



HAL
open science

Caractérisation et modélisation de la culture de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* et mise en place d'un photobioréacteur miniaturisé pour l'étude quantitative de la croissance de micro-organismes photosynthétiques

Nastasia Soanen

► To cite this version:

Nastasia Soanen. Caractérisation et modélisation de la culture de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* et mise en place d'un photobioréacteur miniaturisé pour l'étude quantitative de la croissance de micro-organismes photosynthétiques. Sciences agricoles. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAS023 . tel-02978417

HAL Id: tel-02978417

<https://theses.hal.science/tel-02978417>

Submitted on 26 Oct 2020

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.

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE
LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,
ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Spécialité : Sciences des Aliments)

soutenue le : 21 juillet 2017

Nastasia SOANEN

**Caractérisation et modélisation de la culture de la microalgue
Chlamydomonas reinhardtii et
Mise en place d'un photobioréacteur miniaturisé
pour l'étude quantitative de la croissance de
micro-organismes photosynthétiques**

Rapporteurs :

Mme **ALBASI Claire**, Directeur de Recherche, (LGC), Toulouse.

Mr. **PRUVOST Jérémy**, Professeur, (GePEA), Saint-Nazaire.

Membres :

Mme **LAROCHE Céline**, Maître de Conférences HDR, (IP GePEB), Clermont-Ferrand

Directeur de thèse :

Mr. **DUSSAP Claude-Gilles**, Professeur, (IP GePEB), Clermont-Ferrand

Remerciements

Je remercie le Pr Michel DHOME directeur de l'Institut Pascal et le Pr Claude-Gilles DUSSAP responsable de l'axe GePEB pour m'avoir accueillie au sein de leur établissement.

J'adresse mes remerciements à mon directeur de thèse, le Pr Claude-Gilles DUSSAP, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce doctorat ainsi que le Dr Céline LAROCHE, pour son investissement.

Je remercie Mme ALBASI Claire et Mr PRUVOST Jérémy d'avoir accepté d'examiner mon mémoire.

Je remercie également les membres du GePEA, de l'IBITEC-S et de l'IBAM du CEA, et du BIP pour leur travail sur le projet ANR AlgoH2, ainsi que la Société RUAG pour le projet BIORAT. Je remercie l'Agence Spatiale Européenne et l'Agence Nationale de la Recherche pour leurs financements pour mes travaux.

Aussi, je souhaite remercier les personnes de l'Institut Pascal qui m'ont véritablement aidé dans mon travail, et particulièrement ma Tata du labo Christine GARDARIN pour son caractère exceptionnel et son soutien moral (Merci TATA) mais aussi pour ces qualités de formatrice ainsi que David DUCHEZ pour son soutien moral, sa disponibilité et son sang-froid. Je remercie également Clément GAINARD, notre doryphore, pour tous ses moments partagés.

Enfin, je remercie, plus particulièrement, tous les Terrassiens (Florent, Floriane (Herbula), Maxime (L'imaginarium du photographe), Jérôme (Comme chez Mémé), Christine (Boudoir Froufrou), Gilbert et Renée (Long John Silver Inn) et Christine (Un jour l'Alsace) pour votre présence, votre soutien et votre écoute, et vos cadeaux, et vos sourires, enfin pour tout au final !

J'ajouterais aussi toutes les belles rencontres que j'ai pu faire au cours de ces 3 ans et des cailloux dont la super équipe des petits puciens notamment Nico, Lio, Timmy et David, mais aussi Lio Nel mon fou de Gannat et Valérie ma softeuse, vous m'avez donné joies, sourires, et moments magiques, mes petits chats, je vous adore ! Je ne vous oublie pas non plus les

copines Aveyronnaises (Sassou, Marine, Coco, sans oubliez vos Boys) et vous non plus les copains de thèse : Thomas, Gary, Laura, Arthur.

Et pour finir mes amours : ma mère et ma petite sœur, ma grand-mère, ma famille de cœur (Bernard, Fred, Pop, Badhia, Marie-Paule), Pauline, Marlène (ma jumelle), Olivier et Noel.

MERRRRCIIIII, Maintenant nouvelle vie avec MS, mais promis les copains, je ne vous oublierai pas... Grenoble city vous attend.

Table des Matières

Introduction	1
Chapitre I Etude bibliographique	2
1 Microorganismes photosynthétiques	5
1.1 Généralités	5
1.2 La respiration versus la photosynthèse.....	7
1.2.1 La Photosynthèse.....	9
1.2.2 La respiration.....	10
1.3 Les microalgues	12
1.3.1 Généralités.....	12
1.3.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	13
1.4 Les cyanobactéries	15
1.4.1 Généralités.....	15
1.4.2 <i>Arthrospira platensis</i>	16
1.5 Utilisations des microalgues	18
1.5.1 Les polysaccharides.....	18
1.5.2 Les protéines.....	20
1.5.3 Les lipides.....	21
1.5.4 Les pigments.....	22
2 Cultures de microalgues	23
2.1 Modes de production existants.....	24
2.1.1 Culture en bassins ouverts ou raceway	24
2.1.2 Culture en réacteurs extérieurs	24
2.1.3 Culture en photobioréacteur	25
2.2 Contrôle des cultures en PBR	25
2.2.1 L'irradiance	25
2.2.2 La température.....	28
2.2.3 Le pH.....	30
2.2.4 L'agitation	31
2.3 Mode de culture	31
2.3.1 Mode d'alimentation en batch	31
2.3.2 Mode d'alimentation en Fed batch	32
2.3.3 Mode d'alimentation en continu.....	32
2.3.4 Modes d'alimentation mixtes	32

3	Verrous scientifiques et défis technologiques associés aux cultures de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> et de <i>Arthrospira platensis</i>	32
3.1	La photofermentation et la production d' H_2 chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	33
3.1.1	Le projet ANR Algo H2	33
3.1.2	Le dihydrogène	33
3.1.3	Problématique scientifique	34
3.1.4	Cultures en photobioréacteurs dans le cadre du projet Algo H2	35
3.2	Utilisation de cultures de microalgues pour des systèmes de support vie	38
3.2.1	Le projet MELiSSA	38
3.2.2	Le projet BIORAT	41
3.2.3	Influence de la microgravité	42
3.2.4	L'effet du couple redox ammonium/ammoniac sur <i>Arthrospira platensis</i>	43
4	Modèles de croissance cellulaire et de fonctionnement métabolique	48
4.1	Généralités sur les modèles de croissance cellulaire et de fonctionnement métabolique	48
4.1.1	Expression du modèle sous forme de bilans matière	49
4.1.2	Partie stœchiométrique	50
4.1.3	Partie cinétique	52
4.2	Flux métaboliques et formulation matricielle	53
4.3	Récapitulation de la formulation du modèle	59
4.4	Analyse mécanistique globale simplifiée	61
5	Analyse cinétique couplée à l'analyse thermodynamique	62
5.1	Contexte général	62
5.2	Formulation des bilans d'énergie	63
5.3	Prise en compte des échanges de photons dans les bilans d'énergie	66
5.4	Calcul des débits d'énergie radiative	70
6	Calcul des propriétés de formation	74
6.1	Les données d'Alberty : l'échelle des molalités	74
6.2	Les bases de données construites à partir d'une approche moléculaire	79
6.2.1	Cas des molécules simples	79
6.2.2	Cas des molécules complexes d'intérêt	80
6.3	Construction d'une base de données à partir de COSMO-RS	81
6.4	Application aux molécules biologiques complexes	84
7	Modèles de transfert	84
7.1	Modèle de transfert radiatif	84
7.2	Modèle de transfert de gaz	89
7.2.1	Vitesse volumétrique de transfert de l'oxygène : OTR (oxygen transfer rate)	89
7.2.2	Vitesse volumétrique de transfert de CO_2	90
7.3	Coefficient volumique de transfert gazeux : K_{La}	91

8	Conclusion à l'étude bibliographique.....	92
	<i>Chapitre II Matériels et Méthodes.....</i>	<i>94</i>
1	La souche et les milieux.....	95
1.1	La souche et son entretien.....	95
1.2	Les milieux.....	95
2	Les systèmes de culture.....	97
2.1	Les fioles de Roux.....	97
2.2	Le mini-photobioréacteur.....	98
2.2.1	Matériel.....	99
2.2.2	Interface de gestion : Labview.....	103
2.2.3	Calibration de la sonde pH.....	104
2.2.4	Calibration des capteurs de pression.....	104
2.2.5	Protocole de gestion de la pression dans le compartiment gaz.....	105
2.2.6	Protocole de gestion du pH.....	105
2.2.7	Membrane / fritté.....	105
3	Irradiance : optimisation et calibration.....	106
3.1	Mesure de l'activité photosynthétique.....	106
3.2	Calibration de l'éclairage.....	108
4	Traitement des échantillons.....	109
4.1	Protocole général de traitement des échantillons.....	109
4.2	Suivi cinétique.....	111
4.2.1	Mesure de la turbidité.....	111
4.2.2	Dosage des nitrates.....	111
4.2.3	Dosage de l'ammonium.....	111
4.2.4	Calculs des concentrations en NH ₃ formé et NH ₄ consommé.....	112
4.2.5	Dosage des oses totaux.....	112
5	Caractérisation de la membrane.....	113
	<i>Chapitre III Résultats et discussion.....</i>	<i>115</i>
1	Mise en œuvre des modèles de connaissance.....	116
1.1	Modèle de croissance pour <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	116
1.1.1	Modèle stœchiométrique macroscopique.....	118
1.1.2	Synthèse de constituants cellulaires et synthèse d'amidon.....	118
1.1.3	Dégradation de l'amidon et production d'hydrogène.....	121
1.2	Intégration du rôle de l'hydrogénase dans le schéma métabolique de la photosynthèse.....	124
1.2.1	Equations de synthèse de la biomasse et de dégradation de l'amidon.....	124
1.2.2	Equations détaillées du fonctionnement du chloroplaste en croissance cellulaire avec synthèse d'amidon.....	125

1.2.3	Calcul des rapports de vitesse et résolution équations détaillées.....	127
1.2.4	Calcul des rapports de vitesse lors de la production d'hydrogène.....	134
1.2.5	Production d'hydrogène par la voie directe ou la voie indirecte ?.....	136
1.3	Calcul des propriétés de formation par modélisation thermodynamique.....	138
1.4	Les modèles de transfert.....	146
1.4.1	Le transfert radiatif.....	146
1.4.1.1	Détermination du flux lumineux.....	146
1.4.1.2	L'oxygraphe.....	147
1.4.2	Le transfert de matière.....	149
1.4.2.1	Le coefficient volumique de transfert gazeux : kLa	150
1.4.2.2	Le rendement en oxygène.....	153
2	Validation du miniPBR sur des cultures d'<i>Arthrospira platensis</i>.....	154
2.1	Les cultures en fioles de Roux.....	155
2.1.1	Validation du système de culture en Fioles de Roux.....	156
2.1.2	Concentrations en azote de 1,7 mM.....	158
2.1.3	Concentrations en azote de 3,4 mM.....	162
2.1.4	Concentration en azote de 6,8 mM.....	167
2.1.5	Cultures en milieu Zarrouk supplémenté avec de l'ammonium.....	170
2.1.6	Suivi de la concentration en oses totaux dans les cultures.....	173
2.2	Cultures en mini-photobioréacteur.....	176
2.2.1	Culture sur milieu Zarrouk à $127 \mu\text{moles}_v \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	177
2.2.2	Culture sur milieu Zarrouk à $172 \mu\text{moles}_v \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	182
2.2.3	Culture sur milieu Zarrouk, supplémentée en ammonium, à $172 \mu\text{moles}_v \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	185
	Conclusion.....	189
	Références Bibliographiques.....	194

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation schématique du chloroplaste et de ces 2 phases [1]	8
Figure 2 : Schéma d'une mitochondrie et de ces 2 phases [2]	8
Figure 3 : Schéma des 2 phases de la photosynthèse [3]	9
Figure 4 : Chaîne de transport des électrons lors de l'assimilation des photons dans le chloroplaste (Voet & Voet, 2005) (PS : photosystème ; PC : phycocyanine ; Cyt : cytochrome ; Pheo : phéophytine ; e ⁻ : électron ; h μ : photon ; O ₂ : oxygène ; Pi : phosphate inositol ; OEC : complexe d'oxydation de l'eau ; N-phase : phase négative (stroma) ; P-phase : phase positive (lumen) ; Fd : ferrédoxine ; H ₂ O : eau)	10
Figure 5 : Couplage entre le transport des électrons et la synthèse d'ATP (Voet et Voet, 2005)	12
Figure 6 : Exemple d'algue rouge (<i>Porphyra</i>) [4], verte (<i>Ulva</i>) [5] et bleue (<i>Spiruline</i>) [6]	13
Figure 7 : Physiologie d'une microalgue rouge (à gauche) et d'une microalgue verte (à droite)	13
Figure 8 : Structure cellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en 2D et 3D	14
Figure 9 : Schéma d'une cyanobactérie [7]	16
Figure 10 : Photographie d' <i>Arthrospira platensis</i> , observées au microscope optique x100	17
Figure 11 : Culture de microalgues rouges, vertes et bleues en bassin ouvert [8]	24
Figure 12 : Influence de la température sur les microorganismes [9]	28
Figure 13 : Courbes de croissance et d'activité photosynthétique chez <i>Arthrospira platensis</i> en fonction de la température (d'après Cornet, 1992)	29
Figure 14 : Schéma du réacteur bi-étagé mis en place par le GEPEA (Lemasson, 2015)	35
Figure 15 : Evolution des quantités d'hydrogène et d'oxygène en sortie du PBR 2 (Lemasson, 2015)	36
Figure 16 : Schéma simplifié des deux voies de production du H ₂ chez <i>C. reinhardtii</i> (G. Peltier, ANR AlgoH2, 2014)	37
Figure 17 : Schéma simplifié de la boucle du projet MELiSSA [10]	39
Figure 18 : Schéma simplifié de l'assimilation cellulaire des sources azotées	44
Figure 19 : Vision de principe du métabolisme cellulaire	55
Figure 20 : Training Set de la famille des alcanes (RMSE : 0,28 kJ.mol ⁻¹)	82
Figure 21 : Set de validation pour les alcanes (RMSE : 0,52 kJ.mol ⁻¹)	83
Figure 22 : Représentation de l'atténuation du flux lumineux dans un photobioréacteur plan	85

Figure 23 : Vitesse de la photosynthèse en fonction du flux lumineux chez <i>A. platensis</i> , en fonction de la concentration en biomasse, à $t = 36\text{ °C}$ (Cornet, 1992).....	86
Figure 24 : Photographie d' <i>Arthrospira platensis</i> , observée au microscope optique (x100).....	95
Figure 25 : Schéma d'une fiole de Roux (photobioréacteur) pour les tests préliminaires	98
Figure 26 : Schéma de l'installation [a] Compartiment liquide ; [b] Source de lumière ; [c] Sonde pH ; [d] Agitateur ; [e] Membrane ; [f] Compartiment gazeux ; [g] Capteurs de pression ; [h] Electrovanes (Cogne, 2003).....	100
Figure 27 : Capteurs de pression [a] Phase gazeuse; [b] Phase liquide	101
Figure 28 : Schéma en 3D du mini PBR (Cogne, 2003).....	101
Figure 29 : Photographie du réacteur : visuel des 2 vannes trois voies de prélèvements et des 2 minis EV	102
Figure 30 : Face avant du logiciel d'acquisition.....	103
Figure 31 : Schéma de l'électrode de type Clark vue de dessus (OXYT/ED Oxytherm, Hanstech®) [11].....	106
Figure 32 : Réactions électrochimiques observées au niveau de l'électrode (vue en coupe).....	107
Figure 33 : Diagramme récapitulatif du traitement des prélèvements	110
Figure 34 : Production de dihydrogène par une culture de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> enrichie en amidon (Lemasson, 2015).....	117
Figure 35: Suivi de la composition de la biomasse durant la production d' H_2 pour une culture enrichie en amidon (Lemasson, 2015)	121
Figure 36: Evolution de la biomasse et du contenu cellulaire durant la production d' H_2 pour une culture enrichie en amidon (Lemasson, 2015)	121
Figure 37 : Schéma de principe du fonctionnement du chloroplaste [12]	125
Figure 38 : σ -Profile de l'ATP4-	138
Figure 39 : σ -potentiel de l'éthane (COSMOSThermX)	139
Figure 40 : Calibration moyennée (en 5 points) de l'intensité lumineuse pour les cultures en fiole de Roux.....	146
Figure 41 : Calibration moyennée (en 15 points) de l'intensité lumineuse pour les cultures dans le mini-PBR avec le quantumètre.	147
Figure 42 : Modèle de production de dioxygène par <i>Arthrospira platensis</i> en fonction de l'irradiance (modèle avec inhibition d'Eilers et Peeters) pour une $C_{i,X}$ de $0,06\text{ g.L}^{-1}$	148
Figure 43 : Courbe de la variation de pression (en bar) dans le compartiment gaz du miniPBR, réalisé en complément d'un suivi colorimétrique (dosage des sulfites)	153
Figure 44 : Variation de la pression en bar dans le compartiment gazeux du miniPBR au cours du test de mesure du KLa.....	154

Figure 45 : Installation type pour les expérimentations en fiole de Roux (ici, manipulation à $t=0$)	156
Figure 46: Comparaison des courbes de croissance expérimentales sur milieu Zarrouk (29 mM N-NO ₃) et prédites par le modèle photosim.	158
Figure 47: Courbes de croissance à 1,7 mM d'azote journalier (Fed-batch) et comparaison avec le modèle de croissance Photosim. Moyennes de 3 cultures par condition. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.	159
Figure 48: Culture à 1,7 mM N-NO ₃ : concentration résiduelle en N-NO ₃ lors du prélèvement quotidien et consommation cumulée.....	160
Figure 49: Culture à 1,7 mM N-NH ₄ . Suivi des concentrations en NH ₄ , NH ₃ formé, NH ₄ consommé. Données quotidiennes et cumulées.	161
Figure 50: Observation de la coloration des cultures. Gauche : culture à 1,7 mM N-NO ₃ ; Droite : culture à 1,7 mM N-NH ₄	162
Figure 51: Courbes de croissance à 3,4 mM d'azote journalier et comparaison avec le modèle de croissance Photosim. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (3 répétitions) pour la culture en mélange.	163
Figure 52: Culture à 3,4 mM N-NO ₃ . Suivi des concentrations en N-NO ₃ résiduelles et consommées.	165
Figure 53: Culture en mélange avec un apport quotidien de 3,4 mM d'azote (1,7 mM N-NH ₄ + 1,7 mM N-NO ₃). Suivi des concentrations en NH ₄ , NO ₃ , NH ₃ formé, NH ₄ consommé et NO ₃ consommé. Données quotidiennes et cumulées.....	165
Figure 54: Culture à 3,4 mM N-NH ₄ en 2 apports quotidiens (1,7 mM N-NH ₄ 2x). Suivi des concentrations en NH ₄ , NH ₃ formé, NH ₄ consommé. Données quotidiennes et cumulées.	167
Figure 55: Courbes de croissance à 6,8 et 3,4 mM d'azote journalier en 2 apports quotidiens (respectivement cultures 3,4 mM N-NH ₄ 2x et 1,7 mM N-NH ₄ 2x) et comparaison avec le modèle de croissance Photosim.	168
Figure 56: Culture à 6,8 mM N-NH ₄ en 2 apports quotidien (culture 3,4 mM N-NH ₄ 2x). Suivi des concentrations en NH ₄ , NH ₃ formé, NH ₄ consommé. Données quotidiennes et cumulées.....	169
Figure 57: Courbes de croissance en milieu Zarrouk non supplémenté, ou supplémenté en ammonium à hauteur de 1,7 mM ou 3,4 mM et comparaison avec le modèle de croissance Photosim. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (2 répétitions) pour la culture Z + 1,7 mM N-NH ₄	170
Figure 58: Culture sur milieu Zarrouk (29 mM N-NO ₃). Suivi des concentrations en N-NO ₃ résiduelles et consommées.	171

Figure 59: Culture sur milieu Zarrouk (29 mM N-NO ₃) supplémenté par 1,7 mM N-NH ₄ . Suivi des concentrations en NO ₃ , NH ₄ , NH ₃ formé, NH ₄ et NO ₃ consommés. Données quotidiennes et cumulées.....	172
Figure 60: Culture sur milieu Zarrouk (29 mM N-NO ₃) supplémenté par 3,4 mM N-NH ₄ . Suivi des concentrations en NO ₃ , NH ₄ , NH ₃ formé, NH ₄ et NO ₃ consommés. Données quotidiennes et cumulées.....	173
Figure 61: Concentrations en oses totaux mesurées pour chacune des conditions de culture	174
Figure 62 : Composition massique en oses totaux (g / 100 g de biomasse sèche) pour chacune des conditions de culture	175
Figure 63 : Suivi de la pression, du pH et de la cinétique de croissance d' <i>A. platensis</i> , lors d'une culture en mini-PBR sur milieu Zarrouk classique, et sous un flux lumineux de 127 $\mu\text{moles}_v\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (28 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$). Les étoiles correspondent au prélèvement quotidien, ce qui explique que les cycles de montée en pression soient incomplets.....	178
Figure 64 : Concentration cellulaire ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et consommation de nitrates (mM) pour la culture d' <i>A. platensis</i> en mini-PBR à 127 $\mu\text{moles}_v\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (28 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$). Les points correspondent aux résultats expérimentaux et les lignes continues aux résultats prédictifs.	180
Figure 65 : Suivi de la pression, du pH et de la cinétique de croissance d' <i>A. platensis</i> , lors d'une culture en mini-PBR sur milieu Zarrouk classique, et sous un flux lumineux de 172 $\mu\text{moles}_v\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (37 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$). Les étoiles correspondent au prélèvement quotidien, ce qui explique que les cycles de montée en pression ne soient parfois pas complets.....	183
Figure 66 : Concentration cellulaire ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et consommation de nitrates (mM) pour la culture d' <i>A. platensis</i> en mini-PBR à 172 $\mu\text{moles}_v\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (37 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$). Les points correspondent aux résultats expérimentaux et les lignes continues aux résultats prédictifs.	184
Figure 67 : Suivi de la pression et du pH et lors d'une culture en mini-PBR sur milieu Zarrouk classique supplémenté quotidiennement avec 1,7 mM d'ammonium, à 172 $\mu\text{moles}_v\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (37 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$). Les étoiles sont des repères correspondants aux prélèvements journaliers sur la culture. .	185
Figure 68 : Culture en mini-PBR sur milieu Zarrouk (29 mM N-NO ₃) supplémenté par 1,7 mM N-NH ₄ . Suivi des concentrations en NO ₃ , NH ₄ , NH ₃ formé, NH ₄ et NO ₃ consommés. Données quotidiennes et cumulées.	187
Figure 69 : Concentration cellulaire ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et consommation de nitrates (mM) pour la culture d' <i>A. platensis</i> en mini-PBR à 172 $\mu\text{moles}_v\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (37 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$). Les points correspondent aux résultats expérimentaux et les lignes continues aux résultats prédictifs.	187

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau comparatif Eucaryote/Procaryote (Prescott <i>et al.</i> 2003)	6
Tableau 2 : Composition en AA retrouvés en g pour 100 g de protéines chez <i>Arthrospira platensis</i> (Becker, 2007) comparée aux valeurs de référence recommandées (FAO, 1973).....	21
Tableau 3 : Potentiels chimiques et enthalpies de formation des espèces d'ATP en fonction du pH (d'après Ould Moulaye, 1998). L'espèce équivalente est sous forme H ₄ ATP nommée ATP. T=25°C. La molalité totale des radicaux ATP est 1M (solution idéale). La force ionique I_m est 0,1M.	78
Tableau 4: Composition du milieu Zarrouk modifié, pH 9,5.....	96
Tableau 5 : Concentrations en azote (nitrates ou ammonium) dans les tests en fioles de Roux.....	96
Tableau 6 : Étapes métaboliques impliquées dans le fonctionnement du PSII et dans le pool de plastoquinol dans les conditions physiologiques: stroma pH _N =7.5; lumen pH _P =4 ; P _{O₂} =0,21 atm ; T=298 K	126
Tableau 7 : Étapes métaboliques impliquées dans le fonctionnement du photosystème 1 dans les conditions physiologiques : stroma pH _N = 7.5; lumen pH _P = 4	126
Tableau 8 : Étapes métaboliques impliquées dans le fonctionnement du cytochrome B6f dans les conditions physiologiques : stroma pH _N = 7.5; lumen pH _P = 4	127
Tableau 9 : Étapes métaboliques impliquées dans les étapes terminales de la chaîne de transfert d'électrons et la synthèse d'ATP : stroma pH _N = 7.5; lumen pH _P = 4.....	127
Tableau 10 : Tableau de synthèse des réactions considérées dans le calcul pour la croissance cellulaire.....	128
Tableau 11: Tableau de synthèse de calcul des flux en fonction du rendement de l'ATPase pour la croissance cellulaire et la production d'amidon.....	131
Tableau 12 : Tableau de synthèse des réactions impliquées dans la croissance cellulaire et la dégradation de l'amidon.....	134
Tableau 13 : Tableau de synthèse de calcul des flux en fonction du rendement de l'ATPase lors de la croissance cellulaire et la production d'hydrogène (voie directe).	135
Tableau 14 : Tableau de synthèse de calcul des flux en fonction du rendement de l'ATPase lors de la croissance cellulaire et la production d'hydrogène (voie indirecte).	137

Tableau 15 : Résultats de la modélisation statistique par PLS :	140
Tableau 16 : Résultats des calculs thermodynamiques à partir de COSMO-RS à 298,15 K en solution aqueuse infiniment diluée.	142
Tableau 17 : Concentration en sulfites dans le milieu liquide (en vert les concentrations en M et en jaune en g.L^{-1})	151
Tableau 18: Données d'entrée pour la prédiction de la culture d' <i>Arthrospira platensis</i> en fioles de Roux sur milieu Zarrouk	157

Nomenclature et abréviations

A

α : Coefficient stœchiométrique

α_λ : Module de diffusion linéaire

a (ou A) : Aire spécifique de l'interface d'échange (m^3)

a' : Potentiel chimique

a_w : Activité de l'eau

a_λ : Coefficient spectral d'absorption (m^{-1})

A^i : Vecteur ligne de r éléments

A : Ampère

$A_{es}/B_{es}/C_{es}$: Vecteurs d'entrée et sortie de la cellule ($\text{mol.kg}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$)

AA : Acide Aminé

AcCoA /Acétyl-CoA : Acétyl-coenzyme A

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

Amts : Transporteurs à ammonium

ANR : Agence Nationale de la Recherche

APC : Allophycocyanine

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

B

b^* : Valeur de régression multilinéaire

b_λ : Fraction rétrodiffusée

C

c : Célérité de la lumière ($c = 2,998.10^8 \text{ m.s}^{-1}$)

C_i : Concentration en élément i (g.L^{-1} ou mmol.L^{-1})

C_i^s : Concentration en élément i à saturation (g.L^{-1})

C : Probabilité d'existence d'un élément dans la molécule

CEA : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives

Chl_a : Chlorophylle A

CoA : Coenzyme A

COSMO-RS / CRS : CONductor like Screening MOdel for Real Solvents

D

ΔG : Variation d'enthalpie libre / Valeur de l'enthalpie libre de Gibbs ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)

ΔH : Valeur de l'enthalpie ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)

ΔpH : Variation de pH

ΔS : Valeur de l'entropie ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)

D : Taux de dilution (h^{-1})

DC : Direct Current = Courant continu

DDP : différence de potentiel électrique

DHA : Acide docosahexaénoïque

DI : Dilution Infinie

DO : Densité optique

E

E : Potentiel électrique ou potentiel d'oxydoréduction (V ou mV)

E_a : Coefficient d'absorption ($\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$)

$E_{a\lambda}$: Coefficient massif d'absorption ($\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$)

$E_{s\lambda}$: Coefficient massif de diffusion ($\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$)

e^- : Electron

EPA : Acide eicosapentaénoïque

EPS : Exopolysaccharide

ESA : Agence Spatiale Européenne

EV : Electrovanne

F

F : Constante de Faraday ($F = 96,484\cdot 10^3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)

F6P : Fructose 6 phosphate

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FADH : Forme réduite de flavine adénine dinucléotide

FAO : Food and Agriculture Organization

Fd : Ferredoxine

G

γ_i : Coefficient d'activité de l'espèce i

G : Irradiance (W.m^{-2} ou $\mu\text{moles}_\lambda.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

$G(z)$: Champ d'irradiance

G_c : Point de compensation d'irradiance (W.m^{-2} ou $\mu\text{moles}_\lambda.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

G_s : Seuil d'irradiation de saturation (W.m^{-2} ou $\mu\text{moles}_\lambda.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

$g(\varepsilon)$: Densité d'état

G6P : Glucose 6 phosphate

GAP : Glycéraldéhyde-3-phosphate

GePEA : Génie des Procédés-Environnement-Agroalimentaire

GePEB : Génie des Procédés, Énergétique et Biosystème

H

h : Vecteur des enthalpies massives des composés

He : Coefficient de Henry ($\text{Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$)

I

I_λ : Intensité spectral spécifique (W.m^{-2} ou $\mu\text{moles}_\lambda.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

I_0 : Intensité initiale (W.m^{-2} ou $\mu\text{moles}_\lambda.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

IBAM : Innovative Building Assessment and Management

IBITEC-S : Institut de Biologie et de Technologies de Saclay

J

J : Vecteur des flux métaboliques ($\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

J_k : $k^{\text{ème}}$ flux métabolique ($\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

K

k : Coefficient molaire d'absorption (m^{-1})

K : Constance de saturation

K_L : Coefficient de transfert de masse (m.s^{-1})

K_{La} : Coefficient volumique de transfert de gaz

k : élément de surface de molécule

kJ : Kilojoules

L

λ : Longueur d'ondes (nm)

LED : Diode électroluminescente

M

μ : Vecteur des potentiels chimiques de formation des composés par unité de masse

μm : Micromètre

M : Matrice diagonale des masses molaires des composés

MELiSSA : Micro-Ecological Life Support System Alternative

M_i/M_j : Masse molaire de i et de j (moles)

N

n : Nombre de substrats et de produits

n : Indice de réfraction de l'eau

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADH : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide

NADP⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADPH : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NGC : New General Catalogue of nebulae and clusters of stars

O

OEC : Oxygen-Evolving Complex

OTR : Oxygen Transfer Rate (taux de transfert de l'oxygène)

P

Φ : Rendement quantique moyen (mol.J^{-1})

ϕ_{ent} : Débit d'entropie par unité de volume

ϕ_i : Flux volumique d'entrée et/ou de sortie

$\phi_{O_2, GL}$: Taux de transfert de l'oxygène du gaz vers le liquide

φ : Vecteur des flux entrants

φ^* : Débit spécifique

φ^*_{ent} : Débit d'entropie au débit φ^*

φ^*_p : Débit d'énergie mécaniques associée au débit φ^*

$\varphi^*_{p, milieu}$: Débit d'énergie mécanique dans le milieu réactionnel associé au débit φ^*

φ^*_ε : Débit d'énergie interne associée au débit φ^*
 φ^*_μ : Débit d'enthalpie libre associé au débit φ^*
 P : Pression totale dans le réacteur (bar ou Pa)
 p : Nombre d'élément
 $p(\sigma)$: Nombre d'éléments de surface
 PAR : Photosynthetically Active Radiation
 PBR : Photobioréacteur
 PER : Efficacité protéique
 PGRL1 : Proton Gradient Regulation Like 1
 Phase N : Phase négative
 Phase P : Phase positive
 Pi : Phosphate inositol
 P_i : Pression partielle de l'élément i (atm)
 pKa : Constante d'acidité
 Pot : σ -potentiel
 Pro : σ -profile
 PSI : photosystème I
 PSII : photosystème II
 PTFE : polymère de polytétrafluoroéthylène
 $p_\lambda(\theta, \theta')$: Fonction de la phase spectrale de diffusion

Q

Q_0 : Flux lumineux ($W \cdot m^{-2}$ ou $\mu moles_\lambda \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)

R

ρ : Réflexion
 ρ_m : Rendement maximal
 R : Constante des gaz parfaits ($8,3144621 J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)
 r : Vecteur des vitesses réactionnelles volumiques ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
 Re : Nombre de Reynolds
 r_i : Vitesse réactionnelle volumique de i ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
 R_k : Vitesse volumique de la réaction k ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
 RMSE : Racine Mean Square Error en $kJ \cdot mol^{-1}$
 r_{O_2} : Productivité en oxygène ($mol \cdot h^{-1} \cdot m^{-3}$)
 RuBisCO : Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Oxygénase

S

σ : Partie réactionnelle du système ϕ_{ent} .

σ_i : Densité surfacique de charge ($e^-/\text{\AA}^2$)

s : Vecteur des entropies des composés par unité de masse (J.K^{-1})

S : Matrice des coefficients stœchiométriques

SOD : Superoxyde dismutase

Su : σ -profil x σ -potentiel

s_λ : Coefficient spectral de diffusion (m^{-1})

T

θ : Angle polaire (rad)

T : Température (K ou °C)

t : Temps (h ou s)

TAG : Triacylglycérol

TTL : Transistor-Transistor Logic

U

u : Energie interne total du système par unité de volume

UV : Ultraviolet

V

V : Volt

V : Volume (mL, L, ou m^3)

W

W : Travail (mécanique)

W : Watt

Y

Y_{ij} : Rendement massique de conversion de i à partir du produit j ($\text{g}_i \cdot \text{g}_j^{-1}$)

y_{O_2} : fraction molaire en oxygène

Z

z : Epaisseur du volume (cm)

Exposants et indices

s : à saturation

chloro : Relatif au chloroplaste

exp : Expérimental

f : De formation

g : Gaz

l : Liquide

max : Relatif à la valeur maximale

min : Relatif à la valeur minimale

mitoch : Relatif à la mitochondrie

n : Phase négative

ox : Relatif à une forme oxydée

p : Phase positive

Q : Chaleur

red : Relatif à une forme réduite

w : Eau

X : Biomasse

Introduction

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein de l'Institut Pascal (UMR CNRS ; Université Clermont Auvergne), dans l'axe Génie des Procédés, Énergétique et Biosystèmes à Clermont-Ferrand. Il a été financé par deux projets distincts ayant en commun l'utilisation de microorganismes photosynthétiques aux propriétés étonnantes.

Le premier projet, nommé AlgoH₂, est un projet financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Ce projet vise à comprendre et optimiser la production naturelle de dihydrogène par une microalgue verte, organisme photosynthétique modèle, appelée *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce projet concerne donc la synthèse de biocarburants de troisième génération, sachant que le dihydrogène peut faire partie à terme du bouquet énergétique et constituer une issue plausible à la pénurie des carburants d'origine fossile. Une étude transversale du métabolisme de *Chlamydomonas reinhardtii* est réalisée ici, regroupant une analyse structurale du métabolisme, de sa régulation, des procédés de mise en œuvre des cultures couplés à la compréhension de la biochimie de la microalgue.

Le second projet, piloté par l'Agence Spatiale Européenne (ESA), fait partie des recherches concernant le projet MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative) qui a débuté il y a 25 ans. L'objectif principal de ce projet est de créer un écosystème clos, spécifique, et adaptable aux conditions particulières de la vie dans l'espace. Ce système de support vie doit permettre de recycler complètement les déchets biologiques produits, ainsi que l'atmosphère d'habitacles complètement fermés, qu'il s'agisse de véhicules spatiaux ou des stations planétaires, mais aussi de produire de la nourriture pour un équipage. En effet, des missions de longue durée, telle que le projet Mars, imposent que les volumes et les masses de nourriture, d'eau et d'air soient très réduits. A l'heure actuelle, les procédés physicochimiques connus permettent de recycler une part importante de l'eau et de l'oxygène mais seuls des procédés utilisant des organismes vivants (microorganismes ou plantes supérieures) sont en mesure de produire de la nourriture. Ceci nécessite des innovations technologiques importantes et l'utilisation de bioprocédés pour entrer dans des systèmes de recyclage ce qui est une nouveauté. Le projet BIORAT est une sous-partie du projet MELiSSA et est construit à partir d'un des 5 compartiments de la boucle MELiSSA. Il utilise un compartiment photosynthétique colonisé par la microalgue *Arthrospira platensis* pour recycler l'oxygène à partir de la consommation du CO₂. La cyanobactérie *Arthrospira platensis* a été sélectionnée en raison de sa capacité de croissance à pH élevé, ceci évitant des problèmes de contaminations trop importants lors de la culture. Cette microalgue, très

largement décrite dans la bibliographie, possède également l'avantage d'être un des organismes photosynthétiques les plus riches en protéines et en antioxydants, tout en restant résistante à la toxicité de l'ammonium, source azotée inorganique présente avec les nitrates dans les boucles liquides issues des dégradations primaires des déchets organiques.

Le trait d'union entre les deux aspects, qu'il s'agisse de la croissance et de la production d'hydrogène par *Chlamydomonas reinhardtii* ou bien de la croissance et de la production d'oxygène par *Arthrospira platensis*, est de mettre en place des dispositifs expérimentaux et une compréhension théorique suffisante pour comprendre différents modes de culture d'organismes photosynthétiques et leurs couplages avec les fonctionnements métaboliques. Dans un cas comme dans l'autre, il faut être en mesure de développer des modèles de connaissance caractérisant le métabolisme cellulaire, les transferts de lumière et de gaz dans les cultures de microalgues pour en déduire des stratégies de contrôle et de commande.

Une partie de ce travail, dans le cadre de l'ANR AlgoH2, concerne l'étude du métabolisme de *Chlamydomonas reinhardtii*, sachant que les parties expérimentales ont été réalisées au laboratoire GEPEA (CNRS, Université de Nantes). Le travail a été de « regrouper » l'ensemble des réactions métaboliques existantes dans la cellule afin de réaliser une étude stœchiométrique et thermocinétique du fonctionnement cellulaire en phase de croissance et de production d'hydrogène, l'objectif étant de pouvoir comprendre, contrôler et optimiser la production de dihydrogène en photobioréacteur. Une contribution de ce travail est également d'assembler une base de données cohérente réunissant les propriétés de formation de composés impliqués dans le fonctionnement cellulaire, ceci afin d'appliquer les règles de calculs d'équilibres thermochimiques aux composés du métabolisme cellulaire. Il s'agit donc bien d'allier une connaissance de la thermochimie et de la thermocinétique du métabolisme afin de caractériser pleinement les cultures et d'en déduire ultérieurement, avec l'aide d'un modèle de connaissance du métabolisme, les stratégies de contrôle et de commande des bioprocédés.

Dans une seconde partie, nous avons cherché à optimiser et moderniser un mini-photobioréacteur, conçu à partir d'un réacteur modèle miniature, développé au sein du laboratoire en 2003. La cyanobactérie *Arthrospira platensis*, en raison de sa moindre sensibilité aux contaminations, a servi de modèle d'étude. Un modèle de connaissance de la photosynthèse, regroupant les transferts radiatifs et la cinétique de croissance avait été développé, ce qui a permis de valider les tests préliminaires sur différentes sources nutritives

azotées et ainsi de viser de nouvelles améliorations du mini-PBR. Ce mini-PBR permet de réaliser des analyses rapides sur le fonctionnement de la photosynthèse et son dimensionnement en deux compartiments superposés et séparés par une membrane, permet d'extrapoler son comportement sur des cultures d'*Arthrospira platensis* en conditions de microgravité spatiale. Une partie de ce travail a été suivi avec l'entreprise suisse de domaine spatial, RUAG Space, en charge du développement d'un photobioréacteur devant servir dans des expériences sur la station spatiale internationale (ISS).

Ce manuscrit est construit en trois parties principales.

Le premier chapitre présente une étude bibliographique, exposant, dans un premier temps, les spécificités des deux organismes modèles et les verrous à leur utilisation dans les deux projets brièvement exposés ci-dessus. Dans un second temps, les aspects qui concernent la structure de construction des différents modèles utilisés sont présentés. Ceci recouvre l'élaboration du modèle de croissance et du fonctionnement métabolique, ainsi que le couplage entre la cinétique et la thermodynamique utilisant les propriétés de formation des molécules du métabolisme cellulaire. Les modèles cinétiques de transfert, tel que le modèle de transfert radiatif ou encore de transfert de matière sont présentés ensuite.

Le second chapitre présente les matériels et les méthodes utilisés pour les différentes expériences réalisées, ainsi que les techniques d'analyses, utilisant principalement des procédés biochimiques. Cette partie concerne pour l'essentiel les cultures d'*Arthrospira platensis*.

Enfin, le troisième chapitre expose les résultats obtenus au cours de ces travaux. Ce chapitre est subdivisé en deux parties. La première présente les résultats obtenus autour de la modélisation métabolique des cultures *C. reinhardtii*, avec une interprétation thermocinétique complète des bascules métaboliques induites par les modifications des conditions de culture. En outre cette partie comporte une première évaluation prédictive du calcul des propriétés thermodynamiques des composés du métabolisme cellulaire, notamment dans la chaîne de production de l'hydrogène. La deuxième partie de ce chapitre concerne les expérimentations réalisées sur *A. platensis*. Des tests préliminaires, dans des photobioréacteurs plans type fiole de Roux, ont été opérés afin de mieux comprendre l'impact des différentes sources d'azote testées. Ces tests servent à valider l'utilisation d'un photobioréacteur miniaturisé.

Chapitre I

Etude bibliographique

Cette première partie permet d’appréhender les diverses facettes de ce mémoire. Après un descriptif des microorganismes photosynthétiques, leurs applications et les verrous scientifiques engendrés seront présentés. Enfin, afin de répondre aux objectifs demandés, la mise en place des modèles de connaissance (modèle de croissance, modèle thermodynamique, transfert de matière) et leurs applications seront décrites.

Les microorganismes photosynthétiques sont présents dans tous les écosystèmes terrestres, ils représentent une très large variété d'espèces vivant dans une vaste gamme de conditions environnementales. On estime qu'il existe plus de 300 000 espèces, alors que seulement un nombre limité a été identifié et étudié. Au cours de la dernière décennie, l'utilisation de microalgues pour la production de biocarburants de troisième génération est devenue un défi majeur. Les avantages à utiliser des microalgues ou des cyanobactéries pour diverses applications industrielles comme la production de biocarburants (Hemschemeier, 2008), ou pour la production de divers produits intermédiaires et matières premières, ne manquent pas (Li *et al.*, 2008 ; Christi, 2007 ; Hu *et al.*, 2008 ; Rodolfi *et al.*, 2009 ; Schenk *et al.*, 2008).

Tout d'abord, la culture de ces microorganismes ne compromet pas la production alimentaire, étant donné qu'elle n'utilise pas les terres agricoles. Ensuite, du fait de leur composition nutritive intéressante (protéines, antioxydants, vitamines, etc.), les microalgues peuvent être utilisées sans traitement chimique pour compléter l'alimentation humaine (Falquet, 1996 ; Sialve et Steyer, 2013). Leurs besoins nutritionnels limités (dioxyde de carbone, source d'azote, quelques nutriments et de la lumière) permettent par ailleurs de coupler leur culture à un système de traitement des eaux ou à la captation de CO₂.

Dans l'écosystème terrestre, les microalgues jouent un rôle important dans le recyclage de l'atmosphère. C'est cette propriété qui est utilisée dans l'écosystème MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative) pour produire l'oxygène et capter le CO₂ (Hendrickx *et al.*, 2006). Dans ce cas, les cyanobactéries sont à la fois un élément clé de la régénération de l'oxygène mais aussi de la complémentation alimentaire. Ainsi, la culture de ces microorganismes sert à la fois pour la fixation du CO₂, le traitement des eaux et le recyclage de l'azote. Bien entendu, ceci doit être réalisé de façon intégrée à un ensemble d'opérations unitaires, le compartiment cyanobactéries étant une brique importante de l'ensemble.

Certaines espèces de microalgues peuvent contenir de 20 à 50 % de lipides. Ceux-ci peuvent être destinés à la production de biodiesel. D'autres espèces, telles que *Chlamydomonas*, disposent de particularités originales comme celles de produire naturellement du dihydrogène. Néanmoins, la rentabilité économique de ces nouvelles voies de production de carburants par ces procédés n'est pas encore atteinte, compte tenu du faible coût des carburants d'origine fossile. Il apparaît donc nécessaire, d'une part, d'optimiser les procédés de culture et d'extraction, et d'autre part de trouver des sous-produits ou plutôt des coproduits à haute

valeur ajoutée. En effet, selon l'espèce de microalgues, certains composés peuvent être extraits comme des pigments, des antioxydants, des polysaccharides, des acides gras, des vitamines, etc., ceux-ci pouvant être utilisés comme matières premières dans différents secteurs industriels (industrie pharmaceutique, cosmétique, nutraceutique, alimentation, etc.).

Si la diminution des coûts de production/extraction est un défi majeur, la compréhension fine du métabolisme et des procédés l'est tout autant. Ainsi, la modélisation de ces phénomènes est un outil puissant pour optimiser la croissance et la synthèse de molécules, ainsi que pour la conduite des procédés.

Le travail de modélisation sur la croissance de *Chlamydomonas* a été réalisé dans le cadre d'un projet de recherche financé par l'Agence Nationale de la Recherche, en collaboration avec quatre autres laboratoires. Le consortium a été constitué, en plus de l'axe Génie des Procédés – Energétique – Biosystèmes (GePEB), du laboratoire de Génie des Procédés - Environnement - Agroalimentaire (GEPEA) de Saint-Nazaire pour la mise au point de procédés de production, du laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP) de Marseille, du laboratoire IBITEC-S du CEA de Saclay et du laboratoire IBAM du CEA de Cadarache. L'ensemble de ce consortium associe donc des compétences en génie des procédés, en modélisation, en génie enzymatique (optimisation des hydrogénases), en biologie moléculaire (compréhension du fonctionnement des métalloprotéines et des centres réactionnels photosynthétiques) et en recherche de mutants d'intérêt. Ces travaux de recherche ont été réalisés au cours des 18 premiers mois de cette thèse. Ce projet ANR AlgoH2 vise la production de bio-hydrogène (H₂) par photosynthèse par la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*.

Puis dans un second temps, la mise en fonctionnement d'un petit photobioréacteur (miniPBR) dédié à la production d'oxygène a été réalisée. Ce réacteur a pour objectif de servir de modèle d'étude pour le développement de mini-systèmes de support de vie utilisant la cyanobactérie *Arthrospira platensis*. Ce travail est financé par l'Agence Spatiale Européenne (ESA) et doit contribuer au développement de systèmes spatialisables fonctionnant en conditions de gravité non terrestre.

Ce premier chapitre de bibliographie reprend des analyses générales sur les microorganismes photosynthétiques, les cultures de microalgues et enfin une analyse détaillée de la structuration de la modélisation de cultures microbiennes et d'organismes photosynthétiques. L'analyse des conversions d'énergie étant au centre des problématiques de modélisation, une

partie est consacrée à la détermination des propriétés de formation des composés du métabolisme qui sert dans l'expression d'un modèle de croissance et de production de métabolites.

Même si les cas des deux cultures de *Chlamydomonas reinhardtii* et d'*Arthrospira platensis* sont disjoints et visent des objectifs complètement différents, les problématiques restent voisines. C'est pourquoi nous l'abordons dans un seul et même contexte qui est celui de la modélisation de cultures et du métabolisme d'organismes photosynthétiques.

1 Microorganismes photosynthétiques

1.1 Généralités

Les microorganismes sont présents dans tous types d'écosystèmes, comme les sols, les eaux douces et les eaux marines, l'air, mais aussi des environnements plus hostiles tels que les pôles, les déserts, les geysers, le fond des océans, etc.

Les microorganismes photosynthétiques sont des organismes capables de se développer en utilisant l'énergie lumineuse (naturelle ou artificielle) par le biais de la photosynthèse. Majoritairement unicellulaires, leur taille varie généralement de 0,5 à 20 μm .

De taxonomie très variée, on distingue les microorganismes procaryotes qui ne possèdent ni noyau (mais un nucléoïde), ni organite compartimenté comme les bactéries et les Archaea. Les bactéries photosynthétiques regroupent 3 phylums : les cyanobactéries (bleues), les chlorobactéries (vertes) et les rhodobactéries (pourpres). Les deux dernières ont la particularité de réaliser une photosynthèse anoxygénique à partir de sulfure d'hydrogène ou de matière organique, à l'inverse des cyanobactéries où la photosynthèse est oxygénique.

Les microorganismes eucaryotes, comme les levures et les protistes (algues et protozoaires), possèdent un noyau délimité par une membrane et des organites compartimentés. L'intérêt principal de cette compartimentation est de permettre à la cellule de réaliser simultanément la photosynthèse, au niveau du chloroplaste, et la respiration, au niveau de la mitochondrie.

Tableau 1 : Tableau comparatif Eucaryote/Procaryote (Prescott *et al.* 2003)

Eucaryote		Procaryote
10 – 100 µm	Taille	0,2 – 2,0 µm
Double couche lipidique	Membrane	Invaginations à fonctions métabolique
En cellulose	Paroi	En glycopeptides
ADN grand, plusieurs chromosomes dans le noyau	Génome	ADN plus petit avec un ou plusieurs chromosomes dans le nucléoïde
Présence	Noyau et nucléole	Absence
Présence	Organites	Absence
Rarement	Plasmide	Présence
Absence	Opéron	Présence
Unicellulaire ou Pluricellulaire	Type	Unicellulaire
Sexuée (méiose) et asexuée (mitose)	Division cellulaire	Asexuée par scissiparité
80S	Ribosome	70S
Indépendantes, la transcription dans le noyau et la traduction dans le cytoplasme	Transcription/Traduction	Simultanées
Monocistronique	ARN messager	Polycistronique

Dans la nature, il existe plusieurs types trophiques qui permettent de classer les microorganismes. Ils sont classés selon :

- la source d'énergie utilisée. Certains microorganismes captent l'énergie rayonnante, *eg.* les photons. On dit alors que ce sont des organismes phototrophes. Les organismes chimiotrophes utilisent l'énergie chimique issue de l'oxydation de composés réduits tels que les nutriments.
- la source de carbone. Elle peut être d'origine minérale (inorganique), tel que le CO₂ atmosphérique. Dans ce cas, les organismes sont qualifiés d'autotrophes au carbone. Ils sont capables de produire leurs propres molécules organiques. La source de carbone peut aussi être d'origine organique, on parlera d'organismes hétérotrophes au carbone.
- la source de pouvoir réducteur. Elle peut être minérale (H₂O, H₂S, etc.), on parle de lithotrophie, ou alors organique dans le cas des organotrophes.

Dans le cadre de ces travaux, les organismes photosynthétiques étudiés sont des photolithoautotrophes.

En effet, deux types de microorganismes possédant des originalités de fonctionnement ont été étudiés dans ce mémoire. Le premier est une microalgue verte (eucaryote), *Chlamydomonas reinhardtii*, qui possède la particularité de produire par photofermentation du dihydrogène

dans l'objectif d'une utilisation comme biocarburant. Le second est une cyanobactérie (procaryote) nommée *Arthrospira platensis*. Elle a été étudiée dans des conditions de culture particulières, dans l'objectif d'un compartiment photosynthétique pour un système de support vie spatialisable, pour le renouvellement de l'atmosphère et la complémentation alimentaire d'un équipage.

Malgré une optique d'étude différente pour ces deux microorganismes, une étude précise de leur métabolisme est nécessaire afin d'optimiser au mieux leur utilisation. Le point clé pour comprendre les phénomènes observés se situe au niveau du mécanisme énergétique principal, à savoir : la photosynthèse.

Le paragraphe suivant développe une vision synthétique des principales voies de production d'énergie chez ces microorganismes. L'analyse mécanistique sera reprise plus en détail dans les chapitres suivants, lors de l'analyse des résultats.

1.2 La respiration versus la photosynthèse

La photosynthèse et la respiration sont deux processus biochimiques antagonistes. L'un produit de l'oxygène, l'autre le consomme. Cependant, ces deux phénomènes ont une activité commune : la production d'ATP⁴, intermédiaire métabolique riche en énergie et transporteur d'énergie chimique au sein du métabolisme. La photosynthèse utilise comme source d'énergie les photons de la lumière. La respiration cellulaire fournit de l'énergie à partir de l'oxydation des nutriments présents. Dans les deux cas, le processus de fonctionnement est le même : la conversion d'énergie induit un transfert d'électrons le long d'une chaîne de transport d'électrons jusqu'à un accepteur final (Nicholls et Ferguson, 2013). Le transfert d'électrons se déroule dans un milieu semi-solide, ou du moins un milieu possédant une organisation spatiale, qui est le plus souvent une membrane délimitant différents compartiments cellulaires. Les gradients transmembranaires, en particulier les gradients de pH et de potentiel redox, traduisent la première étape de la conversion de l'énergie. Ces gradients induisent des transferts de composés chimiques entre les différents compartiments qui permettent des biosynthèses, en particulier la régénération des molécules d'ATP, ce qui constitue la deuxième étape du processus de conversion d'énergie.

L'analyse mécanistique de la respiration et de la photosynthèse, suivant un modèle de connaissance, nécessite donc la prise en compte de la compartimentation. Cette méthodologie

d'analyse énergétique a été développée par Sasidharan (2012) pour les végétaux supérieurs. Elle a été reprise et adaptée ici, pour les deux microorganismes photosynthétiques considérés, à partir d'une construction stœchiométrique originale. En effet, que ce soit dans le chloroplaste ou dans la mitochondrie, il existe des différences de pH et de potentiel redox entre les différentes phases de chaque organite.

Pour le chloroplaste, deux compartiments (ou deux phases) sont présents (Figure 1) : la phase P (positive), correspond au lumen du chloroplaste et présente un pH de 4 ; et la phase N (négative), correspond au stroma, avec un pH de 7,5.

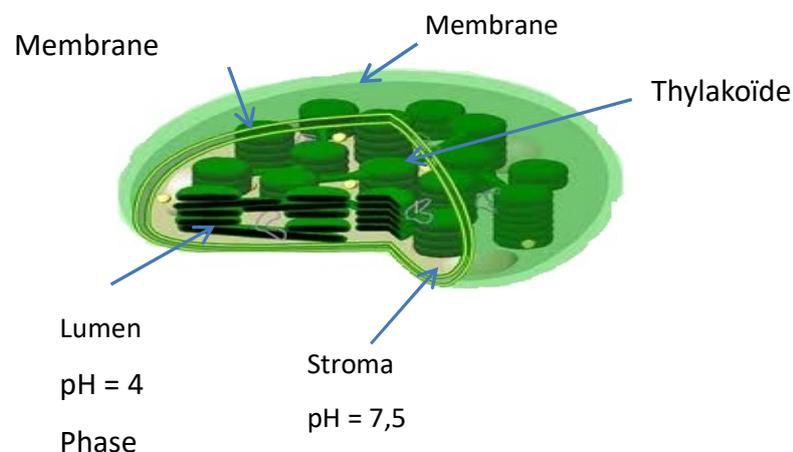


Figure 1 : Représentation schématique du chloroplaste et de ces 2 phases [1]

Pour la mitochondrie (Figure 2), siège de la respiration cellulaire, deux phases sont décrites. La première, la phase P, correspond à l'espace inter-membranaire dont le pH est de 6,5. La seconde, la phase N, est représentée par la matrice de la mitochondrie dont le pH est de 7,5.

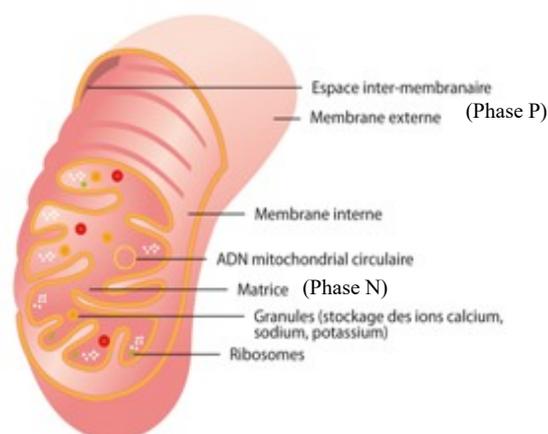


Figure 2 : Schéma d'une mitochondrie et de ces 2 phases [2]

1.2.1 La Photosynthèse

La photosynthèse, réalisée au niveau du chloroplaste, utilise l'énergie lumineuse (les photons) et une source carbonée inorganique pour produire de l'oxygène et de la matière organique. C'est donc un enchainement de réactions dont la première étape est photochimique. Elle se déroule en deux phases (Figure 3) et peut être schématisée sous la forme suivante :

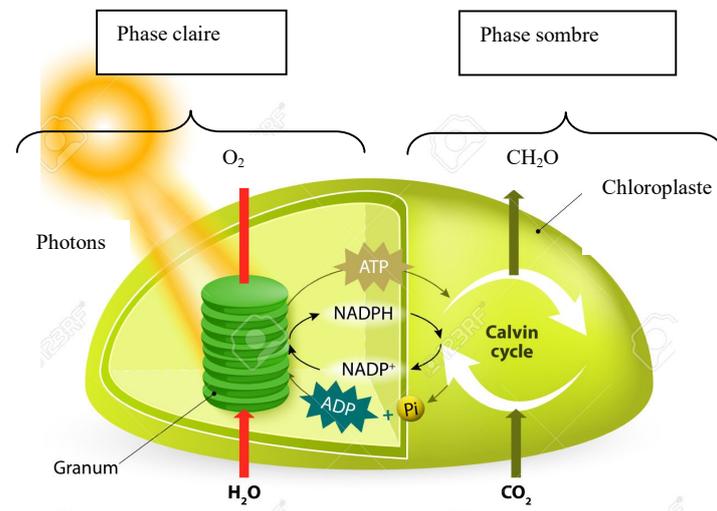


Figure 3 : Schéma des 2 phases de la photosynthèse [3]

La première étape est dépendante de la lumière. Elle est localisée au niveau de la paroi des grana du chloroplaste. Elle correspond à la captation d'énergie lumineuse, c'est-à-dire la captation de photons puis à une photolyse de l'eau afin de produire de l'énergie et des cofacteurs réduits (NADPH, ATP) en utilisant la chaîne de transports des électrons. La seconde phase, dite « sombre » est indépendante de la lumière. Cette phase correspond à l'assimilation du CO_2 et à la production de molécules organiques (CH_2O) notamment lors du cycle de Calvin dans le stroma des cellules. Pour cela, les cofacteurs produits précédemment sont indispensables. Ces deux phases sont donc dépendantes l'une de l'autre.

Ainsi la photosynthèse oxygénique nécessite deux sous unités : le photosystème I (PSI) et le II (PSII), qui sont localisées au niveau de la membrane cellulaire dans le cas des cyanobactéries et de la membrane des thylakoïdes du chloroplaste dans le cas des microalgues. Ces deux photosystèmes possèdent des antennes photosynthétiques : P680 et P700. P680 est le centre réactionnel de la chlorophylle a (chl_a) du PSII et utilise les photons pour réaliser l'oxydation de l'eau et produire de l'ATP. P700, dans le cas du PSI, utilise les électrons produits et les ions H^+ issus du PSII pour réduire le NADP en NADPH. Ainsi le CO_2 atmosphérique peut être transformé en glucose.

De manière plus précise, le PSII est un complexe de protéines dont le cœur est composé de pigments type chlorophylle et β -carotène, reliés aux antennes photosynthétiques. C'est à ce niveau que l'énergie lumineuse sert à exciter les centres réactionnels constitués des protéines D1 (hétérodimère) et D2, afin d'être convertie en cofacteurs nécessaires à l'oxydation de l'eau (au niveau du complexe OEC). De plus, cette étape est indispensable pour permettre un assemblage correct et fonctionnel du cluster manganèse (situé du côté du lumen sur les protéines D1 et D2), lui-même relié aux phéophytines, aux quinones et à l'atome de fer. En effet, lors de l'excitation par les photons, un électron est transféré au donneur primaire (Chl_a) par l'intermédiaire de la phéophytine (accepteur d'électron) jusqu'à la quinone. Ainsi l'oxydation du PSII active la protéine D1 et réduit le P680. Les électrons sont ôtés du complexe manganèse, entraînant une oxydation de l'eau et la formation d'oxygène libre. Le PSI peut ainsi produire le NADPH afin de convertir le CO_2 en glucose à partir des électrons libérés.

Cependant, compte tenu de l'importance de la photosynthèse dans la modélisation et la compréhension du fonctionnement des microorganismes photosynthétiques, le mécanisme de fonctionnement du chloroplaste, représenté sur la Figure 4, sera détaillé d'un point de vue énergétique dans le chapitre 3.

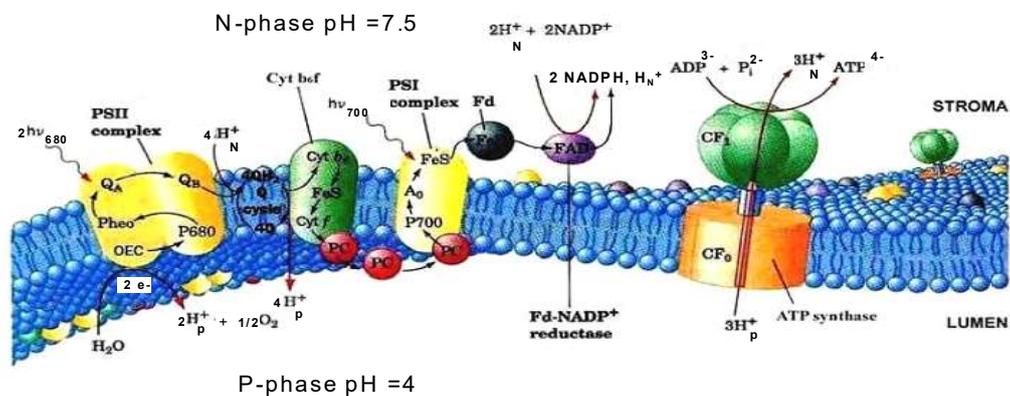


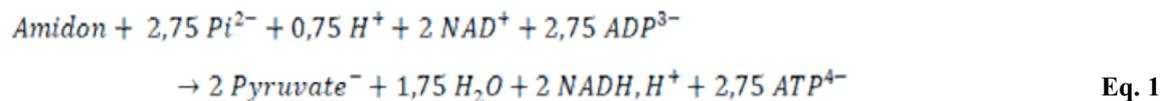
Figure 4 : Chaîne de transport des électrons lors de l'assimilation des photons dans le chloroplaste (Voet & Voet, 2005) (PS : photosystème ; PC : phycocyanine ; Cyt : cytochrome ; Pheo : phéophytine ; e^- : électron ; $h\nu$: photon ; O_2 : oxygène ; P_i : phosphate inositol ; OEC : complexe d'oxydation de l'eau ; N-phase : phase négative (stroma) ; P-phase : phase positive (lumen) ; Fd : ferrédoxine ; H_2O : eau)

1.2.2 La respiration

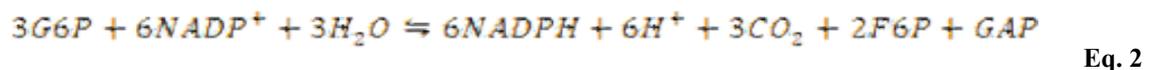
La respiration cellulaire, située au niveau des mitochondries, utilise l'énergie issue de la dégradation de composés organiques en dioxyde de carbone. Elle regroupe trois voies

majeures : la glycolyse, la voie des pentoses-phosphates et le cycle de Krebs, ainsi qu'un enchainement de phosphorylations oxydatives. A partir d'une construction stœchiométrique originale, la méthodologie développée par Sasidharan (2012) permet d'obtenir des équations stœchiométriques simplifiées adaptées aux microorganismes photosynthétiques, qui sont présentées ci-dessous.

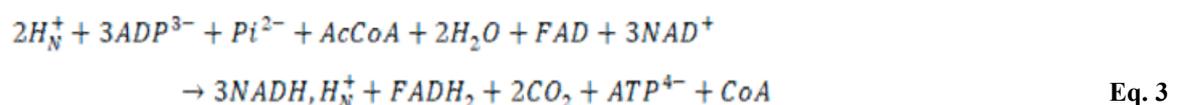
La voie métabolique de la glycolyse est responsable de la conversion du glucose, via le fructose-1,6-bis-phosphate, en pyruvate et de la régénération de l'ATP et du NADH. C'est une succession de réactions enzymatiques qui ont lieu au niveau du cytoplasme de la microalgue. Dans certains cas, la glycolyse permet de dégrader un polysaccharide de réserve (constitué d'un enchainement d'unités de type glucose) comme l'amidon (cas de *Chlamydomonas reinhardtii*) ; l'équation synthétique de dégradation s'écrit alors :



La voie des pentoses phosphates permet la formation de NADPH en oxydant du glucose. C'est une voie alternative à la glycolyse qui se résume sous la forme suivante :



Le cycle de Krebs est responsable de l'oxydation des substrats, dans la matrice interne de la mitochondrie. Le point d'entrée est l'acétyl-CoA. Le cycle de Krebs produit essentiellement des cofacteurs réduits, du CO₂ et de l'ATP. Il peut être résumé sur le plan stœchiométrique comme suit :



Enfin, les phosphorylations oxydatives permettent la synthèse endergonique d'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique (Pi). Cette voie est couplée à la chaîne de transport des électrons (complexe 5) dans la matrice mitochondriale (Figure 5). Elle nécessite une conservation de l'énergie par un couplage énergétique entraînant la formation d'un gradient de protons entre la matrice et l'espace inter-membranaire, c'est-à-dire entre les deux phases décrites précédemment.

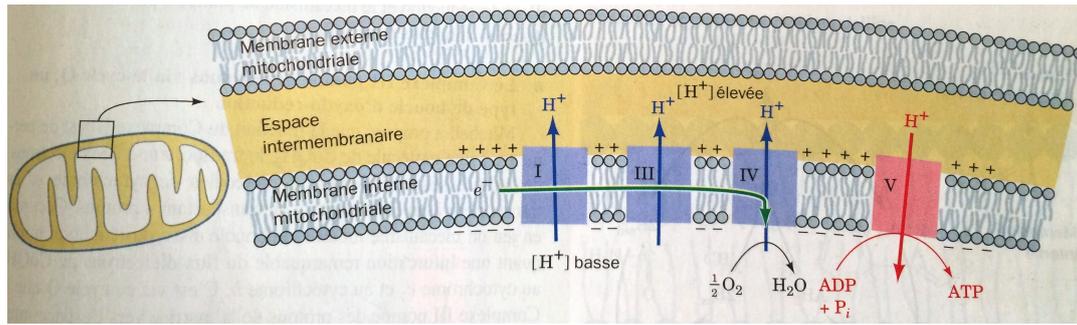
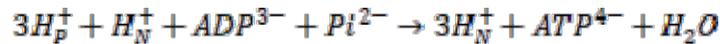


Figure 5 : Couplage entre le transport des électrons et la synthèse d'ATP (Voet et Voet, 2005)

Cela entraîne une différenciation des protons de chaque phase, à savoir H_N pour la matrice (phase N) et H_P pour l'espace inter-membranaire (phase P). Le fonctionnement de l'ATPase est décrit stœchiométriquement comme suit :



Eq. 4

1.3 Les microalgues

1.3.1 Généralités

Les algues sont des organismes vivants dans des milieux aquatiques ou humides. Ces organismes sont photosynthétiques puisqu'ils fixent le gaz carbonique (CO_2) et génèrent du dioxygène (O_2). De ce fait, les algues sont à l'origine de la production de 50 à 70 % de l'oxygène terrestre. Constituées d'une paroi cellulaire, d'un noyau et de plastides contenant des pigments, elles peuvent être classées selon leur pigmentation (Figure 6). Ainsi, on distingue les algues rouges contenant majoritairement de la phycoérythrine ; les vertes, de la chlorophylle ; et les bleues, de la phycocyanine (Prescott, 1969). Elles se distinguent des autres végétaux par la présence d'un thalle, appareil végétatif uni- ou pluricellulaire (El Gamal, 2010). Les algues représentent une grande diversité morphologique et taxonomique. Mesurant de 2 micromètres à plus de 60 mètres de longueur (Barsanti *et al.*, 2006), elles sont généralement classifiées en micro- et macro-algues. Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux microalgues, plus particulièrement dans des conditions de culture en photobioréacteurs.

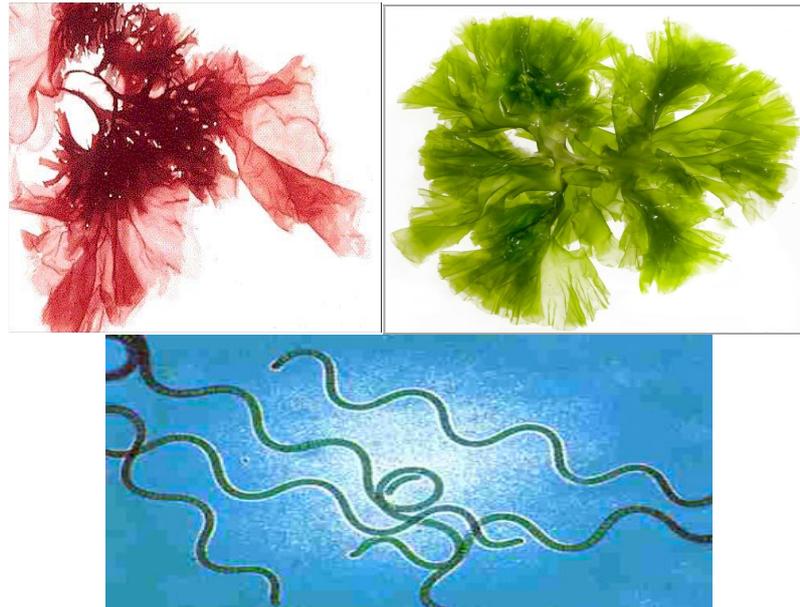


Figure 6 : Exemple d'algue rouge (*Porphyra*) [4], verte (*Ulva*) [5] et bleue (*Arthrospira platensis*) [6]

Les microalgues sont des algues microscopiques, de formes variables. Aussi appelées phytoplanctons, elles sont à la base de la chaîne alimentaire. Elles transforment, via la photosynthèse, le carbone minéral en carbone organique, et secrètent ainsi des macronutriments. Elles peuvent croître en eau douce ou en milieu marin, et elles sont classées en fonction de leur couleur provenant de leurs pigments majoritaires. Ainsi, on distingue (Figure 7) les microalgues vertes (*Chlorophyceae*) des microalgues rouges (*Rhodophyceae*).

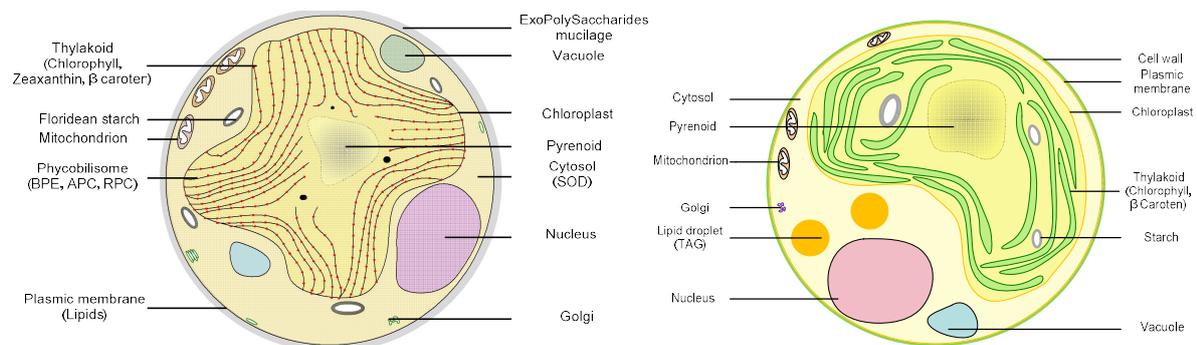


Figure 7 : Physiologie d'une microalgue rouge (à gauche) et d'une microalgue verte (à droite) (Pignolet *et al.*, 2013)

1.3.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

La microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* est un microorganisme photosynthétique de couleur verte appartenant à la classe des *Chlorophyceae*. Cette coloration est due à la présence d'un pigment photosynthétique, la chlorophylle, située au niveau de la membrane des thylakoïdes du chloroplaste. C'est un organisme eucaryote modèle vivant dans les eaux

douces, largement décrit dans la littérature d'un point de vue génétique (Merchant *et al.*, 2007), structurale et métabolique (Harris, 2009).

De forme ovoïde et de structure polaire, elle mesure environ 10 micromètres de long. *Chlamydomonas reinhardtii* (Figure 8) possède la particularité d'être mobile grâce à une paire de flagelles antérieurs. Elle contient un unique chloroplaste basal, siège de la photosynthèse, représentant environ 40 % du volume total de la cellule (Schötz *et al.*, 1972) et entourant le noyau. Elle est également constituée de 2 vacuoles contractiles, dont les contractions dépendent des conditions de cultures (rythme des contractions et synchronisation des vacuoles). Chaque cellule comporte plusieurs mitochondries, sièges de la respiration cellulaire, situées en périphérie de la cellule. C'est au cœur de ces mitochondries qu'ont lieu les réactions de phosphorylations oxydatives (au niveau de la membrane interne) et le cycle de Krebs (au niveau de la matrice).

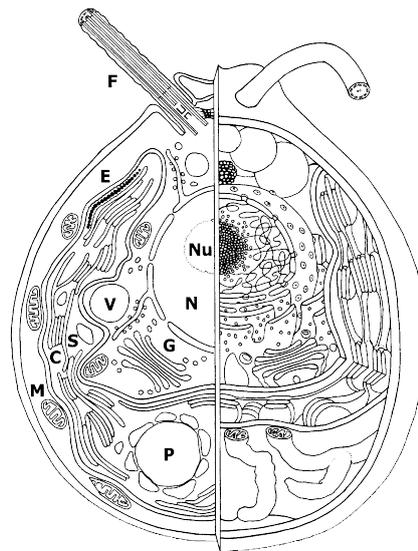


Figure 8 : Structure cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii* en 2D et 3D

Avec : un noyau central (*N*) entourant le nucléole (*Nu*), la paire de flagelles (*F*), le chloroplaste ellipsoïde (*C*), le stigma (*E*), le pyrénoïde (*P*) entouré de grains d'amidon (*S*), les mitochondries (*M*), l'appareil de Golgi (*G*), et la paire de vacuoles (*V*) (Nickelsen et Kück, 2000)

L'intérieur du chloroplaste est de structure laminaire, dite granum ; en effet, il est constitué d'un assemblage de plusieurs thylakoïdes, contenant les pigments photosynthétiques, comme les caroténoïdes ou les chlorophylles. Ces pigments sont les éléments de base du transfert d'énergie le long de la chaîne photosynthétique de transport des électrons, en transformant l'énergie lumineuse (les photons) en énergie chimique et en couples réducteurs (NADPH, NADH, ATP).

Le chloroplaste est aussi composé d'un ou plusieurs pyrénoides, zone de stockage enzymatique. Ce pyrénouide contient notamment l'enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase, appelée RuBisCO, responsable de la fixation du dioxyde de carbone et de la formation de composés organiques dans le cycle de Calvin. C'est en périphérie de ces pyrénoides que s'accumulent les grains d'amidon dont la quantité est variable selon les conditions de culture (Lemasson, 2015).

