



Étude des mécanismes de conversion photosynthétique de l'énergie lumineuse par *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur solaire

Marlène Bonnanfant

► To cite this version:

Marlène Bonnanfant. Étude des mécanismes de conversion photosynthétique de l'énergie lumineuse par *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur solaire. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Le Mans Université, 2020. Français. NNT : 2020LEMA1015 . tel-03084439

HAL Id: tel-03084439

<https://theses.hal.science/tel-03084439>

Submitted on 21 Dec 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.

THESE DE DOCTORAT

LE MANS UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : *Biologie des organismes*

Par

Marlène BONNANFANT

Etude des mécanismes de conversion photosynthétique de l'énergie lumineuse par *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur solaire.

Thèse présentée et soutenue en visioconférence, le 16 juin 2020
Unité de recherche : Mer Molécules Santé (MMS), FR CNRS 3473 IUML,
Thèse N° : 2020LEMA1015

Rapporteurs avant soutenance :

Stefano Caffarri	Professeur à Aix-Marseille Université
Jérôme Morchain	Maître de conférences à INSA Toulouse

Composition du Jury :

Jean-François Cornet (Président du jury)	Professeur à SIGMA Clermont
Stefano Caffarri	Professeur à Aix-Marseille Université
Jérôme Morchain	Maître de conférences à INSA Toulouse
Douglas A. Campbell	Professeur à Mount Allison University
Cecilia Sambusiti	Ingénieure de recherche chez Total SA, Perl
Jean-Luc Mouget (Directeur de thèse)	Professeur au Mans Université
Jérémy Pruvost (Co-directeur de thèse)	Professeur à l'Université de Nantes
Bruno Jesus (Co-encadrant de thèse)	Maître de conférences à l'Université de Nantes

Invitée

Françoise Ergan	Professeur au Mans Université
-----------------	-------------------------------

Remerciements

En premier lieu, je remercie la région Pays de la Loire qui, au travers du programme AMI (Atlantic Microalgae), a financé cette thèse. De la même façon, je remercie la commission européenne qui, par le programme H2020 GHaNA (Genus Haslea, New marine resources for blue biotechnology and Aquaculture), a financé mon séjour de recherche à Mount Allison University de Sackville (NB) au Canada.

Ensuite je remercie Jack Legrand et Pascal Jaouen, anciens directeurs du laboratoire GEPEA pour m'avoir accueillie dans leur locaux et pour m'avoir permis de bénéficier des infrastructures.

Bien évidemment, je tiens à remercier Jérémy Pruvost, Professeur de l'Université de Nantes, actuel directeur du GEPEA et co-directeur de cette thèse sans qui, ce travail n'aurait jamais vu le jour. Je le remercie d'avoir partagé ses connaissances avec moi, je le remercie pour toutes les discussions intéressantes, tous ses conseils toujours pertinents et pour sa disponibilité. Merci.

Je remercie également Jean-Luc Mouget, Professeur du Mans Université et directeur de cette thèse pour ses conseils et sa disponibilité. Je le remercie également de m'avoir permis de bénéficier du programme H2020 GHaNA pour partir 6 mois au Canada.

De même, je remercie Bruno Jesus, Maître de conférences de l'Université de Nantes et co-encadrant de cette thèse pour tous ses conseils précieux. Je le remercie d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions.

Bien-sûr je remercie Douglas A. Campbell, Professeur à Mount Allison University (Sackville, NB, Canada) de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Il a pris le temps de me transmettre une partie de son savoir, c'était pour moi et pour cette thèse très enrichissant. Je le remercie également d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. A travers ces quelques mots, je remercie également toutes les personnes qui m'ont si chaleureusement accueillie lors de mon séjour, en particulier Miranda Corkum, Natalie Donaher et Amanda Cockshutt.

Je remercie également Stefano Caffarri, Professeur d'Aix-Marseille Université, et Jérôme Morchain, Maître de conférences de l'INSA Toulouse, d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et Cecilia Sambusiti, Ingénieure de recherche de chez Total SA, PERL, pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse. Je remercie également Françoise Ergon, Professeur au Mans Université, d'avoir accepté l'invitation, très tardive, à ma soutenance de thèse.

