Castells J, De la Jara A, Carmona L, Freijanes K, Mendoza H. 2012.** Molecular taxonomy of *Dunaliella* (Chlorophyceae), with a special focus on *D. salina*: ITS2 sequences revisited with an extensive geographical sampling. *Aquat Biosyst* 8(2).
- Atta M, Ataullah Bukhari AI, Wahidin S. 2013.** Intensity of Blue LED Light: A potential *stimulus* for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella Vulgaris*. *Bioresour Technol* 148: 373–378.
- Audusse E, Bristeau MO, Pelanti M, Sainte-Marie J. 2011a.** Approximation of the hydrostatic Navier–Stokes system for density stratified flows by a multilayer model: kinetic interpretation and numerical solution. *J Comput Phys* 230(9): 3453–3478.
- Audusse E, Bristeau MO, Perthame B, Sainte-Marie J. 2011b.** A multilayer Saint-Venant system with mass exchanges for Shallow Water flows. Derivation and numerical validation. *ESAIM-Math Model Num* 45(01):169–200.
- Baldauf SL. 2003.** The deep roots of eukaryotes. *Science* 300(5626): 1703-1706.
- Barber J, Andersson B. 1992.** Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci* 17(2): 61-66.
- Barbosa MJ, Albrecht M, Wijffels RH. 2003.** Hydrodynamic stress and lethal events in sparged microalgae cultures. *Biotechnol Bioeng* 83(1): 112-120.
- Barnett A, Méléder V, Blommaert L, Lepetit B, Gaudin P, Vyverman W, Lavaud J. 2015.** Growth form defines physiological photoprotective capacity in intertidal benthic diatoms. *The ISME journal* 9(1): 32-45.
- Baroli I, Melis A. 1996.** Photoinhibition and repair in *Dunaliella salina* acclimated to different growth irradiances. *Planta* 198: 640–646.
- Baroli I, Niyogi KK. 2000.** Molecular genetics of xanthophyll–dependent photoprotection in green algae and plants. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci* 355(1402): 1385-1394.
- Barrow C, Shahidi F. 2008.** Marine nutraceuticals and functional foods. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- Barsanti L, Gualtieri P. 2014.** Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology. CRC Press, Boca Ranton, p2.
- Bauernfeind JC. 1981.** Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Technological and nutritional applications. Academic Press, New York.
- Beel B, Prager K, Spexard M, Sasso S, Weiss D, Müller N, Kottke T. 2012.** A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell* 24(7): 2992-3008.
- Béjà O, Spudich EN, Spudich JL, Leclerc M, DeLong EF. 2001.** Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* 411: 786-789.

- Ben-Amotz A, Katz A, Avron M. 1982.** Accumulation of beta-carotene in halotolerant algae: purification and characterisation of beta-carotene-riche globules from *Dunaliella bardawil* (chlorophyceae). *J Phycol* 18(4): 529–537.
- Ben-Amotz A, Avron M. 1983.** On the factors which determine massive beta-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol* 72(3): 593–7.
- Ben-Amotz A, Shaish A, Avron M. 1989.** Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol* 91(3): 1040-1043.
- Ben-Amotz A, Shaish A, Avron M. 1991.** The biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of β -carotene rich algae. *Bioresour Technol* 38(2): 233-235.
- Ben-Amotz A. & Avron M. 1992.** *Dunaliella*: physiology, biochemistry, and biotechnology. CRC press, p2.
- Ben-Amotz A. 1996.** Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *J Phycol* 32(2): 272-275.
- Ben-Amotz A, Levy Y. 1996.** Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all-trans beta-carotene in human serum. *Am J Clin Nutr* 63(5): 729-734.
- Bendif EM, Probert I, Schroeder DC, de Vargas C. 2013.** On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of Dicrateria to the Prymnesiales (Haptophyta). *J Appl Phycol* 25(6): 1763-1776.
- Benemann JR, Tillett DM, Weissman JC. 1987.** Microalgae biotechnology. *Trends Biotechnol* 5(2): 47-53.
- Benemann J. 1992.** Microalgae aquaculture feeds. *J Appl Phycol* 4: 233–245.
- Benemann J. 2013.** Microalgae for biofuels and animal feeds. *Energies* 6(11): 5869–5886.
- Bennett A, Bogorad L. 1973.** Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J Cell Biol* 58(2): 419-435.
- Ben-Shem A, Frolov F, Nelson N. 2003.** Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* 426(6967): 630-635.
- Berges JA, Varela DE, Harrison PJ. 2002.** Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitrogen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Mar Ecol Prog Ser* 225: 139–146.
- Bernard O, Malara G, Sciandra A. 1996.** The effects of a controlled fluctuating nutrient environment on continuous cultures of phytoplankton monitored by computers. *J Exp Mar Biol Ecol* 197(2): 263–278.
- Bernard O. 2011.** Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production. *J Process Contr* 21(10): 1378–1389.

- Bernard O, Rémond B. 2012.** Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. *Bioresour Technol* 123: 520-527.
- Bernard O, Boulanger AC, Bristeau MO, Sainte-Marie J. 2013.** A 2d model for hydrodynamics and biology coupling applied to algae growth simulations. *ESAIM. Math Model Num* 47(05): 1387–1412.
- Bernard O. 2014.** La production de micro-algues sous serre photovoltaïque: évolution ou révolution?. *Revue de l'Energie* 621: 385-392.
- Bernard O, Mairet F, Chachuat B. 2015.** Modelling of Microalgae Culture Systems with Applications to Control and Optimization. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 153: 59-87.
- Bidigare RR, Smith RC, Baker KS, Marra J. 1987.** Oceanic primary production estimates from measurements of spectral irradiance and pigment concentrations. *Global Biogeochem Cycles* 1(3): 171-186.
- Bidigare RR, Ondrusek ME, Morrow J H, Kiefer DA. 1990.** *In-vivo* absorption properties of algal pigments. *In: Orlando'90. International Society for Optics and Photonics.*
- Bird CJ, Greenwell M, McLachlan J. 1983.** Benthic marine algal flora of the north shore of Prince Edward Island (Gulf of St. Lawrence), Canada. *Aquat Bot* 16(4): 315–335.
- Blackman FF. 1905.** Optima and limiting factors. *Ann Bot*: 281-295.
- Blanken W, Cuaresma M, Wijffels RH, Janssen M. 2013.** Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Research* 2(4): 333-340.
- Blankenship RE, Tiede DM, Barber J, Brudvig GW, Fleming G, Ghirardi M, Sayre RT. 2011.** Comparing photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement. *Science* 332(6031): 805-809.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8): 911–917.
- Bonnefond H, Moelants N, Talec A, Bernard O, Sciandra A. 2016.** Concomitant effects of light and temperature diel variations on the growth rate and lipid production of *Dunaliella salina*. *Algal Res* 14: 72-78.
- Boresch, K. 1921.** Die komplementäre chromatische adaptation. *Arch Protistenk* 44: 1-70.
- Borowitzka MA, Borowitzka LJ. 1988.** Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press.
- Borowitzka MA. 1990.** The mass culture of *Dunaliella salina*. *In: Technical Resource Papers. Regional Workshop on the Culture and Utilisation of Seaweeds 2. Regional Seafarming Development and Demonstration Project, FAO Network of Aquaculture Centres in Asia: Bangkok, Thailand.*
- Borowitzka MA. 1997.** Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *J Appl Phycol* 9: 393–401.

- Bougaran G, Rouxel C, Dubois N, Kaas R, Grouas S, Lukomska E, Cadoret JP. 2012.** Enhancement of neutral lipid productivity in the microalga *Isochrysis affinis Galbana* (T-Iso) by a mutation-selection procedure. *Biotechnol Bioeng* 109(11): 2737-2745.
- Bougaran G, Saint-Jean B. 2014.** Microalgues: de petits végétaux aux grandes promesses!. *Biofutur*, (360): 28-31.
- Boulanger AC, Cancès C, Mathis H, Saleh K, Seguin N. 2013.** OSAMOAL: Optimized Simulations by Adapted MOdels using Asymptotic Limits. *ESAIM Proc* 38: 183–201.
- Boulanger AC, Bristeau MO, Sainte-Marie J. 2013.** Analytical solutions for the free surface hydrostatic Euler equations. *Commun Math Sci* 11(4): 993-1010.
- Bouterfas R, Belkoura M, Dauta A. 2002.** Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater [2pt] algae isolated from a eutrophic lake. *Hydrobiologia* 489(1-3): 207-217.
- Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Rayko E. 2008.** The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456(7219): 239–244.
- Brandt LA, Koch EW. 2003.** Periphyton as a UV-B filter on seagrass leaves: a result of different transmittance in the UV-B and PAR ranges. *Aquatic Botany* 76(4): 317-327.
- Braune W, Ekelund NG. 1990.** Phototactic responses in *Haematococcus lacustris* and its modification by light intensity and the carotenoid biosynthesis inhibitor Norflurazon. *Arch Microbiol* 154(5): 448-452.
- Brennan L, Owende P. 2010.** Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sustainable Energy Rev* 14(2): 557-577.
- Bricaud A, Morel A, Prieur L. 1983.** Optical efficiency factors of some phytoplankters. *Limnol Oceanogr* 28: 816-832.
- Brindley C, Fernández FGA, Fernández-Sevilla JM. 2011.** Analysis of light regime in continuous light distributions in photobioreactors. *Bioresour Technol* 102(3): 3138–3148.
- Brown HT, Escombe F. 1905.** Researches on some of the physiological processes of green leaves, with special reference to the interchange of energy between the leaf and its surroundings. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 76(507): 29-111.
- Brunet C, Chandrasekaran R, Barra L, Giovagnetti V, Corato F, Ruban AV. 2014.** Spectral radiation dependent photoprotective mechanism in the diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. *PloS one* 9(1): e87015
- Burlew JS. 1953.** Algal cultures from laboratory to pilot plant. Washington DC, Carnegie Institution of Washington Publication 600, pp 63-158.
- Butler WL. 1978.** Energy distribution in the photochemical apparatus of Photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol* 29: 345–378.

- Cadoret JP, Bernard O. 2008.** La production de biocarburant lipidique avec des microalgues: promesses et défis. *J Soc Biol* 202: 201–211.
- Camacho Rubio F, Camacho FG, Sevilla JMF, Chisti Y, Molina Grima E. 2003.** A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnol Bioeng* 81: 473–559.
- Cao S, Wang J, Chen D. 2013.** Settlement and cell division of diatom *Navicula* can be influenced by light of various qualities and intensities. *J Basic Microbiol* 53(11): 884–894.
- Caperon J. 1968.** Population growth response of *Isochrysis galbana* to nitrate variation at limiting concentrations. *Ecology* 49: 866–872.
- Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P. 2007.** Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146: 60–78.
- Carvalho AP, Silva SO, Baptista JM, Malcata FX. 2011.** Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* 89(5): 1275–88.
- Casper-Lindley C, Bjrkman O. 1998.** Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynth Res* 56: 277–289.
- Cepák V, Přibyl P, Vítová M. 2006.** The effect of light color on the nucleocytoplasmic and chloroplast cycle of the green chlorococcal alga *Scenedesmus obliquus*. *Folia microbiologica* 51(4): 342–348.
- Cerón MC, García-Malea, MC, Rivas J, Acien FG, Fernandez JM, Del Río E, Molina E. 2007.** Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *J Appl Microbiol* 74(5): 1112–1119.
- Chaves I, Pokorný R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Essen LO, van der Horst GT, Batschauer A, Ahmad M. 2011.** The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol* 62: 335–64.
- Chen GQ, Jiang Y, Chen F. 2008.** Variation of lipid class composition in *Nitzschia laevis* as a response to growth temperature change. *Food Chem* 109: 88–94.
- Chiaramonti D, Prussi M, Casini D, Tredici MR, Rodolfi L, Bassi N, Zittelli GC, Bondioli P. 2013.** Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: Re-thinking a traditional system is possible. *Appl Energy* 102: 101–111.
- Chidambara-Murthy KN, Vanitha A, Rajesha J, Swamy MM, Sowmya PR, Ravishankar GA. 2005.** *In vivo* antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*—a green microalga. *Life Sciences* 76(12): 1381–1390.
- Chisti Y. 2007.** Biodiesel from microalgae. *Biotech Adv* 25: 294–306.
- Chisti Y. 2008.** Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol* 26(3): 126–131.
- Chory J. 2010.** Light signal transduction: an infinite spectrum of possibilities. *Plant J* 61(6): 982–991.

- Christenson L, Sims R. 2011.** Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts *Biotech Adv* 29: 686-702.
- Coesel S, Oborník M, Varela J, Falciatore A, Bowler C. 2008.** Evolutionary origins and functions of the carotenoid biosynthetic pathway in marine diatoms. *PLoS One* 3(8): e2896.
- Coesel SN, Baumgartner AC, Teles LM, Ramos AA, Henriques NM, Cancela L, Varela JC. 2008.** Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for *Psy* and *Pds* steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Mar Biotechnol* 10: 602-611.
- Collet P, Lardon L, Hélias A, Bricout S, Lombaert-Valot I, Perrier B, Lépine O, Steyer JP, Bernard O. 2014.** Biodiesel from microalgae – Life cycle assessment and recommendations for potential improvements. *Renewable Energy* 71: 525-533.
- Combe C, Hartmann P, Rabouille S, Talec A, Bernard O, Sciandra A. 2015.** Long-term adaptive response to high-frequency light signals in the unicellular photosynthetic eukaryote *Dunaliella salina*. *Biotechnol Bioeng* 112(6): 1111-1121.
- Cornet JF. 2010.** Calculation of optimal design and ideal productivities of volumetrically lightened photobioreactors using the constructal approach. *Chem Eng Sci* 65(2): 985-998.
- Cosgrove J, Borowitzka MA. 2010.** Chlorophyll fluorescence terminology: an introduction. In *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer Netherlands: pp. 1-17.
- Costa BS, Jungandreas A, Jakob T, Weisheit W, Mittag M, Wilhelm C. 2013.** Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Exp Bot* 64(2): 483-493.
- Croce R, van Amerongen H. 2014.** Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nat Chem Biol* 10(7): 492-501.
- Cuello MC, Cosgrove JJ, Randhir A, Vadiveloo A, Moheimani NR. 2015.** Comparison of continuous and day time only mixing on *Tetraselmis suecica* (Chlorophyta) in outdoor raceway ponds. *J Appl Phycol* 27(5): 1783-1791.
- Danesi EDG, Rangel-Yagui CO, Sat S, De Carvalho JCM. 2011.** Growth and Content of *Spirulina Platensis* Biomass Chlorophyll Cultivated at Different Values of Light Intensity and Temperature Using Different Nitrogen Sources. *Braz. J. Microbiol* 42(1): 362-373.
- Darwin C. 1881.** *The Power of Movement in Plants*. New York: D. Appleton and Company.
- Das P, Lei W, Aziz SS, Obbard JP. 2011.** Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresour Technol* 102(4): 3883-7.
- Datla P. 2011.** The wonder molecule called phycocyanin. *Parry Nutraceuticals and Valensa International*.
- Davidi L, Levin Y, Ben-Dor S, Pick U. 2015.** Proteome analysis of cytoplasmatic and plastidic β -carotene lipid droplets in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol* 167(1): 60-79.

- Degen J, Uebele A, Retze A, Schmid-Staiger U, Trösch W. 2001.** A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *J Biotech* 92(2): 89-94.
- Dekker JP, Boekema EJ. 2005.** Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta(BBA)-Bioenergetics* 1706(1): 12-39.
- Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG. 2007.** Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 74(6): 1163-1174.
- Delepelaire P, Chua NH. 1981.** Electrophoretic purification of chlorophyll a/b-protein complexes from *Chlamydomonas reinhardtii* and spinach and analysis of their polypeptide compositions. *J Biol Chem* 256(17): 9300-9307.
- Demirbas A, Demirbas MF. 2010.** *Algae Energy: algae as a new source of biodiesel*. Springer, London, 280 pp.
- Demmig-Adams B. 1990.** Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta(BBA)-Bioenergetics* 1020(1): 1-24.
- Demmig-Adams B, Adams WW. 1996.** The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* 1(1): 21-26.
- Demmig-Adams B, Adams WW. 2006.** Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytologist* 172(1): 11-21.
- Denery JR, Dragull K, Tang CS, Li QX. 2004.** Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Anal Chim Acta* 501(2): 175-181.
- Denman KL, Gargett AE. 1983.** Time and space scales of vertical mixing and advection of phytoplankton in the upper ocean. *Limnol Oceanogr* 28: 801-815.
- De Rosbo GK & Bernard O. 2014.** Évaluation du gisement potentiel de ressources algales pour l'énergie et la chimie en France à horizon 2030 (Doctoral dissertation, ADEME).
- Deye JF, Berger TA, Anderson AG. 1990.** Nile Red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids. *Anal Chem* 62(6): 615-622.
- Doney SC, Glover DM, Najjar RG. 1996.** A new coupled, one-dimensional biologicalphysical model for the upper ocean: Applications to the JGOFS Bermuda Atlantic Time-series Study (BATS) site. *Deep Sea Res, Part II* 43(2-3): 591-624.
- Dring MJ. 1971.** Light quality and the photomorphogenesis of algae in marine environments. *In:* Fourth European marine biology symposium. Cambridge University Press Cambridge, pp. 375-392.
- Droop MR. 1974.** The nutrient status of algal cells in continuous culture. *J Mar Biol Ass UK* 54(04): 825-855.

- Duanmu D, Casero D, Dent RM, Gallaher S, Yang W, Rockwell NC, Grossman AR. 2013.** Retrograde bilin signaling enables *Chlamydomonas* greening and phototrophic survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(9): 3621–3626.
- Duysens LNM, Ames J, Kamp BM. 1961.** Two photochemical systems in photosynthesis. *Nature* 190: 510 – 511.
- Dykhuizen DE. 1990.** Experimental studies of natural selection in bacteria. *Annu Rev Ecol Syst*: 373-398.
- Eilers PHC, Peeters JCH. 1988.** A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol Model* 42: 199–215.
- Else D, Jameson D, Raleigh B, Cooney MJ. 2007.** Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *J Microbiol Meth* 68(3): 639-642.
- Emerson R, Arnold W. 1932.** The photochemical reaction in photosynthesis. *Jour Gen Physio* 16: 191-205.
- Emerson R, Lewis CM. 1943.** The dependence of the quantum yield of *Chlorella* photosynthesis on wave length of light. *Am J Bot* 30: 165-178.
- Engelmann TW. 1882.** Über Sauerstoffausscheidung von Pflanzenzellen im Mikrospektrum. *Botanische Zeitschrift* 40: 419-426.
- Engelmann TW. 1883.** *Bacterium photometricum*: ein Beitrag zur vergleichenden Physiologie des Licht- und Farbensinnes. *Archiv Gesamte Physiologie Bonn* 30: 95-124.
- Everroad C, Six C, Partensky F, Thomas JC, Holtzendorff J, Wood AM. 2006.** Biochemical bases of type IV chromatic adaptation in marine *Synechococcus* spp. *J Bacteriol*, 188(9): 3345-3356.
- Ewart AJ. 1896.** On Assimilatory Inhibition in Plants. *J Linn Soc Lond Bot* 31(217): 364-461.
- Falkowski PG, Owens TG. 1980.** Light-Shade Adaptation: Two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiol* 66(4):592–595.
- Falkowski PG. 1980.** Light-shade adaptation in marine phytoplankton. In: Primary productivity in the sea, Springer US. pp. 99-119.
- Falkowski PG, Dubinsky Z, Wyman K. 1985.** Growth-irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 30(2): 311-321.
- Falkowski PG, LaRoche J. 1991.** Acclimation to Spectral Irradiance in Algae. *J Phycol* 27(1): 8–14.
- Falkowski PG, Raven JA. 1997.** Aquatic Photosynthesis, 2nd Ed, Blackwell Science, London, UK.
- Falkowski PG, Barber RT, Smetacek V. 1998.** Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science* 281: 200-206.
- Falkowski PG, Katz ME, Knoll AH, Quigg A, Raven JA, Schofield O, Taylor FJR. 2004.** The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305(5682): 354-360.