1.4 Les cyanobactéries

1.4.1 Généralités

Les cyanobactéries appartiennent à la classe des *Cyanophyceae*, représentées par environ 150 genres et 7500 espèces. Longtemps considérées comme algues (eucaryotes) du fait de leur caractéristique photosynthétique, celles-ci sont en fait des procaryotes et ne possèdent donc pas de noyau. Elles présentent une grande diversité morphologique. Certaines sont unicellulaires, sphériques ou en bâtonnets (Kumar *et al.*, 2016) et se multiplient par divisions binaires ; d'autres sont filamenteuses et se propagent par rupture du filament végétatif ou par germination des akinètes (spores). Certaines peuvent différencier des cellules spécialisées, telles que les hétérocystes, les akinètes et les hormogonies. Les formes les plus complexes possèdent trois types de cellules : des cellules végétatives, des hétérocystes (responsables de la fixation de l'azote) et des akinètes.

Compte tenu de cette hétérogénéité, une majorité des écosystèmes terrestres ou aquatiques sont colonisés par ces microorganismes. On en trouve également dans des milieux extrêmes (chauds, très salés et alcalins). Il existe des formes terrestres et marines, libres et symbiotiques.

Les cyanobactéries ont une paroi entourée de mucilage (lipopolysaccharides), qui joue un rôle de protection de l'environnement et de définition de la forme de la cellule. Principalement composée de peptidoglycanes, elle peut être soit gram-positive soit gram-négative. Ces deux types de paroi sont différenciables par leur structure. En effet, les microalgues gram-positives sont constituées d'une monocouche homogène de peptidoglycanes entourant la membrane plasmique qui est une bicouche de phospholipides polaires (hydrophile/hydrophobe). Une paroi cellulaire gram-négative est plus complexe du fait qu'elle possède en périphérie de la couche de peptidoglycane une membrane externe épaisse (7-8 nm), formant entre ces deux

composants un espace périplasmique qui est composé d'un réseau très lâche de peptidoglycane ainsi que de protéines telles que des enzymes.

Les cyanobactéries sont composées d'un chromatoplasme et d'un centroplasme. Le chromatoplasme, coloré, correspond à la zone de réalisation de la photosynthèse. C'est ici que se trouvent les thylakoïdes et les pigments. Le centroplasme est incolore, c'est là que se trouvent le carboxysome pour la fixation du CO₂ par l'enzyme RuBisCO, le nucléoïde et les ribosomes (Figure 9).

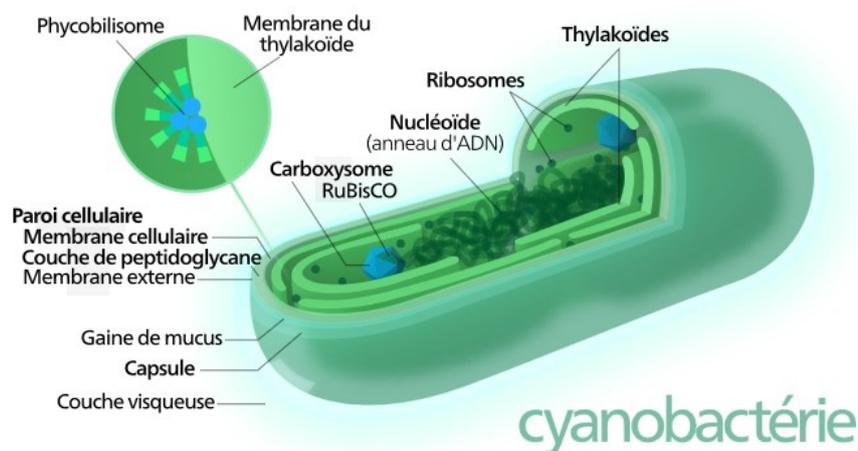


Figure 9 : Schéma d'une cyanobactérie [7]

Les cyanobactéries sont principalement utilisées dans l'industrie cosmétique, mais aussi dans l'alimentation animale et humaine, pour le recyclage atmosphérique (fort rendement de conversion) ou comme fertilisants naturels. Il existe un intérêt accru pour l'utilisation de ces microorganismes dans différentes productions, sachant que le contrôle et l'intensification des procédés de production est un domaine en plein essor (Matsudo *et al.*, 2009 ; Rodrigues *et al.*, 2010, Carvalho *et al.*, 2004).

1.4.2 *Arthrospira platensis*

Parmi ces cyanobactéries, *Arthrospira platensis*, communément appelée Spiruline, est de forme spiralée et multicellulaire (cellules cylindriques d'environ 6 à 12 µm de diamètre). Retrouvée dans les eaux alcalines du lac Tchad (Afrique), c'est un microorganisme procaryote, largement décrit dans la littérature (Rossi *et al.*, 2004 ; Markou *et al.*, 2012 ; Carvalho *et al.*, 2004). Il a été découvert en 1844 pour la première fois, par Wittrock et Nordstedt. C'est une cyanobactérie de type gram négative, sous forme de trichomes assemblés

en hélice d'environ 30 à 70 μm de diamètre et 200 à 500 μm de long. On la retrouve plus ou moins spiralée en fonction de son état et des conditions de culture (Figure 10).

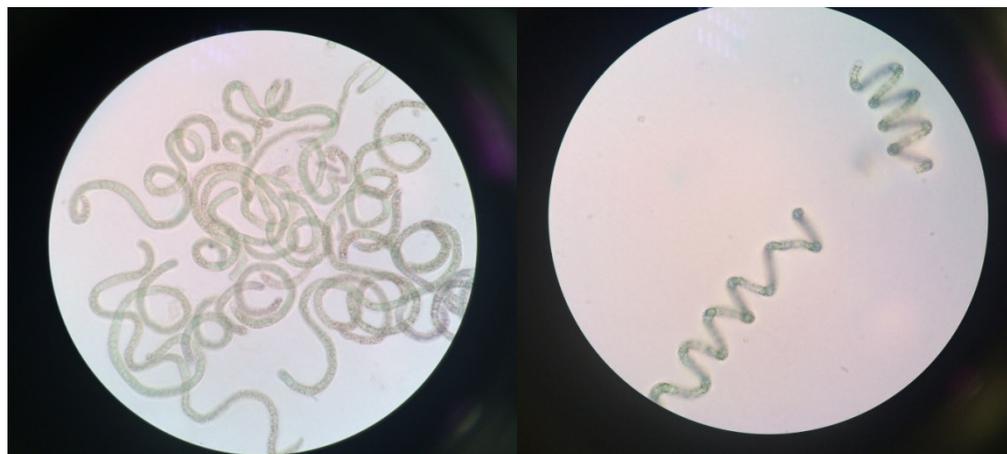


Figure 10 : Photographie d'*Arthrospira platensis*, observées au microscope optique x100

Arthrospira platensis possède une paroi cellulaire composée de mucopolymères et d'exopolysaccharides (Fox, 1999). Cet exopolysaccharide (EPS) est un polysaccharide sulfaté lié à des acides uroniques (environ 40 %). La composition de cet EPS est variable selon les conditions de culture. Sa quantité est fonction du flux lumineux appliqué ; elle augmente avec l'augmentation du flux lumineux. En effet, sa production est couplée à la croissance cellulaire (Filali Mouhim *et al.*, 1993). C'est un EPS qui montre un comportement pseudoplastique non-newtonien (Cornet, 1992).

Arthrospira platensis présente des vacuoles, qui sont responsables de la capacité de flottaison de l'organisme. En effet, la remontée des cellules se fait naturellement en direction de la surface là où la concentration en dioxygène dissous est la plus élevée et où davantage de lumière est disponible. Les vacuoles jouent donc un rôle sur l'aptitude à se déplacer et à réaliser des migrations verticales ascendantes par poussée d'Archimède. La taille des vacuoles intervient de fait sur la capacité à éviter les phénomènes de décantation de façon à rapprocher les microorganismes des zones lumineuses. Il y a donc une certaine forme (incomplètement décrite) d'adaptation et de couplage entre la taille et l'importance des vacuoles, l'intensité de la photosynthèse et les besoins métaboliques. Il a été montré que la taille des vacuoles diminue lorsque la photosynthèse est intense, ce qui a pour effet d'éloigner les microorganismes de la surface. De même, en période diurne, les cellules sédimentent (action de la gravité) à cause du dégonflement de vacuoles gazeuses. Lors d'une phase photosynthétique trop intense, la pression interne de la cellule augmente en raison de

l'augmentation de la quantité d'hydrates de carbone et de la production de chaleur, en particulier par les réactions photochimiques.

Lorsque la phase photosynthétique est active, le cycle de Calvin fonctionne et la quantité de CO₂ sous forme gazeuse diminue, ce qui a pour rétro-effet de diminuer la taille des vacuoles. Il est à noter que l'oxygène généré diffuse à travers les parois cellulaires, alors que pour le CO₂, il existe un effet pH qui conduit à considérer que, lorsque la photosynthèse est active, le pH a tendance à augmenter. Ceci qui a pour effet d'augmenter la solubilité du CO₂ total en augmentant la proportion de bicarbonate dissous.

A l'inverse, lorsque la photosynthèse est limitée, le pH cytosolique diminue, ce qui a pour effet de générer du CO₂ et des hydrates de carbone, ceci augmentant la taille des vacuoles produisant ainsi un allègement de la cellule, lui permettant un mouvement ascendant dans le milieu.

Ainsi, la flottabilité est augmentée par le manque de CO₂ (augmentation de la pression) et diminuée par la quantité d'hydrates de carbone (Dinsdale et Walsby, 1972).

1.5 Utilisations des microalgues

L'utilisation des microorganismes photosynthétiques est très variée. Ils sont producteurs de nombreuses molécules d'intérêt, parfois à haute valeur ajoutée (HVA). La qualité et la quantité des composés d'intérêt sont propres à chaque espèce de microorganismes. En effet, selon la propriété mise en avant et l'industrie qui les emploie, les microalgues peuvent être utilisées et fractionnées comme biocarburants, colorants, compléments alimentaires, texturants, etc. mais aussi dans le fonctionnement cellulaire global peut avoir un intérêt en tant que tel, comme par exemple en utilisant la photosynthèse pour le recyclage de l'atmosphère (eg. Projet MELiSSA, décrit dans ce chapitre, au §3.2.1)

1.5.1 Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères de monosaccharides liés par des liaisons acétal ; ce sont des hydrates de carbone complexes. Selon leur degré de polymérisation, ils peuvent être classés en oligosaccharides (moins de 10 monomères constitutifs) ou en polysaccharides (plus de 10 monomères). Ils peuvent être classés en au moins quatre catégories : les polysaccharides de structure comme la chitine ; les polysaccharides de communication cellulaire, par exemple

le dermatane-sulfate qui est un glycosaminoglycane (GAG) de la matrice extracellulaire ; les polysaccharides extracellulaires (EPS) qui auraient un rôle de protection de la cellule ; et les polysaccharides de réserves énergétiques tels que l'amidon ou le glycogène. Ils diffèrent par leur composition en oses, la longueur de leur chaîne et le nombre d'embranchement qu'ils possèdent.

Les polysaccharides des microalgues sont divers et peuvent représenter jusqu'à 50 % du poids sec des microalgues (Ho *et al.*, 2012). Ces polysaccharides sont principalement des glucides de réserve (amidon chez les eucaryotes, glycogène chez les procaryotes) et des sucres de parois (cellulose et hémicellulose), pouvant être utilisés pour la production de bioéthanol et d'hydrogène (John *et al.*, 2011). C'est le cas par exemple de l'amidon présent dans le cytoplasme de *Chlamydomonas reinhardtii*. L'accumulation intracellulaire de l'amidon est principalement liée à des facteurs environnementaux et sa fonction principale est de tenir lieu de stockage de carbone à l'intérieur de la cellule. Lorsqu'il est mobilisé dans certaines conditions métaboliques, son utilisation est indirecte. L'accumulation de l'amidon permet alors de produire des molécules secondaires tel que le dihydrogène (Projet ANR AlgoH2, CH2 ; Lemasson, 2015) lorsqu'on modifie les conditions de culture.

Certaines souches ont également la particularité d'excréter des polysaccharides (EPS), que l'on retrouve sous forme libre dans le surnageant de culture, ou sous forme liée à la membrane cellulaire. Ainsi *Porphyridium cruentum*, comme d'autres microalgues rouges, est entourée d'une matrice gélatineuse appelée mucilage. Si les sucres de réserve et de paroi sont majoritairement constitués de glucose, en revanche, les EPS présentent des compositions en monosaccharides plus complexes (fréquemment 5 ou 6 monosaccharides différents). Les monosaccharides neutres majoritaires sont souvent le xylose, le galactose et le glucose, mais il est également fréquent de rencontrer de l'arabinose, du rhamnose ou du mannose. Enfin, des teneurs parfois importantes en acides uroniques sont généralement mesurées (Delattre *et al.*, 2016, Soanen *et al.*, 2016, Geresh *et al.*, 2002).

Ces polysaccharides peuvent également porter des esters sulfatés. Ainsi, en fonction de la composition en monosaccharides et de leur degré de sulfatation, les polysaccharides pourront présenter des activités biologiques et être utilisés comme agents antioxydants, anti-tumoraux, anti-coagulants, anti-inflammatoires ou encore comme anti-viraux (Kim *et al.*, 2012, Matsui *et al.*, 2003, Sakamoto *et al.*, 2003, Gardeva *et al.*, 2009, Huheihel, 2001). Certains polysaccharides de *Porphyridium* entrent dans la préparation de la composition d'un visco-

supplément destiné au traitement de l'arthrite (Arad et Atar, 2007). De ce fait, les polysaccharides sont des composés à haute valeur ajoutée, possédant de nombreuses applications dans l'alimentation (Dewapriya et Kim, 2014, Ensing *et al.*, 2014), les cosmétiques, la pharmacie, les textiles, les stabilisants, les émulsifiants, les épaississants (Arad et Levy-Ontman, 2010).

Arthrospira platensis possède un polysaccharide de surface complexe. C'est un hétéro-polymère anionique sulfaté contenant une partie protéique (Pignolet *et al.*, 2013). C'est un polysaccharide aux propriétés intéressantes puisqu'il possède un comportement rhéologique pseudoplastique non-newtonien et des propriétés biologiques (anti-coagulant, anti-thrombotique, anti-oxydant) (Raposo *et al.*, 2013, Majdoub *et al.*, 2009, Chaiklahan *et al.*, 2013). Si certains EPS sont synthétisés principalement en conditions de carence en azote (Delattre *et al.*, 2016), d'autres comme celui d'*Arthrospira platensis* sont produits et même temps que la biomasse, avec un rendement de production qui augmente avec le flux lumineux appliqué (Cornet, 1992).

1.5.2 Les protéines

Les protéines issues des microorganismes photosynthétiques sont utilisées dans l'alimentation humaine en complément alimentaire, dans l'aquaculture pour un apport protéique non animal, et dans l'alimentation animale. Les microalgues possèdent souvent un contenu protéique important dont le taux dépend des conditions de culture.

Arthrospira platensis est considérée comme une source de protéines bien équilibrée pour l'alimentation humaine. Du fait de sa richesse en protéines, représentant jusqu'à 70 % de son poids sec, elle est actuellement utilisée comme complément alimentaire (Becker *et al.*, 2007). La composition en acides aminés (AA), constituant la partie protéique de la biomasse d'*Arthrospira*, suit la répartition présentée dans le Tableau 2. Cependant, ne sont pas inclus la cystéine (0,9 g/100 g) et le tryptophane (0,3 g/100 g ; FAO 1 g/100 g). Ainsi, les protéines de la spiruline apportent un pourcentage non négligeable en acides aminés essentiels puisqu'ils peuvent couvrir la quasi-totalité des besoins recommandés par la FAO (Food and Agriculture Organisation, soit l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture). Pour exemple, les acides aminés phénylalanine et tyrosine apportent plus de 73 % des apports recommandés par la FAO (Sguera, 2008).

Tableau 2 : Composition en AA retrouvés en g pour 100 g de protéines chez *Arthrospira platensis* (Becker, 2007) comparée aux valeurs de référence recommandées (FAO, 1973)

Acide aminé	FAO	Becker	Acide aminé	FAO	Becker
Asparagine	-	11,8	Méthionine	3,5	2,5
Thréonine	-	6,2	Isoleucine	4	6,7
Serine	-	5,1	Leucine	7	9,8
Glutamine	-	10,3	Tyrosine	-	5,3
Proline	-	4,2	Phénylalanine	6	5,3
Glycine	-	5,7	Histidine	-	2,2
Alanine	-	9,5	Lysine	5,5	4,8
Valine	5	7,1	Arginine	-	7,3

Par ailleurs, les protéines de la spiruline présentent une bonne digestibilité (Dillon et Phan, 1993). Cette caractéristique peut être déterminée par le calcul de l'efficacité protéique (PER). Ce PER se calcule comme le rapport : gain de poids de l'animal ou de l'individu / poids de protéines ingérées. Les protéines de référence sont la lactalbumine ou la caséine, lesquelles présentent un PER de 2,5. La spiruline seule, au cours d'expériences menées sur le rat, a un PER de 1,90, tandis qu'accompagnée de riz dans une proportion égale, cette valeur s'élève à 2,40 (Anusuya *et al.*, 1983).

1.5.3 Les lipides

Les lipides présents chez les microalgues sont principalement des lipides dits de réserve. Ils sont majoritairement polaires, comme par exemple les phospholipides ou glycolipides, et sont retrouvés au niveau de la membrane des thylakoïdes du chloroplaste. On retrouve aussi des lipides de stockage neutres tels que les triglycérides, localisés au niveau des vacuoles (Hu *et al.*, 2008). La composition des lipides contenus dans les microalgues est fonction du procédé de culture et de l'espèce sélectionnée.

Ces lipides sont majoritairement utilisés pour produire des carburants de troisième génération. En effet, le biodiesel est produit par transestérification des triglycérides avec du méthanol en présence d'un catalyseur. Certains lipides, les acides gras insaturés, peuvent aussi être utilisés dans l'industrie alimentaire. Certaines microalgues synthétisent également des acides gras à chaînes longues comme les oméga 3 tel que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) ou l'acide docosahexaénoïque (DHA) (Yen *et al.*, 2012), leur ouvrant des débouchés en tant que

compléments alimentaires santé. L'acide γ -linoléinique est l'acide gras essentiel majoritairement retrouvé dans les microalgues, et plus particulièrement chez *Arthrospira*. C'est un précurseur des prostaglandines (médiateur lipidique).

1.5.4 Les pigments

Les pigments sont des complexes moléculaires capables d'absorber le rayonnement lumineux en absorbant à une certaine longueur d'onde. C'est le point d'entrée du rayonnement électromagnétique, sachant que l'énergie absorbée est convertie en intermédiaires métaboliques par une cascade de réactions qui seront détaillées plus loin.

Les principaux pigments retrouvés dans les microalgues sont les chlorophylles, les caroténoïdes et des phycobiliprotéines tels que les phycoérythrine et les phycocyanines. Ces pigments sont utilisés dans l'industrie, comme colorants alimentaires naturels, ainsi que dans la fabrication de cosmétiques, notamment pour les rouges à lèvres et eyeliners (Dainippon Ink and Chemicals, 1985 ; Arad et Yaron, 1992) pour remplacer les colorants synthétiques qui peuvent parfois s'avérer dangereux pour la santé. De plus, grâce à leur propriété de fluorescence, certains pigments sont utilisés pour développer des sondes pour les diagnostics immunologiques (Kronick et Grossman, 1983).

Les chlorophylles sont des pigments verts, localisés au niveau de la membrane des thylakoïdes. Il existe trois principales catégories de chlorophylles sur cinq existantes, les a, b et c. Elles sont différenciées par la composition de leur chaîne carbonée entourant leur ion Mg^{2+} central.

Les phycobiliprotéines sont des protéines polymériques naturelles, contenues dans une structure cellulaire spécifique : le phycobilisome, et extraites de cyanobactéries et d'algues rouges. Elles constituent les pigments accessoires de la photosynthèse en complément de la chlorophylle, puisqu'elles absorbent dans des domaines de longueurs d'ondes faiblement utilisées par la chlorophylle. En effet, les phycobiliprotéines absorbent l'énergie lumineuse incidente, transfèrent cette énergie d'excitation lumineuse au centre réactionnel photosynthétique qui transforme cette énergie en énergie chimique. Ainsi les phycobiliprotéines sont divisées en trois classes, selon leur spectre d'absorption : l'allophycocyanine ou APC (650-655 nm), les phycocyanines ou PC (610-620 nm), les phycoérythrine ou PE (540-570nm) (Voet et Voet, 2005).

Parmi les phycobiliprotéines, la phycoérythrine est un pigment de couleur rouge qui peut être elle-même divisée en 3 sous classes, visibles sur un spectre d'absorption. En effet, la β -phycoérythrine (B-PE) affiche des pics spécifiques à 545 et 565 nm (Tang *et al.*, 2016), la R-phycoérythrine (R-PE) à 499 et 565 nm (Malairaj *et al.*, 2016), et enfin la C-phycoérythrine (C-PE) à 565nm (Marcati *et al.*, 2014).

La β -phycoérythrine présente une coloration intense rose, aussi observable sous UV (coloration jaune). Par conséquent, la B-PE est particulièrement utilisée pour son large coefficient d'absorption et ses propriétés de fluorescence comme élément de détection (marqueurs fluorescents) dans les biocapteurs (Ayyagari *et al.*, 1995).

Les phycocyanines sont des phycobiliprotéines composées de 2 sous unités. Ce sont les pigments majoritaires des cyanobactéries. Elles sont retrouvées dans le système photosynthétique d'*Arthrospira platensis*, au niveau de la membrane lipoprotéique des thylakoïdes et elles sont responsables de la couleur bleu-vert de ces microorganismes. Ces protéines jouent le rôle d'antennes de captation des photons sur le photosystème II. La phycocyanine C présente des propriétés thérapeutiques remarquables ; elle possède des propriétés antioxydantes et peut être utilisée comme marqueur fluorescent biomédical. Par ailleurs, la phycocyanine de la Spiruline protégerait les reins de la toxicité induite par le mercure (Yen *et al.*, 2013). L'utilisation de ces pigments est également très développée en industrie alimentaire comme colorants naturels.

Enfin, les caroténoïdes sont considérés comme des pigments accessoires chez les microalgues et sont également situés au niveau de la membrane des thylakoïdes. Ils regroupent les pigments tels que les carotènes (β -carotènes) et les xanthophylles. Ils peuvent ainsi être rouge, orange, jaune ou violet. Leur accumulation dans les microalgues est généralement due à un stress de type photo-oxydatif (Hu *et al.*, 2008).

2 Cultures de microalgues

La culture de microorganismes dans des espaces maîtrisés conduit à l'optimisation de la production de la biomasse ou de molécules dites à haute valeur ajoutée. Pour cultiver les microorganismes photosynthétiques, il est donc nécessaire de mettre en place des systèmes de production contrôlés de façon à intensifier la production.

2.1 Modes de production existants

Il existe deux alternatives possibles pour la culture de micro-organismes photoautotrophes : les raceway (système de bassins ouverts) et les photobioréacteurs (PBR).

2.1.1 Culture en bassins ouverts ou raceway

Un bassin ouvert (raceway) est typiquement de forme ovale, ouvert vers l'extérieur et possédant un système d'agitation, souvent une roue à aubes, pour limiter la sédimentation et faire circuler l'eau dans le canal (Figure 11).



Figure 11 : Culture de microalgues rouges, vertes et bleues en bassin ouvert [8]

Ce type de système de culture est déjà appliqué à grande échelle, mais nécessite des conditions climatiques favorables. Le contact direct avec l'environnement extérieur engendre un risque de contamination de la culture important. Il s'avère donc indispensable de cultiver des souches à croissance rapide afin de limiter ces contaminations. Certaines plateformes de production de microorganismes photosynthétiques sont équipées de raceways sous serre. L'avantage est de permettre un contrôle de la température. Enfin, les bassins ouverts possèdent un avantage majeur, ils sont beaucoup moins coûteux que les PBR.

2.1.2 Culture en réacteurs extérieurs

D'autres types de systèmes de production en extérieur existent, notamment les réacteurs tubulaires. La culture circule à l'aide de pompes dans des tubes de faible diamètre. Ils ont l'avantage de limiter les contaminations, étant complètement clos, et de bénéficier d'une meilleure accessibilité de la lumière pour les cellules, l'épaisseur de culture étant beaucoup plus faible. Néanmoins, ils nécessitent les mêmes conditions climatiques favorables que la

culture en bassin ouvert, et sont souvent de plus petite capacité, car présentant une surface éclairée plus importante. Certains projets, tel que le BIQ House (à Hambourg en Allemagne), ont développé l'utilisation de photobioréacteurs en façade de bâtiments, apportant de nombreux intérêts écologiques, notamment sur l'utilisation de la chaleur et des biogaz émis. Les réacteurs extérieurs nécessitent cependant d'être utilisés dans des zones climatiques favorables.

2.1.3 Culture en photobioréacteur

Le photobioréacteur (PBR) est un espace clos, dont les variables de culture (irradiance, température, pH, contaminations...) sont contrôlées. Le contrôle de l'éclairage est un élément indispensable au bon déroulement de la croissance des microorganismes de type photosynthétiques (algues ou cyanobactéries).

Les PBR peuvent utiliser un éclairage solaire ou une lumière artificielle. Dans ce cas, l'illumination (flux de photons) est généralement réalisée en continu, et contrôlée en intensité (souvent exprimée en micromoles de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Seule une partie du spectre lumineux est utilisable par les microorganismes photosynthétiques (appelée le PAR pour Photosynthetically Active Radiation) avec des longueurs d'ondes comprises entre 400 et 700 nm. La quantité de $\mu\text{moles de photons}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ peut aussi être exprimée en $\text{W}.\text{m}^{-2}$, avec, dans le cas de la lumière blanche, un facteur de conversion de $0,22 \text{ J}.\mu\text{mol}_{\text{hv}}^{-1}$, soit un facteur de 4,6 pour convertir les $\text{W}.\text{m}^{-2}$ en $\mu\text{moles de photons}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Rochatte, 2016).

Les conditions de culture, à savoir le débit de CO_2 , le pH et la température, sont contrôlées automatiquement. Ce mode de gestion permet donc d'optimiser les performances de production (Lucchetti, 2015).

2.2 Contrôle des cultures en PBR

Le milieu de culture et l'environnement, dans lesquels se trouvent les microorganismes, influencent fortement leur croissance et leur métabolisme.

2.2.1 L'irradiance

L'éclairage de la culture est un point de contrôle essentiel pour la croissance des microorganismes photosynthétiques. Dans les cas des cultures en PBR au laboratoire, la

lumière est artificielle. Elle peut être blanche (lampes halogènes ou panneau de LEDs) ou en LEDs rouges et/ou bleues. Il est possible de modéliser et d'estimer des valeurs seuils entre la respiration cellulaire et la photosynthèse, ainsi que la valeur optimale du flux lumineux à appliquer, en fonction du type d'éclairage, de la forme du réacteur, de la distance entre les lumières et la culture, des surfaces de réfléchissements... Un modèle de transfert radiatif est décrit dans ce chapitre (§7).

La lumière est un élément indispensable à la photosynthèse pour la croissance des cellules dans le PBR, jusqu'à un seuil maximal où apparaît la photo-inhibition (Ritz *et al.*, 2000). Il existe un point de compensation, noté G_c , qui correspond à une irradiance pour laquelle un équilibre est présent entre deux métabolismes majeurs : la photosynthèse et la respiration. En dessous de ce point, pour les organismes autotrophes, l'absence de lumière entraîne la consommation de l'oxygène dissous, aussi appelée respiration.

En effet, plus la lumière est intense plus la croissance cellulaire augmente. Cela reste valable jusqu'au seuil d'irradiance de saturation noté G_s . L'effet de la photopériode (durée de la période d'exposition lumineuse) dépend de l'irradiance à laquelle est exposée la culture. Sous une irradiance inférieure à l'irradiance optimale de croissance (G_s), une augmentation de la durée d'éclairage permet d'augmenter la vitesse de production de biomasse.

Pour des irradiances plus importantes, lorsque le phénomène de photo-inhibition intervient, entraînant une diminution de la croissance, diminuer le cycle d'éclairage permet de diminuer les effets de l'inhibition.

De plus, la composition quantitative et qualitative des pigments photosynthétiques varie avec l'intensité de l'irradiance et le spectre lumineux, notamment pour les microorganismes possédant un phycobilisome (algues bleues et rouges). On observe dans ce cas, une diminution importante des phycobiliprotéines dans les cellules en présence de lumière rouge ($\lambda = 600 - 700 \text{ nm}$) (Farges *et al.*, 2009 ; Rahaoui, 1999 ; Marquardt et Rehm, 1995 ; Akimoto *et al.*, 2012).

Ce phénomène est lié à l'adaptation du système photosynthétique des organismes aux conditions environnementales. Il a été remarqué que, chez la microalgue rouge *Porphyridium cruentum*, la lumière rouge (600 - 700 nm), surtout à faible irradiance, induit, par rapport à la lumière blanche, la diminution de la quantité de phycoérythrine. Lors de l'utilisation d'une lumière blanche ou verte, les quantités de pigments accessoires sont les mêmes puisque les

phycobiliprotéines absorbent principalement les longueurs d'ondes situées dans le vert (Minkova *et al.*, 1996).

Concernant la cyanobactérie *Arthrospira platensis*, Farges *et al.* (2009) ont réalisé des cultures en photobioréacteur en continu durant 5 mois à une irradiance de 135 $\mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en lumière rouge (620 nm), avec un temps de séjour de 62,5 h. L'équipe a montré que ces conditions d'irradiance entraînaient une perte des phycocyanines de 50 %. Ceci s'explique par une possible redirection des électrons du photosystème I vers le photosystème II (absorbant aux alentours de 620 nm). Cependant, il s'avère que ce phénomène est réversible dès lors que l'on modifie le spectre d'émission de la lumière irradiante. L'ajout de LEDs bleues au panneau d'éclairage permet de réactiver le PSI et au bout de 850 heures de culture sous LEDs bleues et rouges, à un flux lumineux de 33 $\mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et avec un temps de séjour de 272 h, l'ensemble du contenu intracellulaire en phycocyanines est retrouvé. En revanche, les pigments chlorophylliens ne sont pas affectés par la modification de la longueur d'onde d'irradiance.

Pour de fortes intensités lumineuses, on observe une augmentation de la quantité de chlorophylles *a* et *b* et de certains caroténoïdes xanthophylles. Les xanthophylles contribuent à la survie de la microalgue en stress lumineux en dissipant l'excès d'énergie absorbée (De Bashan *et al.*, 2008). De plus, il a été constaté que l'irradiance avait des effets sur l'assimilation des substrats. Ainsi, une augmentation de l'irradiance permet d'accroître la vitesse d'assimilation du nitrate par la grande majorité des microalgues mais n'a aucun effet sur l'assimilation de l'azote organique, qui peut donc avoir lieu à l'obscurité (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Le cycle d'éclairage utilisé a aussi un impact sur l'activité photosynthétique et donc sur le métabolisme des microalgues. Plus la phase d'éclairage est longue plus les rendements en biomasse et l'accumulation des lipides seront importants (Reboloso Fuentes *et al.*, 2000). En fonction de la phase dans laquelle se trouvent les microorganismes photosynthétiques, les mécanismes mis en jeu sont différents. La production de glucides est plus importante en présence de lumière et elle servira comme molécule de stockage d'énergie en absence de lumière (respiration). Ce phénomène de stockage de molécules énergétiques est plus amplement détaillé dans le chapitre 3.

2.2.2 La température

Chaque souche de microorganismes possède des paramètres de croissance qui leur sont propres. Le pH et la température sont deux facteurs qui jouent un rôle important dans le bon déroulement d'une culture.

La température a un rôle dans le développement et la croissance cellulaire des microorganismes photosynthétiques. En effet, c'est un facteur influençant les réactions catalysées par les enzymes, du fait de leur thermo-sensibilité. Une augmentation de 10 °C de la température peut doubler la vitesse de la réaction enzymatique, suivie par un ralentissement du métabolisme aux températures de latence dû à la dénaturation protéique, et enfin la mort cellulaire à la température létale (Prescott, 2003). Une température en dessous de la température optimale cause moins de dégâts de structure, En effet, seules les fonctions cellulaires seront affectées. Cependant, les microorganismes n'ont pas tous le même comportement vis à vis de la température. Certains peuvent être psychrophiles, mésophiles, thermo-tolérants, voire hyper-thermophiles.

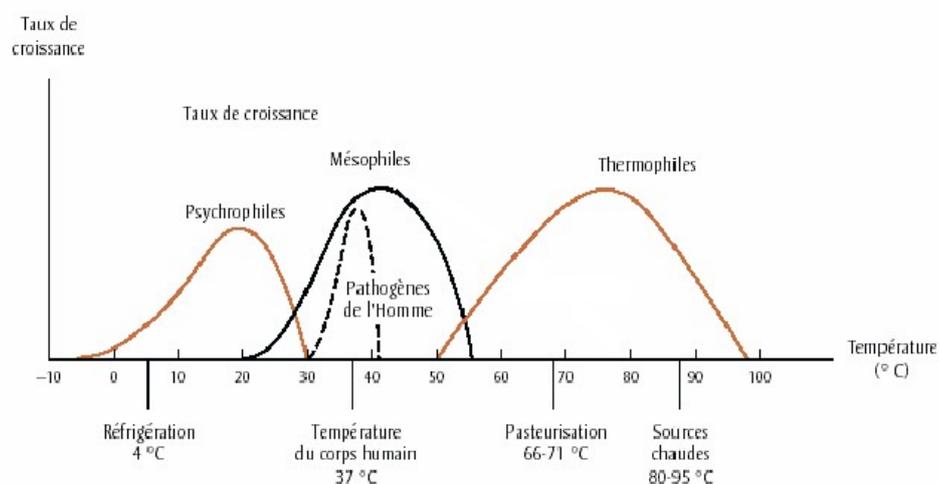


Figure 12 : Influence de la température sur les microorganismes [9]

Les microorganismes psychrophiles (Figure 12) ont une température optimale de l'ordre de 20 °C, mais ils peuvent se développer dans des températures inférieures à 0 °C, comme par exemple *Chlamydomonas nivalis* qui se développe dans une gamme de température allant de -6 °C à 4 °C, ou encore certaines microalgues appartenant au genre *Dunaliella* qui se développent dans des lacs hypersalins de l'Antarctique (Xu *et al.*, 1998).

Les microalgues mésophiles se multiplient à des températures comprises entre 20 et 45 °C (Figure 16). Ce sont les microalgues les plus abondantes en termes de diversité de genres et

d'espèces (*Porphyridium*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*...) ; c'est aussi dans cette catégorie que sont classifiés les agents pathogènes (Prescott, 2003). La microalgue *Celastrella sp.*, est thermo-tolérante et peut se développer à des températures supérieures à 35°C. Elle accumule des pigments (astaxanthine, lutéine, canthaxanthine et bêta-carotène), des triglycérides, et se développe à des températures allant jusqu'à 50 °C avec un optimum de croissance à 45 °C (Hua *et al.*, 2013 ; Huang *et al.*, 2012).

Les microorganismes thermophiles se développent à des températures optimales entre 55 et 65 °C, avec un minimum de 45 °C (Figure 12). Ces organismes, majoritairement procaryotes, possèdent des enzymes beaucoup plus stables et résistantes à la chaleur. C'est par exemple le cas de *Bacillus stearotherophilus*. L'optimum de température de croissance des microorganismes hyper-thermophiles se situe entre 80 et 113 °C. Ce sont des cellules procaryotes relativement rares ; *Pyrolobus fumarii*, est une bactérie retrouvée sur le site TAG en atlantique, au niveau du Fumeur Noir, son optimum est à 106 °C (Blöchl *et al.*, 1997).

Dans le cas d'*Arthrospira platensis*, Cornet (1992) a montré que la température optimale était proche de 36 °C si l'on souhaite obtenir le meilleur rendement photosynthétique et la meilleure cinétique de croissance (Figure 13). Au-delà de cette valeur, on observe un déclin de la productivité en biomasse, couplée à une diminution de l'activité photosynthétique et donc de production d'oxygène. Cette température, de 36 °C, sera celle utilisée dans les différentes cultures réalisées aux cours des travaux présentés dans ce mémoire.

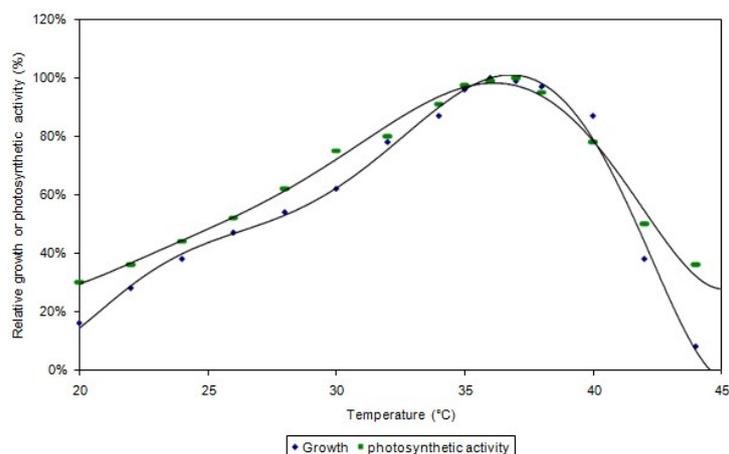


Figure 13 : Courbes de croissance et d'activité photosynthétique chez *Arthrospira platensis* en fonction de la température (d'après Cornet, 1992)

2.2.3 Le pH

De même que pour la température, il existe différents comportements métaboliques et physiologiques de microorganismes en fonction du pH de leur milieu de culture.

Le pH est représentatif de la quantité d'ions hydrogène présent dans l'environnement et est noté entre 0 et 14.

$$pH = -\log [H^+]$$

Eq. 5

Nous reviendrons plus loin sur cette définition en considérant l'activité des ions H^+ plutôt que leur molalité. Pour l'instant, nous pouvons conserver cette définition.

La plupart des microalgues sont alcalophiles et se développent dans des milieux de culture à un pH optimal compris entre 8 et 11,5. Les neutrophiles possèdent un optimum qui s'étend de 5,5 à 8, et les acidophiles de 1 à 5,5. Ainsi, les microalgues du genre *Scenedesmus* peuvent survivre à des variations de pH allant de 5 à 11 mais montrent un optimum de développement pour un pH compris entre 9 et 11. A l'opposé, *Chlamydomonas acidophila* est une microalgue acidophile qui a un pH de croissance compris entre 2 et 9 avec un pH optimal de croissance de 6 (Cuaresma *et al.*, 2006). En cas de variations violentes du pH, les microorganismes sont endommagés, soit au niveau de leur paroi cellulaire, soit au niveau métabolique. Cependant, certains microorganismes ont développé des moyens de protection contre ces variations, tels que des systèmes antiports sodium/proton ou une ATPase transporteuse de protons (Prescott, 2003). Il a aussi été observé que les pH fortement basiques provoquent un phénomène d'autoflocculation (formation d'agrégat par les cellules). Cependant ce phénomène n'interfère pas avec la croissance des microalgues. Le pH n'a pas d'influence notable sur la composition et la production de métabolites tels que les lipides, (Vidyashankar *et al.*, 2013).

La régulation du pH en cours de culture de microorganismes photosynthétiques peut être faite dans un premier temps en modulant l'apport de CO_2 gazeux par bullage dans le milieu de culture (apport en carbonates) ou dans un second temps de manière plus drastique en injectant un tampon dans le milieu (acide ou base).

Ainsi, chaque souche de microorganismes possède des paramètres de croissance qui leur sont propres. Le pH et la température sont deux facteurs qui jouent un rôle important dans le bon déroulement d'une culture. Pour *Arthrospira platensis*, la gamme de température pour une croissance optimale se trouve entre 36 et 40 °C et dans une gamme de pH allant de 8 à 10. En

dehors de ces tranches, la croissance se voit réduite, peut passer en phase de latence, voire de mort cellulaire.

2.2.4 L'agitation

Un système d'agitation est indispensable afin d'homogénéiser la culture. La vitesse d'agitation mécanique est exprimée en rpm (rotation par minute) mais il serait plus cohérent d'exprimer une contrainte de cisaillement moyenne ce qui est rarement fait. Il est nécessaire de contrôler la vitesse d'agitation puisque celle-ci peut causer des dommages cellulaires (fortes contraintes de cisaillement) ou du stress cellulaire.

2.3 Mode de culture

Les cultures de microorganismes en photobioréacteur peuvent être exécutées selon différents modes de conduite en fonction de l'objectif visé. La culture peut être réalisée avec ou sans prélèvement en sortie, avec ou sans ajout de milieux en entrée. Le milieu de culture peut être naturel ou synthétique. L'avantage d'utiliser un milieu de culture synthétique permet de répondre plus précisément aux besoins nutritionnels de chaque espèce et cela de manière répétable. En effet, tous les milieux de culture contiennent les mêmes éléments mais à des concentrations différentes. On retrouve dans ces milieux la présence d'azote, de phosphate, de sulfate ainsi que des traces ions métalliques (zinc, fer, magnésium, etc.) et de vitamines (biotine, thiamine, etc.).

2.3.1 Mode d'alimentation en batch

Une culture de microorganismes en mode batch se déroule sans addition de milieu au cours de la culture. Le volume reste constant et les concentrations en substrats et produits évoluent au cours de la culture.

Le mode de modélisation qui sera développé dans le paragraphe suivant est établi essentiellement pour caractériser un régime transitoire, le modèle traduisant l'évolution temporelle des variables au cours du temps. Le modèle est exprimé le plus généralement par un système d'équations différentielles qui est intégré à partir d'une condition initiale.

2.3.2 Mode d'alimentation en Fed batch

Une culture en Fed-batch correspond à une opération de semi-batch. La complémentation du milieu de culture par une solution concentrée (source de carbone, d'azote, de phosphates, de précurseurs ou autres nutriments) est faite, par intermittence, soit régulièrement afin de réajuster une concentration, soit épisodiquement par exemple lors d'une carence (Henry et Hwa, 2013). Dans ces conditions, le volume de la culture a tendance à augmenter au cours du temps, cependant, dans les cas étudiés dans ce mémoire, les cultures ont été réalisées à volume constant puisque des prélèvements de culture pour analyses ont été réalisés à chaque ajout de solutions.

L'alimentation d'une culture en mode Fed-batch, permet ainsi de limiter les risques de toxicité ou encore de limitation par un des nutriments. De plus, le Fed-batch permet une augmentation de la productivité cellulaire et offre la possibilité de modifier ou adapter le milieu en cours de culture (Carmaux, 2008).

2.3.3 Mode d'alimentation en continu

Le mode de culture en continu consiste à ajouter et soutirer du milieu, à un débit identique, dès lors que les cellules entrent en phase de croissance. La productivité est généralement plus importante qu'en mode discontinu (Carmaux, 2008). L'intérêt majeur réside dans le fait qu'en continu les conditions de culture permettent de fixer le système dans un état permanent.

2.3.4 Modes d'alimentation mixtes

Dans un grand nombre de situations, le mode de culture est mixte entre les trois situations précédentes. C'est le cas notamment d'une culture qui est conduite en batch pour la phase liquide (concerne les substrats et produits) alors que l'alimentation en gaz est en continu. Lorsque la vitesse d'apport gazeux devient limitante, elle impose alors la vitesse de conversion.

3 Verrous scientifiques et défis technologiques associés aux cultures de *Chlamydomonas reinhardtii* et de *Arthrospira platensis*

Ce travail concerne l'étude de deux cultures différentes de microalgues, d'une part les cultures de *Chlamydomonas reinhardtii* en vue de la production d'hydrogène et, d'autre part,

les cultures d'*Arthrospira platensis* en tant que microorganisme impliqué dans des systèmes de support de vie pour la production d'oxygène et la fixation de CO₂.

Même si ces travaux sont disjoints, les problématiques de modélisation et de compréhension du métabolisme photosynthétique ainsi que le développement de photobioréacteurs intensifiés restent similaires. L'objectif de ce paragraphe est de montrer en quoi ces deux exemples conduisent à des questionnements identiques, sachant que dans les deux cas, il est nécessaire d'avoir recours à une compréhension fine du métabolisme cellulaire, du couplage entre le métabolisme et la conception, et sur la conduite du bioréacteur.

3.1 La photofermentation et la production d'H₂ chez *Chlamydomonas reinhardtii*

3.1.1 Le projet ANR AlgoH2

Ce projet ANR vise l'optimisation génétique, métabolique et du procédé de la photoproduction d'hydrogène par une microalgue verte sélectionnée : *Chlamydomonas reinhardtii*. Cet organisme modèle, largement décrit dans la littérature (Harris, 2009 ; Pröschold *et al.*, 2005 ; Rochaix *et al.*, 1998) tant d'un point de vue physiologique que génétique, est connu pour produire de l'hydrogène naturellement, grâce à une enzyme Fe-hydrogénase à forte activité. De plus, elle présente l'avantage d'être facilement cultivable en laboratoire dans des photobioréacteurs.

Le séquençage récent de son génome et l'existence de nombreux outils génétiques permettent une optimisation biotechnologique. Ce projet permet à la fois une approche expérimentale et une amélioration de la production d'hydrogène théorique. En effet, une démarche transversale de modélisation a été appliquée, de l'échelle cellulaire (chaîne de transporteur, métabolisme énergétique, voies de production d'H₂) à celle du réacteur (optimisation des protocoles de production et l'élaboration d'outils de contrôle-commande dédiés).

3.1.2 Le dihydrogène

La particularité intéressante de l'hydrogène dans ce projet est son utilisation comme vecteur énergétique propre. En effet, l'hydrogène est un gaz extrêmement combustible, producteur d'eau. La combustion de cette molécule dans le dioxygène est violente et exergonique. Le ΔH de la combustion est de - 241,6 kJ.mol⁻¹. C'est par conséquent un combustible d'intérêt. Ce

même principe est utilisé dans les piles à combustibles, avec une oxydation plus lente, pour produire un courant électrique.

Le dihydrogène est présent sous forme de traces dans l'atmosphère. Généralement produit industriellement, par électrolyse de l'eau ou à partir d'hydrocarbures. L'utilisation de microorganismes photosynthétiques permet l'obtention d'un dihydrogène « naturel ». *Chlamydomonas reinhardtii* a la capacité de décomposer l'eau grâce à son appareil photosynthétique ce qui conduit à utiliser les électrons et les protons produits pour former le dihydrogène. Ce phénomène est possible grâce au couplage étroit entre la photosynthèse et une enzyme : l'hydrogénase.

3.1.3 Problématique scientifique

Le verrou majeur est que la production d'hydrogène chez *Chlamydomonas reinhardtii* est de nature transitoire puisqu'elle est étroitement liée au métabolisme de la photosynthèse. En effet, l'hydrogénase à fer de *Chlamydomonas reinhardtii* est inhibée en présence de l'oxygène produit par le photosystème II de la chaîne de transport des électrons dans le chloroplaste. Il semble que la réaction de photoproduction d'H₂ constitue une soupape de sécurité permettant de transférer le pouvoir réducteur produit en excès par les photosystèmes vers la voie de production de l'hydrogène tant que la fixation photosynthétique de CO₂ n'est pas active. La production d'hydrogène par *Chlamydomonas reinhardtii* s'avère donc être une adaptation métabolique de la cellule en cas de carence en oxygène. Pour cela, une voie métabolique utilise soit l'énergie lumineuse, soit des composés énergétiques intracellulaires tels que les sucres.

C'est pourquoi, trois axes d'optimisation et de compréhension dans le projet AlgoH2 ont été sélectionnés. Le premier correspond à l'optimisation des voies métaboliques, notamment de la chaîne de transport des électrons dans le chloroplaste de la cellule. Cette partie sera développée plus précisément dans le chapitre 3. Le second vise la production d'un mutant génétiquement modifié possédant une sensibilité à l'oxygène minimisée. Enfin, le dernier axe a pour objectif l'amélioration des protocoles de production de dihydrogène en photobioréacteur contrôlé.

Le présent travail est consacré à une compréhension générale du métabolisme à des fins de modélisation en utilisant une description des mécanismes métaboliques de transfert d'énergie qui sont la clef des couplages énergétiques. Ces mécanismes seront décrits plus précisément

dans le chapitre 3. Pour l'instant, nous récapitulons brièvement les travaux effectués dans les autres équipes membres du consortium Algo H2.

3.1.4 Cultures en photobioréacteurs dans le cadre du projet Algo H2

Le protocole expérimental qui a été choisi consiste à utiliser une cascade de deux réacteurs (Figure 14) : le premier réacteur est opéré dans des conditions de croissance cellulaire ; les conditions de travail dans le second permettent la production du gaz. Ce protocole bi-étagé permet de viser une production en hydrogène optimale.

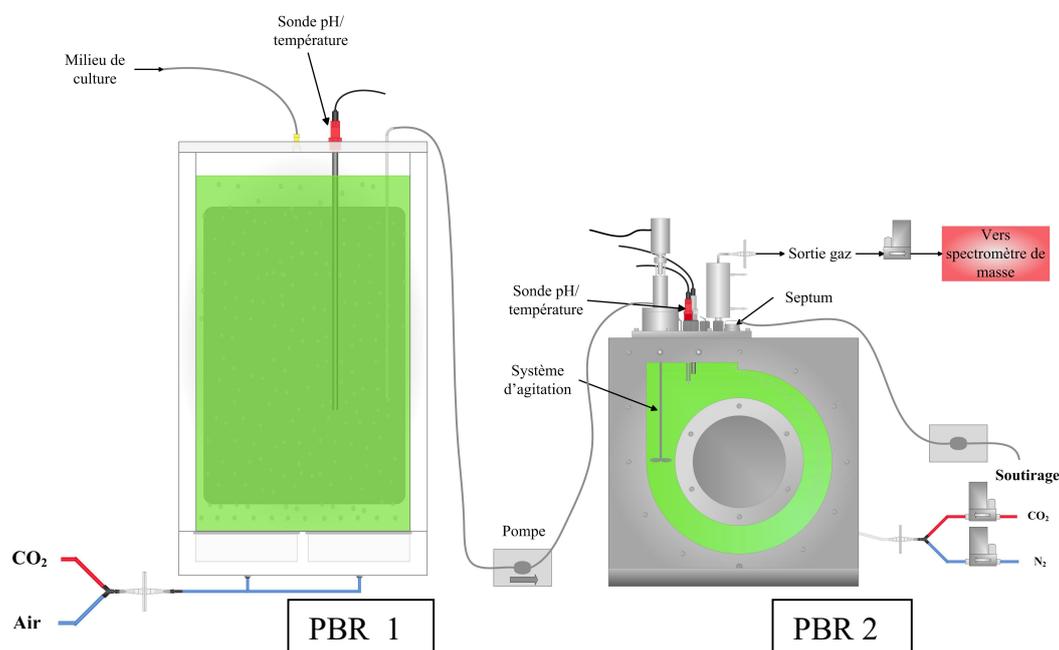


Figure 14 : Schéma du réacteur bi-étagé mis en place par le GEPEA (Lemasson, 2015)

A partir des travaux de Martzloff (2013), Lemasson (2015) a mis en place un protocole de croissance avec l'accumulation d'un sucre de réserve : l'amidon. La culture dans le premier réacteur, permet la croissance et l'augmentation de la biomasse jusqu'à un état stationnaire. La culture est réalisée en autotrophie et en conditions de limitation azotée avec un flux lumineux φ_{10} de 400 $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Cette limitation en azote est à l'origine de l'accumulation de l'amidon dans la cellule (jusqu'à 36,6 % de la teneur massique) (Philipps *et al.*, 2012). Elle permet également de diminuer progressivement le taux d'oxygène présent (diminution de la production photosynthétique) en diminuant le rendement photosynthétique maximal $\frac{F_p}{F_m}$ (Maxwell et Johnson, 2000).

Puis, une fois que la concentration en cellules et leur contenu en amidon a atteint un état stationnaire, l'hypoxie dans le second réacteur couplée à une diminution du flux lumineux incident permet d'activer l'hydrogénase et par conséquent la production de l'hydrogène. En effet, une diminution du flux lumineux par paliers, à hauteur de $100 \mu\text{moles de photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ permet dans un premier temps de diminuer la production photosynthétique en oxygène, puis dans un second temps, avec une réduction du flux à la valeur de $50 \mu\text{moles de photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, la consommation d'oxygène dissous devient supérieure à sa production de telle sorte que le milieu devient anoxique. L'absence totale d'oxygène permet de lever le verrou métabolique présent et donc de permettre la production de dihydrogène en consommant l'amidon mis en réserve (dégradation de la biomasse).

L'amidon, constitué de fractions d'amylose et d'amylopectine, est un substrat énergétique de la voie PSII indépendante ; c'est donc une source d'électrons pour la production d'hydrogène (Melis, 2007) au niveau du pool de plastoquinone de la chaîne de transport des électrons.

Un exemple de profil de la production d'hydrogène est fourni sur la Figure 15.

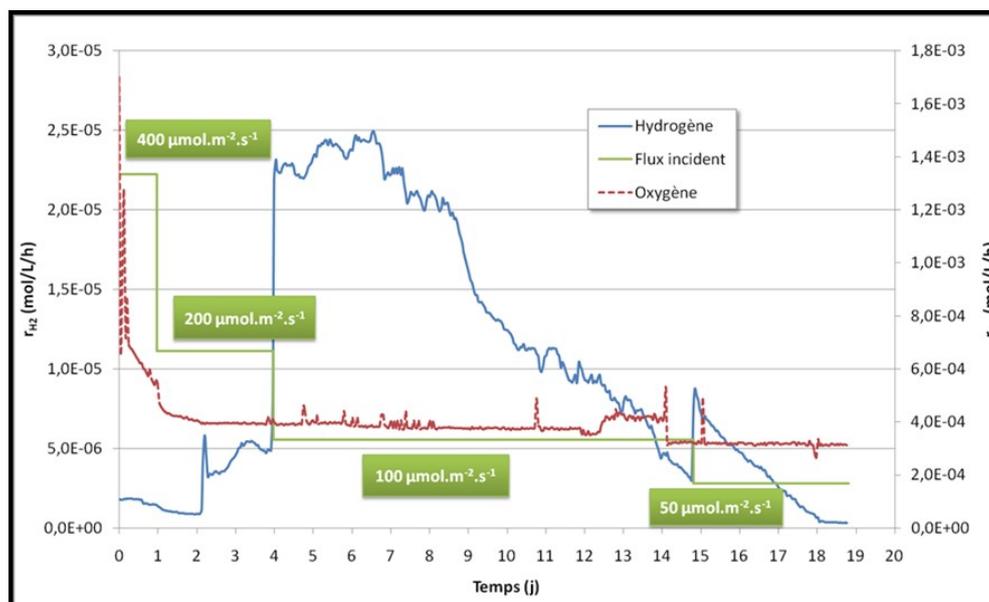


Figure 15 : Evolution des quantités d'hydrogène et d'oxygène en sortie du PBR 2 (Lemasson, 2015)

La vitesse maximale de production obtenue durant les expérimentations sur ce procédé est de $0,56 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, avec un rendement photosynthétique $\frac{F_{H_2}}{F_{Tm}}$ de 0,14. Lors de ces tests expérimentaux, la présence d'un métabolisme fermentaire a été mise en évidence avec la formation d'acides fermentaires et d'éthanol (formate, acétate, éthanol, etc.). Il s'agit donc d'un processus de photofermentation. C'est un procédé qui s'avère donc efficace, mais de

nature transitoire. En effet, la photofermentation est divisée en trois phases. La première consiste à la production d'hydrogène en condition d'hypoxie, accompagnée d'une dégradation des substances de réserve dans la biomasse et d'une chute du rendement photosynthétique. La seconde correspond à la stabilisation du rendement photosynthétique et par conséquent la diminution de la production en H_2 . Enfin, la dernière phase définit l'arrêt de la production gazeuse d'hydrogène ainsi que de la dégradation de la biomasse, avec une augmentation du rendement photosynthétique. Ce phénomène entraîne alors la reprise de la production de l'oxygène et donc l'inhibition de l'hydrogénase.

D'un point de vue génétique, l'élaboration d'un mutant de *Chlamydomonas reinhardtii* a été réalisée. C'est le mutant PGRL1 (Proton Gradient Regulation Like 1). Il possède la particularité d'avoir une hydrogénase beaucoup moins sensible à l'oxygène, ce qui lui permet d'atteindre sa vitesse de production maximale deux fois plus rapidement qu'avec la souche sauvage. En effet, la protéine PGRL1 joue un rôle dans le transfert cyclique des électrons ainsi les réserves en amidon accumulées sont dégradées beaucoup plus rapidement (Tolletter *et al.*, 2011).

Sur le plan de l'interprétation des mécanismes métaboliques, il existe deux voies de production de l'hydrogène, la voie directe et la voie indirecte. La seconde dite PSII indépendante, utilise l'amidon comme source d'énergie. Ces deux voies sont récapitulées sur le schéma suivant (Figure 16) :

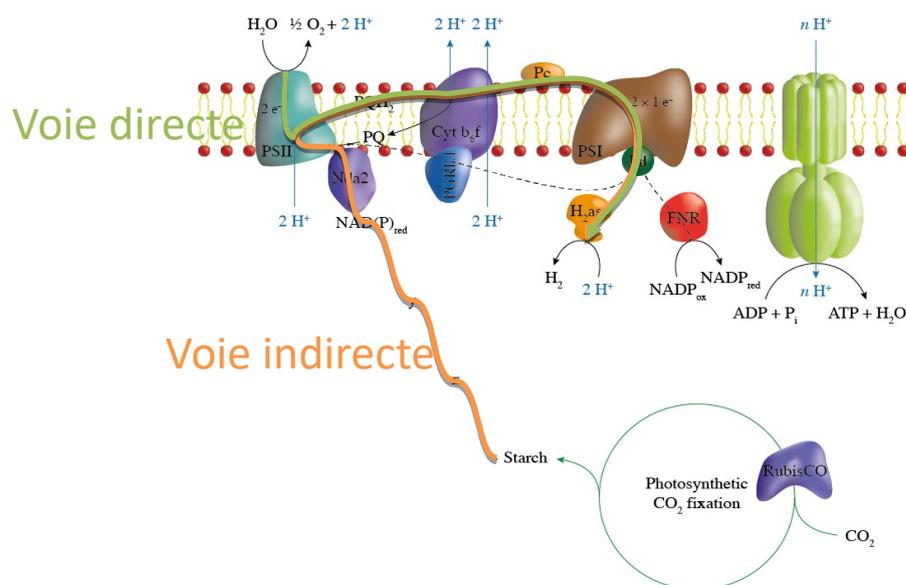


Figure 16 : Schéma simplifié des deux voies de production du H_2 chez *C. reinhardtii* (G. Peltier, ANR AlgoH2, 2014)

La description de ces mécanismes sera reprise dans le chapitre 3 en attachant un soin particulier à l'analyse des conversions d'énergie et des couplages.

3.2 Utilisation de microalgues pour des systèmes de support vie

3.2.1 Le projet MELiSSA

Le projet MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative), débuté en 1989 et porté par l'Agence Spatiale Européenne (ESA), vise à créer un écosystème artificiel biologique en intégrant majoritairement des microorganismes pour une utilisation comme système de support de vie. L'objectif principal est de réduire au maximum les réserves en nourriture et en oxygène apportées lors des missions spatiales de longues durées. Le projet consiste à reconstituer dans un espace réduit, en conditions contrôlées et de manière optimisée, le cycle de la matière où les facteurs biotiques et abiotiques sont présents dans un même environnement clos.

On distingue deux parties dans les écosystèmes artificiels. La première est une phase de dégradation et d'oxydation des déchets. Cette étape peut être réalisée par des voies physicochimiques ou biologiques (seulement biologique dans le projet MELiSSA). La seconde est une phase de régénération des molécules nécessaires à la vie (essentiellement eau et oxygène) et de reconstruction de molécules élaborées et digestibles. Cette deuxième partie consiste donc à produire de l'oxygène et de la nourriture. La photosynthèse est le processus essentiel. Cette phase est uniquement une voie biologique dans MELiSSA, utilisant soit la culture de plantes supérieures, soit la culture d'*Arthrospira platensis*.

Dans le projet MELiSSA, la boucle de matière est organisée autour de 5 compartiments, représentant 5 étapes majeures. Un compartiment producteur de « matières premières » (l'équipage) et 4 compartiments de recyclage (Figure 17).

L'ensemble de la boucle peut être représentée comme sur la figure ci-dessous :

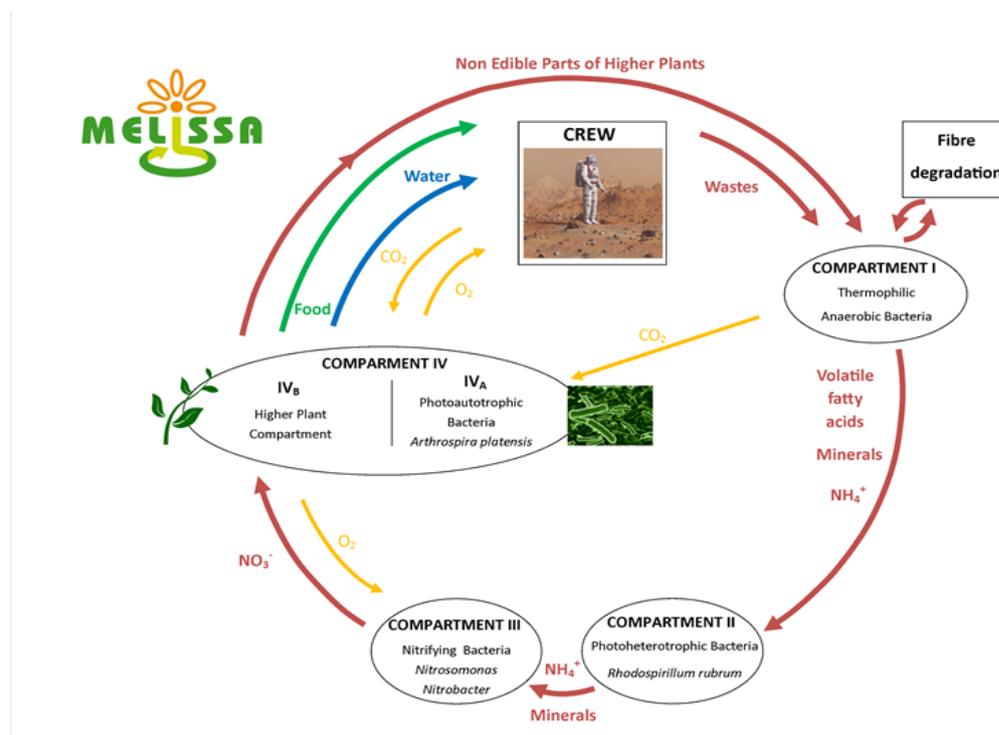


Figure 17 : Schéma simplifié de la boucle du projet MELiSSA [10]

Le compartiment 0 correspond à l'ensemble de l'équipage. C'est le compartiment consommateur et donc le compartiment principal producteur des déchets (liquides, solides ou gazeux).

Le compartiment I est un compartiment liquéfacteur. Colonisé par un consortium de bactéries thermophiles anaérobies, il transforme les déchets du compartiment 0 en acides gras volatils, minéraux et ammonium dirigés vers le compartiment II et en CO_2 utilisé par le compartiment IV.

Le compartiment II est un compartiment composé de la bactérie photohétérotrophe : *Rhodospirillum rubrum*. C'est une bactérie gram négative pourpre non-sulfureuse, dont l'utilisation a pour objectif d'achever la dégradation des déchets organiques débutée dans le CI. Elle dégrade les acides gras volatils en ammonium, minéraux et dioxyde de carbone, celui-ci étant dirigé vers le CIV. La biomasse formée est consommable par l'équipage, mais peut également être réinjectée en C1. Ce compartiment étant photohétérotrophe, il est indispensable d'appliquer de la lumière artificielle.

Le compartiment III est constitué d'un consortium de bactéries nitrifiantes, à savoir *Nitrobacter winogradskyi* et *Nitrosomonas europaea*. Ce compartiment nitrificateur permet

ainsi de transformer l'ammonium en nitrates. Les nitrates sont la source nutritive azotée du compartiment IV, indispensable à la croissance et la réalisation de la photosynthèse.

Le compartiment IV est le compartiment photoautotrophe. Séparé en deux parties distinctes éclairées par de la lumière artificielle, le compartiment IVA contient les bactéries photoautotrophiques : *Arthrospira platensis*. Le compartiment IVB est constitué d'un consortium de végétaux supérieurs. C'est donc dans le compartiment IV que sont produits la nourriture et l'oxygène, à partir des nutriments, de l'eau et du CO₂ récupérés lors des étapes précédentes. L'utilisation de deux types d'organismes dans ce compartiment permet dans un premier temps de produire et de réguler les rations alimentaires de l'équipage, notamment avec le compartiment IVB. La présence d'*Arthrospira platensis* permet une régénération atmosphérique rapide, avec un très bon rendement et permet aussi de compléter l'alimentation de l'équipage avec un apport protéique important.

Le système MELiSSA est donc un système modulaire. L'approche qui a été développée depuis le début du projet, il y a plus de 25 ans, est une approche d'une part d'étude des opérations unitaires et, d'autre part, une approche système couplant plusieurs sous-systèmes entre eux. Comme il est nécessaire de le faire pour les systèmes qui ont vocation à être spatialisés, l'approche MELiSSA comporte intrinsèquement une approche de modélisation prédictive, c'est-à-dire une modélisation par des modèles de connaissance. Il est donc indispensable que le design et la mise en œuvre des opérations unitaires et des sous-systèmes résultent de choix rationalisés et quantifiés par des modèles prédictifs. Ceci engendre deux types de questions fondamentales :

Quelle est l'influence de la microgravité sur différentes opérations unitaires, en particulier sur les phénomènes de transfert entre phases et les phénomènes de mélange en phases fluides ?

Jusqu'à quel niveau de compréhension doit-on pousser la modélisation de phénomènes biologiques qui sont intrinsèquement liés à la mise en place de l'écosystème MELiSSA ?

Le premier type de questionnement se pose pour toute opération unitaire, qu'elle soit physicochimique ou biologique. Tous les systèmes spatialisés de support vie doivent prendre en compte ce type de questions. Certains sont d'ailleurs opérationnels sur la Station Spatiale Internationale, comme le système de captation du CO₂ (sur des cartouches de LiOH) ou certains systèmes de recyclage de l'eau (systèmes à membranes par exemple). Néanmoins, ces

questions demeurent des points d'étude importants pour le développement de systèmes physicochimiques de recyclage de l'oxygène sur des procédés de type Sabatier par exemple.

Le deuxième type de questionnement concerne plus spécifiquement MELiSSA. Comme l'objectif ultime est de produire de la nourriture pour un équipage (avec les compartiments IVA et IVB), il n'y a pas d'autres solutions que de développer des compartiments biologiques qui sont finalement seuls capables de produire des composés alimentaires. On montre alors que le meilleur moyen est également d'utiliser des bioprocédés en amont. Quoi qu'il en soit, la modélisation métabolique et la compréhension des régulations dans les systèmes biologiques, constituent de véritables défis de modélisation, qu'il s'agisse de la compréhension, du design et du contrôle du fonctionnement de bioréacteurs sur Terre ou bien de l'étude de l'influence de l'absence de gravité sur certains niveaux de régulation cellulaire.

3.2.2 Le projet BIORAT

Dans la suite de cet exposé, nous nous intéresserons uniquement au compartiment IVA.

De façon plus précise, le sous-système BIORAT est le couplage d'un compartiment photosynthétique producteur d'oxygène et de consommation de CO₂ avec un compartiment consommateur, ici une cage hermétique contenant des souris. C'est un projet d'écosystème clos limité à deux compartiments en boucle fermée. Actuellement, c'est la société RUAG Space qui est porteuse du projet BIORAT1 phase B+.

Ce sous-système comporte deux types de défis :

- D'une part, le choix des matériaux constitutifs du design doit répondre à des normes drastiques de sécurité, de résistance et de poids afin de répondre aux normes du spatial. De même le confinement exige une compaction du dispositif, c'est-à-dire une intensification du photobioréacteur qui est réellement difficile.
- D'autre part, le contrôle de la fixation du CO₂ et de la production de l'oxygène doit permettre de répondre à la demande des animaux, sachant que les tampons matière restent très réduits et qu'il faut donc être capable de réguler la production en l'adaptant à la demande dans des limites de fonctionnement proches des conditions terrestres, par exemple moins de 10 000 ppm (1%) de CO₂ et plus de 19 % d'oxygène. Ceci exige d'être capable d'avoir un contrôle prédictif du PBR qui permette d'adapter son

fonctionnement aux contraintes, On retrouve ici le besoin de modélisation et de compréhension.

Le système BIORAT est aujourd'hui en fonctionnement sur Terre à l'Université Autonome de Barcelone. L'étude d'un PBR spatialisable fait partie de ce travail, sachant que ceci recouvre le développement d'un PBR qui soit en mesure de satisfaire des conditions de transfert gaz liquide insensibles à la gravité (transfert par membrane) et des conditions d'éclairement contrôlées qui permettent à terme la régulation du système.

3.2.3 Influence de la microgravité

La présence de microgravité (pesanteur résiduelle) a des effets physiques non négligeables sur les cultures de microorganismes (Kacena *et al.*, 1999 ; Walther *et al.*, 1996). La gravité joue essentiellement sur deux échelles d'espace très différentes :

D'une part, les échanges gaz/liquide eu sein du réacteur ou du bioréacteur sont profondément affectés par l'absence de gravité. Dans notre cas, avec la photosynthèse, il est nécessaire de transférer le CO₂ atmosphérique dans la phase liquide et l'oxygène produit de la phase liquide vers la phase gazeuse. En conditions de gravité terrestre, cet échange se fait par la remontée de bulles de gaz vers la surface grâce à la poussée d'Archimède. A un niveau global cet échange est caractérisé par un coefficient d'échange volumétrique K_{La} qui chiffre la vitesse de transfert en fonction des conditions d'agitation et de mélange dans le réacteur et de la différence de potentiel d'échange entre les phases liquide et gaz.

D'autre part, la microgravité « peut » avoir des effets sur le métabolisme lui-même avec des expressions du métabolome qui peuvent être affectées par ces conditions. On ne sait que très peu de choses sur ces effets, sachant que des effets métaboliques ont été reportés sur le métabolisme *Rhodospirillum rubrum* (Hendrickx *et al.*, 2005, Mastroleo *et al.*, 2008a, 2008b, 2009, 2010). Il reste difficile d'en attribuer la raison mais, à nouveau, il est possible que les activités des gaz dissous au niveau intracellulaire soient significativement différentes en microgravité, sachant que les séparations gaz/liquide et/ou la génération de microbulles peuvent être affectées par l'absence de gravité.

Pour l'instant, nous ne considérerons que le premier effet, sachant que le défi est de concevoir un PBR dans lequel la séparation gaz dissous vers liquide s'effectue sans séparation de phase. Il est effectivement possible de créer artificiellement une force de pesanteur à partir d'un

champ de centrifugation, ou en séparant la phase liquide de la phase gazeuse et en jouant sur la pression interne du réacteur, mais ces types de dispositifs n'ont pas conduit à des solutions techniquement extrapolables.

3.2.4 L'effet du couple redox ammonium/ammoniac sur *Arthrospira platensis*

Dans le cadre du projet BIORAT, la culture d'*Arthrospira* est menée sur un milieu Zarrouk modifié par Cogne (2003), utilisant les nitrates comme source d'azote, et à un pH de 9,5. Dans le contexte de la boucle MELiSSA, ce compartiment photosynthétique sera précédé par le compartiment nitrificateur (CIII). Comme décrit précédemment, le CIII est chargé de dégrader l'ammonium en nitrites puis en nitrates par l'intermédiaire d'une co-culture en lit fixe de *Nitrosomas winogradskyi* et *Nitrobacter europea*. Une étude récente (Cruvellier, 2017) a montré que le CIII est capable d'assurer une nitratisation complète de l'ammonium sous certaines conditions opératoires de charge entrante et de temps de séjour. Néanmoins, lors de la mise en place de la colonisation de la biomasse, lors de problèmes techniques, ou dans des conditions extrêmes de charge en azote ou de temps de séjour courts, de l'ammonium est retrouvé dans l'effluent de la colonne. Il apparaît donc indispensable de mieux comprendre l'impact de l'apport d'ammonium sur la culture d'*Arthrospira platensis*.

Les microorganismes photosynthétiques de type cyanobactéries ont généralement l'ammonium pour source d'azote préférentielle. En effet, l'assimilation de l'ammonium est beaucoup moins énergivore que celle des nitrates, puisque les nitrates doivent être réduits en ammonium en deux étapes enzymatique (Figure 18). La première est la réduction des nitrates en nitrites par une nitrate réductase, puis des nitrites en ammonium par une nitrite réductase (Flores *et al.*, 2005).

L'assimilation des nitrates, après pénétration dans la cellule par le biais d'un transporteur membranaire type NRT, nécessite deux étapes de réduction dans le cytoplasme par l'action de deux enzymes. L'ammonium est quant à lui assimilé tel quel dans la cellule, après son transfert au travers de la paroi cellulaire par un transporteur type Amt. Il est à noter que l'ammoniac, à la différence des nitrates et de l'ammonium, diffuse directement au travers de la membrane.