- Fasham MJR, Ducklow HW, McKelvie SM. 1990.** A nitrogen-based model of plankton dynamics in the oceanic mixed layer. *J Mar Syst* 48(3): 591–639.
- Faugeras B, Lévy M, Mémery L, Verron J, Blum J, Charpentier I. 2003.** Can biogeochemical fluxes be recovered from nitrate and chlorophyll data? A case study assimilating data in the Northwestern Mediterranean Sea at the JGOFS DYFAMED station. *J Mar Syst* (40-41): 99–125.
- Field CB. 1998.** Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic compounds. *Science* 281: 237–240.
- Figuerola FL, Aguilera J, Niell FX. 1995.** Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). *European J Phycol* 30(1): 11-18.
- Forest KT. 2014.** Vivid watercolor paintbox for eukaryotic algae. *Proc Natl Acad Sci* 111(15): 5448-5449.
- Foster KW, Smyth RD. 1980.** Light Antennas in phototactic algae. *Microbiological reviews* 44(4): 572.
- Foster KW, Saranak J, Patel N, Zarilli G, Okabe M, Kline T, Nakanishi K. 1984.** A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature* 311: 756–759.
- Frank HA, Bautista JA, Josue JS, Young AJ. 2000.** Mechanism of non-photochemical quenching in green plants: energies of the lowest excited singlet states of violaxanthin and zeaxanthin. *Biochemistry* 39: 2831–2837.
- Fu W, Gudmundsson O, Feist AM, Herjolfsson G, Brynjolfsson S, Palsson B. 2012.** Maximizing biomass productivity and cell density of *Chlorella vulgaris* by using light-emitting diode-based photobioreactor. *J Biotechnol* 161(3): 242-249.
- Fu W, Guðmundsson Ó, Paglia G, Herjólfsón G, Andrússon ÓS, Palsson B, Brynjólfsón S. 2013.** Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(6): 2395-2403.
- Fujimoto Y, Iwamoto H, Kato A, Yamada K, Ishii T. 1956.** Studies on the Growth of *Chlorella* by Continuous Cultivation: Part I. Part II. *Bull Agric Chem Soc Japan* 20(1): 13-24.
- Fyfe PK, Jones MR, Heathcote P. 2002.** Insights into the evolution of the antenna domains of Type-I and Type-II photosynthetic reaction centres through homology modelling. *FEBS letters* 530(1): 117-123.
- Gaidukov N. 1902.** Über den Einfluß farbigen Lichtes auf die Färbung lebender Oscillarien. *Abh. preuß. Akad. Wiss. Anhang Phys.-math. Kl.* 1-36.
- García F, Freile-Pelegrín Y, Robledo D. 2007.** Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bioresour Technol* 98(7): 1359–1365.

- Garcia-Camacho F, Sánchez-Mirón A, Molina-Grima E, Camacho-Rubio F, Merchuck JC. 2012.** A mechanistic model of photosynthesis in microalgae including photoacclimation dynamics. *J Theor Biol* 304: 1–15.
- Geider RJ. 1987.** Light and temperature dependence of the carbon to chlorophyll a ratio in microalgae and cyanobacteria: implications for physiology and growth of phytoplankton. *New Phytologist* 106: 1-34.
- Geider RJ, Delucia EH, Falkowski PG, Finzi AC, Grime JP, Grace J, Kana TM, LaRoche J, Long SP, Osborne BA. 2001.** Primary productivity of planet earth : biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats. *Global Change Biology* 7 (8): 849–882.
- Glover HE, Keller MD, Spinrad RW. 1987.** The effects of light quality and intensity on photosynthesis and growth of marine eukaryotic and prokaryotic phytoplankton clones. *J Exp Mar Biol Ecol* 105(2): 137-159.
- Gordillo FJ, Goutx M, Figueroa FL, Niell FX. 1998.** Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *J Appl Phycol* 10(2): 135-144.
- Gordon JM, Polle JEW. 2007.** Ultrahigh bioproductivity from algae. *Appl Microbiol Biotechnol* 76(5): 969–975.
- Gordon R, Seckbach J. 2012.** The Science of Algal Fuels: Phycology, Geology, Biophotonics, Genomics and Nanotechnology. Springer.
- Gostan J, Lechuga-Deveze C, Lazarra L. 1986.** Does blue light affect the growth of *Chaetoceros protuberans* Bacillariophyceae ?, *J Phycol* 22: 63–71.
- Gouveia L, Veloso V, Reis A, Fernandes H, Novais J, Empis J. 1996.** Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol* 57(2): 157-163.
- Gouveia L, Oliveira AC. 2009.** Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(2):269–274.
- Govindjee G, Govindjee R. 1974.** The absorption of light in photosynthesis. *Scientific American*, 231(6): 68-82.
- Govindjee CW, Coleman, WJ. 1990.** How plants make oxygen. *Sci. Amer* 262: 50-58.
- Govindjee LN. 1995.** Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence. *Aust J Plant Physiol* 22: 131–160.
- Green BR, Durnford DG. 1996.** The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annual review of plant biology*, 47(1): 685-714.
- Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. 1985.** Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100(3): 965-973.
- Griffiths MJ, Harrison ST. 2009.** Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol* 21(5): 493-507.

- Grobbelaar JU. 1989.** Do light/dark cycles of medium frequency enhance phytoplankton productivity? *J Appl Phycol* 1: 333–340.
- Grobbelaar JU, Nedbal L, Tichý V. 1996.** Influence of high frequency light / dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. *J Appl Phycol* 8(4–5): 335–343.
- Grobbelaar JU, Kurano N. 2003.** Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation *J Appl Phycol* 15: 121–126.
- Grobbelaar JU. 2009.** Upper limits of photosynthetic productivity and problems of scaling. *J Appl Phycol* 21(5): 519–522.
- Grobbelaar JU. 2010.** Microalgal biomass production: Challenges and realities. *Photosynth Res* 106(1–2): 135–144.
- Gross M, Henry W, Michael C, Wen Z. 2013.** Development of a rotating algal biofilm growth system for attached microalgae growth with in situ biomass harvest. *Bioresour Technol* 150: 195–201.
- Grossman AR, Schaeffer MR, Chiang GG, Collier JL. 1993.** The phycobilisome, a light harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiological Reviews* 57: 725–749.
- Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX. 2011.** Microalgae as sources of carotenoids. *Marine drugs*, 9(4): 625–644.
- Guidi L, Legendre L, Reygondeau G, Uitz J, Stemmann L, Henson SA. 2015.** A new look at ocean carbon remineralization for estimating deepwater sequestration. *Global Biogeochemical Cycles* 29(7): 1044–1059.
- Guillard RRL, Ryther JH. 1962.** Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt), and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun. *Can J Microbiol* 8(2): 229–239.
- Guillard RR. 1975.** Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *In*: Culture of marine invertebrate animals. Springer US, pp. 29–60
- Häder DP, Lebert M. 2009.** Photoorientation in photosynthetic flagellates. *In*: Chemotaxis. Humana Press, pp. 51–65.
- Hadi MR, Shariati M, Afsharzadeh S. 2008.** Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gav-khooni salt marsh, Iran. *Biotechnol Bioprocess Eng* 13: 540–544.
- Hadiyanto H, Elmore S, Van Gerven T, Stankiewicz A. 2013.** Hydrodynamic evaluations in high rate algae pond (HRAP) design. *Chem Eng J* 217: 231–239.
- Han BP. 2001.** Photosynthesis-irradiance response at physiological level: A mechanistic model. *J Theor Biol* 213: 121–127.
- Hannon M, Gimpel J, Tran M, Rasala B, Mayfield S. 2010.** Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels* 1(5): 763–784.

- Hartmann P, Béchet Q, Bernard Q. 2014.** The effect of photosynthesis time scales on microalgae productivity. *Bioprocess Biosyst Eng* 37(1): 17–25.
- Hauschild CA, McMurter HJG, Pick FR. 1991.** Effect of spectral quality on growth and pigmentation of picocyanobacteria. *J Phycol* 27: 698-702.
- Havaux M. 1998.** Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* 3(4): 147-151.
- Havelková-Doušová H, Prášil O, Behrenfeld M. 2004.** Photoacclimation of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) Under Fluctuating Irradiance. *Photosynthetica* 42(2): 273–281.
- Hegemann P. 2008.** Algal sensory photoreceptors. *Annu Rev Plant Biol* 59: 167-189.
- Henley WJ. 1993.** Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *J Phycol* 29(6): 729-739.
- Herrmann H, Häder, DP, Köfferlein M, Seidlitz HK, Ghatti F. 1996.** Effects of UV radiation on photosynthesis of phytoplankton exposed to solar simulator light. *J Photoch Photobio B* 34(1): 21-28.
- Herzig R, Dubinsky Z. 1992.** Photoacclimation, photosynthesis, and growth. *Israel J Bot* 41(4–6): 199–212.
- Hessen DO, Anderson TR. 2008.** Excess carbon in aquatic organisms and ecosystems: Physiological, ecological, and evolutionary implications. *Limnol Oceanogr* 53(4): 1685–1696.
- Hill R, Bendall R. 1960.** Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis. *Nature* 186: 136–37.
- Höök M, Tang X. 2013.** Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change-A review. *Energy Policy* 52: 797-809.
- Hopkins WG. 2003.** *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur, Bruxelles.
- Horton P, Ruban AV, Walters RG. 1996.** Regulation of light harvesting in green plants. *Annual review of plant biology* 47(1): 655-684.
- Hosseini Tafreshi A, Shariati M. 2009.** *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *J Appl Microbiol* 107(1): 14-35.
- Hreiz R, Sialve B, Morchain J, Escudié R, Steyer JP, Guiraud P. 2014.** Experimental and numerical investigation of hydrodynamics in raceway reactors used for algaculture. *Chem Eng J* 250: 230-239.
- Huisman J, Matthijs HC, Visser PM, Balke H, Sigon CA, Passarge J, Mur LR. 2002.** Principles of the light-limited chemostat: theory and ecological applications. *Antonie van Leeuwenhoek* 81(1): 117-133.
- Hultberg M, Jönsson HL, Bergstrand KJ, Carlsson AS. 2014.** Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol* 159: 465-467.

- Humbeck K, Hoffmann B, Senger H. 1988.** Influence of energy flux and quality of light on the molecular organization of the photosynthetic apparatus in *Scenedesmus*. *Planta* 173: 205–212.
- Huysman MJJ, Fortunato AE, Matthijs M, Schellenberger Costa B, Vanderhaeghen R. 2013.** AUREOCHROME1a-mediated induction of the diatom-specific cyclin dsCYC2 controls the onset of cell division in diatoms (*Phaeodactylum tricornutum*). *Plant Cell* 25: 215–228.
- Iluz D, Alexandrovich I, Dubinsky Z. 2012.** The enhancement of photosynthesis by fluctuating light. *Artificial Photosynthesis*: 115–134.
- Im CS, Eberhard S, Huang K, Beck CF, Grossman AR. 2006.** Phototropin involvement in the expression of genes encoding chlorophyll and carotenoid biosynthesis enzymes and LHC apoproteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 48(1): 1–16.
- Jahnke LS. 1999.** Massive carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* induced by ultraviolet-A radiation. *J. Photochem. Photobiol B: Biol* 48: 68–74.
- Jahns P, Holzwarth AR. 2012.** The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim Biophys Acta BBA* 1817(1): 182–193.
- James SC, Boriah V. 2010.** Modeling algae growth in an open-channel raceway. *J Comput Biol* 17(7): 895–906.
- Janssen M, Kuijpers TC, Veldhoen B, Ternbach MB, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. 1999.** Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light/dark cycles: 13–87 s. *J Biotechnol* 70: 323–333.
- Janssen M, Slenders P, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. 2001.** Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme Microb Tech* 29: 298–305.
- Janssen M, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. 2003.** Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up and future prospects. *Biotechnol Bioeng* 81: 193–210.
- Jerlov NG. 1968.** *Optical Oceanography*. Elsevier Publ, Amsterdam, 194 pp.
- Jerlov NG. 1976.** *Marine optics* (Vol. 14). Elsevier.
- Jin E, Polle JE. 2009.** Carotenoid biosynthesis in *Dunaliella* (Chlorophyta). In: Ben-Amotz A, Polle JE, Rao DVS. (Eds.) *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*. Scientific Publishers, Enfield, NH, pp. 147–171.
- Jorissen HJ, Braslavsky SE, Wagner G, Gärtner W. 2002.** Heterologous expression and characterization of recombinant phytochrome from the green alga *Mougeotia scalaris*. *Photochem Photobiol* 76(4): 457–466.
- Juneau P, Barnett A, Méléder V, Dupuy C, Lavaud J. 2015.** Combined effect of high light and high salinity on the regulation of photosynthesis in three diatom species belonging to the main growth forms of intertidal flat inhabiting microphytobenthos. *J Exp Marine Biol* 463: 95–104.
- Jungandreas A, Costa BS, Jakob T, Von Bergen M, Baumann S, Wilhelm C. 2014.** The acclimation of *Phaeodactylum tricornutum* to blue and red light does not influence the

- photosynthetic light reaction but strongly disturbs the carbon allocation pattern. PLoS ONE 9(8): e99727.
- Kana TM, Gilbert PM. 1987.** Effect of irradiance up to 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on marine *Synechococcus* WH7803-I. Growth, pigmentation and cell composition. Deep-sea Research 34: 479-495.
- Kana TM, Geider RJ, Critchley C. 1997.** Regulation of photosynthetic pigments in microalgae by multiple environmental factors: A dynamic balance hypothesis. New Phytol 137(4):629–638.
- Karni L, Avron M. 1988.** Ion content of the halotolerant alga *Dunaliella salina*. Plant and cell physiology 29(8): 1311-1314.
- Katsuda T, Lababpour A, Shimahara K, Katoh S. 2004.** Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. Enzyme and microbial technology, 35 (5): 81-86.
- Kautsky H, Hirsch A. 1931.** Neue versuche zur kohlenensäureassimilation. Naturwissenschaften 19(48): 964-964.
- Kehoe DM, Gutu A. 2006.** Responding to color: the regulation of complementary chromatic adaptation. Annu Rev Plant Biol 57: 127-150.
- Kidd DG, Lagarias JC. 1990.** Phytochrome from the green alga *Mesotaenium caldariorum*. Purification and preliminary characterization. J Biol Chem 1 265(12): 7029–7035.
- Kim JH, Nemson JA, Melis A. 1993.** Photosystem II Reaction Center Damage and Repair in *Dunaliella salina* (Green Alga) (Analysis under Physiological and Irradiance-Stress Conditions). Plant Physiol 103: 181–189.
- Kim ZH, Kim SH, Lee HS, Lee CG. 2006.** Enhanced production of astaxanthin by flashing light using *Haematococcus pluvialis*. Enzyme Microb Technol 39: 414–419.
- Kim TH, Lee Y, Han SH, Hwang SJ. 2013.** The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. Bioresour Technol 130: 75-80.
- Kirk JTO. 1983.** Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press Publ, Cambridge, UK, 401 pp.
- Kirk JTO. 1994.** Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems, 2nd Ed, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 478 pp.
- Kirst H, Garcia-Cerdan JG, Zurbriggen A, Ruehle T, Melis A. 2012.** Truncated photosystem chlorophyll antenna size in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* upon deletion of the TLA3-CpSRP43 gene. Plant Physiol 160(4): 2251-2260.
- Klein RM. 1992.** Effects of green light on biological systems. Biological Reviews 67(2): 199-284.
- Kok B, Burlew JS. 1953.** Experiments on photosynthesis by *Chlorella* in flashing light. Algal Culture. Washington: Carnegie Institution of Washington, Pub 600, pp. 63–75.
- Kok B. 1956.** Photosynthesis in flashing light. Biochim Biophys Acta 21(2): 245-258.

- Kok B, Gassner EB, Rurainski HJ. 1965.** Photoinhibition of chloroplast reactions. *Photochem Photobiol* 4: 215–227.
- Krause GH, Weis E. 1991.** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu Rev Plant Biol* 42(1): 313–349.
- Kreimer G. 2009.** The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more? *Curr Genet* 55: 19–43.
- Krüger TP, Wientjes E, Croce R, Can Grondelle R. 2011.** Conformational switching explains the intrinsic multifunctionality of plant light-harvesting complexes. *Proc Natl Acad Sci* 108(33): 13516–13521.
- Kutschera U, Niklas KJ. 2005.** Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory in Biosciences* 124(1), 1–24.
- Lacour T. 2010.** Influence du statut azoté et du cycle lumineux diurne sur le métabolisme lipidique d'*Isochrysis* sp. (Haptophyceae). Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix Marseille 2.
- Lacour T, Sciandra A, Talec A, Mayzaud P, Bernard O. 2012.** Neutral lipids and carbohydrates productivities as a response to the nitrogen status in the haptophyceae *Isochrysis* sp. (t-iso): starvation vs. limitation. *J Phycol* 48(3): 647–656.
- Laetsch WM, Stetler, DA. 1965.** Chloroplast structure and function in cultured tobacco tissue. *Am J Bot*: 798–804.
- Lamers PP, Janssen M, De Vos RC, Bino RJ, Wijffels RH. 2008.** Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol* 26(11): 631–638.
- Lamers PP, Van de Laak CC, Kaasenbrood PS, Lorier J, Janssen M, De Vos RC, Bino RJ, Wijffels RH. 2010.** Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnol Bioeng* 106(4): 638–648.
- Lamers PP, Janssen M, De Vos RC, Bino RJ, Wijffels RH. 2012.** Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *J Biotechnol* 162: 21–27.
- Langley N, Harrison S, Van Hille R. 2012.** A critical evaluation of CO₂ supplementation to algal systems by direct injection. *Biochem Eng J* 68: 70–75.
- Lardon L, Helias A, Sialve B, Steyer JP, Bernard O. 2009.** Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environ Sci Technol* 43(17): 6475–6481.
- Laurienzo P. 2010.** Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Marine drugs* 8(9): 2435–2465.
- Lavaud J, Strzepek RF, Kroth, PG. 2007.** Photoprotection capacity differs among diatoms: Possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnol Oceanogr* 52(3): 1188–1194.

- Laws EA. 1986.** Use of the flashing light effect to stimulate production in algal mass cultures. *Nova Hedwigia Beih* 83: 230-234.
- Lazár D. 1999.** Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochim Biophys Acta(BBA)-Bioenergetics* 1412(1): 1-28.
- Lee YK. 2001.** Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *J Appl Phycol* 13(4), 307-315.
- Le Floch E, Malara G, Sciandra A. 2002.** An automatic device for *in vivo* absorption spectra acquisition and chlorophyll estimation in phytoplankton cultures. *J Appl Phycol* 14:435–444.
- Leonardi PI, Cáceres EJ. 2004.** Comparative analysis of the fine structure of young and adult individuals of *Dunaliella salina* (Polyblepharidaceae, Chlorophyceae) with emphasis on the flagellar apparatus. *J Phycol* 30(4): 642-653.
- Leverenz RL, Sutter M, Wilson A, Gupta S, Thurotte A, de Carbon CB, Kerfeld CA. 2015.** A 12 Å carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection. *Science* 348(6242): 1463-1466.
- Levin A. 2015.** U.S. Patent N° 8,986,985. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Li Z, Wakao S, Fischer BB, Niyogi KK. 2009.** Sensing and responding to excess light. *Annu Rev Plant Biol* 60: 239–260.
- Lichtenthaler HK. 1987.** Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods Enzymol* 148: 350–382.
- Litchman E. 2000.** Growth rates of phytoplankton under fluctuating light. *Fresh Biol* 44(2): 223–235.
- Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2000.** Regulation of transcription initiation. In W. H. Freeman (Ed.), *Molecular Cell Biology*. New York: WH. Freeman.
- Loeblich LA. 1982.** Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J Mar Bio Ass* 62: 493-508.
- Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka, J. 2005.** Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* 438 (7070): 1040-1044.
- Lourenço SO, Barbarino E, Mancini-Filho J, Schinke KP, Aidar E. 2002.** Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. *Phycologia* 41(2): 158-168.
- Lu S, Li L. 2008.** Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *J Integr Plant Biol* 50(7): 778-785.
- Lunch CK, LaFountain AM, Thomas S, Frank HA, Lewis LA, Cardon ZG. 2013.** The xanthophyll cycle and NPQ in diverse desert and aquatic green algae. *Photosynth Res* 115(2-3): 139-151.

- Macedo M F, Miller AZ, Dionísio A, Saiz-Jimenez C. 2009.** Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology* 155(11): 3476-3490.
- MacIntyre HL, Kana TM, Anning T, Geider RJ. 2002.** Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J Phycol* 38: 17–38.
- Makareviciene V, Skorupskaite V, Andruleviciute V. 2013.** Biodiesel fuel from microalgae-promising alternative fuel for the future: a review. *Rev Environ Sci Bio* 12(2): 119-130.
- Malara G, Sciandra A. 1991.** A multiparameter phytoplankton culture system driven by microcomputer. *J Appl Phycol* 3(3): 235-241.
- Malcata FX. 2011.** Microalgae and biofuels: A promising partnership. *Trends Biotechnol* 29(11): 542–549.
- Mao TK, Van de Water J, Gershwin ME. 2005.** Effects of a Spirulina-based dietary supplement of a cytokine production from allergic rhinitis patients. *J Med Food* 8(1): 27–30.
- Marchetti J, Bougaran G, Dean LL, Mégrier C, Lukomska E, Kaas R, Olivo E, Baron R, Robert R, Cadoret JP. 2012.** Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis* affinis *galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture* 326–329: 106–115.
- Marchetti J, Bougaran G, Jauffrais T, Lefebvre S, Rouxel C, Saint-Jean B, Cadoret JP. 2013.** Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). *J Appl Phycol* 25(1): 109-119.
- Margulis L, Schwartz KV. 1988.** Five kingdoms an illustrated guide to the phylum of life on earth. New York. WH freeman.
- Marín N, Morales F, Lodeiros C, Tamigneaux E. 1998.** Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *J Appl Phycol* 10: 405-411.
- Markager S, Vincent WF. 2001.** Light absorption by phytoplankton: development of a matching parameter for algal photosynthesis under different spectral regimes. *J Plankton Res* 23(12): 1373-1384.
- Marra J. 1978.** Phytoplankton photosynthetic response to vertical movement in a mixed layer. *Mar Biol* 46(3): 203-208.
- Masuda T, Tanaka A, Melis A. 2003.** Chlorophyll antenna size adjustments by irradiance in *Dunaliella salina* involve coordinate regulation of chlorophyll a oxygenase (CAO) and Lhcb gene expression. *Plant Mol Biol* 51(5): 757-771.
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS. 2010.** Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energ Rev* 14(1): 217–232.

- Matthijs HCP, Balke H, Van Hes UM, Kroon BMA, Mur LR, Binot RA. 1996.** Application of light-emitting diodes in bioreactors: flashing light effects and energy economy in algal culture *Chlorella pyrenoidosa*. *Biotechnol Bioeng* 50(1): 98–107.
- Melis A. 2009.** Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science* 177: 272–280.
- Mendoza H, Martel A, del Rio MJ, Reina GG. 1999.** Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *J Appl Phycol* 11(1): 15–19.
- Mendoza H, De La Jara A, Freijanes K, Carmona L, Ramos AA, de Sousa Duarte V, Serafim Varela JC. 2008.** Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: A new approach to select carotenoid hyperproducing strains. *Electron J Biotechnol* 11(4): 5–6.
- Mendoza JL, Granados MR, De Godos I, Acién FG, Molina E, Banks C, Heaven S. 2013.** Fluid-dynamic characterization of real-scale raceway reactors for microalgae production. *Biomass Bioenerg* 54: 267-275.
- Meseck SL, Alix JH, Wikfors GH. 2005.** Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chuii* (PLY429). *Aquaculture* 246(1): 393-404.
- Michel H, Deseinoffer J. 1988.** Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of the photosystem II. *Biochemistry* 27: 1-7.
- Milledge J. 2011.** Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 10(1): 31-41.
- Moerschel E. 1991.** The light-harvesting antennae of cyanobacteria and red algae. *Photosynthetica* 25(1): 137-144.
- Mogedas B, Casal C, Forján E, Vilchez C. 2009.** β -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors. *J Biosci Bioeng* 108(1): 47-51.
- Möglich A, Yang X, Ayers RA, Moffat K. 2010.** Structure and function of plant photoreceptors. *Annu Rev Plant Biol* 61: 21-47.
- Moheimani NR, Parlevliet D. 2013.** Sustainable solar energy conversion to chemical and electrical energy. *Renew Sust Energ Rev* 27: 494-504.
- Mohsenpour SF, Richards B, Willoughby N. 2012.** Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresour Technol* 125: 75–81.
- Molina Grima E, Fernández Sevilla JM, Sánchez Pérez JA, García Camacho F. 1996.** A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *J Biotech* 45: 59–69.
- Monod J. 1950.** La technique de culture continue, théorie et applications. *Ann Inst Pasteur* 79(19): 390–401.

- Montesinos E, Guerrero R, Abella C, Esteve I. 1983.** Ecology and physiology of the competition for light between *Chlorobium limicola* and *Chlorobium phaeobacteroides* in natural habitats. *Appl Environ Microbiol* 46: 1007-1016.
- Morel A. 1978.** Available, usable, and stored radiant energy in relation to marine photosynthesis. *Deep Sea Research* 25(8): 673-688.
- Morel A, Lazzara L, Gostan J. 1987.** Growth rate and quantum yield time response for a diatom to changing irradiances (energy and color) 1. *Limnol Oceanogr* 32(5): 1066-1084.
- Morel A, Huot Y, Gentili B, Werdell PJ, Hooker SB, Franz BA. 2007.** Examining the consistency of products derived from various ocean color sensors in open ocean (Case 1) waters in the perspective of a multi-sensor approach. *Remote Sensing of Environment* 111(1): 69-88.
- Mouget JL, Rosa P, Tremblin G. 2004.** Acclimation of *Haslea ostrearia* to light of different spectral qualities - confirmation of 'chromatic adaptation' in diatoms. *J Photochem Photobiol B* 75: 1–11.
- Müller P, Li XP, Niyogi KK. 2001.** Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125(4): 1558-1566.
- Muñoz-Tamayo R, Mairet F, Bernard O. 2013.** Optimizing microalgal production in raceway systems. *Biotechnol Progress* 29(2): 543–552.
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI. 2007.** Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim Biophys Acta* 1767(6): 414– 421.
- Mustárdy L, Garab G. 2003.** Granum revisited. A three-dimensional model—where things fall into place. *Trends Plant Sci*, 8(3): 117-122.
- Nakajima Y, Ueda R. 1997.** Improvement of photosynthesis in dense microalgal suspension by reduction of light harvesting pigments. *J Appl Phycol* 9(6): 503-510.
- Nakajima Y, Tsuzuki M, Ueda R. 2001.** Improved productivity by reduction of the content of light-harvesting pigment in *Chlamydomonas perigranulata*. *J Appl Phycol* 13(2): 95-101.
- Neale J. 1987.** Algal photoinhibition and photosynthesis in the aquatic environment. In: Photoinhibition (eds Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 39–65.
- Nedbal L, Tichy V, Xiong F, Grobbelaar JU. 1996.** Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light. *J Appl Phycol* 8: 325– 333.
- Neidhardt J, Benemann JR, Zhang L, Melis, A. 1998.** Photosystem-II repair and chloroplast recovery from irradiance stress: relationship between chronic photoinhibition, light-harvesting chlorophyll antenna size and photosynthetic productivity in *Dunaliella salina* (green algae). *Photosynthesis Research* 56(2): 175-184.
- Nielsen MV, Sakshaug E. 1993.** Photobiological studies of *Skeletonema Costatum* adapted to spectrally different light regimes. *Limnol Oceanogr* 38: 1576–1581.

- Nigg EA. 1995.** Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17(6): 471-480.
- Nixon PJ, Michoux F, Yu J, Boehm M, Komenda J. 2010.** Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Ann Bot* 106(1): 1–16.
- Niyogi KK, Björkman O, Grossman AR. 1997.** The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14162–14167.
- Niyogi KK. 1999.** Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 333–359.
- Niyogi KK. 2000.** Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 3(6): 455-460.
- Niyogi KK, Truong TB. 2013.** Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 16(3): 307-314.
- Norsker NH, Barbosa MJ, Vermuë MH, Wijffels RH. 2011.** Microalgal production- a close look at the economics. *Biotechnol Adv* 29(1): 24-27.
- Novick A, Szilard L. 1950.** Description of the chemostat. *Science* 112(2920): 715–716.
- Ohki K, Gannt E, Lippschultz CA, Ernst MC. 1985.** Constant phycobilisome size in chromatically adapted cells of the cyanobacterium *Tolypothrix tenius*, and variation in *Nostoc* sp. *Plant Physiology* 79: 943-948.
- Ohr LM. 2005.** Riding the nutraceuticals wave. *Food technology* 59: 95–96.
- Olaizola M, Duerr EO. 1990.** Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *J Appl Phycol* 2(2): 97-104.
- Oldenhof H, Zachleder V, Van Den Ende H. 2006.** Blue-and red-light regulation of the cell cycle in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *European J Phycol* 41(3): 313-320.
- Ong LJ, Glazer AN. 1991.** Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria. I. Bilin types and locations and energy transfer pathways in *Synechococcus* spp. phycoerythrins. *J Biol Chem* 266(15): 9515-9527.
- Oren A. 2005.** A hundred years of *Dunaliella* research : 1905-2005. *Saline systems* 1(2): 1-14
- Pahlow M. 2000.** Temporal Trends in Deep Ocean Redfield Ratios. *Science* 287(5454): 831–833.
- Palenik B. 2001.** Chromatic Adaptation in Marine *Synechococcus* Strains. *Appl Environ Microbiol* 67(2): 991-994.
- Park S, Lee Y, Jin E. 2013.** Comparison of the responses of two *Dunaliella* strains, *Dunaliella salina* CCAP 19/18 and *Dunaliella bardawil* to light intensity with special emphasis on carotenogenesis. *Algae* 28(2): 203-211.
- Pazos JVP, Izquierdo PF. 2011.** Synthesis of neutral lipids in *Chlorella* sp. under different light and carbonate conditions *Cien Tecnol Fut* 4(4): 47–58.

- Pengerud B, Skjoldal EF, Thingstad TF. 1987.** The reciprocal interaction between degradation of glucose and ecosystem structure. Studies in mixed chemostat cultures of marine bacteria, algae, and bacterivorous nanoflagellates. *Mar Ecol Prog Ser* 35: 111-117.
- Perin G, Bellan A, Segalla A, Meneghesso A, Alboresi A, Morosinotto T. 2015.** Generation of random mutants to improve light-use efficiency of *Nannochloropsis gaditana* cultures for biofuel production. *Biotechnol Biofuels* 8(1): 1.
- Perner-Nochta I, Posten C. 2007.** Simulations of light intensity variation in photobioreactors. *J Biotechnol* 131: 276–285.
- Phillips JN, Myers J. 1954.** Growth Rate of *Chlorella* in Flashing Light. *Plant Physiol* 29(2): 152–161.
- Pick FR. 1991.** The abundance and composition of fresh-water picocyanobacteria in relation to light penetration. *Limnol Oceanogr* 36: 1457-1462.
- Pierson BK, Olson JM. 1989.** Evolution of photosynthesis in anoxygenic photosynthetic procaryotes. In: Cohen Y and Rosenberg E (eds) *Microbial Mats, Physiological Ecology of Benthic Communities*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp 402–427.
- Polle, JEW, Tran D, Ben-Amotz A. 2009.** History, Distribution and Habitats of Algae of the Genus *Dunaliella* Teodoresco (Chlorophyceae). In: *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*, (Eds.), Science Publishers, Enfield, pp: 1-13.
- Poppel GV, Goldbohm RA. 1995.** Epidemiological evidences for β -carotene and cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 62: 1393–1402.
- Posten C. 2009.** Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng Life Sci* 9(3): 165–177.
- Posten C, Jacobi A, Steinweg C, Lehr F, Rosello R. 2011.** U.S. Patent Application N° 13/110,189.
- Posudin YI, Masyuk NP, Lilitska GG, Radchenko MI. 1991.** Phototopotaxis of two species of *Dunaliella*. *Teod Ukr Bot J* 48(4): 48-53.
- Posudin YI, Massjuk NP, Lilitskaya GG. 2010.** Photomovement of *Dunaliella* Teod. Vieweg+ Teubner.
- Prézelin BB, Glover HE, Van Hoven B, Steinberg D, Matlick HA, Schofield O, Campbell L. 1989.** Blue-green light effects on light-limited rates of photosynthesis: Relationship to pigmentation and productivity estimates for *Synechococcus* populations from the Sargasso Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 54(1): 121-136.
- Pruvost J, Pottier L, Legrand J. 2006.** Numerical investigation of hydrodynamic and mixing conditions in a torus photobioreactor. *Chem Eng Sci* 61 (14): 4476-4489.
- Pruvost J, Cornet JF, Legrand J. 2008.** Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: an energetically consistent analysis. *Chem Eng Sci* 63: 3679-3694.
- Pulz O, Scheibenbogen K. 1998.** Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 38: 123-152.

- Pulz O. 2001.** Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 57(3): 287–293.
- Pulz O, Gross W. 2004.** Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65(6): 635–48.
- Rabouille S, Clauquin P. 2016.** Photosystem-II shutdown evolved with Nitrogen fixation in the unicellular diazotroph *Crocospaera watsonii*. *Environ Microbiol*.
- Rainey PB, Buckling A, Kassen R, Travisano M. 2000.** The emergence and maintenance of diversity: insights from experimental bacterial populations. *Trends Ecol Evol* 15(6): 243-247.
- Rao AV, Agarwal S. 2000.** Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J Am Col Nut* 19(5): 563-569.
- Raposo MFJ, Mendes-Pinto MM, Morais RMSC. 2001.** Carotenoids, foodstuff and human health. In: Morais R (Ed.), *Functional foods: an introductory course*, Universidade Católica Portuguesa — Escola Superior de Biotecnologia, Porto, pp 107-123.
- Raposo MFJ, Morais RMSC, Morais AMMB. 2013.** Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life sciences* 93(15): 479-486.
- Ras M, Steyer JP, Bernard O. 2013.** Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Rev Environ Sci Bio* 12(2): 153-164.
- Raven JA, Beardall J. 1981.** Respiration and photorespiration. *Can. Bull. Fish Aquat Sci* 210, pp. 55-82.
- Razzak SA, Hossain MM, Lucky RA, Bassi AS, De Lasa H. 2013.** Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—a review. *Renew Sust Energ Rev* 27: 622-653.
- Redfield AC. 1963.** The influence of organisms on the composition of sea-water. *The Sea* pp 26–77.
- Reinke J. 1883.** Untersuchungen ueber die Einwirkung des Lichtes auf die Sauerstoffausscheidung der Pflanzen. *Bot Z* 41 (42): 697– 712.
- Renaud SM, Parry DL, Luong-Van T, Kuo C, Padovan A, Sammy N. 1991.** Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J Appl Phycol* 3: 43–53.
- Renaud SM, Thinh LV, Lambrinidis G, Parry DL. 2002.** Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211(1): 195-214.
- Richardson K, Beardall J, Raven JA. 1983.** Adaptation of unicellular algae to irradiance: An analysis of strategies. *New Phytol* 93(2): 157–191.
- Richmond A, Vonshak A. 1978.** *Spirulina* culture in Israel. *Arch fur Hydroiologie (Beih. Ergebn. Limnol)*. Vol.11, pp. 274-280.

- Richmond A. 2000.** Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *J Appl Phycol* 12 (3-5): 441-451.
- Richmond A. 2004.** Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: An overview. *Hydrobiologia* 512: 33–37.
- Richmond A. 2008.** Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Sciences Ltd., Oxford: Amos Richmond 2004, 566 p.
- Riebesell U, Schulz KG, Bellerby RGJ, Botros B, Fritsche P, Meyerhöfer M, Neill C, Nondal G, Oschlies A, Wohlers J, Zöllner E. 2007.** Enhanced biological carbon consumption in a high CO₂ ocean. *Nature* 450: 545-548.
- Rise M, Cohen E, Vishkautsan M, Cojocaru M, Gottlieb HE, Arad SM. 1994.** Accumulation of secondary carotenoids in *Chlorella zofingiensis*. *J Plant Physiol* 144(3): 287-292.
- Rivkin RB. 1989.** Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. I. Photosynthesis, chemical composition and growth. *Mar Ecol Prog Ser.* 55(2): 291-304.
- Rocap G, Larimer FW, Lamerdin J, Malfatti S, Chain P, Ahlgren NA, Arellano A et al. 2003.** Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424: 1042-1047.
- Rockwell NC, Duanmu D, Martin SS, Bachy C, Price, DC, Bhattacharya D, Lagarias JC. 2014.** Eukaryotic algal phytochromes span the visible spectrum. *Proc Natl Acad Sci* 111(10): 3871-3876.
- Rodolfi L, Chini Zittelli G, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR. 2009.** Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102(1): 100–112.
- Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES, Johnsen G. 2011.** Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography. Cambridge University Press.
- Rüdiger W, López-Figueroa F. 1992.** Photoreceptors in algae. *Photochem Photobiol* 55(6): 949-954.
- Rumin J, Bonnefond H, Saint-Jean B, Rouxel C, Sciandra A, Bernard O, Bougaran G. 2015.** The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnol Biofuels* 8(1): 1.
- Ruyters G. 1984.** Effects of blue light on enzymes. In: *Blue light effects in biological systems.* Springer Berlin Heidelberg, pp. 283-301.
- Salguero A, León R, Mariotti A, de la Morena B, Vega JM, Vilchez C. 2005.** UV-A mediated induction of carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* with retention of cell viability. *Appl Microbiol Biotechnol* 66(5): 506-511.
- Sancar A. 2000.** Cryptochrome: the second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception. *Annu Rev Biochem* 69(1): 31-67.

- Sánchez-Estudillo L, Freile-Pelegrin Y, Rivera-Madrid R, Robledo D, Narváez-Zapata JA. 2006.** Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga, *Dunaliella salina*. *Biotechnol Lett* 28: 787-791.
- Sánchez Mirón A, Cerón García MC, Contreras Gómez A, García Camacho F, Molina Grima E, Chisti Y. 2003.** Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem Eng J* 16: 287-297.
- Sánchez-Saavedra MDP, Voltolina D. 1994.** The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. *Comp Biochem Physiol B* 107(1): 39-44.
- Sánchez-Saavedra MDP, Maeda-Martínez AN, Acosta-Galindo S. 2015.** Effect of different light spectra on the growth and biochemical composition of *Tisochrysis lutea*. *J Appl Phycol*: 1-9.
- Sathyendranath S, Platt T. 1989.** Computation of aquatic primary production: extended formalism to include effect of angular and spectral distribution of light. *Limnol Oceanogr* 34: 188-198.
- Schatz GH, Broc H, Holzwarth AR. 1988.** Kinetic and energetic model for the primary processes in photosystem II. *Biophys J* 54(3): 397-405.
- Schellenberger Costa B, Jungandreas A, Jakob T, Weisheit W, Mittag M *et al.* 2013.** Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Exp Bot* 64(2): 483-493.
- Schreiber U, Klughammer C, Kolbowski J. 2011.** High-end chlorophyll fluorescence analysis with the multi-color-pam. i. various light qualities and their applications. *PAM Appl Notes* 1:1-21.
- Schulze PS, Barreira LA, Pereira HG, Perales JA, Varela JC. 2014.** Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends Biotechnol* 32(8): 422-430.
- Sciandra A, Harlay J, Lefèvre D, Lemée R, Rimmelín P, Denis M, Gattuso JP. 2003.** Response of coccolithophorid *Emiliania huxleyi* to elevated partial pressure of CO₂ under nitrogen limitation. *Mar Ecol Prog Ser* 261: 111-122.
- Senger H, Bauer B. 1987.** The influence of light quality on adaptation and function of the photosynthetic apparatus. *Photochemistry and photobiology* 45(S1): 939-946.
- Serôdio J, Ezequiel J, Barnett A, Mouget JL, Méléder V, Laviale M, Lavaud J. 2012.** Efficiency of photoprotection in microphytobenthos: role of vertical migration and the xanthophyll cycle against photoinhibition. *Aquat Microb Ecol* 67: 161-175.
- Šetlík I, Allakhverdiev SI, Nedbal L, Šetlíková E, Klimov VV. 1990.** Three types of Photosystem II photoinactivation. *Photosynth Res* 23(1): 39-48.
- Seyfabadi J, Ramezani Z, Khoeyi ZA. 2011.** Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *J Appl Phycol* 23: 721-726.
- Sforza E, Simionato D, Giacometti GM, Bertuccio A, Morosinotto T. 2012.** Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PloS One* 7(6):e38975.