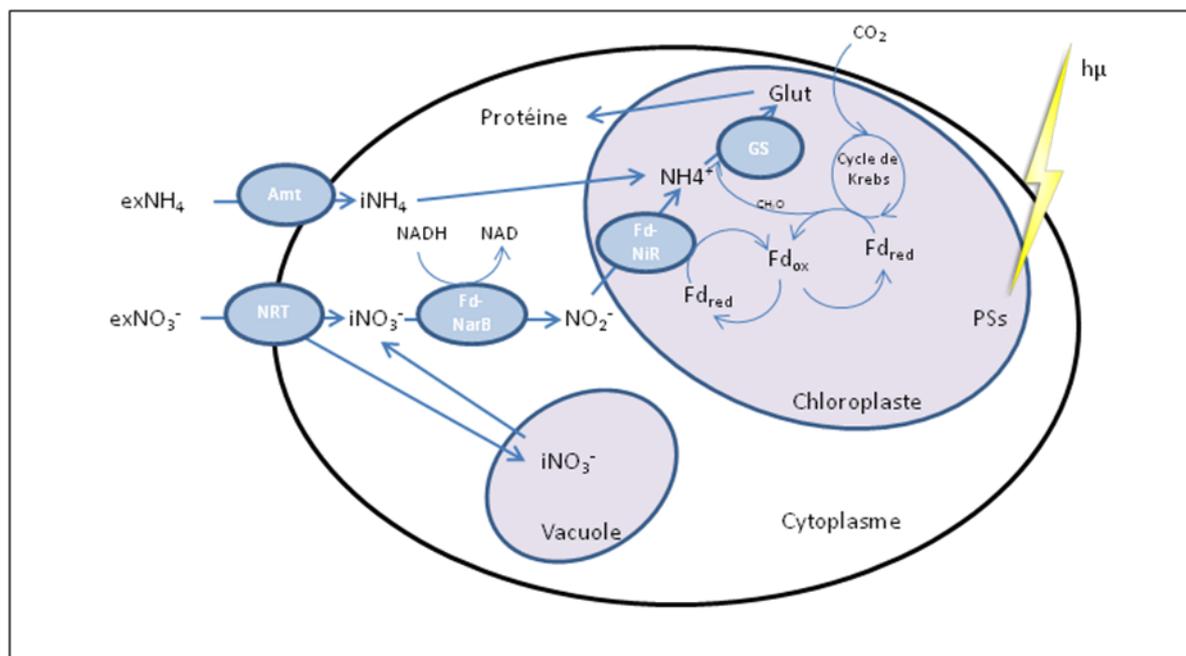
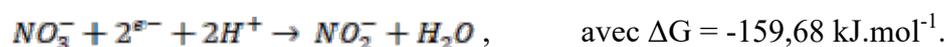


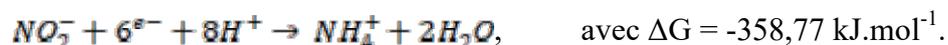
Figure 18 : Schéma simplifié de l'assimilation cellulaire des sources azotées

(Amt : transporteur transmembranaire de l'ammonium (NH₄) ; NRT : enzyme de transfert membranaire du nitrate (NO₃) ; Fd-NarB et Fd-Nir les enzymes de réduction du nitrate en ammonium ; Gs : Glutamine synthétase ; Fd_i : Ferredoxine réduite (red) ou oxydée (ox) ; PSs : ensemble des photosystèmes I et II assimilant les photons (hμ) ; Glut : glutamine ; NADH et NAD : coenzymes)

La première étape d'assimilation des nitrates intracellulaire est la réduction des nitrates en nitrites, grâce à l'enzyme type nitrate réductase nommée Fd-NarB, dont l'équation stœchiométrique s'écrit :



La seconde étape est une étape de réduction des nitrites en ammonium, par une nitrite réductase appelée Fd-Nir. Son équation stœchiométrique s'écrit :

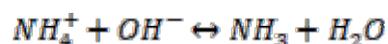


Par la suite, l'ammonium entre dans le cycle de la production de la glutamine (cycle Glutamine synthétase/glutaminate : GS/GOGAT), sa transformation nécessite du 2-oxoglutarate, qui est un intermédiaire du cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique : TCA).

L'ammonium possède une haute affinité avec les transporteurs de la famille des Amts (Ammonium transports) qui agissent au niveau de la régulation de la concentration en azote intracellulaire (Yang *et al.*, 2007). Ainsi, à la différence des nitrates, les ions ammonium (NH₄⁺) sont dégradés beaucoup plus facilement par les spirulines, ce qui correspond à une plus faible dépense énergétique (Boussiba 1989; Graham et Wilcox, 2000; Carvalho, 2004). Néanmoins, des vitesses de croissance plus faibles sont parfois observées lors de cultures en

présence d'ammonium par rapport aux nitrates (Belkin et Boussiba, 1991a; Kim *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2007). Ces résultats sont cependant à prendre avec précaution, les cultures ayant souvent été conduites avec de faibles quantités d'ammonium et des phénomènes de limitation en azote ayant pu intervenir.

Ajouté au milieu de culture en remplacement des nitrates, lors d'une culture en continu, l'ammonium peut avoir plusieurs effets. À faible concentration, on observe une altération de la biomasse en raison d'une limitation en azote. À plus forte concentration, l'ammonium a un effet toxique sur le métabolisme d'*Arthrospira platensis*. Néanmoins, ce phénomène de toxicité semble principalement lié à la transformation des ions ammonium en ammoniac (NH_3), par la réaction suivante (pKa de 9,25 à 25°C):



Eq. 6

En effet, l'ammoniac a été décrit comme la principale espèce azotée inhibitrice de croissance chez *Arthrospira* (Boussiba, 1989; Boussiba et Gibson, 1991).

Sachant que l'équilibre chimique ammonium/ammoniac est pH dépendant, le pH du milieu a donc une action sur l'inhibition car il joue directement sur le rapport entre ammonium et ammoniac. Le degré de toxicité dépend donc de la quantité totale d'ammonium et du pH du milieu (Markou *et al.*, 2014b ; Tan *et al.*, 2016), et plus précisément du Δ -pH existant entre le pH intracellulaire et celui du milieu de culture (Boussiba et Gibson, 1991). Cette toxicité serait liée au fait que l'ammoniac diffuse librement à travers les membranes cellulaires, s'accumulant au sein des cellules incapables de réguler son entrée (Drath *et al.*, 2008). En particulier, l'ammoniac affecterait le Δ -pH du gradient de protons du thylakoïde (Belkin et Boussiba, 1991b; Pérez Navarro *et al.*, 2013; Oyala *et al.*, 2015 ; Schuldiner *et al.*, 1972).

Ainsi, l'ammoniac aurait un impact direct sur le système photosynthétique (Abeliovich et Azov, 1976). Dès 30 mg.L⁻¹, la présence d'ammoniac aurait un effet négatif sur l'activité photosynthétique (Converti *et al.*, 2006), avec une réduction de 30% à 70 mg.L⁻¹ et 50% à 140 mg.L⁻¹ (Belkin et Boussiba, 1991a).

L'ammoniac semble avoir pour cible le système d'oxydation de l'eau (OEC ; oxygen-evolving complex), causant des dommages au niveau du photosystème II (Dai *et al.*, 2014; Drath *et al.*, 2008), plus particulièrement en attaquant le cluster à Manganèse de l'OEC (Drath *et al.*, 2008 ; Belkin et Boussiba, 1991a; Azov et Goldman, 1982; Abeliovich et Azov, 1976 ;

Pérez Navarro *et al.*, 2013; Oyala *et al.*, 2015 ; Markou et Muylaert, 2016). Cependant, l'ammoniac agirait également sur la chaîne de transport d'électrons dans son ensemble et pas seulement sur le PSII (Markou et Muylaert, 2016). La diffusion de l'ammoniac dans les cellules, qui modifie le pH du lumen du thylakoïde, affecterait également le ΔpH du gradient de protons, et ainsi, induirait une diminution de la synthèse d'ATP et donc de l'activité photochimique.

Pour de faibles intensités lumineuses, ce phénomène pourrait être réversible car le mécanisme de réparation du PSII n'est pas affecté chez la cyanobactérie *Synechocystis* (Dai *et al.*, 2014). Cependant, l'ammoniac augmenterait la sensibilité du centre réactionnel PSII à la photoinhibition et, dans ces conditions, le mécanisme de réparation serait insuffisant. En effet, l'excès d'énergie lumineuse provoque des dommages au niveau de la protéine D1 du centre réactionnel PSII lors de conditions de photoinhibition. Le mécanisme de réparation permet la dégradation de la protéine D1 endommagée et son remplacement par une protéine néosynthétisée, ce mécanisme impliquant une protéase ATP et Zn^{2+} dépendante, appartenant à la famille des FtsH (Murata *et al.*, 2007 ; Drath *et al.*, 2008). La diminution de la synthèse d'ATP liée à la toxicité de l'ammoniac empêcherait donc la réparation de la protéine D1.

La perte d'activité photosynthétique diminue alors la viabilité cellulaire jusqu'à la mort cellulaire, et par la perte de capacité de croissance quelle que soit la source d'azote utilisée par la suite. Ce phénomène est également température dépendant (toxicité augmentée avec l'augmentation de la température) car l'ammoniac est un gaz volatil qui diffuse plus facilement au travers des membranes avec l'accroissement de la température. Le phénomène d'inhibition dépend aussi de la salinité du milieu, sachant que l'équilibre de dissociation précédent dépend des activités des espèces. Lorsqu'on augmente la salinité du milieu, à concentration et pH égaux, on diminue l'activité des ions ammonium et on augmente l'activité de l'ammoniac (effet salting out). Les deux phénomènes concourent donc à augmenter l'activité de l'ammoniac ce qui rend plus prononcés les effets d'inhibition.

Enfin, alors que certains auteurs attestent que le phénomène de toxicité de l'ammoniac est indépendant de la quantité de biomasse présente (Azov et Goldman, 1982), d'autres ont observé une toxicité plus importante pour de faibles concentrations en biomasse, celle-ci diminuant progressivement pour des concentrations en biomasse comprises entre 0,125 et 0,25 g.L⁻¹, puis atteignant un plateau. Ces résultats suggèrent l'existence d'un potentiel ratio biomasse/NH₃ pour lequel la toxicité est liée à la concentration en biomasse (Markou *et al.*,

2014a). Ainsi, pour contourner ce problème, certains auteurs conduisent des cultures en mode Fed-batch avec un ajout exponentiel d'ammonium au fur et à mesure de la croissance, permettant le maintien d'un ratio biomasse/ NH_4^+ constant (Converti *et al.*, 2006 ; Carvalho *et al.*, 2007).

En ce qui concerne le seuil de toxicité de l'ammoniac, des concentrations toxiques (c'est-à-dire ayant un impact négatif sur la vitesse de croissance) de l'ordre de 2 à 6 mM, ainsi qu'une concentration inhibitrice à 10 mM (Abeliovich et Azov, 1976 ; Azov et Goldman, 1982) ont été observées chez différentes microalgues (*Chlorella pyrenoidosa*, *Anacystis nidulans*, *Plectonema boryanum*, *Dunaliella tertiolecta*, *Scenedesmus obliquus*, *Phaeodactylum tricorutum*), En ce qui concerne *Arthrospira platensis*, les seuils de toxicité n'ont pas été établis de manière aussi claire, mais il est généralement admis qu'ils seraient du même ordre de grandeur. Ainsi, un seuil de toxicité de 10 mM en NH_4Cl a été proposé pour *Arthrospira platensis* (Carvalho *et al.*, 2004 ; Jha *et al.*, 2007). Néanmoins, si les publications indiquent une concentration en ammonium appliquée, la concentration en ammoniac résultante n'est généralement pas calculée. Par ailleurs, la connaissance du pH de la culture ne permet pas toujours de l'estimer, un grand nombre d'études ayant été conduites en bassins ouverts. En effet, ces études ont souvent pour objectif de mettre en place des procédés de culture peu coûteux pour le traitement d'effluents liquides. Dans ces conditions, l'ammoniac, très volatil, est « strippé », c'est-à-dire qu'il est entraîné dans l'atmosphère et ne reste donc pas dans la phase liquide. Ainsi, Rodrigues *et al.*, (2010) ont réalisé des cultures à des pH initiaux de 9,5 et à des concentrations en NH_4Cl considérées comme élevées (15 et 21,5 mM), mais n'ont jamais détecté de NH_3 dans la phase liquide.

L'ensemble de ces données indique que le contrôle du pH et de la concentration en ammonium utilisée dans les cultures d'*Arthrospira platensis* sont essentiels, sachant qu'à pH élevé le seuil toxique en NH_3 peut être atteint, même pour de faibles concentrations en ions ammonium. Une étude récente (Deschoenmaker 2016), a montré qu'en fixant le pH à 8,5, une culture en continu d'*Arthrospira platensis* peut être conduite à une concentration de 28 mM en ammonium, concentration considérée comme toxique par d'autres auteurs. Dans le cadre de la boucle MELiSSA, l'abaissement du pH du compartiment IVa à une valeur de 8,5 est une stratégie envisageable afin d'augmenter la tolérance de la cyanobactérie à l'ammonium. En effet, la croissance d'*Arthrospira platensis* est similaire pour des pH compris entre 8,3 et 10. Néanmoins, cette solution diminuerait les performances du compartiment en limitant le transfert du CO_2 de la phase gaz vers la phase liquide. De ce fait, et avant de modifier les

conditions de culture dans le compartiment photosynthétique, il semble essentiel d'évaluer de manière plus précise le seuil de toxicité de l'ammoniac à pH alcalin. De plus, peu d'information est disponible sur des cultures avec un apport conjoint de nitrates. L'objectif est donc d'évaluer les paramètres de culture (production de biomasse, production d'oxygène) lors de cultures sur sources d'azote mixtes, permettant de maintenir les performances du compartiment IVa. Enfin, la mise en œuvre de ces cultures dans un miniPBR à membrane pourrait permettre d'implémenter les modèles de connaissances existants, et qui sont à la base du contrôle des procédés de la boucle MELiSSA.

Du point de vue de la modélisation, un système de culture est toujours décrit par un ensemble d'équations qui traduisent des bilans sur les produits et les substrats. Ces relations sont généralement écrites en condition de régime transitoire (système d'équations différentielles) qui modélisent les accumulations dans le système.

Le modèle comprend également une description stœchiométrique qui rend compte des bilans de conservation sur les éléments. Enfin, le modèle doit prendre en compte une modélisation des cinétiques, qu'elles soient physiques (par exemple le transfert d'énergie lumineuse ou le transfert gaz liquide) ou « biologiques », traduisant les vitesses réactionnelles d'ensemble lors de la croissance et/ou de la conversion des substrats en produits, lorsque ces cinétiques ne sont pas limitées par des phénomènes physiques.

L'objectif des paragraphes suivants est de présenter de façon générale les outils de modélisation en ayant une attention particulière sur les phénomènes photoréactifs qui sont au cœur de cette étude.

4 Modèles de croissance cellulaire et de fonctionnement métabolique

4.1 Généralités sur les modèles de croissance cellulaire et de fonctionnement métabolique

De façon très générale, un modèle de croissance cellulaire, et plus généralement un modèle de fonctionnement métabolique, comporte deux « parties » :

- Une partie de bilan matière, dont la représentation doit inclure les contraintes de conservation des éléments suivant le principe de Lavoisier. Cette partie est essentiellement composée d'une ou d'un ensemble d'équations stœchiométriques.
- Une partie cinétique qui comprend d'une part, les expressions des vitesses réactionnelles en fonction des concentrations et, d'autre part, les expressions des cinétiques physiques de transfert qui peuvent contrôler le déroulement de la culture.

Nous reprenons pour les paragraphes qui suivent une formulation qui a été progressivement développée au laboratoire de Génie Chimique et Biochimique, devenu Axe Génie des Procédés, Énergétique et Biosystèmes de l'Institut Pascal. (Pons, 1987 ; Dussap, 1988 ; Cornet, 1992, 2007 ; Pons *et al.*, 1996 ; Poughon, 1998 ; Poughon *et al.*, 2001 ; Cogne, 2003 ; Cogne *et al.*, 2003a, 2005 ; Farges *et al.*, 2012 ; Dauchet, 2012 ; Dussap CG., Cogne G., Cornet JF., GdR 2015). Nous faisons le choix de citer les thèses du Laboratoire, où ces travaux sont développés de façon plus précise que dans les publications où seules certaines parties sont décrites. Il nous apparaît cependant utile de reprendre ici la formulation des modèles de fonctionnement métabolique d'un seul tenant, sachant que les hypothèses de calcul des flux, l'association avec les équations de bilans globaux et la formulation des couplages thermodynamiques sont souvent présentés de façon disjointe. Nous ne ferons pas usage de références ciblées dans le texte qui suit, sachant que la formulation de détail résulte d'une évolution progressive de cette présentation au sein du laboratoire et dans la littérature.

4.1.1 Expression du modèle sous forme de bilans matière

Le modèle total est bâti à partir des équations de bilans sur les substrats et les produits. Dans le cas général, il est exprimé comme un système d'équations différentielles par rapport au temps. Lorsque le système est en régime permanent, celui-ci devient un système d'équations algébriques, le plus souvent non linéaire. Lorsqu'on ne peut pas faire l'hypothèse de l'homogénéité des concentrations dans le volume réactionnel, il faut reporter la description sur des éléments de volume et l'intégrer, en plus, sur l'espace.

Dans tout ce qui suit, nous ferons l'hypothèse que les concentrations sont homogènes dans le volume réactionnel et qu'elles représentent l'état du système à un temps donné en fonction de conditions opératoires. En conséquence, nous exprimerons des vitesses moyennes sur l'espace réactionnel, sachant que le calcul de ces vitesses moyennes, exprimées au cours du temps en

moyenne spatiale, peut et doit le plus souvent résulter de la prise en compte d'une hétérogénéité spatiale, notamment dans le cas de la prise en compte des vitesses de transfert.

Dans le contexte d'une homogénéité des concentrations dans le volume réactionnel et avec l'hypothèse que le volume réactionnel reste constant, le système d'équations de bilan matière s'écrit de la façon suivante :

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = Vr_i + V\phi_i \quad \text{Eq. 7}$$

Soit :

$$\frac{dC_i}{dt} = r_i + \phi_i \quad \text{Eq. 8}$$

C_i (g.L^{-1}) est la concentration du composé i dans le volume réactionnel. L'intégration du système d'équations différentielles précédent fournit l'évolution dans le temps des concentrations.

r_i ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) désigne la vitesse réactionnelle volumétrique. C'est une variable algébrique, c'est-à-dire qu'elle est négative quand il s'agit d'une consommation d'un substrat et positive quand il s'agit de la production d'un composé.

ϕ_i ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) désigne le flux volumétrique d'entrée et /ou de sortie (positif ou négatif) des substrats et produits dans le volume réactionnel.

L'équation générale précédente définit donc le cadre général de la modélisation. L'expression générale d'un modèle dépend de la façon d'exprimer les variables du membre de droite de l'expression précédente, c'est-à-dire les vitesses réactionnelles volumétriques et les flux volumétriques. Par exemple, lorsque le système fonctionne en chémostat le flux s'exprime en fonction des concentrations d'entrée et de sortie et du taux de dilution $D = F/V$:

$$\phi_i = D(C_i^{\text{ent}} - C_i^{\text{sort}}) \quad \text{Eq. 9}$$

4.1.2 Partie stœchiométrique

Une fois définis, les substrats et les produits décrivant une conversion, que ce soit une réaction chimique ou biologique, sont liés par une équation stœchiométrique qui traduit la

conservation des éléments. Bien sûr, ceci suppose que la composition élémentaire de tous les substrats et produits soit définie, ce qui est une première contrainte.

Les rendements de conversion y sont définis comme les rapports (en masse) entre les produits et les substrats :

$$Y_{ij} = \frac{\alpha_i M_i}{\alpha_j M_j} : \text{rendement de conversion du produit } i \text{ à partir du produit } j \text{ en (g } i / \text{ g } j)$$

α_i, α_j : coefficients stoechiométriques
 M_i, M_j : masses molaires

On voit donc que se fixer une stoechiométrie revient à se fixer des rendements.

En termes d'expression des vitesses réactionnelles, c'est-à-dire en utilisant les notations utilisées précédemment et pour le cas où le système réactif est décrit par une seule stoechiométrie, on peut donc écrire :

$$r_i = Y_{ij} r_j \quad \text{Eq. 10}$$

Si les coefficients stoechiométriques sont exprimés en valeurs algébriques (négatifs pour les substrats et positifs pour les produits) les rendements sont également algébriques. Le signe des vitesses dans l'expression des bilans (Eq. 11) est donc bien conforme à ce qui est attendu et à la convention de signe de l'Eq. 11.

Si p désigne le nombre d'éléments constitutifs et n le nombre de substrats et produits, le nombre de coefficients stoechiométriques « ajustables » ou indépendants est $n - p - 1$. Cette relation prend en compte le fait qu'on fixe un des coefficients à la valeur de 1. Le nombre obtenu représente le nombre de degrés de liberté associés à la définition de la stoechiométrie. En particulier si $n = p - 1$, tous les coefficients stoechiométriques sont imposés par le principe de Lavoisier. A composition élémentaire constante de tous les substrats et produits, la conversion se déroule donc à stoechiométrie constante et donc à rendements constants. On ne présente pas ici les cas particuliers où certaines équations de conservation entre éléments sont redondantes. Finalement, la détermination d'une stoechiométrie à partir de bilans de conservation sur les éléments constitutifs est un travail qui répond pleinement aux méthodologies de l'algèbre linéaire et doit être traitée comme telle.

Dans le cas le plus général, les stoechiométries peuvent être variables en fonction du temps et des conditions de culture, ce qui traduit le fait que les rendements deviennent eux-mêmes

variables. Les lois de variation des rendements en fonction du temps et des conditions de culture sont difficiles à formuler de façon générique. C'est pourquoi, on préfère dans les travaux de modélisation exprimer plusieurs stœchiométries à coefficients fixés et se déroulant en parallèle ; les variations des rendements peuvent toujours être représentées par un ensemble de stœchiométries différentes se déroulant à des vitesses elles-mêmes différentes et non proportionnelles.

Pour mémoire, lorsque plusieurs stœchiométries, fonctionnant en parallèle, se déroulent à des vitesses qui restent proportionnelles entre elles, on pourra toujours effectuer la somme des stœchiométries pondérée par ces vitesses. Cela conduit à une nouvelle stœchiométrie globale, elle-même à coefficients stœchiométriques constants, donc à rendements constants.

En désignant par R_k la vitesse volumétrique de la réaction k exprimée $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$, la vitesse spécifique de conversion du composé i s'écrit :

$$r_i = \sum_k Y_{ik} R_k \quad \text{Eq. 11}$$

Nous avons supposé que la vitesse de chaque réaction était exprimée en variables massiques par rapport au composé k , celui-ci pouvant bien entendu être différent d'une réaction à l'autre.

4.1.3 Partie cinétique

A chaque équation stœchiométrique correspond une vitesse réactionnelle. Les vitesses réactionnelles sont exprimées par des relations cinétiques en fonction des concentrations en substrats et des produits. Sachant que le modèle général de culture s'exprime sous forme d'un système d'équations de bilans sur ces mêmes entrées et sorties, les valeurs de ces concentrations résultent elles-mêmes de la résolution de ces équations de bilan (Eq. 8). Le calage d'un modèle cinétique à partir de résultats expérimentaux nécessite donc de résoudre le système d'équations de bilans et d'ajuster les paramètres du modèle cinétique aux résultats. Il s'agit donc d'une identification non linéaire qui doit être réalisée de façon itérative dans le cas général.

Cependant, on voit intuitivement (ce qui est confirmé par l'analyse de détail) qu'il existe essentiellement deux cas limite :

Le métabolisme et les différentes cinétiques enzymatiques intracellulaires contrôlent les vitesses réactionnelles globales ; le microorganisme « a tout ce qu'il lui faut » dans le volume

réactionnel et la (ou les) vitesses réactionnelles sont uniquement contrôlées par les régulations métaboliques qui s'établissent sans aucune limitation externe. Le modèle cinétique exprime essentiellement des cinétiques enzymatiques, notamment en croissance exponentielle où finalement la vitesse de croissance globale observée devient proportionnelle à la quantité de biomasse. L'intégration de l'équation de bilan sur le réacteur conduit à une cinétique exponentielle.

Une vitesse est contrôlée par une (ou plusieurs) conditions externes. C'est le cas des limitations par le transfert où la vitesse est imposée au microorganisme par les conditions opératoires. Ceci est avéré dans au moins trois cas importants pour notre étude : la limitation par le transfert radiatif, la limitation par le transfert gaz liquide, la limitation par l'apport en substrat qui peut conduire au lessivage de la biomasse produite en culture en continu. Par conséquent, le métabolisme et les régulations des flux intracellulaires doivent s'adapter aux conditions externes et plus précisément à la vitesse qui est imposée. L'expression du modèle de fonctionnement dépend donc essentiellement de la formulation des cinétiques physiques, sachant que le modèle global s'exprime toujours via le système d'équations de bilans.

Cependant, il existe toute une gamme de comportements différents, notamment dans le cas où le microorganisme adapte son métabolisme en modifiant l'expression de certaines voies, c'est-à-dire en modifiant les rendements de conversion. C'est précisément ces cas-là qu'il faut envisager dans notre étude.

Donc on conçoit que, même si la présentation précédente établit une partition entre les aspects stœchiométriques et les aspects cinétiques, il existe intrinsèquement une relation forte entre ces deux « parties » du modèle.

4.2 Flux métaboliques et formulation matricielle

Avec ce qui précède, il sera donc toujours possible de formuler un modèle de fonctionnement métabolique en développant parallèlement trois axes :

L'expression, le calcul et la prédiction des rendements de conversion en fonction des conditions opératoires, des concentrations, du temps de culture, etc. et le respect de la contrainte de conservation des éléments, c'est-à-dire dans le cadre d'une ou plusieurs expressions des stœchiométries.

L'expression et la compréhension des cinétiques de transferts physiques qui peuvent devenir limitantes, tels que le transfert radiatif et les transferts de gaz dissous.

L'expression de cinétiques biologiques en considérant que, dans les cas de non limitation, les vitesses contrôlant le fonctionnement sont essentiellement de type enzymatique et résultent de ce fait de l'expression génétique.

L'ensemble de ces blocs de modèle doit être inséré dans un système de bilans en régime transitoire sur les substrats et les produits de la culture (Eq. 8). Notons que la biomasse fait partie des produits.

Le premier axe de travail, qui concerne l'expression des stœchiométries, est finalement celui qui comporte le plus d'empirisme, car les variations ou les évolutions de rendements dépendent de facteurs intrinsèques qu'il faut essayer d'analyser. Bien entendu pour des utilisations strictement opérationnelles et à partir d'un corpus expérimental suffisant, la modélisation empirique de rendements non constants peut être parfaitement acceptable. Néanmoins le modèle obtenu s'adaptera difficilement à un changement de souche et / ou de conditions opératoires. Ce n'est pas l'approche qui est privilégiée ici. Ce travail de thèse envisage une analyse mécanistique plus poussée, avec l'ambition de prendre en compte une connaissance plus profonde du métabolisme.

La technique développée consiste à intégrer l'ensemble des voies métaboliques d'un microorganisme donné. On utilise le terme générique de calcul de flux métaboliques. Ceci signifie qu'on exprimera les cinétiques et les stœchiométries globales de la culture à partir d'une connaissance détaillée du métabolisme.

De façon globale et générale le fonctionnement du métabolisme cellulaire peut être récapitulé en trois grandes parties (Figure 19) :

- La synthèse de précurseurs (ou de briques) métaboliques, c'est-à-dire les molécules simples résultant du métabolisme central, principalement liée aux flux de carbone et d'azote.
- La synthèse des constituants cellulaires à partir des briques précédentes, autrement dit la synthèse des biomolécules élaborées composant la principale partie des constituants cellulaires.

- Le métabolisme énergétique, régénérant les cofacteurs et régulant la régénération de l'ATP nécessaire aux synthèses cellulaires.

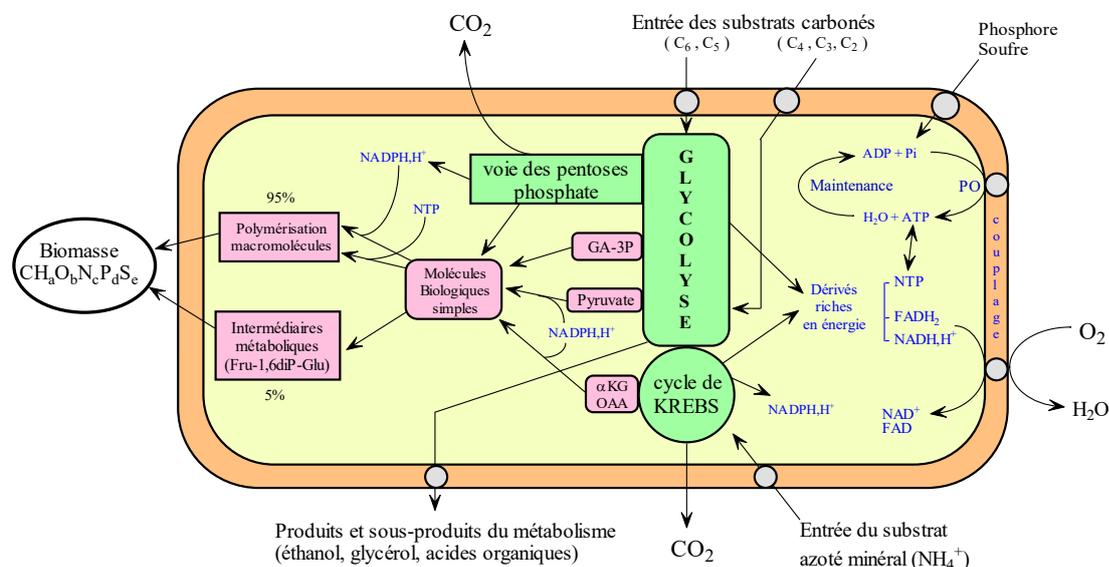


Figure 19 : Vision de principe du métabolisme cellulaire

La base de la modélisation métabolique repose sur la prise en compte de la totalité des stœchiométries descriptives de l'ensemble des bioconversions cellulaires. Le point important est qu'aucune de ces stœchiométries ne comporte de coefficient stœchiométrique à déterminer, l'analyse des mécanismes métaboliques fournissant *de facto*, équation par équation, une description conforme au principe de Lavoisier.

La finalité est alors de déterminer (de modéliser) l'ensemble des vitesses métaboliques en fonction des conditions opératoires. Ce but apparaît comme beaucoup plus ambitieux que l'objectif précédent de modélisation de la culture, mais en fait, ce cadre structurel permet de formuler des conditions qui expriment des couplages entre les cinétiques physiques et les cinétiques enzymatiques. Le fonctionnement du système est formulé de façon matricielle de la façon suivante :

$$S J = A_{ES}$$

Eq. 12

S désigne la matrice des coefficients stœchiométriques (*n* produits et substrats sur les lignes et *r* réactions sur les colonnes)

J est le vecteur des flux métaboliques, c'est-à-dire des r vitesses de réaction. Les vitesses de réaction sont obtenues une fois qu'on a multiplié le flux intracellulaire (en mole.g_X⁻¹) par la concentration en biomasse. Avec les notations précédentes, ceci s'exprime par :

$$R_k = \alpha_k M_k C_X J_k \quad \text{Eq. 13}$$

J_k est le $k^{\text{ième}}$ flux métabolique (mole.g_X⁻¹.h⁻¹)

C_X est la concentration en biomasse (g_X.L⁻¹)

α_k et M_k sont respectivement le coefficient stœchiométrique (algébrique) et la masse molaire du produit k qui sert de référence à l'expression de la vitesse volumétrique R_k .

A_{ES} désigne le vecteur des entrées / sorties de la cellule. Les éléments de ce vecteur ont la même unité que les éléments du vecteur J (mole.g_X⁻¹.h⁻¹) ; ce sont des vitesses réactionnelles qui doivent être exprimées en terme de vitesses spécifiques par unité de masse de biomasse sèche (ou éventuellement par unité de masse de protéine).

Afin d'utiliser cette formulation et de faire le raccord avec la formulation de bilan, le vecteur des vitesses r_i s'exprime donc par :

$$r = C_X M A_{ES} \quad \text{Eq. 14}$$

r est le vecteur des vitesses réactionnelles volumétriques (g.L⁻¹.h⁻¹) pour n produits et substrats.

M est la matrice diagonale des masses molaires des composés comportant n lignes et n colonnes.

Quelle que soit la dimension du système, il existe une source de simplification importante qui consiste à supposer qu'un grand nombre de composés ne rentrent ni ne sortent de la cellule, appelés intermédiaires métaboliques, de sorte qu'une partie du vecteur au second membre soit déterminée (éléments égaux à 0). En d'autres termes, cette simplification consiste à supposer que les intermédiaires métaboliques sont formés et régénérés à la même vitesse. Ce qui amène à un ensemble de contraintes sur le calcul des vitesses, diminuant de façon drastique

l'indétermination du système. En corollaire, ceci revient à faire l'hypothèse d'un régime pseudo-permanent pour les intermédiaires métaboliques dont l'accumulation intracellulaire est négligée. Le plus souvent, cette supposition est justifiée puisque les phénomènes que l'on cherche à modéliser sont des valeurs moyennes sur l'ensemble du volume réactionnel. Mais également, il faut souligner que l'on cherche à représenter des phénomènes avec des constantes de temps de l'ordre de la dizaine de minutes alors que la modulation des concentrations intracellulaires est certainement beaucoup plus rapide.

Partant de là, on distingue dans les composés, les composés échangeables (E) entre l'intérieur de la cellule et son environnement et les composés intermédiaires métaboliques, non échangeables (NE), dont la vitesse d'accumulation est nulle.

Pour autant, si l'on a n produits et intermédiaires et r flux métaboliques, calculer les flux revient à construire, à partir de l'équation matricielle précédente, une matrice inversible (déterminant non nul) au moins d'ordre r avec un second membre dont les éléments sont tous connus et dont un au moins est non nul.

Sans entrer dans les détails de la méthode, on procède en plusieurs étapes :

On examine tout d'abord les colinéarités entre les lignes sur la partie qui concerne les intermédiaires métaboliques (NE). Il existe des lignes colinéaires, sachant que certains intermédiaires sont inscrits dans la description sous forme de radicaux (NAD, FAD, Adénosine, etc.) et que ce phénomène génère des colinéarités qui doivent être éliminées. On obtient ainsi n_1 lignes indépendantes avec des zéros en correspondance dans le vecteur A_{ES} .

Si p désigne le nombre d'éléments (C, H, O, N, etc.) constitutifs des composés échangeables, il faut supprimer p lignes parmi celles qui sont nécessairement colinéaires aux autres, puisqu'elles sont en combinaison linéaire via la conservation stœchiométrique (imposée par le principe de Lavoisier). C'est le résultat de l'écriture exacte de toutes les stœchiométries du métabolisme qui crée intrinsèquement ce type de redondance à éliminer. On conserve alors les autres composés échangeables ce qui revient à prendre en compte n_2 lignes linéairement indépendantes dans les échangeables.

Dans les n_2 lignes précédentes, on ne considère que les lignes concernant les échangeables dont la vitesse est déterminée par des conditions externes (limitation par le transfert par exemple), de façon à exprimer au final les flux dans une situation de limitation. Il est en effet

impératif pour calculer le vecteur J d'avoir pour chaque ligne une valeur finie en correspondance dans le vecteur A_{ES} . Par exemple dans le cas d'une limitation par le transfert d'oxygène, on retiendra l'oxygène comme échangeable et on exprimera la valeur de la vitesse de transfert d'oxygène dans le réacteur. Il reste donc après cette opération n_3 lignes échangeables dont la vitesse est fixée.

A ce stade, on obtient une matrice B qui est formée de $n_1 + n_3$ lignes non colinéaires et de r colonnes. Il y a toujours autant de flux métaboliques à calculer, soit r flux. Le vecteur B_{ES} comprend tous les éléments de A_{ES} qui correspondent aux lignes de la matrice de départ S qui ont été conservées. Par construction, tous les éléments de A_{ES} sont connus.

Pour pouvoir inverser et déterminer le vecteur des flux J , on complète la matrice B et le vecteur B_{ES} soit par des relations supplémentaires au sein des flux qui tiennent compte des couplages entre les voies métaboliques, soit par des contraintes thermodynamiques d'irréversibilité de certaines réactions, ou d'équilibres réactionnels, ou encore par des informations complémentaires concernant les transferts physiques comme par exemple à propos du transfert radiatif. C'est dans la partie du travail d'analyse que se situe réellement la partie modélisation de la culture. On complète ainsi la matrice B d'une part, et le vecteur B_{ES} , d'autre part, par $(r - n_1 - n_3)$ lignes supplémentaires. Ces lignes définissent les degrés de liberté du système ou encore la dimension de l'espace de régulation métabolique. Dans la plupart des cas, on constate que la dimension de cet espace de régulation reste inférieure à 5. Ces informations supplémentaires définissent donc de nouvelles relations entre les flux métaboliques. Ces relations (linéaires) que l'on ajoute sous forme de lignes dans la matrice doivent être déterminées de façon à supprimer les colinéarités entre les colonnes si elles existent. C'est le cas notamment lorsqu'il y a des cycles métaboliques. Il en est de même lorsque l'on est dans l'impossibilité d'adjoindre la valeur d'une vitesse de production ou de consommation d'un composé échangeable qui est dans le vecteur B_{ES} . Il est alors possible de remplacer la ligne relative à ce composé par une autre information concernant un ou plusieurs flux métaboliques lorsque ceci est plus facile à réaliser. A l'arrivée, on obtient alors une matrice C qui est inversible et un vecteur C_{ES} dont tous les éléments sont définis. Dans le cas

où la matrice \mathbf{C} comporte plus de lignes que de colonnes, le système est surdéterminé ; on met alors en place une méthode de réconciliation (par analyse multilinéaire). Ce dernier point n'est pas présenté ici.

La suite est très simple. Le vecteur des flux est donné par : $\mathbf{J} = \mathbf{C}^{-1}\mathbf{C}_{ES}$. Bien entendu la matrice \mathbf{C} est inversible par construction. Une fois les valeurs des flux connues, on les reporte dans l'équation de départ pour obtenir toutes les vitesses des entrées / sorties de la cellule : $\mathbf{A}_{ES} = \mathbf{S}\mathbf{J}$. L'opération précédente est toujours réalisable, quelles que soient les colinéarités qui existent dans la matrice \mathbf{S} . Les valeurs des éléments de \mathbf{A}_{ES} sont insérées dans les équations de bilans sur les composés de la culture. Ces bilans constituent toujours la structure du modèle. Ce système d'équations différentielles définit donc toujours le modèle de la culture.

De façon globale, outre l'écriture de la matrice \mathbf{S} , autrement dit de la stœchiométrie, le principal travail de modélisation ne comprend plus que deux parties :

- Exprimer les vitesses de transfert physique, telles que les limitations physiques éventuelles ou encore suivant les notations de l' Eq. 8 les flux volumétriques
- Écrire les relations de couplage entre les voies, c'est-à-dire analyser sur le plan thermodynamique et énergétique le fonctionnement du métabolisme cellulaire.

Par conséquent ce travail concerne tout autant l'analyse du métabolisme de *Chlamydomonas reinhardtii* que de la compréhension de la croissance d'*Arthrospira platensis* en mini photobioréacteur. Dans un cas comme dans l'autre, la compréhension fine des relations de couplage entre le transfert radiatif, la disponibilité de substrats carbonés et les cinétiques des échanges gazeux (O_2 , CO_2 et H_2) est un élément important de la modélisation.

4.3 Récapitulation de la formulation du modèle

Avec les notations précédentes, on peut récapituler, suivant une formulation explicite, la modélisation. En utilisant une écriture matricielle, on obtient :

$$\mathbf{J} = \mathbf{C}^{-1}\mathbf{C}_{ES}$$

Eq. 15

$$A_{ES} = SJ \quad \text{Eq. 16}$$

$$r = C_X MA_{ES} = C_X MSJ \quad \text{Eq. 17}$$

$$\frac{dC}{dt} = r + \phi = C_X MSJ + \phi \quad \text{Eq. 18}$$

La modélisation consiste donc à exprimer, dans cet ordre :

- la matrice S (hypothèse d'une cartographie métabolique générale),
- la matrice C qui doit être inversible,
- le vecteur le vecteur C_{ES} dont les lignes sont en correspondance avec celles de la matrice C et dont les éléments doivent être complètement calculables et comporter au moins une relation cinétique,
- le vecteur ϕ des flux volumétriques d'entrée et / ou de sortie (positifs ou négatifs) des substrats et produits dans le volume réactionnel.

Il faut noter que, pour que ce modèle tienne compte de la croissance cellulaire, la biomasse doit elle-même apparaître comme un produit du métabolisme. Il faut considérer, dans ces relations, la concentration C_x comme étant la concentration de biomasse active (ou catalytique), sachant que toutes les vitesses sont exprimées de façon proportionnelle à cette concentration. En d'autres termes, les produits de réserve (amidon par exemple) doivent être pris en compte comme des produits externes.

Pour rappel, les hypothèses principales de cette formulation sont :

- Des concentrations homogènes dans le volume réactionnel ;
- Pas de variation du volume liquide dans le réacteur ;
- Le volume intrinsèque de la biomasse humide négligeable devant le volume de liquide ;
- La non accumulation des intermédiaires métaboliques ;
- La capacité à formuler toutes les configurations métaboliques dans la seule matrice S , sachant que les hypothèses conduisant à l'établissement de la

matrice \mathbf{C} (qui est également une donnée d'entrée de la modélisation) peuvent conduire à annuler le fonctionnement de certaines voies.

L'intégration de ce système d'équations différentielles fournit l'évolution des concentrations en fonction du temps à partir d'une condition initiale qui doit être fixée. Par construction, les concentrations en intermédiaires métaboliques restent constantes. Il faut souligner que le vecteur \mathbf{C}_{ES} comporte nécessairement au moins une, voire plusieurs expressions cinétiques explicites en fonction des concentrations dans le volume réactionnel.

Dans certains cas, on peut être amené à ajouter une condition supplémentaire de non accumulation dans le volume du réacteur d'un produit échangeable. C'est le cas par exemple pour l'oxygène. Il s'agit aussi d'une hypothèse de régime pseudo-permanent, qu'il faut cependant distinguer de l'hypothèse faite sur les intermédiaires métaboliques puisqu'elle ne concerne pas le même volume. Ce cas est simple à introduire dans cette formulation : il suffit de conserver dans le vecteur \mathbf{C}_{ES} (et donc dans la matrice \mathbf{C}) la ligne qui correspond à l'oxygène et à exprimer que la valeur de l'élément de \mathbf{C}_{ES} est égale à la capacité de transfert (en moles) divisée par la concentration en biomasse. *De facto*, l'accumulation d'oxygène devient nulle après intégration du modèle et toutes les autres vitesses en sont affectées.

De même, il est important d'aller suffisamment loin dans l'analyse mécanistique du métabolisme pour affecter à une étape bien particulière une absorption photonique à une longueur d'onde précise. Là encore, si l'étape de 'captation' du photon fait partie de la description métabolique, on conserve dans \mathbf{C}_{ES} la ligne qui concerne les photons de cette longueur d'onde et on affecte l'expression cinétique qui tient compte du modèle physique de transfert radiatif. C'est de cette façon que le transfert physique et les cinétiques métaboliques peuvent être couplés.

4.4 Analyse mécanistique globale simplifiée

Partant de l'analyse précédente qui envisage un mode de modélisation mécanistique complet, on peut avoir une analyse plus simple dont le principe reste finalement le même. Ceci consiste à regrouper les « événements métaboliques » en quatre grandes familles :

- Le métabolisme énergétique (synthèse des cofacteurs réduits et oxydés, synthèse d'ATP essentiellement),
- La synthèse des constituants cellulaires,
- La maintenance,
- La synthèse et / ou la mobilisation des substances de réserve.

La description de chaque « événement métabolique » est finalement le résultat d'une somme de voies métaboliques au vu des hypothèses de fonctionnement qui peuvent être faites. C'est donc une forme d'analyse métabolique qui est bien en ligne avec l'analyse présentée au paragraphe précédent mais qui en fournit une version simplifiée. Les seuls intermédiaires métaboliques qui sont réellement pris en compte sont les cofacteurs réduits et oxydés d'une part, les intermédiaires énergétiques de type ATP d'autre part. La description des stœchiométries de régénération des cofacteurs et des couplages entre ces formes d'équations est un élément essentiel de la modélisation. L'équation de maintenance se traduit par une hydrolyse de l'ATP. La synthèse des substances de réserve est un phénomène à prendre nécessairement en compte au même titre que la maintenance.

On obtient alors une modélisation qui prend en compte, de la même façon que précédemment, les effets des limitations physiques. Cette version simplifiée permet néanmoins de s'affranchir des calculs matriciels lourds qui rendent le système intuitivement moins compréhensible.

Finalement cette approche simplifiée est toujours à considérer en premier lieu, une modélisation plus complète sous forme matricielle pouvant apporter des raffinements complémentaires au cas où la vision simplifiée n'apporte pas suffisamment de précision. Ce point de vue sera systématiquement considéré par la suite.

5 Analyse cinétique couplée à l'analyse thermodynamique

5.1 Contexte général

Qu'il s'agisse de l'analyse globale simplifiée ou du calcul de l'ensemble des flux métaboliques, il apparaît toujours nécessaire de formuler des hypothèses de couplage pour réduire l'indétermination du système. C'est le moyen d'exprimer les variations éventuelles de rendements en fonction des conditions appliquées. Cela correspond à la cinquième étape de la méthode décrite plus haut pour le calcul des flux. Nous avons d'ailleurs écrit qu'il s'agissait de l'étape de modélisation proprement dite. En effet, pour un ensemble d'hypothèses, le

calcul des flux à la dernière étape peut conduire à calculer des flux qui correspondent à des vitesses non réalisables d'un point de vue thermodynamique. Cela invalide donc les hypothèses de départ. Corrélativement, pour formuler des hypothèses correctes de couplage entre les flux métaboliques, il est nécessaire d'analyser le fonctionnement sur le plan thermodynamique et des bilans d'énergie et d'entropie.

5.2 Formulation des bilans d'énergie

Tout d'abord, nous emploierons le pluriel « bilans d'énergie » pour distinguer le bilan enthalpique qui conduit au calcul de la quantité de chaleur dégagée ou absorbée, et le bilan entropique que nous déduirons du bilan d'énergie totale.

Nous nous plaçons dans une hypothèse de régime pseudo-permanent pour le calcul des accumulations des quantités d'énergie. Ceci revient à considérer qu'il n'y a pas d'accumulation de quantité d'énergie à l'intérieur du volume réactionnel, ou autrement dit, qu'à un instant donné d'une culture, les bilans d'énergie permettent de relier les flux entrants, sortants et les dissipations. C'est une hypothèse tout à fait réaliste. Pour s'en rendre compte, au moins de façon approximative, on retient qu'une culture s'effectue généralement à température constante. Ceci signifie qu'il n'y a pas d'accumulation d'enthalpie dans le milieu. Ceci montre également que le bilan entropique a un sens et que l'accumulation de l'entropie doit également être négligée.

Par ailleurs, si ce formalisme peut être développé à la dimension du bioréacteur, l'application à l'échelle de parties du métabolisme sera essentielle pour réduire les indéterminations de la matrice métabolique et formuler des hypothèses de couplage entre des voies métaboliques.

On exprime les bilans, avec les variations dans le temps, avant de faire l'hypothèse du régime pseudo-permanent. En considérant le volume liquide comme constant et l'accumulation d'énergie mécanique comme négligeable, le bilan d'énergie totale s'exprime par :

$$\frac{du}{dt} = \varphi_Q + \varphi_W + h^T \varphi \quad \text{Eq. 19}$$

u : énergie interne totale du système par unité de volume

h : vecteur des enthalpies massiques des composés

φ : vecteur des flux entrants et sortants par unité de volume de liquide

φ_Q, φ_W : débits de chaleur et d'énergie mécanique échangés par unité de volume liquide

Dans l'expression précédente, nous n'avons pas pris en compte les transferts radiatifs et nous avons négligé les termes de variation d'énergie cinétique et d'énergie potentielle des fluides entre l'entrée et la sortie. Nous reprendrons plus loin cette équation avec les termes radiatifs qui nécessitent un traitement spécifique.

Comme la température est considérée comme constante (système isotherme), on peut exprimer la variation de l'entropie totale du système. La partition du bilan d'énergie totale s'effectue à partir de la relation fondamentale de la thermodynamique :

$$T dS = dU + p dV - \sum_i \mu_i dn_i \quad \text{Eq. 20}$$

Pour transposer cette relation différentielle entre les variables d'état à une relation de bilan entropique, il est nécessaire de soustraire le débit d'énergie mécanique du bilan entropique et d'ajouter le débit d'énergie produit par les frottements. En considérant à nouveau le volume constant, en travaillant avec des variables volumétriques (par unité de volume), et en négligeant le travail des forces de pression entre l'entrée et la sortie du système, on obtient :

$$T \frac{ds}{dt} = \frac{du}{dt} - \sum_i \mu_i \frac{dC_i}{dt} - \phi_w + \phi_{Fr} \quad \text{Eq. 21}$$

Pour exprimer le bilan d'entropie, on remplace alors les termes du membre de droite par les expressions obtenues dans les bilans matière et d'énergie totale.

$$\begin{aligned} T \frac{ds}{dt} &= \phi_Q + \phi_{Fr} + h^T \phi - \mu^T \frac{dC}{dt} \\ &= \phi_Q + \phi_{Fr} + (h^T - \mu^T) \phi - \mu^T r \\ &= \phi_Q + \phi_{Fr} + T s^T \phi - \mu^T r \end{aligned} \quad \text{Eq. 22}$$

μ : vecteur des potentiels chimiques de formation des composés par unité de masse

s : vecteur des entropies de formation des composés par unité de masse

A partir de là, on partitionne le bilan d'entropie en deux parties. Il est nécessaire de bien distinguer la partition du bilan d'énergie totale précédente et cette partition du bilan d'entropie.

La première partie correspond au débit d'entropie par unité de volume résultant des entrées / sorties dans le système : ϕ_{ent} . La deuxième partie correspond à un terme de source par unité de volume, c'est-à-dire à la partie réactionnelle : σ . Il existe cependant une ambiguïté de

définition concernant la partie rayonnement, sachant qu'on peut la comptabiliser dans l'une ou l'autre partie. Il nous semble cependant plus opportun de regrouper les termes strictement réactionnels tout en gardant à l'esprit que l'on prend en compte, dans la description des mécanismes, l'entrée de photons comme étant un élément des stœchiométries. Ceci conduit à :

$$T \frac{ds}{dt} = T \dot{\Phi}_{ent} + T \sigma \quad \text{Eq. 23}$$

$$T \dot{\Phi}_{ent} = \dot{\Phi}_Q + \dot{\Phi}_{Fr} + T s^T \dot{\Phi} \quad \text{Eq. 24}$$

$$T \sigma = -\mu^T r = -C_X \mu^T M S J \quad \text{Eq. 25}$$

On a remplacé dans l'expression du terme source l'expression du vecteur des vitesses de la réaction obtenue précédemment. On introduit alors le vecteur des affinités des réactions de la façon suivante :

$$A^T = -\mu^T M S \quad \text{Eq. 26}$$

On vérifie sans peine que A est un vecteur colonne de r éléments (A^T un vecteur ligne de r éléments). On obtient alors une expression très simple du terme source :

$$T \sigma = C_X A^T J \quad \text{Eq. 27}$$

Avec l'hypothèse de régime pseudo-permanent (pas d'accumulation d'énergie ni d'entropie dans le système), ces équations de bilan conduisent à :

Hypothèse de régime pseudo - permanent sur le bilan d'énergie totale :

$$\dot{\phi}_Q + \dot{\phi}_W = -h^T \dot{\phi}$$

Hypothèse de régime pseudo - permanent sur le bilan d'entropie :

$$T \sigma = -T \dot{\phi}_{ent} \quad \text{Eq. 28}$$

soit :

$$T \sigma = C_X A^T J = -(\dot{\phi}_Q + \dot{\phi}_{Fr} + T s^T \dot{\phi}) = \mu^T \dot{\phi} + \dot{\phi}_W - \dot{\phi}_{Fr}$$

En négligeant les termes mécaniques ce qui est parfaitement justifié ici (à condition de ne pas prendre en compte la chaleur à évacuer en raison de l'agitation mécanique), on obtient :

$$\dot{Q}_Q = -h^T \dot{Q} \quad \text{Eq. 29}$$

$$T\sigma = C_x A^T J = -(\dot{Q}_Q + T s^T \dot{Q}) = \mu^T \dot{Q} \quad \text{Eq. 30}$$

Formulée sous cette forme, la dernière relation permet d'exprimer un bilan d'entropie global. Mais le plus intéressant avec cette formulation est de pouvoir analyser réaction par réaction leur faisabilité ou non. En effet, pour qu'une réaction chimique se déroule, il faut que l'affinité chimique soit positive, sachant que lorsque plusieurs réactions sont couplées, notamment via des transferts diffusionnels, certaines peuvent faire apparaître globalement des affinités négatives. Il est donc nécessaire de comparer le signe des éléments du vecteur des affinités A et les éléments du vecteur J . Ceci donne lieu à l'introduction de relations de contraintes dans la matrice descriptive C ce qui est l'objectif recherché.

Une remarque importante est que les systèmes d'équations précédents ont été établis en considérant que le système d'étude était homogène du point de vue des concentrations. Ceci est bien vérifié à l'échelle macroscopique dans des réacteurs de petite taille et sur un intervalle de temps suffisamment important pour filtrer les fluctuations. Par contre, à l'échelle locale au niveau intracellulaire, il faut revenir sur cette hypothèse pour analyser le signe des affinités. Les gradients de pH et de potentiels électriques dans différents compartiments intracellulaires sont tels que les affinités réactionnelles peuvent être significativement différentes (et d'ailleurs de signe inversé) suivant que l'on utilise un pH intracellulaire moyen ou bien le pH local. On sera donc amené à considérer l'analyse de mécanismes de façon fine et locale. Les échanges entre compartiments permettent de reconstituer la vision d'ensemble du fonctionnement cellulaire.

Quoi qu'il en soit, la première condition à l'application de cette méthodologie est de pouvoir calculer les enthalpies h , les entropies s et les potentiels chimiques μ des différents composés du métabolisme cellulaire. C'est l'objet de la section suivante.

5.3 Prise en compte des échanges de photons dans les bilans d'énergie

Dans la formulation précédente, nous n'avons pas pris en compte les échanges de photons dans les bilans d'énergie. Outre le fait que la description doit suivre une formulation

particulière qui sera décrite plus loin, les bilans d'énergie doivent être formulés de façon spécifique pour au moins trois raisons :

- Lors de réactions photochimiques, les photons n'interviennent pas comme des composés chimiques matériels. En effet, ils ne sont pas des quantités conservées au même titre que les bilans matière qui ont été écrits.
- On déduit de la propriété précédente que le potentiel chimique du photon est nul à l'équilibre thermodynamique, quelle que soit la longueur d'onde.
- L'énergie du photon est bien connue et déterminée par la loi de Planck : $E = h\nu$. Il convient cependant d'exprimer l'enthalpie et l'entropie du photon par des relations spécifiques supplémentaires pour établir les bilans d'entropie et d'énergie totale.

Pour préciser les choses, nous procédons en deux temps. Tout d'abord nous exprimons les bilans d'énergie puis nous précisons le calcul des différentes variables. Nous définissons les variables suivantes, qui sont toutes définies par rapport à une unité de volume de réacteur :

φ^* : débit spécifique de photons en entrée (moles.m⁻³)

φ_ε^* : débit d'énergie interne associée au débit φ^* (J.m⁻³) : $\varphi_\varepsilon^* = h\nu\varphi^*$

φ_p^* : débit d'énergie mécanique associée au débit φ^* (J.m⁻³)

φ_{ent}^* : débit d'entropie au débit φ^* (J.K⁻¹.m⁻³)

Comme le potentiel chimique du photon est nul à l'équilibre thermodynamique, on a une relation nécessaire entre ces débits :

$$\phi_\varepsilon^* + \phi_p^* - T \phi_{ent}^* = 0 \quad \text{Eq. 31}$$

On considère tout d'abord un système non réactif. Les bilans d'énergie s'écrivent de façon très similaire à ce qui a été écrit plus haut, avec cependant la prise en compte du terme de pression radiative, c'est-à-dire du terme de débit d'énergie mécanique ϕ_p .

Le bilan d'énergie s'écrit :

$$\frac{du}{dt} = \phi_Q + \phi_W + \phi_\varepsilon^* + \phi_p^* \quad \text{Eq. 32}$$

Le bilan d'entropie s'écrit :

$$T \frac{ds}{dt} = \phi_Q + \phi_{Fr} + T \phi_{ent}^* - \phi_p^* \quad \text{Eq. 33}$$

On voit apparaître le terme $-\phi_p^*$ dans le bilan pour tenir compte du travail des forces de pression qui avaient été négligées dans le paragraphe précédent. En tenant compte de la relation de contrainte entre les débits d'énergie associée aux flux de photons, le bilan entropique est alors réécrit de la façon suivante :

$$T \frac{ds}{dt} = \phi_Q + \phi_{Fr} + \phi_\varepsilon^* \quad \text{Eq. 34}$$

Bien que ce soit hors sujet, on en déduit également le bilan d'énergie mécanique en régime permanent (qui est la correspondance du théorème de Bernoulli en mécanique des fluides) :

$$\phi_p^* + \phi_W - \phi_{Fr} = 0 \quad \text{Eq. 35}$$

Cette relation très simple et élémentaire lie la pression de radiation à l'énergie mécanique communiquée, elle justifie *a posteriori* le fait que l'on ait considéré le potentiel chimique des photons comme nul.

Partant de cette formulation, on peut maintenant réunir les équations bilan avec la réaction chimique du paragraphe précédent.

Le bilan d'énergie s'écrit :

$$\frac{du}{dt} = \phi_Q + \phi_W + \phi_\varepsilon^* + \phi_p^* + h^T \phi \quad \text{Eq. 36}$$

Le bilan d'entropie s'écrit :

$$T \frac{ds}{dt} = \phi_Q + \phi_{Fr} + \phi_\varepsilon^* + T s^T \phi - \mu^T r \quad \text{Eq. 37}$$

Il reste à effectuer la partition du bilan d'entropie entre un terme convectif et un terme de source, ce qui comporte une part d'arbitraire. Pour ceci, nous introduisons le terme de débit d'entropie ϕ_{ent}^* . On obtient alors :

$$T \frac{ds}{dt} = \phi_Q + \phi_{Fr} + T \phi_{ent}^* + T s^T \phi - \phi_p^* - \mu^T r = T \phi_{ent} + T \sigma \quad \text{Eq. 38}$$

Lorsqu'il existe une réaction photochimique dans le milieu, il faut considérer que la part d'énergie mécanique apportée par le photon est convertie en « énergie chimique ». Il est alors naturel de considérer que :

$$T \phi_{ent} = \phi_Q + \phi_{Fr} + T \phi_{ent}^* + T s^T \phi \quad \text{Eq. 39}$$

$$T \sigma = (\phi_p^* - T \phi_{ent}^*) - \mu^T r = -\phi_p^* - \mu^T r \quad \text{Eq. 40}$$

Avec les notations précédentes, on obtient alors :

$$T \sigma = -\phi_p^* - C_X \mu^T M S J = -\phi_p^* + C_X A^T J \quad \text{Eq. 41}$$

Ceci peut être exprimé en prenant en compte les hypothèses de régime pseudo-permanent sur toutes les formes d'énergie.

Hypothèse de régime pseudo-permanent sur le bilan d'énergie totale :

$$\phi_Q + \phi_W + T \phi_{ent}^* = -h^T \phi \quad \text{Eq. 42}$$

Hypothèse de régime pseudo-permanent sur le bilan d'entropie :

$$T \sigma = -T \phi_{ent} \quad \text{Eq. 43}$$

Soit :

$$T \sigma = -\phi_p^* + C_X A^T J = -(\phi_Q + \phi_{Fr} + T \phi_{ent}^* + T s^T \phi) = \mu^T \phi + \phi_W - \phi_{Fr} \quad \text{Eq.44}$$

En négligeant par ailleurs les termes d'échanges convectifs d'énergie mécanique et de frottement, on obtient :

$$\phi_Q = -T \phi_{ent}^* - h^T \phi \quad \text{Eq. 45}$$

$$T \sigma = (\phi_p^* - T \phi_{ent}^*) + C_X A^T J = -\phi_p^* + C_X A^T J = -(\phi_Q + T \phi_{ent}^* + T s^T \phi) = \mu^T \phi \quad \text{Eq. 46}$$

Le point remarquable de cette partition est que finalement le terme source prend globalement la même forme d'un point de vue du bilan global. L'autre point est qu'il est clair que la quantité de chaleur à échanger pour maintenir la température dans le système doit tenir compte de la variation d'enthalpie des composés entre l'entrée et la sortie et de l'entropie dissipée par la radiation. Enfin, cette partition du bilan entropique fait clairement apparaître un terme négatif dans le terme source, ce qui indique que la part d'énergie mécanique apportée par le photon doit être retranchée du terme source qui malgré tout doit rester positif.

Cependant, la formulation précédente des bilans prend comme hypothèse de départ que la radiation est à l'équilibre thermodynamique. Ceci n'est pas exact car les photons restent rigoureusement sans interactions entre eux. En d'autres termes, l'équilibre thermodynamique de la radiation n'est atteint que lorsqu'il y a interaction des photons avec la matière. Le principe de calcul pour le rayonnement du corps noir est donc très éloigné des conditions d'un réacteur photochimique. On peut malgré tout conserver la formulation précédente à condition de revenir sur la relation de départ en écrivant une nouvelle relation entre les débits :

$$\phi_{\varepsilon}^* + \phi_p^* - T \phi_{ent}^* = \phi_{\mu}^*$$

$\phi_{p\ milieu}^*$: débit d'énergie mécanique dans le milieu réactionnel associé au débit ϕ^* ($J.m^{-3}$)

ϕ_{μ}^* : débit d'enthalpie libre associé au débit ϕ^* ($J.m^{-3}$)

Il suffit alors d'exprimer différemment les expressions précédentes en calculant le flux :

$$\phi_p^{**} = \phi_p^* - \phi_{\mu}^* \quad \text{Eq. 47}$$

Les deux expressions finales des bilans d'énergie deviennent alors :

$$\dot{Q}_Q = -T\dot{\phi}_{ent}^* - h^T \dot{\phi} = \dot{Q}_{\mu}^* - \dot{Q}_p^* - \dot{Q}_s^* - h^T \dot{\phi} \quad \text{Eq. 48}$$

$$T\sigma = -\dot{Q}_p^* + \dot{Q}_{\mu}^* + C_X A^T J = -(\dot{Q}_Q + T\dot{\phi}_{ent}^* + T s^T \dot{\phi}) = \mu^T \dot{\phi} \quad \text{Eq. 49}$$

5.4 Calcul des débits d'énergie radiative

La question n'est pas ici de résoudre l'équation de transfert radiatif mais d'exprimer les débits d'énergie, d'entropie et d'enthalpie associés à un débit de photons donné à l'équilibre thermodynamique du rayonnement. Dans les traités de physique statistique, les résultats peuvent être résumés comme suit : une radiation à l'équilibre thermodynamique (c'est-à-dire

un flux de photons de différentes longueurs d'onde qui se sont équilibrées à la source avec un corps noir) vérifie la loi de répartition suivante :

$$N_{\text{photon}} = \int_0^{\infty} \frac{g(\varepsilon)}{e^{\frac{\varepsilon}{kT}} - 1} d\varepsilon \quad \text{Eq. 50}$$

$$E_{\text{photon}} = \int_0^{\infty} \frac{\varepsilon g(\varepsilon)}{e^{\frac{\varepsilon}{kT}} - 1} d\varepsilon \quad \text{Eq. 51}$$

$$E_p = -kT \int_0^{\infty} \ln \left(1 - e^{-\frac{\varepsilon}{kT}} \right) g(\varepsilon) d\varepsilon \quad \text{Eq. 52}$$

T est la température de la source et non la température du milieu. On suppose que l'équilibre thermodynamique est réalisé à cette température.

La fonction $g(\varepsilon)$ (en J^{-1}) est la densité d'états. Ceci veut dire que la quantité $g(\varepsilon) d\varepsilon$ représente le nombre d'états dont l'énergie est comprise entre ε et $\varepsilon + d\varepsilon$. On montre que dans un milieu où la vitesse de la lumière est c , on obtient :

$$g(\varepsilon) = \frac{8\pi V \varepsilon^2}{c^3 h^3} \quad \text{Eq. 53}$$

En passant sur les détails de calcul des intégrales précédentes, et surtout en considérant que la fonction $g(\varepsilon)$ est proportionnelle à ε^2 , on démontre que :

$$E_p = \frac{1}{3} E_{\text{photon}} \quad \text{Eq. 54}$$

C'est finalement le seul résultat que nous retiendrons, sachant qu'avec les notations du paragraphe précédent ceci conduit à :

$$\phi_p^* = \frac{1}{3} \phi_\varepsilon^* ; \quad T \phi_{\text{ent}}^* = \frac{4}{3} \phi_\varepsilon^* \quad \text{Eq. 55}$$

Sachant que pour une longueur d'onde de fréquence ν , on a :

$$\phi_\varepsilon^* = \frac{1}{V} h \nu \phi^* \quad \text{Eq. 56}$$

Bien qu'il s'agisse d'une extrapolation de la thermodynamique du rayonnement du corps noir à une gamme de fréquence particulière, ceci fournit une base de calcul pour effectuer les bilans précédents à l'équilibre thermodynamique.

En dehors de cet équilibre, il faut raisonner de façon différente. Le débit d'entropie reste identique entre la source d'énergie et l'entrée dans le système réactionnel. Comme la source et le système réactionnel sont respectivement à des températures T_S et T , on déduit que le débit volumétrique d'entrée d'entropie dans le système réactionnel est :

$$\phi_{ent}^* = \frac{1}{T_S} \frac{4}{3} \phi_\varepsilon^* \quad \text{Eq. 57}$$

On utilise maintenant la relation hors d'équilibre pour le volume réactionnel à T :

$$\phi_\varepsilon^* + \phi_p^* - T \phi_{ent}^* = \phi_\mu^* \quad \text{Eq. 58}$$

Soit en utilisant la relation précédente :

$$T \phi_{ent}^* = \frac{T}{T_S} \frac{4}{3} \phi_\varepsilon^* = \frac{1}{V} \frac{4}{3} \frac{T}{T_S} h \nu \phi^* \quad \text{Eq. 59}$$

$$\phi_\mu^* - \phi_p^* = \phi_\varepsilon^* - T \phi_{ent}^* = \left(1 - \frac{4}{3} \frac{T}{T_S}\right) \phi_\varepsilon^* = \frac{1}{V} \left(1 - \frac{4}{3} \frac{T}{T_S}\right) h \nu \phi^* \quad \text{Eq. 60}$$

On reporte ces expressions dans les équations des bilans d'énergie du paragraphe précédent et on obtient :

$$\phi_Q = -\frac{1}{V} \frac{4}{3} \frac{T}{T_S} h \nu \phi^* - h^T \phi \quad \text{Eq. 61}$$

$$T \sigma = \frac{1}{V} \left(1 - \frac{4}{3} \frac{T}{T_S}\right) h \nu \phi^* + C_x A^T J = \mu^T \phi \quad \text{Eq. 62}$$

Il convient d'apporter une correction supplémentaire aux équations de bilans précédentes. Pour l'instant nous avons considéré que l'énergie mécanique apportée dans le milieu par les photons était identique à la valeur dans le vide, mais cette hypothèse est à nuancer. En effet, il faut prendre en compte le fait que le débit d'énergie mécanique est proportionnel à la vitesse de propagation au carré. Ceci s'exprime par :

$$\phi_{p\ milieu}^* = \frac{u^2}{c^2} \phi_p^* \quad \text{Eq. 63}$$

En utilisant la valeur de l'indice de réfraction, ceci conduit à :

$$\phi_{p\ milieu}^* = \frac{1}{n^2} \phi_p^* \quad \text{Eq. 64}$$

On utilise alors la relation hors d'équilibre pour le volume réactionnel à T et avec le débit d'énergie mécanique apportée dans le milieu par les photons :

$$\phi_\varepsilon^* + \phi_{p\ milieu}^* - T \phi_{ent}^* = \phi_\mu^* \quad \text{Eq. 65}$$

Le terme qu'il faut prendre en compte dans le terme source est toujours $\phi_\mu^* - \phi_p^*$. C'est véritablement le débit d'énergie convertible à la température T (sans terme entropique). Ce terme est donné par :

$$\phi_\mu^* - \phi_p^* = \phi_\varepsilon^* - T \phi_{ent}^* - (\phi_p^* - \phi_{p\ milieu}^*) = \left(1 - \frac{4}{3} \frac{T}{T_S}\right) \phi_\varepsilon^* - \left(1 - \frac{1}{n^2}\right) \phi_p^* \quad \text{Eq. 66}$$

En utilisant l'expression : $\phi_p^* = \frac{1}{3} \phi_\varepsilon^*$ on obtient :

$$\phi_\mu^* - \phi_p^* = \left(\frac{2}{3} + \frac{1}{3n^2} - \frac{4}{3} \frac{T}{T_S}\right) \phi_\varepsilon^* = \frac{1}{3V} \left(2 + \frac{1}{n^2} - \frac{4T}{T_S}\right) h\nu \phi^* \quad \text{Eq. 67}$$

Le terme source s'exprime alors :

$$T \sigma = \frac{1}{3V} \left(2 + \frac{1}{n^2} - \frac{4T}{T_S}\right) h\nu \phi^* + C_x A^\Gamma J = \mu^T \phi \quad \text{Eq. 68}$$

L'application numérique avec $T = 300$ K et $T_S = 6000$ K et en considérant l'indice de réfraction de l'eau $n = 1,33$, on obtient :

$$T \sigma = \frac{0,788}{V} h\nu \phi^* + C_x A^\Gamma J \quad \text{Eq. 69}$$

Le coefficient 0,788 est en parfait accord avec le rendement quantique qui est généralement considéré. Le grand intérêt des expressions précédentes est qu'elles expriment les débits de

chaleur et le terme de source en fonction des débits de matière et du débit de photons (par unité de volume réactionnel).

6 Calcul des propriétés de formation

Les diverses molécules qui interviennent dans le métabolisme cellulaire, en particulier au niveau du chloroplaste et de la mitochondrie, ont été listées pour le travail d'étude énergétique réalisée sur ces deux compartiments intracellulaires (Sasidharan, 2012). Le point principal concerne la détermination des propriétés de formation de composés souvent complexes chimiquement et pour lesquels on n'a pas de moyen de mesurer ces valeurs.

6.1 Les données d'Alberty : l'échelle des molalités

Toute la question est maintenant de pouvoir calculer les propriétés nécessaires à l'établissement des bilans d'énergie. Ceci concerne le calcul des potentiels chimiques et des affinités ainsi que des enthalpies de formation. Ces propriétés interviennent en particulier dans les équations de bilan Eq. 26, Eq. 27, Eq. 69.

Dans la littérature, il existe peu de bases de données qui soient spécifiques aux composés biologiques. La plupart des bases de données sur les propriétés de formation concernent des molécules classiques à l'état gaz ou à l'état liquide pur, comme par exemple pour les composés de la famille des alcanes, des alcènes, des alcools, etc.

Dans le cas du métabolisme cellulaire, les molécules sont complexes et les données recherchées sont dans des conditions qui se rapprochent de l'état « dilution infinie dans l'eau liquide » à une température de 25 °C. Les molécules complexes sont décrites comme des molécules possédant un grand nombre de groupements chimiques et de variétés différentes ou celles possédant une lourde chaîne d'unités répétées, ce sont donc des assemblages poly-atomiques complexes. La base de données d'Alberty (Equilibrator 2.0[®]) (Alberty, 1998, 2003) est le référentiel concernant les composés du métabolisme cellulaire le plus complet. Cependant, cette base de données comporte un certain nombre de lacunes, ce qui a nécessité de développer au laboratoire des méthodes prédictives de calcul de ces propriétés.

À partir de cette banque de données, il est possible de compléter une partie des valeurs d'enthalpie libre de Gibbs (ΔG) d'intérêts, présents dans le réseau de *Chlamydomonas reinhardtii* et ce dans l'échelle des molalités. Nous utilisons ici la notation ΔG pour noter de

façon différente le potentiel chimique qui a été utilisé dans les paragraphes précédents et qui doit être calculé avec une référence absolue, pour permettre des comparaisons entre les potentiels chimiques des composés, de la notation ΔG qui désigne une variation d'enthalpie libre pour une réaction. Ceci permet en outre de porter un « diagnostic » sur la faisabilité réaction par réaction, sachant que les ΔG peuvent toujours être calculés à partir des potentiels chimiques de formation, et être éventuellement corrigés des propriétés d'activités. Comme nous travaillons avec un état de référence à dilution infinie, la correction d'activité peut, au moins en première approximation, être négligée.

Dans un souci d'homogénéité, les ΔG calculés à pH 0, et pour une force ionique nulle, ont été sélectionnés ; seuls les ΔG issus des calculs d'Alberty de 2003 ont été retenus. En effet, certaines valeurs de ΔG que l'on obtient par des méthodes de contributions de groupes, risquent d'entraîner des problèmes d'homogénéité des calculs, notamment sur la définition des états de référence.

De façon générale, l'expression du potentiel chimique comprend deux parties :

$$\mu_i = \mu_i^{0m} + RT \ln \gamma_i m_i \quad \text{Eq. 70}$$

Dans cette expression, μ_i désigne le potentiel chimique du composé i . Sa valeur (kJ.mole^{-1}) dépend de l'état de référence choisi pour les atomes constitutifs. Cette valeur ne dépend pas des échelles de définition des concentrations. Pour qu'il soit possible de comparer les valeurs entre différents composés, il faut que l'état de référence des atomes constitutifs soit le même. Ceci permet alors de calculer les ΔG des réactions à partir des valeurs des potentiels chimiques des composés entrant dans la réaction. Les valeurs des ΔG des réactions ne dépendent ni de l'état de référence des atomes constituant les différentes espèces, ni des échelles de définition des concentrations. En génie chimique, on utilise des états de référence corps pur pour les éléments du système. C'est la convention qui a été utilisée à l'Institut Pascal (Laboratoire de Génie Chimique Biologique devenu Axe Génie des Procédés, Énergétique et Biosystèmes) depuis les travaux de Ould Moulaye (1998). C'est une référence qui est différente de celle d'Alberty (Alberty, 1998, 2003). À condition d'avoir les relations de passage d'un état à l'autre, ceci ne pose pas de difficulté majeure.

Les valeurs des deux termes du membre de droite de la relation précédente dépendent aussi de l'état standard considéré et de l'échelle de définition de la composition de la solution.

L'expression précédente a été énoncée dans l'échelle des molalités. C'est l'échelle la plus courante pour des solutions diluées, en particulier pour les solutions biologiques et alimentaires, en particulier lorsqu'elles contiennent des électrolytes. Ceci signifie que le premier terme μ_i^{0m} désigne le potentiel chimique du composé i dans une solution supposée idéale à 1M. Le deuxième terme correspond à la correction d'activité. Il fait intervenir la molalité du composé i (moles de i / kg de solvant) et le coefficient d'activité dans l'échelle des molalités. Ce deuxième terme est souvent négligé en première approximation en considérant que les propriétés des solutions ne sont pas affectées par des effets de concentrations, le premier terme étant le terme prépondérant.