- Shaish A, Avron M, Pick U, Ben-Amotz A. 1993.** Are active oxygen species involved in induction of β -carotene in *Dunaliella bardawil* ?. *Planta* 190(3): 363-368.
- Sharma NK, Rai AK. 2010.** Biodiversity and biogeography of microalgae: progress and pitfalls. *Environmental Reviews*: 19(NA): 1-15.
- Shihira-Ishikawa I, Nakamura T, Higashi SI, Watanabe M. 2007.** Distinct responses of chloroplasts to blue and green laser microbeam irradiations in the centric diatom *Pleurosira laevis*. *Photochem Photobiol* 83(5): 1101-1109.
- Shu CH, Tsai CH, Liao WH, Chen KY, Huang HC. 2012.** Effects of Light Quality on the accumulation of oil in a Mixed Culture of *Chlorella* sp. and *S. Cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol* 87: 601–607.
- Shukla A, Biswas A, Blot N, Partensky F, Karty JA, Hammad LA, Kehoe DM. 2012.** Phycoerythrin-specific bilin lyase–isomerase controls blue-green chromatic acclimation in marine *Synechococcus*. *Proc Natl Acad Sci* 109(49): 20136-20141.
- Siefermann-Harms D. 1987.** The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiologia Plantarum* 69(3): 561-568.
- Skulberg OM. 2000.** Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *J Appl Phycol* 12: 341–348
- Slade R, Bauen A. 2013.** Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy* 53: 29-38.
- Small GD, Min BY, Lefebvre A. 1995.** Characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* gene encoding a protein of the DNA photolyase/blue light photoreceptor family. *Plant Mol Biol* 28: 443–454.
- Smith HL, Waltman P. 1995.** The theory of the chemostat: dynamics of microbial competition (Vol. 13). Cambridge university press.
- Sorokin C, Krauss RW. 1958.** The effects of light intensity on the growth rates of green algae. *Plant physiology* 33(2): 109.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. 2006.** Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101(2): 87–96.
- Staehelin LA, Armond, PA, Miller, KR. 1975.** Chloroplast membrane organization at the supramolecular level and its functional implications. *Brookhaven symposia in biology* (28): 278-315.
- Steele JH. 1985.** A comparison of terrestrial and marine ecological systems. *Nature* 313: 355-358.
- Stein JR. 1979.** Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, 472p.
- Stirzaker D. 2003.** Elementary probability. Cambridge University Press.

- Stomp M, Huisman J, De Jongh F, Veraart A. J, Gerla D, Rijkeboer M, Stal LJ. 2004.** Adaptive divergence in pigment composition promotes phytoplankton biodiversity. *Nature* 432(7013): 104-107.
- Stomp M, Huisman J, Vörös L, Pick FR, Laamanen M, Haverkamp T, Stal LJ. 2007.** Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecol Lett* 10(4): 290-298.
- Stramski D, Reynolds RA. 1993.** Diel variations in the optical properties of a marine diatom. *Limnol Oceanogr* 38(7): 1347-1364.
- Strasser B, Sánchez-Lamas M, Yanovsky MJ, Casal JJ, Cerdán PD. 2010.** *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes. *Proc Natl Acad Sci* 107(10): 4776-4781.
- Sukenik A, Wyman KD, Bennett J, Falkowski, PG. 1987.** A novel mechanism for regulating the excitation of photosystem II in a green alga. *Nature* 327: 704 – 707.
- Sukenik A, Livne A. 1991.** Variations in lipid and fatty acid content in relation to acetyl CoA carboxylase in the marine prymnesiophyte *Isochrysis galbana*. *Plant Cell Physiol* 32(3): 371-378.
- Tanaka A, Melis A. 1997.** Irradiance-dependent changes in the size and composition of the chlorophyll ab light-harvesting complex in the green alga *Dunaliella salina*. *Plant Cell Physiol* 38(1): 17-24.
- Takache H, Pruvost J, Marec H. 2015.** Investigation of light/dark cycles effects on the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in conditions representative of photobioreactor cultivation. *Algal Research* 8: 192-204.
- Takahashi S, Murata N. 2008.** How do environmental stresses accelerate photoinhibition?. *Trends Plant Sci* 13(4): 178-182.
- Tandeau de Marsac N. 1977.** Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J Bacteriol* 130: 82-91.
- Tang G, Suter PM. 2011.** Vitamin A, nutrition, and health values of algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. *J Pharm Nutr Sci* 1(2): 111-118.
- Tanumihardjo SA. 2002.** Factors influencing the conversion of carotenoids to retinol: bioavailability to bioconversion to bioefficacy. *Int J Vitam Nutr Res* 72: 40-45.
- Teo CL, Atta M, Bukhari A, Taisir M, Yusuf AM, Idris A. 2014.** Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production *via* the use of different LED wavelengths. *Bioresour Technol* 162: 38-44.
- Teodoresco EC. 1905.** Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacée-Polyblepharidée. *Beih z Bot Centralbl Bd* 18: 215-232.
- Terry KL. 1986.** Photosynthesis in modulated light: Quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnol Bioeng* 28(7): 988–995.
- Ting CS, Owens TG. 1994.** The effects of excess irradiance on photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* 106(2): 763-770.

- Torzillo G, Goksan T, Faraloni C, Kopecky J, Masojídek J. 2003.** Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* during the shift from the green to red stage. *J Appl Phycol* 15(2-3): 127-136.
- Trebst A. 1995.** Dynamics in photosystem II structure and functions. *In*: Schulze ED, Caldwell MM (Eds), *Ecophysiology of photosynthesis*. Springer Verlag.
- Tredici MR, Materassi R. 1992.** From open pond to vertical alveolar panels: the italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *J Appl Phycol* 4: 221-231.
- Tredici MR. 2004.** Mass production of microalgae: Photobioreactors. *In*: Richmond A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Ltd: 566.
- Tyystjärvi E. 2008.** Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chemistry Reviews* 252(3): 361-376.
- Valle KC, Nymark M, Aamot I, Hancke K, Winge P, Andresen K, Bones AM. 2014.** System responses to equal doses of Photosynthetically Usable Radiation of blue, green, and red light in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PloS one* 9(12), e114211.
- Van Niel, CB, Muller FM. 1931.** On the purple bacteria and their significance to the study of photosynthesis. *Recueil des Travaux Botaniques Neerlandais* (JH de Busry, Amsterdam) 28: 245–274.
- Vasilikiotis C, Melis A. 1994.** Photosystem II reaction center damage and repair cycle: chloroplast acclimation strategy to irradiance stress. *Proc Natl Acad Sci* 91(15): 7222-7226.
- Vechtel B, Pistorious EK, Ruppel HG. 1992.** Occurrence of secondary carotenoids in PSI complexes isolated from *Eremosphaera viridis* De Bary (Chlorophyceae). *Z. Naturforsch* 47e: 51-56.
- Vejrazka C, Janssen M, Streefland M, Wijffels RH. 2011.** Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in flashing light. *Biotechnol Bioeng* 108(12): 2905–2913.
- Vejrazka C, Janssen M, Streefland M, Wijffels RH. 2012.** Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in attenuated, flashing light. *Biotechnol Bioeng* 109(10): 2567-2574.
- Velicer GJ, Lenski RE. 1999.** Evolutionary trade-offs under conditions of resource abundance and scarcity: experiments with bacteria. *Ecology* 80(4): 1168-1179.
- Vesk M, Jeffrey SW. 1977.** Effect of blue-green light on photosynthetic pigments and chloroplast structure in unicellular marine algae from six classes. *J Phycol* 13: 280–288.
- Vierling E, Alberte RS. 1980.** Functional organization and plasticity of the photosynthetic unit of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Physiol Plant* 50: 93–98.
- Vítová M, Bišová K, Kawano S, Zachleder V. 2015.** Accumulation of energy reserves in algae: From cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnol Adv* 33(6): 1204-1218.

- Vonshak A. 1997.** *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor and Francis. 233p.
- Vonshak A, Torzillo G. 2004.** Environmental stress physiology. In: Richmond A, editor. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. United Kingdom: Blackwell Science. p 57-82
- Vörös L, Callieri C, Balogh KV, Bertoni R. 1998.** Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Hydrobiologia* 370: 117-125.
- Vorst P, Baard R, Mur L, Korthals H, Vandenende H. 1994.** Effect of growth arrest on carotene accumulation and photosynthesis in *Dunaliella*. *Microbiology UK* 140: 1411–1417.
- Voskresenskaya NP. 1972.** Blue light and carbon metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* 23(1): 219-234.
- Wallen DG, Geen GH. 1971.** Light quality in relation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae. *Mar Biol* 10 (1): 34-43.
- Wang CY, Fu CC, Liu YC. 2007.** Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochem Eng J* 37(1): 21-25.
- Warburg O. 1919.** Über die Geschwindigkeit der Kette der Kette; ensarezusammensetzung in Lebendenzellen. *Biochemischezeitschrift* 100: 230–270.
- Warburg O. 1920.** *Biochem Z*: 103-188.
- Waterbury JB, Watson SW, Valois FW, Franks DG. 1986.** Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *Can Bull Fish Aquat Sci* 214(71): 120.
- Weller S, Franck J. 1941.** Photosynthesis in flashing light. *Jour Phys Chem* 45: 1359-1373.
- Whitmarsh J. 1998.** Electron transport and energy transduction. In: *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise*. Editors, A. S. Raghavendra, p. 87-107. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wijffels RH, Barbosa MJ. 2010.** An outlook on microalgal biofuels. *Science* 329(5993): 796–799.
- Wilhelm C, Krämer P, Wild A. 1985.** Effect of different light qualities on the ultrastructure, thylakoid membrane composition and assimilation metabolism of *Chlorella fusca*. *Physiologia Plantarum* 64(3): 359-364.
- Wilhelm C, Jungandreas A, Jakob T, Goss R. 2014.** Light acclimation in diatoms: From phenomenology to mechanisms. *Marine genomics* 16: 5-15.
- Williams PJLB, Laurens LML. 2010.** Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy Environ Sci* 3(5): 554.
- Woese CR. 1977.** Endosymbionts and mitochondrial origins. *J Mol Evol* 10(2): 93–96.
- Wood AM. 1985.** Adaptation of photosynthetic apparatus of marine ultraphytoplankton to natural light fields. *Nature* 316: 253-255.

- Wood AM, Phinney DA, Yentsch CS. 1998.** Water column transparency and the distribution of spectrally distinct forms of phycoerythrin-containing organisms. *Mar Ecol Prog Ser* 162: 25-31.
- Wu X, Merchuk JC. 2001.** A model integrating fluid dynamics in photosynthesis and photoinhibition processes. *Chem Eng Sci* 56(11): 3527-3538.
- Wu H, Gao K, Villafañe VE, Watanabe T, Helbling EW. 2005.** Effects of solar UV radiation on morphology and photosynthesis of filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Appl Environ Microbiol* 71(9): 5004-5013.
- Wynne D, Rhee GY. 1986.** Effects of light intensity and quality on the relative N and P requirements (the optimum N:P ratio) of marine algae. *J Plankton Res* 8: 91–103.
- Yamamoto HY. 1979.** Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure Appl Chem* 51(3): 639-648.
- Yamamoto HY, Bassi R. 1996.** Carotenoids: localization and function. *In: Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* Springer Netherlands, pp. 539-563.
- Yentsch CS. 1974.** Some aspects of the environmental physiology of marine phytoplankton: A second look. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 12: 41-75.
- Young EB, Beardall J. 2003.** Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *J Phycol* 39(5): 897-905.
- Zachleder V, Kuptsova ES, Los DA, Cepák V, Kubín Š, Shapizugov JM, Semenenko VE. 1989.** Division of chloroplast nucleoids and replication of chloroplast DNA during the cell cycle of *Dunaliella salina* grown under blue and red light. *Protoplasma* 150(2-3): 160-167.
- Zarmi Y, Bel G, Aflalo C. 2013.** Theoretical analysis of culture growth in flat-plate bioreactors: the essential role of timescales. *In: Handbook of microalgal culture* 2: 205-224.
- Zavafer A, Chow WS, Cheah MH. 2015.** The action spectrum of Photosystem II photoinactivation in visible light. *J Photochem Photobiol B: Biology* 152: 247-260.
- Zhang QH, Wu X, Xue SZ, Wang ZH, Yan CH, Cong W. 2013.** Hydrodynamic characteristics and microalgae cultivation in a novel flat-plate photobioreactor. *Biotechnol Prog* 29(1): 127-134.
- Zittelli GC, Rodolfi L, Biondi N, Tredici MR. 2006.** Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 261 (3): 932-943.

ANNEXES

Annexe 1 : Effets de la lumière colorée (revue bibliographique)	<i>ii</i>
Annexe 2 : Milieux de culture	<i>xvi</i>
Annexe 3 : Choix du type d'éclairage	<i>xvii</i>
Annexe 4 : Compléments d'information (chapitre IV)	<i>xix</i>
Annexe 5 : Courbes photosynthèse-lumière (T-Iso 2X)	<i>xxv</i>
Annexe 6 : Poster (Conférence ' <i>Aquatic Sciences Meeting</i> ', 2015)	<i>xxvi</i>
Annexe 7 : Article (Conférence IFAC, 2014)	<i>xxviii</i>

- Annexe 1 -

Revue bibliographique sur les effets de la lumière colorée

1. Introduction

This section presents a literature review on the influence of spectral light on the growth and physiology of phytoplankton species. Table A1-I provides an overview of the different studies reported here.

2. Known response to a colored light field

2.1. *Spirulina platensis*

Cyanobacteria were investigated for their pigment synthesis, as their natural richness in accessory pigments is a potential asset. *Spirulina platensis* grows very well under red light, whereas harvesting blue photons proves much more difficult (Wang *et al.*, 2007). Besides, phycobilins, typical of cyanobacteria, confer absorption properties in the green part of the spectrum, resulting in fair to good growth efficiency (Wang *et al.*, 2007; Ravelonandro *et al.*, 2008). Such property is noteworthy as it might facilitate the maintenance of co-cultures with green microalgae. Regarding pigment synthesis efficiency, Olaizola & Duerr (1990) observed highest carotenoid production under white light, while strong intensities in red and blue lights stimulate β -carotene but show lower productions of myxoxanthophylls. These results oppose to the more recent observations of Wang *et al.* (2007), who obtained highest growth rates for red light and much higher irradiances. Overall, the increase in carotenoids at higher irradiances corresponds to a photoprotective mechanism. Olaizola & Duerr (1990) discussed the possibility to trigger carotenogenesis as a short term response of the organism exposed to lights with specific spectral compositions. But longer-term studies are yet to be performed to analyze how the cell composition in chlorophyll and carotenoids may evolve under a modified light spectrum.

2.2 – *Gloeotheca membranacea*

G. membranacea grown under purple, green, orange and red light and an intensity of $150 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ shows highest growth rate and biomass accumulation under purple light. Red light only promoted lower biomass accumulation (Mohsenpour *et al.*, 2012). Strangely, highest chlorophyll a production is reported under green light.

2.3 – *Tetraselmis* sp.

Tetraselmis spp are known for their high lipid content. At rather low light intensities ($100 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), blue light appears to drive highest growth rates and lipid contents

than red or white light (Teo *et al.*, 2014). This result opposes to a parallel study conducted on *Tetraselmis suecica* exposed to red, blue, green and white light, which showed highest photosynthetic efficiency and growth rate under red or white light, while productivity is half under blue or green light (Abiusi *et al.*, 2013). The latter study further reports that changes in the light spectrum affected the cell cycle, and therefore the cell size. But while the chlorophyll content varied with the spectrum (decreasing under red light and increasing under blue light), the carotenoid content remained unchanged (Abiusi *et al.*, 2013).

2.4 – *Nannochloropsis* sp.

Nannochloropsis spp are also known for their high lipid content. The studies conducted by Teo and colleagues (2014) as well as Das and colleagues (2011) also concluded to a higher growth and lipid productivity under blue light. But accessory pigments in *Nannochloropsis* allowed for a fair growth under green light, which drove the highest Fatty Acid Methyl Ester (FAME) content per dry weight (20.4 %).

2.5 – *Chlorella* spp.

The literature reports a variety of studies performed on *Chlorella* spp. *Chlorella* would show highest growth rate under orange (Mohsenpour *et al.*, 2012) or blue (Atta *et al.*, 2013) light. Biomass productivity can be highest under red (Shu *et al.*, 2012) or purple (Mohsenpour *et al.*, 2012) light. Highest chlorophyll production were observed under red light (Mohsenpour *et al.*, 2012) while highest lipid production rates occurred under blue light (Shu *et al.*, 2012). Investigations on the effect of the light spectrum on growth and pigments synthesis therefore suggest that longer wavelengths tend to support higher growth rates and pigments synthesis while shorter wavelengths would promote lipid productivity.

2.6 – *Isochrysis* sp.

At equivalent incident irradiances of 300 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, *Isochrysis* shows higher lipid production and chlorophyll *a* content under blue light compared to white (Marchetti *et al.*, 2013).

2.7 – *Porphyra leucosticta*

The red alga *Porphyra* shows lowest photosynthetic efficiencies under blue light compared to red or white light (Aguilera *et al.*, 2000; Korbee *et al.*, 2005). But when exposed to blue, red, yellow and green LED light, compounds derived from the nitrogen cycle, phycoerythrin and proteins show highest rates of accumulation under blue light (Korbee *et al.*, 2005). Such accumulation may not be the fact of an unbalanced carbon accumulation in

regard to nitrogen acquisition, but instead to blue photoreceptors on cells (Korbee *et al.*, 2005).

2.8 – *Pseudo-nitzschia multistriata*

In an experimental approach using constant, photosynthetic usable radiation (PUR), Brunet *et al.* (2014) demonstrated how the spectrum composition is an essential trigger for acclimation processes in diatoms. They showed in particular that fast photoprotection processes like the xanthophyll cycle are initiated by exposition to red light and activated by strong blue photon densities. The authors discuss the agreement of their results with the optical properties of natural water columns, in which red wavelengths are only available at the very surface.

2.9 – *Dunaliella salina*

UV filters also decrease photoinhibition in *Dunaliella salina* (Herrmann *et al.*, 2014).

2.10 – *Haematococcus pluvialis*

According to Jeon *et al.* (2005), *Haematococcus pluvialis* is very tolerant to high irradiances and does not yet photoinhibits under $2000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Within this range of irradiances, red light sustained highest photosynthetic efficiency than green or even white light.

3. Conclusion

Quite a few studies cited above were performed at extremely low irradiances ($2\text{--}10 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), possibly to recreate irradiance conditions experiences in dense cultures. However, only a handful of them actually tested high irradiances representative of surface conditions. Most often, the incident irradiances applied vary between experimental analyses, which introduce a bias when comparing experiments on the influence of the light spectrum: the effect of light intensity superimposes to that of the light color. Seyfabadi and colleagues (2011) provided evidence for a decrease in chlorophyll *a* cell content and an increase in β -carotene cell content in cultures of *Chlorella* exposed to increasing irradiances. As a consequence, while the effect of light color on the synthesis of accessory pigments such as carotenoids is already being quite investigated, conclusions have to be taken with care as these studies may be biased by the low irradiance conditions.

The tight entanglement between light quality and light intensity therefore makes it difficult to draw general tendencies as for the dynamics of pigment contents in cells. Overall, the influence of colored light on growth or metabolites synthesis still appears poorly understood.

A second issue is that comparisons are made difficult, if not hazardous, by the fact that irradiance conditions are not always reported as a flux of photons. With the heterogeneity in irradiance units (e.g. lux vs $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), also come differences in the amount of energy made available to cells. As shorter wavelengths are more energetic than longer ones, photosynthesis is ought to saturate at lower irradiances under blue light compared to red light. A possible consequence is that comparison of yields observed under red or blue light will show different results depending on the light intensity.

The present literature review did not intent to be exhaustive; instead, the sample of experimental investigations presented here was meant to provide an overall idea of the kind of studies already performed and of their results. This review reveals that it is critical to consider photosynthetically active irradiance units (PAR) at least, and further, strongly points to take in consideration the radiations that are actually useful for photosynthesis (PUR, as discussed by Morel, 1978), which requires a measure of the absorption spectrum of the culture.

Table A1-I : Synthesis of experimental studies on the influence of colored light on growth and metabolites production.