Pour les composés neutres en solution (éthanol, sucres, etc.), la relation précédente suffit pour calculer les ΔG des réactions. Pour les composés qui se dissocient suivant des réactions acide-base, la situation est plus complexe, puisqu'il faut considérer une espèce équivalente qui tient compte de l'ensemble des espèces en solution, leur proportion dépendant du pH. Considérons l'équilibre de dissociation acide base suivant :



Cet équilibre est caractérisé par l'égalité des potentiels chimiques entre réactifs et réactants, ce qui permet de définir la constante d'équilibre :

$$\mu_{A^-} + \mu_{H^+} = \mu_{AH} \quad \text{Eq. 72}$$

Avec :

$$\mu_{H^+} = RT \ln a_{H^+} = RT \ln \gamma_{H^+}^m m_{H^+} = -RT pH \ln 10 \quad \text{Eq. 73}$$

On en déduit donc que :

$$\mu_{AH}^{0m} - \mu_{A^-}^{0m} = RT \left[\ln \gamma_{A^-}^m m_{A^-} - \ln \gamma_{AH}^m m_{AH} - pH \ln 10 \right] \quad \text{Eq. 74}$$

On définit alors la constante d'équilibre K et pK comme :

$$\mu_{AH}^{0m} - \mu_{A^-}^{0m} = RT \ln K = -RT pK \ln 10 \quad \text{Eq. 75}$$

Soit :

$$K = 10^{-pK} = 10^{-pH} \frac{\gamma_{A^-}^m m_{A^-}}{\gamma_{AH}^m m_{AH}} \quad \text{Eq. 76}$$

On suppose que la solution est idéale (dans l'échelle des molalités avec une référence à 1 M), pour tous les composés neutres. On peut donc considérer que leurs coefficients d'activité sont égaux à 1. Pour les espèces chargées, la correction d'activité intervient de façon significative, même aux plus faibles molalités. En première approximation, la correction à prendre en compte en fonction de la force ionique du milieu est donnée par (Ould Moulaye, 1998) :

$$\ln \gamma_i^m = -1.1758 \left(\frac{T}{298.15} \right)^{0.5069} \frac{I_m^{1/2}}{1 + 1.6 I_m^{1/2}} z_i^2 \quad \text{Eq. 77}$$

z_i est la charge de l'espèce i . I_m est la force ionique du milieu donnée en fonction des molalités des composés chargés :

$$I_m = \frac{1}{2} \sum_i m_i z_i^2 \quad \text{Eq. 78}$$

On définit alors la molalité totale des espèces A (m_{AT}) en tenant compte des dissociations en fonction du pH de la solution, de la force ionique (via les coefficients d'activité) et du pK :

$$\frac{m_{A^-}}{m_{AH}} = \frac{\gamma_{AH}^m}{\gamma_{A^-}^m} 10^{pH-pK} \quad \text{Eq. 79}$$

Soit :

$$m_{AT} = m_{AH} \left[1 + \frac{\gamma_{AH}^m}{\gamma_{A^-}^m} 10^{pH-pK} \right] \quad \text{Eq. 80}$$

Cette expression est généralisée sans difficultés pour des dissociations multiples.

Si l'espèce A est neutre, son potentiel chimique est donné comme la somme pondérée des potentiels chimiques des espèces :

$$\mu_{AT} = X_{AH} \mu_{AH} + X_{A^-} (\mu_{A^-} + \mu_{H^+}) \quad \text{Eq. 81}$$

En utilisant la relation d'équilibre et l'expression de la molalité totale des espèces en solution, on obtient :

$$\mu_{AT} = \mu_{AH} = \mu_{AH}^{0m} + RT \ln \frac{\gamma_{AH}^m m_{AT}}{1 + \frac{\gamma_{AH}^m}{\gamma_{A^-}^m} 10^{pH-pK}} \quad \text{Eq. 82}$$

Cette dernière relation met clairement en évidence que le calcul du potentiel chimique de l'espèce A globale dépend du pH et du pK .

L'application des relations précédentes pour l'ATP est donnée dans le Tableau 3. On calcule le potentiel chimique de l'espèce neutre ATP en prenant en compte un pseudo-équilibre avec les ions H^+ , c'est-à-dire en considérant le pH de la solution. Ceci conduit à la relation suivante :

$$\mu_{ATP} = \mu_{H_2ATP^{2-}} + 2 \mu_{H^+} = \mu_{H_2ATP^{2-}} - 2 RT pH \ln 10 = \mu_{HATP^{3-}} - 3 RT pH \ln 10 \quad \text{Eq. 83}$$

Tableau 3 : Potentiels chimiques et enthalpies de formation des espèces d'ATP en fonction du pH (d'après Ould Moulaye, 1998). L'espèce équivalente est sous forme H_4ATP nommée ATP. $T=25^\circ C$. La molalité totale des radicaux ATP est 1M (solution idéale). La force ionique I_m est 0,1 M.

Espèce	pK	μ_i^{0m} kJ mol ⁻¹	h_i kJ mol ⁻¹	C_p J mol ⁻¹ K ⁻¹	pH = 4 kJ mol ⁻¹	pH = 6, kJ mol ⁻¹	pH = 7, kJ mol ⁻¹	pH = 8, kJ mol ⁻¹
H_2ATP^{2-}	4,70	-2836,16	-5177,25		-2839,9	-2849,4	-2856,9	-2867,1
$HATP^{3-}$	7,62	-2809,33	-5162,35	-63,00	-2817,1	-2815,2	-2817,0	-2821,5
ATP^{4-}		-2765,84	-5168,65	-189,00	-2794,2	-2780,9	-2777,0	-2775,8
ATP					-2885,5	-2917,9	-2936,8	-2958,5

On constate donc que le potentiel chimique de l'espèce équivalente varie significativement avec le pH , qui doit donc être pris en compte. Il est également possible de généraliser l'analyse précédente en prenant en compte la complexation par des ions divalents comme Mg^{2+} . Ceci modifie le calcul des potentiels des espèces équivalentes qui dépend alors de constantes de complexation et des concentrations en ions Mg^{2+} . Cependant cette analyse bute sur le manque de données d'équilibre et de méthode de prédiction. C'est pourquoi nous n'entrons pas dans cette analyse ici.

Il est également possible de travailler directement à partir du ΔG d'une réaction si celui-ci est connu dans des conditions de pH donné. Considérons la réaction d'oxydoréduction suivante :



Les relations suivantes permettent d'obtenir le potentiel de réaction et le ΔG en fonction du pH :

$$\begin{aligned}\Delta G_{m,pH} &= \Delta G_{m,pH=0} + \alpha_{H^+} RT \ln 10^{-pH} \\ \Delta G_{m,pH} &= \Delta G_{m,pH=7} + \alpha_{H^+} RT \ln 10^{7-pH} \\ \Delta G_{m,pH} &= \alpha_e F E_{m,pH} \quad F = 96\,484 \text{ kJ.mole}^{-1}\end{aligned}\tag{Eq. 85}$$

6.2 Les bases de données construites à partir d'une approche moléculaire

L'analyse précédente n'est valable que si l'on dispose des pK , et plus généralement des données d'équilibre, et des valeurs d'enthalpies de formation dans l'état de référence. Afin de compléter les valeurs manquantes, une autre approche a été étudiée. Il s'agit d'utiliser une approche moléculaire à partir des données calculées à partir de simulation de chimie quantique des molécules, qui conduit aux valeurs de l'entropie et de l'enthalpie de formation. Ceci fait partie de travaux réalisés récemment au laboratoire par Oumar Touré. Ces travaux sont toujours en cours et se poursuivent actuellement.

6.2.1 Cas des molécules simples

Pour les molécules dites « simples », une méthode de contribution de groupes a été développée à partir des données de formation connues et répertoriées dans les tables, telles que l'enthalpie, l'entropie à l'état gaz (Touré, 2014). En comparant avec des valeurs issues de la simulation par la mécanique quantique, on a conçu une méthode de régression en comparant la base des données des molécules simples aux valeurs simulées. De façon schématique, la simulation quantique fournit des valeurs de l'énergie de formation dans un état gaz hypothétique (pour une molécule isolée dans le vide). Cette énergie est corrélée à l'enthalpie de formation. Le modèle COSMO-RS (Touré, 2014) permet également d'obtenir l'énergie de formation en solution, y compris en solution infiniment diluée. En parallèle, l'analyse en thermodynamique statistique permet également de corréler l'entropie de formation (de façon principalement empirique) à l'enthalpie de formation. Ceci permet donc d'obtenir le potentiel chimique de formation. Cette approche a dans le principe au moins deux intérêts : d'une part, elle permet d'obtenir les propriétés de formation *ex nihilo* simplement à partir de la formule chimique ; d'autre part, la capacité du modèle COSMO-RS à travailler sur des molécules en solution permet d'établir des corrélations des propriétés de formation à

dilution infinie, directement à partir des simulations quantiques. La méthodologie suivante a été suivie :

$$E_{\text{gaz}} \rightarrow \Delta H_{f,\text{gaz}} \quad \text{Eq. 86}$$

$$\mu_{\text{gaz}}^{\text{COSMO-RS}} \rightarrow \Delta G_{f,\text{gaz}} \rightarrow \Delta G_f^{\text{DI}} \quad \text{Eq. 87}$$

On corrèle E_{gaz} et $\mu_{\text{gaz}}^{\text{COSMO-RS}}$, qui sont fournis par les simulations quantiques aux valeurs des tables. Ceci permet d'établir *ex nihilo* des méthodes de contribution de groupes, à partir des groupements chimiques pour prédire les valeurs de formation à l'état gaz de l'enthalpie libre de formation ΔG_f . Une fois que ces valeurs de formation à l'état gaz sont déterminées, on calcule les valeurs de formation à l'état dilution infinie par la relation suivante qui décrit de façon thermodynamiquement robuste les transformations successives : Molécule à l'état corps pur état gaz / Molécule à l'état corps pur liquide / Molécule infiniment diluée dans l'eau :

$$\Delta G_f^{\text{DI}} = \Delta G_f^{\text{gaz}} + RT \ln\left(\frac{P_i^0}{P_{\text{ref}}}\right) + RT \ln \gamma^\infty \quad \text{Eq. 88}$$

Les valeurs du coefficient d'activité à dilution infinie γ^∞ sont obtenues à partir du modèle COSMO-RS directement. Les pressions de vapeur saturante P_i^0 n'étant pas calculables avec ce modèle, ces valeurs ont été recherchées dans la littérature. La thèse d'Oumar Touré (2014), réalisée au laboratoire, fournit les détails de la méthode utilisée.

6.2.2 Cas des molécules complexes d'intérêt

La mise en place d'une méthodologie spécifique est nécessaire. Beaucoup de molécules d'intérêt ne sont stables qu'à l'état liquide. Pour les molécules complexes, les enthalpies libres de Gibb's ΔG_f^{gaz} et les pressions de vapeur P_i^0 ne sont pas connues. Il est donc nécessaire de procéder autrement. Pour cela une méthode de contribution de groupes entre le potentiel chimique à dilution infinie $\mu_{\text{DI}}^{\text{COSMO-RS}}$ (dans l'échelle des molarités) et le $\Delta G_{f,\text{DI}}^{\text{Alberty}}$ (dans l'échelle des molalités) a été réalisée afin de passer directement d'une donnée à l'autre. Pour ce faire, une base de données « riche » allant des molécules simples aux plus complexes, calée sur les données d'Alberty, a été mise en place selon la méthodologie suivante :

Alcanes → Alcools → Sucres → Sucres phosphates

Simple → Complexe

6.3 Construction d'une base de données à partir de COSMO-RS

L'ensemble de ce travail a été développé par Oumar Touré et publié dans les références suivantes (Touré *et al.*, 2013, 2014b, 2015a, 2015b, 2016a, 2016b).

Initialement, le modèle COSMO-RS a été développé pour calculer les propriétés d'excès de molécules (coefficients d'activité) à partir de calculs quantiques, d'électrostatique et de thermodynamique statistique. Durant ses travaux de recherche, Touré (2014) a étendu l'application du modèle jusqu'à permettre la prédiction de potentiels chimiques μ_i^0 et l'enthalpie libre de formation ΔG_f .

Le modèle COSMO-RS permet de prendre en compte les interactions physiques de solvation de molécules en solution par l'étude des contacts entre les surfaces chargées. Ceci correspond à une approche de thermodynamique statistique et permet de déterminer le potentiel chimique d'une chaque molécule en solution afin de pouvoir par la suite déduire toutes les propriétés d'excès comme l'activité de l'eau a_w , certaines propriétés d'équilibre, les coefficients d'activités γ_i , *etc.*

La base de la représentation des propriétés thermodynamiques de formation repose sur le choix d'un état de référence défini à une température et une pression données. En travaillant avec des valeurs standard proches des conditions classiques pour les bioréactions, la température choisie est de $T = 25 \text{ °C}$ et la pression de 1 atm avec un état physique de référence à dilution infinie (DI) dans l'eau afin de pouvoir calculer les propriétés réactionnelles d'intérêt. Pour déterminer les propriétés thermodynamiques des molécules, le modèle COSMO-RS calcule les propriétés de formation des molécules à l'état de gaz parfait qu'il s'agisse d'un état hypothétique ou non. Par contre, le modèle fournit des valeurs dans un état de référence interne aux simulations quantiques qui est très éloigné de l'état de référence utilisé en chimie ou encore de l'état de référence utilisé par Alberty pour les molécules biologiques et alimentaires. L'objectif de la méthode est d'établir une corrélation entre l'état de référence quantique et les états de référence classiques. On procède en deux temps : corréler les valeurs quantiques à des valeurs connues de propriétés de formation à l'état standard corps pur gazeux, par exemple issues du simulateur Simulis Thermodynamics de la Société Prosim ; obtenir le $\Delta G_f^{\text{exp, DI}}$ à partir de valeurs $\Delta G_f^{\text{exp, gaz}}$. Afin d'établir une corrélation prédictive, la relation suivante a été utilisée :

$$\Delta G_{f,i} = \alpha'_i + \sum_k (b'_k c_k)$$

Eq. 89

α' correspond au potentiel chimique $\mu^{\text{DI, COSMO-RS}}$, calculé par le modèle COMO-RS ; l'indice k caractérise un élément de surface de molécule, défini par simulation quantique, qui correspond à une charge par unité de surface (densité surfacique de charges ou σ -profile) ; b' est déterminé par la régression multilinéaire utilisant comme descripteur les σ -profile ; c correspond à la probabilité d'existence d'un élément du type considéré dans la molécule.

Des tests en deux phases ont été réalisés (Touré et Dussap, 2016) : sur les molécules simples afin de vérifier la validité de la méthode (phase de training) ; ensuite en modèle de prédiction (phase de validation). Dans le cas de la famille des alcanes, la régression multilinéaire donne les résultats de la Figure 20.

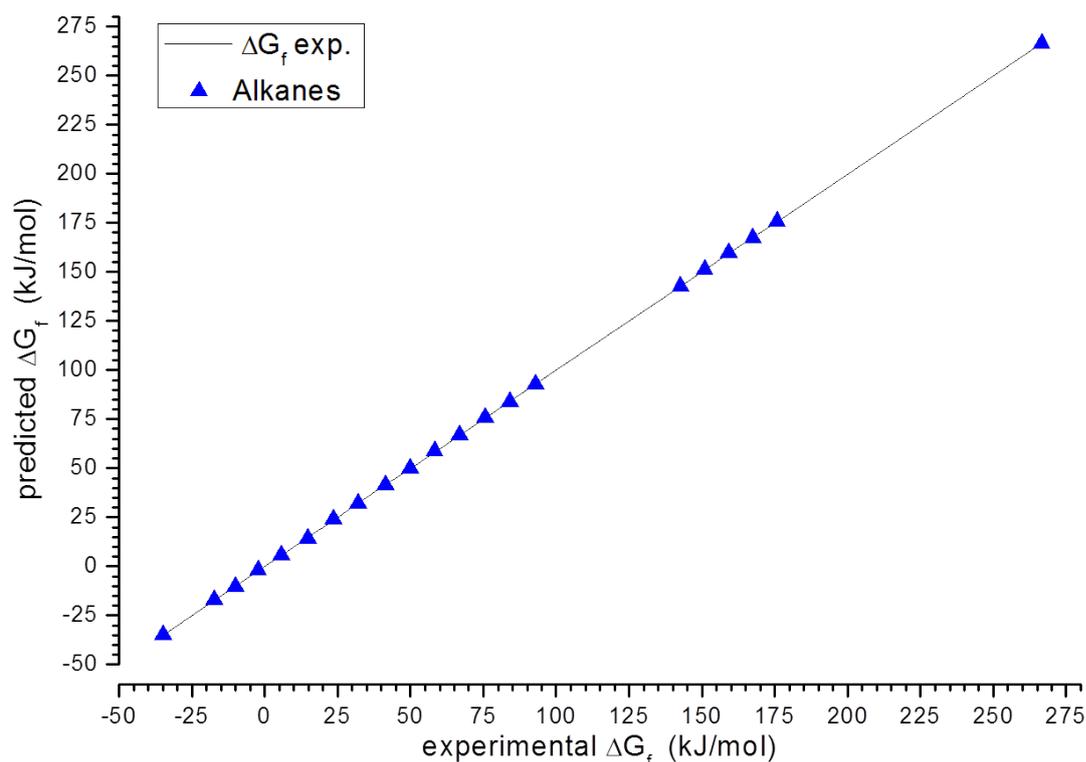


Figure 20 : Training Set de la famille des alcanes (RMSE : 0,28 kJ.mol⁻¹)

Cette phase permet de définir le potentiel chimique commun à une famille de molécules, dans notre cas celui de la famille des alcanes. Elle est réalisée à partir de valeurs issues de la bibliographie (Simulis Thermodynamics par exemple) et de valeurs expérimentales. Cette

phase est ici validée puisque l'écart à la moyenne (RMSE) est faible ($0,28 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Une fois le descripteur α^* connu, la phase de validation est nécessaire afin de valider la méthode.

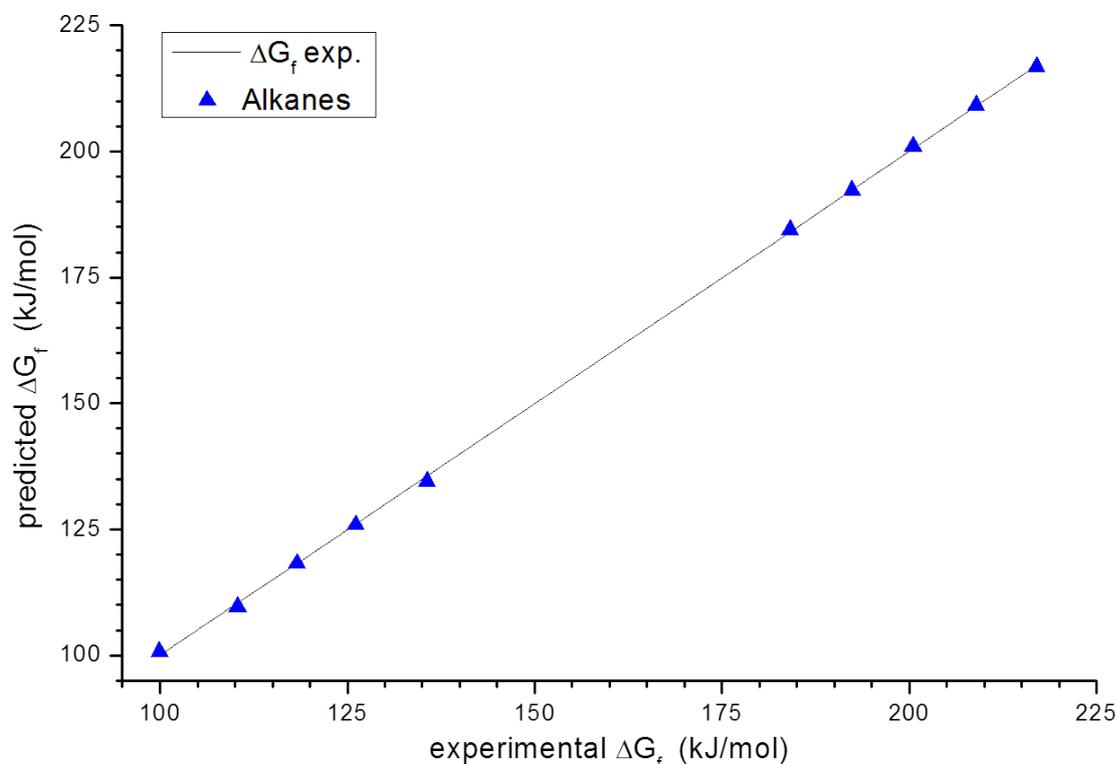


Figure 21 : Set de validation pour les alcanes (RMSE : $0,52 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Ici (Figure 21), nous utilisons des valeurs expérimentales connues et des valeurs calculées par le modèle. Ces essais démontrent que la méthode est valide puisque l'écart à la moyenne reste faible, seulement de $0,52 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Ce modèle (Touré, 2016), développé au sein du laboratoire, offre de bonnes perspectives pour les molécules biologiques dites complexes afin d'obtenir des données thermodynamiques compatibles avec la base de données d'Alberty. Ce modèle de régression reste pour l'instant cependant incomplet pour traiter les propriétés des composés chargés, sachant que le développement originel du modèle COSMO ne prend pas compte ces aspects. Il reste donc des difficultés pour établir une cohérence avec toutes les propriétés d'équilibre acide base et avec les potentiels d'oxydoréduction.

6.4 Application aux molécules biologiques complexes

La méthodologie choisie ci-dessus est aujourd'hui fonctionnelle et validée. Cependant le nombre de données reste insuffisant pour travailler sur des molécules complexes et en tout cas mérite un travail spécifique approfondi.

La régression multilinéaire qui a été choisie est la PLS (Partial Least Squares regression). C'est une méthode statistique de régression qui permet de modéliser des liens entre des variables complexes et des variables latentes. Elle a, dans notre cas, l'avantage de pouvoir traiter de nombreux points sur le σ -profil des molécules complexes. Par cette méthode, il a été possible de nous avons pu combiner les différents descripteurs à partir du σ -profil, du σ -potentiel, ou du produit des deux et cela sur plusieurs groupes de molécules (sucres, sels, acides...) où le nombre de molécules était variable.

7 Modèles de transfert

7.1 Modèle de transfert radiatif

Des modèles physiques de transfert radiatif développés par le laboratoire ont été utilisés dans la seconde partie de ces travaux pour comprendre et analyser le déroulement de la croissance d'une culture d'organismes photosynthétiques.

Pour une géométrie déterminée, un modèle de transfert radiatif permet de définir par calcul la disponibilité de l'énergie lumineuse en différents points du mélange réactionnel en fonction du flux lumineux incident. Il permet *in fine* de prévoir les performances d'un réacteur tel que la production de biomasse ou de produits, comme l'oxygène, en formulant le couplage du transfert radiatif avec les réactions de photosynthèse des organismes en culture.

Ainsi, un modèle cinétique de photobioréacteur est composé de deux principaux blocs : un modèle de transfert de rayonnement et une loi de couplage de la vitesse d'absorption des photons avec les vitesses de production au niveau métabolique.

Le modèle de transfert de rayonnement fournit la vitesse d'absorption du rayonnement en tout point du milieu de culture. Il permet d'obtenir la répartition de la lumière (sa vitesse d'absorption) dans la zone de culture et ainsi de définir l'atténuation de la lumière (les zones sombres et les zones éclairées par rapport au point de compensation de la photosynthèse) comme le montre l'exemple sur la Figure 22.

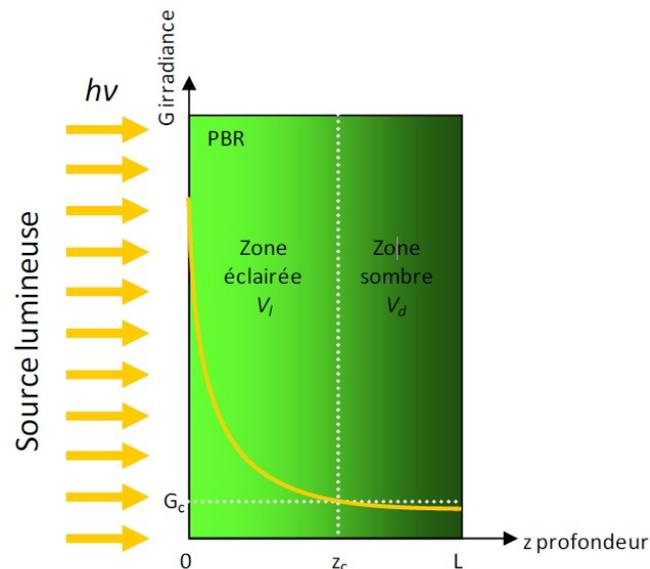


Figure 22 : Représentation de l'atténuation du flux lumineux dans un photobioréacteur plan (l'irradiance de compensation, la profondeur (épaisseur) du PBR, le volume éclairé et le volume de la zone sombre) (Pruvost et Cornet, 2012)

La loi de couplage entre la vitesse d'absorption des photons et la vitesse de production biochimique s'écrit en définissant un rendement quantique et un rendement énergétique. Dans le cas particulier de la vitesse de production d'oxygène, elle s'écrit comme suit (Cornet et Dussap, 2009) :

Si $G > G_c$,

$$r_{O_2} = \rho_M K \overline{\Phi}_{O_2} E_a C_X \frac{G}{K + G} \quad \text{Eq. 90}$$

Si $G < G_c$,

$$r_{O_2} = 0 \quad \text{Eq. 91}$$

Avec : r la vitesse volumétrique de production en oxygène, ρ_M le rendement maximal ; K la constante de saturation ; Φ le rendement quantique moyen en oxygène ; E_a le coefficient d'absorption ; C_X la concentration en biomasse et G l'irradiance.

La loi de couplage permet ainsi d'obtenir des courbes d'allure hyperbolique comme dans l'exemple ci-dessous (Figure 23) où le flux lumineux incident collimaté est assimilé à l'irradiance dans des suspensions très diluées.

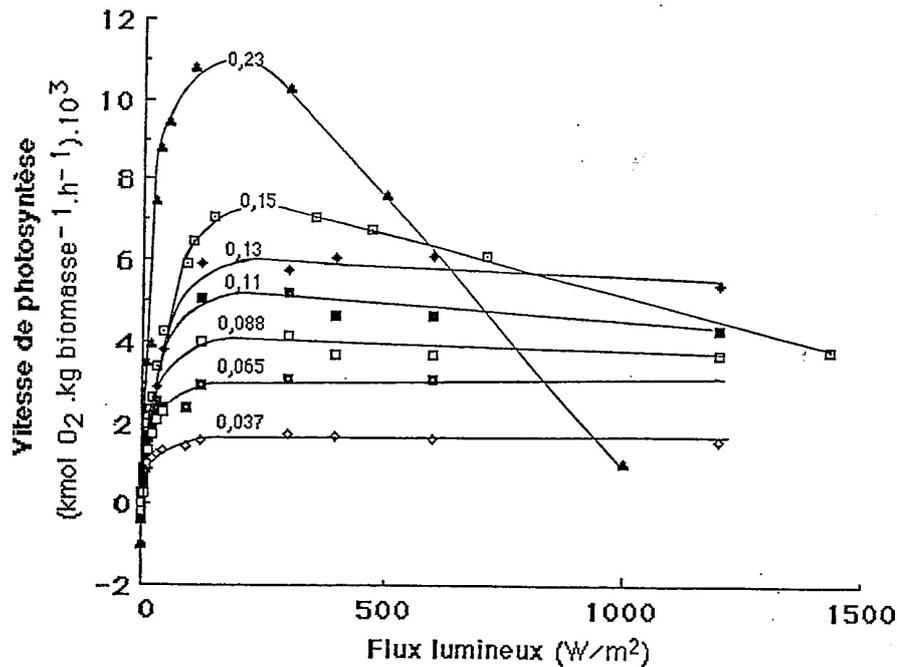


Figure 23 : Vitesse de la photosynthèse en fonction du flux lumineux chez *A. platensis*, en fonction de la concentration en biomasse, à $t = 36\text{ °C}$ (Cornet, 1992).

Ces courbes ont été reproduites dans ce travail à l'aide de l'oxymètre du laboratoire (Chapitre 3). Des résultats expérimentaux ont été obtenus pour la production d'oxygène en fonction de l'intensité lumineuse. Cependant, on voit qu'il faut être capable de connaître l'irradiance en chaque point du réacteur pour calculer la vitesse locale de production en oxygène ; la vitesse moyenne spatiale observée étant alors obtenue par intégration sur le volume réactionnel.

En spectrophotométrie, on utilise la loi de Bouguer (nommée à tort loi de Beer-Lambert) pour traduire l'atténuation de la lumière dans une direction. Cette loi n'est valable que dans certaines conditions. En effet, si un faisceau de photons d'intensité initiale I_0 (en $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ ou $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) traverse un volume d'épaisseur z (en cm) contenant une solution absorbante de concentration C connue (en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), alors l'intensité I une fois le volume traversé aura comme valeur :

$$I = I_0 * e^{-kzC}$$

Eq. 92

Avec k le coefficient molaire d'absorption.

Cette équation montre donc qu'il existe une décroissance exponentielle de l'intensité lumineuse en fonction du trajet optique. Cependant, dans un milieu où il existe des particules

tels que les microorganismes, les photons peuvent être diffusés et emprunter une infinité de directions.

Dans cette configuration, la description du transfert de rayonnement dans le milieu biologique obéit à l'équation de transferts radiatifs de Chandrasekhar (1960) qui est une équation intégrodifférentielle linéaire de type Boltzmann.

Dans le cas d'une simplification monodimensionnelle en géométrie cartésienne, correspond au réacteur utilisé, cette équation s'écrit :

$$-\cos(\theta) \frac{dI_\lambda}{dz} = (a_\lambda + s_\lambda)I_\lambda - \frac{s_\lambda}{2} \int_0^\pi I_\lambda p_\lambda(\theta, \theta') \sin(\theta') d\theta' \quad \text{Eq. 93}$$

où I_λ est l'intensité spectrale spécifique, θ un angle polaire, a_λ et s_λ sont les coefficients spectraux d'absorption et de diffusion, et $p_\lambda(\theta, \theta')$ est fonction de la phase spectrale de diffusion. Ces trois derniers paramètres peuvent être obtenus de manière théorique par la résolution des équations de Maxwell sur la particule (Dauchet *et al.*, 2015).

Trois méthodes approchées ont été développées (Dauchet *et al.*, 2016) afin de résoudre l'équation précédente : la méthode P1, la méthode de diffusion simple et la méthode à deux flux (Pottier *et al.*, 2005). Dans le cas de cette dernière approximation, largement utilisée pour les PBR, et en considérant un cas d'étude avec un rayonnement incident quasi-collimaté (direction θ_c) et une réflexion négligeable à l'arrière, notée ρ , on obtient l'expression analytique suivante pour l'atténuation de l'irradiance spectrique G_λ (Pottier *et al.*, 2005) :

$$\frac{G_\lambda(z)}{G_{\lambda 0}} = 2 \sec(\theta_c) \frac{[\rho(1 + \alpha_\lambda)e^{(-\delta_\lambda z)} - (1 - \alpha_\lambda)e^{(-\delta_\lambda z)}]e^{(\delta_\lambda z)} + [(1 + \alpha_\lambda)e^{(\delta_\lambda z)} - \rho(1 - \alpha_\lambda)e^{(\delta_\lambda z)}]e^{(-\delta_\lambda z)}}{(1 + \alpha_\lambda)^2 e^{(\delta_\lambda z)} - (1 - \alpha_\lambda)^2 e^{(-\delta_\lambda z)} - \rho(1 - \alpha_\lambda^2)e^{(\delta_\lambda z)} + \rho(1 - \alpha_\lambda^2)e^{(-\delta_\lambda z)}} \quad \text{Eq. 94}$$

Avec, δ_λ le coefficient d'extinction calculé à partir de l'équation suivante :

$$\delta_\lambda = C_X \sec(\theta_c) \sqrt{E_{a_\lambda}(E_{a_\lambda} + 2b_\lambda E_{s_\lambda})} \quad \text{Eq. 95}$$

Et, α_λ le module de diffusion linéaire, compris entre 0 (milieu diffusant) et 1 (milieu absorbant) :

$$\alpha_\lambda = \sqrt{\frac{E_{a_\lambda}}{E_{a_\lambda} + 2b_\lambda E_{s_\lambda}}} \quad \text{Eq. 96}$$

Ce module quantifie l'équilibre entre les phénomènes de diffusion et d'absorption.

Dans les deux équations précédentes, E_{a_λ} est le coefficient massique d'absorption et E_{s_λ} le coefficient massique de diffusion et b_λ est la fraction rétrodiffusée qui s'écrit :

$$b_\lambda = \frac{1}{2} \int_{\pi/2}^{\pi} p_\lambda(\theta, \theta') \sin(\theta) d\theta \quad \text{Eq. 97}$$

Cette méthode à deux-flux permet donc de modéliser les transferts de lumière pour des photobioréacteurs illuminés sur une face et possédant une face réfléchissante à l'arrière, et ceci sur l'ensemble du spectre lumineux. Elle sera utilisée pour analyser et optimiser les résultats expérimentaux obtenus sur le mini PBR.

Une fois résolue pour toutes les longueurs d'ondes d'intérêt du PAR (Photosynthetically Active Radiation) (λ comprise entre 400 et 700 nm), l'équation donnant le profil d'irradiance spectrique sera intégrée sur toutes ces longueurs d'ondes pour obtenir le champ d'irradiance $G(z)$ qui sera alors utilisé dans l'équation de couplage initiale (Eq. 90 (r_{O_2})) :

$$G(z) = \int_{400}^{700} G_\lambda(z) d\lambda \quad \text{Eq. 98}$$

La vitesse moyenne de production d'oxygène dans le réacteur est obtenue par une intégrale moyenne volumique (en une seule dimension dans le cas simple traité) :

$$\langle r_{O_2} \rangle = \frac{1}{L} \int_0^L r_{O_2}(z) dz \quad \text{Eq. 99}$$

Cette vitesse moyenne sera comparée à l'expérience réalisée au cours de cette thèse.

7.2 Modèle de transfert de gaz

7.2.1 Vitesse volumétrique de transfert de l'oxygène : OTR (oxygen transfer rate)

La connaissance des vitesses de transfert de l'oxygène et du CO₂ entre la phase gazeuse et celle liquide est un élément clé dans la validation des manipulations réalisées sur le mini-PBR et de son utilisation.

Le taux de transfert de l'oxygène (OTR) de la phase gaz vers celle liquide, noté $\phi_{O_2, GL}$, s'exprime en mol.h⁻¹.L⁻¹. Il est défini par l'équation suivante :

$$\phi_{O_2, GL} = k_L a (C_{O_2, L}^* - C_{O_2, L}) \quad \text{Eq. 100}$$

Avec $k_L a$ le coefficient volumétrique de transfert de gaz (en h⁻¹), $C_{O_2, L}$ la concentration en oxygène dans la phase liquide, et $C_{O_2, L}^*$ la concentration en oxygène dissous dans la phase liquide à saturation (Poughon *et al.*, 2003). Celle-ci est donnée par la relation d'équilibre suivante :

$$C_{O_2, L}^* = \frac{y_{O_2} * P}{He(T)} \quad \text{Eq. 101}$$

La fraction molaire en oxygène y_{O_2} est déterminée par une analyse du gaz en sortie par chromatographie gazeuse. P désigne la pression totale dans le réacteur et est également une variable mesurée.

La valeur du coefficient de Henry pour l'oxygène est : $He = 770 \text{ L.atm.mole}^{-1}$

A 25 °C, pour une fraction molaire en sortie de 21 % et à la pression de 1,01 bar, on obtient :

$$C_{O_2, L}^* = 8,74 \text{ mg.L}^{-1} \quad \text{Eq. 102}$$

Pour tenir compte de la variation en fonction de la température on applique la loi de Van't Hoff :

$$He(T) = He(T_0) \exp\left(\frac{\Delta H_{sol}}{R} \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right)\right) \quad \text{Eq. 103}$$

Pour l'oxygène le rapport $\frac{\Delta H}{R}$ vaut 1700 K. Ceci conduit par exemple à un coefficient de Henry de He = 846 L.atm.mole⁻¹ à 30 °C (Sander, 2015). La concentration correspondante à saturation par l'air à 30 °C est de 7,94 mg.L⁻¹.

Il existe enfin des corrections à effectuer lorsque la solution contient d'autres solutés. Ces corrections ne seront pas prises en compte ici.

Lorsque l'on connaît, ou bien que l'on mesure, la concentration en oxygène dissous, la connaissance du coefficient volumétrique de transfert permet de déterminer le flux de transfert du gaz vers le liquide.

7.2.2 Vitesse volumétrique de transfert de CO₂

La vitesse de transfert de CO₂ est dirigée par une relation similaire à la précédente. En considérant que le $K_L a$ reste identique, la seule chose qui change est le coefficient de Henry.

Pour le CO₂ à 25 °C le coefficient de Henry est : He = 29,4 L.atm.mole⁻¹

Cependant il y a une difficulté supplémentaire pour le CO₂ qui est liée au fait que l'espèce CO₂ s'hydrate en acide carbonique qui est lui-même un acide faible et se dissocie en solution aqueuse pour former des ions bicarbonate et carbonate. Le déplacement de l'équilibre dépend alors du pH de telle sorte que la totalité du carbone 'dissous' comprend le CO₂ dissous, les ions bicarbonate et les ions carbonate. La prise en compte des équilibres de dissociation successifs conduit à :

$$CO_{2T} = CO_{2\text{dissous}} \left(1 + 10^{\text{pH}-\text{p}K_1} + 10^{2\text{pH}-\text{p}K_1-\text{p}K_2} \right) \quad \text{Eq. 104}$$

Les valeurs de pK₁ et pK₂ sont respectivement à 30 °C de 6,057 et 10,3. On obtient alors :

$$CO_{2T} = \frac{y_{CO_2} P}{He_{CO_2}} \left(1 + 10^{\text{pH}-\text{p}K_1} + 10^{2\text{pH}-\text{p}K_1-\text{p}K_2} \right) \quad \text{Eq. 105}$$

En adoptant une loi identique pour exprimer la variation en température du coefficient de Henry, la valeur du rapport $\frac{\Delta H}{R}$ vaut 2400 K (Sander, 2015).

En appliquant ces différentes lois, la concentration en carbone total dans un milieu à pH 7 à 30 °C saturé par du gaz à 3 % de CO₂ (soit 30 000 ppm), on obtient :

$$He (CO_2; 30^\circ\text{C}) = 33,6 \text{ L.atm.mole}^{-1}$$

$$CO_2 \text{ dissous} = 0,894 \text{ mmole.L}^{-1} = 39,3 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$C_{\text{Total dissous}} = C_T = 8,74 \text{ mmole.L}^{-1}$$

A pH 9, on obtient dans les mêmes conditions de température et de pression partielle une concentration en carbone total de 746 mmole.L⁻¹. A ce pH, on n'est généralement pas dans des conditions d'équilibre entre le liquide et le gaz mais on observe au moins que la capacité de saturation du milieu est importante.

Comme pour l'oxygène, la vitesse de transfert du CO₂ du gaz au liquide est donnée par :

$$\varphi_{CO_2} = K_L a (C_{CO_2}^* - C_{CO_2}) \quad \text{Eq. 106}$$

7.3 Coefficient volumique de transfert gazeux : $K_L a$

$K_L a$ exprimé en h⁻¹, est composé de deux facteurs. K_L est le coefficient de transfert de masse. Il est fonction de la température et des propriétés physiques du système. a est l'aire spécifique de l'interface d'échange et s'écrit :

$$a = \frac{A}{V_L} \quad \text{Eq. 107}$$

Avec A l'aire de la surface d'échange et V_L le volume de la phase liquide. Dans le cas présent, le débit et la pression ne devraient pas interagir avec le $K_L a$. En effet, le dimensionnement du mini-PBR fait que le compartiment liquide est dépourvu de gaz. Il n'y a donc pas de formation de bulle. Le phénomène de coalescence et de modification de la surface d'échange gaz/liquide n'est donc pas une difficulté puisque a sera constant (l'aire de la surface d'échange est équivalente à la surface de la membrane).

Dans le cas de matériaux poreux hydrophobes où l'on n'a aucune pénétration d'eau dans les pores (Picard, 2001), le transfert de l'oxygène de la phase liquide vers la phase gazeuse est décrit par la théorie du double film formulée par Whitman (1923), qui suppose que le transfert s'effectue par diffusion moléculaire à travers deux films stagnants de fluide et à travers la membrane. Cogne (2003) a montré que la résistance au transfert côté gaz et à travers la membrane pouvait être considérée comme négligeable. Un calcul théorique des coefficients de transfert de matière concernant la couche limite côté liquide a été réalisé en assimilant la

membrane à un disque tournant. La corrélation proposée par Bird *et al.* (2002) a été appliquée et fournit des résultats cohérents avec l'expérience :

$$\text{Sh} = \frac{K_L d}{D_{\text{O}_2}} = 0,879 \text{Re}^{1/2} \text{Sc}^{1/3} \quad \text{Eq. 108}$$

En prenant comme la dimension caractéristique $d = 2$ cm, la longueur d'un agitateur tournant à la surface de la membrane, on obtient pour la valeur du nombre de Reynolds (Re) 5 890, $\text{Sc} = 476$ et $K_L = 7,4 \cdot 10^{-5} \text{ m.s}^{-1}$. Cette relation permet donc d'obtenir la valeur du coefficient de transfert K_L . Connaissant la surface de la membrane et le volume de liquide, on obtient donc une estimation du coefficient volumétrique de transfert.

8 Conclusion à l'étude bibliographique

Dans ce mémoire, deux types de microorganismes photosynthétiques aux propriétés particulières sont étudiés dans deux contextes de recherche différents.

Le premier microorganisme est la microalgue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*, dans le cadre du projet ANR Algo H₂. Cette algue possède la particularité de produire du dihydrogène naturellement en dégradant l'amidon (sucre de réserve) qu'elle accumule intracellulairement au cours de sa croissance, et ce en condition de limitation azotée. L'objectif, ici, est de comprendre et interpréter le réseau métabolique de cet organisme en étudiant les variations thermodynamiques internes propres à chaque réaction enzymatique et métabolique. Une étude compartimentée a été réalisée, puis approfondie pour l'organite photosynthétique jouant un rôle majeur dans la production de dihydrogène, à savoir le chloroplaste.

Le second microorganisme, la cyanobactérie nommée *Arthrospira platensis*, est étudié dans le contexte du projet de recherche MELiSSA. L'objectif est de réaliser différentes cultures en présence d'ammonium, afin de mieux comprendre l'impact de cette source d'azote sur le métabolisme de la cyanobactérie. Par la suite, ce type de culture sera transposé dans un mini-photobioréacteur spatialisable, développé par Cogne en 2003, et modifié dans le cadre de cette étude.

L'utilisation de modèles de connaissance de croissance et de fonctionnement est nécessaire, que ce soit d'un point de vue radiatif, métabolique, thermodynamique et de la compréhension des limitations par les transferts physiques entre phases. L'intérêt du travail est d'associer ces différents corpus théoriques et expérimentaux pour aboutir à une compréhension et une

conception raisonnée des photobioréacteurs de façon à développer l'ingénierie de ces biotransformations dans des contextes d'utilisation différents.

Ce chapitre a permis de développer un corpus de base, d'une part sur les utilisations de microalgues et d'autre part sur la modélisation des bioréacteurs, en fondant une approche sur les équations de bilan matière et énergie. Un focus particulier a été porté sur l'analyse thermodynamique couplée aux bilans matière. L'introduction dans les équations des bilans sur les phases photoniques a permis de déterminer de façon théorique les relations entre le bilan d'énergie totale et le bilan entropique. L'analyse thermodynamique d'une bioréaction, qu'elle soit photosynthétique ou non, dépend du calcul et de la prédiction de propriétés d'équilibre et de formation. La recherche d'un ensemble cohérent de propriétés de formation demeure un verrou lorsqu'on adresse les biotransformations, sachant qu'il est nécessaire d'y associer la prise en compte des équilibres de dissociation. Ce point a été abordé dans cette étude dans une optique prédictive qui est développée au sein de l'axe GePEB depuis plusieurs années, en utilisant des voies d'approche nouvelles, en particulier les modèles prédictifs résultant de l'analyse par des simulations quantiques des propriétés moléculaires.

Chapitre II

Matériels et Méthodes

Nous détaillons dans cette partie les matériels et les méthodes qui ont été utilisés pour le développement d'un mini-photobioréacteur pour la culture d'*Arthrospira platensis* (spiruline). Comme la partie expérimentale concernant les cultures de *Chlamydomonas reinhardtii* n'a pas été menée dans le cadre de cette étude, nous ne présentons pas les méthodes expérimentales qui ont été utilisées.

1 La souche et les milieux

1.1 La souche et son entretien

La souche utilisée est une souche d'*Arthrospira platensis* PCC 8005, cyanobactérie photosynthétique, issue de la souchothèque de l'Institut Pasteur (Paris) (Figure 24). C'est une souche non axénique, qui se multiplie en symbiose avec une bactérie type bacille gram +.

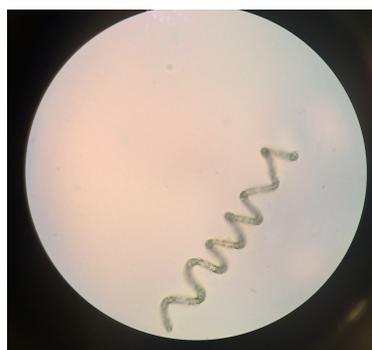


Figure 24 : Photographie d'*Arthrospira platensis*, observée au microscope optique (x100)

La souche est repiquée dans le milieu Zarrouk modifié décrit au paragraphe suivant, au maximum tous les mois, afin de conserver un matériel biologique de pré-culture et conserver l'intégrité des souches.

Elles sont conservées dans des fioles Erlenmeyer de 500 mL contenant 200 mL de milieu de culture, à 30 °C, sur plaque à agitation orbitale à 100 rpm et à sous flux lumineux contrôlé ($I = 150 \mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

1.2 Les milieux

C. Zarrouk a déterminé au cours de ses recherches (1966) la composition des eaux du lac Tchad, milieu naturel des espèces *Arthrospira*. Les milieux utilisés au cours de nos travaux sont des milieux synthétiques modifiés par rapport à celui déterminé par Zarrouk.

La première modification correspond à une modification du pH. Cornet (1992) a modifié le tampon d'hydrogénocarbonates afin d'obtenir un pH égal à 9,5. Ce pH a l'avantage d'augmenter la pression de sélection en limitant les contaminations bactériennes mais il présente surtout l'intérêt d'augmenter la capacité de dissociation du CO_2 en ions carbonate CO_3^{2-} et bicarbonate HCO_3^- dans le milieu, puisqu'à ce pH nous nous reprochons du pKa du couple qui est de 10,33 à 25 °C. Suite à une étude en ICP-ES, Cogne *et al.*, (2003a) ont ensuite proposé de simplifier la composition du milieu Zarrouk, par élimination des éléments

non nécessaires à la croissance de la cyanobactérie. Le milieu de base utilisé lors de nos expériences (Zarrouk modifié) correspond donc à cette double modification. La composition de ce milieu est reportée dans le Tableau 4.

Tableau 4: Composition du milieu Zarrouk modifié, pH 9,5

Composé	Concentration (g.L ⁻¹)	Composé	Concentration (g.L ⁻¹)	Composé	Concentration (g.L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0,5	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,08	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,11
NaHCO ₃	10,5	NaNO ₃	2,5	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,03
Na ₂ CO ₃	7,6	EDTA	0,08	FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,01
CaCl ₂	0,03	K ₂ SO ₄	1	MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,23
NaCl	1				

Pour les tests préliminaires, différents milieux basés sur le milieu Zarrouk modifié ont été utilisés. Ils diffèrent par la quantité et la source d'azote utilisée. Selon les cas, le milieu contient du nitrate (NaNO₃), de l'ammonium (NH₄Cl), ou un mélange de nitrate et d'ammonium. Différentes concentrations en azote ont été testées, afin d'avoir un apport quotidien en azote de 1,7 mM N, 3,4 mM N ou 6,8 mM N. Pour ces différentes conditions, nous avons choisi de travailler en conduite « Fed-Batch ». Ainsi, après avoir réalisé un dosage quotidien (ou deux fois par jour sur certaines expérimentations) de l'azote, nous injectons une solution concentrée d'ammonium ou de nitrate. Ces solutions sont introduites après filtration sur des filtres seringues 0,22 µm stériles hydrophiles. Une dernière série d'expériences a été réalisée en utilisant directement le milieu Zarrouk modifié (29 mM N-NO₃), supplémenté ou non par de l'ammonium à hauteur de 1,7 ou 3,4 mM N-NH₄ quotidiennement. Dans ce cas, la concentration en nitrates étant non limitante pour la croissance, aucun ajout de nitrates quotidien n'a été réalisé. Le Tableau 5 résume les différentes conditions testées.

Tableau 5 : Concentrations en azote (nitrates ou ammonium) dans les tests en fioles de Roux

Cultures	[NO ₃] (mM)	[NH ₄] (mM)	Ajout quotidien (mM)
1,7 mM N-NO ₃	1,7	0	1,7 (N-NO ₃)
1,7 mM N-NH ₄	0	1,7	1,7 (N-NH ₄)
3,4 mM N-NO ₃	3,4	0	3,4 (N-NO ₃)
3,4 mM N (1,7 mM N-NO ₃ + 1,7 mM N-NH ₄)	1,7	1,7	3,4 (N-NO ₃ et N-NH ₄)
1,7 mM N-NH ₄ 2x	0	1,7	3,4 (2x 1,7 mM N-NH ₄)
3,4 mM N-NH ₄ 2x	0	3,4	6,8 (2x 3,4 mM N-NH ₄)
Zarrouk	29	0	0
Zarrouk + 1,7 mM N-NH ₄	29	1,7	1,7 (N-NH ₄)
Zarrouk + 3,4 mM N-NH ₄	29	3,4	3,4 (N-NH ₄)

En ce qui concerne les essais en mini-PBR, seuls 2 milieux ont été utilisés : le milieu Zarrouk modifié (29 mM N-NO₃) et un milieu Zarrouk modifié supplémenté quotidiennement en ammonium à hauteur de 1,7 mM N-NH₄.

2 Les systèmes de culture

2.1 Les fioles de Roux

Les fioles de Roux (Figure 25) sont des « bouteilles » de 750 mL possédant un volume utile de 670 mL, inoculées, après stérilisation, à 10 % avec les pré-cultures afin d'avoir une concentration cellulaire en début d'expérience de l'ordre de 0,15 g.L⁻¹.

Elles sont thermo-régulées à la température de 36 °C par une circulation dans une double enveloppe d'eau provenant d'un thermo-cryostat (ECO RE 415S, Lauda). La mesure de température est réalisée à l'aide d'une sonde Pt 100 plongeant dans la culture.

Les fioles de roux sont installées sur des agitateurs magnétiques, et la culture est agitée grâce à un barreau aimanté cylindrique (vitesse environ 500 rpm).

Chaque fiole est éclairée par un dispositif de trois lampes halogènes à lumière blanche de 20W type SYLVANIA BAB36°, dont l'intensité est variable selon le réglage de l'alimentation (ELC 924A). Sur chaque fiole, est adapté un condenseur dans lequel circule de l'eau réfrigérée à 3 °C (thermo-régulée par un thermo-cryostat type Lauda ECO RE 415S). Ces condenseurs servent à limiter les évaporations d'eau en les condensant (retour à la phase liquide).

Un mélange de gaz à 2 % de CO₂, soit 20 000 ppm, est envoyé, avec un débit total faible, de l'ordre de 75 mL.min⁻¹, afin de limiter la formation de grosses bulles qui font remonter la culture dans les condenseurs. Le mélange de gaz est filtré (par des filtres hydrophobes Millipore® autoclavables 0,22 µm) à l'entrée de chaque fiole pour limiter les contaminations. Cet apport de CO₂ permet d'apporter du carbone inorganique à la culture (même s'il y en a déjà sous forme de carbonates dans le milieu), mais peut également permettre de moduler le pH en cours de culture en le maintenant dans une gamme acceptable.

Des prélèvements quotidiens d'un volume constant de 4 mL sont réalisés à l'aide de seringues stériles Luer de 5 mL, en zone stérile (au bec benzène).

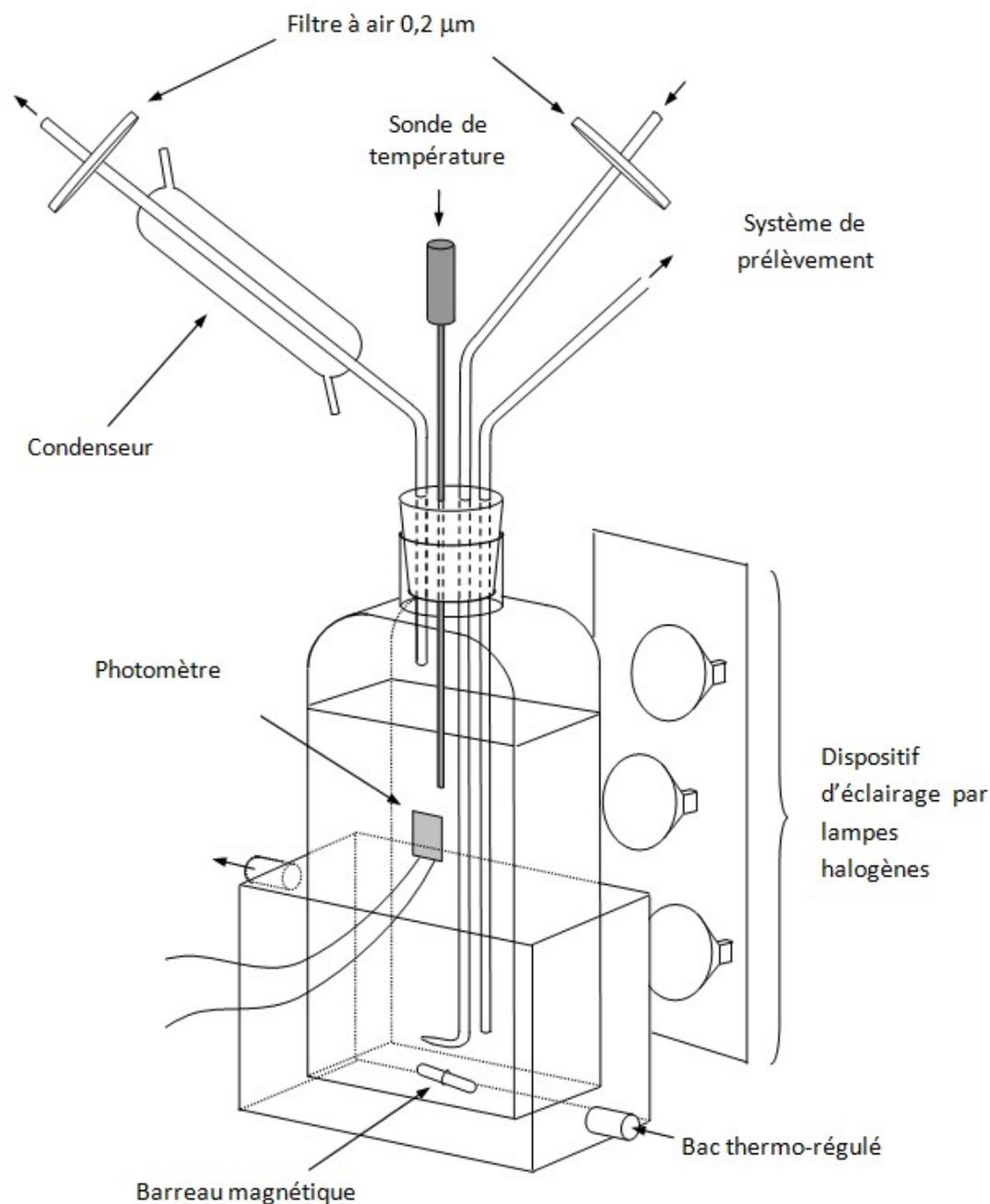


Figure 25 : Schéma d'une fiole de Roux (photobioréacteur) pour les tests préliminaires

2.2 Le mini-photobioréacteur

Un mini-photobioréacteur à membrane, développé initialement par Cogne (Cogne *et al.*, 2003), a été utilisé pour certaines expériences. Son originalité repose sur l'emploi d'une membrane pour séparer les phases liquide et gazeuse. Ceci répond en particulier à la problématique de séparation des gaz en microgravité et permet donc d'envisager un fonctionnement similaire dans l'espace. Ceci permet de réaliser les échanges gazeux entre les

deux phases sans la formation de bulles dans le compartiment liquide. De façon à maximiser conjointement la surface éclairée du réacteur et la surface d'échange de la membrane entre les deux compartiments, le réacteur a été conçu originellement sous forme de dispositif horizontal Cogne (2003). Ce type de photobioréacteur à membrane a été le premier prototype de ce type qui par la suite a été repris dans d'autres expériences réalisées par l'ESA.

Conceptuellement, ce mini-PBR comprend 2 compartiments fermés, un compartiment liquide et un compartiment gaz, séparés par une membrane perméable aux gaz. Lors de la production d'oxygène au sein du milieu de culture liquide, l'oxygène diffuse au travers de la membrane ce qui induit une augmentation de pression dans le compartiment gaz. La pression est mesurée dans le compartiment gaz. La mesure de la vitesse d'augmentation fournit l'information instantanée sur la vitesse de production d'oxygène dans la phase liquide. Ceci n'est valable que si le rapport des volumes gaz et liquide est déterminé avec précision et si la capacité de transfert entre le gaz et le liquide est suffisante pour que le phénomène contrôlant soit la vitesse de production d'oxygène et non pas la vitesse de transfert. Il faut donc être dans une situation où l'on peut faire l'approximation de la non-accumulation de l'oxygène au sein du liquide. Lorsque que la pression dans le dispositif atteint une valeur seuil définie par l'opérateur, le compartiment gaz est mis à l'atmosphère puis à nouveau fermé. Il suffit alors de compter le nombre de cycles pour déterminer la vitesse moyenne de production de gaz.

Bien entendu ce système de mesure fonctionne si la production d'oxygène est le seul phénomène d'échange gaz liquide. En conséquence, il est nécessaire que le milieu de culture contienne l'intégralité du carbone consommé par les microalgues. Ceci est réalisé en utilisant un milieu bicarbonate à pH élevé de telle sorte que la pression partielle d'équilibre en CO_2 entre le liquide et gaz reste faible et que ses variations soient négligeables devant les variations de pression partielle en oxygène. Dans le cas contraire, le système reste fonctionnel d'un point de vue de la culture des microalgues (transfert de CO_2 du gaz au liquide et transfert d'oxygène du liquide au gaz) mais le protocole de mesure de la vitesse de production d'oxygène doit être revu et compensé du transfert du CO_2 à contre-courant de celui de l'oxygène.

2.2.1 Matériel

Afin de répondre aux impératifs des travaux de recherches en cours, plusieurs modifications ont été apportées au réacteur.

Il a été réalisé, en 2000, en acier inoxydable alimentaire 316 L. D'un volume total de 132 mL, c'est un cylindre éclairé sur sa face supérieure. Un agitateur magnétique (0,5 x 15 mm), positionné à l'intérieur de la phase liquide dont la hauteur est de 21 mm et le volume de 106 mL (Figure 26), produit une agitation efficace.

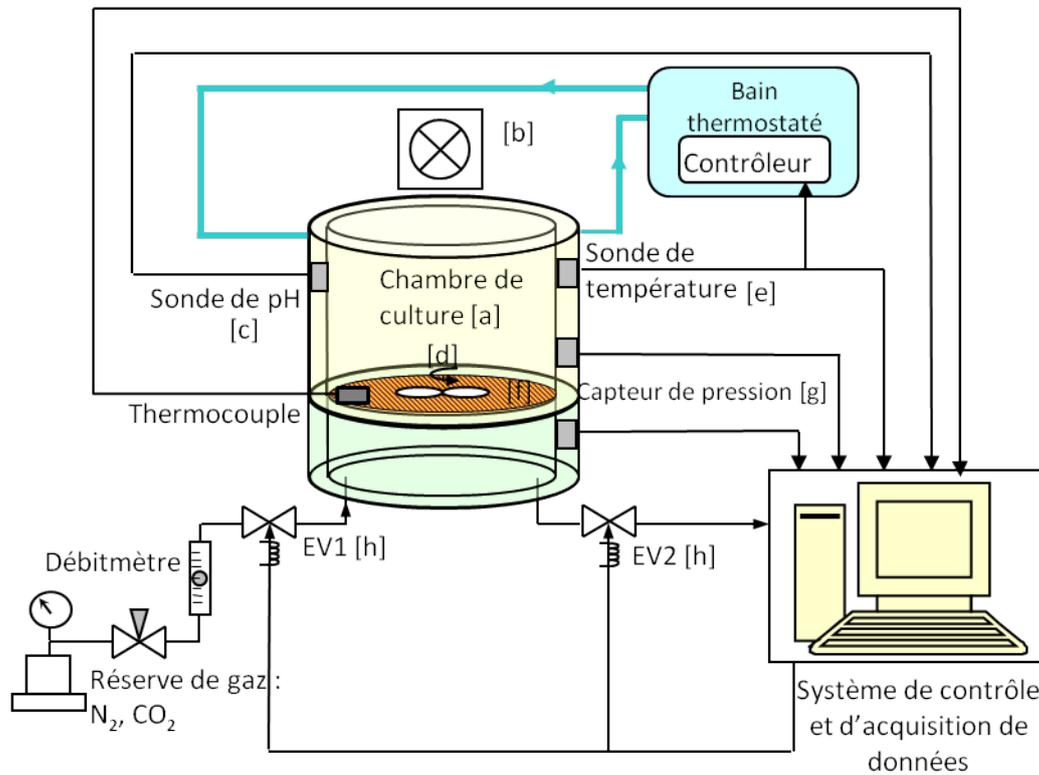


Figure 26 : Schéma de l'installation [a] Compartiment liquide ; [b] Source de lumière ; [c] Sonde pH ; [d] Agitateur ; [e] Membrane ; [f] Compartiment gazeux ; [g] Capteurs de pression ; [h] Electrovanne (Cogne, 2003)

L'usinage d'un système de prélèvement décrit plus loin a été réalisé. Le logiciel d'acquisition utilisé au cours de la thèse de Cogne (2003) devenu obsolète, un nouvel outil d'acquisition a été entièrement développé sur le logiciel Labview afin de répondre, entre autres, aux problématiques de gestion de la production gazeuse et permettre l'acquisition des données nécessaires à la bonne conduite des expérimentations. D'un point de vue matériel, des modifications ont été réalisées sur le capteur de pression en phase gazeuse et sur les systèmes d'électrovannes. Enfin, le réseau électrique a été restructuré afin de coïncider avec le nouveau logiciel d'acquisition.

L'oxygène produit diffuse à travers une membrane en PTFE (Fluoropore, 0,22 μm , Millipore[®]) vers le compartiment gazeux d'un volume de 26 mL, sur lequel est monté un capteur de pression (MPX2200AP Case 344B-01, Freescale[®]) (Figure 27). Deux

électrovannes unidirectionnelles normalement fermées (3/2 NF APP.D0.8 CM 3021112 D.24/DC), alimentées en 24 V, sont disposées de façon à effectuer un ‘flush’ en évacuant l’oxygène accumulé dans la phase gazeuse vers l’extérieur par le biais d’un fin capillaire, relié à la seringue de prélèvement de gaz en verre (1005 TLL, 5 mL, Hamilton[®]). Un autre capteur de pression à membrane affleurant dans la phase liquide (EPX-N03-3.5B, Entran[®]) (Figure 27) donne la différence de pression de part et d’autre de la membrane.

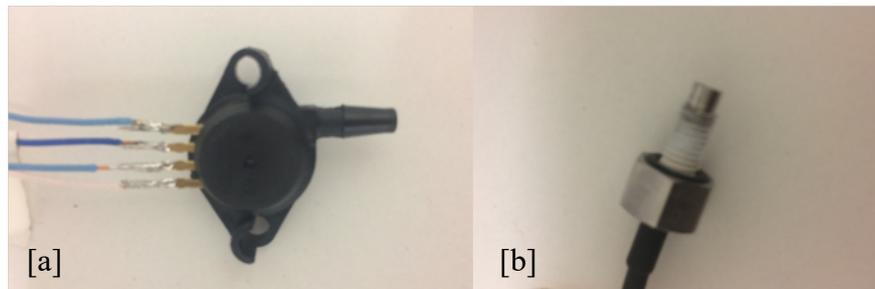


Figure 27 : Capteurs de pression [a] Phase gazeuse; [b] Phase liquide

Un système de régulation de la température a été installé afin de maintenir la température de la culture autour de l’optimum de 36 °C. Pour cela, une sonde de température (Pt 100 ; Ø 6 mm) est reliée en contrôle externe à un bain thermo-régulé (Cryothermostat Lauda[®] ECO RE415S), qui régule la température du réacteur par l’intermédiaire de l’échangeur à chaleur à circulation liquide situé à l’arrière du réacteur (Figure 28). Cet échangeur de chaleur, en inox, possède une surface d’échange de 48 cm².

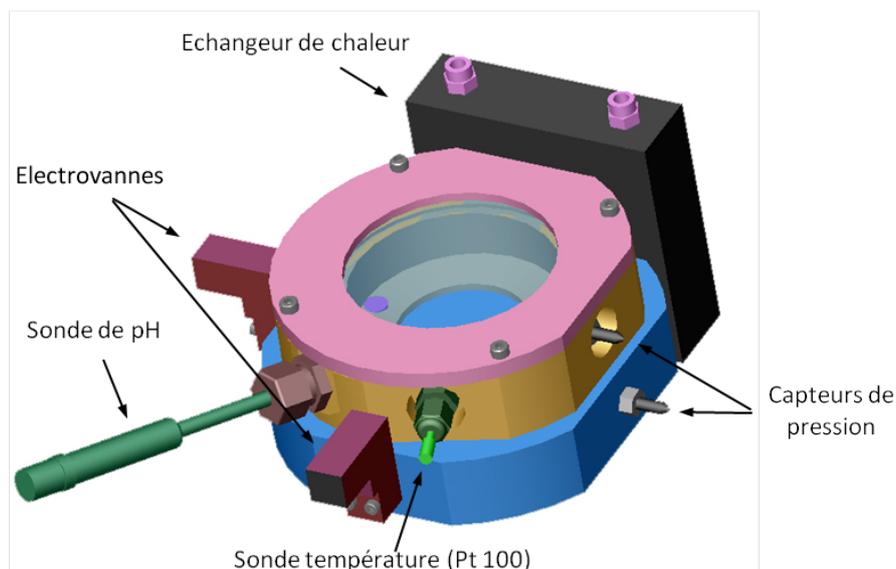


Figure 28 : Schéma en 3D du mini PBR (Cogne, 2003)

De plus, un thermocouple (3107_0-TPK-01 K-type, Phidgets[®]), monté sur une demi-lune en caoutchouc inséré dans la fente latérale du réacteur, est relié à un capteur (1051-2 1-Input, Phidgets[®]) et permet ainsi l'acquisition de la température sur le programme.

La forme du réacteur a été dessinée de telle sorte que le rapport du volume de liquide au volume de gaz V_l/V_g soit maximal. Dans notre cas ce rapport est égal à 3,08 (Cogne *et al.*, 2003). Une pièce en inox placée dans le compartiment gaz, désignée sous le nom de « bouchon », permet d'ajuster ce rapport. Il est en effet important que le volume de gaz soit le plus petit possible pour amplifier les variations de dégagement ou d'absorption de gaz.

Le système d'inoculation et de prélèvement qui a été usiné permet l'utilisation du réacteur en mode continu transitoire (culture en continu à volume constant). En effet, un système de vanne 3 voies Luer-Lock a été installé de part et d'autre du réacteur (Figure 29). A l'aide de seringues Luer-Lock stériles, du milieu de culture peut être injecté en prélevant en simultanément l'échantillon de culture. Il devient alors possible d'effectuer des prélèvements en cours de manipulation sans faire entrer d'air dans le compartiment liquide. Cependant, il est indispensable de dépressuriser le réacteur en mode manuel sur l'interface de contrôle pour pouvoir faire le prélèvement. En effet, une pression, plus haute que la pression atmosphérique, entrainerait une fuite de liquide et l'apparition de bulles dans le compartiment liquide par la remontée de gaz du compartiment gazeux (dépressurisation du compartiment gaz).

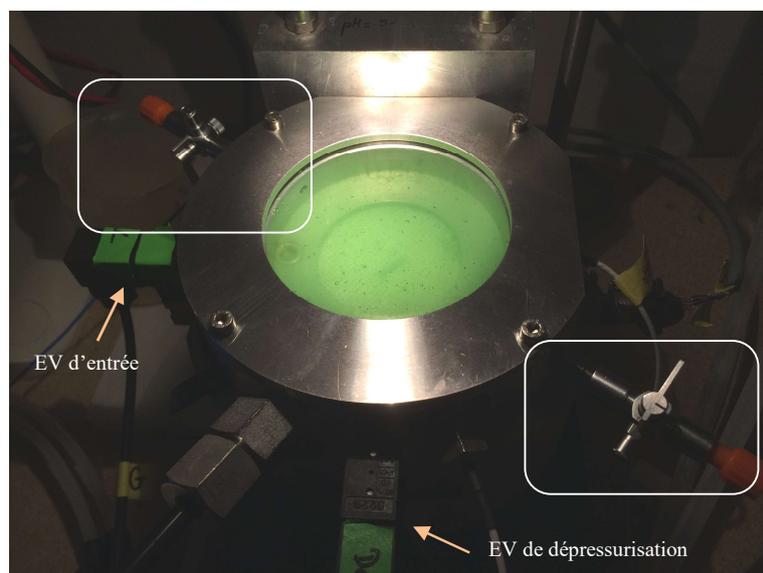


Figure 29 : Photographie du réacteur : visuel des 2 vannes trois voies de prélèvements et des 2 mini EV

Deux mini EV sont fixées sur le réacteur, une en entrée et une autre en sortie, nommée par la suite EV de dépressurisation (Figure 29). Deux autres EV sont situées en amont sur le circuit

de gaz. Ces deux dernières permettent la sélection d'un des deux gaz de flush, azote ou dioxyde de carbone, en fonction des besoins de la manipulation. En effet, pour chaque cycle de montée de pression, un flush d'azote sera nécessaire, et pour la régulation du pH du CO₂ sera envoyé en flush dans le réacteur. Les différents cycles seront décrits précisément, ultérieurement. Enfin, un détendeur est installé en entrée du réacteur afin de limiter une montée en pression trop rapide lors du flush qui pourrait altérer la membrane.

2.2.2 Interface de gestion : Labview

L'ensemble des composants électroniques est contrôlé par une interface créée à partir du logiciel Labview[®]. L'interface de contrôle est présentée sur la Figure 30.

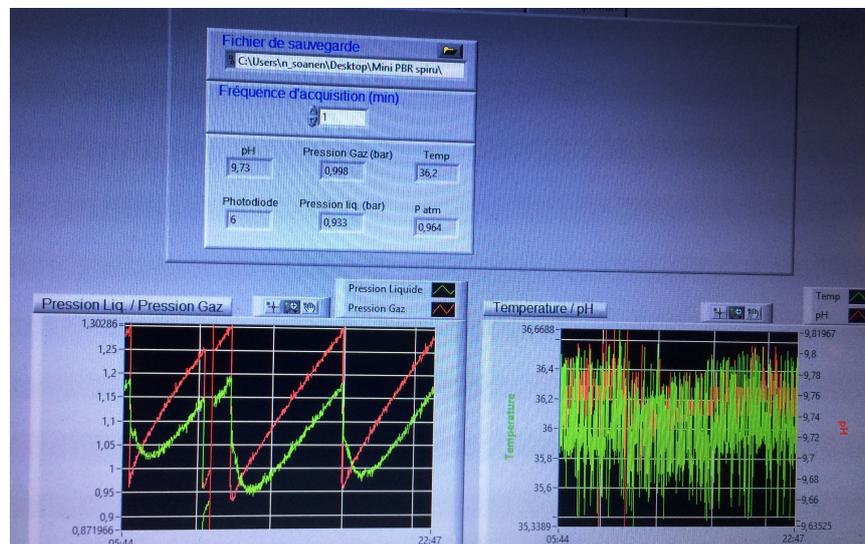


Figure 30 : Face avant du logiciel d'acquisition

Cette interface permet de contrôler les 4 électrovannes (EV) de l'installation. L'interface de gestion est aussi en charge de l'acquisition des données telles que la température, le pH, les pressions dans le compartiment liquide et dans le compartiment gaz. Pour cela, un boîtier Ni-6008 (National Instrument[®]) relié à une carte relai à contrôles TTL (Arduino[®]) permet de transformer les signaux d'acquisition reçus et de contrôle émis, mais aussi d'alimenter certains composants en 5 V.

C'est aussi depuis cette interface que nous réalisons les calibrations de la sonde pH et des capteurs de pression.

2.2.3 Calibration de la sonde pH

La sonde pH (Electrode Flex-micro, Ø 6mm, Mettler-Toledo[®]) est alimentée par le boîtier Ni-6008 et est reliée à celui-ci par un adaptateur pH (1130, Phidgets[®]). Elle est fixée sur le réacteur à l'aide d'un presse-étoupe.

Le signal transmis au boîtier d'acquisition, et donc à l'interface, est une tension en millivolts qui est propre à chaque pH puisque la valeur numérique est fonction de l'acidité ou de l'alcalinité de la solution. La calibration se fait à partir de deux solutions pH (7 et 10). La lecture de la tension pour chaque solution permet ainsi d'ajuster le 'm', valeur de l'ordonnée à l'origine, et le 'b', valeur de la pente. Ces valeurs sont calculées automatiquement sur l'interface après indication des tensions des solutions de calibration.

2.2.4 Calibration des capteurs de pression

La calibration du capteur de pression de la phase liquide (Entran[®]) est effectuée à partir du capteur de pression de la phase gaz (Freescale[®]). En effet, ce second capteur est calibré en usine, et après vérification des valeurs transmises, nous servira à chaque calibration comme valeur de référence. De plus, un autre capteur de pression a été installé à proximité de l'installation afin d'effectuer une correction automatique des valeurs mesurées en fonction de la pression atmosphérique. Ces 3 capteurs sont alimentés en 15,5 V (ALR3003D, ELC[®]).

Le signal transmis pour ces deux capteurs est en millivolts. Cependant, les valeurs étant très faibles, la transmission du signal sur le boîtier d'acquisition Ni-6008 se fait par l'intermédiaire d'amplificateurs (Q488-0C01, Eurotherm[®]) alimentés en 24 V DC par une alimentation stabilisée (AL897A, ELC[®]). Ainsi, après lecture des valeurs transmises sur l'interface depuis le capteur calibré usine, nous avons pu identifier une relation de proportionnalité, type ($ax + b$), entre la tension et la valeur de la pression. La correction automatique de la pression atmosphérique a ainsi pu être intégrée dans la valeur de l'ordonnée à l'origine. La même procédure a été réalisée pour le capteur à membrane affleurante en utilisant le capteur Fresscale[®] comme référence.

2.2.5 Protocole de gestion de la pression dans le compartiment gaz

Le temps de montée en pression est mesuré sur l'interface ; c'est une donnée utile par la suite pour calculer la vitesse de production du gaz.

Quand la pression dans le compartiment gaz atteint la consigne haute de 1,3 bars absolus, l'électrovanne de dépressurisation, en sortie du réacteur, s'ouvre jusqu'à une valeur seuil de 1,05 bars. Puis l'ensemble des deux électrovannes s'ouvre automatiquement et l'oxygène dans la phase gazeuse est chassé par un flux entrant d'azote disponible à partir d'une réserve de gaz (bouteille de 110 L avec un détendeur à débit fixe de 2,5 L.m⁻¹). Cette étape peut être qualifiée d'étape de purge. Après l'ouverture contrôlée de l'EV d'arrivée de l'azote (alimentée en 220 V), un flush d'azote (N₂) a lieu pendant 90 secondes. Puis, après fermeture des EV d'entrée et d'azote, l'EV de sortie reste ouverte jusqu'à atteindre à nouveau la pression seuil de basse pression de 1,05 bars et un nouveau cycle commence.