Species	Light *	L:D cycle	Intensity ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Culture mode	Target	Highest growth rate obtained under:	Highest production rates or contents under:	Ref.
<i>Spirulina platensis</i>	OSRAM LEDs: white (380-760), blue (460-475), red (620-645), green (515-54) & yellow (587-595)	Cont.	0–3000	Batch	Growth	Red, 3000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.	–	[1]
<i>Spirulina platensis</i>	White fluorescent tubes; Halogen lamps; Red & blue, 40 W bulbs	Cont.	66–1328	Batch	Carotenoids	White, 465 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ or red, 133 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.	White, 432 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.	[2]
<i>Spirulina platensis</i>	Fluorescent tubes + filters: blue, red, green & white	Cont.	400–1200 lux **	Batch	Growth	Green, 1200 lux	Green, 1200 lux	[3]
<i>Gloeotheca membranacea</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>	Xenon lamps + acrylic filters: purple, green, red, orange	12:12	250 150	Batch	Pigments (Chl), growth	Orange (<i>C.v.</i>) Purple (<i>G.m.</i>)	Highest biomass accumulation under purple light. Highest Chla production under red (<i>C.v.</i>) or green (<i>G.m.</i>)	[4]
<i>Synechococcus</i> spp. <i>Tolypothrix</i>	Fluorescent tubes + filters: green, red	Cont.	40	Continuous	Pigments	-	Pigment plasticity differs among strains	[5]
<i>Synechocystis</i> sp.	White halogen + filters and red (635) & far red (726) LEDs	Cont.	50	Batch	FAME ⁺ , ARN, RT-PCR	-	Red light affects gene expression induced by low temperatures. $\omega 3$ accumulation affected by red light	[6]
<i>Navicula</i> sp.	LEDs : blue (460), green (520), yellow (600), red (640)	12:12	0.14 to 13.5	Fed-batch	Settlement, cell division	Blue light	Settlement stimulation under blue light & high light intensity	[7]
<i>Haslea ostrearia</i>	Projectors with halogen bulbs with filters : blue, green, yellow, red, far-red	14:10	20 (LL) 100 (HL)	Batch	Chromatic acclimation Growth, pigment content, photosynthesis efficiency	Higher at high irradiance Blue light at low irradiance	Cell pigment contents and pigment ratios (in function of Chl <i>a</i>) lower in yellow, red and far red light (low irradiance) PSII quantum efficiency almost constant for white, blue and green light	[8]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Blue, green, red, white LEDs	Variable	230 (red) 100 (green)	Continuous	Chromatic acclimation	-	Gene expression mainly light quality-dependent Gene encoding proteins important for photoprotection	[9]

			50 (blue) 100 (white) Constant PUR	culture	Transcriptional, metabolic & photo- physiological responses		and PSII repair : dependent on a blue light receptor- mediated signal Declining in photosynthetic efficiency in red light	
<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>	Blue, red and green LEDs	12:12	6.1 & 11 mol m ⁻² d ⁻¹ Constant PUR	Batch	Abundance, pigments, fluorescence, POC, PON	-	Fast photoprotection processes (e.g. NPQ) require red light to be initiated and high blue intensities to be activated.	[10]
<i>Chaetoceros protuberans</i>	White and blue filters	12:12	PUR _w =PUR _b = 56, 125 and 13 μ m ⁻² .s ⁻¹ Constant PUR	Semi- continuo us culture	Growth, carbohydrate & protein contents	No difference	No effect of the light spectrum	[11]
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Blue LEDs (450-500)	LL flashed, continuo us	2.8-12	Batch	Carotenoids, growth	-	Highest astaxanthin content under flashed blue light	[12]
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Blue (470), red (625), green (525), blue-purple (410), purple (380) LEDs + white sodium light	Cont.	2.8	Batch	Carotenoids	-	Red LED lead to astaxanthin accumulation	[13]
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Incandescent + red, yellow, green & blue filters	Cont.	0-2000	Batch	Photosynthetic activity	Red	No observed inhibition	[14]
<i>Tetraselmis</i> sp., <i>Nannochloropsis</i> sp.	Blue (457), red (660), red+blue LEDs & white (fluorescent tube)	12:12	100	Batch	Growth, lipids	Blue	Blue	[15]
<i>Nannochloropsis</i> sp.	96 LEDs panels: white, blue (470), red (680) & green (550)	Cont.	400– 1200 lux**	Batch (photo- trophy mixotro- phy)	Lipids	Blue > white > green > red	Highest FAME ⁺ production under green light (in % dry weight), and blue light (for volumetric)	[16]
<i>Chlorella</i> sp. + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Blue and red LEDs	12:12	1000 lux	Batch	Lipids	Red>blue	Blue>red	[17]

<i>Chlorella vulgaris</i>	Blue (460), green (525), yellow (585), red (620), purple (460 ; 660), white (430-730) with LEDs	16:8	100	Batch	Growth, lipids		Highest biomass accumulation under yellow, red and white light Highest PFA ⁺⁺ concentration under green light	[18]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Blue LED, white light	12:12, 16:8	100–300	Batch	Lipids	Blue, I=200, 12:12	Blue, I=200, 12:12	[19]
<i>Chlorella vulgaris</i>	White fluorescent	8:16, 12:12, 16:8	37.5, 62.5, 100	Batch	Abundance, pigments, lipids	White, 100, 16:8	Chl <i>a</i> decreased with irradiance increase. β -carotene increased with irradiance.	[20]
<i>Chlorella fusca</i>	White (Osram tubes), blue (Philips), and red light (white light lamp with a red filter)	Cont.	Blue (9.9 W.m ⁻²), White (7.5 W.m ⁻²) and red (6.7 W.m ⁻²) Constant PUR	Homoco ntinuous culture	Ultrastructure, Thylakoïd membrane composition, Assimilation metabolism	No difference	Enlarged cells, thinner cell walls and lower starch content in blue light Higher photosynthetic rates per chlorophyll molecule in blue light Stimulation of the content of soluble protein and soluble carbohydrates in blue light Dry weight productivity enhanced under blue light PSII:PSI ratio lower in blue light Blue light cells : twice the concentration of cyt b ₆ /f	[21]
<i>Tetraselmis suecica</i>	Red, white, green & blue LEDs	Cont.	160	Batch	Abundance, pigments, lipids	Red	Productivity equivalent under white & red. Productivity decreases by 50% under blue or green; photosynthetic efficiency decreases by a third. Smaller cells under red light	[22]
<i>Dunaliella salina</i>	Filtered solar light : 295, 320, 335 and 400	Cont.	-	Batch	Fluorescence (PAM)	Highest efficiency under blue	Photoinhibition decreases under UV filters	[23]
<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Thalassiosira rotula</i>	White light, blue & red filters	12:12,	12, 40, 120, 200 Constant PUR	Batch	Abundance Chl <i>a</i> , CHN, proteins, lipids	Cell division : not affected by light quality	Chl <i>a</i> greater in blue and white Rate of protein synthesis, carbon uptake & respiration greater in blue and red	[24]
<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Cyclotella nana</i>	Blue, white and green fluorescent lamps	16:8	7.9 to 8.10 ³ ergs.cm ⁻² .sec ⁻¹	Batch	Growth, concentration of proteins, RNA, DNA and photosynthetic pigments	Blue	Chlorophyll, protein, DNA and RNA concentrations higher in blue light and lower in green light than in white light Highest total carotenoid concentrations in green light Highest total pigment concentrations in blue light	[25]

ANNEXE 1. Revue bibliographique

<i>Tisochrysis lutea</i>	Blue, green, red and white fluorescent lamps	Cont.	60	Batch	Growth, biochemical composition, lipids	White and blue	Higher values of the Chla content with blue and red light Greater protein content with blue light & green light in the stationary phase Higher level of carbohydrates with white light Similar lipid percentages in the exponential phase	[26]
<i>Isochrysis sp. (T-Iso)</i>	Six dimmable fluorescent tubes (blue & white)	D= 0.2 & 0.7 day ⁻¹	300	Continuous culture	Biochemical composition, photosynthetic rate	-	Lower carbohydrate content and carbon quota but higher Chla content & photosynthetic activity under blue light. Higher protein quota under blue light at D=0.7 d ⁻¹ . Productivity per cell unaffected by the color.	[27]
<i>Porphyra leucosticta</i>	White (fluorescent lamps), blue, red, green (fluorescent lamps with plexiglas filters) & yellow (low pressure sodium lamp)	12:12	45	Batch	Photosynthesis, Pigments & UV absorbing amino-acids	Red & white	Highest accumulation of nitrogen metabolism derived compounds i.e. phycoerythrin, UV-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) and proteins but lowest photosynthetic capacity in blue light.	[28]
<i>Porphyra leucosticta</i>	White, blue, red fluorescent	12:12	35	Batch	DOC, POC, O ₂ evolution	-	More photons absorbed under blue or white. But lower photosynthetic rate under blue	[29]

* numbers in parenthesis indicate the wavelength in nm. ** = 7.6–22.8 μmol.m⁻².s⁻¹.

Cont. = continuous light. LL = Low light. HL = High light.

FAME⁺ = Fatty Acid Methyl Ester. PFA⁺⁺ = Polyunsaturated Fatty Acids. DOC = Dissolved Organic Carbon. POC = Particulate Organic Carbon. PON = Particulate Organic Nitrogen.

Tableau A1-II : Principales études expérimentales menées sur l'influence de la lumière colorée sur la croissance et la production de métabolites (en gras et souligné : études réalisées à PUR constant ou prise en compte du PUR). Les cyanobactéries, largement étudiées pour leur capacité d'adaptation chromatique, ne sont pas présentées ici.

Embranchement/ Classe	Références
Chlorophyta	Wallen & Geen, 1971 ; <u>Wilhelm <i>et al.</i>, 1985</u> ; Humbeck <i>et al.</i> , 1988 ; <u>Rivkin, 1989</u> ; Zachleder <i>et al.</i> , 1989 ; Herrmann <i>et al.</i> , 1997 ; Katsuda <i>et al.</i> , 2004 ; Jeon <i>et al.</i> , 2005 ; Seyfabadi <i>et al.</i> , 2011 ; Shu <i>et al.</i> , 2012 ; Mohsenpour <i>et al.</i> , 2012 ; Abiusi <i>et al.</i> , 2013 ; Atta <i>et al.</i> , 2013 ; Teo <i>et al.</i> , 2014 ; Hultberg <i>et al.</i> , 2014.
Bacillariophyceae (diatomées)	French, 1967 ; Jupin & Giraud, 1971 ; Sugahara <i>et al.</i> , 1971 ; Wallen & Geen, 1971 ; Caron <i>et al.</i> , 1983 ; Holdsworth, 1985 ; <u>Gostan <i>et al.</i>, 1986</u> ; <u>Morel <i>et al.</i>, 1987</u> ; <u>Rivkin, 1989</u> ; <u>Nielsen & Sakshaug, 1993</u> ; Sánchez-Saavedra & Voltolina, 1996 ; Mercado <i>et al.</i> , 2004 ; Mouget <i>et al.</i> , 2004 ; Liang <i>et al.</i> , 2006 ; <u>Wu <i>et al.</i>, 2011</u> ; Cao <i>et al.</i> , 2012 ; <u>Schellenberger <i>et al.</i>, 2013</u> ; <u>Brunet <i>et al.</i>, 2014</u> ; <u>Jungandreas <i>et al.</i>, 2014</u> ; <u>Valle <i>et al.</i>, 2014</u> .
Eustigmatophyceae	Das <i>et al.</i> , 2011 ; Teo <i>et al.</i> , 2014.
Rhodophyta	Algarra <i>et al.</i> , 1991 ; Figueroa <i>et al.</i> , 1995 ; Aguilera <i>et al.</i> , 2000 ; Granbom <i>et al.</i> , 2001 ; Korbee <i>et al.</i> , 2005 ; Barufi <i>et al.</i> , 2015.
Haptophyceae	Marchetti <i>et al.</i> , 2013 ; Sánchez-Saavedra <i>et al.</i> , 2015.
Dinophyceae	Faust <i>et al.</i> , 1982 ; Humphrey, 1983 ; Nelson & Prézélin, 1990 ; Kroon <i>et al.</i> , 1993 ; Schofield <i>et al.</i> , 1996.
Espèces multiples	Voskresenskaya, 1972 ; Vesik & Jeffrey, 1977 ; Wynne & Rhee, 1986 ; <u>Glover <i>et al.</i>, 1987</u> .

References

Table A1 and table A2:

- [1] **Wang CY, Fu CC, Liu YC. 2007.** Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochem Eng J* 37(1): 21-25.
- [2] **Olaizola M, Duerr EO. 1990.** Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *J Appl Phycol* 2(2): 97-104.
- [3] **Ravelonandro PH, Ratianarivo DH, Joannis-Cassan C, Isambert A, Raherimandimby M. 2008.** Influence of light quality and intensity in the cultivation of *Spirulina platensis* from Toliara (Madagascar) in a closed system. *J Chem Technol Biotechnol* 83 (6): 842–848.
- [4] **Mohsenpour SF, Richards B, Willoughby N. 2012.** Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresour Technol* 125: 75–81.
- [5] **Stomp M, Huisman J, De Jongh F, Veraart A. J, Gerla D, Rijkeboer M, Stal LJ. 2004.** Adaptive divergence in pigment composition promotes phytoplankton biodiversity. *Nature* 432(7013): 104-107.
- [6] **Mironov KS, Sidorov RA, Kreslavski VD, Bedbenov VS, Tsydendambaev VD, Los DA. 2014.** Cold-induced gene expression and ω 3 fatty acid unsaturation is controlled by red light in *Synechocystis*. *J Photochem Photobiol* 137: 84-88.
- [7] **Cao S, Wang J, Chen D. 2013.** Settlement and cell division of diatom *Navicula* can be influenced by light of various qualities and intensities. *J Basic Microbiol* 53(11): 884-894.
- [8] **Mouget JL, Rosa P, Tremblin G. 2004.** Acclimation of *Haslea ostrearia* to light of different spectral qualities - confirmation of 'chromatic adaptation' in diatoms. *J Photochem Photobiol B* 75: 1–11.
- [9] **Valle KC, Nymark M, Aamot I, Hancke K, Winge P, Andresen K, Bones AM. 2014.** System responses to equal doses of Photosynthetically Usable Radiation of blue, green, and red light in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PloS one* 9(12), e114211.
- [10] **Brunet C, Chandrasekaran R, Barra L, Giovagnetti V, Corato F, Ruban AV. 2014.** Spectral radiation dependent photoprotective mechanism in the diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. *PloS one*, 9(1).
- [11] **Gostan J, Lechuga-Deveze C, Lazarra L. 1986.** Does blue light affect the growth of *Chaetoceros protuberans* Bacillariophyceae ?, *J Phycol* 22: 63–71.
- [12] **Katsuda T, Shimahara K, Shiraishi H, Yamagami K, Ranjbar R, Katoh S. 2006.** Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *J Biosci Bioeng* 102 (5): 442-446.
- [13] **Katsuda T, Lababpour A, Shimahara K, Katoh S. 2004.** Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme Microb Tech* 35 (5): 81-86.
- [14] **Jeon YC, Cho CW, Yun YS. 2005.** Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochem Eng* 27(2) : 127-131.

- [15] **Teo CL, Atta M, Bukhari A, Taisir M, Yusuf AM, Idris A. 2014.** Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production *via* the use of different LED wavelengths. *Bioresour Technol* 162: 38-44.
- [16] **Das P, Lei W, Aziz SS, Obbard JP. 2011.** Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresour Technol* 102(4): 3883-7.
- [17] **Shu CH, Tsai CH, Liao WH, Chen KY, Huang HC. 2012.** Effects of Light Quality on the accumulation of oil in a Mixed Culture of *Chlorella* sp. and *S. Cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol* 87: 601–607.
- [18] **Hultberg M, Jönsson HL, Bergstrand KJ, Carlsson AS. 2014.** Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol* 159: 465-467.
- [19] **Atta M, Ataullah Bukhari AI, Wahidin S. 2013.** Intensity of Blue LED Light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella Vulgaris*. *Bioresour Technol* 148: 373–378.
- [20] **Seyfabadi J, Ramezanzpour Z, Khoeyi ZA. 2011.** Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *J Appl Phycol* 23: 721-726.
- [21] **Wilhelm C, Krámer P, Wild A. 1985.** Effect of different light qualities on the ultrastructure, thylakoid membrane composition and assimilation metabolism of *Chlorella fusca*. *Physiol Plant* 64(3): 359-364.
- [22] **Abiusi F, Sampietro G, Marturano G, Biondi N, Rodolfi L, D'Ottavio M, Tredici MR. 2013.** Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. *Biotechnol Bioeng* 111(5): 956-964.
- [23] **Herrmann H, Häder DP, Ghatti F. 1997.** Inhibition of photosynthesis by solar radiation in *Dunaliella salina*: relative efficiencies of UV - B, UV - A and PAR. *Plant Cell Environ* 20(3): 359-365.
- [24] **Rivkin RB. 1989.** Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. I. Photosynthesis, chemical composition and growth. *Mar Ecol Prog Ser* 55(2): 291-304.
- [25] **Wallen DG, Geen GH. 1971.** Light quality and concentration of proteins, RNA, DNA and photosynthetic pigments in two species of marine plankton algae. *Mar Biol* 10: 44-51.
- [26] **Sánchez-Saavedra MDP, Maeda-Martínez AN, Acosta-Galindo S. 2015.** Effect of different light spectra on the growth and biochemical composition of *Tisochrysis lutea*. *J Appl Phycol*: 1-9.
- [27] **Marchetti J, Bougaran G, Jauffrais T, Lefebvre S, Rouxel C, Saint-Jean B, Cadoret JP. 2013.** Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). *J Appl Phycol* 25(1): 109-119.
- [28] **Korbee N, Figueroa FL, Aguilera J. 2005.** Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *J Photochem Photobiol B* 80(2): 71-78.

- [29] **Aguilera J, Francisco J, Gordillo L, Karsten U, Figueroa FL, Niell FX. 2000.** Light quality effect on photosynthesis and efficiency of carbon assimilation in the red alga *Porphyra leucosticta* J Plant Physiol 157(1): 86-92.

Table A2:

- Algarra P, De La Vina G, Niell FX. 1991.** Effects of light quality and irradiance level interactions on short-term pigment response of the red alga *Corallina elongata*. Mar Ecol Prog Ser 74: 27-32.
- Barufi BJ, Figueroa FL, Plastino EM. 2015.** Effects of light quality on reproduction, growth and pigment content of *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta: Gracilariales). Scientia Marina 79(1): 15-24.
- Caron L, Jupin H, Berkaloff C. 1983.** Effects of light quality on chlorophyll-forms Ca 684, Ca 690 and Ca 699 of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Photosynth Res 4(1): 21-33.
- Faust MA, Sager JC, Meeson BW. 1982.** Response of *Prorocentrum Mariae-Lebouriae* (Dinophyceae) to light of different spectral qualities and irradiances: growth and pigmentation. J Phycol 18(3): 349-356.
- Figueroa FL, Aguilera J, Niell FX. 1995.** Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). European J Phycol 30(1): 11-18.
- French CS. 1967.** Changes with age in the absorption spectrum of chlorophyll α in a diatom. Archiv für Mikrobiologie 59(1-3): 93-103.
- Glover HE, Keller MD, Spinrad RW. 1987.** The effects of light quality and intensity on photosynthesis and growth of marine eukaryotic and prokaryotic phytoplankton clones. J Exp Mar Biol Ecol 105(2): 137-159.
- Granbom M, Pedersen M, Kadel P, Lüning K. 2001.** Circadian rhythm of photosynthetic oxygen evolution in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta): dependence on light quantity and quality. J Phycol 37(6): 1020-1025.
- Holdsworth ES. 1985.** Effect of growth factors and light quality on the growth, pigmentation and photosynthesis of two diatoms, *Thalassiosira gravida* and *Phaeodactylum tricornutum*. Mar Biol 86(3): 253-262.
- Humbeck K, Hoffmann B, Senger H. 1988.** Influence of energy flux and quality of light on the molecular organization of the photosynthetic apparatus in *Scenedesmus*. Planta 173: 205–212.
- Humphrey GF. 1983.** The effect of the spectral composition of light on the growth, pigments, and photosynthetic rate of unicellular marine algae. J Exp Mar Biol Ecol 66(1), 49-67.
- Jungandreas A, Costa BS, Jakob T, Von Bergen M, Baumann S, Wilhelm C. 2014.** The acclimation of *Phaeodactylum tricornutum* to blue and red light does not influence the photosynthetic light reaction but strongly disturbs the carbon allocation pattern. PLoS ONE 9(8): e99727.