2.2.6 Protocole de gestion du pH

Dès que le pH atteint la valeur de 10, l'ouverture de l'électrovanne de sortie permet de dépressuriser le réacteur jusqu'au seuil de 1,05 bars. A ce stade, les 2 mini électrovannes ainsi que l'EV du flux de CO₂ (alimentée en 24 V) s'ouvrent afin de balayer le gaz contenu et de réaliser un flush de dioxyde de carbone jusqu'à ce que le pH atteigne la valeur de 8,5. Puis, après fermeture des EV d'entrée et de CO₂, l'EV de sortie reste ouverte jusqu'à atteindre la pression seuil de 1,05 bars et un nouveau cycle commence. Nous avons défini la valeur seuil de pH à 8,5, car il existe un temps de latence correspondant au temps de transfert des gaz au travers de la membrane. En suivant cette procédure, le pH ne descend pas en dessous de 8.

2.2.7 Membrane / fritté

La membrane doit être rigide, strictement hydrophobe, mais elle doit être perméable aux gaz, notamment à l'oxygène et au CO₂ afin de permettre les échanges entre les deux phases. Une étude précise des caractéristiques de perméabilité à la vapeur d'eau de plusieurs membranes a été réalisée (Cogne, 2003). Le choix s'est porté sur une membrane poreuse, plus perméable aux gaz, augmentant ainsi le transfert des gaz entre les deux phases. Une membrane en PTFE (polymère de polytétrafluoroéthylène) a été sélectionnée, elle possède la particularité d'être montée sur un filtre écran quadrillé et donc d'avoir seulement une seule face en PTFE (Fluoropore FGLP09050, Merck Millipore[®]).

Afin d'augmenter sa durée d'utilisation, cette membrane est positionnée sur un verre fritté de porosité 2 (40 à 100 μm), séparant rigidement les deux phases du réacteur.

Enfin, une grille en nylon a été installée entre la membrane et le barreau aimanté afin de limiter au maximum l'usure de la membrane par frottements.

3 Irradiance : optimisation et calibration

3.1 Mesure de l'activité photosynthétique

Des mesures de productivité en oxygène ont été réalisées à l'aide d'un oxymètre (Oxygraph Hansatech[®] à source lumineuse de haute intensité) afin de déterminer le flux lumineux minimal, optimal et maximal à appliquer aux cultures d'*Arthrospira platensis*.

L'oxymètre est une cellule électrochimique polarographique de type Clark, possédant deux électrodes (une cathode en platine et une anode en argent) dont la différence de potentiel électrique est stabilisée à 700 mV (Figure 31). La cellule de Clark est reliée directement à une chambre de culture (DW2/2 Hanstech[®], Volume = 2 mL), thermostatée par circulation de liquide dans une double enveloppe, et agitée ($v = 100 \text{ rpm}$) dans le but d'augmenter la vitesse de transfert des gaz (ici l'oxygène) au travers de la membrane en polytétrafluoroéthylène (PTFE) recouvrant la cellule. Les électrodes sont immergées dans une solution d'électrolyte (solution de chlorure de potassium (KCl) saturée à 50 %).

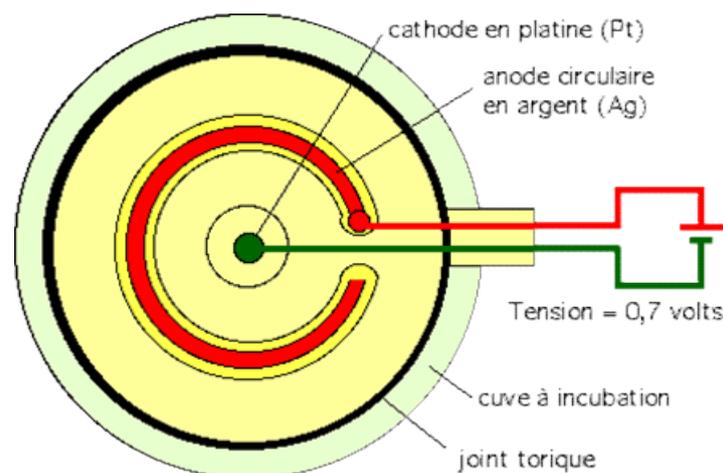


Figure 31 : Schéma de l'électrode de type Clark vue de dessus (OXYT/ED Oxytherm, Hansatech[®]) [11]

Plusieurs réactions électrochimiques sont observées (Figure 32). Au niveau de l'électrode en argent, la différence de potentiel électrique (DDP) induit l'oxydation de l'argent de l'anode qui se complexe avec les ions chlorures du KCl d'après les réactions :



Et



Dans un autre temps, l'oxygène est réduit en peroxyde d'hydrogène, au niveau de la cathode :



Puis l' H_2O_2 est ionisé en ions hydroxydes :

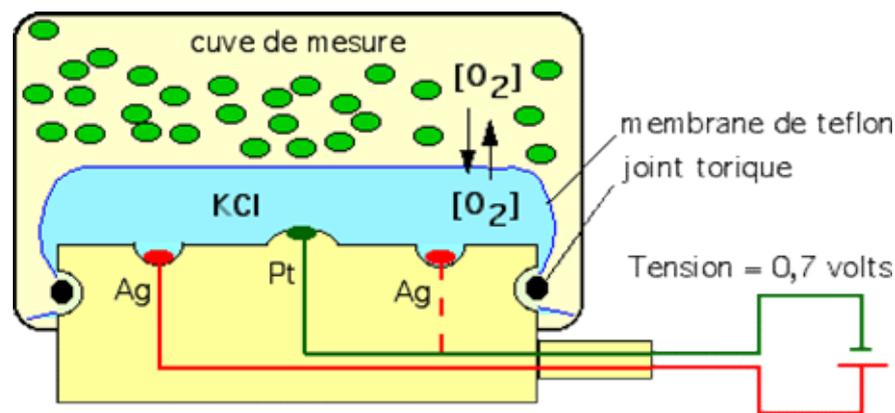


Figure 32 : Réactions électrochimiques observées au niveau de l'électrode (vue en coupe)

Ainsi, l'oxygène, qui est produit dans la chambre d'analyse, entraîne un enchaînement de réactions responsables de la production d'un courant électrique faible qui est amplifié et dont le flux est proportionnel à la concentration en oxygène.

La calibration de l'appareil est réalisée sur 2 points, à partir d'une solution d'eau ultrapure saturée en oxygène, puis en absence d'oxygène. L'état d'anoxie est obtenu par l'ajout de sulfites dans la chambre.

La lumière est apportée par une lampe de lumière blanche de haute intensité LS2 (Hansatech). La lampe est connectée à la chambre par une fibre optique A8 LS2/FO. L'intensité lumineuse peut être diminuée en utilisant des filtres neutres (transmission : 80 %, 50 %, 25 %, 10 %, 1,7 %). La lampe possède deux emplacements à filtres ce qui permet de moduler l'intensité

lumineuse dans une gamme d'irradiances comprises entre 0 et 8 384 $\mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La production d'oxygène par les cellules est mesurée pour différentes irradiances, à savoir à l'obscurité, à 20, à 86, à 160, à 615, à 990, et à 1140 $\mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Pour la mise en œuvre de la mesure, 2 mL de culture contenant 0,06 g.L⁻¹ de cellules sont déposés dans la chambre. Les microalgues sont dans le milieu Zarrouk modifié auquel 20 mM de NaHCO₃ ont été ajoutés afin que les microorganismes ne soient pas limités par la source de carbone lors de la mesure de l'activité photosynthétique. L'acquisition des données est réalisée sur une durée minimale de 15 minutes par intensité, avec une fréquence de mesure fixée à 5 secondes, à l'aide du logiciel « Oxygraph plus Software », ce qui permet de tracer des courbes de production de dioxygène en fonction du temps. Les valeurs expérimentales sont alors confrontées au modèle mathématique d'Eilers et Peeters (1988), dont l'équation s'écrit :

$$r_{\text{O}_2} = r_{\text{O}_2, \text{max}} * \frac{G}{K_1 + G + \frac{G^2}{K_2}} - r_{\text{resp}} \quad \text{Eq. 113}$$

Où r_{O_2} est la production d'O₂ (en nmol.mL⁻¹.min⁻¹), $r_{\text{O}_2, \text{max}}$ est la production maximale d'O₂ (en nmol.mL⁻¹.min⁻¹), r_{resp} est la consommation d'O₂ en absence de lumière (en nmol.mL⁻¹.min⁻¹), G est l'irradiance (en $\mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et K_1 et K_2 sont des constantes évaluées expérimentalement.

On peut alors définir G_C , la valeur où les phénomènes de photosynthèse et de respiration sont à vitesses identiques, c'est-à-dire lorsqu'il y a autant d'O₂ produit que de consommation de CO₂ ; et G_S , la valeur de productivité maximale en oxygène.

Ces valeurs sont exprimées en $\mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

3.2 Calibration de l'éclairage

Afin de connaître le flux lumineux incident appliqué lors des expériences en fioles de Roux ou en mini-PBR, des calibrations ont été réalisées permettant de relier la tension électrique des alimentations (en Volts) et l'irradiance ($\mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Pour les fioles de Roux, l'irradiance est mesurée à l'aide d'un quantum-mètre (LI-COR model LI-189), à une distance fixe de 5 centimètres entre la fiole et le dispositif. Des mesures sont réalisées sur 5 points de la surface de captation de la lumière par la fiole. Une atténuation du

flux lumineux exercée par la surface vitrée d'une valeur de 9 % a été prise en compte étant donné qu'il n'est pas possible de faire la mesure de l'intérieur des fioles (entrée de bouteille trop étroite pour permettre le passage du capteur).

Pour le mini-photobioréacteur, le capteur a été placé sous la surface vitrée du réacteur, permettant la prise en compte de l'atténuation par le verre. Une distance de 11 cm par rapport à la lampe halogène est fixée (distance équivalente lors des différentes cultures réalisées dans le PBR), et la corrélation entre les intensités électriques et leur valeur de flux lumineux est relevée. Les résultats sont moyennés pour chaque intensité (à partir des 3 points de mesure réalisés pour chacune). Les résultats de ces calibrations sont présentés dans le chapitre 3.

La quantité de $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ peut aussi être exprimée en $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$. Dans le cas de la partie visible de la lumière aussi appelée le PAR (Photosynthetically Active Radiation = λ comprise entre 400 et 700 nm), le facteur de conversion vaut $0,2177 \text{ J}\cdot\mu\text{mol}_{\text{hv}}^{-1}$, soit un facteur de 4,6 pour convertir les $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ en $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Rochatte, 2016).

4 Traitement des échantillons

4.1 Protocole général de traitement des échantillons

Pour les expériences en fioles de Roux, des prélèvements d'un volume constant de 4 mL sont réalisés stérilement à l'aide de seringues à connecteurs Luer de 5 mL.

Chaque prélèvement est ensuite séparé en deux volumes de 2 mL. Un est directement centrifugé (30 minutes, 15 °C, 10 000g). Le surnageant est récupéré pour les dosages d'ammonium et de nitrates. Le second volume est soniqué à l'aiguille à ultrasons, afin de lyser les cellules. Il est ensuite centrifugé (30 minutes, 15 °C, 10 000 g). Par la suite, le surnageant est dessalé par ultrafiltration sur des tubes-filtres possédant une membrane en cellulose de porosité 10 kDa (Amicon[®] Ultra-4 Centrifugal Filter Devices, Merck[®], 7500 g, 15 min) avant le dosage des oses totaux. En effet, les sels présents dans le surnageant de l'échantillon interagissent avec les réactifs des dosages.

Le même protocole est exécuté sur les prélèvements du mini PBR. Cependant, les prélèvements, d'un volume de 1 mL, sont réalisés avec des seringues à connecteurs Luer-Lock. Ils sont ensuite divisés en deux volumes de 500 μL . Le surnageant est dessalé avec des

tubes-filtres Amicon[®] Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices, Merck[®], à 14 000 g, 15 min puis à 1000 g pendant 2 minutes afin de récupérer le retentât.

Le schéma général de traitement des échantillons est proposé sur la Figure 33 et le détail des analyses quantitatives réalisées est proposé dans les paragraphes suivants.

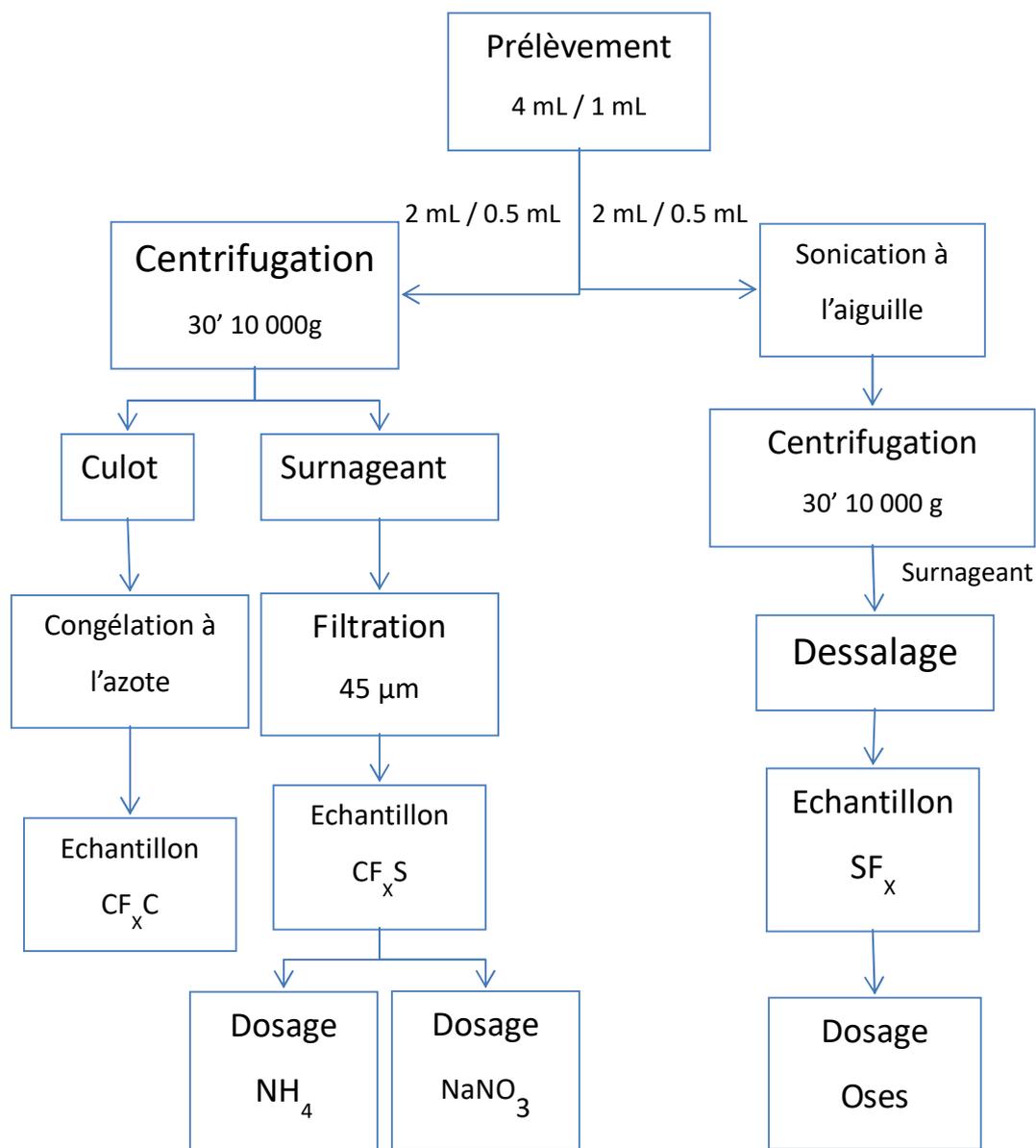


Figure 33 : Diagramme récapitulatif du traitement des prélèvements

4.2 Suivi cinétique

4.2.1 Mesure de la turbidité

La mesure de la turbidité de la culture est réalisée immédiatement sur le prélèvement, en amont des centrifugations. La concentration en cellules constituant la biomasse est déterminée par une lecture au spectrophotomètre (CPS-240 A, Shimadzu®) à la longueur d'onde de 750 nm. Cette densité optique (DO) est représentative de la croissance des microalgues dans le PBR.

Une corrélation DO/masse sèche a été établie à 0,65 g.L⁻¹ de matière sèche par unité d'absorbance.

4.2.2 Dosage des nitrates

Le dosage de la concentration en nitrate dans le surnageant est effectué suivant la méthode de Cawse (1967) modifié selon *American Public Health Association* (A.P.H.A.) (1971) avec comme réactif l'acide perchlorique à 5 %.

Une gamme étalon à base de nitrate de sodium dont les concentrations vont de 0 à 1 g.L⁻¹ est utilisée. Ce dosage consiste à ajouter à 100 µL d'échantillon, 900 µL d'acide perchlorique à 5 %. Les absorbances des échantillons et de la gamme étalon sont mesurées à 210 nm et à 275 nm, contre le zéro à 210 nm de la gamme étalon, dans des cuves en quartz.

Par le biais du calcul ci-dessous, nous obtenons la DO de l'échantillon, à reporter sur la gamme étalon afin de connaître la concentration.

$$DO_{ech} = DO_{210,ech} - 2 * (DO_{275,ech} - \overline{DO_{275,gamme}})$$

Eq. 114

L'absorbance à 275 nm permet d'éliminer les interférences dues aux nitrites (NaNO₂).

La concentration en azote des échantillons est exprimée en équivalent N.

4.2.3 Dosage de l'ammonium

Le dosage colorimétrique de la concentration en ammonium, effectué sur le surnageant du prélèvement de culture, utilise comme réactif l'hypochlorite de sodium (javel) et le phénol nitroprussiate (kit de dosage de Sigma 640-3 et 640-1). Ce dosage est basé sur la réaction de Berthelot (1859). En milieu basique, les ions ammonium sont transformés totalement en

ammoniac. L'ammoniac dissous réagit sur l'hypochlorite ClO^- pour former une monochloramine. Ce composé, en présence de phénol et en milieu oxydant, donne lieu à la formation d'un bleu d'indophénol. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la concentration en ions NH_4^+ . Cette méthode a été décrite par (PATTON et CROUCH, 1977).

Une gamme étalon à base de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) dont les concentrations vont de 0 à 80 mg d'N.L⁻¹ est utilisée.

Cette méthode consiste à additionner 50 μL d'échantillon à 50 μL de javel et 500 μL de phénol puis ajouter 3 mL d'eau milliQ. Après avoir mélangé au vortex, et attendu 1 heure, les échantillons sont lus au spectrophotomètre à une DO de 570 nm contre le témoin de la gamme. La coloration est stable durant une heure.

La concentration en ammonium des échantillons est exprimée en équivalent N.

4.2.4 Calculs des concentrations en NH_3 formé et NH_4 consommé

Le dosage présenté ci-dessus permet donc d'accéder à la concentration « résiduelle » en ammonium dans les cultures. Cependant, comme décrit dans le Chapitre 1, le couple $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ possède un pKa de 9,25 et aux pH de nos cultures, une partie de l'ammonium introduit dans les milieux se retrouve donc sous forme d'ammoniac. Cette quantité de NH_3 formée est donc calculée selon la formule suivante (en considérant que la dissociation est immédiate) :

$$C_{\text{NH}_3} = C_{\text{NH}_4^+} \times 10^{(\text{pH} - \text{pKa})} \quad \text{Eq. 115}$$

La concentration en NH_4 consommée est alors calculée par différence :

$$C_{\text{NH}_4^+ \text{ consommée}} = C_{\text{NH}_4^+ \text{ initiale}} - C_{\text{NH}_3 \text{ formé}} - C_{\text{NH}_4^+ \text{ résiduelle}} \quad \text{Eq. 116}$$

4.2.5 Dosage des oses totaux

Un dosage des sucres totaux au résorcinol, selon la méthode décrite par Monsigny et al (1988), est réalisé sur l'échantillon prélevé. C'est un dosage résorcinol - acide sulfurique, effectué à partir d'une gamme étalon de glucose de 0 à 0,15 g.L⁻¹.

La déshydratation des unités osidiques conduit à la formation de composés furfuriques. Ces derniers interagissent avec les composés phénoliques du résorcinol par condensation pour former des composés absorbant à 450 nm.

La méthodologie à suivre consiste à ajouter à 200 μL d'échantillon le même volume de résorcinol et 1 mL d'acide sulfurique à 80 %. La solution est placée au bain marie pendant 30 minutes à 90 °C, puis refroidie à l'obscurité et à température ambiante pendant une demi-heure. La densité optique est mesurée à 450 nm et la concentration en oses totaux des échantillons est exprimée en équivalent glucose par rapport à la gamme étalon.

5 Caractérisation de la membrane

Afin de caractériser le coefficient de transfert de masse lors de l'échange gaz/liquide dans le miniPBR, nous avons combiné une partie de la méthodologie développée par Poughon *et al.* (2003) avec une partie de celle décrite par Dahi *et al.* (2015).

La première partie, issue Poughon *et al.* (2003), correspond à la détermination du coefficient de transfert gaz/liquide ($k_L a$) par titration de l'oxydation des sulfites selon la méthode de Cooper (norme AFNOR NF X42-103, 1989). Une concentration en Na_2SO_3 plus faible est cependant utilisée (10 g.L^{-1}), étant donné les faibles volumes réactionnels, et afin de réduire le temps de l'expérimentation. Ce dosage chimique est réalisé en début et en fin de manipulation. La seconde partie de notre méthode, issue de Dahi *et al.* (2015), est un suivi de la diminution de la pression dans le compartiment gazeux. Elle permet un suivi en continu du transfert de l'oxygène au travers de la membrane. L'objectif est de montrer que le transfert à travers la membrane n'est pas le facteur limitant qui est le facteur observé lors de la culture et que la capacité de transfert de l'oxygène entre les deux phases est suffisante.

Le compartiment liquide du miniPBR est rempli d'une solution de sulfites (Na_2SO_3) à 10 g.L^{-1} et de cobalt (Co^{2+}) à $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Le compartiment gaz du réacteur est quant à lui rempli avec de l'air ambiant. L'air ambiant possède une concentration en oxygène équivalent à 20,93 %. Pour lier la diminution de pression à la vitesse molaire de transfert d'oxygène, on prend en compte la loi des gaz parfaits $PV = nRT$. Il est donc indispensable de faire ces tests en contrôlant la température du gaz en utilisant la régulation thermique mise en place sur le mini-réacteur.

Les tests sont réalisés, sous agitation et à la pression de 1,5 bars.

Le dosage des sulfites de sodium se fait sur un prélèvement de 1 mL d'échantillon après neutralisation par la solution de diiode (I_2) à 0,1 M, dont la réaction s'écrit :



Puis, le dosage des ions de diiode en excès se fait par le thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$) à 0,1 M, selon l'équation :



Ajouter x mL de thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$), jusqu'à décoloration complète de la solution (sulfite + diiode).

La concentration (mol.L^{-1}) en sulfites de sodium pourra alors être calculée selon la relation :

$$C_{SO_3^{2-}} = \frac{C_{I_2} V_{I_2} - \frac{1}{2} C_{S_2O_3^{2-}} * V_{S_2O_3^{2-}}}{V} \quad \text{Eq. 119}$$

Le tracé de la variation de pression dans le compartiment gazeux permet, dans un premier temps de suivre la consommation de l'oxygène gazeux présent, et dans un second temps, le tracé du logarithme népérien de la courbe nous donne une valeur de pente, indispensable pour le calcul du $k_L a$. Le développement de la méthode est décrit dans le chap. résultats.

Ainsi, à partir de la concentration en sulfites de sodium restante et le suivi de pression dans le compartiment gazeux, nous pouvons déterminer la quantité d'oxygène qui a été transférée au travers de la membrane pendant une unité de temps définie.

Chapitre III

Résultats et discussion

Cette dernière partie traite de la modélisation de la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* avec stockage d'amidon en tant que substance de réserve. La phase de production d'hydrogène est également caractérisée par un modèle structuré du fonctionnement du chloroplaste. Dans la deuxième partie de ce chapitre, la mise au point d'un petit dispositif expérimental pour caractériser les cultures de microalgues est décrite. Son utilisation dans le cadre de la culture de spirulines fournit la preuve de concept.

1 Mise en œuvre des modèles de connaissance

1.1 Modèle de croissance pour *Chlamydomonas reinhardtii*

Le travail de modélisation sur la croissance a été réalisé dans le cadre du projet de recherche AlgoH2 financé par l'Agence Nationale de la Recherche, en collaboration avec 4 autres laboratoires. Ce consortium est constitué, en plus de l'axe GePEB, du laboratoire de Génie des procédés - Environnement - Agroalimentaire (GePEA) de Saint-Nazaire pour la mise au point de procédés de production, du laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP) de Marseille pour leur génie enzymatique des hydrogénases, du laboratoire IBITEC-S du CEA de Saclay pour leur connaissances en biologie moléculaire au niveau des métalloprotéines et des centres réactionnels photosynthétiques, et le laboratoire IBAM du CEA de Cadarache, pour leurs recherches sur des mutants d'intérêts. Ces travaux de recherche ont été réalisés au cours des 18 premiers mois de ma thèse, durée correspondant au temps restant jusqu'à la clôture du programme.

Le projet ANR AlgoH2 vise la production de bio-hydrogène (H_2) par photosynthèse par la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*.

Initialement, il existe un paradoxe à produire de l' H_2 par photosynthèse. En effet, dans la plupart des biosystèmes photosynthétiques, l'utilisation de l'énergie lumineuse induit la photolyse de l'eau (au niveau du photosystème 2, dit PSII) produisant de l'oxygène (O_2) et un transport d'électrons le long de la chaîne de transfert des électrons. Ce mouvement d'électrons conduit à la production de pouvoir réducteur, c'est-à-dire la production de cofacteurs réduits tels que la nicotinamine adénine dinucléotide (NAD) ou la flavine adénine dinucléotide (FAD) qui servent de constituants cellulaires dans les réactions de biosynthèse. C'est pourquoi, l'orientation du métabolisme cellulaire pour produire de l' H_2 semble donc *a priori* quelque chose de contradictoire au fonctionnement métabolique classiquement connu. En effet, ceci conduit à dévier le métabolisme de la production de cofacteurs réduits vers la production d' H_2 . Or, la production d' H_2 résulte d'un fonctionnement de sauvegarde, ou encore de « débordement », avec la fonction d'« évacuer » le pouvoir réducteur produit en excès, ou de permettre le fonctionnement métabolique dans des conditions dégradées, tel que la carence d'un substrat, l'épuisement de substances de réserve, etc.

De façon plus précise, la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, dont la capacité à produire de l' H_2 a été démontrée (Melis, 2007 ; Esquivel, 2011 ; Antal, 2009), est amenée à se retrouver dans deux états de fonctionnement très différents : un état de fonctionnement

« classique » avec utilisation du pouvoir réducteur produit par la photosynthèse pour assurer la production de composants cellulaires (biomasse) et la synthèse de substances de réserve (amidon) ; un état de fonctionnement « décalé » dans une situation de carence où l'amidon accumulé en réserve est utilisé, ce qui conduit à l'utilisation du pouvoir réducteur pour la production d' H_2 .

D'un point de vue de la mise en œuvre réalisée au laboratoire du GePEA (Thèse Camille Lemasson, 2015), dans un bioprocédé de production d' H_2 par *Chlamydomonas reinhardtii*, la conception de réacteurs bi-étagés permet d'obtenir dans un premier temps, une accumulation de la biomasse et une mise en réserve d'amidon intracellulaire, puis une stabilisation de la biomasse entraînant une dégradation de l'amidon. Cette seconde phase est l'origine de la production de dihydrogène. Elle semble être effective grâce à une diminution de la lumière incidente, ainsi qu'une mise en anoxie, accompagnée d'une carence en azote dans le milieu de culture (Figure 34).

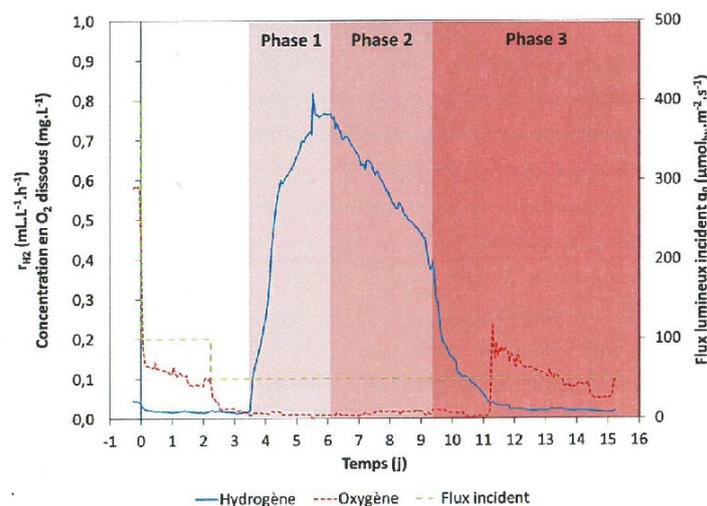


Figure 34 : Production de dihydrogène par une culture de *Chlamydomonas reinhardtii* enrichie en amidon (Lemasson, 2015)

Quelle que soit la situation, on conçoit qu'une analyse en terme de modèle structuré de l'énergétique cellulaire est essentielle pour comprendre de façon approfondie le fonctionnement des régulations et prévoir les orientations métaboliques en fonction des conditions appliquées en bioréacteur, que ce soit en disponibilité d'énergie lumineuse, en terme de qualité et de quantité des substrats, en disponibilité des substances de réserve et en capacité métabolique (expression génétique) à dévier le métabolisme vers la production d' H_2 . Une modélisation de la production d' H_2 par *Chlamydomonas reinhardtii* passe donc par l'expression de la connaissance de l'énergétique cellulaire et par une analyse mécanistique.

C'est à cette condition qu'on peut espérer lier le fonctionnement cellulaire à des aspects de conduite et de contrôle d'un ensemble de bioréacteurs.

1.1.1 Modèle stœchiométrique macroscopique

Ainsi, le premier modèle structuré du fonctionnement de *Chlamydomonas reinhardtii* peut se résumer à deux modes de fonctionnement découplés :

- la synthèse de constituants cellulaires accompagnée de la synthèse de substances de réserve : l'amidon ;
- la dégradation des substances de réserve dans une situation de carence.

La production d'oxygène résulte du fonctionnement du métabolisme énergétique cellulaire et s'accompagne de la production de cofacteurs réduits ; la production d'H₂ résulte de situations de débordement du pouvoir réducteur avec une déviation de cet excès vers l'hydrogénase de la microalgue.

D'un point de vue stœchiométrique, la biomasse de *Chlamydomonas reinhardtii* est constituée de deux fractions. La première est une biomasse catalytique ; la seconde est une fraction de réserve. Cette dernière correspond à l'accumulation de l'amidon, polysaccharides de réserve correspondant à 300 unités glucose en moyenne.

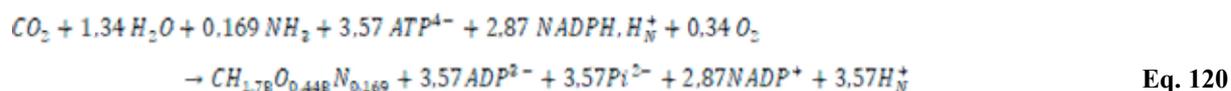
Il est nécessaire de définir, par une analyse mécanistique, un modèle stœchiométrique qui prend en compte ces « évènements » métaboliques principaux en introduisant dans la vision stœchiométrique les bilans en cofacteurs réduits et oxydés ainsi que les productions et consommations en adénosine triphosphate (ATP) et en adénosine diphosphate (ADP). Une approche plus poussée revient à décomposer de façon plus détaillée le métabolisme cellulaire en un ensemble de réactions élémentaires constitutives du métabolisme, ce qui fournit une vision détaillée du fonctionnement métabolique.

Enfin, la vision la plus élaborée consiste, non seulement, à décomposer le fonctionnement cellulaire en un ensemble de réactions métaboliques constitutives, mais également à tenir compte de la compartimentation cellulaire.

1.1.2 Synthèse de constituants cellulaires et synthèse d'amidon

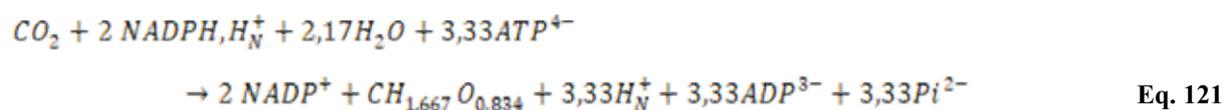
Dans cette première approche, on utilise la composition élémentaire globale de la biomasse catalytique, qui est CH_{1,78}O_{0,448}N_{0,169}. Cette formule élémentaire de la biomasse a été établie par Martzloff (2013) pour une culture de *Chlamydomonas reinhardtii* en croissance

autotrophe sans limitation par la source d'azote. L'équation de la synthèse de la biomasse est écrite en supposant qu'il y a un nombre fixé de moles de cofacteurs nécessaires à la croissance. Le nombre de moles de cofacteurs $NADPH, H^+$ et le nombre de moles d'ATP par mole de carbone incorporé dans les constituants cellulaires a été déterminé en reprenant les travaux de Cornet (1992). Ceci permet de présenter la structure des calculs qui suivent. C'est une donnée indispensable à ce stade. Seule l'écriture complète de toutes les équations de biosynthèse des constituants cellulaires (précurseurs, acides aminés, protéines, lipides, hydrates de carbone, acides nucléiques) permet de déterminer l'équation et les mécanismes de synthèse des éléments de la biomasse de façon plus détaillée. Nous ne considérerons pas cette vision détaillée du métabolisme cellulaire associé à la croissance. L'équation suivante, établie à partir des bilans en cofacteurs réduits et en ATP pour les différentes voies de synthèse des précurseurs cellulaires, tient compte des différents bilans sur les voies métaboliques :



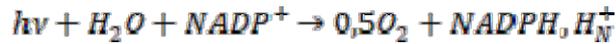
De façon artificielle, cette équation stœchiométrique fait apparaître une consommation d'oxygène, ce qui est normal dans la mesure où la production des cofacteurs réduits pour la croissance doit être associée à la réaction de photolyse de l'eau qui conduit nécessairement à la production d'oxygène. Le point important est que le rapport $P/2e^-$ vaut $3,57 / 2,87 = 1,24$ qui est une valeur relativement faible, caractéristique de la croissance cellulaire. Dans le cas de cette équation, la compartimentation est considérée. En effet, dans chaque compartiment de la cellule (chloroplaste ou mitochondrie), il existe deux phases : une phase négative, notée N, et une phase positive, notée P. Ces deux phases sont définies par leur pH et leur potentiel d'oxydoréduction. Dans le cas du chloroplaste (Figure 4, chapitre 1), les 2 phases sont présentes. La phase P correspond au lumen (pH = 4), lieu de l'accumulation de l'amidon, et la phase N correspond au stroma (pH = 7,5).

L'équation de la synthèse de l'amidon s'écrit :



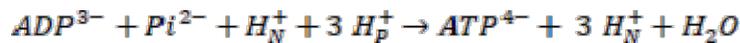
Ici la synthèse de l'amidon, avec cette écriture utilisant les cofacteurs réduits et l'ATP, ne fait pas apparaître de consommation, ni de production d'oxygène. Le rapport $P/2e^-$ est de 1,67 ce qui est plus élevé que pour la synthèse des constituants cellulaires.

La synthèse de constituants cellulaires et celle de l'amidon sont couplées à la photolyse de l'eau (nécessitant un apport énergétique lumineux) et à la production d'oxygène :



Eq. 122

Lorsqu'on couple cette équation de synthèse des cofacteurs réduits avec l'équation de synthèse de la biomasse, la production d'oxygène devient positive et égale à $2,87 / 2 - 0,34 = 1,09$ moles d' O_2 par C-mole de biomasse. Lorsqu'on couple cette équation avec la synthèse d'amidon, on obtient une production nette d'oxygène qui vaut 1 mole O_2 / C-mole d'amidon. Cette équation est couplée à la production d'ATP :



Eq. 123

Nous avons ici privilégié une écriture des stœchiométries en introduisant les charges effectives des composés intermédiaires (ATP^{4-} , ADP^{3-} , Pi^{2-} , $NADP^+$, $NADPH, H_N^+$) sachant que ce n'est pas indispensable à ce stade mais que ceci sera utile par la suite.

Ces quatre équations stœchiométriques définissent un schéma classique de photosynthèse avec une production de la biomasse, accompagnée d'une accumulation de molécules de réserve, à savoir l'amidon. De façon globale, cette analyse stœchiométrique indique que le métabolisme photosynthétique peut varier dans un intervalle de $P/2e^-$ compris entre 1,24 (synthèse de constituants cellulaires) et 1,67 (synthèse de métabolites de réserve comme l'amidon) et que la production d'oxygène est comprise entre 1 et 1,1 mole d' O_2 par mole de CO_2 fixée. Dans le cadre de l'étude du métabolisme de *Chlamydomonas reinhardtii*, il est nécessaire de prendre en compte deux aspects complémentaires importants : le métabolisme respiratoire, c'est-à-dire la production de biomasse associée à la respiration, ou encore la mobilisation des métabolites de réserve par oxydation, et l'effet de la limitation en azote.

L'ensemble des réactions chloroplastiques et mitochondriales utilise les réactions répertoriées, dans le travail de thèse de Sasidharan (2012). L'aspect important du modèle de croissance et de synthèse d'amidon consiste à déterminer la proportion de carbone déviée vers l'accumulation d'amidon. Il est connu, et a été démontré, que cette accumulation est accentuée par la carence azotée (Martzolff, 2013 ; Lemasson, 2015), l'amidon représentant jusqu'à 40% du poids sec de biomasse obtenue (Figure 35) en mode continu et en limitation par l'azote. L'autre aspect consiste à caractériser le couplage entre la production de cofacteurs réduits et la production d'ATP. D'un point de vue cinétique, il semble que la constitution primaire de la biomasse ne soit pas affectée par la carence, mais que seule la mise en réserve soit impactée (Figure 35 et Figure 36).

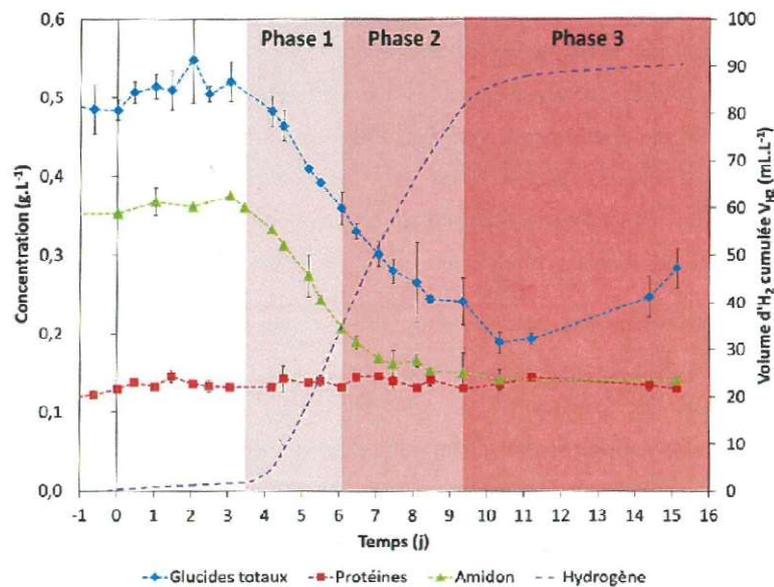


Figure 35: Suivi de la composition de la biomasse durant la production d'H₂ pour une culture enrichie en amidon (Lemasson, 2015)

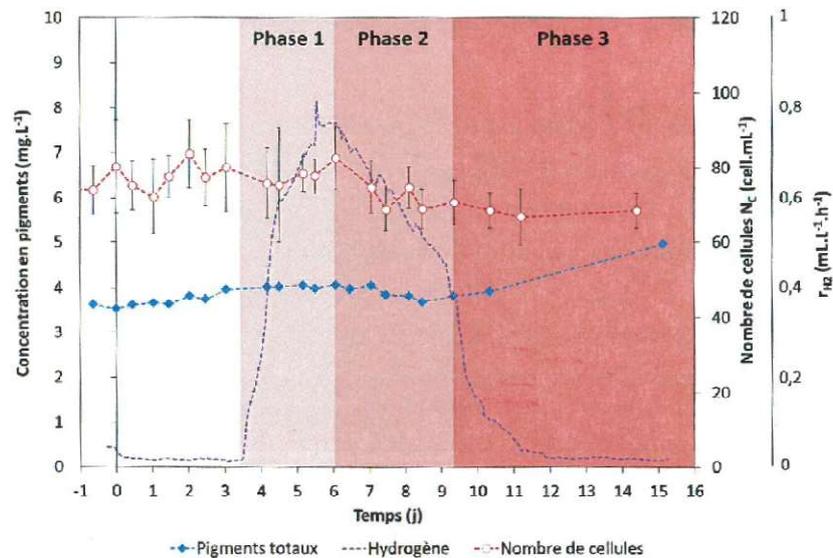


Figure 36: Evolution de la biomasse et du contenu cellulaire durant la production d'H₂ pour une culture enrichie en amidon (Lemasson, 2015)

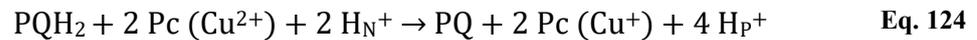
1.1.3 Dégradation de l'amidon et production d'hydrogène

En limitation par la lumière et en culture en continu, la carence en azote et la dégradation d'amidon conduisent à stabiliser la biomasse et à produire du dihydrogène. Il semble également que le procédé ait un impact sur certaines protéines, à savoir sur les pigments tels que la chlorophylle située au niveau de la paroi des thylakoïdes du chloroplaste. Par ailleurs, il n'y a pas d'équation a priori aussi simple que précédemment pour décomposer le processus de mobilisation de l'amidon, sachant que les produits de dégradation sont multiples : hydrogène,

éthanol, acétate, formate, etc. Néanmoins, nous limiterons cette étude au mécanisme de production d'hydrogène qui est induit, en mode de culture en continu, par une réduction du flux lumineux, ce qui entraîne une diminution de l'oxygène dissous dans le milieu consécutive à la diminution de la vitesse de production d'O₂, et à une limitation par la source d'azote.

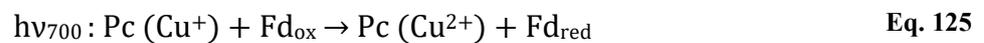
Afin de comprendre ce système, il est indispensable de démontrer la « boîte » métabolique pour permettre l'accès aux rendements de conversion. En résumé, pour les voies de dégradation qui semblent être activées en situation de carence, il est nécessaire d'aller plus en profondeur sur le métabolisme énergétique afin de développer un mode de compréhension plus approfondi. Nous récapitulons ci-après les réactions principales.

La production d'hydrogène a lieu dans le stroma du chloroplaste à partir de ferrédoxine réduite. La réaction au niveau du cytochrome *b6f* s'écrit (Sasidharan, 2014) :



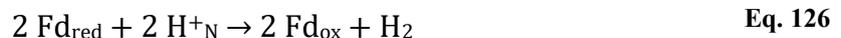
$$\Delta G_{\text{physio}} = - 2,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

La plastocyanine réduite, produite $\text{Pc}(\text{Cu}^+)$, permet alors la production de la ferrédoxine réduite par cette réaction, à l'aide d'énergie lumineuse à 700 nm de longueur d'onde :



$$\Delta G_{\text{m},7} = - 91,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

La production de ferrédoxine réduite est le point de départ de la production d'hydrogène. C'est à ce point que s'effectue la bifurcation, via une enzyme type hydrogénase, appelée HYDA1. Cette réaction s'écrit :



Par définition de l'origine des potentiels, l'équation $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ possède un $\Delta G_{\text{m}} = 0$ à $\text{pH} = 0$ à 1 atm de pression partielle d'H₂. Avec une pression partielle d'H₂ de 1 atm et à pH 7, on obtient :

$$\Delta G_{\text{m},\text{pH}=0} = \Delta G_{\text{m},7} + 2 \text{RT} \ln 10^{(7-0)}$$

$$\text{Soit } \Delta G_{\text{m},7} = 2 \text{RT} \ln 10^7 = 79,91 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

A la pression partielle d'H₂, notée P_{H2} (où P_{H2} est exprimé en atm), on obtient :

$$\Delta G_{m,7} = RT(2 \ln 10^{-7} + \ln(P_{H_2}))$$

Pour une pression partielle de 0,01 atm cela conduit à :

$$\Delta G_{m,7} = 68,50 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

En résumé, la réaction d'hydrogénation possède les caractéristiques suivantes que l'on peut aussi exprimer en termes de potentiel électrique :



$$\Delta G_{m,7} = 68,50 \text{ kJ.mol}^{-1} \quad E_{m,7} = - \Delta G_{m,7} / (2 \times 96,484) = - 355 \text{ mV}$$

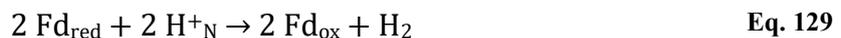
Bien entendu les valeurs de $\Delta G_{m,7}$ et $E_{m,7}$ varient en fonction du pH et de la pression partielle en H_2 .

La réaction de réduction de Fd_{ox} s'écrit :



$$E_{m,7} = - 450 \text{ mV}; \Delta G_{m,7} = 43,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

Dans les conditions de pression partielle en H_2 testées, la réaction de production de H_2 est plus électropositive. Cette réaction fonctionne donc dans le sens de la réduction et, globalement, la ferrédoxine est oxydée. On obtient la réaction globale suivante :



$$\Delta G_{m,7} = - 2 \times 43,4 + 68,50 = - 18,30 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

$$\Delta G_{m,7,5} = - 2 \times 43,4 + RT(2 \ln 10^{-7,5} + \ln P_{H_2}) = - 12,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

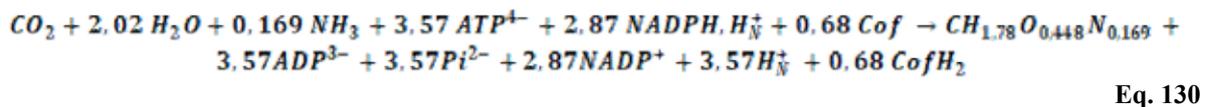
La production d' H_2 est donc possible par cette voie, bien que le $\Delta G_{m,7,5}$ ne soit pas suffisamment négatif pour que l'on ignore complètement les effets de la limitation par l'hydrogénase par un contrôle cinétique ou, encore, le fait que l'hypothèse de concentrations inégales en Fd_{red} et Fd_{ox} puisse jouer un rôle.

1.2 Intégration du rôle de l'hydrogénase dans le schéma métabolique de la photosynthèse

A ce stade du développement, nous avons montré que la ré-oxydation de la ferrédoxine dans les conditions du stroma (Phase N ; pH=7,5) par l'hydrogénase était thermodynamiquement possible (Eq. 10). Pour établir, au moins dans le principe, pourquoi cette réaction prend le pas sur les réactions de la photosynthèse, et en particulier sur la production d'amidon, lors d'une limitation en azote, il faut décomposer le fonctionnement métabolique de façon plus détaillée que nous l'avons fait jusqu'ici, au moins pour tout ce qui concerne le fonctionnement du chloroplaste, sachant que nous cherchons à représenter la bascule métabolique qui conduit à la production d'hydrogène.

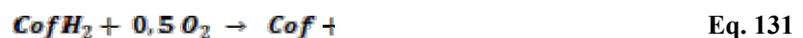
1.2.1 Equations de synthèse de la biomasse et de dégradation de l'amidon

La première chose est de revoir l'équation de synthèse de biomasse (Eq. 120) qui fait intervenir une consommation d'oxygène ce qui n'est pas suffisamment détaillé d'un point de vue mécanistique. Dans la mesure où le mécanisme de respiration mitochondriale est opérationnel chez *Chlamydomonas reinhardtii*, on peut réécrire l'équation de croissance cellulaire en faisant intervenir les cofacteurs NAD^+ et FAD qui sont nécessaires à la croissance et dont on sait que le potentiel d'oxydoréduction ne s'échange pas avec les cofacteurs $NADP^+$ qui sont internes au stroma et ne s'échangent pas avec le cytoplasme cellulaire. Sans considérer le détail des mécanismes de synthèse, on peut donc écrire :



Eq. 130

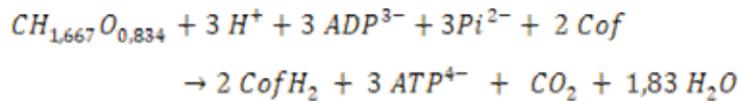
Cette équation est couplée avec la réaction de respiration mitochondriale (ré-oxydation des cofacteurs) écrite de façon synthétique sous la forme :



Eq. 131

Bien entendu, la somme des équations 130 et 131 est identique à l'équation 120.

De la même façon, en situation d'anoxie (ou d'oxygène dissous limitant), on constate une mobilisation des réserves, c'est-à-dire de dégradation de l'amidon. Sans entrer dans le détail du mécanisme de dégradation, et en considérant que l'oxydation est complète, on peut considérer que l'amidon est dégradé en glucose qui est ensuite oxydé suivant la glycolyse et le cycle de Krebs. La stœchiométrie de dégradation est donc la suivante :



Eq. 132

Dans la dernière équation (Eq. 132) nous avons considéré la phosphorylation liée au substrat mais nous n'incluons pas la phosphorylation oxydative liée à la ré-oxydation des cofacteurs. La quantité d'ATP produite par cette voie est donc considérée comme de l'ATP consommé pour la maintenance.

1.2.2 Equations détaillées du fonctionnement du chloroplaste en croissance cellulaire avec synthèse d'amidon

Nous nous basons sur le travail réalisé au laboratoire par Swathy Sasidharan (2012) pour la décomposition des différentes étapes de fonctionnement de la chaîne de transfert d'électrons dans le chloroplaste et pour l'analyse des différences d'enthalpie libre à chaque étape de la chaîne de transfert d'électrons, l'objectif étant d'aboutir à un schéma cohérent du fonctionnement du chloroplaste dans les conditions de croissance et de stockage de l'amidon. Nous prenons pour l'instant en compte les valeurs tabulées des enthalpies libres de formation.

Le schéma général et de principe qui repose sur le fonctionnement des deux photosystèmes est représenté sur la Figure 37. L'ensemble des réactions est reporté dans les tableaux 6 à 9, sachant que la description mécanistique détaillée figure dans la thèse de Sasidharan (2012). Par rapport, à ce document, nous avons révisé certaines valeurs, notamment en ce qui concerne le potentiel chimique du photon, en prenant en compte les développements qui ont présentés dans la partie bibliographie de ce mémoire (paragraphe 5.4) pour calculer le potentiel chimique du photon en fonction de son énergie (facteur 0,788).

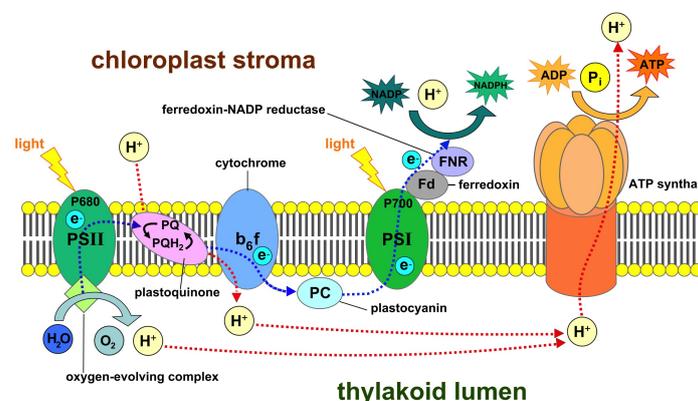


Figure 37 : Schéma de principe du fonctionnement du chloroplaste [12]

Tableau 6 : Étapes métaboliques impliquées dans le fonctionnement du PSII et dans le pool de plastoquinol dans les conditions physiologiques: stroma $\text{pH}_N=7.5$; lumen $\text{pH}_P=4$; $P_{O_2}=0,21$ atm ; $T=298$ K

Eq.	Réaction élémentaire	$\Delta G_{m,7}$ (kJ/mol)	ΔG_{physio} (kJ/mol)	$E_{m,7}$ (mV)	$E_{m,4}$ (mV)	$E_{m,7.5}$ (mV)
PSII-1	Hv_{680}	138,6	138,6			
PSII-2	$\text{P}_{680}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{P}_{680}$	-125,4	-125,4	1 300	1 300	
PSII-3	$\text{hv}_{680} \rightarrow \text{P}_{680}^+ + \text{e}^-$	-13,2	-13,2			
PSII-4	$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2 \text{e}^- + 2 \text{H}_P^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	-154,4	-188,6	800	978	
PSII-5	$2 \text{P}_{680}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{P}_{680} + 2 \text{H}_P^+ + \frac{1}{2} \text{O}_2$	-96,5	-62,2			
PSII-6	$2 \text{hv}_{680}: \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{H}_P^+ + \frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{e}^-$		-88,6			450
PSII-7	$\text{PQ} + 2 \text{e}^- + 2 \text{H}_N^+ \rightarrow \text{PQH}_2$	0	5,7	0		- 30
PSII-8	$\text{PQ} + 2 \text{e}^- + 2 \text{H}_P^+ \rightarrow \text{PQH}_2$	0	-34,2	0	177	
Global:						
PSII-9	$2 \text{hv}_{680}: \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}_N^+ + \text{PQ} \rightarrow \text{PQH}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 + 2 \text{H}_P^+$		-82,9			

Pour le PSII, ces calculs indiquent que l'oxydation du cytochrome P_{680} (PSII-3) s'effectue dans des conditions assez proches de l'équilibre thermodynamique, indiquant une efficacité thermodynamique globale entre la capture du photon et la production de P_{680}^+ d'au moins 90 %. On remarque que la production d'oxygène dans le lumen est associée directement au fonctionnement du PSII (Equation globale PSII-9 et couple redox PSII-4).

Tableau 7 : Étapes métaboliques impliquées dans le fonctionnement du photosystème 1 dans les conditions physiologiques : stroma $\text{pH}_N = 7.5$; lumen $\text{pH}_P = 4$

Eq.	Réactions élémentaires	$\Delta G_{m,7}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{m,7.5}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{m,4}$ (kJ/mol)	$E_{m,4}$ (mV)	$E_{m,7}$ (mV)
B6f-1	$\text{PQ} + 2 \text{e}^- + 2 \text{H}_N^+ \rightarrow \text{PQH}_2$	0	5,7			0
B6f-2	$\text{PQ} + 2 \text{e}^- + 2 \text{H}_P^+ \rightarrow \text{PQH}_2$			- 34,2	177	
B6f-3	$\text{PQ} + 2 \text{e}^- + 4 \text{H}_P^+ \rightarrow \text{PQH}_2 + 2 \text{H}_N^+$	-74,2*				
B6f-4	$2 \text{Pc} (\text{Cu}^{2+}) + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{Pc} (\text{Cu}^+)$	-71,4				370
Global:						
B6f-5	$\text{PQH}_2 + 2 \text{Pc} (\text{Cu}^{2+}) + 2 \text{H}_N^+ \rightarrow \text{PQ} + 2 \text{Pc} (\text{Cu}^+) + 4 \text{H}_P^+$	-2,8*				

On constate que le pompage d'ions H^+ vers le lumen s'effectue dans des conditions proches de l'équilibre thermodynamique (réaction P6f-5), à condition de considérer qu'il est associé à l'oxydation du pool de plastoquinones et à la réduction de la phycocyanine.

Tableau 8 : Étapes métaboliques impliquées dans le fonctionnement du cytochrome B6f dans les conditions physiologiques : stroma pH_N = 7,5; lumen pH_P = 4

Eq.	Réactions élémentaires	$\Delta G_{m,7}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{m,4}$ (kJ/mol)	$E_{m,4}$ (mV)	$E_{m,7}$ (mV)
PSI-1	$h\nu_{700}$	141,8			
PSI-2	$P_{700}^+ + e^- \rightarrow P_{700}$	- 43,4			450
PSI-3	$h\nu_{700}: P_{700} \rightarrow P_{700}^+ + e^-$	- 98,4			1 019
PSI-4	$Pc (Cu^{2+}) + e^- \rightarrow Pc (Cu^+)$	- 35,7			370
PSI-5	$h\nu_{700}: Pc (Cu^+) \rightarrow Pc (Cu^{2+}) + e^-$	-62,6			649
PSI-6	$Fd_{ox} + e^- \rightarrow Fd_{red}$	43,4			- 450
PSI-8	Global:				
	$h\nu_{700}: Pc (Cu^+) + Fd_{ox} \rightarrow Pc (Cu^{2+}) + Fd_{red}$	-19,2			
PSI-10	Global:				
	$2 Fd_{red} + PQ + 2 H_p \rightarrow 2 Fd_{ox} + PQH_2$	- 86,8	-121*		

Le dernier tableau concerne les étapes terminales de la chaîne de transfert d'électrons et de la synthèse d'ATP. On peut résumer ces étapes par les équations suivantes :

Tableau 9 : Étapes métaboliques impliquées dans les étapes terminales de la chaîne de transfert d'électrons et la synthèse d'ATP : stroma pH_N = 7,5; lumen pH_P = 4

Eq.	Réactions élémentaires	$\Delta G_{m,7}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{m,7.5}$ (kJ/mol)	$E_{m,7}$ (mV)	$E_{m,7.5}$ (mV)
T-1	$Fd_{ox} + e^- \rightarrow Fd_{red}$	43,4		- 450	
T-2	$2 H_N^+ + 2e^- + NADP^+ \rightarrow NADPH, H_N^+$	61,7		- 320	
	Global:				
T-3	$2 Fd_{red} + 2 H_N^+ + NADP^+ \rightarrow 2 Fd_{ox} + NADPH, H_N^+$	-25,1	-19,4*		
T-4	$H_N^+ + ADP^{3-} + Pi^{2-} \rightarrow ATP^4 + H_2O$	32,5	35,4		
	Global:				
T-5	$3 H_P^+ + H_N^+ + ADP^{3-} + Pi^{2-} \rightarrow 3 H_N^+ + ATP^4 + H_2O$		- 24,5*		

1.2.3 Calcul des rapports de vitesse et résolution équations détaillées

À partir des détails mécanistiques précédents, nous avons construit une matrice métabolique simplifiée sur le plan du métabolisme de croissance et de synthèse d'amidon et détaillée sur le modèle réactionnel mécanistique des réactions de transfert d'énergie lumineuse dans le chloroplaste. Ce modèle réactionnel est présenté dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Tableau de synthèse des réactions considérées dans le calcul pour la croissance cellulaire

Eq.	Réactions métaboliques	$\Delta G_{m,7}$ (kJ/mol)
R1	$CO_2 + 2,02 H_2O + 0,169 NH_3 + 3,57 ATP^{4-} + 2,87 NADPH, H_N^+ + 0,68 Cof$ $\rightarrow CH_{1,78}O_{0,448}N_{0,169} + 3,57ADP^{3-} + 3,57Pi^{2-} + 2,87NADP^+ + 3,57H_N^+ + 0,68$	
R2	$O_2 + 2 NADPH, H_N^+ + 2,17H_2O + 3,33ATP^{4-}$ $\rightarrow 2 NADP^+ + CH_{1,667}O_{0,834} + 3,33H_N^+ + 3,33ADP^{3-} + 3,33Pi^{2-}$	
R3	$CofH_2 + 1/2 O_2 \rightarrow Cof + H_2O$	
R4	$2 hv_{\square\square\square}: H_2O + 2 H_N^+ + PQ \rightarrow PQH_2 + 1/2 O_2 + 2 H_p^+$	-82,9
R5	$PQH_2 + 2 Pc (Cu^{2+}) + 2 H_N^+ \rightarrow PQ + 2 Pc (Cu^+) + 4 H_p^+$	-2,8*
R6	$hv_{700}: Pc (Cu^+) + Fd_{ox} \rightarrow Pc (Cu^{2+}) + Fd_{red}$	-19,2
R7	$2 Fd_{red} + PQ + 2 H_p^+ \rightarrow 2 Fd_{ox} + PQH_2$	-121*
R8	$2 Fd_{red} + 2 H_N^+ + NADP^+ \rightarrow 2 Fd_{ox} + NADPH, H_N^+$	-19,4*
R9	$3 H_p^+ + H_N^+ + ADP^{3-} + Pi^{2-} \rightarrow 3 H_N^+ + ATP^{4-} + H_2O$	-25,1

Nous avons ensuite utilisé la méthode générale présentée dans le chapitre 1 (paragraphe 4.1 et 4.2) pour le calcul des flux métaboliques. Pour établir la liste des 9 réactions du Tableau 10, nous avons déjà aggloméré certaines séquences réactionnelles qui ne présentaient pas de branchements ou de bifurcation, de façon à minimiser la complexité et la dimension du système. En utilisant la nomenclature du chapitre 1, cet ensemble de réactions fait apparaître :

- 6 composés échangeables : CO_2 , O_2 , H_2O , NH_3 , $CH_{1,78}O_{0,448}N_{0,169}$ (biomasse), $CH_{1,667}O_{0,834}$ (amidon). Dans le même groupe il faut ajouter les photons hv_{680} et hv_{700} qui alimentent les photosystèmes II et I respectivement. Les composés échangeables sont, par définition, échangés avec le milieu extérieur.
- 15 composés non échangeables : ATP , ADP , Pi , H_N , H_p , Cof , $CofH_2$, $NADPH_2$, $NADP$, PQ , PQH_2 , $Pc(Cu^+)$, $Pc(Cu^{2+})$, Fd_{ox} , Fd_{red} . Par définition, ces composés ne sont pas globalement produits ou consommés par le métabolisme (voir chapitre 1).
- L'ensemble des stœchiométries du tableau 5 fait implicitement intervenir 12 bilans de conservation sur les éléments et les pseudo-éléments suivants : C, H, O, N, Adénine, Pi, Cof, NADP, PQ, Pc, Fd et le bilan sur les charges

Pour résumer, la dimension du système à résoudre est la suivante :

- 9 inconnues doivent être calculées (les 9 vitesses des réactions du Tableau 10) ;
- 21 (= 15 + 6) équations correspondent aux bilans sur les composés ;
- Dans les 21 équations de bilan précédentes, il y a 12 colinéarités induites par les conservations stœchiométriques ; la conséquence est que seules 9 équations sont linéairement indépendantes.
- Le choix de ces 9 équations parmi les 21 équations possibles doit respecter les règles qui ont été énoncées au chapitre 1 (paragraphe 4.2). En particulier, il faut que les 9 équations retenues soient linéairement indépendantes et il faut qu'on soit en mesure de fixer une valeur correspondant au métabolite considéré dans le vecteur A_{ES} qui désigne le vecteur des entrées / sorties de la cellule. Il faut aussi que l'on y inclue tous les intermédiaires métaboliques linéairement indépendants, de façon prendre en compte leur non-accumulation dans la cellule.
- Il faut prendre en compte au moins une équation sur un échangeable pour qu'il y ait au moins un élément non nul dans le vecteur A_{ES} .

Après différents essais, nous avons faits les choix suivants :

- La vitesse de réaction R4 est fixée. Elle correspond au fonctionnement du PSII et à l'entrée de 2 moles de photons $h\nu_{680}$. Tous les résultats suivants sont donc exprimés par mole de photon $h\nu_{680}$.
- Nous avons choisi de conserver dans la matrice à inverser les 7 métabolites intermédiaires suivants : ATP, H_p , Cof, NADPH₂, PQH₂, Pc(Cu⁺), Fd_{red}. On remarque que, comme il y a 15 métabolites intermédiaires et 8 pseudo-éléments qui concernent uniquement ces métabolites, le nombre d'équations indépendantes qui concerne les intermédiaires métaboliques qui ne sont pas accumulés dans la cellule est de 15 - 8 = 7 équations. C'est donc le nombre exact de relations de conservation des intermédiaires qui doit être choisi.
- Pour la dernière relation, il y a plusieurs choix possibles. Le choix le plus clair consiste à fixer le rapport $P/2e^-$, qui correspond au rapport R9/R8 et dont on a vu qu'il pilotait le rapport des vitesses de synthèse de la biomasse et de l'amidon, c'est-à-dire au final la proportion d'amidon dans la biomasse.

- Enfin, on attend de la simulation que les vitesses trouvées soient conformes au sens thermodynamique, c'est-à-dire des vitesses positives si ΔG est négatif.

Avec ces hypothèses, on constate que le calcul des vitesses métaboliques est effectivement possible : la matrice des stœchiométries, notée C au paragraphe 4.2 du chapitre 1, est inversible. : $J = C^{-1}C_{ES}$. Par contre, quelle que soit la valeur du rapport $P/2e^-$ imposé le flux de la réaction R7 est négatif, ce qui est impossible avec $\Delta G = -121 \text{ kJ.mole}^{-1}$. La réaction R7 ne peut pas fonctionner dans le sens endergonique. Il est donc nécessaire de considérer que cette réaction n'est pas fonctionnelle dans les conditions de croissance et de production d'amidon de *Chlamydomonas reinhardtii*. Ceci n'est d'ailleurs pas surprenant car l'hypothèse de fonctionnement de la réaction R7 correspond à une ré-oxydation de la ferrédoxine qui tient lieu de court-circuit dans le fonctionnement du Q-cycle et à un fonctionnement dégradé du cytochrome *b6f* (Sasidharan, 2012) et donc de la chaîne de transfert d'électrons.

Nous ne retenons donc pas l'hypothèse de la fonctionnalité de la réaction, R7 et nous modifions la matrice des contraintes en imposant le flux de la réaction R7 à 0 au lieu d'imposer la valeur de $P/2e^-$. Dans cette nouvelle configuration, le système reste inversible mais le calcul des flux fournit des valeurs négatives de la croissance cellulaire. Nous avons donc cherché à modifier le système métabolique de façon à aboutir à des valeurs cohérentes des flux.

Une modification très simple consiste à considérer que le couplage entre le flux de protons au travers de la membrane chloroplastique n'est pas parfait, c'est-à-dire que la réaction de synthèse de l'ATP par l'ATPase F0-F1 (réaction R9) utilise une stœchiométrie d'utilisation des protons différentes, tel que :



Nous définissons le rapport de couplage comme le rapport :

$$\rho = \frac{3}{n}$$

Par définition, pour un couplage non parfait (non stœchiométrique), ρ est inférieur à 1. Les résultats des simulations sont donnés dans le Tableau 11. Le point intéressant est que lorsqu'on fixe le rapport ρ , on obtient les valeurs de tous les flux, y compris le $P/2e^-$ et la fraction f d'amidon qui compose la biomasse synthétisée.

Tableau 11: Tableau de synthèse de calcul des flux en fonction du rendement de l'ATPase pour la croissance cellulaire et la production d'amidon.

ρ	$Hv_{680} + hv_{700}$	f (% masse)	P/e^-	Y_{O_2X} $O_2/C\text{-mole } X$	R1 (C-mole X)	R5
0,622	4	0	1,244	1,10	0,348	1
0,63	4	6,2	1,26	1,15	0,335	1
0,64	4	13,4	1,28	1,23	0,318	1
0,65	4	20,4	1,30	1,31	0,302	1
0,66	4	26,8	1,32	1,41	0,285	1
0,68	4	38,8	1,36	1,64	0,252	1
0,70	4	49,5	1,40	1,94	0,219	1
0,72	4	59,2	1,44	2,34	0,186	1

On constate que la cartographie des flux est très sensible au rapport ρ et qu'il existe une plage de valeurs réalistes relativement étroite (de 0,622 à 0,75). Ce rapport est directement lié au $P/2e^-$ et à la fraction d'amidon synthétisée.

On constate également que lorsqu'on fixe la vitesse d'entrée sur le PSII avec 2 photons hv_{680} , on impose de facto la vitesse d'entrée sur le PSI et la vitesse de la réaction R5.

Pour aller plus loin et coupler la vitesse d'entrée sur le PSII, c'est-à-dire le transfert de photons et déterminer de façon théorique le rapport ρ , il est nécessaire d'écrire les relations de couplage thermocinétiques entre la vitesse et le couplage du transfert d' H^+ au travers de la membrane du chloroplaste, c'est-à-dire le fonctionnement de l'ATPase F0-F1. Nous ne développons pas en détail ces relations de couplage qui nécessitent une étude très spécifique. Nous proposons ici une analyse en tendance. Nous remarquons les faits suivants:

- L'analyse de couplages permet de donner une structuration encore plus forte au modèle, puisqu'on détermine, via le transfert d'énergie lumineuse et le couplage énergétique, non seulement les vitesses de synthèse mais également les rendements de conversion.
- Les calculs du rapport des forces thermodynamiques qui caractérise le couplage entre le transfert des ions H^+ et la synthèse d'ATP est tout à fait conforme aux calculs théoriques réalisés par Dussap (1988). En effet la variation d'enthalpie libre pour la synthèse d'ADP est de $-32,5$ kJ/mole à 25°C et pH 7,5 et pour des molalités égales à

1 pour tous les solutés de la réaction (ADP, ATP et Pi) (Ould Moulaye, 1998). La variation de potentiel chimique des ions H^+ est de 20 kJ/mole pour un gradient de 3,5 unités pH. Le rapport des forces thermodynamiques est donné par (Dussap, 1988) :

$$x = Z \frac{A_P}{A_{H^+}} = \frac{q}{3} \frac{A_P}{A_{H^+}} \quad Z = \frac{q}{3}$$

Le facteur 3 désigne le coefficient stœchiométrique dans la réaction R9. Le facteur q est le coefficient de couplage. Si l'on considère que le couplage s'effectue dans des conditions optimales de minimisation de la vitesse de production d'entropie, le coefficient de couplage est $q = 0,910$ (Dussap, 1988). La valeur de x vaut donc : - 0,493. Mais lorsqu'on considère que la molalité de l'ATP est 7,5 fois supérieure à celle de l'ADP et de Pi, la variation d'enthalpie libre pour la synthèse d'ADP devient égale à - 42,5 kJ/mole. Ce rapport de 7,5 pour les molalités de l'ATP et de l'ADP est tout à fait conforme à ce qui est connu des conditions physiologiques pour la plupart des espèces vivantes. Dans ces conditions, le rapport des forces devient égal à - 0,644 ce qui est exactement la valeur calculée par Dussap (1988). Dans ces conditions d'optimalité, le calcul théorique du rapport ρ vaut $-xq$, soit 0,586 ($J_P/J_H = 1/n = \rho/3 = -xZ$). Cette valeur (complètement théorique) est légèrement inférieure à la plus faible valeur possible indiquée dans le tableau précédent (0,622) mais ceci indique que la théorie est en excellent accord avec la simulation des flux en croissance optimale, c'est-à-dire sans synthèse d'amidon. Il suffit par exemple de modifier légèrement l'équation de croissance cellulaire, en admettant un $P/2e^-$ légèrement inférieur dans l'équation 130 pour que la valeur minimale de ρ devienne rigoureusement égale à 0,586 au lieu de 0,622.

- Lorsque le flux de photons devient trop important pour la seule croissance cellulaire de la biomasse active, soit qu'il y ait un éclairage puissant, soit que la croissance cellulaire soit en limitation, la vitesse de transfert des ions H^+ devient imposée au système, tout simplement parce que le pH du lumen a tendance à diminuer. Dans ces conditions, Dussap (1988) a montré que le calcul théorique du rapport ρ tend vers q^2 ($J_P/J_H = 1/n = qZ$). Avec la même valeur du coefficient de couplage ceci donne une valeur limite asymptotique $\rho = 0,83$. Cette valeur n'est pas réaliste (elle correspond à une synthèse d'amidon de 99 % de la masse cellulaire). Elle correspond aussi à une valeur nulle du rapport des forces x , c'est-à-dire à une augmentation du rapport

ADP/ATP qui doit rester dans une limite qui permette l'utilisation de l'ATP dans les réactions de biosynthèse. C'est d'ailleurs la valeur limite haute de ce rapport qui détermine la fraction supérieure d'amidon synthétisé. L'augmentation progressive de ρ lorsque les flux lumineux sont augmentés est parfaitement réaliste puisqu'elle correspond à une augmentation de la synthèse d'amidon dans la cellule. Elle a été observée par exemple par Lemasson (2014). Concernant ce couplage il faut aussi noter que la réaction R5 qui est la réaction principale de transfert des ions H^+ vers le lumen se déroule dans des conditions proches de l'équilibre thermodynamique (Tableau 10) ce qui rend l'analyse du couplage entre la vitesse de transfert des ions H^+ vers le lumen et la vitesse d'assimilation par le PSII un peu plus compliquée à analyser que l'analyse précédente ne le laisse supposer. Il est à prévoir que l'analyse de ce couplage permet d'envisager de caractériser et de modéliser le fonctionnement de la chaîne de transfert d'électrons lorsque les deux photosystèmes sont éclairés avec des puissances lumineuses différentes, l'alimentation sur le PSI se couplant avec l'arrivée de protons par la réaction R5.

En résumé, le schéma métabolique de croissance cellulaire et de synthèse d'amidon qui a été énoncé est parfaitement réaliste. Il se prête à des analyses thermocinétiques plus poussées que ce qui est présenté ici. Ces analyses ont l'intérêt de permettre des prédictions des coefficients de couplage et également des prédictions de concentrations (pH, ATP, ADP, Pi, etc.) dans les différents compartiments du chloroplaste si l'on considère que les rapports de forces thermodynamiques sont déterminés par la théorie. Il est à noter que le calcul du rapport des forces (ici noté par la variable x) est réalisé à partir de données thermodynamiques. C'est, à notre connaissance, la première fois qu'il est montré que ce calcul correspond à la valeur théorique obtenue par minimalisation de la fonction de vitesse de production d'entropie, sous contrainte ou non de flux. Il est aussi montré que la bascule métabolique lorsque la vitesse d'apport d'énergie lumineuse devient la variable de contrôle du métabolisme conduit à la modification du couplage qui entraîne la production d'amidon. Ces calculs doivent cependant utiliser des données fiables des potentiels chimiques qui permettent des calculs des variations des enthalpies libres. Nous évaluons la précision nécessaire pour effectuer des calculs réalistes à mieux d'un 1 kJ/mole.

1.2.4 Calcul des rapports de vitesse lors de la production d'hydrogène

Nous procédons ici de façon similaire à ce qui a été présenté pour la croissance cellulaire dans le paragraphe précédent. Nous conservons la stœchiométrie de la croissance cellulaire.