- Jupin H, Giraud G. 1971.** Modification of the absorption spectrum in the far red of a diatom cultured in red light. *Biochim Biophysica Acta* 226(1): 98-102.
- Kroon B, Prézelin BB, Schofield O. 1993.** Chromatic regulation of quantum yields for photosystem II charge separation, oxygen evolution, and carbon fixation in *Heterocapsa pygmaea* Pyrrophyta. *J Phycol* 29: 453–462.
- Mercado JM, Sanchez-Saavedra MD, Correa-Reyes G, Lubian L, Montero O. 2004.** Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquatic Botany* 78(3): 265-277.
- Morel A, Lazzara L, Gostan J. 1987.** Growth rate and quantum yield time response for a diatom to changing irradiances (energy and color) 1. *Limnol Oceanogr* 32(5): 1066-1084.
- Nelson NB, Prezelin BB. 1990.** Chromatic light effects and physiological modelling of absorption properties of *Heterocapsa pygmaea* (= *Glenodinium* sp.). *Mar Ecol Prog Ser* 63: 37-46.
- Nielsen MV, Sakshaug E. 1993.** Photobiological studies of *Skeletonema Costatum* adapted to spectrally different light regimes. *Limnol Oceanogr* 38: 1576–1581.
- Sánchez-Saavedra MDP, Voltolina D. 1996.** Effect of blue-green light on growth rate and chemical composition of three diatoms. *J Appl Phycol* 8(2): 131-137.
- Schellenberger Costa B, Jungandreas A, Jakob T, Weisheit W, Mittag M. 2013.** Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Exp Bot* 64: 483–493.
- Schofield O, Prézelin B, Johnsen G. 1996.** Wavelength dependency of the maximum quantum yield of carbon fixation for two red tide dinoflagellates, *Heterocapsa pygmaea* and *Prorocentrum minimum* Pyrrophyta: implications for measuring photosynthetic rates. *J Phycol* 32: 574–583.
- Vesk M, Jeffrey SW. 1977.** Effect of blue-green light on photosynthetic pigments and chloroplast structure in unicellular marine algae from six classes. *J Phycol* 13: 280–288.
- Voskresenskaya NP. 1972.** Blue light and carbon metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* 23(1): 219-234.
- Wu HY, Cockshutt AM, McCarthy A, Campbell DA. 2011.** Distinctive photosystem II photoinactivation and protein dynamics in marine diatoms. *Plant Physiol* 156: 2184–2195.
- Wynne D, Rhee GY. 1986.** Effects of light intensity and quality on the relative N and P requirements (the optimum N:P ratio) of marine algae. *J Plankton Res* 8: 91–103.
- Zachleder V, Kuptsova ES, Los DA, Cepák V, Kubín Š, Shapizugov JM, Semenenko VE. 1989.** Division of chloroplast nucleoids and replication of chloroplast DNA during the cell cycle of *Dunaliella salina* grown under blue and red light. *Protoplasma* 150(2-3): 160-167.

- Annexe 2 -

Préparation des milieux de culture pour la maintenance des souches

Milieu f/2 (Guillard & Ryther, 1962 ; Guillard, 1975)

L'eau de mer est prélevée au point B, situé à la sortie de la rade de Villefranche-sur-Mer, à 1 mètre de profondeur, et filtrée sur 0,1 μm (préfiltration sur 1 μm) à l'aide d'une cartouche Millipore. Après autoclavage (120°C, 30 minutes), les solutions de NaNO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, métaux traces et vitamines sont ajoutées de manière axénique (filtration sur filtre 0,2 μm , sous une hotte à flux laminaire).

Tableau A2-I : Composition du milieu f/2.

Composé	Quantité pour 1 L de milieu	Solution stock (g.L ⁻¹ d'eau milliQ)	Concentration finale dans le milieu f/2 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
NaNO_3	1 mL	75	882,35
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 mL	5	36,23
Solution de métaux traces. 950 mL d'eau milliQ avec :	1 mL		
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3,15 g)			11,7
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,36 g)			11,7
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1 mL)		180	0,91
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mL)		22	0,08
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mL)		10	0,04
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1 mL)		9,8	0,04
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 mL)		6,3	0,03
Solution de vitamines :	0,5 mL		
Thiamine			
Biotine			
Vitamine B12 (Cyanocobalamine)			

- Annexe 3 -

Choix du type d'éclairage

Une expérience préliminaire a été réalisée sur *Dunaliella salina* afin de déterminer les types de LED les plus favorables à sa croissance (Chapitre II).

Dunaliella salina a été cultivée dans du milieu f/2, en fed-batch, au sein de flasques de polycarbonate de 200 mL, disposées dans des compartiments clos. Chaque flasque a été éclairée à l'aide d'une platine de LED blanche (Fig. A3-1 et Fig. A3-2). Les cultures ont ainsi été exposées à une lumière continue blanche à une intensité (PAR) constante de $300 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cette expérience a été menée en triplicats durant 20 jours. Après inoculation, l'abondance cellulaire a été mesurée quotidiennement (HIAC/ROYCO 9700 Pacific Scientific Instruments).

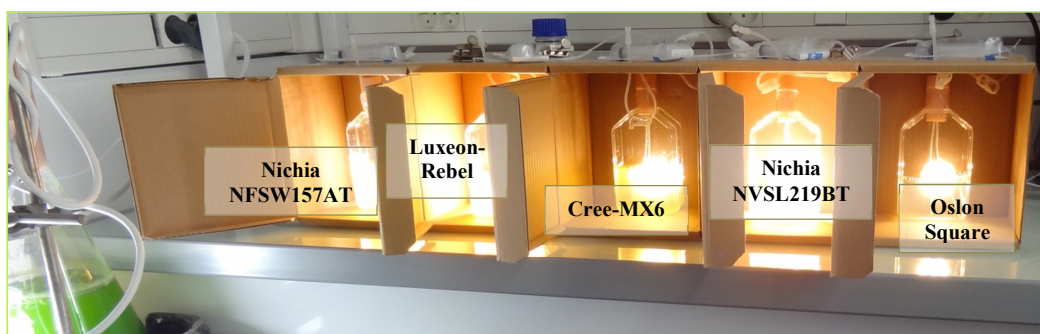


Figure A3-1 : Dispositif expérimental (vue de face). Les LED sont connectées à un microcontrôleur (Arduino Mega 2560) permettant de contrôler avec précision le flux de photons.

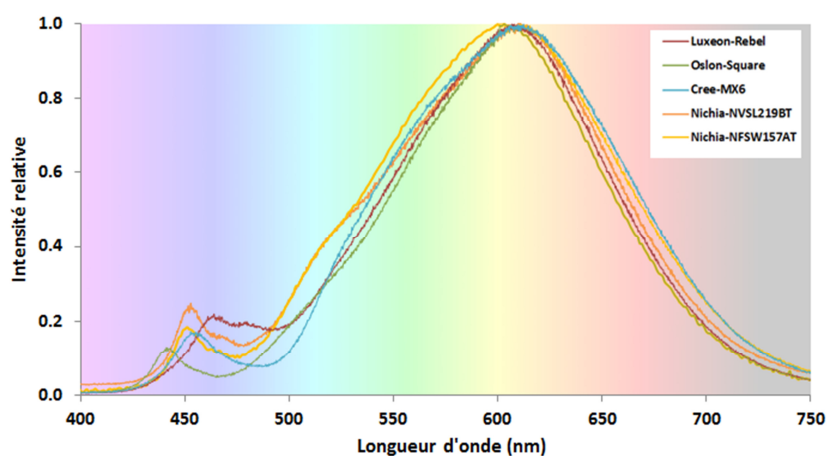


Figure A3-2 : Spectres d'émission des différentes LED blanches testées.

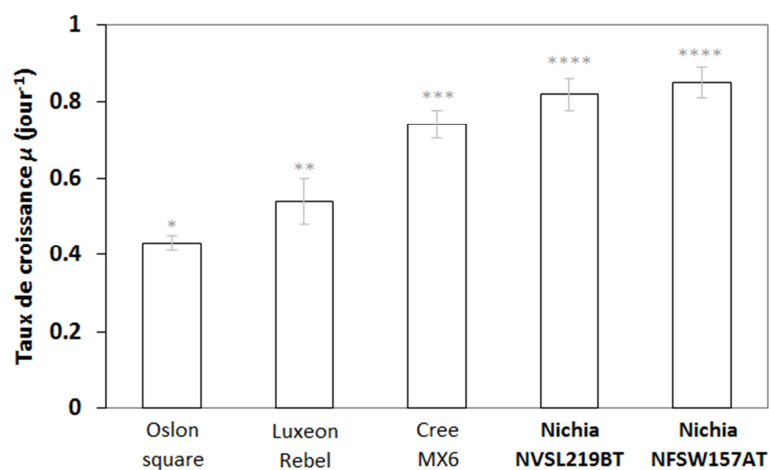


Figure 3A-3 : Taux de croissance de *Dunaliella salina* (jour⁻¹) en fonction du type de LED blanche utilisé.

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes entre les triplicats ($\pm$ SD, n=30). Les astérisques (*, **, ***, ****) indiquent une différence significative entre les moyennes (ANOVA, test de Tukey, $P < 0,05$). Les deux modules de LED utilisés au cours de cette étude sont indiqués en gras.

- Annexe 4 -

Compléments d'information (Chapitre IV)

A. Detailed materials and methods

Cell population, cell size. After inoculation, the changes in population density and mean diameter were first monitored daily (twice a day), in triplicates, using a Coulter Counter Beckman (Multisizer 3) with a 50 μm aperture tube. The cell suspension was diluted with filtered (0,2 μm) seawater (38 g.L^{-1}), to obtain adequate cell concentration. For each experimental condition, the specific growth rate (μ , day^{-1}) was estimated, during the exponential phase, from cell counts (X cells mL^{-1}) taken at 24 h intervals, according to the following relation:

$$\mu = \frac{\ln(X_{t_2}) - \ln(X_{t_1})}{t_2 - t_1}$$

where X_t is the cell density at time t ; t_1 and t_2 are two consecutive days.

Pigment extraction and analysis. Pigments were extracted from algae collected after one day cultivation. Samples of 3 mL cell suspension were daily taken from the reactors and transferred to 10 mL tubes wrapped with aluminium paper. For the extraction, 6 mL of 90% acetone were added in each tube, immediately stored during 1 hour at -20°C . Cells were precipitated by centrifugation at 2000 rpm for 5 minutes. Absorbance was measured in duplicate(s) at 470 nm, 644.80 and 661.60 nm (Lichtenthaler, 1987), with a UV/Vis spectrophotometer (Perkin Elmer, Lambda 2). Concentrations of chlorophyll *a* (C_a), chlorophyll *b* (C_b) and of total carotenoids (C_{x+c}) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) were calculated from the equations according to Lichtenthaler (1987).

Elemental stoichiometry. The particulate organic carbon (POC) and nitrogen (PON) in the cultures were determined once a day after 4 days cultivation. Samples (6,8 mL) were first filtered onto pre-combusted (4h at 450°C) GF/C filters (Whatman) and then dried at 60°C before analysis with a CHN analyser (2400 Series II CHNS/O - Pekin Elmer). Nitrogen (pmol-N.cell^{-1}) and carbon (pmol-C.cell^{-1}) cells contents were estimated using the cell abundance measured at the time of sampling.

We used a 2π light sensor (Biospherical Instruments QSL-100) placed in a photobioreactor filled with medium to estimate the maximum irradiance in the culture system. After correcting this signal relative to algal biomass, we consider this estimation as I_0 .

B. The multi-layer Saint-Venant approach

$$\begin{cases} \frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\partial \rho u}{\partial x} + \frac{\partial \rho w}{\partial z} = 0 \\ \frac{\partial \rho u}{\partial t} + \frac{\partial \rho u^2}{\partial x} + \frac{\partial \rho u w}{\partial z} + \frac{\partial p}{\partial x} = \frac{\partial \Sigma_{xx}}{\partial x} + \frac{\partial \Sigma_{xz}}{\partial z} + F_x(x, z, t) \\ \frac{\partial p}{\partial z} = -\rho g + \frac{\partial \Sigma_{zx}}{\partial x} + \frac{\partial \Sigma_{zz}}{\partial z} + F_z(x, z, t) \end{cases}$$

The Navier-Stokes equations consist in three set of equations. The first represents mass conservation. The second one is the momentum and the third is the energy balance. This system is solved according to the following boundary conditions: $t > t_0$, $x \in \mathbb{R}$, and $z_b(x) \leq z \leq \eta(x, t)$, with $\eta(x, t)$ the free surface elevation, $u = (u, w)^T$ the velocity vector, $p(x, z, t)$ the pressure, g the gravity and $\rho(T)$ the water density. The components of the wheel's force are described by $F_x(x, z, t)$ and $F_z(x, z, t)$. Hence the water height is $H = \eta - z_b$. The equations are integrated on the water height and only the average horizontal velocity is considered in each layer for the Saint-Venant multilayer approach.

C. Computation of average light and probability to be in a layer

The average light in the upper euphotic layer $\bar{I}_E$ can be computed as follows (I_h is the light at depth h):

$$\bar{I}_E = \int_{I_h}^{I_0} f_I(I) I dI = -I_0 \frac{1 - I_h/I_0}{\ln \eta} \quad (\text{A4-1})$$

Now, from Equation (IV-1) $\frac{1}{L} \ln \frac{I_L}{I_0} = \frac{1}{h} \ln \frac{I_h}{I_0}$. Since $p = h/L$, we have $\frac{I_h}{I_0} = \eta^p$

$$\bar{I}_E = I_0 \frac{1 - \eta^p}{\ln \eta} \quad (\text{A4-2})$$

and

$$\bar{I}_D = I_0 \frac{\eta^p - \eta}{\ln \eta} \quad (\text{A4-3})$$

Now, the average light value, when commuting between I_E and I_D can be computed as follows:

$$\langle I \rangle = p\bar{I}_E + (1 - p)\bar{I}_D = I_0[p(1 - \eta^p) + (1 - p)(\eta^p - \eta)] \quad (\text{A4-4})$$

As a consequence, the average light equation yields:

$$p(1 - \eta^p) + (1 - p)(\eta^p - \eta) = 1 - \eta \quad (\text{A4-5})$$

which reduces to:

$$\eta^p = \frac{1 - p\eta - p}{1 - 2p} \quad (\text{A4-6})$$

The right hand side is an increasing function of p , while the left hand side is a decreasing function. The trivial solution $p = 1$ is thus the only one.

D. Computation of the signal variance

The variance associated to an average light $\bar{I}$ is given by:

$$\mathcal{V} = \int_{I_L}^{I_0} f_I(I)(I - \bar{I})^2 dI = -\frac{1}{\ln(\eta)}[(I_0^2 - I_L^2)/2 - 2\bar{I}(I_0 - I_L) - \bar{I}^2 \ln(\eta)] \quad (\text{A4-7})$$

Thus,

$$\mathcal{V} = -\frac{1}{\ln(\eta)}[(I_0 - I_L)[(I_0 + I_L)/2 - 2\bar{I}] - \bar{I}^2 \ln(\eta)] \quad (\text{A4-8})$$

Using equation (IV-2) giving the expression of average light, we get:

$$\mathcal{V} = \bar{I} \left[I_0 \frac{1 + \eta}{2} - \bar{I} \right] \quad (\text{A4-9})$$

E. Constraining the light pattern variance

Assuming a light pattern commuting between I_E and I_D such that

- The average value is $\bar{I}$:

$$\bar{I} = pI_E + (1 - p)I_D \quad (\text{A4-10})$$

- The variance is V :

$$\bar{I} \left[I_0 \frac{1+\eta}{2} - \bar{I} \right] = p(\bar{I} - I_E)^2 + (1-p)(\bar{I} - I_D)^2 \quad (\text{A4-11})$$

Equation (A4-11) can be rewritten:

$$\bar{I} I_0 \frac{1+\eta}{2} = p I_E^2 + (1-p) I_D^2 \quad (\text{A4-12})$$

Finally, the average-variance equations can be rewritten:

$$\begin{aligned} p I_E + (1-p) I_D &= f_1(I_0, \eta) \\ p I_E^2 + (1-p) I_D^2 &= f_2(I_0, \eta) \end{aligned} \quad (\text{A4-13})$$

where $f_1(I_0, \eta) = I_0 \frac{1-\eta}{-\ln(\eta)}$ and $f_2(I_0, \eta) = I_0^2 \frac{1-\eta^2}{-2\ln(\eta)}$.

This system of two equations has three unknowns (p, I_E, I_D) .

Assuming $I_D = 0$, the system becomes simpler:

$$\begin{aligned} p I_E &= f_1(I_0, \eta) \\ p I_E^2 &= f_2(I_0, \eta) \end{aligned} \quad (\text{A4-14})$$

The solution is therefore:

$$\begin{aligned} I_E &= \frac{f_2(I_0, \eta)}{f_1(I_0, \eta)} \\ p &= \frac{f_1(I_0, \eta)^2}{f_2(I_0, \eta)} \end{aligned} \quad (\text{A4-15})$$

This means:

$$\begin{aligned} I_E &= I_0 \frac{1+\eta}{2} \\ p &= \frac{2\bar{I}}{I_0(1+\eta)} \end{aligned} \quad (\text{A4-16})$$

In the second case, we choose $I_E = I_0$, the system is now:

$$\begin{aligned} p I_0 + (1-p) I_D &= f_1(I_0, \eta) \\ p I_0^2 + (1-p) I_D^2 &= f_2(I_0, \eta) \end{aligned} \quad (\text{A4-17})$$

The first equation yields:

$$p(I_0 - I_D) = f_1(I_0, \eta) - I_D \quad (\text{A4-18})$$

which can be injected in the second equation, leading to:

$$(f_1(I_0, \eta) - I_D)(I_0 + I_D) + I_D^2 = f_2(I_0, \eta) \quad (\text{A4-19})$$

whose solution is:

$$I_D = \bar{I} \frac{1 - \eta}{2(1 - \frac{\bar{I}}{I_0})} \quad (\text{A4-20})$$

Finally, we have:

$$\begin{aligned} I_D &= -\frac{(1-\eta)^2}{2(1-\eta+\ln(\eta))} I_0 \\ p &= \frac{\bar{I} - I_D}{I_0 - I_D} \end{aligned} \quad (\text{A4-21})$$

- Annexe 5 -

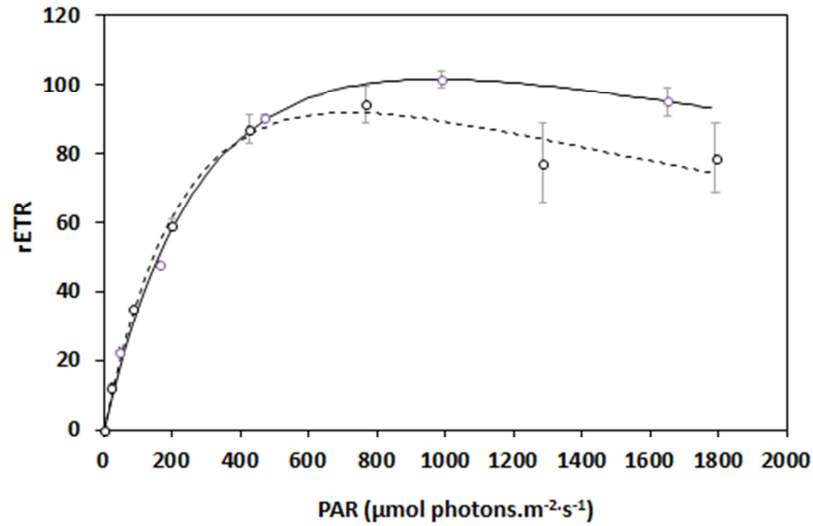


Fig. A4-1 : Courbes de réponse de la photosynthèse à la lumière (courbe dite 'PI') présentant le taux de transport relatif des électrons (rETR) de T-Iso 2X, pré-acclimatée (7 jours) à une lumière blanche ($I_{in} = 700 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Le taux de transport des électrons a été suivi à l'aide de lumières de mesure verte (540 nm, ligne continue) ou rouge (625 nm, ligne pointillée), suivant le protocole décrit par Rabouille & Claquin (2016), avec une incubation au noir de 10 min. Les paramètres photosynthétiques suivants ont été calculés grâce aux données après ajustement du modèle mathématique de Eilers et Peeters (1988) : $\alpha = 0,48$, $E_k = 190 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $\text{ETR}_{\text{max}} = 92 \mu\text{mol e}^{-}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (625 nm); $\alpha = 0,42$, $E_k = 239 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et $\text{ETR}_{\text{max}} = 101 \mu\text{mol e}^{-}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (540 nm).