Nous remplaçons l'équation de synthèse d'amidon par l'équation de dégradation (Eq. 132). Il est cependant nécessaire de considérer pour les simulations ultérieures que l'ATP formé lors de la glycolyse est formé dans le cytosol et non pas dans le stroma. Sur le plan du mécanisme, ceci veut dire que les granules d'amidon sont dépolymérisés dans le stroma et que les unités glucose sont transférées à travers la membrane du chloroplaste vers les autres compartiments de la cellule. Nous ajoutons la réaction de synthèse de l'hydrogène à partir de la ferrédoxine réduite (Eq. 129). L'ensemble de ces réactions est reporté dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Tableau de synthèse des réactions impliquées dans la croissance cellulaire et la dégradation de l'amidon

Eq.	Réactions métaboliques	$\Delta G_{m,7}$ (kJ/mol)
R1	$\text{CO}_2 + 2,02 \text{H}_2\text{O} + 0,169 \text{NH}_3 + 3,57 \text{ATP}^{4-} + 2,87 \text{NADPH, H}_N^+ + 0,68 \text{Cof}$ $\rightarrow \text{CH}_{1,78}\text{O}_{0,448}\text{N}_{0,169} + 3,57 \text{ADP}^{3-} + 3,57 \text{Pi}^{2-} + 2,87 \text{NADP}^+$ $+ 3,57 \text{H}_N^+ + 0,68 \text{CofH}_2$	
R2	$\text{CH}_{1,667}\text{O}_{0,834} + 3 \text{H}^+ + 3 \text{ADP}^{3-} + 3 \text{Pi}^{2-} + 2 \text{Cof}$ $\rightarrow 2 \text{CofH}_2 + 3 \text{ATP}^{4-} + \text{CO}_2 + 1,83 \text{H}_2\text{O}$	
R3	$\text{CofH}_2 + 0,5 \text{O}_2 \rightarrow \text{Cof} + \text{H}_2\text{O}$	
R4	$2 \text{hv}_{\square\square\square}: \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}_N^+ + \text{PQ} \rightarrow \text{PQH}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 + 2 \text{H}_P^+$	-82,9
R5	$\text{PQH}_2 + 2 \text{Pc} (\text{Cu}^{2+}) + 2 \text{H}_N^+ \rightarrow \text{PQ} + 2 \text{Pc} (\text{Cu}^+) + 4 \text{H}_P^+$	-2,8*
R6	$\text{hv}_{700}: \text{Pc} (\text{Cu}^+) + \text{Fd}_{\text{ox}} \rightarrow \text{Pc} (\text{Cu}^{2+}) + \text{Fd}_{\text{red}}$	-19,2
R7	$2 \text{Fd}_{\text{red}} + 2 \text{H}^+_N \rightarrow 2 \text{Fd}_{\text{ox}} + \text{H}_2$	-18,5
R8	$2 \text{Fd}_{\text{red}} + 2 \text{H}_N^+ + \text{NADP}^+ \rightarrow 2 \text{Fd}_{\text{ox}} + \text{NADPH, H}_N^+$	-19,4*
R9	$3 \text{H}^+_P + \text{H}_N^+ + \text{ADP}^{3-} + \text{Pi}^{2-} \rightarrow 3 \text{H}_N^+ + \text{ATP}^{4-} + \text{H}_2\text{O}$	-25,1

Pour la résolution, l'analyse des degrés de liberté du système est similaire à ce qui a été fait précédemment. La contrainte sur la réaction R7 (fixée à 0 dans le tableau 5) est remplacée par une contrainte sur l'oxygène, en faisant l'hypothèse que le métabolisme est contraint dans une anoxie partielle, c'est-à-dire en considérant que tout l'oxygène produit au niveau du PSII et consommé par la ré-oxydation des cofacteurs (réaction R3 du Tableau 12). L'oxygène devient

donc un intermédiaire métabolique. Nous fixons également l'entrée sur le PSII comme précédemment.

Comme précédemment, nous fixons un couplage entre le transfert d'ions H^+ à travers la membrane entre le lumen et le stroma. Avec le schéma métabolique décrit dans le tableau précédent, nous obtenons des valeurs positives de la production d'hydrogène uniquement pour des valeurs du rapport ρ inférieures à 0,622. Les résultats sont reportés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Tableau de synthèse de calcul des flux en fonction du rendement de l'ATPase lors de la croissance cellulaire et la production d'hydrogène (voie directe).

ρ	$H\nu_{680} + h\nu_{700}$	Y_{CO2X} CO ₂ /C-mole X	$Y_{XAmidon}$ g/g	$Y_{H2Amidon}$ mL/g	R1 (C-mole X)	R5
0,622	4	0,095	0,79	0	0,348	1
0,62	4	0,100	0,79	6	0,347	1
0,60	4	0,148	0,75	76	0,336	1
0,58	4	0,20	0,72	144	0,325	1
0,56	4	0,25	0,69	210	0,313	1
0,54	4	0,31	0,66	275	0,302	1
0,52	4	0,38	0,63	339	0,291	1
0,50	4	0,45	0,60	402	0,280	1
0,45	4	0,64	0,53	553	0,252	1

Avec les hypothèses précédentes, on constate que les différents rendements évoluent en fonction du rapport ρ . Globalement, la culture est productrice de CO₂. La vitesse de production de la biomasse diminue lorsque ρ diminue. On constate également que le rapport des vitesses massiques de production de biomasse et d'épuisement de l'amidon est inférieur à 1 ce qui signifie que la concentration cellulaire totale diminuera dans la culture. Enfin, le rendement de production d'hydrogène, exprimé en mL H₂.g⁻¹ d'amidon augmente lorsque le rapport ρ diminue. Ce résultat doit être comparé au résultat reporté dans les Figure 34 à Figure 36 de ce chapitre. On obtient expérimentalement un rapport en moyenne de 300 mL.g⁻¹ amidon lors de la phase d'épuisement de l'amidon. Ceci correspond à un rapport ρ d'environ 0,53, sachant qu'en instantané il est probable que des valeurs inférieures soient atteintes. L'analyse globale est donc parfaitement cohérente.

Sur le plan de l'analyse thermocinétique, cet état de fonctionnement correspond au cas inverse de la croissance cellulaire accompagnée de la synthèse d'amidon. De façon qualitative, on peut écrire que comme la vitesse d'alimentation du PSII (et du PSI) est faible, le gradient de pH à travers la membrane a tendance à diminuer. Ceci correspond à une diminution du rapport des forces thermodynamique x qui devient progressivement la variable qui s'impose dans le fonctionnement du système. Dussap (1988) a montré que dans ces conditions la valeur limite de x valait $-q$. Dans ces conditions extrêmes, le rapport des vitesses $J_P/J_H = 1/n$ tend vers 0, ce qui correspond à n infini, c'est-à-dire à $\rho = 0$. Il s'agit là de valeurs limites qui ne sont pas atteintes physiologiquement mais la tendance est bien la bonne puisque comme l'indique le tableau 8 la diminution de ρ conduit bien à la production de H_2 . Il est intéressant de noter que si ρ est bien le paramètre de contrôle métabolique, une relativement faible variation induit des comportements radicalement différents. La modélisation de ce contrôle est un sujet à part entière et résulte de la modélisation sous contrainte de la fonction de production d'entropie.

1.2.5 Production d'hydrogène par la voie directe ou la voie indirecte ?

Dans le premier chapitre, nous avons posé la question de savoir si l'hydrogénase utilisait la voie directe (synthèse d' H_2 dans le stroma à partir d'ions H^+ dans le stroma) ou bien si la voie indirecte avec l'utilisation d'ions H^+ dans le lumen (Figure 16). Nous avons utilisé la première hypothèse dans le schéma métabolique considéré (Tableau 13), après avoir montré que la réaction restait thermodynamiquement possible, y compris à $pH = 7,5$.

On peut bien entendu, utiliser la voie indirecte dans les calculs. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14. La seule réaction qui a été modifiée est la réaction R7 dans laquelle nous avons remplacé H^+_N par H^+_P .

On constate que la différence est essentiellement quantitative sur le rendement en hydrogène rapporté à la biomasse synthétisée. Seules des mesures expérimentales, qui doivent associer la production de CO_2 , de biomasse et d'hydrogène doivent permettre de discriminer ces deux hypothèses.

Néanmoins, nous préférons conserver la première hypothèse (Tableau 13) qui résulte bien d'une hypothèse mécaniste et en particulier la présence de l'hydrogénase dans le voisinage de la ferrédoxine, c'est-à-dire dans le stroma. Nous remarquons également que le modèle de couplage que nous avons mis au point traduit bien une consommation « non

stœchiométrique » d'ions H^+ en provenance du lumen puisque le nombre n est systématiquement supérieur à 3 (ρ inférieur à 1).

Tableau 14 : Tableau de synthèse de calcul des flux en fonction du rendement de l'ATPase lors de la croissance cellulaire et la production d'hydrogène (voie indirecte).

ρ	$Hv_{680} + hv_{700}$	Y_{CO_2X} CO ₂ /C-mole X	$Y_{XAmidon}$ g/g	$Y_{H_2Amidon}$ mL/g	R1 (C-mole X)	R5
0,622	4	0,095	0,79	0	0,348	1
0,62	4	0,102	0,78	10	0,347	1
0,60	4	0,174	0,74	111	0,330	1
0,58	4	0,25	0,69	206	0,314	1
0,56	4	0,33	0,65	296	0,299	1
0,54	4	0,42	0,61	381	0,283	1
0,52	4	0,52	0,57	461	0,269	1
0,50	4	0,62	0,53	537	0,255	1
0,45	4	0,92	0,45	711	0,221	1

En d'autres termes, la voie indirecte est une forme de leurre, en étant caractérisée par un surplus d'ions H^+ transférés depuis le lumen vers le stroma qui a pour simple rôle d'assurer le couplage thermodynamique. Par exemple, pour un rapport ρ de 0,53 qui correspond à une production d'hydrogène de 300 mL par gramme d'amidon, on transfère 3,8 protons H^+_P pour utiliser 2 protons H^+_N pour l'hydrogénase.

En résumé, l'analyse qui avait été validée pour modéliser la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* avec la synthèse d'amidon en substance de réserve a été extrapolée avec succès à la phase de production d'hydrogène.

À nouveau, l'analyse thermocinétique est la clé des explications et des interprétations du fonctionnement de la microalgue. Au moins en tendance, l'adéquation avec l'expérience est très prometteuse. Il reste à étendre cette analyse de façon quantitative et prédictive pour prendre en compte la modélisation la variation du rendement ρ en fonction de conditions de culture et incorporer ce modèle en termes cinétiques.

Différents points d'étude restent ouverts :

- L'analyse de l'optimalité de la fonction de dissipation en fonction des conditions d'éclairement et de limitation appliquées ;
- L'étude des schémas métaboliques de croissance cellulaire, étude déjà très avancée dans la thèse de Martzloff (2013) ;
- Le calcul prédictif des enthalpies et enthalpies libres de formation des composés du métabolisme, ceci afin de généraliser le type d'étude thermocinétique précédente.

Nous traitons (en partie) ce dernier item dans le paragraphe suivant.

1.3 Calcul des propriétés de formation par modélisation thermodynamique

A partir de la méthodologie développée au sein du laboratoire par Touré (2016), la quasi intégralité des molécules du réseau métabolique chloroplastique de *Chlamydomonas reinhardtii* a été modélisée afin de trouver une cohérence avec le référentiel d'Alberty.

Le travail de modélisation thermodynamique équivaut à un calcul prédictif des propriétés de formation. COSMO-RS est un modèle entièrement prédictif combinant une approche thermodynamique statistique et une approche moléculaire quantique. Deux descripteurs sont utilisés dans le modèle COSMO-RS (Toué, 2014) : le σ -potentiel (Figure 38) et le σ -profil (Figure 39).

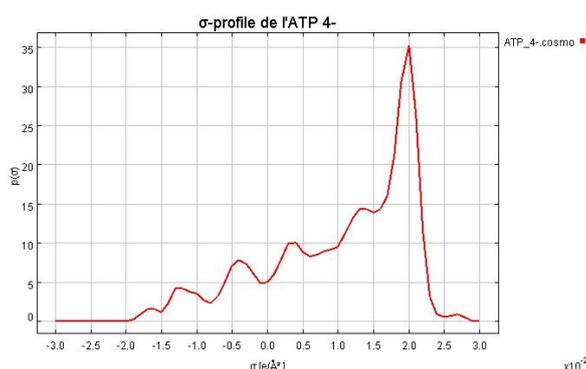


Figure 38 : σ -Profile de l'ATP4-

Pour une molécule donnée, chaque élément de surface possède une densité surfacique de charge σ_i . Cette densité est déterminée par des calculs de chimie quantique, et l'ensemble de ces éléments permet d'obtenir la structure électronique de la molécule en fonction de la forme de celle-ci, de sa constitution atomique et de la répartition des électrons. De plus, le modèle

utilise pour chaque élément une surface moyennée par rapport à l'ensemble, où chaque surface possède sa propre densité surfacique de charge. Cette représentation, en diagramme de distribution, se nomme le σ -profil (Figure 38). Il décrit la répartition du nombre d'éléments de surface $p(\sigma)$ de même densité de charge σ en fonction de leur valeur de densité surfacique de charge σ (en $e^-/\text{\AA}^2$).

Le σ -potentiel est une visualisation du degré d'affinité du solvant par unité de surface de polarité identique (σ). Il permet par des calculs d'intégrations de définir le potentiel chimique de la molécule d'intérêt. Il est représenté sous la forme d'un graphe (Figure 39).

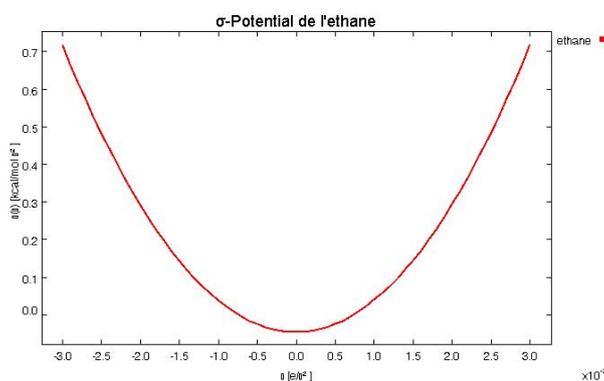


Figure 39 : σ -potentiel de l'éthane (COSMOSThermX)

Cependant certaines molécules restent complexes à simuler. Afin de compléter les données manquantes, une méthode statistique de régression linéaire a été utilisée : la régression multilinéaire du type PLS (Partial Least Squares regression). C'est une méthode statistique de régression qui permet de modéliser des liens entre des variables complexes et des variables latentes. Elle a, dans notre cas, l'avantage de pouvoir traiter les nombreux points sur le σ -profil des molécules complexes.

Pour cela, plusieurs essais ont été réalisés en combinant diverses variables issues de COSMO-RS. En effet, pour une même catégorie de molécules (Set A, Sels, Sucres...), sept régressions multilinéaires ont été calculées réalisées à partir des descripteurs de COSMO-RS, à savoir à partir du σ -potentiel (Pot) ou du σ -profil (Pro) ou de l'ensemble des 2 (Su) ; et cela sous différentes combinaisons. Ces régressions ont ainsi permis de définir l'erreur-type ou RMSE (Racine Mean Square Error) en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le ΔG_0 de l'ensemble des molécules de chaque famille étudiée (plus il est faible, plus la régression est efficace). Le Tableau 10 contient les résultats obtenus par la méthode statistique PLS.

Tableau 15 : Résultats de la modélisation statistique par PLS :

	Set A	Set B	Set C	Sels + Acides	Sels + Acides 2	Sucres	Set A + Sucres	Set A + Acides	Set A + Acides + Sucres
Pot	9,0	318,0	587,6	272,2	232,0	300,6	125,5	90,1	244,9
Su	18,0	201,9	675,6	177,8	335,7	230,6	148,4	104,4	324,8
Pro	41,3	166,8	378,0	87,0	136,8	6,2	39,9	26,8	51,3
Pot + Su	2,3	176,9	461,2	133,2	162,2	67,2	14,5	9,1	49,5
Su + Pro	2,3	67,9	270,7	72,0	136,8	6,1	8,0	5,4	22,2
Pot + Pro	4,2	68,4	268,8	48,8	142,0	4,3	23,3	13,2	43,4
Pot + Su + Pro	5,8	77,2	175,8	0,8	134,9	8,0	5,6	4,8	8,7

Nombre de molécules	116	76	149	42	100	39	155	158	197
Nombre réduit de classes	Beaucoup de classes	Beaucoup de classes	Beaucoup de classes	Plusieurs classes	Beaucoup de classes	Nombre réduit de classes			
	homogène	hétérogène				homogène			

RMSE en kJ/mol :
< 10
10 < < 20
20 < < 50
50 < < 100
> 100

Set A : Molécules issues de la thèse d'Oumar Touré (molécules simples) ;
Set B : Molécules neutres dans AlgoH2 ; **Set C** : Ensemble des molécules d'AlgoH2 ; **Sels + Acides** : Molécules chargées + acides aminés + Acides ;
Sucres : Sucres, sucres phosphatés d'AlgoH2

Pot : σ -potentiel ; **Su** : σ -potentiel x σ -profile ; **Pro** : σ -profile

Dans le cas d'une base de données homogène, comme dans la combinaison de calculs des alcanes seuls (Set A), par exemple, la régression multilinéaire a fourni des corrélations satisfaisantes (erreur inférieure à 10 kJ.mol⁻¹).

Dans le cas d'une base de données hétérogènes, mélangeant plusieurs familles de molécules (alcanes + alcools + sucres + base Alberty...), la PLS donne de moins bonnes corrélations (visible en rose et rouge dans le tableau). En effet, la variabilité du type de molécules présentes dans ces catégories est problématique. Un grand nombre de molécules dans chaque famille est nécessaire pour réaliser la régression puis la modélisation, il est donc nécessaire de

réduire le nombre de classes étudiées sans diminuer le nombre de molécules utilisées, comme dans le cas du dernier set montrant des résultats probants avec un nombre de classes réduit, 197 molécules étudiées et ce à partir de la combinaison des régressions pour le σ -potentiel ajouté au σ -profile et à la multiplication des 2 (Su).

Cette méthode montre beaucoup de points positifs pour la réalisation de la nouvelle base de données. Cependant, une collecte importante de données (ΔG) à dilution infinie reste indispensable pour valider complètement la méthode et conformer sa capacité prédictive.

Les valeurs d'enthalpie libres de Gibb's ΔG_0 calculées sur COSMO-RS sont répertoriées dans le Tableau 16 ainsi que les $\Delta G'$, pour un pH et une force ionique nulle dans une solution idéale. Pour l'instant, nous avons cohérence réelle avec les données d'Alberty mais il sera nécessaire d'étendre les simulations pour avoir les propriétés de dissociation (calcul prédictif des pK) sachant qu'il est nécessaire d'avoir ces données pour calculer les enthalpies libres de formation des espèces équivalentes (Tableau 3, chapitre 1).

Pour utiliser ces données en solution réelle, il est nécessaire d'utiliser les relations qui ont été présentées dans le chapitre 1 (paragraphe 6.1) pour tenir compte en plus des corrections d'activité. Un avantage important du modèle COSMO-RS est qu'il permet de faire des simulations directes en solution réelle et d'obtenir ainsi les coefficients d'activité. Comme nous cherchons le plus souvent de données de potentiels chimiques pour les utiliser dans les relations d'équilibre, l'objectif est à terme d'effectuer ces simulations sans passer par les propriétés d'activité.

Cependant, le niveau de maturité de la version du modèle COSMO-RS que nous avons utilisée, ne permet pas pour l'instant un niveau de précision suffisant (précision 1 kJ/mole). C'est pourquoi, nous n'avons pas pour l'instant utilisé les simulations COSMO-RS pour les intégrer pleinement dans les études thermochimiques abordées au paragraphe précédent.

Tableau 16 : Résultats des calculs thermodynamiques à partir de COSMO-RS à 298,15 K en solution aqueuse infiniment diluée.

Abréviation	Nom complet	Nom Fichier cosmo	Formule brute	Formule chargée	charge	I = 0
						pH = 0
						ΔG^0
glc	D-glucose	glc.cosmo	C ₆ H ₁₂ O ₆		0	-915,9
glp	D-glucose 1-phosphate	glp_0.cosmo	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	0	
glp	D-glucose 1-phosphate	glp_1-.cosmo	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	C ₆ H ₁₂ O ₉ P	-1	
glp	D-glucose 1-phosphate	glp_2-.cosmo	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	C ₆ H ₁₁ O ₉ P	-2	-1756,9
g6p	D-glucose 6-phosphate	g6p_0.cosmo	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	0	
g6p	D-glucose 6-phosphate	g6p_1-.cosmo	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	C ₆ H ₁₂ O ₉ P	-1	
g6p	D-glucose 6-phosphate	g6p_2-.cosmo	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	C ₆ H ₁₁ O ₉ P	-2	-1763,9
f6p	D-fructose-6-phosphate	f6p_0.cosmo	C ₆ H ₁₃ O ₆ P	C ₆ H ₁₃ O ₆ P	0	
f6p	D-fructose-6-phosphate	f6p_1-.cosmo ; Fructose6-phosphate_1-.cosmo	C ₆ H ₁₃ O ₆ P	C ₆ H ₁₂ O ₆ P	-1	
f6p	D-fructose-6-phosphate	f6p_2-.cosmo ; Fructose6-phosphate_2-.cosmo	C ₆ H ₁₃ O ₆ P	C ₆ H ₁₁ O ₆ P	-2	-1760,8
fdp	D-fructose-1.6-bisphosphate	FDP_0.cosmo ; Fructose-1,6-bisposphate_0.cosmo	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	0	
fdp	D-fructose-1.6-bisphosphate	FDP_1-.cosmo ; Fructose-1,6-bisposphate_1-.cosmo	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	C ₆ H ₁₃ O ₁₂ P ₂	-1	
fdp	D-fructose-1.6-bisphosphate	FDP_2-.cosmo ; Fructose-1,6-bisposphate_2-.cosmo	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	C ₆ H ₁₂ O ₁₂ P ₂	-2	
fdp	D-fructose-1.6-bisphosphate	FDP_3-.cosmo ; Fructose-1,6-bisposphate_3-.cosmo	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	C ₆ H ₁₁ O ₁₂ P ₂	-3	
fdp	D-fructose-1.6-bisphosphate	FDP_4-.cosmo ; Fructose-1,6-bisposphate_4-.cosmo	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	C ₆ H ₁₀ O ₁₂ P ₂	-4	-2601,4
atp	ATP	ATP_4-.cosmo	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₁₃ P ₃	-4	-2768,1
atp	ATP	ATP_3-.cosmo	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₁₃ P ₃	-3	
atp	ATP	ATP_2-.cosmo	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₁₃ P ₃	-2	
atp	ATP	ATP_1-.cosmo	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₃ P ₃	-1	
atp	ATP	ATP_0.cosmo	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	0	
atp	ATP	ATP_1+.cosmo	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	C ₁₀ H ₁₇ N ₅ O ₁₃ P ₃	1	
atp	ATP	ATP_2+ TmoleX.cosmo	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	C ₁₀ H ₁₈ N ₅ O ₁₃ P ₃	2	
adp	ADP	ADP_3-.cosmo	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₁₃ P ₂	-3	-1906,1
adp	ADP	ADP_2-.cosmo	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₁₃ P ₂	-2	
adp	ADP	ADP_1-.cosmo	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₁₃ P ₂	-1	
adp	ADP	ADP_0.cosmo	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₃ P ₂	0	
adp	ADP	ADP_1+ TmoleX.cosmo	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₂	1	
adp	ADP	ADP_2+ TmoleX.cosmo	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	C ₁₀ H ₁₇ N ₅ O ₁₃ P ₂	2	
cytox	ferricytochrome c (Fe ³⁺)	Fe3+ CytochromeC TmoleX.cosmo	C ₄₂ H ₃₄ FeN ₈ O ₆ S ₂	C ₄₂ H ₃₇ FeN ₈ O ₆ S ₂	3	
cytred	ferrocytochrome c (Fe ²⁺)	Fe2+ CytochromeC TmoleX.cosmo	C ₄₂ H ₃₄ FeN ₈ O ₆ S ₂	C ₄₂ H ₃₆ FeN ₈ O ₆ S ₂	2	
dhap	dihydroxyacetone phosphate	DHAP_2-.cosmo	C ₃ H ₇ O ₆ P	C ₃ H ₅ O ₆ P	-2	-1296,3
dhap	dihydroxyacetone phosphate	DHAP_1-.cosmo	C ₃ H ₇ O ₆ P	C ₃ H ₆ O ₆ P	-1	
dhap	dihydroxyacetone phosphate	DHAP_0.cosmo	C ₃ H ₇ O ₆ P	C ₃ H ₇ O ₆ P	0	
gap	glyceraldehyde-3-phosphate G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate_2-.cosmo	C ₃ H ₇ O ₆ P	C ₃ H ₅ O ₆ P	-2	-1288,6
gap	glyceraldehyde-3-phosphate G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate_1-.cosmo	C ₃ H ₇ O ₆ P	C ₃ H ₆ O ₆ P	-1	
nad	nicotinamide adénine dinucléotide	NAD_1-.cosmo	C ₂₁ H ₂₈ N ₇ O ₁₄ P ₂	C ₂₁ H ₂₇ N ₇ O ₁₄ P ₂	-1	0
nad	nicotinamide adénine dinucléotide	NAD_0+.cosmo ;	C ₂₁ H ₂₈ N ₇ O ₁₄ P ₂	C ₂₁ H ₂₈ N ₇ O ₁₄ P ₂	0	
nad	nicotinamide adénine dinucléotide	NAD_1+.cosmo	C ₂₁ H ₂₈ N ₇ O ₁₄ P ₂	C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₄ P ₂	1	
nad	nicotinamide adénine dinucléotide	NAD_2+ TmoleX.cosmo	C ₂₁ H ₂₈ N ₇ O ₁₄ P ₂	C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₄ P ₂	2	
nad	nicotinamide adénine dinucléotide	NAD_3+.cosmo	C ₂₁ H ₂₈ N ₇ O ₁₄ P ₂	C ₂₁ H ₃₁ N ₇ O ₁₄ P ₂	3	
nadh	nicotinamide adenine dinucléotide (reduced form)	NADH_2-.cosmo	C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₄ P ₂	C ₂₁ H ₂₇ N ₇ O ₁₄ P ₂	-2	22,7
pi	phosphate 2-	Phosphate-Pi_2-.cosmo	H ₃ PO ₄	HPO ₄	-2	-1096,1
pi	phosphate 2-	Phosphate-Pi_1-.cosmo	H ₃ PO ₄	H ₂ PO ₄	-1	
l3dpg	3-phospho-D-glycérol phosphate 4-	Bpg_4-.cosmo	C ₃ H ₈ O ₁₀ P ₂	C ₃ H ₄ O ₁₀ P ₂	-4	-2436

Chapitre III Résultats et Discussion

13dpg	3-phospho-D-glycérol phosphate	Bpg_3-.cosmo	C ₃ H ₈ O ₁₀ P ₂	C ₃ H ₅ O ₁₀ P ₂	-3	
13dpg	3-phospho-D-glycérol phosphate	Bpg_2-.cosmo	C ₃ H ₈ O ₁₀ P ₂	C ₃ H ₆ O ₁₀ P ₂	-2	
nadp	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate 3-	NADP_3-.cosmo	C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₇ P ₃	C ₂₁ H ₂₆ N ₇ O ₁₇ P ₃	-3	-835,2
nadph	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (reduced form) 4-	NADPH_4-.cosmo	C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₇ P ₃	C ₂₁ H ₂₆ N ₇ O ₁₇ P ₃	-4	-809,7
nadph	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (reduced form)	NADPH_3-.cosmo	C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₇ P ₃	C ₂₁ H ₂₇ N ₇ O ₁₇ P ₃	-3	
nadph	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (reduced form)	NADPH_2-.cosmo	C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₇ P ₃	C ₂₁ H ₂₈ N ₇ O ₁₇ P ₃	-2	
nadph	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (reduced form)	NADPH_1-.cosmo	C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₇ P ₃	C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₇ P ₃	-1	
nadph	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (reduced form)	NADPH_0+.cosmo	C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₇ P ₃	C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₇ P ₃	0	
nadph	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (reduced form)	NADPH_1+.cosmo	C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₇ P ₃	C ₂₁ H ₃₁ N ₇ O ₁₇ P ₃	1	
nadph	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (reduced form)	NADPH_2+.cosmo	C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₇ P ₃	C ₂₁ H ₃₂ N ₇ O ₁₇ P ₃	2	
nadph	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (reduced form)	NADPH_3+.cosmo	C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₇ P ₃	C ₂₁ H ₃₃ N ₇ O ₁₇ P ₃	3	
3pg	D-glycérate-3-phosphate 3-	3-Phospho-D-glycerate_3-.cosmo	C ₃ H ₇ O ₇ P	C ₃ H ₄ O ₇ P	-3	-1502,5
3pg	D-glycérate-3-phosphate	3-Phospho-D-Glycerate_2- TmoleX.cosmo	C ₃ H ₇ O ₇ P	C ₃ H ₅ O ₇ P	-2	
2pg	D-glycérate-2-phosphate 3-	2-phosphoglycerate_3-.cosmo	C ₃ H ₇ O ₇ P	C ₃ H ₄ O ₇ P	-3	-1496,4
2pg	D-glycérate-2-phosphate	2-phosphoglycerate_2-.cosmo	C ₃ H ₇ O ₇ P	C ₃ H ₅ O ₇ P	-2	
h2o	H ₂ O	h2o.cosmo	H ₂ O	H ₂ O	0	-237,2
pep	phosphoenolpyruvate 3-	pep_3-.cosmo	C ₃ H ₅ O ₆ P	C ₃ H ₂ O ₆ P	-3	-1263,7
pep	phosphoenolpyruvate 3-	pep_2-.cosmo	C ₃ H ₅ O ₆ P	C ₃ H ₃ O ₆ P	-2	-1263,7
pyr	pyruvate -	pyruvate_1-.cosmo	C ₃ H ₄ O ₃	C ₃ H ₃ O ₃	-1	-472,3
coa	coenzyme A	CoA_0.cosmo	C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O ₁₆ P ₃ S	C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O ₁₆ P ₃ S	0	-47,8
coa	coenzyme A	CoA_1-.cosmo	C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O ₁₆ P ₃ S	C ₂₁ H ₃₅ N ₇ O ₁₆ P ₃ S	-1	
accoa	acétyl-CoA -	Acetyl-CoA_0.cosmo	C ₂₃ H ₃₈ N ₇ O ₁₆ P ₃ S	C ₂₃ H ₃₈ N ₇ O ₁₆ P ₃ S	0	-180,4
co2	CO ₂ tot	Co2tot_2-.cosmo	CO ₂	CO ₂ (+)	-2	
co2	CO ₂ tot	Co2tot_1-.cosmo	CO ₂	CO ₂ (+HO)	-1	
co2	CO ₂ tot	Co2tot_0.cosmo	CO ₂	CO ₂ (+H ₂ O)	0	-386
oaa	oxaloacétate 2-	Oxaloacetate_2-.cosmo	C ₄ H ₄ O ₅	C ₄ H ₂ O ₅	-2	-793,3
cit	citrate 3-	Citrate_3-.cosmo	C ₆ H ₈ O ₇	C ₆ H ₅ O ₇	-3	-1162,7
cit	citrate	Citrate_2-.cosmo	C ₆ H ₈ O ₇	C ₆ H ₆ O ₇	-2	
cit	citrate	Citrate_1-.cosmo	C ₆ H ₈ O ₇	C ₆ H ₇ O ₇	-1	
icit	isocitrate	Isocitrate_3-.cosmo	C ₆ H ₈ O ₇	C ₆ H ₅ O ₇	-3	
icit	isocitrate 2-	Isocitrate_2-.cosmo	C ₆ H ₈ O ₇	C ₆ H ₆ O ₇	-2	-1192,6
icit	isocitrate	Isocitrate_1-.cosmo	C ₆ H ₈ O ₇	C ₆ H ₇ O ₇	-1	
akg	□-oxoglutarate = 2-oxoglutarate = 2 ketoglutarate	Ketoglutarate_2-.cosmo	C ₅ H ₆ O ₅	C ₅ H ₅ O ₅	-1	-820,1
succoa	succinyl-CoA -	SuccinylCoA_1-.cosmo	C ₂₅ H ₄₀ N ₇ O ₁₉ P ₃ S	C ₂₅ H ₃₉ N ₇ O ₁₉ P ₃ S	-1	-509,7
succoa	succinyl-CoA	SuccinylCoA_0.cosmo	C ₂₅ H ₄₀ N ₇ O ₁₉ P ₃ S	C ₂₅ H ₄₀ N ₇ O ₁₉ P ₃ S	0	
succ	succinate 2-	succinate_2-.cosmo	C ₄ H ₆ O ₄	C ₄ H ₄ O ₄	-2	-690,4
succ	succinate	succinate_1-.cosmo	C ₄ H ₆ O ₄	C ₄ H ₅ O ₄	-1	
succ	succinate	succinate_0.cosmo	C ₄ H ₆ O ₄	C ₄ H ₆ O ₄	0	
fum	fumarate 2-	Fumarate_2-.cosmo	C ₄ H ₄ O ₄	C ₄ H ₂ O ₄	-2	-601,9
fum	fumarate	Fumarate_1-.cosmo	C ₄ H ₄ O ₄	C ₄ H ₃ O ₄	-1	
fum	fumarate	Fumarate_0.cosmo	C ₄ H ₄ O ₄	C ₄ H ₄ O ₄	0	
q°	ubiquinone radicalaire	UQ° C7 1- TmoleX1.cosmo	C ₄₉ H ₇₅ O ₄	C ₄₉ H ₇₄ O ₄	-1	
q°	ubiquinone radicalaire	UQ° C8 1- TmoleX.cosmo	C ₄₉ H ₇₅ O ₄	C ₄₉ H ₇₄ O ₄	-1	
q°	ubiquinone radicalaire	UQ° O 1- TmoleX.cosmo	C ₄₉ H ₇₅ O ₄	C ₄₉ H ₇₄ O ₄	-1	
q°	ubiquinone radicalaire	UQ° C9 1- TmoleX.cosmo	C ₄₉ H ₇₅ O ₄	C ₄₉ H ₇₄ O ₄	-1	
q	ubiquinone	ubiquinone8_0.cosmo	C ₄₉ H ₇₄ O ₄	C ₄₉ H ₇₄ O ₄	0	565,9
qh2	ubiquinol	ubiquinol8_0.cosmo	C ₄₉ H ₇₆ O ₄	C ₄₉ H ₇₆ O ₄	0	

Chapitre III Résultats et Discussion

pq	plastoquinone 9	Plastoquinone9 0.cosmo	C ₅₃ H ₈₀ O ₂	C ₅₃ H ₈₀ O ₂	0	867,2
pqh2	plastoquinol 9	Plastoquinol9 0.cosmo	C ₅₃ H ₈₂ O ₂	C ₅₃ H ₈₂ O ₂	0	702,1
mal	L-malate	Malate_2-.cosmo	C ₄ H ₆ O ₅	C ₄ H ₄ O ₅	-2	-842,7
mal	L-malate	Malate_1-.cosmo	C ₄ H ₆ O ₅	C ₄ H ₅ O ₅	-1	
6pgl	6-phospho-D-glucono-1.5-lactone	6-Phosphonoglucono-D-lactone_2-.cosmo	C ₆ H ₁₁ O ₉ P	C ₆ H ₉ O ₉ P	-2	-1746,1
6pgl	6-phospho-D-glucono-1.5-lactone	6-Phosphonoglucono-D-lactone_1-.cosmo	C ₆ H ₁₁ O ₉ P	C ₆ H ₁₀ O ₉ P	-1	0
6pgc	6-phospho-D-gluconate	6-Phospho-D-gluconate_1-.cosmo	C ₆ H ₁₃ O ₁₀ P	C ₆ H ₁₁ O ₁₀ P	-2	-2009,8
ru5p	D-ribulose 5-phosphate	Ribulose5P_2-.cosmo	C ₅ H ₁₁ O ₈ P	C ₅ H ₉ O ₈ P	-2	-1595,3
ru5p	D-ribulose 5-phosphate	Ribulose5P_1-.cosmo	C ₅ H ₁₁ O ₈ P	C ₅ H ₁₀ O ₈ P	-1	
xu5p	D-xylulose 5-phosphate	Xu5P_-2.cosmo	C ₅ H ₁₁ O ₈ P	C ₅ H ₉ O ₈ P	-2	-1600,5
xu5p	D-xylulose 5-phosphate	Xu5P_-1.cosmo	C ₅ H ₁₁ O ₈ P	C ₅ H ₁₀ O ₈ P	-1	
xu5p	D-xylulose 5-phosphate	Xu5P.cosmo	C ₅ H ₁₁ O ₈ P	C ₅ H ₁₁ O ₈ P	0	
r5p	□-D-ribose 5-phosphate	ribose5P_2-.cosmo	C ₅ H ₁₁ O ₈ P	C ₅ H ₉ O ₈ P	-2	-1602,8
r5p	□-D-ribose 5-phosphate	ribose5P_1-.cosmo	C ₅ H ₁₁ O ₈ P	C ₅ H ₁₀ O ₈ P	-1	
s7p	sedoheptulose 7-phosphate	S7P_-2.cosmo	C ₇ H ₁₅ O ₁₀ P	C ₇ H ₁₃ O ₁₀ P	-2	-1907,8
s7p	sedoheptulose 7-phosphate	S7P_-1.cosmo	C ₇ H ₁₅ O ₁₀ P	C ₇ H ₁₄ O ₁₀ P	-1	
s7p	sedoheptulose 7-phosphate	S7P.cosmo	C ₇ H ₁₅ O ₁₀ P	C ₇ H ₁₅ O ₁₀ P	0	
e4p	D-érythrose-4-phosphate	E4P_-2.cosmo	C ₄ H ₉ O ₇ P	C ₄ H ₇ O ₇ P	-2	-1444,1
e4p	D-érythrose-4-phosphate	E4P_-1.cosmo	C ₄ H ₉ O ₇ P	C ₄ H ₈ O ₇ P	-1	
rudp	D-ribulose 1.5-bisphosphate	RuDP_4-.cosmo	C ₅ H ₁₂ O ₁₁ P ₂	C ₅ H ₈ O ₁₁ P ₂	-4	
rudp	D-ribulose 1.5-bisphosphate	RuDP_3-.cosmo	C ₅ H ₁₂ O ₁₁ P ₂	C ₅ H ₉ O ₁₁ P ₂	-3	
rudp	D-ribulose 1.5-bisphosphate	RuDP_2-.cosmo	C ₅ H ₁₂ O ₁₁ P ₂	C ₅ H ₁₀ O ₁₁ P ₂	-2	-2519,8
rudp	D-ribulose 1.5-bisphosphate	RuDP_1-.cosmo	C ₅ H ₁₂ O ₁₁ P ₂	C ₅ H ₁₁ O ₁₁ P ₂	-1	
sdp	sedoheptulose-1.7-bisphosphate	SDP_4-.cosmo	C ₇ H ₁₆ O ₁₃ P ₂	C ₇ H ₁₂ O ₁₃ P ₂	-4	
sdp	sedoheptulose-1.7-bisphosphate	SDP_3-.cosmo	C ₇ H ₁₆ O ₁₃ P ₂	C ₇ H ₁₃ O ₁₃ P ₂	-3	
sdp	sedoheptulose-1.7-bisphosphate	SDP_2-.cosmo	C ₇ H ₁₆ O ₁₃ P ₂	C ₇ H ₁₄ O ₁₃ P ₂	-2	-2828,2
sdp	sedoheptulose-1.7-bisphosphate	SDP_1-.cosmo	C ₇ H ₁₆ O ₁₃ P ₂	C ₇ H ₁₅ O ₁₃ P ₂	-1	
glx	glyoxylate	Glyoxylate_1-.cosmo	C ₂ H ₂ O ₃	C ₂ HO ₃	-1	-468,6
ac	acétate	acetate_ph0.cosmo	C ₂ H ₄ O ₂	C ₂ H ₄ O ₂	0	
ac	acétate	acetate.cosmo	C ₂ H ₄ O ₂	C ₂ H ₃ O ₂	-1	-369,3
amp	adenosine monophosphate	AMP_2-.cosmo	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₇ P	-2	-1040,5
amp	adénosine monophosphate	AMP_1-.cosmo	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P	-1	
amp	adénosine monophosphate	AMP_0+.cosmo	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	0	
amp	adénosine monophosphate	AMP_1+.cosmo	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₇ P	1	
amp	adénosine monophosphate	AMP_2+.cosmo	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₇ P	2	
ppi	pyrophosphate 3-	PPi_-4.cosmo	H ₄ P ₂ O ₇	P ₂ O ₇	-4	
ppi	pyrophosphate 3-	PPi_-3.cosmo	H ₄ P ₂ O ₇	HP ₂ O ₇	-3	-1973,9
ppi	pyrophosphate 3-	PPi_-2.cosmo	H ₄ P ₂ O ₇	H ₂ P ₂ O ₇	-2	
ppi	pyrophosphate 3-	PPi_-1.cosmo	H ₄ P ₂ O ₇	H ₃ P ₂ O ₇	-1	
ppi	pyrophosphate 3-	PPi_0.cosmo	H ₄ P ₂ O ₇	H ₄ P ₂ O ₇	0	
o2	O ₂ aq	O2.cosmo	O ₂	O ₂	0	16,4
fdox	oxidized ferredoxin (Fd(Fe ³⁺))		Fe	Fe	3	0
fdrd	reduced ferredoxin (Fd(Fe ²⁺))		Fe	Fe	2	38,4
hnu680	photon (□ = 680 nm)					175,92
hnu700	photon (□ = 700 nm)					170,89
hn	proton N-phase Hn 7,5		H	H	1	0
hpc	proton P-phase (chloro) = Hp 4		H	H	1	0

Chapitre III Résultats et Discussion

hpm	proton P-phase (mitoch) = Hp 6,5		H	H	1	0
h2	dihydrogen	h2.cosmo	H ₂	H ₂	0	17,6
lac	Lactate	Lactate_1-.cosmo D-lactate.cosmo	C ₃ H ₆ O ₃	C ₃ H ₅ O ₃	-1	-516,7
for	formate	Formate 1-.cosmo	CH ₂ O ₂	CHO ₂	-1	-351
acpi	acétyl phosphate	Acetylphosphate_2-.cosmo	C ₂ H ₅ O ₅ P	C ₂ H ₃ O ₅ P	-2	
acpi	acétyl phosphate	Acetylphosphate_1-.cosmo	C ₂ H ₅ O ₅ P	C ₂ H ₄ O ₅ P	-1	
acpi	acétyl phosphate	Acetylphosphate_0.cosmo	C ₂ H ₅ O ₅ P	C ₂ H ₅ O ₅ P	0	-1298,3
etoh	ethanol	Ethanol 0.cosmo	C ₂ H ₆ O	C ₂ H ₆ O	0	-181,6
acald	acétaldéhyde	acetaldehyde.cosmo	C ₂ H ₄ O	C ₂ H ₄ O	0	-139
nh3	ammoniac	ammonia 0.cosmo	NH ₃	NH ₃	1	-79,3
glu	glutamate	Glutamate-L 1-.cosmo	C ₅ H ₉ NO ₄	C ₅ H ₈ NO ₄	-1	-697,5
gln	glutamine	Glutamine-L 0.cosmo	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	C ₅ H ₉ N ₂ O ₃	-1	-447,8
fad	Fad	FAD 2-.cosmo	C ₂₇ H ₃₃ N ₉ O ₁₅ P ₂	C ₂₇ H ₃₁ N ₉ O ₁₅ P ₂	-2	0
fadh2	Fadh2	FADH2 2-ok.cosmo	C ₂₇ H ₃₅ N ₉ O ₁₅ P ₂	C ₂₇ H ₃₃ N ₉ O ₁₅ P ₂	-2	-38,9
aconi	cis-aconitate	cis-Aconitate 3-.cosmo	C ₆ H ₆ O ₆	C ₆ H ₃ O ₆	-3	-917,1
P+	oxidised pheophytin		C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	C ₅₅ H ₇₅ N ₄ O ₅	1	
P	reduced pheophytin		C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	0	
Amidon	amidon		C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₆ H ₁₀ O ₅	0	-2285,28

1.4 Les modèles de transfert

1.4.1 Le transfert radiatif

La détermination du flux lumineux pour les différents outils de production de biomasse utilisés (fioles de Roux ou mini-photobioréacteur) est indispensable pour viser un optimal de croissance et une meilleure réalisation de la photosynthèse. L'objectif étant de nous rapprocher au mieux du point de saturation (G_s). Rappelons que celui-ci est estimé par le modèle d'Eilers et Peeters à partir des essais expérimentaux en chambre de production de gaz (oxygraphe), qui a été décrit dans la bibliographie. Cette méthode est utilisée un peu plus loin dans ce chapitre (Figure 42). Par ailleurs, une mesure précise du flux lumineux appliqué est indispensable car c'est une donnée d'entrée du modèle de croissance cellulaire.

1.4.1.1 Détermination du flux lumineux

Dans le cas des fioles de Roux, le capteur du quantumètre est positionné à la même distance des lampes halogènes que les fioles de Roux, soit à 5 cm. Des mesures sont réalisées sur 5 points de la surface de captation de la lumière par la fiole. Les résultats moyennés sont intégrés sur la courbe de calibration ci-dessous, une atténuation du flux lumineux exercée par la surface vitrée d'une valeur de 9 % a été prise en compte étant donné qu'il n'est pas possible de faire la mesure de l'intérieur des fioles (entrée de bouteille trop étroite pour permettre le passage du capteur). Il est alors possible de corrélérer la puissance d'alimentation des lampes (en volts) avec la puissance du flux lumineux reçu (Figure 40) par le biais de l'équation :

$$y = 5,5755e^{0,3416x}$$

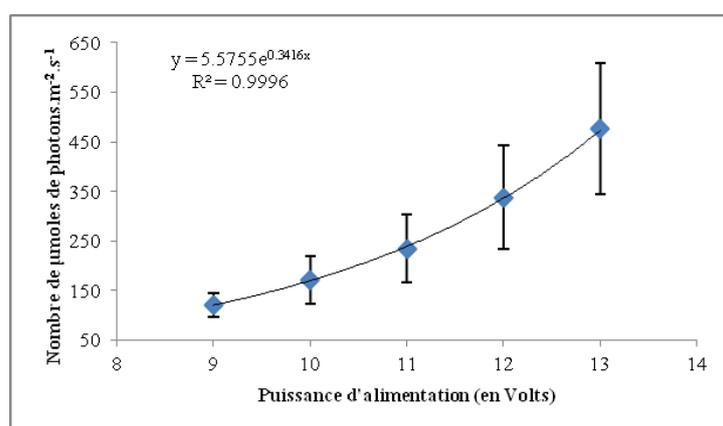


Figure 40 : Calibration moyennée (en 5 points) de l'intensité lumineuse pour les cultures en fiole de Roux

Pour le mini-photobioréacteur, le capteur a été placé sous la surface vitrée du réacteur, permettant la prise en compte de l'atténuation par le verre. Une distance de 11 cm par rapport

à la lampe halogène est fixée (distance équivalente lors des différentes cultures réalisées dans le PBR), et la corrélation entre les intensités électriques et leur valeur de flux lumineux est relevée. Les résultats sont moyennés pour chaque intensité (à partir des 3 points de mesure réalisés pour chacune). La courbe de calibration ci-dessous (Figure 41) a été obtenue, et l'équation de corrélation est la suivante : $y = 7,8052e^{0,4293x}$.

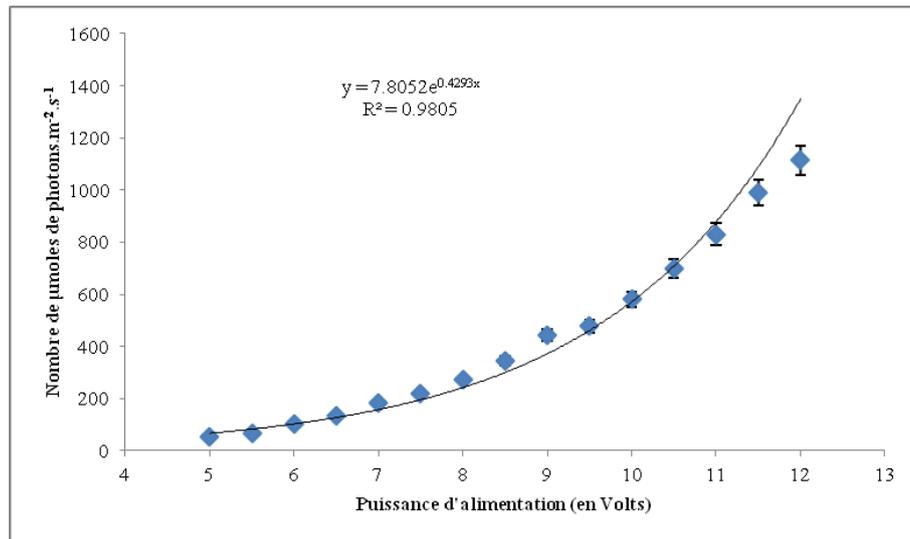


Figure 41 : Calibration moyennée (en 15 points) de l'intensité lumineuse pour les cultures dans le mini-PBR avec le quantumètre.

Le flux lumineux incident étant un élément indispensable à la réalisation de la photosynthèse par les microorganismes photosynthétiques, des mesures de productions d'oxygène ont été faites à l'aide d'un oxygraphe.

1.4.1.2 L'oxygraphe

Pour déterminer les valeurs optimales d'irradiance et de température, des modèles mathématiques sont utilisés. Cependant, afin d'appliquer les modèles existants, il est indispensable de réaliser au préalable des mesures expérimentales. Ainsi, à partir des tests effectués à l'aide de l'oxygraphe, nous avons pu intégrer nos résultats expérimentaux à la simulation mathématique prédictive selon le modèle d'Eilers et Peeters (1988) (Eq. 5, Chapitre 2).

$$r_{O_2} = r_{O_2, \max} * \frac{G}{K_1 + G + \frac{G^2}{K_2}} - r_{resp} \quad \text{Eq. 133}$$

Où r_{O_2} est la production d'O₂ (en nmol.mL⁻¹.min⁻¹), $r_{O_2,max}$ est la production maximale d'O₂ (en nmol.mL⁻¹.min⁻¹), r_{resp} est la consommation d'O₂ (en nmol.mL⁻¹.min⁻¹), G est l'irradiance (en μmoles photons.m⁻².s⁻¹) et K_1 et K_2 sont des constantes évaluées mathématiquement à partir du solveur Excel.

Les valeurs expérimentales, issues des tests sur l'oxygraphe, et celles modélisées ont été obtenues en utilisant une concentration en biomasse d'*Arthrospira platensis* à 0,06 g.L⁻¹ (Figure 42).

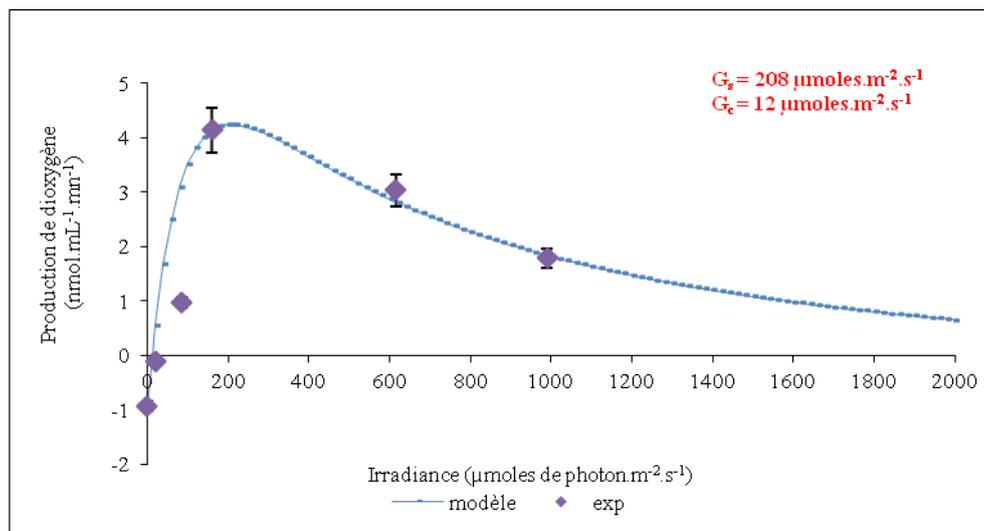


Figure 42 : Modèle de production de dioxygène par *Arthrospira platensis* en fonction de l'irradiance (modèle avec inhibition d'Eilers et Peeters) pour une $C_{i,x}$ de 0,06 g.L⁻¹.

Avec le modèle d'Eilers et Peeters, les constantes K_1 et K_2 ont été déterminées respectivement à 145,01 et 297,64. Les valeurs modélisées permettent de définir le flux lumineux appliqué au moment où la production de dioxygène est égale à zéro, ce qui correspond au point de compensation G_c . L'irradiance au niveau de ce point, déterminé grâce au modèle mathématique, est de 12 μmoles.m⁻².s⁻¹.

En dessous de cette valeur, la production globale en oxygène est négative. En effet, entre l'obscurité et 12 μmoles.m⁻².s⁻¹, l'oxygène produit par photosynthèse est consommé par les microorganismes, c'est par conséquent un état métabolique de respiration. Le point de compensation correspond donc à un état d'équilibre où il y a autant de dioxygène produit par photosynthèse que consommé par la respiration, ainsi la somme algébrique de l'oxygène photosynthétique et respiratoire s'annule.

Le taux de production d'oxygène est maximal pour un flux lumineux de $208 \mu\text{moles}_v.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ce flux lumineux incident correspond à l'irradiance de saturation (G_s) qui peut être corrélée au $r_{O_2, \text{max}}$, dont la valeur est estimée par des calculs, et pour la concentration cellulaire utilisée ici, à la hauteur de $4,24 \text{ nmol}.\text{mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$, soit $70,67 \text{ mmol}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de biomasse. Puis, passé le seuil de saturation, l'activité photosynthétique diminue. L'irradiance devient donc inhibitrice. Elle entraîne une photoinhibition responsable de la baisse de l'activité photosynthétique. En effet, Critchley a démontré en 1988 que la photoinhibition correspondait à la perte de la protéine D1 du PSII ou à des dommages sur le centre réactionnel P680. La valeur de G_s obtenue par Vonshak (1997), de $165 \mu\text{moles}_v.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, est du même ordre que celle obtenue dans notre simulation. Mohite et Wackte (2011) ont déterminé une gamme de valeurs pour G_c et G_s pour différentes concentrations en nitrate et en dioxyde de carbone. Ces expériences ont été réalisées en chambre de production avec une électrode à oxygène de type Clark et à partir des paramètres d'Edwards et Walker (1983). Il en ressort que le point de compensation d'*Arthrospira platensis* se situe entre 11 et $43 \mu\text{moles}_v.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et le point de saturation entre 146 et $192 \mu\text{moles}_v.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Il est à noter que les valeurs données ci-dessus sont fonction de la concentration intracellulaire en phycocyanine et de la concentration cellulaire initiale. En effet, Cornet (1992) a démontré que l'augmentation de la quantité de phycocyanine dans les cellules augmentait le phénomène de photoinhibition.

Une fois les données concernant l'activité photosynthétique d'*Arthrospira platensis* obtenues, le calcul de données autour du transfert de matière sont nécessaires afin d'optimiser et de comprendre le fonctionnement de la croissance cellulaire dans le mini-photobioréacteur.

C'est pourquoi, deux grandeurs ont été calculées: le coefficient volumique de transfert gazeux et le rendement en oxygène.

1.4.2 Le transfert de matière

Afin de vérifier que la membrane choisie n'est pas limitante pour le transfert du gaz entre le compartiment liquide et le gazeux, le calcul du coefficient volumique de transfert du gaz a été réalisé sur le miniPBR à partir d'un dosage colorimétrique sur la phase liquide (par le suivi des sulfites) et de la variation de la pression dans le compartiment gazeux.

1.4.2.1 Le coefficient volumique de transfert gazeux : $k_L a$

Le coefficient volumique de transfert gazeux, noté $k_L a$ et exprimé en h^{-1} , est composé de deux facteurs : k_L , qui est le coefficient de transfert de masse et est fonction de la température et des propriétés physique du système ; a , qui est l'aire spécifique de l'interface d'échange et qui s'écrit :

$$a = \frac{A}{V_L} \quad \text{Eq. 134}$$

Avec A l'aire de la surface d'échange (en m^2) et V_L le volume en m^3 de la phase liquide. Dans le cas présent, le débit et la pression du flux gazeux ne vont pas interagir avec le $k_L a$. En effet, le dimensionnement du miniPBR fait que le compartiment liquide est dépourvu de gaz. Il n'y a donc pas de formation de bulles. Le phénomène de coalescence et de modification de la surface d'échange gaz/liquide n'est donc pas un verrou puisque a est constant (l'aire de la surface d'échange est équivalente à la taille de la membrane).

Le $k_L a$ peut être déterminé expérimentalement par une méthode de variation logarithmique de la pression gazeuse au cours de la manipulation.

En effet, la pression totale gazeuse dans le réacteur, exprimée en Pa, s'écrit :

$$P_{tot} = \frac{n_{tot}RT}{V} = \frac{(n_{N_2} + n_{O_2})RT}{V} \quad \text{Eq. 135}$$

Où, n_i est le nombre de moles du composé i , V le volume (en L), R la constante des gaz parfaits ($= 8,31451 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) et T la température exprimée en Kelvin. Par la suite, t le temps est exprimé en heure.

Donc,

$$\frac{dP_{tot}}{dt} = \frac{dn_{O_2}}{dt} * \frac{RT}{V} \quad \text{Eq. 136}$$

Où la variation en moles d'O₂ par unité de temps est décrite par l'équation suivante, avec V_G le volume du compartiment gazeux en L :

$$\frac{dn_{O_2}}{dt} = \frac{dP_{tot}}{dt} * \frac{V_G}{RT} \quad \text{Eq. 137}$$

Afin d'appliquer cette méthode de calcul, il est indispensable de réaliser un dosage chimique sur l'oxydation des sulfites (Poughon et al., 2003) qui suit la réaction suivante :



L'utilisation du cobalt comme catalyseur permet d'optimiser les résultats de détermination du $k_L\alpha$ puisqu'il permet d'obtenir une élimination complète de l'oxygène dans la phase liquide (Reuss, 1993). Ainsi, la présence de sulfites en solution à la fin de l'expérimentation (Tableau 17) permet de définir que $C_{O_2,L}$ est nulle, ce qui se traduit par la stœchiométrie suivante :

$$r_{O_2} = \frac{r_{SO_3^{2-}}}{2}, \text{ en mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}, \text{ avec } r_{SO_3^{2-}} \text{ le rendement d'oxydation des sulfites.}$$

Tableau 17 : Concentration en sulfites dans le milieu liquide (en vert les concentrations en M et en jaune en g.L⁻¹)

Calculs concentration en sulfite de sodium									
Volume I2 (L)	Conc. I2	Volume Thio (L)	Conc. Thio	Volume éch. (L)	Conc. Sulfite				
0,01	0,1	0,0174	0,1	0,001	0,13		T=0	1,31	131000
0,01	25,38	0,0174	24,818	0,001	37,8834				
0,01	0,1	0,0193	0,1	0,001	0,035		T=final	1,12	112000
0,01	25,38	0,0193	24,818	0,001	14,3063				
						dt (s) =	1860	dP (Pa) =	-19000

Ainsi la variation en mol d'oxygène dans le réacteur peut s'écrire :

$$\frac{dn_{O_2}}{dt} = V_L * k_L\alpha * C^* \quad \text{Eq. 139}$$

Avec, n_{O_2} le nombre de moles d'oxygène, t le temps en h, V_L le volume du compartiment liquide du réacteur en L, $k_L a$ le coefficient de transfert volumétrique de gaz en h^{-1} et C^* la concentration en $mol.L^{-1}$.

Par conséquent,
$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_L}{V_G} RT * C^* * k_L a \quad \text{Eq. 140}$$

Avec $\frac{dP}{dt}$ en $Pa.h^{-1}$.

Or,
$$\frac{dP_{tot}}{dt} = \frac{d(P_{N_2} + P_{O_2})}{dt} \quad \text{Eq. 141}$$

Où P_i la pression partielle du composé i , en Pa.

Sachant que la variation de la pression en azote est stable puisque c'est un gaz neutre non consommé, alors la variation de la pression totale est égale à la variation de la pression en oxygène. Ainsi,

$$\frac{dP_{tot}}{dt} = \frac{dP_{O_2}}{dt} = \frac{V_L}{V_G} * RT * \frac{P_{O_2}}{He} * k_L a \quad \text{Eq. 142}$$

Avec He la constante d'Henry, fonction de la température et exprimée en $L.Pa.mol^{-1}$.

D'où
$$\frac{dP_{O_2}}{P_{O_2}} = \frac{V_L}{V_G} * \frac{RT}{He} * k_L a * dt \quad \text{Eq. 143}$$

Donc
$$\frac{dP_{O_2}}{P_{O_2}(t=0)} = \frac{V_L}{V_G} * \frac{RT}{He} * k_L a * (t - t_0) \quad \text{Eq. 144}$$

Où $\frac{V_L}{V_G} * \frac{RT}{He} * k_L a$ est égale à la valeur de la pente des valeurs expérimentales (Figure 43). Le volume est exprimé en m^3 , la température en degrés Kelvin, le coefficient d'Henry en $L.Pa.mol^{-1}$.

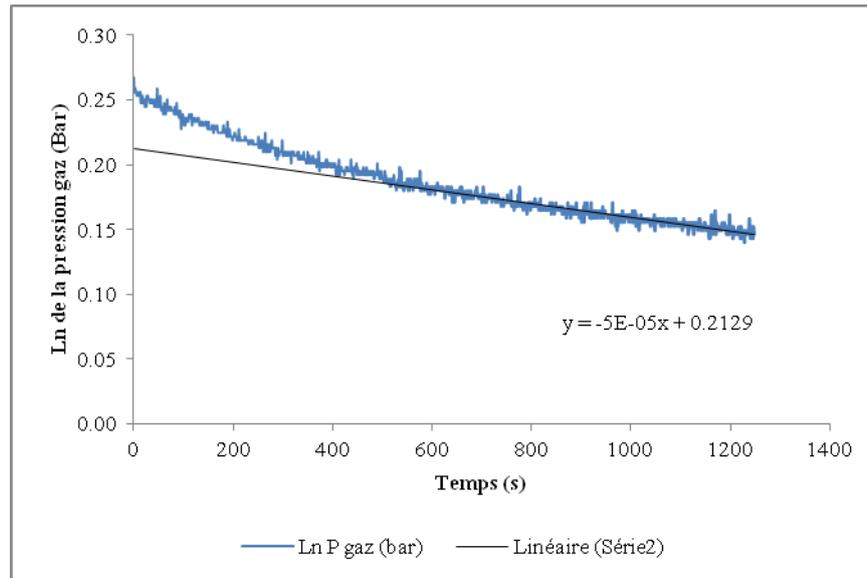


Figure 43 : Courbe de la variation de pression (en bar) dans le compartiment gaz du miniPBR, réalisé en complément d'un suivi colorimétrique (dosage des sulfites)

Ainsi, le coefficient volumique gazeux, $k_L a$, du réacteur lorsque la membrane est en place et après équilibre entre les phases liquide et gaz, est d'environ $0,14 \text{ h}^{-1}$.

1.4.2.2 Le rendement en oxygène

Travaillant à température constante, nous avons pu calculer d'après les travaux de Dahi *et al.* (2015), le rendement en oxygène à partir des variations de pression. D'après l'équation suivante, on considère en fin de manipulation que les volumes gazeux et liquide sont à l'équilibre dans chaque phase, d'où :

$$r_{O_2} = \left[\frac{V_G}{V_L RT} + \frac{1}{H_{O_2}(T)} \right] \frac{dP}{dt} \quad \text{Eq. 145}$$

Où $H_{O_2}(T)$ est le coefficient d'Henry pour l'oxygène. Il a été calculé pour *Arthrospira platensis* à la température de $36 \text{ }^\circ\text{C}$ et dans le milieu de culture Zarrouk, sa valeur est de $10,471 \times 10^4 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ (calculé d'après Schumpe *et al.*, 1985). V_i est le volume du compartiment i et est exprimé en m^3 , R est la constante des gaz parfaits et est égale à $8,31425 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, T la température est exprimée en K. Enfin la pression P est en Pa et le temps t en heures. Dans cette étude, T , V_L et V_G sont fixés à respectivement à $309,15 \text{ K}$, 106 mL et 24 mL . Les mesures réalisées sur le miniPBR ont permis d'obtenir la vitesse de transfert entre les deux compartiments du réacteur par la diminution de la pression dans la phase gazeuse visible sur la Figure 44. La diminution de la pression s'explique par le fait que les sulfites de

la solution contenue dans le compartiment liquide consomment l'oxygène présent dans le compartiment gaz.

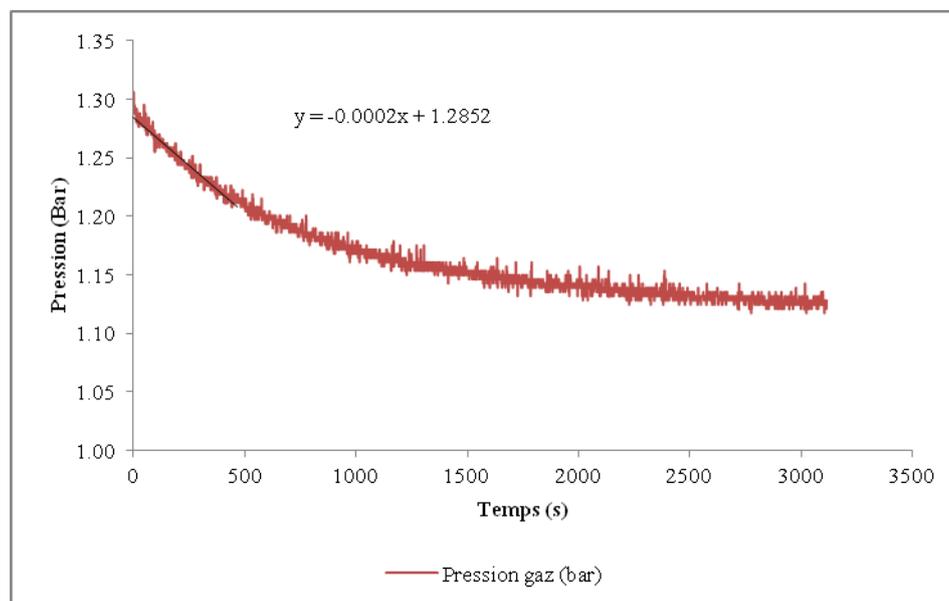


Figure 44 : Variation de la pression en bar dans le compartiment gazeux du miniPBR au cours du test de mesure du KLa

Ainsi, à partir de l'étude de la Figure 44, le $\frac{dP}{dt}$ est connu, le rendement gazeux en oxygène

peut être calculé à partir de l'équation ci-dessus (Eq. 145). Il est à noter que le $\frac{dP}{dt}$ est

estimé sur la phase de décroissance maximale. En effet, lorsque la variation de pression devient stable (phase linéaire), cela signifie qu'il n'y a plus de transfert de gaz (O_2 dans notre cas) du compartiment gazeux vers le liquide. De plus, le dosage colorimétrique des sulfites réalisé en fin de manipulation atteste de l'absence d'oxygène dans le compartiment gazeux et donc que la réaction de consommation de l'oxygène par les sulfites a été complète.

La valeur ainsi calculée, dans le cas de la manipulation avec les sulfites et sans limitation, est de $1,76 \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

2 Validation du miniPBR sur des cultures d'*Arthrospira platensis*

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre s'inscrit dans la thématique du projet BIORAT, et plus généralement dans celle de la boucle MELiSSA. Comme présenté dans la synthèse bibliographique, le projet BIORAT repose sur la culture de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* afin de régénérer l'atmosphère d'un compartiment consommateur. Les contraintes liées à la microgravité (et en particulier son impact sur le transfert gaz/liquide) ont conduit à

proposer un système d'échange membranaire et à développer un mini photobioréacteur spatialisable, dont le fonctionnement a déjà été validé sur terre (Cogne, 2003). Néanmoins, dans la perspective du couplage des différents compartiments de la boucle MELiSSA, une nouvelle problématique est récemment apparue, concernant la possibilité d'alimenter la culture d'*Arthrospira platensis* par un milieu contenant de l'ammonium, à la place ou en complément des nitrates classiquement utilisés. Cette modification de la source d'azote employée nécessite donc une étude approfondie. En effet, le pH du compartiment Spiruline est actuellement de 9,5, ce qui favorise le transfert du CO₂ vers la phase liquide. Néanmoins, ce pH est situé au-dessus du pKa du couple ammonium/ammoniac (pKa = 9,25) ce qui implique d'une part la diminution de la disponibilité de la source d'azote pour la croissance de la cyanobactérie, mais également un problème de toxicité du NH₃ produit. Or, comme indiqué dans la synthèse bibliographique, le seuil de toxicité de l'ammoniac pour *Arthrospira* n'est pas clairement démontré. Enfin, le contrôle de la production d'oxygène s'effectue actuellement par variation de l'intensité lumineuse appliquée à la culture, via un modèle de connaissance. Il apparaît donc indispensable d'évaluer les cinétiques de croissance et de production d'oxygène en présence d'ammonium, afin d'implémenter ce modèle.

L'objectif est donc ici de réaliser des expériences préliminaires afin d'évaluer le comportement d'*Arthrospira platensis* en présence d'ammonium, en utilisant des systèmes de cultures de type « fioles de Roux ». Par la suite, les données observées devront être validées dans le miniphotobioréacteur, ce qui a nécessité de le « moderniser », le système de contrôle et d'acquisition devenu obsolète.

2.1 Les cultures en fioles de Roux

Les fioles de Roux sont des systèmes de culture développés au laboratoire et permettant la conduite de 3 expériences en parallèle. Comme décrit dans le matériel et méthodes, elles sont thermostatées, éclairées par un flux lumineux contrôlable, alimentées en gaz (mélange CO₂/air) avec une composition et un débit connu, agitées, et disposant d'un système de prélèvement/ajout. Enfin, elles sont équipées de condenseurs, limitant l'évaporation et le stripping de l'ammoniac lors des cultures en présence d'ammonium. Une photo de l'installation est présentée sur la Figure 45.



Figure 45 : Installation type pour les expérimentations en fiole de Roux (ici, manipulation à $t=0$)

Dans le cadre de ces expériences, différentes concentrations en azote ont été testées, avec selon les conditions, des nitrates, de l'ammonium, ou un mélange des 2. Un mode de conduite de type fed-batch a été retenu, afin d'augmenter progressivement la charge en NH_3 dans les fioles. Dans la suite de ce chapitre, les expériences sont donc comparées en fonction de la charge quotidienne en azote (1,7 mM N, 3,4 mM N ou 6,8 mM N). Au cours des cultures, des prélèvements ont permis de suivre la concentration en biomasse, en oses totaux, en nitrates et/ou en ammonium, ainsi que le pH (permettant ainsi de calculer la proportion d'ammonium transformée en ammoniac).

2.1.1 Validation du système de culture en Fioles de Roux

Bien que les fioles de Roux aient déjà été utilisées par le passé pour d'autres expériences, nous avons tout d'abord souhaité les valider en réalisant une culture d'*Arthrospira platensis* sur le milieu Zarrouk « standard » (29 mM N- NO_3) et en comparant les résultats obtenus avec le modèle de croissance photosim version 3.0 (2002) développé par Cornet. Compte-tenu de la concentration importante de nitrates dans le milieu initial, cette culture a été réalisée en mode Batch. Ce modèle repose actuellement sur des données liées au métabolisme d'*Arthrospira platensis* lors de cultures sur nitrates, et sur l'étude des transferts radiatifs. La comparaison des données expérimentales et des données prédites permettra donc entre autre, de valider les mesures expérimentales de flux lumineux appliqué. Par ailleurs, cette culture servira de référence pour les autres conditions de culture.

Le design du système de culture étant imposé et la culture étant en batch, pour une irradiance fixée, l'augmentation de la concentration cellulaire induit une variation du flux lumineux moyen reçu par les cellules. Ainsi à faible concentration une partie des photons peut être « perdue » ($\gamma > 1$), alors qu'à forte concentration cellulaire une zone d'ombre apparaît ($\gamma < 1$), diminuant l'irradiance moyenne reçue par les cellules et donc la cinétique de croissance. En revanche, à $\gamma = 1$ l'ensemble des photons mis à disposition sont utilisés par les cellules. Lors des cultures en fiole de Roux, nous avons choisi de nous placer en conditions de limitation par la lumière ($\gamma < 1$). Dans ces conditions, le taux de croissance spécifique étant fonction du flux d'énergie lumineuse, la croissance est alors linéaire en fonction du temps. Néanmoins, le flux lumineux a été augmenté au cours de la culture, afin de maintenir le γ le plus proche possible de 1.

Les données d'entrée du modèle sont donc un fonctionnement en mode batch, le flux lumineux (en W.m^{-2}), la géométrie du réacteur (ici plan éclairé sur 1 seule face), l'épaisseur de culture (en m), la fraction éclairée (en %), les concentrations en biomasse active, EPS, nitrates et sulfates (en kg.m^{-3}). Ne disposant que de la concentration en biomasse totale, nous avons considéré que l'EPS représente 5% de cette biomasse. L'ensemble de ces données d'entrée sont résumés dans le Tableau 18.

Tableau 18: Données d'entrée pour la prédiction de la culture d'*Arthrospira platensis* en fioles de Roux sur milieu Zarrouk

Géométrie du réacteur	plan, éclairé sur 1 face		
Fonctionnement	batch		
Epaisseur de culture (m)	0,035		
Fraction éclairée	100%		
Irradiance (W.m^{-2})	24	46	67
Durée du batch (h)	48	72	72
Concentration en biomasse active (kg.m^{-3})	0,19 ^a	0,511 ^b	1,35 ^b
Concentration en EPS (kg.m^{-3})	0,01 ^a	0,08 ^b	0,27 ^b
Concentration en nitrates (kg.m^{-3})	2,50	2,32 ^b	1,90 ^b
Concentration en sulfates (kg.m^{-3})	1,00	0,99 ^b	0,96 ^b

^a Calculés à partir de la concentration initiale en biomasse totale dans la fiole et en prenant 5% comme concentration en EPS dans cette biomasse.

^b Données obtenues à la fin de la phase précédente de modélisation.

Les résultats expérimentaux et prédits sont reportés sur la Figure 46.

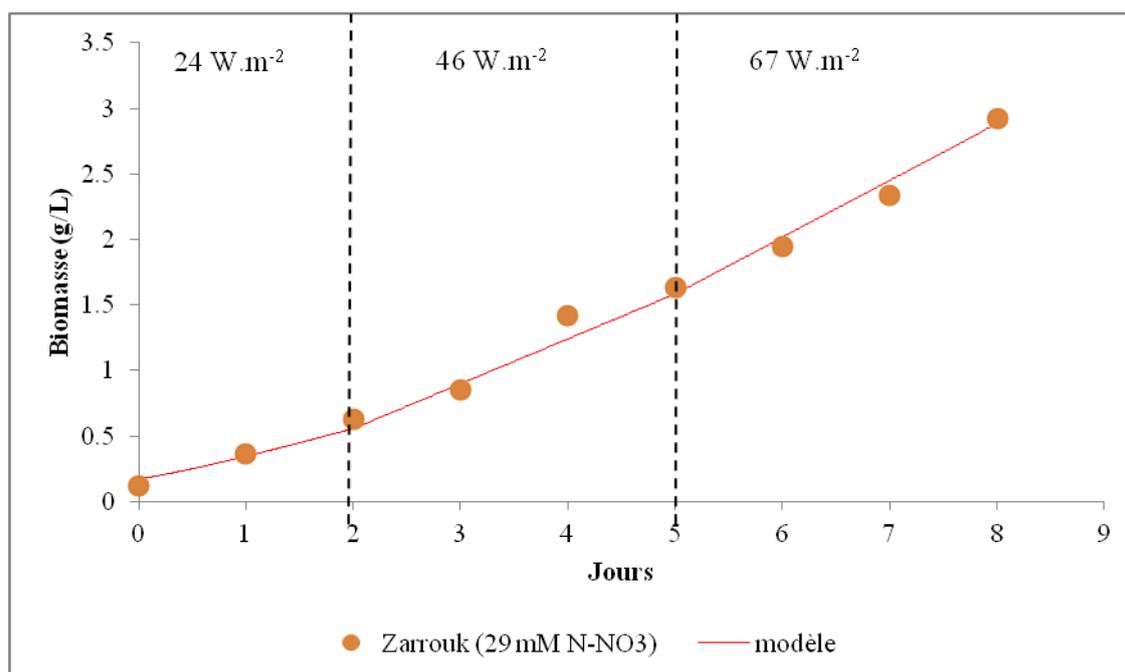


Figure 46: Comparaison des courbes de croissance expérimentales sur milieu Zarrouk (29 mM N-NO₃) et prédites par le modèle photosim.

Ainsi, nous observons une parfaite correspondance entre les concentrations cellulaires expérimentales et prédites par le modèle, permettant de valider le système de culture en fioles de Roux, et ainsi d'envisager leur utilisation pour les cultures en présence d'ammonium.

2.1.2 Concentrations en azote de 1,7 mM

Dans un premier temps, nous avons souhaité comparer la croissance d'*Arthrospira platensis* lors d'un apport quotidien d'une concentration molaire équivalente en N de 1,7 mM, soit sous forme de nitrates (culture appelée par la suite 1,7 mM N-NO₃), soit sous forme d'ammonium (culture appelée 1,7 mM N-NH₄). Le choix s'est porté sur cette concentration car comme décrit dans la synthèse bibliographique, une concentration toxique de 2 mM est généralement admise pour *Arthrospira platensis*, bien que ce seuil n'ait pas été établi pour cette cyanobactérie. Par ailleurs, Carvalho *et al.* (2004) ont montré qu'en dessous de 1,6 mM de concentration en azote, des effets irréversibles sur les cellules étaient observables, dus à une limitation nutritive. C'est pourquoi, nous avons choisi de travailler à la concentration de 1,7 mM d'azote, et en mode Fed-batch avec un ajout journalier après dosage afin de revenir à la concentration initiale. L'objectif était d'éviter les limitations dans les conditions de faible concentration et de limiter l'effet toxique dans le cas de l'utilisation de l'ammonium.

Les cinétiques de croissance obtenues dans ces 2 conditions de culture (1,7 mM N-NO₃ et 1,7 mM N-NH₄) sont reportées sur la Figure 47 et comparées aux données prédites par le modèle.

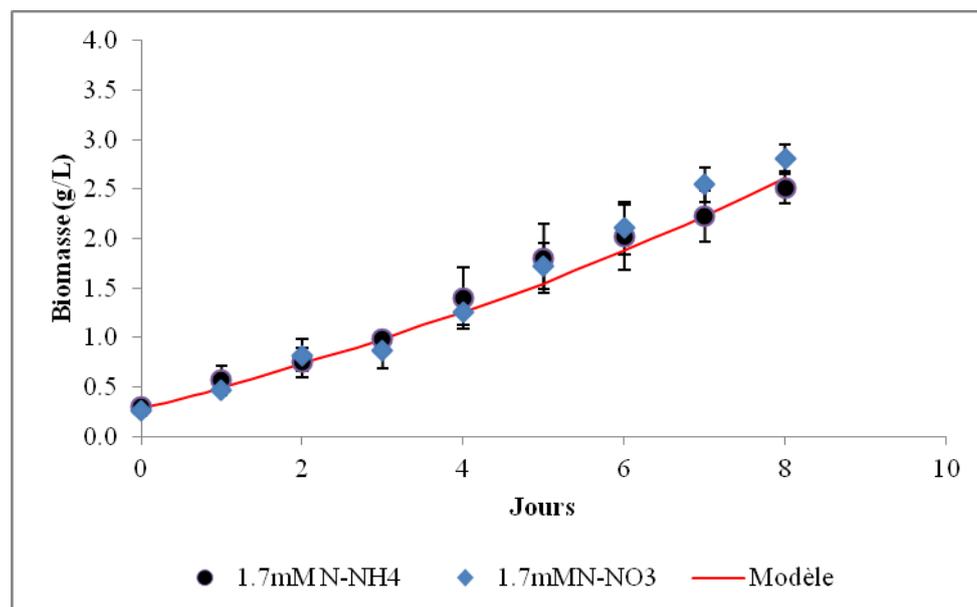


Figure 47: Courbes de croissance à 1,7 mM d'azote journalier (Fed-batch) et comparaison avec le modèle de croissance Photosim. Moyennes de 3 cultures par condition. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

Aucune différence significative n'est observée dans la cinétique de croissance d'*Arthrospira platensis* avec un apport journalier de 1,7 mM d'azote. En effet, la concentration cellulaire dans la fiole avec l'ammonium passe de 0,29 g.L⁻¹ à 2,51 g.L⁻¹, soit une productivité en biomasse r_X de $0,28 \pm 0,029$ g.L⁻¹.j⁻¹ et de 0,26 g.L⁻¹ à 2,80 g.L⁻¹ dans le cas de la fiole avec les nitrates soit une productivité en biomasse r_X de $0,32 \pm 0,024$ g.L⁻¹.j⁻¹. Par ailleurs, ces deux cinétiques de croissance coïncident avec la courbe prédite par le modèle.

A chaque prélèvement, les concentrations résiduelles en ammonium et en nitrate ont été quantifiées dans le but de remettre à niveau la quantité d'azote disponible, ainsi que pour réaliser un suivi de la consommation d'azote. Une mesure de pH a également été réalisée afin d'évaluer la formation de NH₃.

Concernant la fiole de Roux à 1,7 mM N-NO₃, on observe sur la Figure 48 une concentration initiale en N-NO₃ supérieure aux 1,7 mM prévus. Cette quantité de nitrates trop importante vient du fait que l'inoculum (10% du volume de la culture) provient d'une préculture sur cette même source d'azote et dans laquelle les nitrates n'étaient pas épuisés. De ce fait, la supplémentation quotidienne en N-NO₃ à hauteur de 1,7 mM n'a été réalisée qu'à partir du J2

et la quantité de N-NO₃ dosée quotidiennement dans la fiole ne varie que légèrement, indiquant une consommation régulière de la source d'azote. Ceci est vérifié en traçant la consommation cumulée en N-NO₃ au cours du temps (Figure 48) qui semble linéaire ce qui s'explique par le fait que la croissance se fait en conditions de limitation par la lumière et non en condition de limitation nutritionnelle. La rupture de pente observée au 4^{ème} jour correspond à une augmentation du flux lumineux. Ainsi, une vitesse moyenne de consommation d'azote de 1 mM.j⁻¹ a pu être calculée.

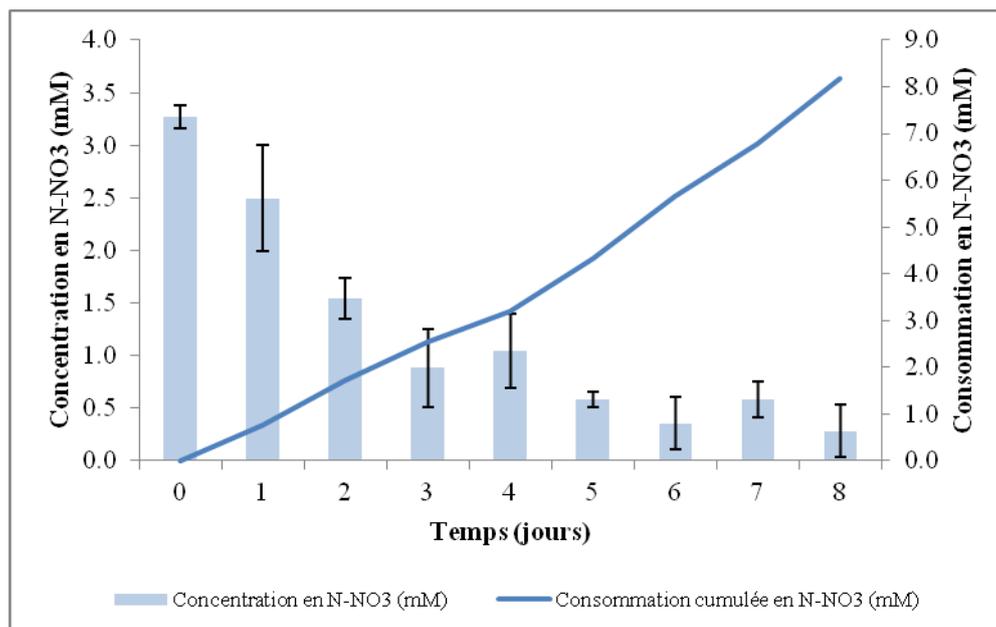


Figure 48: Culture à 1,7 mM N-NO₃ : concentration résiduelle en N-NO₃ lors du prélèvement quotidien et consommation cumulée.

De la même façon, les concentrations en N-NH₄ résiduelles, consommées, ou transformées en NH₃ ont été reportées sur la Figure 49.

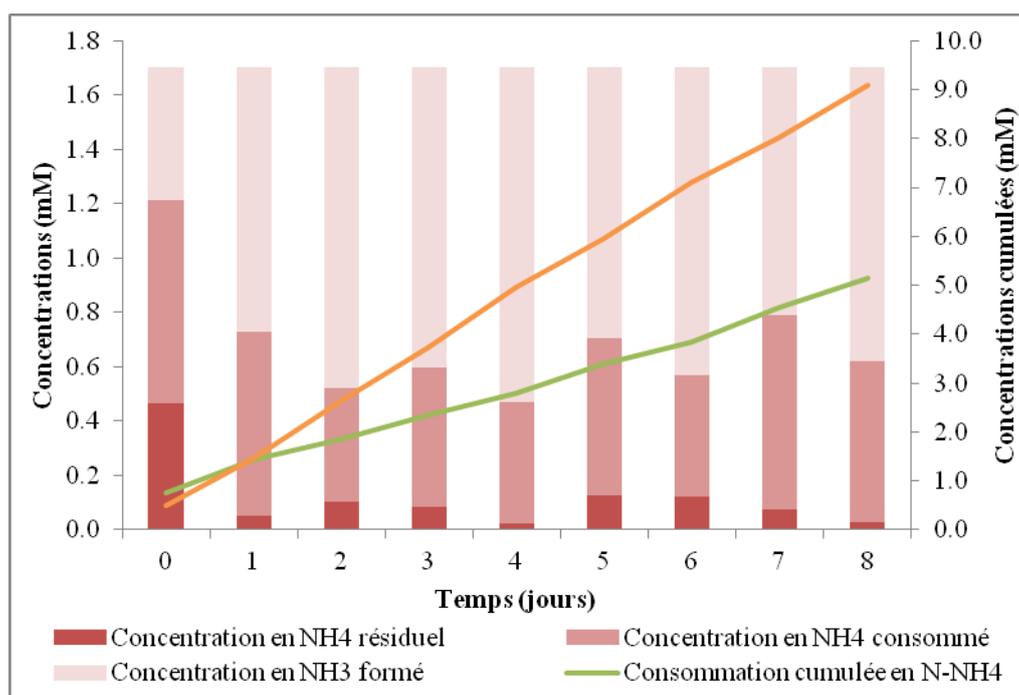


Figure 49: Culture à 1,7 mM N-NH₄. Suivi des concentrations en NH₄, NH₃ formé, NH₄ consommé. Données quotidiennes et cumulées.

Dans ces conditions de culture, on observe que la quantité quotidienne de N-NH₄ résiduel est très faible voire nulle. En effet, une forte proportion de l'azote mis à disposition sous forme de NH₄ est en réalité transformée en NH₃ aux pH élevés mesurés quotidiennement, atteignant une concentration cumulée de 9,1 mM. Ainsi, la quasi-totalité de l'azote restante sous forme NH₄ est alors consommé par la cyanobactérie, induisant une situation de limitation voire de carence en azote. La vitesse de croissance et la production de biomasse observées pourraient donc être sous-estimées puisque limitées par la disponibilité en NH₄ (limitation en azote). De la même façon, la vitesse de consommation du N-NH₄ a été estimée à 0,7 mM.j⁻¹ ce qui est inférieur aux 1 mM.j⁻¹ obtenus dans le cas de la culture sur nitrates, mais là encore la limitation en azote pourrait avoir entraîné une sous-estimation.

Par ailleurs, nous avons remarqué que dans la fiole contenant 1,7 mM N-NH₄ dans le milieu, les cellules d'*Arthrospira platensis* se sont décolorées. A la différence de la première fiole de Roux, contenant les nitrates, les cellules sont passées d'un vert intense à un vert-jaune pâle (Figure 50).

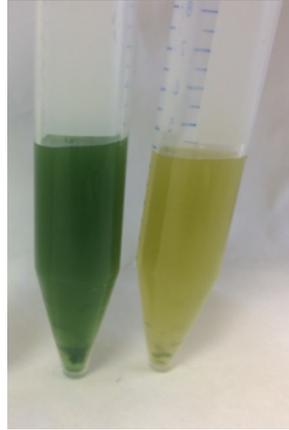


Figure 50 : Observation de la coloration des cultures. Gauche : culture à 1,7 mM N-NO₃ ; Droite : culture à 1,7 mM N-NH₄.

Ce phénomène peut être dû à la limitation azotée (Cornet *et al.*, 1998). En effet, la présence de limitations en nutriment entraîne une modification du métabolisme de la cellule. Certains pigments, les phycocyanines et les chlorophylles, sont dégradés afin d'être utilisés comme source d'azote pour assurer la synthèse d'autres protéines. Plus la carence sera importante, plus la culture va devenir pâle et tendre vers une couleur jaune (Sassano *et al.*, 2007, Rodrigues *et al.*, 2010). Cependant, il semble que ce phénomène soit réversible dès lors que la quantité d'azote redevient suffisante dans le milieu (Deschoenmaeker *et al.*, 2016). Ce phénomène pourrait expliquer le fait qu'aucune différence significative de la cinétique de croissance n'ait été observée, malgré la carence en azote constatée.

Les cultures à 1,7 mM d'azote n'ayant pas montré de différence en terme de cinétiques de croissance, et ce malgré une concentration finale de 9,1 mM en NH₃ dans le cas de la culture sur ammonium (concentration initialement supposée toxique), d'autres cultures ont été réalisées avec un apport quotidien de 3,4 mM d'azote.

2.1.3 Concentrations en azote de 3,4 mM

Dans cette seconde série d'expériences, une concentration molaire équivalente en N de 3,4 mM est apportée quotidiennement, soit sous forme de nitrates (culture appelée par la suite 3,4 mM N-NO₃), soit sous forme d'un mélange équimolaire de nitrates et d'ammonium (culture appelée 3,4 mM N - 1,7 mM N-NO₃ + 1,7 mM N-NH₄), soit sous la forme d'un « double fed-batch » avec un apport de 1,7 mM N-NH₄ deux fois par jour (culture appelée 1,7 mM N-NH₄ 2x).

Les courbes de croissance pour ces trois conditions et la comparaison avec le modèle photosim sont reportées sur la Figure 51.

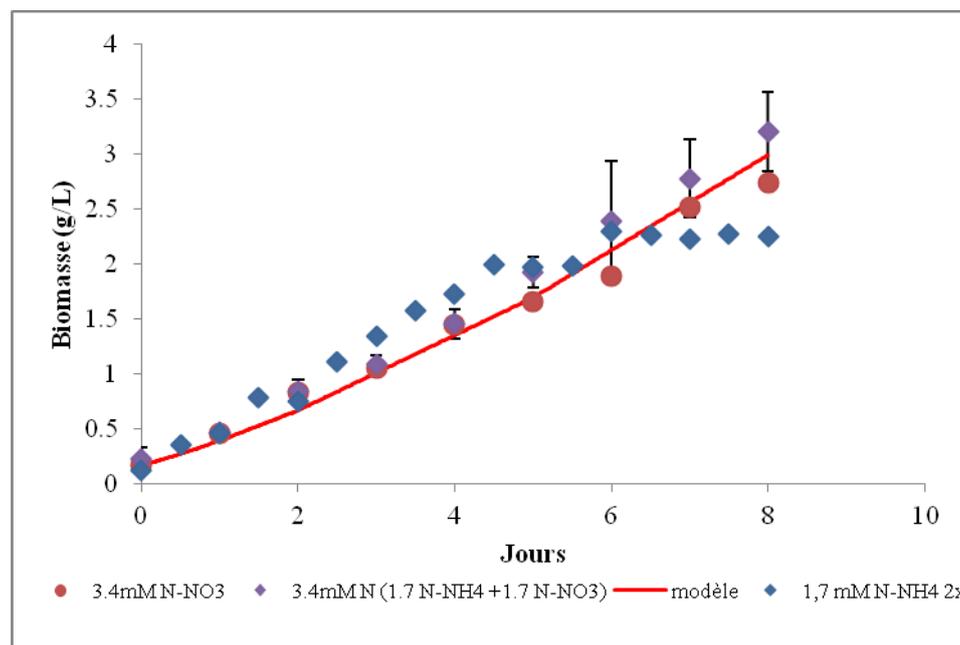


Figure 51 : Courbes de croissance à 3,4 mM d'azote journalier et comparaison avec le modèle de croissance Photosim. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (3 répétitions) pour la culture en mélange.

Pour la culture contenant 3,4 mM N-NO₃ et celle à 3,4 mM N sous forme de mélange, les cinétiques de croissance sont similaires, et restent cohérentes avec la prédiction du modèle. Dans le cas de la culture avec 3,4 mM de nitrates, la concentration cellulaire est passée de 0,17 g.L⁻¹ à 3,13 g.L⁻¹, soit une productivité en biomasse r_X de $0,32 \pm 0,077$ g.L⁻¹.j⁻¹. Cette productivité en biomasse est identique à celle précédemment obtenue pour la culture à 1,7 mM N-NO₃, ce qui est cohérent avec le fait que la cinétique de croissance traduisait uniquement une condition de limitation par le flux lumineux, et non pas une limitation nutritionnelle. Ainsi, apporter d'avantage d'azote dans le milieu n'augmente pas la vitesse de croissance. Pour la culture contenant 3,4 mM d'azote apportée sous la forme d'un mélange équimolaire de nitrates et d'ammonium, la concentration cellulaire passe de 0,23 g.L⁻¹ à 3,21 g.L⁻¹, soit une productivité en biomasse $r_X = 0,37 \pm 0,059$ g.L⁻¹.j⁻¹. Compte-tenu des écarts-types, la différence de productivité en biomasse par rapport à la culture sur nitrates est jugée non significative. En revanche, pour la culture réalisée avec l'ammonium seul sous forme de 2 apports quotidiens à 1,7 mM, (1,7 mM N-NH₄ 2x), la vitesse de croissance semble légèrement supérieure durant 4,5 jours, puis la concentration cellulaire se stabilise et la croissance semble

stoppée. Ainsi, la concentration cellulaire passe de $0,12 \text{ g.L}^{-1}$ à $1,99 \text{ g.L}^{-1}$ à 4,5 jours et reste stable autour de $2,25 \text{ g.L}^{-1}$ entre les J6 et J8, ce qui représente une productivité en biomasse $r_x = 0,27 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Cette productivité en biomasse semble donc légèrement inférieure à celles obtenues précédemment, ce qui semble cohérent étant donné qu'elles ont été calculées sur la totalité de l'expérience et compte-tenu du « plateau » atteint en fin de culture. En revanche, sur la première partie de la culture, les concentrations cellulaires sont plus élevées que pour les autres conditions ce qui pourrait traduire une vitesse de croissance plus importante. Cette observation pourrait donc aller dans le sens d'une assimilation simplifiée du NH_4 dans le métabolisme d'*Arthrospira platensis* (Deroche, 1983). Néanmoins, cette expérience n'ayant pas fait l'objet de répétition, il est difficile de savoir si la vitesse de croissance est réellement plus élevée. Afin d'évaluer cet aspect cinétique, le taux de croissance maximal apparent ($\mu_{\text{max, app.}}$) et le temps de génération (T_g) ont été calculés pour cette culture et pour celle réalisée avec un apport de $3,4 \text{ mM}$ de nitrates. Les résultats obtenus sont $\mu_{\text{max, app.}} = 0,54 \text{ j}^{-1}$ et $T_g = 1,30 \text{ j}$ pour la culture $1,7 \text{ mM N-NH}_4$ 2x, contre $\mu_{\text{max, app.}} = 0,51 \text{ j}^{-1}$ et $T_g = 1,37 \text{ j}$ pour la culture $3,4 \text{ mM N-NO}_3$. Ces résultats ne semblent donc que très peu différents et nécessiteront d'autres expériences avant de pouvoir tirer des conclusions.

Afin de mieux comprendre le comportement cinétique d'*Arthrospira platensis*, les concentrations en nitrates et ammonium ont été dosées à chaque prélèvement, permettant d'établir des suivis des concentrations résiduelles et de la consommation d'azote.

Les résultats obtenus pour la culture à $3,4 \text{ mM N-NO}_3$ sont présentés sur la

Figure 52. Comme précédemment pour la culture à $1,7 \text{ mM N-NO}_3$, la concentration initiale en nitrates est trop élevée par rapport à la concentration ciblée et provient de l'inoculum. Le profil de consommation est également similaire, avec une concentration résiduelle en N-NO_3 peu différente d'un jour à l'autre à partir du J3, et comprise entre $1,78$ et 2 mM N-NO_3 . Ceci confirme également les observations précédentes, selon lesquelles dans nos conditions de flux lumineux, un apport quotidien de $1,7 \text{ mM N-NO}_3$ n'est pas limitant pour la cyanobactérie. Enfin, la consommation cumulée en N-NO_3 est relativement linéaire, avec une vitesse de consommation de l'azote de $1,4 \text{ mM}.\text{j}^{-1}$.

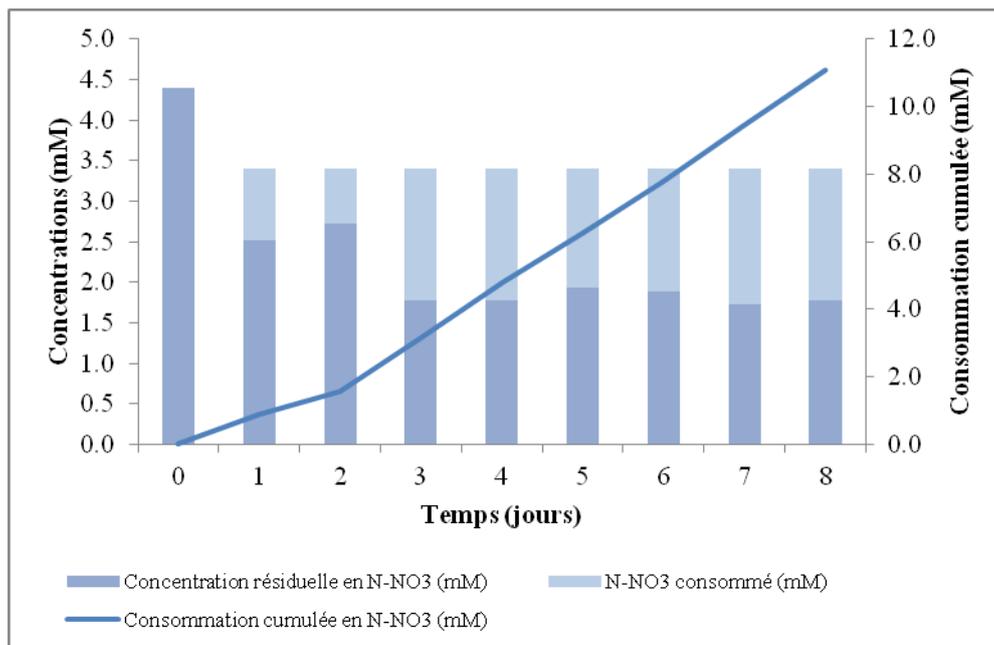


Figure 52 : Culture à 3,4 mM N-NO₃. Suivi des concentrations en N-NO₃ résiduelles et consommées.

Dans la fiole contenant le mélange de sources azotées (3,4 mM N - 1,7 mM N-NO₃ + 1,7 mM N-NH₄) les suivis de concentrations et les calculs de consommations montrent que les cyanobactéries consomment à la fois les nitrates et l'ammonium (Figure 53).

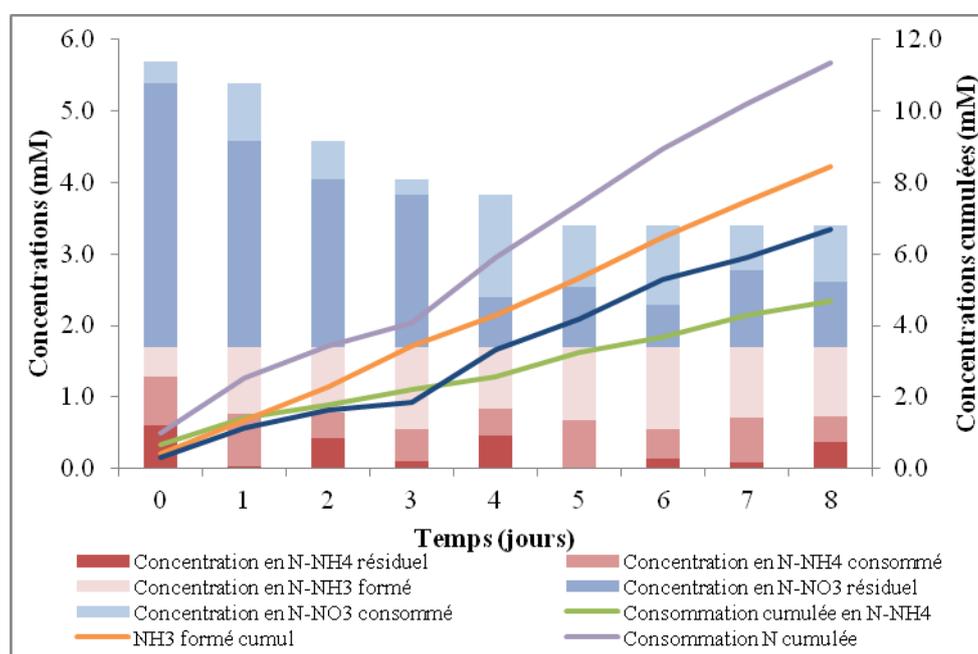


Figure 53 : Culture en mélange avec un apport quotidien de 3,4 mM d'azote (1,7 mM N-NH₄ + 1,7 mM N-NO₃). Suivi des concentrations en NH₄, NO₃, NH₃ formé, NH₄ consommé et NO₃ consommé. Données quotidiennes et cumulées.

En effet, quotidiennement la concentration résiduelle en ammonium est proche de zéro à la différence de celle en nitrates. Néanmoins, cette faible quantité de NH₄ résiduel dans le milieu

est due en majeure partie à la transformation de l'ammonium en ammoniac, qui atteint une concentration cumulée de 8,5 mM à la fin de la culture. La vitesse de consommation du N-NH₄ a été calculée à 0,65 mM.j⁻¹, ce qui est du même ordre de grandeur que lors de la culture à 1,7 mM N-NH₄ (0,7 mM.j⁻¹). En revanche, la limitation en azote constatée par les dosages et confirmée par la décoloration des cellules lors de cette précédente culture, n'est pas retrouvée ici, puisque même si la quantité d'ammonium est limitante, les cellules disposent toujours de nitrates pour leur croissance. Par ailleurs, aucune modification des pigments n'a été constatée visuellement. La vitesse de consommation moyenne du N-NO₃ ayant été calculée à 0,84 mM.j⁻¹, on obtient au global une vitesse de consommation de l'azote de 1,4 mM.j⁻¹, ce qui est identique à la culture à 3,4 mM N-NO₃. Lochab *et al.* (2014) et Doeshenmaker (2016) ont montré par des études transcriptomiques qu'en présence de NH₄ dans le milieu, une modification de l'expression de certains gènes était observée. En effet, l'expression des gènes *ntcA*, *nrtA* (encodant pour les sous-unités des transporteurs nitrite et nitrate), *narB* (encodant la nitrate reductase NarB) et *nirA* (encodant la nitrite reductase NirA) se voit réduite et celle du gène *narM* (rôle dans la transformation de l'ammonium) augmentée. Cette répression de l'expression des gènes est responsable de la diminution de l'assimilation des nitrates, ce qui ici aurait dû se traduire par un « temps d'adaptation » métabolique pour passer d'une source d'azote à l'autre, et donc une vitesse globale de consommation d'azote plus faible. Néanmoins, ces études ont été réalisées à des concentrations en ammonium plus élevées que dans nos conditions (> 4 mM N-NH₄ pour Lochab *et al.*, et 28,5 mM pour Doeshenmaker *et al.*) suggérant que cette répression des gènes nécessite d'atteindre une concentration seuil en NH₄ dans le milieu de culture.

Enfin, pour la culture réalisée en « double fed-batch » avec un apport de 1,7 mM N-NH₄ 2 fois par jour (culture appelée 1,7 mM N-NH₄ 2x), les données de concentrations en NH₄ résiduel, en NH₃ formé, et NH₄ consommé sont reportés sur la Figure 54.

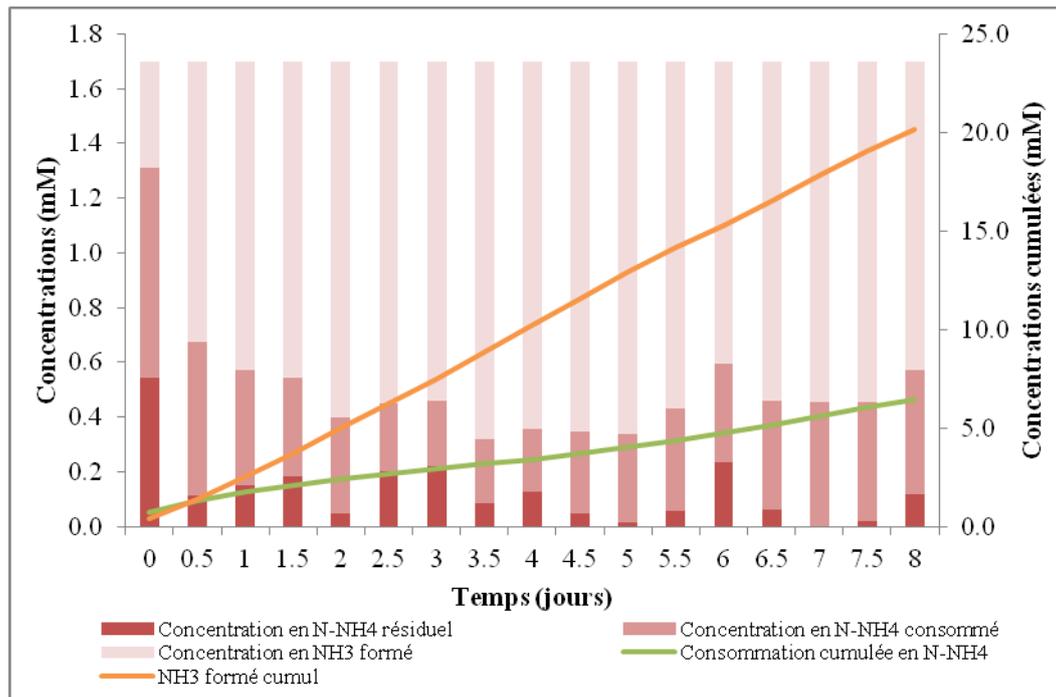


Figure 54 : Culture à 3,4 mM N-NH₄ en 2 apports quotidiens (1,7 mM N-NH₄ 2x). Suivi des concentrations en NH₄, NH₃ formé, NH₄ consommé. Données quotidiennes et cumulées.

Tout d'abord, les résultats montrent quotidiennement la présence résiduelle d'ammonium dans la culture, même si elle est parfois très faible, excepté au J7 où aucune trace n'a été détectée. Néanmoins, contrairement à la culture à 1,7 mM N-NH₄ où une carence récurrente avait été détectée, aucune décoloration des cellules n'a été observée. En ce qui concerne la concentration en NH₃ formé, elle est ici très importante, atteignant 20 mM à la fin de la culture. Par ailleurs, alors que la concentration cellulaire est restée stable après environ 5 jours de culture (jour auquel la concentration cumulée en NH₃ atteignait 13 mM), la consommation en N-NH₄ reste linéaire. Cette vitesse de consommation, estimée à 0,81 mM.j⁻¹, est plus faible que celle précédemment obtenue.

2.1.4 Concentration en azote de 6,8 mM

Bien qu'un impact de la présence d'ammoniac sur la cinétique de croissance ait été détectée pour la culture à 3,4 mM d'ammonium (1,7 mM N-NH₄ 2x), nous avons souhaité tester une concentration encore plus importante, avec un apport quotidien de 6,8 mM N-NH₄ en 2 apports quotidiens (3,4 mM N-NH₄ 2x). La courbe de la concentration cellulaire est reportée sur la Figure 55, et comparée à la cinétique de croissance précédemment obtenue (1,7 mM N-NH₄ 2x) et celle prédite par le modèle.

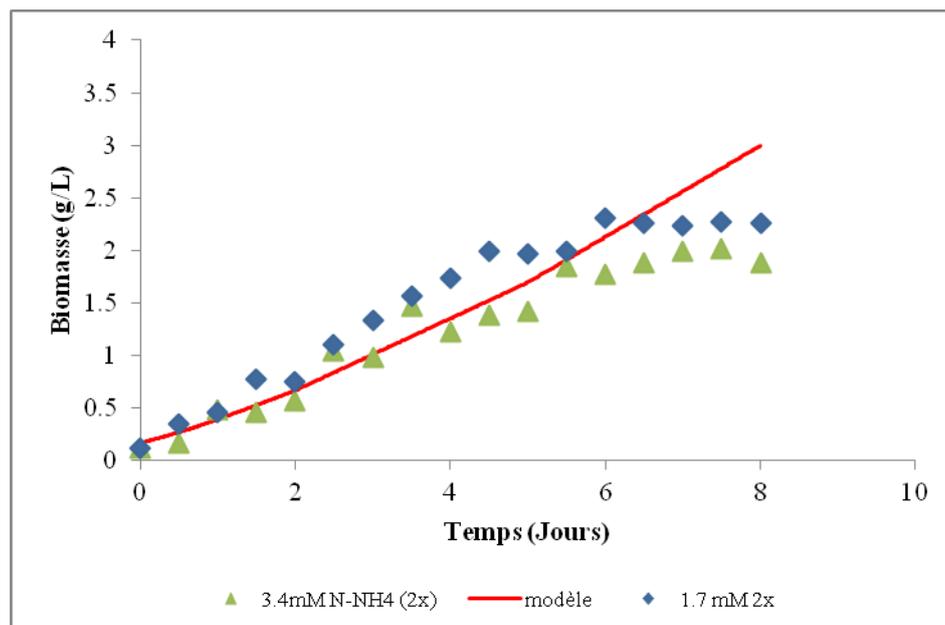


Figure 55 : Courbes de croissance à 6,8 et 3,4 mM d'azote journalier en 2 apports quotidiens (respectivement cultures 3,4 mM N-NH₄ 2x et 1,7 mM N-NH₄ 2x) et comparaison avec le modèle de croissance Photosim.

Pour cette nouvelle culture réalisée avec 6,8 mM d'ammonium sous forme de 2 apports quotidiens à 3,4 mM, (3,4 mM N-NH₄ 2x), la vitesse de croissance reste cohérente avec la prédiction du modèle dans une première phase d'environ 5,5 jours. Par la suite, la concentration cellulaire se stabilise et la croissance semble stoppée. Ainsi, la concentration cellulaire passe de 0,12 g.L⁻¹ à 2 g.L⁻¹, ce qui représente une productivité en biomasse $r_X = 0,25 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Cette productivité en biomasse est donc la plus faible obtenue jusqu'ici, ce qui semble logique étant donné qu'elle a été calculée sur la durée totale de l'expérience. En revanche, le taux de croissance maximal apparent ($\mu_{\text{max app.}}$) et le temps de génération (T_g) ont été calculés pour cette culture et donnent $\mu_{\text{max app.}} = 0,60 \text{ j}^{-1}$ et $T_g = 1,16 \text{ j}$. Ces valeurs indiqueraient une croissance légèrement plus rapide que pour les cultures à 1,7 mM N-NH₄ 2x ($\mu_{\text{max app.}} = 0,54 \text{ j}^{-1}$ et $T_g = 1,30 \text{ j}$) et 3,4 mM N-NO₃ ($\mu_{\text{max app.}} = 0,51 \text{ j}^{-1}$ et $T_g = 1,37 \text{ j}$), montrant un « effet bénéfique » de la présence d'ammonium sur la croissance cellulaire, tout du moins dans une première phase, avant que la concentration en ammoniac n'atteigne un seuil toxique. Cette observation est en accord avec l'étude de Markou *et al.*, (2014a), qui observe un taux de croissance légèrement supérieur au témoin (29 mM N-NO₃) pour des cultures réalisées avec 100 mg.L⁻¹ d'azote sous forme NH₄Cl (7,14 mM N-NH₄). En revanche un effet négatif est observé à des concentrations supérieures. Néanmoins, cette expérience n'ayant pas fait l'objet de répétitions, ces résultats sont à prendre avec précaution et nécessiteront d'être confirmés.

Les données de concentrations en NH_4 résiduel, en NH_3 formé, et NH_4 consommé sont reportées sur la Figure 56.

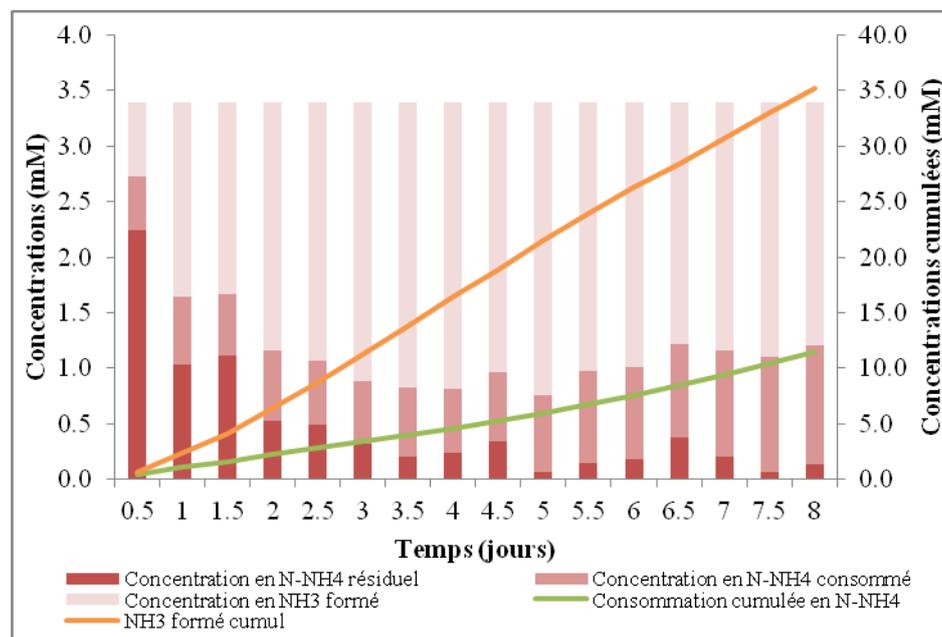


Figure 56: Culture à 6,8 mM N-NH₄ en 2 apports quotidien (culture 3,4 mM N-NH₄ 2x). Suivi des concentrations en NH₄, NH₃ formé, NH₄ consommé. Données quotidiennes et cumulées.

Les résultats montrent quotidiennement la présence résiduelle d'ammonium dans la culture, ce qui est cohérent par rapport à la culture précédente (1,7 mM N-NH₄ 2x). En ce qui concerne la concentration en NH₃ formé, elle est logiquement encore plus importante, atteignant 35 mM à la fin de la culture. En revanche, alors que la concentration cellulaire s'était stabilisée pour une concentration cumulée en NH₃ d'environ 13 mM, ici c'est seulement à une concentration en NH₃ d'environ 23 mM que la croissance s'arrête. La « concentration seuil » en NH₃ induisant l'arrêt de la croissance n'a donc pas clairement pu être établie par cette série d'expériences. Comme précédemment, la consommation en N-NH₄ reste linéaire même après l'arrêt de la croissance, avec une vitesse de consommation de 1,44 mM.j⁻¹, similaire à celle obtenue pour les cultures à 3,4 mM N-NO₃ (1,40 mM.j⁻¹) et 3,4 mM en mélange (1,7 mM N-NO₃ + 1,7 mM N-NH₄ ; 1,42 mM.j⁻¹).

Dans le cadre de la boucle MELiSSA, l'apport en ammonium ne se fera pas seul, mais en complément des nitrates contenus dans le milieu Zarrouk. Une dernière série d'expériences a donc été réalisée, cette fois en supplémentant le milieu Zarrouk avec de l'ammonium.

2.1.5 Cultures en milieu Zarrouk supplémenté avec de l'ammonium

Les milieux de culture utilisés étaient composés d'une concentration en nitrates correspondant au milieu d'origine (29 mM N-NO₃), et supplémenté avec de l'ammonium à différentes concentrations molaires (1,7 mM ou 3,4 mM). L'objectif était d'étudier l'impact de l'ammonium sur la croissance cellulaire d'*Arthrospira platensis* en s'affranchissant des limitations azotées éventuelles. Le mode de culture utilisé est toujours un fed-batch pour l'ammonium (concentrations réajustées quotidiennement). En revanche, compte-tenu de la concentration initiale élevée en nitrates, celle-ci n'a pas été réajustée en cours de culture.

Les cinétiques de croissance obtenues pour le milieu supplémenté à 1,7 mM N-NH₄ (culture appelée Zarrouk + 1,7 mM N-NH₄), et celui supplémenté à 3,4 mM N-NH₄ (culture appelée Zarrouk + 3,4 mM N-NH₄), sont reportés sur la Figure 57. Une culture en milieu Zarrouk non supplémenté est également présentée à titre comparatif.

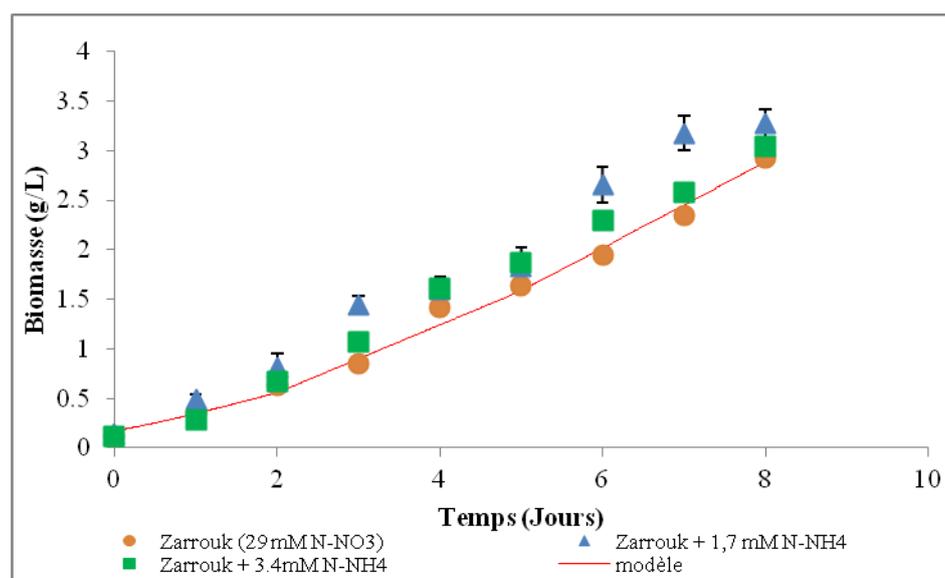


Figure 57: Courbes de croissance en milieu Zarrouk non supplémenté, ou supplémenté en ammonium à hauteur de 1,7 mM ou 3,4 mM et comparaison avec le modèle de croissance Photosim. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types (2 répétitions) pour la culture Z + 1,7 mM N-NH₄.

Le suivi de la croissance d'*Arthrospira platensis* dans les trois fioles de Roux montre peu de différences durant les premiers jours. Pour la culture réalisée en milieu Zarrouk non supplémenté, la concentration cellulaire passe de 0,12 g.L⁻¹ à 2,92 g.L⁻¹, soit un r_x de 0,35 g.L⁻¹.j⁻¹. De la même façon, pour le milieu Zarrouk + 3,4 mM N-NH₄, la concentration cellulaire passe de 0,12 g.L⁻¹, à 3,04 g.L⁻¹, soit un r_x de 0,37 g.L⁻¹.j⁻¹, ce qui est totalement similaire, et conforme au modèle de croissance développé sur nitrates. En revanche, pour la

culture dans le milieu supplémenté à 1,7 mM N-NH₄, la croissance semble plus importante à partir du 4^{ème} jour. Ainsi, la concentration cellulaire passe de 0,13 g.L⁻¹ à 3,62 g.L⁻¹ en fin de test, soit un μ_{max} de 0,44 g.L⁻¹.j⁻¹. Ce résultat suggère donc un « effet bénéfique » de la présence d'ammonium sur la croissance cellulaire, comme précédemment observé pour la culture à 3,4 mM N-NH₄ 2x. Néanmoins, cet effet positif devrait logiquement être observé également pour la culture contenant 3,4 mM d'ammonium, ce qui n'est pas le cas ici. Bien que la condition de culture en milieu Zarrouk supplémenté par 1,7 mM N-NH₄ ait été réalisée deux fois, des différences importantes dans les concentrations cellulaires ont été obtenues. Il sera donc nécessaire de confirmer cette observation par d'autres expériences.

Quotidiennement, des dosages des nitrates et de l'ammonium ont été réalisés. La Figure 58 présente les concentrations en nitrates résiduelles et consommées pour la culture en milieu Zarrouk non supplémenté.

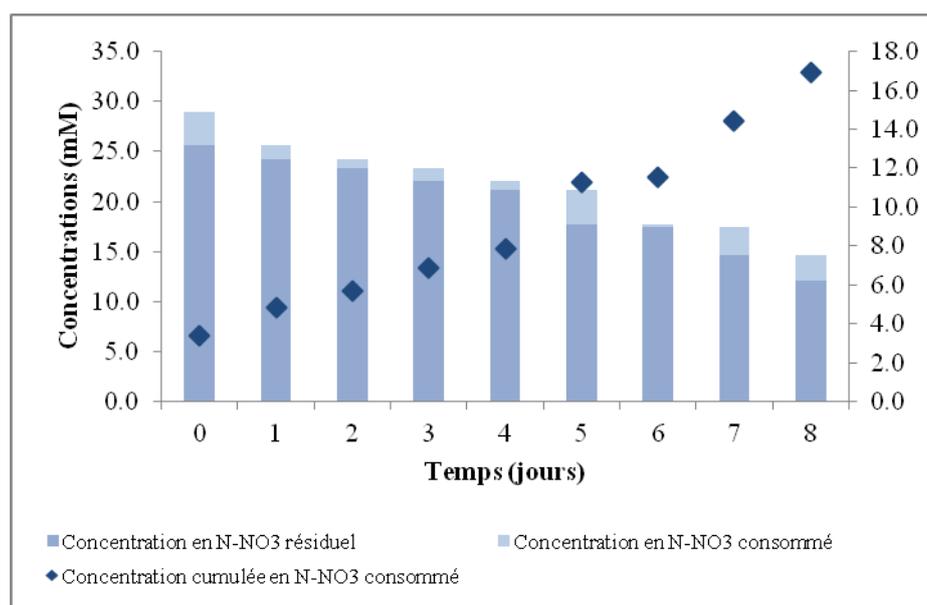


Figure 58 : Culture sur milieu Zarrouk (29 mM N-NO₃). Suivi des concentrations en N-NO₃ résiduelles et consommées.

Comme prévu par le modèle, la concentration en nitrates contenue dans le milieu Zarrouk n'est pas limitante pour la croissance d'*Arthrospira platensis* durant 8 jours et dans nos conditions de flux lumineux. En effet, la concentration résiduelle en fin de culture est d'environ 6 mM. Par ailleurs, si l'on observe la courbe correspondant à la concentration cumulée en N-NO₃ consommé, on observe une rupture de pente après 4 jours, qui correspond à une augmentation du flux lumineux. La vitesse de consommation des nitrates est donc bien linéaire sur chacune des phases et liée à une condition de limitation par la lumière.

Pour la culture en milieu Zarrouk + 1,7 mM N-NH₄, les concentrations en N-NH₄ et N-NO₃ résiduelles, consommées, et NH₃ formé sont reportées sur la Figure 59.

La concentration en N-NH₄ dosée quotidiennement dans la fiole est très faible, voire même nulle aux 3^{ème} et 8^{ème} jours. Cette situation de limitation/carence en ammonium avait déjà été observée lors de la culture à 1,7 mM N-NH₄ et celle en mélange (1,7 mM N-NO₃ + 1,7 mM N-NH₄). Néanmoins, dans le cas de cette expérience, la présence de 29 mM de nitrates évite aux cellules d'être en réelle situation de carence en azote. Par ailleurs, la consommation totale en ammonium atteint seulement 3,11 mM en fin de culture, alors que 4,6 mM avaient été consommés lors de la culture en mélange. En ce qui concerne la consommation des nitrates, elle atteint 17 mM à la fin de la culture, ce qui est similaire à la consommation observée pour la culture sur milieu Zarrouk classique. De ce fait, une quantité plus importante d'azote a été consommée lors de cette culture (de l'ordre de 21 mM), ce qui est cohérent avec l'obtention d'une quantité de biomasse plus importante.

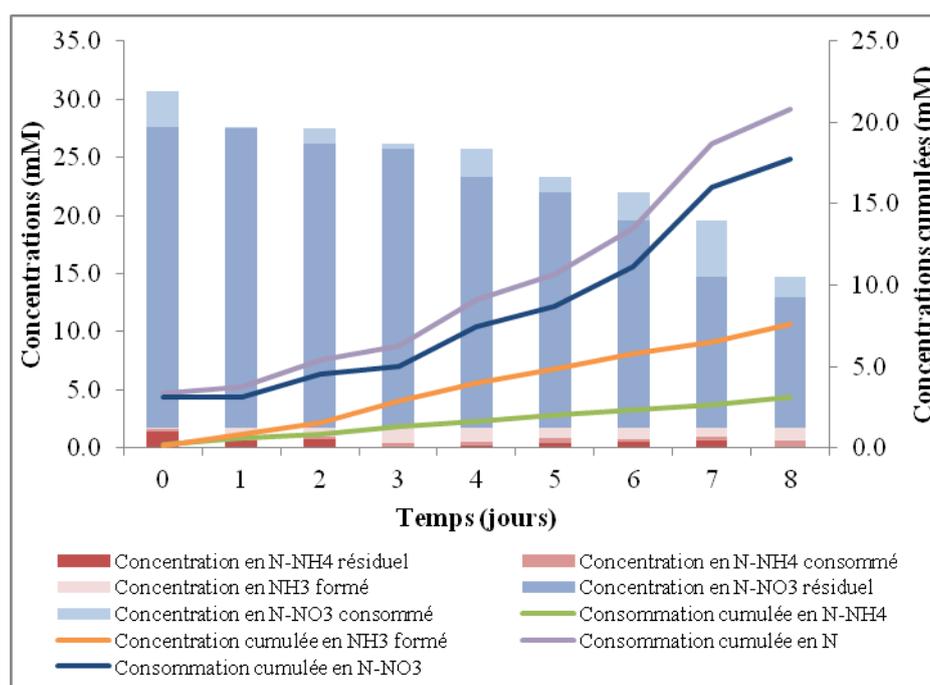


Figure 59 : Culture sur milieu Zarrouk (29 mM N-NO₃) supplémenté par 1,7 mM N-NH₄. Suivi des concentrations en NO₃, NH₄, NH₃ formé, NH₄ et NO₃ consommés. Données quotidiennes et cumulées.

Enfin, pour la culture en milieu Zarrouk + 3,4 mM N-NH₄, les concentrations en N-NH₄ et N-NO₃ résiduelles, consommées, et NH₃ formé sont reportées sur la Figure 60.

La concentration en N-NH₄ dosée quotidiennement dans la fiole est faible, mais jamais nulle. La consommation totale en ammonium atteint ici 7,2 mM en fin de culture, ce qui correspond

au double par rapport à la culture Zarrouk + 1,7 mM N-NH₄ et est donc cohérent. En ce qui concerne la consommation des nitrates, elle est un peu plus faible (~15 mM à la fin de la culture), ce qui au total correspond donc à 22 mM d'azote consommé lors de cette culture. Ainsi, cette quantité totale d'azote consommé est similaire dans les deux conditions de culture alors que la quantité de biomasse finale est différente, suggérant une composition élémentaire de la biomasse différente, avec une composition molaire en N plus importante lors de cultures sur ammonium. Néanmoins, les données obtenues ici ne permettent évidemment pas de conclure et nécessiteront d'autres expériences. Enfin, la concentration cumulée en NH₃ dans la culture atteint 16,45 mM sans impact visible sur la vitesse de croissance.

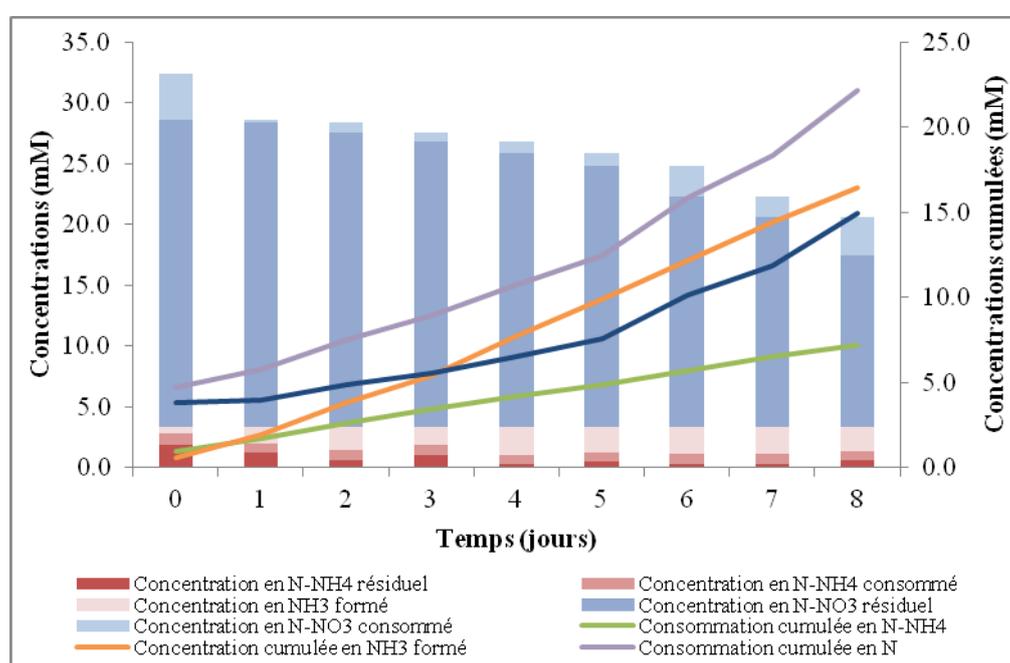


Figure 60 : Culture sur milieu Zarrouk (29 mM N-NO₃) supplémenté par 3,4 mM N-NH₄. Suivi des concentrations en NO₃, NH₄, NH₃ formé, NH₄ et NO₃ consommés. Données quotidiennes et cumulées.

2.1.6 Suivi de la concentration en oses totaux dans les cultures

Pour chacune des cultures présentées dans les paragraphes précédents, des dosages des oses totaux ont été réalisés, afin d'obtenir d'autres informations métaboliques sur *A. platensis*. En effet, l'impact de la présence d'ammonium comme source d'azote sur la production de polysaccharides reste méconnu chez cette cyanobactérie. *Arthrospira platensis* produit deux polysaccharides différents. Le premier, extracellulaire (EPS) et lié à la paroi cellulaire, est synthétisé comme métabolite primaire en parallèle de la croissance cellulaire. Une influence du flux lumineux appliqué sur la synthèse de cet EPS a été démontrée (Cornet, 1992). Le

second polysaccharide, intracellulaire, est le glycogène et sert de molécule de réserve. Celui-ci est principalement produit dans des conditions de carence en azote (Mohite et Wakte, 2011 ; Husunama *et al.*, 2013) et son accumulation peut atteindre 50 % du poids de la biomasse sèche (Aoyama *et al.*, 1997). Dans le cas de nos expériences, et compte-tenu du faible volume d'échantillon prélevé quotidiennement, il n'était pas envisageable de doser séparément ces deux polysaccharides. Nous avons donc décidé de réaliser un dosage global (oses totaux) sur la biomasse après sonication. Les résultats présentés (Figure 61) correspondent donc à la somme de l'EPS et du glycogène.

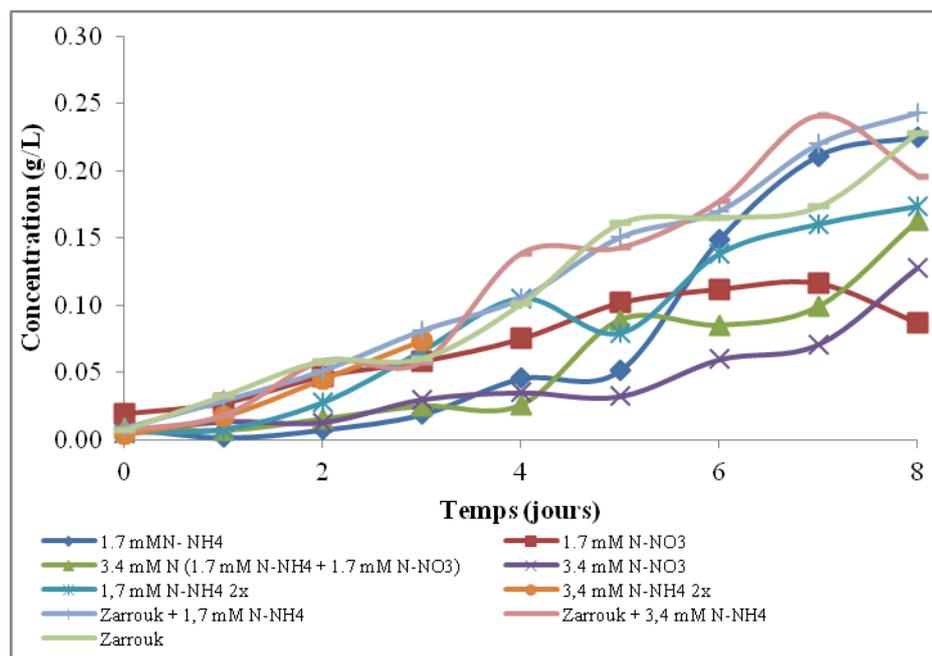


Figure 61: Concentrations en oses totaux mesurées pour chacune des conditions de culture

D'une manière globale, toutes les courbes suivent la même tendance, à savoir une augmentation de la concentration en oses totaux au cours du temps, avec des concentrations finales comprises globalement entre 0,1 et 0,25 g.L⁻¹. Cette accumulation de polysaccharides semble donc ici suivre l'accumulation de biomasse.

Afin de s'affranchir des différences liées à la concentration cellulaire variable selon les cultures et ainsi visualiser un potentiel impact de la source d'azote, les résultats ont été exprimés en g de sucres totaux pour 100 g de biomasse (pourcentage massique). Les résultats sont présentés sur la Figure 62.

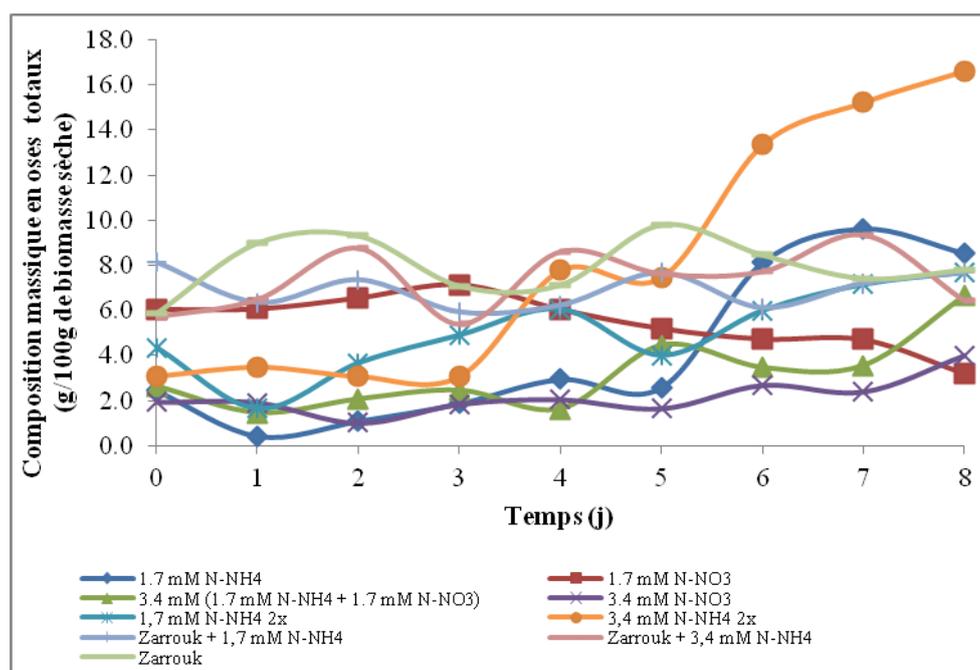


Figure 62 : Composition massique en oses totaux (g / 100 g de biomasse sèche) pour chacune des conditions de culture

Les pourcentages massiques d'oses dans la biomasse ne montrent que peu de différence selon les conditions de culture, et restent globalement constants, entre 2 et 8%. Deux exceptions méritent néanmoins d'être soulignées : la culture à 1,7 mM N-NH₄, pour laquelle le pourcentage massique d'oses dans la biomasse reste stable autour de 2% durant 5 jours, puis augmente brutalement à environ 8% entre le 5^{ème} et le 6^{ème} jour, et la culture à 6,8 mM d'azote (3,4 mM N-NH₄ 2x) ou une augmentation importante est observée après 3 jours de culture, atteignant 17% en fin de culture.

Aikawa *et al.* (2012) ont montré que la production des sucres intracellulaires, notamment du glycogène, était principalement due au couplage entre une limitation en azote et le flux lumineux (croissant avec le flux lumineux et maximal avec un flux lumineux supérieur à 700 $\mu\text{moles}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). Dans le cas de nos expériences, le flux lumineux appliqué a été maintenu entre 24 et 67 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$, soit environ de 110 à 310 $\mu\text{moles}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Ce phénomène pourrait expliquer l'accumulation de polysaccharides observée à partir de 5 jours pour la culture réalisée avec un apport quotidien de 1,7 mM N-NH₄ (culture pour laquelle des limitations/carences en azote ont été observées et flux lumineux augmenté à 5 jours). En revanche, aucune carence n'ayant été mise en évidence pour la culture à 6,8 mM N-NH₄ (3,4 mM N-NH₄ 2x), le phénomène mis en œuvre pourrait être différent. En effet, la concentration finale est deux fois plus importante dans la fiole de Roux contenant 6,8 mM d'ammonium que dans celle à 1,7 mM. Le mécanisme induisant l'accumulation de polysaccharides pourrait

ainsi être modifié en présence d'ammonium ou d'ammoniac. En effet, Markou *et al.* (2014a) ont montré, en culture de type batch, que pour une concentration en biomasse initiale équivalente, et à un même taux initial d'ammonium, l'augmentation du pH (et donc de la quantité d'ammoniac) entraînait une augmentation de la quantité d'oses totaux. Par exemple, pour une concentration en N-NH₄ de 150 mg.L⁻¹ (10,7 mM N-NH₄), à un pH de 9, le pourcentage était de 5 à 10 % de la biomasse sèche, contre 40 à 50 % pour un pH de 10. Pour 100 mg.L⁻¹ N-NH₄ (7,14 mM), cette valeur passe de 10 % à pH 8, contre 20 % à pH 9 voire même 40 % à pH 10. Néanmoins, les auteurs n'excluent pas que ces différences soient dues à une limitation en azote due à la quantité plus importante de NH₃ formé. Ces résultats nécessiteront donc d'être confirmés par des expériences supplémentaires, d'autant plus que cette accumulation plus importante n'est pas observée pour la culture à 3,4 mM N-NH₄ (1,7 mM N-NH₄ 2x) par exemple, alors que le taux d'ammoniac a atteint 20 mM en fin de culture. Enfin, il s'agit ici de dosage de sucres totaux, et il serait nécessaire d'analyser de manière séparée les sucres intracellulaires (glycogène) et extracellulaire (EPS), à la fois en terme de quantité, mais également en terme de composition pour l'EPS.

2.2 Cultures en miniphotobioréacteur

Suite à ces expériences préliminaires, nous avons souhaité mettre en œuvre des cultures dans le miniphotobioréacteur. Différentes cultures d'*Arthrospira platensis* ont été réalisées afin de valider les modifications apportées au mini-PBR et enfin observer l'influence de la modification de la source d'azote sur la cinétique de croissance.

Ce miniphotobioréacteur possède deux compartiments séparés par une membrane hydrophobe (un compartiment liquide et l'autre gazeux). L'augmentation de la pression dans le compartiment gazeux du réacteur est liée à la production de dioxygène et donc de biomasse. Le suivi de l'augmentation de pression dans le compartiment gazeux nous permet donc d'accéder à une estimation de la production en dioxygène et d'évaluer la croissance cellulaire. Néanmoins, parmi les modifications apportées au PBR, un système de prélèvement/ajout a été mis en place, permettant un suivi hors-ligne de paramètres tels que la concentration en biomasse et en source d'azote. Par ailleurs, cette modification permet désormais de pouvoir réaliser des fed-batch qui étaient jusqu'alors impossibles. Dans le but de conserver les conditions initiales de test, à savoir l'absence de gaz dans la phase liquide, il est nécessaire d'injecter dans la phase liquide un volume équivalent à celui prélevé. C'est pourquoi nous avons ajouté à chaque prélèvement un millilitre de milieu Zarrouk, et tenu compte du taux de

dilution de 0,94 pour le calcul des résultats. Les cinétiques de croissance d'*A. platensis* et la consommation en azote sont comparés aux résultats prédictifs obtenus avec le modèle. Enfin, le miniPBR est équipé d'une sonde pH, permettant de déclencher un flush de CO₂ lorsque le pH atteint la valeur de 10. Il ne s'agit donc pas réellement d'une régulation de pH, le flush ayant pour objectif de le ramener à 8,3. La mise en place d'une régulation de pH plus fine (entre 9 et 10) fait partie des améliorations envisageables, voire indispensables, afin de valider des cultures en présence d'ammonium à pH basique. Il est à noter que les différentes cultures n'ont pas toutes été réalisées à la même valeur de pH initial. En effet, celui-ci est fortement dépendant du pH de l'inoculum et donc de « l'âge » de la préculture utilisée.

2.2.1 Culture sur milieu Zarrouk à 127 $\mu\text{moles}_v\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Une première culture d'*Arthrospira platensis*, éclairée à 127 $\mu\text{moles}_v\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, soit environ 28 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$, a été réalisée sur le miniphotobioréacteur, sur un milieu Zarrouk classique avec une source d'azote sous forme de nitrates. La durée de 96 heures a permis de tester les modifications apportées au miniphotobioréacteur, notamment le système de prélèvements et le système d'acquisition.

Le suivi de la pression, du pH et de la cinétique de croissance d'*A. platensis* sont reportés sur la Figure 63. On observe que les cycles de production de gaz confirment le bon déroulement de la photosynthèse. Cependant, la vitesse de production de l'oxygène est stable. En effet, sur une période de 24 heures, environ 4 cycles de montée de pression sont visibles et ce jusqu'à la fin de l'expérimentation. Pour chaque cycle, une évolution de la pression de 0,95 bar à 1,30 bar est réalisée, puis elle est suivie d'un flush d'azote gazeux et d'une dépressurisation du compartiment gaz. La différence de pression entre le compartiment gaz et le compartiment liquide s'explique par le fait que nous avons étalonné les capteurs de pression, à l'air et à pression atmosphérique, et sans membrane afin que le k_La engendré n'affecte pas la calibration des capteurs. Malgré cela, la différence de pression de part et d'autre de la membrane, visible sur la Figure 63, est constante autour de 0,1 bar. Ce ΔP entre la phase liquide et la phase gazeuse était aussi observé dans les travaux de thèse de Cogne (2003).

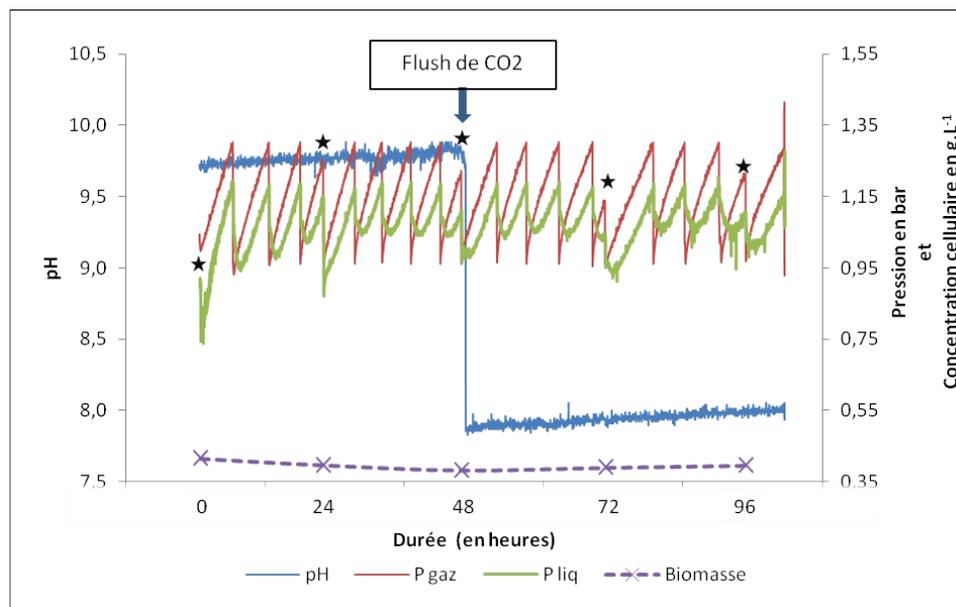


Figure 63 : Suivi de la pression, du pH et de la cinétique de croissance d'*A. platensis*, lors d'une culture en miniPBR sur milieu Zarrouk classique, et sous un flux lumineux de $127 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ($28 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$). Les étoiles correspondent au prélèvement quotidien, ce qui explique que les cycles de montée en pression soient incomplets.

Au cours de ces travaux, Cogne a maintenu pendant 200 heures la culture en phase linéaire. En effet, au-delà, il a observé un ralentissement de la cinétique de croissance, visible expérimentalement par une diminution du ΔP transmembranaire. Ce phénomène n'a pas été observé dans les travaux présentés dans ce mémoire étant donné la durée plus courte des expériences.

Bien que l'on note une augmentation du pH de la culture, nécessitant un flush de CO₂ après 48 heures de croissance, il semble que la quantité de biomasse reste constante. Cette absence de croissance cellulaire observée apparaît donc anormale, d'autant plus que tout au long de la manipulation, il y a bien eu consommation des nitrates et production d'oxygène. Cogne a montré en 2003 que lors de la phase de croissance exponentielle et la phase linéaire, le ΔP transmembranaire du réacteur restait constant. C'est n'est qu'au cours de la phase de ralentissement de croissance, que l'on observe une diminution de la différence de pression entre les deux phases. Ce phénomène d'amenuisement du ΔP n'ayant pas été observé sur l'expérience réalisée, il semble qu'une erreur d'estimation de la quantité de biomasse soit le plus probable, certainement dû à la présence d'agrégats dans le compartiment liquide ou d'un volume mort dans le système de prélèvement. Néanmoins, la possibilité de déterminer la vitesse de croissance d'*Arthrospira platensis* par l'augmentation de la pression dans un réacteur fermé a été démontré au cours des travaux de thèse de Cogne et publié (2001). Pour cela, il est nécessaire de calculer le rendement en oxygène de cette expérience, à partir des

cycles de montée de pression. Ce rendement a été estimé à partir de l'équation définie précédemment (§1.3.2.2) :

$$r_{O_2} = \left[\frac{V_G}{V_L RT} + \frac{1}{H_{O_2}(T)} \right] \frac{dP}{dt} \quad \text{Eq. 146}$$

Pour le calcul, les volumes des différents compartiments V_G et V_L sont exprimés en m^3 , R est la constante des gaz parfait ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), la température de $36 \text{ }^\circ\text{C}$ est exprimée en Kelvin, le coefficient d'Henry, d'une valeur de $10,471 \cdot 10^4 \text{ Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$ est donné pour le milieu Zarrouk à la température de $36 \text{ }^\circ\text{C}$ (calculée d'après Schumpe, 1985). La variation de pression dP correspond à la montée totale de pression dans le compartiment gazeux au cours de l'expérience soit le nombre de cycles couplé au ΔP soit $1,3 \text{ bar} - 0,97 (P_{\text{atm}})$ et dt la durée de la manipulation en heures. Ainsi :

$$r_{O_2, \text{exp}} = \left(\frac{2,6 \cdot 10^{-2}}{1,06 \cdot 10^{-2} + 8,31 \cdot 309,15} + \frac{1}{10,471 \cdot 10^4} \right) \cdot \frac{19 + 0,33 \cdot 10^5}{96} = 0,686 \text{ mol.h}^{-1}.\text{m}^{-3}$$

Afin de vérifier la validité de la manipulation, nous avons réalisé une modélisation de la cinétique de croissance d'*A. platensis* en culture batch à partir des données expérimentales, à savoir : un réacteur de 106 mL de phase liquide avec une profondeur de culture moyennée à 22 mm, une biomasse initiale C_x de $0,415 \text{ g.L}^{-1}$, une concentration en nitrates de $1,94 \text{ g.L}^{-1}$, et un flux lumineux de 28 W.m^{-2} . Les résultats obtenus sont comparés avec les résultats expérimentaux sur la Figure 64.