- Annexe 6 -**Conférence 'Aquatic Sciences Meeting', Espagne 2015**

C. Combe, P. Hartmann, S. Rabouille, A. Talec, O. Bernard et A. Sciandra



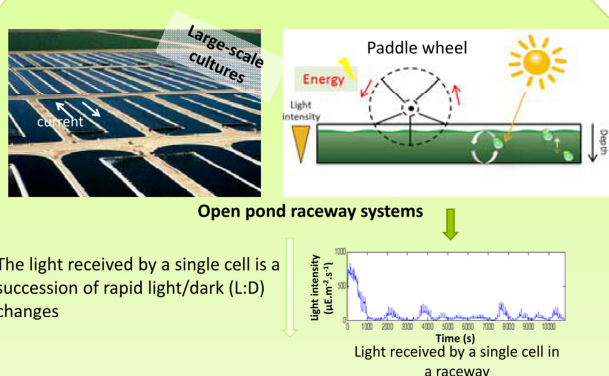
Hydrodynamics determine the phytoplankton cell trajectories in the water column and therefore the regime of light experienced by each cell. This is the case in agitated, highly turbid phytoplankton cultures, where single cells experience a succession of flashes. Microalgal growth characteristics under such conditions are thus fundamental information to understand nonlinear properties of photosynthesis. For this purpose, the effect of intermittent light was investigated on the growth of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae). Continuous cultures were exposed to the same average total light dose but with different flashing light regimes. Different durations of light flashes (0.1 to 30 s) and dark periods ($0.67 \leq L/D \leq 2$) were tested, yielding flash frequencies in the range 0.017-5 Hz. Specific growth rate, photosynthetic pigments, lipid productivity and elemental composition were measured for each irradiance condition. The different light treatments led to specific growth rates ranging from 0.25 to 0.93 day⁻¹. While photosynthetic efficiency was enhanced with increased flash frequency, no significant differences were observed in the carbon and chlorophyll contents. Pigment analysis showed that within this range of flash frequency, cells progressively photoacclimated to the average light intensity.

Context

Hydrodynamics determines the phytoplankton cell trajectories in the water column. Therefore, given the light conditions at the surface, hydrodynamics conditions the regime of light experienced by each cell: individual cells move back and forth from high light to relative darkness. The light received by a single cell is thus a succession of L:D-changes.

In agitated, highly turbid phytoplankton cultures, algal cells are exposed to a succession of rapid flashes, with time constants ranging from milliseconds to tens of minutes. Microalgal growth characteristics under such conditions are thus fundamental information to understand photoacclimation mechanisms. For this purpose, the effect of light modulation was investigated on the growth of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) in semi-continuous cultures

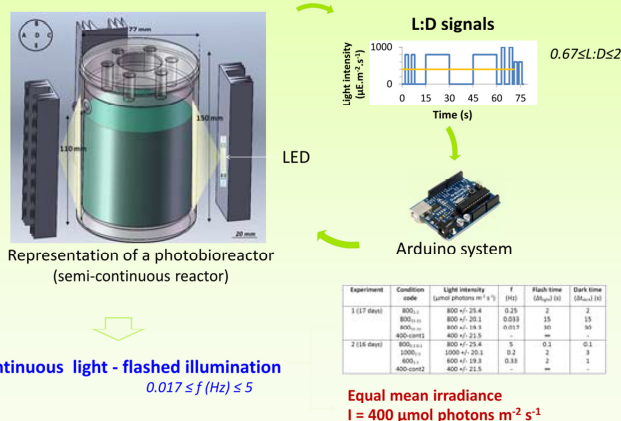
Problematics



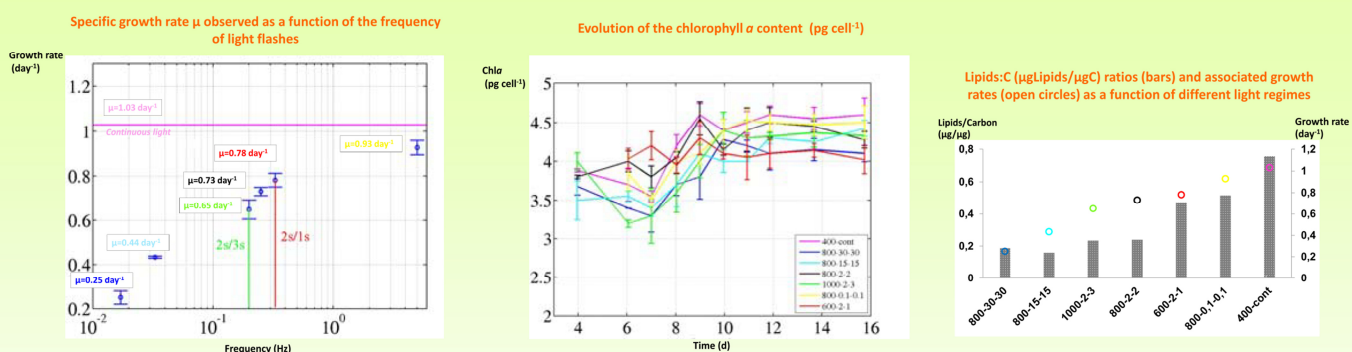
- Impacts of the pattern of light exposure on the growth rate and several physiological properties of *Dunaliella salina*
- Acclimation mechanisms of the photosynthetic apparatus?
- Optimal paddle wheel speed ?

Experimental design

An innovative device based on a freely programmable LED system developed to reproduce the succession of rapid light/dark changes



Main results



- In semi-continuous cultures maintained at similar cell densities, the specific growth rate increases with increasing flash frequencies (from 0.25 to 0.93 day⁻¹), with continuous light yielding the highest growth rate (1.03 day⁻¹) – « Light integration effect »

- Nine-day acclimation period observed until equilibrium

- No immediate effect of the L:D cycle frequency in the carbon and chlorophyll contents: cells sluggishly photoacclimate to the average light intensity independently from light fluctuations

- The slowest L:D alternation provides both the lowest lipid amount and the lowest growth rate

Conclusion

- An original device to understand the long term response of photosynthesis to dynamic light signals
- Increasing the mixing rate in raceway ponds may enhance the photosynthetic yield of microalgae
- The response to light pattern must be addressed in a 3 dimensional state space (acclimation state, light dose, L:D cycle frequency)

Bibliography

Combe C, Hartmann P, Rabouille S, Talec A, Bernard O, Sciandra A. 2015. Long-term adaptive response to high-frequency light signals in the unicellular photosynthetic eukaryote *Dunaliella salina*. Biotechnol Bioeng. In press



¹BIOCORE-INRIA, BP93, 06902 Sophia-Antipolis Cedex, France

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 7093, LOV, Observatoire océanologique, F-06230, Villefranche/mer, France

³CNRS, UMR 7093, LOV, Observatoire océanologique, F-06230, Villefranche/mer, France

- Annexe 7 -

Philipp Hartmann, David Demory, Charlotte Combe, Raouf Hamouda, Anne-Céline Boulanger, Marie-Odile Bristeau, Jacques Sainte-Marie, Bruno Sialve, Jean-Philippe Steyer, Sophie Rabouille, Antoine Sciandra and Olivier Bernard. Growth Rate Estimation of algae in Raceway Ponds: A novel Approach. The 19th World Congress of the International Federation of Automatic Control (IFAC). Cape Town (South Africa), 2014.

Growth Rate Estimation of algae in Raceway Ponds: A novel Approach

Philipp Hartmann* David Demory** Charlotte Combe**
Raouf Hamouda*** Anne-Céline Boulanger***
Marie-Odile Bristeau*** Jacques Sainte-Marie***
Bruno Sialve**** Jean-Philippe Steyer**** Sophie Rabouille**
Antoine Sciandra** Olivier Bernard*

* INRIA Sophia Antipolis, 2004, Route des Lucioles, B.P 93, 06902
Sophia Antipolis, France

** UPMC, BP 28, Chemin du Lazaret, 06234 Villefranche sur Mer,
France

*** INRIA Paris-Rocquencourt Domaine de Voluceau, B.P. 105, 78153
Le Chesnay Cedex, France

**** INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement,
Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne, France

Abstract: Microalgae mass cultivation is a promising future source of biomass for energy and food production. In order to optimize productivity of large scale plants and to make them environmentally and economically sustainable, energy requirements have to be minimized. In particular, mixing of the growth medium is a major energy input, and its effect on overall productivity should be better understood. Several dynamic models have been developed to represent the effect of a rapidly varying light on the photosynthesis process especially for the effect of photoinhibition on growth. In order to assess the mixing effects in a complex hydrodynamic regime, we propose to reconstruct the light profile received by a single cell. A multi-layer Saint-Venant approach is used to simulate the hydrodynamics of the system. It allows for the computation of Lagrangian trajectories, and finally, when knowing the light distribution, the light pattern perceived by a cell. This pattern is then used with the dynamical model for photosynthesis. In a last step, the growth rate of the whole system is estimated as the average over a set of trajectories.

Keywords: modelling, biofuel, raceway, hydrodynamics, microalgae, optimization

1. INTRODUCTION

Microalgae are considered a new source of biomass and renewable energy since the 70s (Sheehan et al., 1998). Advantages of microalgae cultivation compared to terrestrial plants are a high photosynthetic yield, independence from fertile soil and a possibly reduced freshwater consumption (Williams and Laurens, 2010). These advantages can lead to a large algal biomass production which is not in direct competition with food production. Improving biofuel production and energy generation from microalgae receives increasing attention over the last years. Increased Lipid productivity can be obtained in special conditions of nutrient limitation and high light illumination. It has been reported that after a nitrogen limitation microalgae can reach a very high lipid content (more than 50% of dry weight) (Metting, 1996).

In a wider perspective, the consumption of CO₂ during photosynthesis can contribute to carbon mitigation (Talec et al., 2013). There are also combined approaches for wastewater treatment technologies (Sialve et al., 2009) and for a production of high value products such as cosmetics and pharmaceuticals (Wijffels and Barbosa, 2010). All

these possibilities have put microalgae in a favorable position for the integration in biorefinery concepts.

For large scale production of microalgal biofuel, many problems have to be addressed. Light conditions and nutrient supply affect the photosynthetic yield, and two key processes are involved. Among them, photoinhibition diminishes of photosynthetic yield due to an excess of irradiance which destroys some key proteins of the photosynthetic apparatus. This can be represented by models that take into account the dynamics of the photosynthetic reaction centers which are represented in resting (or open) state or active (closed) state. The dynamics of open/closed transition occurs at a fast time scale (within seconds), while photoinhibition occurs in the time scale of minutes. In order to achieve optimal biomass productivities, it is very important to understand the effects of dynamical light patterns on photosynthesis dynamics, and especially on the mechanisms which lead to photoinhibition.

In this work, we propose an integrated approach for the estimation of growth rate of an open-channel raceway microalgae culture. In a first step, numerical integration of an approximation of the Navier-Stokes equation by a multilayer Saint-Venant approach is carried out in order to

predict the trajectories of single algae cells in the medium (Bernard et al., 2013). In a second step, a dynamical model for photoinhibition (Han, 2001) is calibrated using experimental data. This model gets numerically integrated using light profiles corresponding to different trajectories and calculate the average among them. This average value is considered to be an estimation of the growth rate of the complete raceway pond.

2. METHODS & RESULTS

The presented approach for the estimation of the growth rate of raceway ponds consists of three steps:

- (1) Computation of the trajectories and light profiles of individual algae cells within the raceway volume
- (2) Growth rate estimation for each trajectory using a photosynthesis model
- (3) Averaging of the growth rate among individual trajectories resulting in an estimation for the entire system

In the following paragraph we present the hydrodynamic model presented by Bernard et al. (2013), the Photosynthesis model of Han (2001) and how the average growth rate for the entire system is calculated. We finally present structural properties of the model of Han leading to a non-linear growth response to dynamic light signals.

2.1 Hydrodynamics and single cell trajectories computation

An approximation of the Navier-Stokes equations has been proposed by Audusse et al. (2011a), which is well adapted to the conditions in an open raceway pond. Compared to former multilayer models that are adapted for non miscible fluids, the so-called multilayer Saint-Venant system with mass exchanges is a good approximation of the Navier-Stokes equations. The accuracy and the stability properties of the multilayer approach have been demonstrated in Audusse et al. (2011a,b).

Moreover the multilayer model has been successfully confronted with analytical solutions of the hydrostatic Euler and Navier-Stokes systems with free surface (Boulanger and Sainte-Marie (2013)). The multilayer model consists in Galerkin type approximation along the vertical axis of the Navier-Stokes system, it results in a set of partial differential equations with hyperbolic features and written over a fixed mesh. The system is numerically solved by considering a 2D triangular mesh of the ground surface, the layers defined by the water depth giving the third spatial dimension. The discretization technique used a finite volume scheme based on a kinetic interpretation of the equations. A specific forcing term mimicking the effect of the paddle wheel was added (Bernard et al., 2013). The impact of the wheel on the fluid is considered as a normalized force applied by the wheel's blade and equal to the square of the velocity at each point. Here, a 3D extension to the model presented in Bernard et al. (2013) was used. The used meshing represents a real raceway pond of the Environmental Biotechnology Laboratory of INRA Narbonne (see Figure 1).

Finally, Lagrangian trajectories of several particles are reconstructed by integrating the velocity field for various initial conditions of the particles. In addition, a Brownian

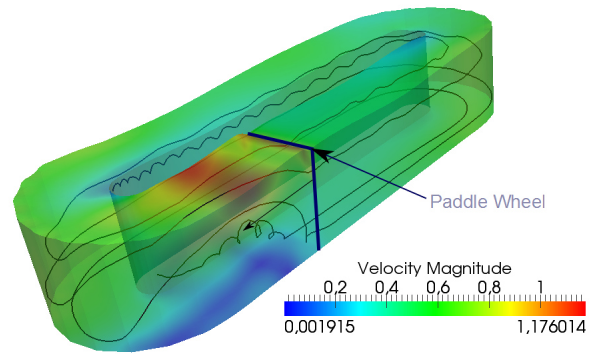


Fig. 1. 3D representation of the water volume and its velocity field in the numerical simulation. A particular trajectory is also represented.

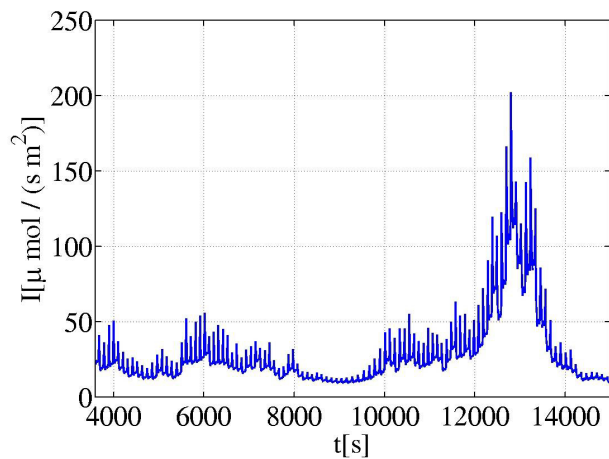


Fig. 2. Light signal received by a single cell as a function of time

motion model is applied to better represent the local diffusion effect.

The raceway simulation has been run for 15 000 seconds. The simulation starts with static non agitated medium, and the paddle wheel is immediately set on. Consequently, the first 3600 seconds of simulation were disregarded, in order to reach a stabilisation period.

Light intensity profiles are calculated from the trajectories by applying the law of Beer-Lambert for light attenuation. The attenuation coefficient was chosen to be a fixed constant which leads to 5 % of the incident light intensity at the bottom of the raceway. Consequently, the light intensity as a function of the water depth z above the particle is:

$$I(z) = I_0 \cdot e^{-\gamma \cdot (z)} \quad (1)$$

Taking into account the depth of the culture of $0.3m$, we can deduce a value of $15.35m^{-1}$ for the parameter γ . A typical light pattern is presented on fig. 2.

2.2 The Han Model

Han (2001) presented a mechanistic model for photosynthesis which includes dynamical effects of photoinhibition. This model represents the dynamics of the photosystems depending of light flux. Photosystems are the first units involved in photosynthesis, they collect photons and transfer electrons to the rest of the system. They can have three possible states: open (A) and relaxed, closed while they are processing photons (B) or inhibited (C) when they received an excess of photons.

Dynamic processes are represented by the transition between the states and depend on the photon flux. Primary production is described by the transition between A and B. Excitation is assumed to occur at a rate of σI , with σ being the functional cross section of the photosynthetic unit (PSU). De-excitation is assumed to occur at a rate of $\frac{1}{\tau}$, with τ being the turnover time of the electron transport chain. At higher irradiation photoinhibition occurs: PSII's pass over from closed to inhibited state at a rate $k_d \sigma I$. At the same time a repair mechanism compensates this effect at a constant rate k_r .

The equations describing the rates of change in the fractions of open, closed and inhibited states are given by:

$$\begin{aligned}\dot{A} &= -I \sigma A + \frac{B}{\tau} \\ \dot{B} &= I \sigma A - \frac{B}{\tau} + k_r C - k_d \sigma I B \\ \dot{C} &= -k_r C + k_d \sigma I B.\end{aligned}\quad (2)$$

Expressions giving the fractions of open, closed and inhibited states at steady state as a function of the irradiance I can be derived explicitly from 2. The steady-state expression A^∞ for the open state A is given by:

$$A^\infty(I) = \frac{1}{1 + \tau \sigma I + k_d / k_r \tau \sigma^2 I^2}, \quad (3)$$

Finally, growth rate is described by a function proportional to IA . At steady state, this corresponds to a Haldane type curve:

$$\mu^\infty(I) = \bar{\mu} \frac{I}{1 + \tau \sigma I + k_d / k_r \tau \sigma^2 I^2}, \quad (4)$$

2.3 Parameters identification

In order to identify the parameters of the Han model for the species *Dunaliella salina* completely it was necessary to use data from different studies. The light response curve was taken from Park et al. (2013) describing the photosynthetic response of microalgae (measured by oxygen evolution) to different light intensities. With this data, we fitted a well-parametrized form of eq. 4 by Bernard and Rémond (2012). In a second step, experiments consisting of measuring the growth rate for different crenellated light/dark alternation frequencies have been done. For such caricatural light signals varying at high frequencies, approximation of the response of the Han model can be obtained (Hartmann et al., 2013). Such approximations responses were used to fit the model to data measured by Combe et al. (2013). It leads to a value for τ and the respiration rate R . The increase of the Quantum yield

Parameter	Value	Unit
k_r	$2 \cdot 10^{-4}$	s^{-1}
k_d	$1.82 \cdot 10^{-16}$	.
τ	0.667	s
σ	0.0143	$m^2/(\mu mol)$
R	4.9250	$mol \cdot 10^{-6} \text{ cells min}^{-1}$

Table 1. Estimated model parameters based on experimental data by (Park et al., 2013) and data by Combe et al. (2013)

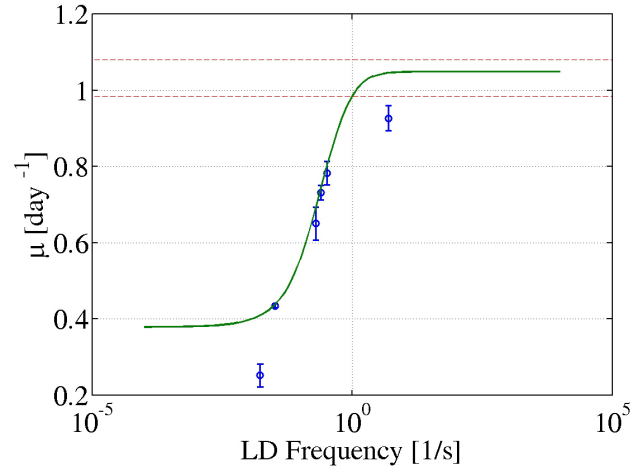


Fig. 3. Dependency between Frequency and Growth rate. Frequency on a logarithmic scale, Circles show measured values of data by Combe et al. (2013), lines show model predictions according to Hartmann et al. (2013)

after light to dark transtion as published by Neidhardt et al. (1998) imposes a time scale for the repair process of the photocenters. From this we deduced the value for k_r . However, according to the data of Park et al. (2013), inhibition plays a minor role within natural values for the light intensity. Thus the values for k_d and k_r have negligible impact on the model behaviour in real-life conditions.