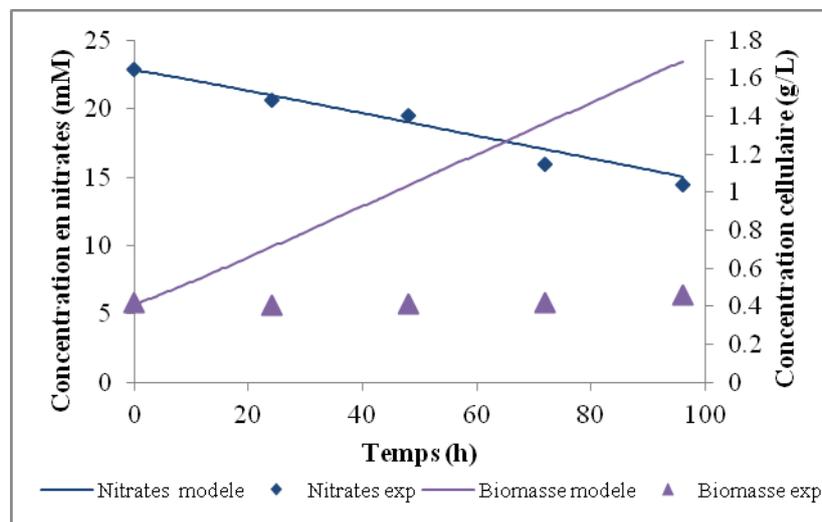


Figure 64 : Concentration cellulaire ($g.L^{-1}$) et consommation de nitrates (mM) pour la culture d'*A. platensis* en miniPBR à $127 \mu moles.v.m^{-2}.s^{-1}$ ($28 W.m^{-2}$). Les points correspondent aux résultats expérimentaux et les lignes continues aux résultats prédictifs.

On observe que, concernant la consommation des nitrates présents dans le milieu de culture, les points expérimentaux coïncident avec les valeurs prédites. Ainsi, la vitesse de consommation des nitrates est de $1,87 \text{ mM.j}^{-1}$, contre $1,96 \text{ mM.j}^{-1}$ pour la prédiction du modèle. En revanche, les données expérimentales sur la croissance cellulaire ne sont pas cohérentes avec la prédiction du modèle. Afin de confirmer le bon déroulement de la manipulation, nous avons estimés dans un premier temps la productivité en oxygène.

Ainsi, à partir des courbes présentées Figure 64, nous avons calculé la valeur de la pente de la courbe de croissance modélisée qui est équivalente au $r'_{X,mod}$.

$$r'_{X,mod} = 1,333 * 10^{-2} \text{ g.L}^{-1} . \text{h}^{-1}$$

Connaissant la formule C-molaire de la biomasse d'*A. platensis* ($M_w = 23,67 \text{ g.mol}^{-1}$), on obtient $r'_{X,mod}$:

$$r'_{X,mod} = 5,63 * 10^{-4} \text{ moles de biomasse.L}^{-1} . \text{h}^{-1}$$

Le rendement en oxygène, $r_{O_2,mod}$ correspond au rendement molaire de la biomasse par le produit du quotient photosynthétique, noté Q_p . Ce coefficient est défini comme le rapport des vitesses de production du dioxygène et du dioxyde de carbone et sa valeur est de 1,40 (Cornet *et al.*, 1998 ; Dauchet *et al.*, 2016), ainsi :

$$r_{O_2,mod} = r'_{X,mod} * Q_p = 7,90 * 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} . \text{h}^{-1} = 0,790 \text{ mol.m}^{-3} . \text{h}^{-1} \pm 10 \%$$

Afin d'affiner ce calcul, nous avons estimé de façon plus précise le $r_{O_2,mod}$, en prenant en compte une stœchiométrie variable. Cette stœchiométrie correspond à une estimation du ratio entre 2 fractions d'*A. platensis* dans le modèle, à savoir la biomasse active et la teneur en EPS. Ce ratio de fractions est dépendant de l'intensité du flux lumineux incident appliqué, étant donné que la production de polysaccharides est fonction de l'irradiance. Ainsi la valeur du rendement en oxygène donnée par le modèle est de : $r_{O_2,mod} = 0,75 \text{ mol.m}^{-3} . \text{h}^{-1} \pm 10 \%$. Rappelons que le $r_{O_2,exp}$ a été défini à la valeur de

0,686 mol.m⁻³.h⁻¹, soit 10,9% de moins que le $r_{O_2, mod}$. Ce paramètre calculé est très dépendant du flux lumineux. L'intensité d'éclairement des ampoules type halogène n'est pas homogène sur l'ensemble de la surface éclairée et diminue très fortement en périphérie (jusqu'à 25 % de moins). Or, les mesures d'irradiance appliquée réalisées au photomètre ont été faites en 3 points. Il est envisageable que l'estimation du flux correspondant au voltage appliqué soit un peu surestimée et donc entraîne une erreur de calcul. Une mesure en actinométrie (mesure du flux par le suivi d'une réaction photochimique) serait véritablement bénéfique et beaucoup plus précise. Par conséquent, sachant que les prédictions du modèle ont une précision de l'ordre de 10 %, ce résultat est donc acceptable et montre que le modèle concorde relativement bien avec les résultats expérimentaux obtenus.

Par conséquent, la culture s'est déroulée normalement et il y a effectivement un problème sur l'estimation de la biomasse. Deux causes sont possibles. Dans un premier temps, il est probable que le volume du prélèvement (1 mL) ne soit pas représentatif de l'ensemble de la phase liquide du réacteur, d'autant plus que des agrégats cellulaires ont été observés au sein du réacteur. De plus, il existe une zone morte au niveau de la zone de prélèvement, due à l'épaisseur du réacteur et au volume mort de la vanne 3 voies. Dans un second temps, la quantité de biomasse a été définie suite à une corrélation entre la turbidité (DO_{750 nm}) et une biomasse sèche estimée sur les manipulations en fioles de Roux. Or, la turbidité correspond à une mesure de la diffusion de la lumière et le coefficient de diffusion est sensible à la distribution de la taille et de la forme des cellules (Rochatte, 2016). Dans le cas d'*Arthrospira platensis*, la forme et la taille des particules sont très sensibles au type d'agitation, à la forme de l'agitateur ainsi qu'à la géométrie du réacteur. La vitesse et la force de cisaillement sont influencées par ces propriétés (Rochatte, 2016). Les observations microscopiques réalisées montrent que les cellules sont moins spiralées et plus petites après les expérimentations.

En 2003, ce miniPBR était équipé d'une photodiode (BPW 34 FAS, Osram®), matériel que nous aurions souhaité mettre en place à nouveau sur les manipulations présentées dans ce mémoire, or suite à un souci technique, nous n'avons pas pu utiliser la photodiode comme complément d'informations sur la concentration cellulaire. Cependant, il semble que Cogne ait lui aussi rencontré des problèmes d'estimation de la biomasse en utilisant la photodiode, bien que ce problème puisse être résolu en corrigeant la quantité de biomasse présente dans le réacteur par les mesures de turbidité (avec une DO_{880nm}) en début et fin d'expérience. En effet, il semble que l'angle d'incidence de la lumière émise par la lampe halogène ne soit pas

favorable pour être utilisée avec le capteur (signal trop faible pour être précis). La mise en place d'un panneau à LED, dimensionné pour ce réacteur pourrait permettre de solutionner ce problème d'angle incident. De plus, cela permettrait d'homogénéiser la dispersion de la lumière et donc éviter les zones d'ombres ou la perte de photons.

Enfin, Cogne a réalisé des expériences plus longues (environ 700 heures), qui lui ont permis d'identifier les différentes phases de croissance, dont la phase linéaire dans laquelle se situe cette culture. En effet, les cycles de montées en pression se réalisant à vitesse relativement constante, nous pouvons affirmer que les cellules d'*Arthrospira* dans cette expérience étaient en phase de croissance linéaire, ce qui traduit une condition de limitation par la lumière.

Dans les deux expériences qu'il a réalisées, la quantité de biomasse initiale dans le réacteur était, à chaque fois, inférieure à $0,1 \text{ g.L}^{-1}$. Dans les expériences réalisées au cours de cette thèse, la concentration cellulaire initiale était bien plus élevée ($\sim 0,4 \text{ g.L}^{-1}$). Un essai à cette concentration a été réalisé, mais, une sédimentation de la biomasse ainsi qu'un arrêt de la croissance ont été observés, entraînant l'absence de production gazeuse. Cette mortalité observée pourrait être due au fait que le flux lumineux appliqué est plus élevé dans nos expériences (28 W.m^{-2} contre 20 W.m^{-2}), nous conduisant à augmenter la concentration cellulaire initiale.

2.2.2 Culture sur milieu Zarrouk à $172 \mu\text{moles}_v.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Une seconde manipulation a été réalisée sur le miniPBR, dans des conditions proches de celles précédentes, sur une durée de 136 heures. Afin d'augmenter la production en oxygène, nous avons choisi d'augmenter l'intensité du flux lumineux incident à $172 \mu\text{moles}_v.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, soit 37 W.m^{-2} . Le suivi de la pression, du pH et de la cinétique de croissance d'*A. platensis* sont reportés sur la Figure 67.

L'augmentation du flux lumineux incident influence le comportement d'*Arthrospira platensis*. En effet, on observe sur la Figure 65 que la quantité de biomasse est plus importante que lors de la précédente expérience (Figure 63), passant de $0,415 \text{ g.L}^{-1}$ à $0,829 \text{ g.L}^{-1}$, soit un r_x estimé à $0,073 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$. L'augmentation constante du pH confirme qu'il y a une croissance cellulaire dans la phase liquide du miniPBR.

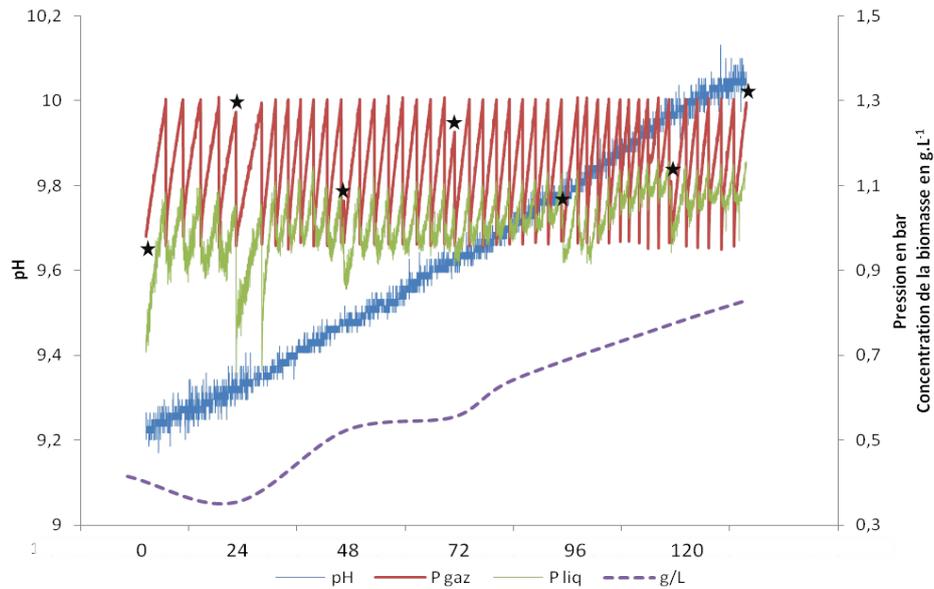


Figure 65 : Suivi de la pression, du pH et de la cinétique de croissance d'*A. platensis*, lors d'une culture en miniPBR sur milieu Zarrouk classique, et sous un flux lumineux de $172 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($37 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$). Les étoiles correspondent au prélèvement quotidien, ce qui explique que les cycles de montée en pression soient parfois incomplets.

C'est au niveau de la production de l'oxygène transféré dans la phase gazeuse que l'on observe une modification flagrante du comportement d'*A. platensis*. En effet, dans la manipulation précédente, la vitesse de production du gaz était constante, dans le cas présent, il y a, toutes les 24 heures, un cycle d'augmentation de pression de plus. Au cours des 24 premières heures, nous avons noté 5 cycles, puis 7 jusqu'à 72 heures de manipulation, et enfin presque 10 entre 96 heures et 120 heures de culture. Cette augmentation est due à l'accroissement de la production d'oxygène. En effet, l'augmentation du flux lumineux incident de 28 à $37 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ retarde la mise en place d'une limitation par la lumière. Comme précédemment, la productivité en oxygène a été calculée :

$$r_{O_2, \text{exp}} = \left(\frac{2,6 \cdot 10^{-2}}{1,06 \cdot 10^{-2} + 8,31 + 309,15} + \frac{1}{10,471 \cdot 10^4} \right) * \frac{44 + 0,33 \cdot 10^2}{136} = 1,12 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$$

Afin de confirmer le bon déroulement de la manipulation, nous avons, sur le même principe que précédemment, modélisé la croissance cellulaire d'*A. platensis*, à partir du modèle de transfert radiatif décrit dans la partie bibliographique, dans le cas d'une culture sur le miniPBR. Les valeurs d'entrées ont été : le choix d'une culture en batch, sur un réacteur de 106 mL de phase liquide et une profondeur de culture moyennée à 22 mm. La concentration initiale de nitrates était de $2,38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, et la biomasse était estimée à $0,415 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ et un flux lumineux

incident de 37 W.m^{-2} . Les résultats obtenus par la modélisation sont comparés à ceux expérimentaux sur la Figure 66.

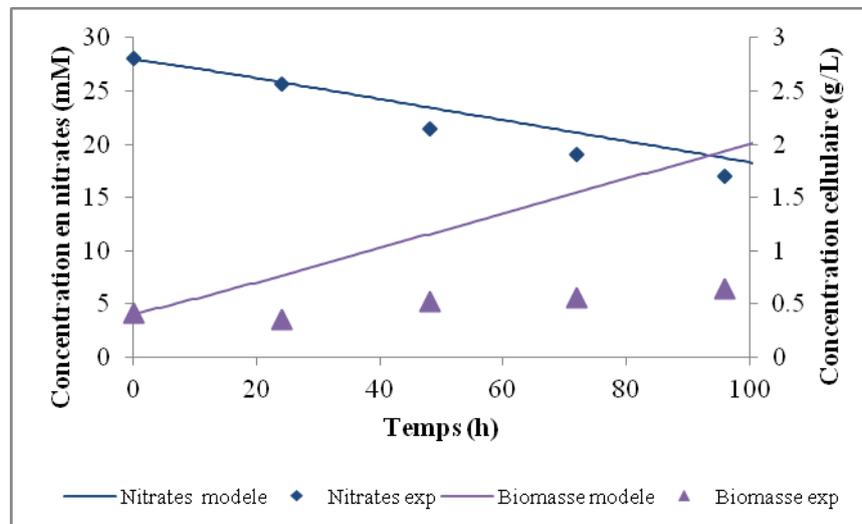


Figure 66 : Concentration cellulaire (g.L^{-1}) et consommation de nitrates (mM) pour la culture d'*A. platensis* en miniPBR à $172 \mu\text{moles.v.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (37 W.m^{-2}). Les points correspondent aux résultats expérimentaux et les lignes continues aux résultats prédictifs.

On observe alors que la cinétique de consommation des nitrates par *A. platensis* est concordante avec les résultats prédits. En effet, la vitesse de consommation des nitrates a été déterminée expérimentalement à $2,62 \text{ mM.j}^{-1}$ contre $2,35 \text{ mM.j}^{-1}$ pour la prédiction du modèle. On se situe donc dans la limite des 10 % d'erreur du modèle. Cependant, comme dans la manipulation précédente, les résultats expérimentaux concernant la quantité de biomasse ne coïncident pas du tout avec les valeurs prédites.

Nous avons voulu vérifier si le $r_{\text{O}_2,\text{exp}}$ était équivalent au $r_{\text{O}_2,\text{mod}}$ prédit par le modèle. Pour cela, nous avons mesuré la pente de courbe de croissance modélisée afin d'obtenir le $r'_{X,\text{mod}}$.

$$r_{X,\text{mod}} = 1,69 * 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$$

$$r'_{X,\text{mod}} = 7,14 * 10^{-4} \text{ moles de biomasse.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$$

Ainsi, à partir du coefficient photosynthétique d'*A. platensis* ($Q_P = 1,40$), nous avons pu obtenir la productivité en oxygène estimée par le modèle.

$$r_{\text{O}_2,\text{mod}} = r'_{X,\text{mod}} * Q_P = 1,00 * 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1} = 1,00 \text{ mol.m}^{-3}.\text{h}^{-1} \pm 10 \%$$

Comme précédemment, un écart est donc constaté entre les valeurs expérimentales et prédites (10,7 %), ce qui est acceptable compte-tenu de la précision du modèle. Le problème qui ressort est similaire à celui rencontré pour la première manipulation, à savoir une sous-

estimation de la biomasse dans la phase liquide, pouvant être causée par un volume mort trop important, un prélèvement d'échantillon trop faible pour être représentatif, ou une erreur de corrélation entre la biomasse sèche et la $DO_{750\text{ nm}}$ due aux modifications physiques engendrées par l'agitation (évolution de la conformation des cellules au cours de la manipulation).

Bien que le système de prélèvement et d'estimation de la biomasse n'ait pas pu être validé par ces expériences, une culture a été réalisée en présence d'ammonium.

2.2.3 Culture sur milieu Zarrouk, supplémentée en ammonium, à $172\ \mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$

A partir des résultats préliminaires obtenus sur les manipulations en fioles de Roux, nous avons choisi de tester l'influence de l'ammonium sur la croissance et la production d'oxygène par *A. platensis*. Cette culture est réalisée à $172\ \mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ avec un milieu de culture Zarrouk, supplémenté de façon quotidienne avec 1,7 mM d'ammonium. Cette condition de culture a été retenue car lors des essais en fioles de Roux, aucune carence en azote n'avait été détectée, et la cinétique de croissance semblait même légèrement plus rapide que lors des cultures sur nitrates seuls. Le suivi de la pression, du pH et de la cinétique de croissance de *A. platensis* sont reportés sur la Figure 68.

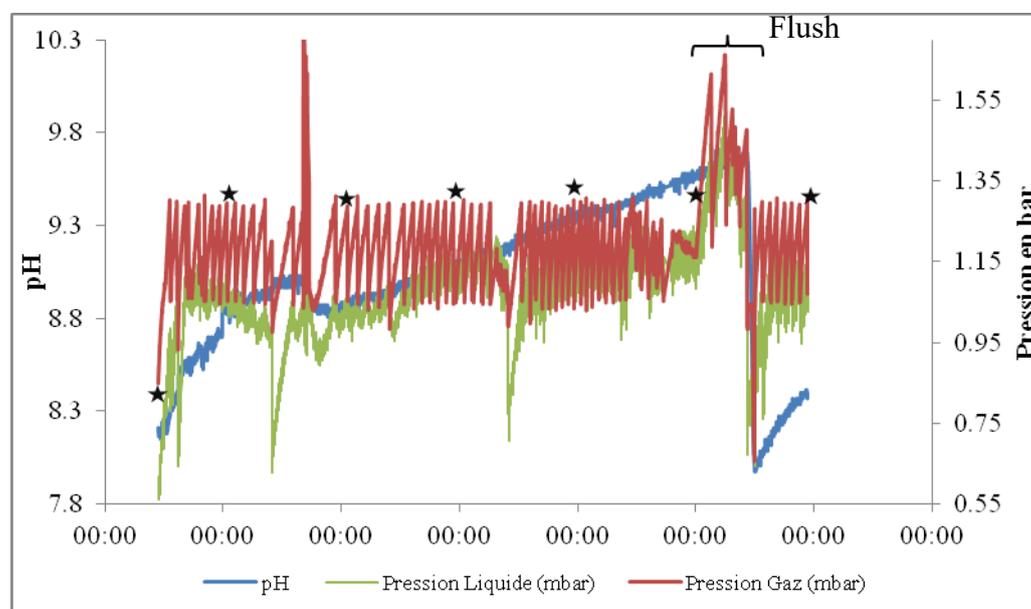


Figure 67 : Suivi de la pression et du pH et lors d'une culture en miniPBR sur milieu Zarrouk classique supplémenté quotidiennement avec 1,7 mM d'ammonium, à $172\ \mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ($37\ \text{W}\cdot\text{m}^2$). Les étoiles sont des repères correspondants aux prélèvements journaliers sur la culture.

Cette manipulation, d'une durée de 132 heures, a rencontré quelques soucis techniques. En effet, au cours de cette culture, l'électrovanne d'entrée du CO₂, jusqu'à présent contrôlée par le logiciel d'acquisition Labview, est tombée en panne au bout d'environ 30 heures de manipulation, entraînant une injection continue de CO₂ et une montée en pression dans le réacteur jusqu'à 1,7 bar. N'ayant pas d'électrovanne de remplacement, la bouteille de CO₂ a été fermée afin d'éviter des flushs inopinés dans le réacteur. Un seul flush « manuel » de CO₂ a été réalisé au bout de 100 heures entraînant une chute du pH de la culture à 8.

Concernant le déroulement de la manipulation, l'augmentation linéaire du pH de la culture confirme la multiplication des cellules d'*A. platensis*.

La croissance cellulaire et la production d'oxygène sont aussi confirmées par l'augmentation progressive de la fréquence des cycles de montée en pression dans le réacteur (Figure 67). En effet, à partir du flush de CO₂ (t = 30 h) le nombre de cycles est passé de 7 cycles par heure, à 11 puis 16 cycles (entre 72 et 96 h).

La productivité en oxygène estimée sur cette manipulation est de :

$$r_{O_2,exp} = \left(\frac{2,6 \times 10^{-3}}{1,06 \times 10^{-4} \times 8,31 \times 309,15} + \frac{1}{10,471 \times 10^4} \right) \times \frac{62 \times 0,33 \times 10^3}{120} = 1,79 \text{ mol. m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$$

D'après cette estimation, le $r_{O_2,exp}$ est bien supérieur à celui obtenu pour l'expérience réalisée dans les mêmes conditions sans la complémentation en ammonium ($1,12 \text{ mol. m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$).

Les concentrations en N-NH₄ et N-NO₃ résiduelles, consommées, et NH₃ formé sont reportées sur la Figure 68. On constate que la concentration résiduelle quotidiennement en N-NH₄ est très faible voire nulle. Ce résultat est en accord avec les tests préliminaires en fiole de Roux, qui avaient montré des carences/limitations en ammonium pour cette concentration. Comme précédemment pour la culture Zarrouk + 1,7 mM N-NH₄, la présence abondante de nitrates a cependant évité une carence en azote et une décoloration de la culture.

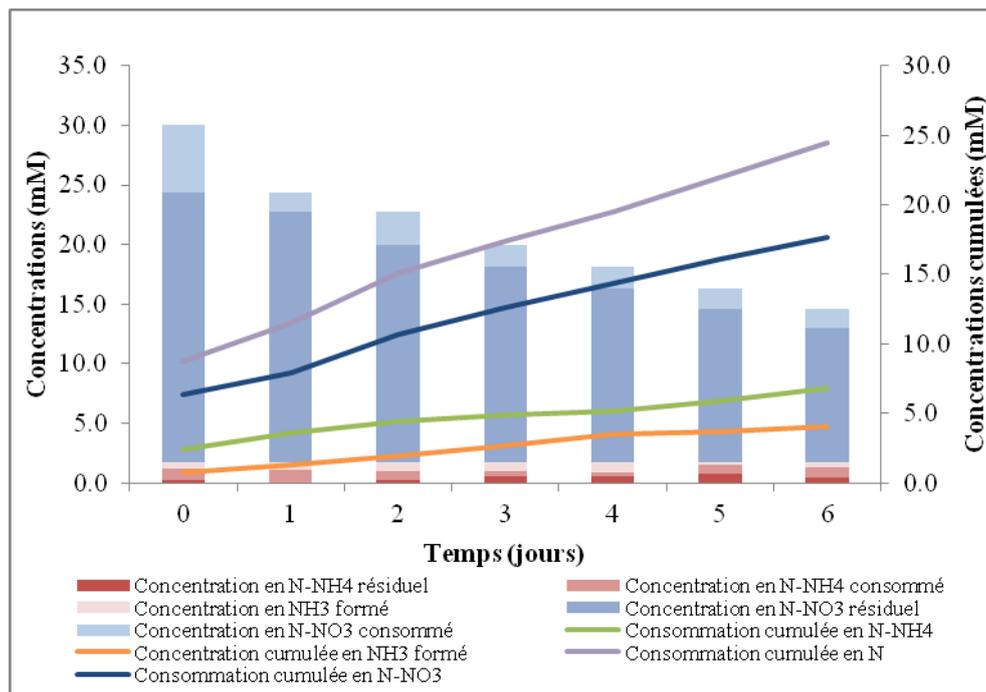


Figure 68 : Culture en miniPBR sur milieu Zarrouk (29 mM N-NO₃) supplémenté par 1,7 mM N-NH₄. Suivi des concentrations en NO₃, NH₄, NH₃ formé, NH₄ et NO₃ consommés. Données quotidiennes et cumulées.

En ce qui concerne la concentration cumulée en NH₃, elle atteint 4 mM à la fin de l'expérience, ce qui est bien en dessous de la concentration toxique suspectée d'après les expériences préliminaires.

La comparaison entre les données expérimentales et prédites par le modèle sont reportées sur la Figure 69 pour la concentration cellulaire et la consommation des nitrates.

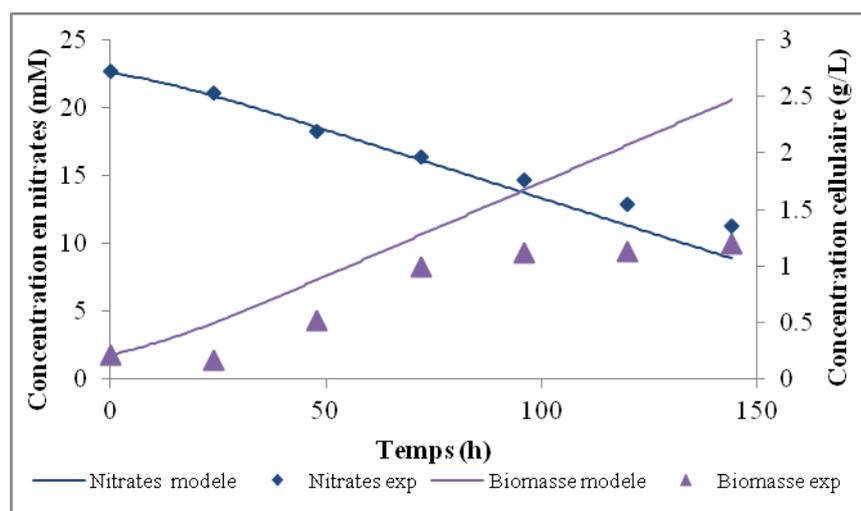


Figure 69 : Concentration cellulaire (g.L⁻¹) et consommation de nitrates (mM) pour la culture d'*A. platensis* en miniPBR à 172 $\mu\text{moles}_v\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (37 W.m⁻²). Les points correspondent aux résultats expérimentaux et les lignes continues aux résultats prédictifs.

Pour cette expérience, la vitesse de consommation des nitrates a été déterminée expérimentalement à $1,89 \text{ mM.j}^{-1}$ et celle en ammonium à $0,72 \text{ mM.j}^{-1}$ ce qui représente $2,62 \text{ mM.j}^{-1}$ d'azote. Cette valeur, strictement identique à celle obtenue dans l'expérience précédente sur nitrates seuls et dans les mêmes conditions d'éclairage, présente un écart avec la prédiction du modèle ($2,35 \text{ mM.j}^{-1}$) qui reste dans la limite des 10 % d'erreur. En revanche, bien que nous ayons tenté de réduire l'impact du volume mort du prélèvement en effectuant des purges, nous constatons à nouveau une sous-estimation de la concentration cellulaire, qui passe de $0,43 \text{ g.L}^{-1}$ à $1,31 \text{ g.L}^{-1}$ en 6 jours, soit un $r_x = 0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$. D'après le modèle, nous devrions atteindre $2,45 \text{ g.L}^{-1}$ soit un $r_{X,mod} = 1,61 * 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($r'_{X,mod} = 6,80 * 10^{-4} \text{ moles de biomasse.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Ainsi, à partir du coefficient photosynthétique d'*A. platensis* ($Q_p = 1,40$), nous avons pu obtenir la productivité en oxygène estimée par le modèle.

$$r_{O_2,mod} = r'_{X,mod} * Q_p = 9,54 * 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1} = 0,954 \text{ mol.m}^{-3}.\text{h}^{-1} \pm 10 \%$$

Par conséquent, le $r_{O_2,exp}$ est bien supérieur à celui estimé par la modélisation. La présence d'ammonium dans le milieu permettrait donc l'augmentation de la productivité en oxygène.

Conclusion

Ce travail de thèse a été financé par deux projets distincts, ayant en commun l'utilisation de microorganismes photosynthétiques. Il comporte des parties très dissemblables et des développements très différents, d'une part concernant la culture de *Chlamydomonas reinhardtii* en vue de la production d'hydrogène et, d'autre part, pour la réalisation d'un mini-PBR en vue de l'obtention de données métaboliques sur le fonctionnement d'*Arthrospira platensis*. Il s'agit donc de deux financements et de deux types d'application (de long terme) complètement disjoints.

Par contre, comme nous l'avons souligné dès le début de ce manuscrit, il s'agit pour l'un et l'autre des sujets de développer une modélisation en termes de modèle de connaissance pour les deux procédés. Ceci nécessite des outils expérimentaux permettant d'obtenir des données en culture fiables, et permettant des interprétations métaboliques. Ceci nécessite aussi des outils théoriques de représentation du métabolisme cellulaire et de caractérisation de son fonctionnement, outils qui puissent traduire de façon profonde les couplages qui existent entre les modes de culture et les observables qui sont, pour l'un et l'autre des procédés étudiés ici, soit la production de l'hydrogène, soit la production de l'oxygène.

Sur le plan expérimental, le petit dispositif, adapté et assemblé pour cette étude, remplit les objectifs que nous nous étions fixés. Nous avons développé un dispositif expérimental qui permet la mesure de la croissance cellulaire, de la production d'oxygène et de consommation de la source d'azote en conditions contrôlées d'éclairage. Ce dispositif, dans la mesure où il n'utilise pas directement d'échange liquide gaz par contact entre les phases mais un dispositif de transfert par membrane, est extrapolable pour des expériences spatiales. Ce type de bioréacteur est en cours de développement par la société RUAG Space pour des expériences sur la station spatiale internationale.

Les expériences préliminaires ont été réalisées pour tester l'influence de la source d'azote sur la croissance cellulaire. Nous notons un effet bénéfique possible d'un apport d'azote sous forme ammonium sur la cinétique de croissance cellulaire associé à une vitesse de production d'oxygène supérieure. Il faut cependant confirmer ces valeurs par une étude spécifique. De même, le seuil toxique d'ammonium pour la croissance semble relativement élevé. Il y a cependant un effet pH important à prendre en compte, sachant que la perte de NH_3 vers la phase gaz est d'autant plus élevée que le pH est élevé et que l'espèce toxique est la concentration en NH_3 et non pas la concentration en ions ammonium. La diffusion de l'espèce NH_3 au travers de la membrane est également un sujet qu'il conviendra de quantifier pour une

étude plus systématique. Ceci intervient, d'une part pour l'évaluation des rendements d'assimilation de l'azote et, d'autre part, en tant que composé potentiellement polluant dans la composition de la phase gazeuse enrichie en oxygène. Ce point devra être clarifié plus tard.

Dans l'ensemble, le principe de ce dispositif expérimental est utilisé dans une famille d'expériences, visant à utiliser dans des conditions de vols dans l'espace un compartiment photosynthétique pour assurer, d'une part l'élimination du CO₂ produit par la respiration animale d'un ensemble de rats et, d'autre part, la production de l'oxygène nécessaire à la respiration. Les deux points difficiles sont les suivants : *i*) réaliser un PBR qui soit capable de fonctionner en non gravité, c'est-à-dire inventer un dispositif qui ne fasse pas appel aux transferts directs liquide gaz ; *ii*) avoir une connaissance suffisamment profonde du couplage métabolisme / conditions de transfert d'énergie lumineuse / conditions de transfert de gaz dissous pour établir un modèle de commande du PBR qui satisfasse des besoins fluctuants en O₂ et en élimination de CO₂. Nous avons validé la première partie. Nous avons la structure de modélisation qui permet d'attaquer le deuxième point avec confiance.

La deuxième partie de ce manuscrit porte sur une culture différente, celle de *Chlamydomonas reinhardtii*. La partie expérimentale ne concernait pas ce travail et a été réalisée au GEPEA. Le travail présenté ici portait essentiellement sur l'interprétation en termes d'analyse du métabolisme et sur la possibilité d'analyse thermocinétique. Il a été nécessaire que nous fassions l'assemblage d'un nombre important de travaux réalisés, tant au Laboratoire GEPEA qu'à l'Institut Pascal. Le schéma métabolique que nous proposons reste finalement très simple. Nous l'avons limité à l'étude des réactions qui caractérisent l'apport d'énergie à la cellule, c'est-à-dire aux réactions présentes dans le chloroplaste. C'est ici que se situe le nœud central de la régulation métabolique. L'analyse du fonctionnement du chloroplaste, que nous présentons prend en compte les deux compartiments du chloroplaste (stroma et lumen) et les flux de transfert de protons entre les deux, flux qui sont couplés à la chaîne de transfert d'électrons. Nous arrivons à une modélisation de ce que l'on appelle le schéma en Z. La modélisation est en très grande conformité avec des travaux anciens concernant l'analyse thermocinétique des couplages entre différentes réactions métaboliques. Il nous a permis de déterminer un coefficient de couplage sur le transfert de protons. Ce schéma métabolique a aussi été adapté de façon très cohérente pour prendre en compte la phase de production d'hydrogène. C'était l'objectif que nous nous étions fixé. Un résultat très important est que nous montrons que le coefficient de couplage, déduit des résultats expérimentaux, est en excellent accord avec celui prévu par la théorie. C'est aussi la première fois au laboratoire,

que nous obtenons une preuve directe que le rapport des forces thermodynamiques, calculé de façon théorique est en accord quasi-parfait avec les rendements expérimentaux en croissance et en production d'hydrogène. Ces rendements théoriques utilisent les propriétés de formation des composés du métabolisme qui nécessitent encore quelques efforts de modélisation et d'ajustement avec des données bibliographiques. Avec l'intention d'obtenir et d'utiliser un modèle entièrement prédictif, nous avons appliqué un modèle de solution aqueuse basé sur des simulations quantiques : le modèle COSMO-RS. Nous avons une corrélation satisfaisante pour corriger les propriétés d'activité à dilution infinie, y compris avec les corrections correspondant aux solutions électrolytiques. Nous montrons qu'il faut bien prendre en compte l'influence du pH et probablement aussi d'autres concentrations en cations du type Mg^{2+} . Cependant les corrélations que nous avons avec les modèles publiés pour l'instant ne suffisent pas pour avoir des prédictions d'une précision de l'ordre de 1 kJ.mole^{-1} . Il sera nécessaire de mettre en place d'autres modèles, plus complets. Ce travail est en cours au laboratoire. Nous avons donc posé les bases de la comparaison mais nous n'avons pas poussé plus loin la phase d'identification et de comparaison avec tous les composés du métabolisme.

Il restera à développer l'analyse cinétique complète de la croissance, de l'accumulation d'amidon et de la production d'hydrogène par *Chlamydomonas reinhardtii*. C'est un travail en soi, mais nous avons fourni ici la structure qui permet de le faire. Le point clé est de différencier de façon précise les compartiments chloroplastiques et d'écrire convenablement le couplage entre transfert de protons et production d'ATP. Nous montrons bien que la modulation du métabolisme en fonction des conditions de culture imposées par l'opérateur joue sur un coefficient de couplage qui résulte d'une optimisation sous contrainte de la vitesse de production d'entropie. C'est un point essentiel. Il reste également à développer un travail similaire pour la respiration mitochondriale qui porte sur une deuxième partie du métabolisme que nous n'avons pas examinée en détail pour l'instant.

Conformément à ce que nous avons énoncé au début de ce manuscrit, cette analyse doit s'appliquer de la même façon aux cultures d'*Arthrospira platensis*, en particulier pour comprendre comment s'effectue la bascule métabolique lorsqu'on modifie la source d'azote et/ou la vitesse d'apport des photons. Notre dispositif expérimental doit permettre d'avancer sur ce point.

En conclusion, ce qui pouvait apparaître comme deux sujets disjoints fait bien partie d'un même corpus expérimental et théorique. La compréhension générale de l'ensemble des

phénomènes impliqués, tout comme de l'influence de conditions de culture imposées aux microorganismes par l'opérateur, nécessite de développer tout ce travail de façon cohérente, qu'il s'agisse des dispositifs expérimentaux instrumentés qui permettent de suivre en ligne les observables, des modèles théoriques d'adaptation des métabolismes cellulaires aux conditions externes qui sont imposées ou encore des modèles de propriétés thermochimiques qui conduisent à formuler les conditions thermocinétiques appropriées.

Nous avons travaillé dans cette direction, même si une intégration complète du ou des modèles constitue un travail à venir, nous ouvrons la voie à des développements futurs et des applications très pratiques dans des domaines très différents, comme la mise en place de systèmes de support vie pour l'exploration spatiale ou bien des systèmes de production de vecteurs énergétiques pour le futur.

Références Bibliographiques

- Abeliovitch, A., Azov, Y. (1976). Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, 801–806.
- Achard, C. (1992). Modélisation des propriétés d'équilibre de milieux biologiques et alimentaires à l'aide de modèles prédictifs. Thèse de l'Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, France. 380 pp.
- Aikawa, S., Izumi, Y., Matsuda, F., Hasunuma, T., Chang, J. S., Kondo, A. (2012). Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrospira platensis* by optimization of light intensity and nitrate supply. *Bioresource Technology*, 108, 211–215.
- Akimoto, K., Sano, F., Homma, T., Wada, M., Nagashima, M., Oda, J. (2012). Comparaison of marginal abatement cost curves for 2020 and 2030: Longer perspectives for effective global GHG emission reductions. *Sustainability Science*, 7, 157-168.
- Alberty, R. A. (1998). Calculation of standard transformed Gibbs Energies and Standard Transformed Enthalpies of Biochemical Reactants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 353(1), 116–130.
- Alberty, R.A. (2003). Thermodynamics of Biochemical Reactions. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ.
- Antal, T. K., Volgusheva, A. A., Kukarskih, G. P., Krendeleva, T. E., Rubin, A. B. (2009). Relationships between H₂ photoproduction and different electron transport pathways in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(22), 9087–9094.
- Anusuya D. M., Venkataraman L. V. (1983). Supplementary value of the proteins of the blue green algae *Spirulina platensis* to rice and wheat proteins. *Nutrition Reports International*, 28, 1029–1035.
- Aoyama, K., Uemura, I., Miyake, J., Asada, Y. (1997). Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 17-20.

- A.P.H.A. (1971). Ultraviolet spectrometric method in standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association, Washington D.C.* 237-239.
- Arad, S.M., Atar, D. (2007). Viscosupplementation with algal polysaccharides in the treatment of arthritis. WIPO Patent WO/2007/066340
- Arad, S. M., Levy-ontman, O. (2010). Red microalgal cell-wall polysaccharides : biotechnological aspects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 358–364.
- Arad, S.M, Yaron, A. (1992). Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends Food Science Technology*, 3, 92–97.
- Ayyagari, M., Pande, R., Kamtekar, S., Gao, H., Marx, K., Kumar, J., Tripathy, S., Akkara, J., Kaplan, D. (1995). Molecular assembly of proteins and conjugated polymers: toward development of biosensors. *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 116–121.
- Azov, Y., Goldman, J.C. (1982). Free Ammonia Inhibition of Algal Photosynthesis in Intensive Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 735-739.
- Barsanti L, Gualtieri P. (2006). *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. Florida: Taylors R Francis Group, 301 pp.
- Becker, E. W. (2007). Micro algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25, 207–210.
- Belkin, S., Boussiba, S. (1991a). High Internal pH Conveys Ammonia Resistance in *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 38, 167-169.
- Belkin, S., Boussiba, S. 1991b. Resistance of *Spirulina platensis* to ammonia at high pH values. *Plant and Cell Physiology*, 32, 953–958.
- Berthelot, M. (1859). Correspondence-'violet d'aniline', Répertoire de chimie appliquée. Société Chimique de Paris, 1, 284.
- Bird, M.K., Dutta-Roy, R., Heyl, M., Allison, M., Asmar, S.W., Folkner, W.M., Preston, R.A., Atkinson, D.H., Edenhofer, P., Plettemeier, D., Wohlmuth, R., Iess, L., Tyler, G.L. (2002). The Huygens Doppler Wind Experiment: Titan winds derived from probe radio frequency measurements. *Space Science Reviews*, 104, 613-640.

- Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W., Stetter, K.O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles*, 1(1), 12-21.
- Boussiba, S. (1989). Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant and Cell Physiology*, 30, 303–308.
- Boussiba, S., Gibson, J. (1991). Ammonia translocation in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1-14.
- Carmaux, S. (2008). Caractérisation de la mort des cellules animales cultivées en bioréacteur, Thèse de Doctorat à l'Université de Lorraine, Nancy. 243 pp.
- Carvalho, C. M., Francisco, F. R., Almeida, K. a, Sato, S., Converti, A. (2004). Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (cyanophyceae) by Fed batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates. *Journal of Phycology*, 40, 589–597.
- Cawse, P.A. (1967). The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrometry. *Analyst*, 62, 311-315.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Triratana, P., Loha, V., Tia, S., Bunnag, B. (2013). Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 73–78.
- Chandrasekhar S. (1960). Radiative transfer. Dover books of Physics, New York, 416 pp.
- Christi, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306.
- Cogne, G., Lasseur, C., Cornet J-F., Dussap, C-G., Gros, J-B. (2001). Growth monitoring of a photosynthetic micro-organism (*Spirulina platensis*) by pressure measurement. *Biotechnology Letters*, 23, 1309–1314.
- Cogne G. (2003). Conception, mise en œuvre et modélisation d'un photobioréacteur à membrane pour l'étude du comportement de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* en microgravité. Thèse de doctorat à l'Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, France. 218pp.
- Cogne, G., Gros, J-B., Dussap, C-G. (2003b). Identification of a Metabolic Network Structure Representative of *Arthrospira (Spirulina) platensis* Metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(6), 667–676.

- Cogne, G., Gros, J-B., Dussap, C-G., Lafon, P. (2003a). A Simple Reliable Bioreactor for Studying the Growth and Metabolism of Photosynthetic Micro-organisms in Space. *SAE Technical Papers*, 1–5.
- Cogne, G., Cornet, J-F., Gros, J-B. (2005). Design, operation, and modeling of a membrane photobioreactor to study the growth of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* in space conditions. *Biotechnology Progress*, 21(3), 741–750.
- Converti, A., Scapazzoni, S., Lodi, A., Carvalho, J. C. M. (2006). Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 8–16.
- Cornet, J-F. (1992). Etude cinétique et énergétique d'un photobioréacteur. Etablissement d'un modèle structure. Applications à un écosystème clos artificiel. Thèse de doctorat à l'Université de Paris 11- Centre d'Orsay, France. 356 pp.
- Cornet, J-F. (2007). Procédés Limités par le Transfert de Rayonnement en Milieu Hétérogène : Étude des couplages cinétiques et énergétiques dans les photo-bioréacteurs par une approche thermodynamique. HdR à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France. 349 pp.
- Cornet, J-F., Dussap, C-G. (2009). A Simple and Reliable Formula for Assessment of Maximum Volumetric Productivities in Photobioreactors. *Biotechnology Progress*, 25(2), 424–435.
- Cornet, J-F., Dussap, C-G., Cluzel, P., Dubertret, G. (1992). A Structured Model for Simulation of Cultures of the Cyanobacterium *Spirulina platensis* in Photobioreactors : II . Identification of Kinetic Parameters under Light and Mineral Limitations. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(7), 826–834.
- Cornet, J-F., Dussap, C-G., Gros, J-B. (1998). Kinetics and energetics of photosynthetic micro-organisms in photobioreactors. pp. 153–224 *In* Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis. Schepper T. (Ed.), Springer Berlin Heidelberg.
- Critchley, C. (1988). The chloroplast thylakoid membrane system is a molecular conveyor belt. *Photosynthetic Research*, 19, 265-276.
- Cruvellier, N. (2017). Etude et modélisation du compartiment nitrificateur de la boucle MELiSSA: coculture sur ammonium et triculture sur urée. Thèse de Doctorat à l'Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France. 271pp.

- Cuaresma, M., Garbayo, I., Vega, J.M., Vilchez, C. (2006). Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 158-162.
- Dai, G-Z., Qiu, B-S., Forchhammer, K. (2014). Ammonium tolerance in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and the role of the psbA multigene family. *Plant, Cell and Environment*, 37, 840–851.
- Dahi, G., Eskandari, A., Dauchet, J., Gros, F., Roudet, M., Cornet, J-F. (2015). Chemical Engineering and Processing : Process Intensi fication A novel experimental bench dedicated to the accurate radiative analysis of photoreactors : The case study of CdS catalyzed hydrogen production from sacrificial donors. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 98, 174–186.
- Dainippon Ink and Chemicals, 1985, Lina blue A (Natural blue colorant of Spirulina origin), Technical information. Tokyo, Japan: Dainippon Ink and Chemicals
- Dauchet, J. (2012). Analyse radiative des photobioréacteurs. Thèse de Doctorat à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France. 393pp.
- Dauchet, J., Blanco, S., Cornet, J-F. (2015). Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer Calculation of the radiative properties of photosynthetic microorganisms. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 161, 60–84.
- Dauchet, J., Cornet, J-F., Gros, F., Roudet, M., Dussap, C-G. (2016). Photobioreactor Modeling and Radiative Transfer Analysis for Engineering Purposes. pp. 1–106. *In Advances in Chemical Engineering : Photobioreaction Engineering*, vol. 48. Legrand J. (Ed.), Academic Press.
- De Bashan, L.E., Trejo, A., Huss, V.A.R., Hernandez, J.P., Bashan, Y. (2008). *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology*, 99,4980–4989.
- De Jesus Raposo, M.F., De Morais, R.M.S.C., De Moaris, A.M.M.B. (2013). Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine Drugs*, 11, 233–252.

- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Michaud, P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1159-1179.
- Deschoenmaeker, F. (2016). Nitrogen Metabolism of Cyanobacteria , *Arthrospira* sp . PCC 8005. Thèse de doctorat à l'Université de Mons, Belgique. 340pp
- Deroche, M-E. (1983). Relations entre la photosynthèse et l'assimilation de l'azote. *Bulletin de La Société Botanique de France. Actualités Botaniques*, 130(1), 85–98.
- Dewapriya, P., Kim, S-K. (2014). Marine microorganisms: an emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods. *Food Research International*. 56, 115–125.
- Dillon J.C., Phan P.A. (1993) Spirulina as a source of proteins in human nutrition. pp 103–107. *In Spiruline algue de vie*, vol 12. Doumengue F, Durand-Chastel H, Toule-Mont A (Eds). Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco.
- Dinsdale, M.T., Walsby, A.E. (1972). The interaction of cell turgor pressure, gas-vacuolation, and buoyancy in a blue-green alga. *Journal of experimental Botany*, 23,561-570.
- Drath, M., Kloft, N., Batschauer, A., Marin, K., Novak, J., Forchhammer, K. (2008). Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiology*, 147(1), 206–15.
- Dussap C-G. (1988). Etude thermodynamique et cinétique de la production de polysaccharides microbiens par fermentation en limitation par le transfert d'oxygène : Modèle structuré de la production de xanthane. Thèse de doctorat à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France. 274 pp.
- Eilers, P.H.C., Peeters, J.C.H. (1988). A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modelling*, 42, 199–215.
- El Gamal, A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(1), 1–25.
- Ensing, E.P., Ciuti, S., de Wijs, F.A.L.M., Lentferink, D.H., Ten Hoedt, A., Boyce, M.S., Hut, R.A. (2014). GPS Based Daily Activity Patterns in European Red Deer and North American Elk (*Cervus elaphus*): Indication for a Weak Circadian Clock in Ungulates. *Plos One*, 9(9), e106997.

- Esquível, M.G., Amaro, H.M., Pinto, T.S., Fevereiro, P.S., Malcata, F.X. (2011). Efficient H₂ production via *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends in Biotechnology*, 29(12), 595–600.
- Falquet, J. (1996). Spiruline, Aspects Nutritionnels. *Antenna Technology*. 1-41.
- FAO (1973). Energy and protein requirement. Report of a Joint FAO/WHO adhoc Expert Committee, vol. 52. Geneva.
- Farges, B., Laroche, C., Cornet, J- F., Dussap, C-G. (2009). Spectral kinetic modeling and long-term behavior assessment of *Arthrospira platensis* growth in photobioreactor under red (620 nm) light illumination. *Biotechnology Progress*, 25(1), 151–162.
- Farges, B., Poughon, L., Pons, A., Dussap, C-G. (2012). Methodology for Bioprocess Analysis : Mass Balances , Yields and Stoichiometries. pp. 261–286. *In Stoichiometry and research - The importance of quantity - in Biomedicine*. Alesion Innocenti D.R. (Ed.). InTech, Rijeka, Croatie.
- Filali Mouhim, R., Cornet, J-F., Fontaine, T., Fournet, B., Dubertret, G. (1993). Production, Isolation and Preliminary characterization of the exopolysaccharides of the cyanobacterium *Spirulina Platensis*. *Biotechnology Letters*, 15(6), 567–572.
- Flores, E., Frías, J. E., Rubio, L. M., Herrero, A. (2005). Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 83(2), 117–133.
- Fox, R.D. (1999). La Spiruline : Technique, pratique et promesse. Ed. Edisud. France. 246 pp.
- Gardeva, E., Toshkova, R., Minkova, K. (2009). Cancer protective action of polysaccharide, derived from red microalga *Porphyridium cruentum* - A biological background. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 783–787.
- Geresh, S., Adin, I., Yarmolinsky, E., Karpasas, M. (2002). Characterization of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: molecular weight determination and rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 50, 183–189.
- Graham, L.E., Wilcox, L.W. (2000). *Algae*. Prentice Hall (Ed.). Upper Saddle River, NJ
- Harris, E. H. (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook : Organellar and Metabolic Processes*, vol. 2. Stern D. et Harris E. (Eds.), Academic Press, Elsevier, USA.

- Hemschemeier, A., Fouchard, S., Cournac, L., Peltier, G., Happe, T. (2008). Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks. *Planta*, 227(2), 397–407.
- Hendrickx, L., Mastroleo, F., Baatout, S., Paille, C., Mergeay, M., Wattiez, R. (2005). A Global Approach to Assess Stress Response of the Bioregenerative Life Support System Organism *Rhodospirillum rubrum* Under Space-Flight Related Environmental Conditions. *SAE Technical Papers*.
- Hendrickx, L., De Wever, H., Hermans, V., Mastroleo, F., Morin, N., Wilmotte, A., Janssen P., Mergeay, M. (2006). Microbial ecology of the closed artificial ecosystem MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative): Reinventing and compartmentalizing the Earth's food and oxygen regeneration system for long-haul space exploration missions. *Research in Microbiology*, 157, 77–86.
- Henry, C.L., Hwa S.S. (2013). Fed-Batch Cultures, Principles and Applications of semi-batch Bioreactors. Cambridge Editions, 471 pp.
- Ho S.H., Chen C.Y., Chang J.S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244–252.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, 54, 621–639.
- Hua, C.W., Chuang, L.T., Yu, P.C, Chen, C.N.N. (2013). Pigment production by a new thermotolerant microalga *Celastrella* sp. F50. *Food Chemistry*, 138, 2071-2078.
- Huang, J., Roberts, A.J., Leschziner, A.E., Reck-Peterson, S.L. (2012). Lis1 Acts as a "Clutch" between the ATPase and Microtubule-Binding Domains of the Dynein Motor. *Cell*, 150(5), 975-986.
- Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J., Arad, S.M. (2001). Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on Herpes simplex and Varicella zoster viruses. *Journal of Applied Phycology*, 13(2), 127-134.
- Hasunuma, T., Kikuyama, F., Matsuda, M., Aikawa, S., Izumi, Y., Kondo, A. (2013). Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion. *Journal of Experimental Botany*, 64(10), 2943–2954.

- Jha, P., Ali, A., Raghuram, N. (2007). Nitrate-Induction of Nitrate Reductase and its Inhibition by Nitrite and Ammonium Ions in *Spirulina platensis*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 13(2), 163-167.
- John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., Pandey, A. (2011). Bioresource Technology Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102, 186–193.
- Kacena, M. A., Merrell, G. A., Manfredi, B., Smith, E. E., Klaus, D. M., Todd, P. (1999). Bacterial growth in space flight: logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 229- 234.
- Kim, S.M., Jung, Y.J., Kwon, O.N., Cha, K.H., Um, B.H., Chung, D., Pan, C.H. (2012). A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1843–1855
- Kronick, M.N., Grossman, A.R. (1983). Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. *Clinical Chemistry*, 29, 1582–1586.
- Kumar, M., Kaushik, S., Goswami, P. (2016). Biomass and Bioenergy Cyanobacteria: A metabolic power house for harvesting solar energy to produce bio-electricity and biofuels. *Biomass and Bioenergy*, 90, 187–201.
- Lemasson C. (2015). Contribution à l'étude de la production d'hydrogène par *Chlamydomonas reinhardtii* : vers la mise en place d'une production continue en photobioréacteur bi-étagé. Thèse de doctorat à l'Université de Nantes, France. 201pp.
- Li Y, Horsman M, Wu N, Lan CQ, Dubois-Calero N. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*, 24, 815–820.
- Lin, L., Chan, G.Y.S., Jiang, B.L., Lan, C.Y. (2007). Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment. *Waste Management*, 27, 1376–1382.
- Lochab, S., Kumar, P. A., Raghuram, N. (2014). Molecular characterization of nitrate uptake and assimilatory pathway in *Arthrospira platensis* reveals nitrate induction and differential regulation. *Archives of Microbiology*, 196(6), 385–394.
- Lucchetti, A. (2014). Modélisation et conception d'un système de culture de microalgues. Thèse de doctorat à l'Ecole nationale supérieure des Mines, Paris, France. 175 pp.

- Majdoub, H., Mansour, M. Ben, Chaubet, F., Roudesli, M. S., Maaroufi, R. M. (2009). Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(10), 1377–1381.
- Malairaj, S., Muthu, S., Gopal, V. B., Perumal, P., Ramasamy, R. (2016). Qualitative and quantitative determination of R-phycoerythrin from *Halymenia floresia* (Clemente) C. Agardh by polyacrylamide gel using electrophoretic elution technique. *Journal of Chromatography A*, 1454, 120–126.
- Marcati, A., Ursu, A. V., Laroche, C., Soanen, N., Marchal, L., Jubeau, S., Djelveh G., Michaud, P. (2014). Extraction and fractionation of polysaccharides and B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by membrane technology. *Algal Research*, 5, 258–263.
- Markou, G. (2012). Alteration of the biomass composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresource Technology*, 116, 533-535.
- Markou, G., Vandamme, D., Muylaert, K. (2014a). Ammonia inhibition on *Arthrospira platensis* in relation to the initial biomass density and pH. *Bioresource Technology*, 166, 259–265.
- Markou, G., Vandamme, D., Muylaert, K. (2014b). Microalgal and cyanobacterial cultivation : The supply of nutrients. *Water Research*, 65, 186–202.
- Markou, G., Muylaert, K. (2016). Effect of light intensity on the degree of ammonia toxicity on PSII activity of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 216, 453–461.
- Marquardt, J., Rehm, A.M. (1995). *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) from red and green light: characterization of photosystem I and determination of in situ fluorescence spectra of the photosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 30(1), 49-56.
- Martzolff, A. (2013). Analyse systémique du métabolisme carboné et énergétique de *Chlamydomonas reinhardtii*. Thèse de doctorat à l'Université de Nantes, France. 296 pp.
- Mastroleo, F., Leys, N., Benotmane, R. A., Vanhavere, F., Janssen, A., Hendrickx, L., Mergeay, M., Wattiez, R. (2008a). Effects of the ISS low Earth orbit related environment on the transcriptome and proteome expression in the ESA Life Support

- System bacterium *Rhodospirillum rubrum* ATCC 25903. *International Journal of Astrobiology*, 7(1), 86–86.
- Mastroleo, F., Leys, N., Benotmane, R. A., Vanhavere, F., Janssen, A., Hendrickx, L., Wattiez, R., Mergeay, M. (2008b). Low Earth orbit journey and ground simulations studies point out metabolic changes in the ESA life support organism *Rhodospirillum rubrum*. MELiSSA symposium. 37th COSPAR Scientific Assembly. 13-20 Juillet 2008, Montréal, Canada. p.1946.
- Mastroleo, F., Van Houdt, R., Leroy, B., Benotmane, M. A., Janssen, A., Mergeay, M., Vanhavere, F., Hendrickx, L., Wattiez, R., Leys, N. (2009). Experimental design and environmental parameters affect *Rhodospirillum rubrum* S1H response to space flight. *The ISME Journal*, 3, 1402–1419.
- Mastroleo, F., Van Houdt, R., Mergeay, M., Hendrickx, L., Wattiez, R., Leys, N. (2010). Culture in Simulated Microgravity Affects Quorum Sensing in the Life Support Bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1H. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 40(6), 597–598.
- Matsudo, M. C., Bezerra, R. P., Sato, S., Perego, P., Converti, A., Carvalho, J.C.M. (2009). Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. *Biochemical Engineering Journal*, 43, 52–57.
- Matsui, M., Muizzuddin, N., Arad, S. M., Marenus, K. (2003). Sulfated polysaccharides from Red Microalgae Have Antiinflammatory Properties In Vitro and In Vivo. *Applied and Environmental Microbiology*, 104, 13–22.
- Maxwell, K., Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence — a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668.
- Melis, A. (2007). Photosynthetic H₂ metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae). *Planta*, 226, 1075–1086.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O, *et al.* (117 co-authors). (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318, 245–250.

- Minkova, K., Michailov, Y., Toncheva P., Houbavenska, N. (1996). Antiviral activity of *Porphyridium cruentum* polysaccharide. *Pharmazie*, 51, 194.
- Mohite, Y.S., Wakte, P.S. (2011). Photosynthesis , Growth and Cell Composition of *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Under Elevated Atmospheric CO₂ and Nitrogen Supplement. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2(1), 77–94.
- Monsigny, M., Petit, C., Roche, A-C. (1988). Calorimetric Determination of Neutral Sugars by a Resorcinol Sulfuric Acid Micromethod. *Analytical Biochemistry*, 175, 525–530.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767, 414–421.
- Nicholls, D.G., Fergusson, S.J. (2013). Bioenergetics, 4ème édition. Academic Press, Elsevier. 419 pp.
- Nickelsen, J., Kuck, U. (2000). The Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an Experimental System to Study Chloroplast RNA Metabolism. *Naturwissenschaften*, 87, 97–107.
- Oyala, P.H., Stich, T.A., Debus, R.J., Britt, R.D. (2015). Ammonia Binds to the Dangler Manganese of the Photosystem II Oxygen-Evolving Complex. *Journal of the American Chemical Society*, 137 (27), 8829–8837.
- Ould Moulaye, C-B. (1998). Calcul des propriétés de formation en solution aqueuse des composés impliqués dans les procédés microbiologiques et alimentaires Prédiction et réconciliation de données Modélisation des équilibres chimiques et des équilibres entre phases. Thèse de Doctorat à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Patton, C.J., Crouch, S.R. (1977). Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 49, pp. 464-469.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., De-Bashan, L.E., Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45,11–36.
- Pérez Navarro, M., Ames, W.M., Nilsson, H., Lohmiller, T., Pantazis, D.A., Rapatskiy, L., Nowaczyk, M.M., Neese, F., Boussac, A., Messinger, J., Lubitz, W., Cox, N. (2013). Ammonia binding to the oxygen-evolving complex of photosystem II identifies the

- solvent-exchangeable oxygen bridge (μ -oxo) of the manganese tetramer. *PNAS*, 110(39), 15561-15566.
- Philipps, G., Happe, T., Hemschemeier, A. (2012). Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 235, 729–45.
- Picard, C., Larbot, A., Guida-Pietrasanta, F., Boutevin, B., Ratsimihety, A. (2001). Grafting of ceramic membranes by fluorinated silanes: hydrophobic features. *Separation and Purification Technology*, 25(1–3), 65–69.
- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae : biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40, 781–796.
- Pons, A. (1987). Analyse de la production de xanthane par *Xanthomonas campestris* nrrl b-1459 en cuve agitée et en colonne a bulles a l'aide d'un modèle structure. Thèse de doctorat à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France. 182 pp.
- Pons, A., Dussap, C-G., Péquignot, C., Gros, J-B. (1996). Metabolic flux distribution in *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 for various carbon sources. *Biotechnology and Bioengineering*, 51(2), 177-189.
- Pottier, L., Pruvost, J., Deremetz, J., Cornet, J-F., Legrand, J., Dussap, C-G. (2005). A fully predictive model for one-dimensional light attenuation by *Chlamydomonas reinhardtii* in a torus photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(5), 569–582.
- Poughon, L. (1998). L'écosystème artificiel MELiSSA : modélisation et simulation de la boucle en régime permanent et modèle dynamique du compartiment de nitrification. Thèse de doctorat à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France. 268 pp.
- Poughon, L., Dussap, C-G., Gros, J-B. (2001). Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(4), 416–433.
- Poughon, L., Duchez, D., Cornet, J-F., Dussap, C-G. (2003). k_La determination : comparative study for a gas mass balance method. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 25, 341–348.
- Prescott, G.W. (1969). The algae: a review. Thomas Nelson and Sons LTD, London, UK, 436 pp.

- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (2003). Microbiologie, 2^{ème} édition. De Boeck (Ed.), 1137 pp.
- Pröschold, T., Harris, E.H., Coleman, A.W. (2005). Portrait of a Species : *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 170, 1601–1610.
- Pruvost, J., Cornet, J-F. (2012). Knowledge models for the engineering and optimization of photobioreactors, Chapter 10, pp181-224. In *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*. Posten, C., Walter, C. (Eds.), De Gruyter.
- Rahaoui, A. (1999). Ecophysiologie de *Rhodella violacea* (Rhodophyta): production et propriétés structurales des exopolysaccharides et de l'amidon floridéen. 260 pp.
- Reboloso Fuentes, M.M., Acien Fernández, G.G., Sánchez Pérez, J.A., Guil Guerrero, J.L. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, 70, 345–353.
- Ritz, M., Thomas, J-C., Spilar, A., Etienne, A-L. (2000). Kinetics of Photoacclimation in Response to a Shift to High Light of the Red Alga *Rhodella violacea* Adapted to Low Irradiance. *Plant physiology*, 123, 1415-1426.
- Rochaix, J-D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. (1998). The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in *Chlamydomonas* (Govindjee). Kluwer academic publishers.
- Rochatte, V. (2016). Développement et modélisation d'un photobioréacteur solaire à dilution interne du rayonnement. Thèse de doctorat à l'Université Blaise-Pascal, Clermont-Ferrand, France. 268 pp.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100–112.
- Rodrigues, M.S., Ferreira, L.S., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M. (2010). Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 101, 4491–4498.
- Rossi, N. ã., Jaouen, P., Legentilhomme, P., Petit, I. (2004). Harvesting of cyanobacterium *Arthrospira platensis* using organic filtration membranes. *Food and Bioproducts Processing*, 82(C3), 244–250.

- Sakamoto, H., Torada, H., Toto, K., Nakamura, Y., Nakano, T., Yamaguchi, T., Sato, M., Saito, T., Taniguchi, A., Yokoyama, T., Kan-No, N., Nagahisa, E. (2003). Biological activity of the polysaccharide produced by the marine phytoplankton *Porphyridium* sp. and additive effect of slag on the polysaccharide production. *Tetsu-to-Hagane*, 89, 475–481.
- Sander, R. (2015). Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 15, 4399–4981.
- Sasidharan, S. (2012). Modélisation de la croissance des plantes supérieures pour les systèmes de support-vie : modèle métabolique de la feuille de laitue considérant la conversion d'énergie et le métabolisme central du carbone. Thèse de doctorat à l'Université Blaise Pascal, Clermont -Ferrand, France. 214 pp.
- Sassano, C.E.N., Gioielli, L. A., Almeida, K. A., Sato, S., Perego, P., Converti, A., Carvalho, J.C.M. (2007). Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass and Bioenergy*, 31, 593–598.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 1, 20–43.
- Schötz, F., Bathelt, H., Arnold, C.G., Schimmer, O. (1972). Die Architektur und Organisation der *Chlamydomonas*-Zelle. *Protoplasma*, 75, 3, 229–254.
- Schuldiner, S., Rottenberg, H., Avron, M. (1972). Determination of Δ pH in Chloroplasts. *The FEBS Journal*, 25(1), 64–70.
- Schumpe, A. (1985). Gas solubilities in biomedica, pp.160-170. In *Biotechnology*, Vol. 2, Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), Weinheim : VCH Publishers.
- Sguera, S. (2008). *Spirulina platensis* et ses constituants (intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques). Thèse de Pharmacie à l'Université de Nancy I, Nancy, France. 163 pp.
- Sialve, B., Steyer, J.-P. (2013). Les microalgues, promesses et défis. *Innovations Agronomiques*, 26, 25–39.
- Soanen, N., Da Silva, E., Gardarin, C., Michaud, P., Laroche, C. (2016). Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. *Bioresource Technology*, 213, 231–238.

- Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J.C.M., Converti, A. (2005). Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243, 217–224.
- Tan, X-B., Zhang, Y-L., Yang, L-B., Chu, H-Q., Guo, J. (2016). Outdoor cultures of *Chlorella pyrenoidosa* in the effluent of anaerobically digested activated sludge: The effects of pH and free ammonia. *Bioresource Technology*, 200, 606–615.
- Tang, Z., Zhao, J., Ju, B., Li, W., Wen, S., Pu, Y., Qin, S. (2016). One-step chromatographic procedure for purification of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Protein Expression and Purification*, 123, 70–74.
- Tolleter, D., Ghysels, B., Alic, J., Petroutsos, D., Tolstygina, I., Krawietz, D., Happe, T., Auroy, P., Adriano, J-M., Beyly, A., Cuiné, S., Plet, J., Reiter, I.M., Genty, B., Cournac, L., Hippler, M., Peltier, G. (2011). Control of hydrogen photoproduction by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant cell*, 23, 2619-2630.
- Toure, O. (2014). Prédiction des propriétés d'équilibre dans les milieux biologiques et alimentaires par le modèle COSMO-RS. Thèse de doctorat à l'Université Blaise-Pascal, Clermont-Ferrand, France. 295 pp.
- Toure, O., Dussap, C-G., Lebert, A. (2013). Comparison of Predicted pK a Values for Some Amino-Acids, Dipeptides and Tripeptides, Using COSMO-RS, ChemAxon and ACD/Labs Methods. *Oil & Gas Science and Technology*, 68(2), 281–297.
- Toure, O., Audonnet, F., Lebert, A., Dussap, C-G. (2014). COSMO-RS-PDHS: A new predictive model for aqueous electrolytes solutions. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(12), 2873–2883.
- Toure, O., Audonnet, F., Lebert, A., Dussap, C-G. (2015). Development of a thermodynamic model of aqueous solution suited for foods and biological media. Part A: Prediction of activity coefficients in aqueous mixtures containing electrolytes. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 93, 443–450.
- Toure, O., Audonnet, F., Lebert, A., Dussap, C-G., (2015). Development of a Thermodynamic Model of Aqueous Solution Suited for Foods and Biological Media. Part A: Prediction

- of Activity Coefficients in Aqueous Mixtures Containing Electrolytes. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 93(2), 443–450.
- Toure, O., Lebert, A., Dussap, C-G. (2016). Fluid Phase Equilibria Extension of the COSMO-RS-PDHS model to the prediction of activity coefficients in concentrated { water-electrolyte } and { water-polyol } solutions. *Fluid Phase Equilibria*, 424, 90–104.
- Toure, O., Dussap, C-G. (2016). Determination of Gibbs energies of formation in aqueous solution using chemical engineering tools. *Bioresource Technology*, 213, 359–368.
- Vidyashankar, S., Deviprasas, K., Chauhan, V.S., Ravishankar, G.A., Sarada, R. (2013). Selection and evaluation of CO₂ tolerant indigenous microalga *Scenedesmus dimorphus* for unsaturated fatty acid rich lipid production under different culture conditions. *Bioresource Technology*, 144, 28–37.
- Voet, D., Voet, J.G. (2005). Biochimie, 2ème édition. De Boeck Editions, 1583 pp.
- Vonshak, A. (1997). Physiology, Cell-Biology and Biotechnology. Taylor & Francis, London, UK.
- Walther, I., Bechler, B., Müller, O., Hunzinger, E., Cogoli, A. (1996). Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* in a bioreactor in microgravity. *Journal of Biotechnology*, 47, 113-127.
- Whitman, W.G., Russel, R.P., Welling, C.M., Cochrane, J.D. (1923). The Effect of Velocity on the Corrosion of Steel in Sulfuric Acid. *Industrial and Engineering Chemistry*, 15(6), 672-676.
- Xu, X-Q., Beardall, J., Hallam, N.D. (1998). Modification of fatty acid composition in halophilic antarctic microalgae. *Phytochemistry*, 49(5), 1249-1252.
- Xue, Y., Okvist, M., Hansson, O., Young, S. (1998). Crystal structure of spinach plastocyanin at 1.7Å resolution. *Protein Science*, 7, 2099–2105.
- Yang, H., Xu, Y., Zhu, W., Chen, K., Jiang, H. (2007). Detailed mechanism for AmtB conducting NH₄⁺/NH₃: molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 92(3), 877–885.
- Yen, H.W., Hu, I.C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Lee, D. J., Chang, J.S. (2013). Microalgae-based biorefinery - From biofuels to natural products. *Bioresource Technology*, 135, 166–174.

Sources et bases de données internet

- [1] <http://lepoumondelaplanete.e-monsite.com/pages/partie-1/1.html>
- [2] <http://lesbeauxjardins.com/cours/botanique/2-cytologie/mitochondrie.gif>
- [3] http://fr.123rf.com/photo_41854862_photosynthese-schema-du-processus-de-la-photosynthese-montrant-les-reactions-a-la-lumiere-et-le-cycl.html, le 26/07/2016
- [4] http://www.quizz.biz/uploads/quizz/115755/8_7C3EA.jpg
- [5] http://www.olmix.com/sites/default/files/algue_verte.jpg
- [6] <http://www.thedifferentmagazine.com/images/stories/BEAUTE/forme/spiruline.jpg>
- [7] <http://www.images.google.fr/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fupload.wikimedia.org%2Fwikipedia%2Fcommons%2Fthumb%2Ff%2Ff5%2FCyanobacterium-fr.svg%2F330px-Cyanobacterium-fr.svg.png&imgrefurl=https%3A%2F%2Ffr.wikipedia.org%2Fwiki%2FCyanobacteria&h=184&w=330&tbnid=1MfOOIIt75F2QM%3A&vet=1&docid=k0bBFC0IPNVCoM&ei=bAxMWOuAOMX9ULa5hLgJ&tbnm=isch&client=firefox-b-ab&iact=rc&uact=3&dur=697&page=0&start=0&ndsp=29&ved=0ahUKEwjr5uPE5unQAhXFPhQKHbYcAZcQMwgxKAAwAA&bih=917&biw=1680>
- [8] <http://www.energyrealities.org/images/otc/input/content/598/w/erpB5E6A7E23592B6FDB.jpg>
- [9] <http://www.tpe.bacterie.free.fr>
- [10] <http://www.melissafoundation.org>
- [11] <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/page-electrode.html>
- [12] <https://www.aquaportail.com/definition-3968-photophosphorylation.html>

ChemSpider, Search and share chemistry : <http://www.chemspider.com/>

eEquilibrator 2.0: <http://equilibrator.weizmann.ac.il/>

ChlamyCyc : <http://chlamyto.mpimp-golm.mpg.de/chlamycyc/index.jsp>

PMN, *Chlamydomonas reinhardtii* Pathways : <http://pmn.plantcyc.org/CHLAMY/class-tree?object=Pathways>

Résumé

Financés par deux projets de recherche distincts (AlgoH2 (ANR) et MELiSSA (ESA)), ces travaux de thèse, réalisés au sein de l'axe GePEB, sont axés sur l'application de modèles de connaissance pour le fonctionnement de l'énergétique cellulaire sur des cultures de microorganismes photosynthétiques.

La première étude a été réalisée sur la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*, afin d'optimiser la production de dihydrogène. Le travail a été de « regrouper » l'ensemble des réactions métaboliques existantes dans la cellule afin de réaliser une étude stœchiométrique et thermocinétique du fonctionnement cellulaire en phase de croissance et de production d'hydrogène, l'objectif étant de pouvoir comprendre, contrôler et optimiser la production de dihydrogène en photobioréacteur. Une contribution de ce travail est également d'assembler une base de données cohérente réunissant les propriétés de formation de composés impliqués dans le fonctionnement cellulaire, ceci afin d'appliquer les règles de calculs d'équilibres thermochimiques aux composés du métabolisme cellulaire.

Dans un second temps, un miniphotobioréacteur, développé au sein du laboratoire en 2003 a été optimisé et modernisé. Ce miniPBR permet de réaliser des analyses rapides sur le fonctionnement de la photosynthèse. Son dimensionnement en deux compartiments superposés et séparés par une membrane présente l'intérêt de pouvoir extrapoler le comportement de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* en condition de microgravité spatiale. Un modèle de connaissance de la photosynthèse, regroupant les transferts radiatifs et la cinétique de croissance en présence de nitrates avait préalablement été développé, ce qui a permis de valider les tests préliminaires réalisés en fioles de Roux sur différentes sources nutritives azotées et ainsi de viser de nouvelles améliorations du miniPBR.

Mots clés : Microorganismes photosynthétiques, Modèles de connaissances, Etude thermocinétique, Source d'azote, Photobioréacteur.

Abstract

Funded by two separate research projects (AlgoH2 (ANR) and MELiSSA (ESA)), this work, conducted within the GePEB axis, is focused on the application of knowledge models of energetics of living cells for cultures of photosynthetic microorganisms.

The first study was conducted on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, in order to optimize the bio-production of dihydrogen. The work has been to gather the whole metabolic reactions existing in the cell in order to carry out a stoichiometric and thermokinetic study of the cellular functioning of growth and hydrogen production phases, the objective being to understand, control and optimize the production of hydrogen in photobioreactor. A contribution of this work is also to assemble a consistent database, bringing together the properties of formation of compounds involved in the cellular functioning, in order to apply the rules of calculations of thermochemical equilibria to compounds of cellular metabolism.

As a second part of the study, a mini-photobioreactor developed in the lab in 2003 has been optimized and modernized. This mini-PBR allows realizing fast analyzes on the functioning of the photosynthesis. The design in two compartments separated by a membrane presents the interest extrapolating the behavior of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* in conditions of microgravity. A model of knowledge of the photosynthesis, grouping the radiative transfer and the kinetics of growth on nitrate source had previously been developed. Comparing the preliminary tests carried out in Roux flasks on different nutrient nitrogen sources with model allowed better understanding of the cellular metabolism and further improvements of the mini-PBR.

Keywords: Photosynthetic microorganisms, Knowledge models, Thermokinetic study, Nitrogen sources, Photobioreactors