After a least square fit on the data presented in paragraph 2.3, the parameters turned out as in tab. 1. The fit of the experimental data is presented in figures 3 and 4.

2.4 Simple factors in light signal affecting productivity

In a preliminary study, the effect of the paddle wheel on the light received by a cell was studied by a caricatural light/dark signal with equal periods of light (at intensity I_0) and darkness. In the work of Hartmann et al. (2013), the effect of the light/dark frequency ω is studied. It is shown that the average growth rate $\mu(I_0, \omega)$ is an increasing function of ω , and that the growth rate is bound within:

$$\frac{1}{2} \mu^\infty(I_0) \leq \mu(I_0, \omega) \leq \mu\left(\frac{I_0}{2}, +\infty\right) = \mu^\infty\left(\frac{I_0}{2}\right) \quad (5)$$

This means that for very low frequencies, the system can be approximated by a system where half of the time growth rate is obtained for a continuous light at I_0 , while there is no growth the rest of the time. For a very fast frequency, much faster than the time scales of the Han model, the light signal is averaged into a light $\frac{I_0}{2}$.

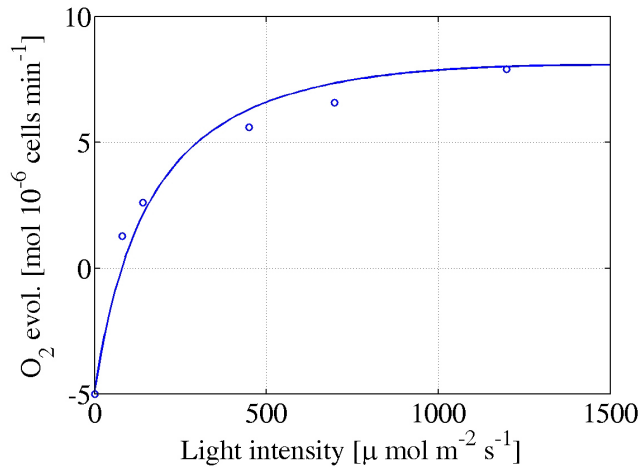


Fig. 4. Steady state Light response curve for the utilized parameters

The next step is to test this effect with a more realistic light pattern, derived from a trajectory computed with our hydrodynamical approach.

Firstly, the effect of the signal variance on the growth rate at steady state is analysed. Given different signals with alternation of constant light periods of same length, between $I - \delta I$ and $I + \delta I$; The previously considered case is a specific case for $\delta I = I$.

Hypothesis 1. (H1) Assuming that $I + \delta I$ is in the convex part of the Han equation (4). In other words:

$$\frac{d^2\mu^\infty}{dI^2}(I + \delta I) < 0 \quad (6)$$

In order to optimize productivity of large scale plants and to make them environmentally and economically sustainable, energy requirements have to be minimized.

Property 1. Using Hypothesis H1, we have

$$\frac{\mu^\infty(I + \delta I) + \mu^\infty(I - \delta I)}{2} \leq \mu^\infty(I)$$

Proof: This Property is easily proven when considering the decreasing function (Hypothesis (H1)) $\frac{d\mu^\infty}{dI}\mu^\infty(I)$. We have

$$\frac{d\mu^\infty}{dI}(I) \leq \frac{d\mu^\infty}{dI}(I - \delta I)$$

Integrating this expression between I and $I + \delta I$, we get

$$\mu^\infty(I + \delta I) - \mu^\infty(I) \leq \mu^\infty(I) - \mu^\infty(I - \delta I)$$

This provides the result.

As a consequence, any light signal varying at very low frequency between $I - \delta I$ and $I + \delta I$ would lead to an average growth rate lower than the growth rate for the average light I .

The same reasoning holds for δI : increasing δI (provided that μ^∞ stays in a region where it is convex) leads to a reduced growth rate. This reasoning highlights the two effects affecting growth:

- Signal frequency which tends to increase growth rate

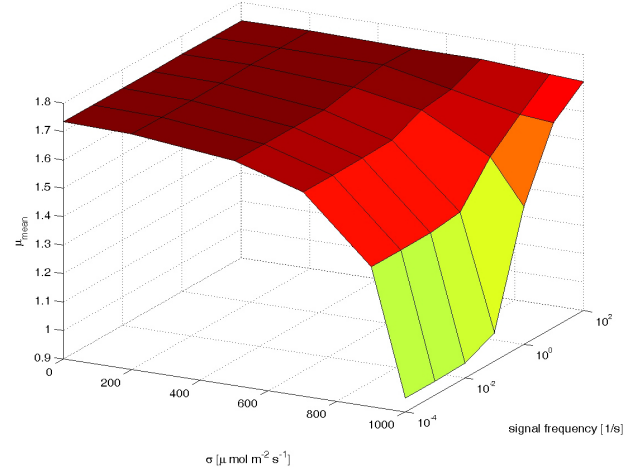


Fig. 5. Average growth rate based on the Han model using rectangular light signals with different variance and frequency

- Variance of the Light signal which, at low frequency, tends to decrease the growth rate

Fig. 5 shows results for numerical integrations of the Han model based on a rectangular signals with different signal variance and frequency. Coherently with the analytical prediction, it can be observed that the growth rate increases with frequency and decreases with increasing variance.

In the next paragraph, a reference trajectory is used so that the second effect is eliminated and the result depends only on the frequency of light dark succession.

2.5 Effect of the paddle wheel velocity

In a simple approach, in order to understand the effect of the paddle wheel on productivity, it is assumed that increasing mixing intensity is equivalent to contraction and dilatation of the time axis of the cell trajectory. This corresponds to a linearisation of the paddle wheel effect. Considering one reference trajectory, means that different mixing intensities are represented by dilation factors of the time axis. Increased paddle wheel mixing thus corresponds to a time-contracted reference trajectory.

Based on the light signals the mean photosynthetic productivity is calculated from the Han model over the full trajectory. The travel time has been contracted and dilated down by a factor of 100. Moreover, together with the travel time, we simultaneously considered the effect of incident light irradiation I_0 on productivity. The results are presented in fig. 6.

As it can be observed, a reduced travelling time yields only about 70 % of the productivity at the original traveling time for 1000 $\mu\text{mol}/\text{s}^{-1}\text{m}^{-2}$ surface light intensity. There is only an insignificant difference between the result for the light profile passing a 100 times faster and the original speed.

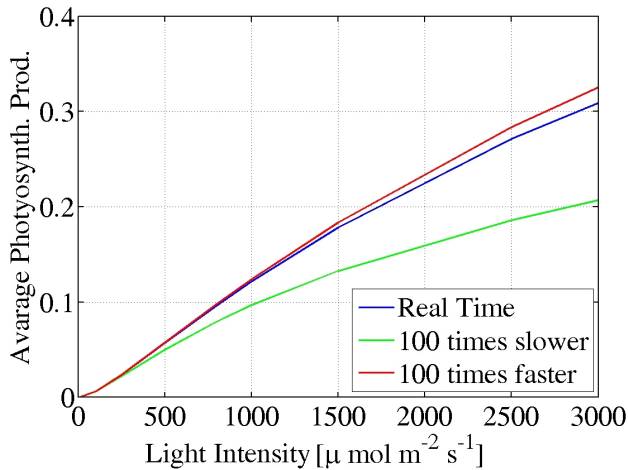


Fig. 6. Steady state Light response curve for the utilized parameters, exemplary trajectory

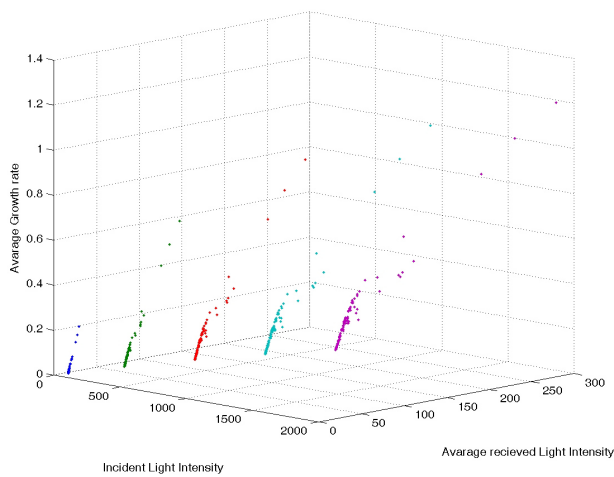


Fig. 7. Average received light intensity and growth rate as a function of surface light intensity. Each color of points refers to one surface light intensity.

2.6 Growth rate prediction for the mixed Culture

In order to estimate the growth rate of the entire culture, we calculated the average growth rate of all 460 trajectories for different light intensities at the surface. For the total average growth rate μ_{av} we get consequently:

$$\mu_{av} = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{\mu}(z_i)}{n} \quad (7)$$

With z_i being the time dependent depth coordinate for the i th trajectory. The resulting average photosynthetic productivity as a function of incident light intensity of the culture is presented in Fig. 8. The individual growth rate of all single trajectories are presented in Fig. 7. The growth rate and the average received light intensity of each trajectory is represented by one point in the 3D Coordinate system.

The average growth rate (fig. 7) of the culture increases linearly with the surface light intensity. However, due to a special characteristics in the hydrodynamic simulation the

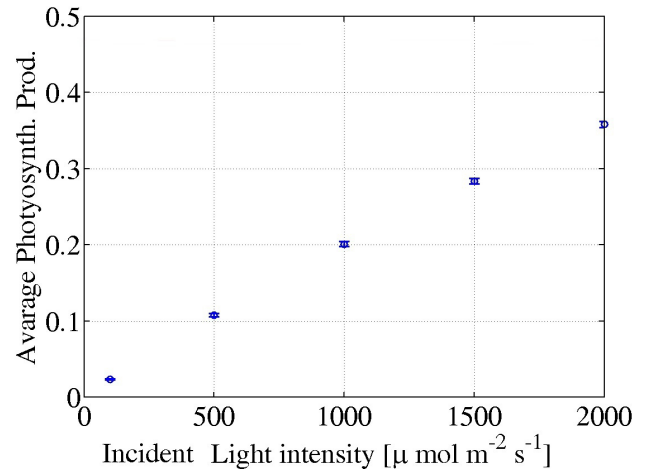


Fig. 8. Average Value of gross Growth rate between the 460 trajectories for different incident illuminations.

average received light intensity has significant variability among the trajectories (compare fig. 7) for the same surface intensity.

3. DISCUSSION

With the presented approach, we can estimate the growth rate of the raceway pond based on the growth response of individual algae cells. Contrary to similar approaches, we did not rely on rectangular light signals, but on light profiles which have been calculated from the hydrodynamics of the system.

For the calibration of the Han Model for *Dunaliella salina*, data from three different studies have been used. The increasing productivity as a function of cycle frequency in the data of Combe et al. (2013) has been identified as an effect of the open/closed dynamics, which is directly linked to the value of the parameter τ . Since this increase can be observed at frequencies of about 1 Hz, the parameter τ has been estimated as 0.67 s. This value, unusually high, is slower than what is considered a typically in the literature (cf. Falkowski and Raven (2007)). Nevertheless, the study follows an experimental protocol presented by Falkowski and Raven (2007), which allows for direct determination of this physiological parameter. This result might therefore be taken as a hint for an unusual behaviour of *Dunaliella salina* in flashing light conditions.

Structural properties of the Han model show that the growth response depends not only on the average light intensity, but also on the frequency and the shape of the received light profile. This leads to the conclusion that considering only the frequency of the light signal is not enough to estimate the photosynthetic efficiency. Contrarily to several works studying the growth response as a function of flash frequency, predictions of actual productivity should also be based on the variance of the signal. With the proposed approach we suggest a new paradigm to treat this problem by reconstructing realistic trajectories. In order to predict the growth rate within the aggregate system, the average growth rate has been deduced from 460 trajectories. A linear relation between surface light intensity and aggregated growth

rate is found. This could be interpreted similarly to the average growth rate computed in Bernard (2011), when averaging the Han static response over the depth of the culturing system. Analytical computation in this simplified case shows that this is similar to shifting the optimal light intensity towards higher light, and reducing the maximum growth rate. Shifting the maximum of the curve on fig. 4 is similar to rescaling the response curve for low light intensity. As a consequence, the response to light becomes approximatively linear.

When regarding the individual values for average growth rate and depth for different trajectories, there is a significant spread for the average depth of the particles. This indicates, that the simulation time is not sufficient in order to show the ergodicity of the system.

At the current state of this study, we suspect that a numerical artefact in the integration of the hydrodynamics leads to an overestimated spatial probability for the particles at the bottom of the raceway. This imposes consequently an offset for the average received light intensity of the particles and leads to growth rates which are underestimated. In the context of the high respiration – which was found for our calibration – the growth rates are even below respiration. It should be pointed out that – to our best knowledge – at present no studies exist which evaluate the spatial distribution of particles in a hydrodynamic raceway simulation for sufficiently long simulation time.

4. CONCLUSION

This work investigates how hydrodynamics impacts biology in microalgae culture ponds. The actual effect on photosynthetic efficiency is assessed by coupling the Lagrangian trajectories computed from a multi-layer Saint-Venant hydrodynamical model, to a dynamical model representing the fast time scales of photosynthesis. Such study highlights the idea that experiments conducted to assess the effect of light/dark frequency on photosynthesis are not sufficient to characterize the mixing effect in a raceway. More work is required to better study the impact of the paddle wheel, by ensuring that basics statistical properties of Lagrangian trajectories (average depth, equipartition of the particles) are not affected by the wheel velocity. This approach is also the foundation for the development of a computer driven approach able to optimize the design of raceways and increase the ratio between the recovered biofuel from the microalgae and energy consumption for mixing.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank to ANR-BIME 004

REFERENCES

- Audusse, E., Bristeau, M.O., Pelanti, M., and Sainte-Marie, J. (2011a). Approximation of the hydrostatic navier-stokes system for density stratified flows by a multilayer model: Kinetic interpretation and numerical solution. *Journal of Computational Physics*, 230(9), 3453–3478.
- Audusse, E., Bristeau, M.O., Perthame, B., and Sainte-Marie, J. (2011b). A multilayer saint-venant system with mass exchanges for shallow water flows. derivation and numerical validation. *ESAIM: Mathematical Modelling and Numerical Analysis*, 45(01), 169–200.
- Bernard, O. (2011). Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production. *Journal of Process Control*, 21(10), 1378–1389.
- Bernard, O., Boulanger, A.C., Bristeau, M.O., and Sainte-Marie, J. (2013). A 2d model for hydrodynamics and biology coupling applied to algae growth simulations. *ESAIM: Mathematical Modelling and Numerical Analysis*, 47, 1387–1412.
- Bernard, O. and Rémond, B. (2012). Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. *Bioresource Technology*.
- Boulanger, A.C. and Sainte-Marie, J. (2013). Analytical solutions for the free surface hydrostatic Euler equations. *Commun. Math. Sci.*, 11(4), 993–1010.
- Combe, C., Bernard, O., and Rabouille, S. (2013). *Etude expérimentale de la réponse adaptative de Dunaliella salina a des signaux lumineux haute fréquence*. Master's thesis.
- Falkowski, P.G. and Raven, J.A. (2007). *Aquatic Photosynthesis*. Princeton University Press, 2nd edition.
- Han, B.P. (2001). Photosynthesis-irradiance response at physiological level: A mechanistic model. *Journal of Theoretical Biology*, 213, 121–127.
- Hartmann, P., Béchet, Q., Bernard, O., et al. (2013). The effect of time scales in photosynthesis on microalgae productivity. *Bioprocess and Biosystems Engineering*.
- Metting, F.B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 17, 477–489.
- Neidhardt, J., Benemann, J., Zhang, L., and Melis, A. (1998). Photosystem-ii repair and chloroplast recovery from irradiance stress: relationship between chronic photoinhibition, light-harvesting chlorophyll antenna size and photosynthetic productivity in *dunaliella salina* (green algae). *Photosynthesis Research*, 56(2), 175–184.
- Park, S., Lee, Y., and Jin, E. (2013). Comparison of the responses of two *Dunaliella* strains, *Dunaliella salina* CCAP 19/18 and *Dunaliella bardawil* to light intensity with special emphasis on carotenogenesis. *Algae*, 28(2), 203–211.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., and Roessler, P. (1998). A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from Algae. Technical report, U.S. Department of Energy.
- Sialve, B., Bernet, N., and Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27, 409–416.
- Talec, A., Philistin, M., Ferey, F., Walenta, G., Irisson, J.O., Bernard, O., and Sciandra, A. (2013). Effect of gaseous cement industry effluents on four species of microalgae. *Bioresource Technology*, 143, 353–359.
- Wijffels, R.H. and Barbosa, M.J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science*, 329(5993), 796–799.
- Williams, P.J.I.B. and Laurens, L.M.L. (2010). Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: Review and analysis of the biochemistry, energetics and economics. *Energy & Environmental Science*, 3, 554–590.

ABSTRACT

Microalgae are a promising source of third generation biofuels. The interest on these photosynthetic microorganisms also lies within the extent of the spectrum of molecules that they can produce, such as proteins, pigments, and vitamins. Nevertheless, further progress is still necessary to reduce the economic and environmental costs of cultivation processes and to ensure the viability of this sector. In particular, better understanding of the effect of light on the productivity of dense cultures is an essential step to optimize these processes.

The aim of this thesis is to study the quantitative and qualitative effects of light on growth and acclimation mechanisms of two species of microalgae with high biotechnological interest ; *Dunaliella salina* and *Tisochrysis lutea*. The first part of this thesis examines the response of *Dunaliella salina* to rapid light changes, by reproducing irradiance fluctuations typically experienced by microalgal cells in a highly turbid suspension in raceway ponds. In the second part, we analyzed the response of *Dunaliella salina* and *Tisochrysis lutea* to different light spectra. Our experimental and theoretical approach allowed us to identify the effect of colored light on productivity and pigment composition of microalgae. Furthermore, our results offer encouraging prospects for elevate understanding and use of light and improve the energy performance of these processes.

Keywords: *Dunaliella salina*, *Tisochrysis lutea*, biofuel, photosynthesis, hydrodynamics, flashing light, photolimitation, LED, wavelengths, pigments, phenotypic plasticity, photoacclimation, productivity.

RÉSUMÉ

Les microalgues constituent une source prometteuse de biocarburants dits de troisième génération. L'intérêt de ces micro-organismes photosynthétiques réside également dans l'étendue de la palette de molécules qu'elles peuvent produire, telles que les protéines, les pigments ou encore les vitamines. Néanmoins, des progrès sont encore nécessaires pour diminuer les coûts économiques et environnementaux des procédés de culture et assurer ainsi la viabilité de la filière. En particulier, mieux comprendre l'effet de la lumière sur la productivité des cultures denses est une étape essentielle pour optimiser ces procédés.

L'objectif de cette thèse est d'étudier les effets quantitatifs et qualitatifs de la lumière sur la croissance et les mécanismes d'acclimatation de deux espèces de microalgues à fort intérêt biotechnologique, *Dunaliella salina* et *Tisochrysis lutea*. La première partie de cette thèse examine la réponse de *Dunaliella salina* à des variations rapides de la lumière, reproduisant les fluctuations de l'éclairement typiquement perçues par les cellules microalgales brassées au sein des systèmes de cultures industriels à haute densité de type raceway. Dans la seconde partie, nous avons analysé la réponse de *Dunaliella salina* et *Tisochrysis lutea* à différentes compositions du spectre lumineux. L'approche à la fois expérimentale et théorique nous a permis d'identifier les effets d'une lumière colorée sur la productivité et la composition pigmentaire des microalgues. Nos résultats offrent des perspectives encourageantes et des pistes concrètes permettant d'optimiser l'utilisation de la lumière pour produire des microalgues et d'améliorer le bilan énergétique de ces procédés.

Mots-clés : *Dunaliella salina*, *Tisochrysis lutea*, biocarburant, photosynthèse, hydrodynamique, lumière intermittente, photolimitation, LED, longueurs d'ondes, pigments, plasticité phénotypique, photoacclimatation, productivité.