Je tiens aussi à remercier Jean-François Cornet, Professeur de SIGMA Clermont, pour avoir d'une part accepté la présidence de mon jury de thèse et d'autre part, pour avoir fait partie de mon Conseil de Suivi Individuel. Par la même occasion, j'en profite pour remercier Gilles Peltier, Chercheur du CEA, pour avoir, lui aussi, fait partie de mon CSI. Votre écoute et vos conseils ont permis d'orienter et d'améliorer cette thèse. Merci à vous.

Bien évidemment, une thèse n'est pas un voyage en solitaire et cette thèse n'aurait pas vu le jour sans les nombreux collègues du GEPEA qui n'ont pas hésité à m'aider au moindre problème.

En particulier, je remercie Hélène qui, par sa connaissance des photobioréacteurs du laboratoire et de leurs programmes obscurs a été indispensable à la réalisation de ce travail. Merci pour ton aide, ta disponibilité et ta gentillesse. C'était un réel plaisir de travailler avec toi.

Egalement merci Mariana pour ton aide. Tu t'es rendue disponible pour éclaircir certains points que je ne comprenais pas alors que tu étais très occupée par ailleurs et c'était toujours un bonheur de discuter avec toi.

Merci Guillaume pour avoir partagé l'encadrement de Putty avec moi. Tu m'as également permis de comprendre beaucoup d'aspects du travail de modélisation des systèmes biologiques. Je remercie également Raphaëlle qui dès mes premiers jours m'a accueillie et m'a appris tout ce qu'il fallait savoir. Tu as toujours été là quand j'en avais besoin, et toujours avec le sourire ! Je remercie aussi grandement mes stagiaires Putty et Victorien qui m'ont beaucoup aidée lors de ma dernière année. Votre implication et votre sérieux ont permis à cette thèse d'aller encore plus loin qu'espéré. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Merci aux autres collègues que je croisais régulièrement, Delphine, Sébastien, Rémy C. (Wikipedia du labo), Carole, Nesrine, Fanny, Dominique, Laurence, Estelle, Olivier, Pascale, Guillaume R., Marie- Pierre, Maeva, Anthony M., Catherine, Emmanuel, Benjamin, Jordan, Abdel et j'en oublie peut-être (désolé). Tout le monde a toujours été très disponible pour m'aider et me soutenir. Quand on doute, un sourire ou un conseil peut faire la différence alors merci à vous.

Je remercie aussi Laurette pour toutes ces discussions du matin autour parfois d'une orchidée. C'était un petit rituel que j'appréciais beaucoup.

Ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans les personnes avec qui j'ai partagé bien plus qu'une simple aventure scientifique. Parmi eux et en premier je dois remercier la géniale Antoinette ! Merci pour tout ce que tu m'as appris dès mon arrivée. Tu as toujours été adorable avec moi, tu m'as montré le bon chemin à suivre tu m'as toujours dit que je ferai une super

thèse. Je ne sais pas si elle est super mais elle est finie en tout cas ! Merci également à Fernando qui m'a supportée à chaque doute. Tu as toujours été de très bon conseil et on ne rencontre pas un collègue comme toi tous les jours. Chaque matin, j'avais le sourire parce que je savais qu'on allait rire ensemble ! Merci aussi à Antoine D., on a beaucoup échangé sur nos sujets de thèses et c'était super intéressant de croiser nos idées. Et puis travailler avec toi dans les laboratoires, c'était un peu comme mettre son MP3 en mode aléatoire et se laisser entraîner par les musiques du moment (ou très datées), et ça mettait toujours de bonne humeur ! Merci Eglantine, tu es celle avec qui j'ai partagé pendant le plus de temps le bureau. J'ai beaucoup appris en te regardant travailler, tu es un exemple de courage et d'endurance. Merci Shuli pour ton soutien et pour ta bonne humeur (et merci à Cici aussi pour ses câlins). Merci Vladimir pour toutes les discussions « philosophiques » qu'on a pu avoir, pour les cours de danse et de roller, c'était trop cool ! Merci à mes anciens collègues de bureau que je n'ai pas encore cité, Julien, Sikandar et Joris. C'était toujours bien de pouvoir partager des bons moments avec vous-même si certains me laissaient parfois parler un peu seule... Merci aux ananas Myriam, Charlène, Rosine, Erika, Dounia, Lisa pour votre bonne humeur et pour tous vos bons conseils. Et merci à Alexandra, Rémi N., Armel, Philippe, Jérémy M., Elsa, Danièle, Lucie, Robin, Sarra, Anthony R. Guillaume T., Kashif, Hengsim, Flora, Nôurhen, Rhadija. Encore une fois j'espère ne pas en oublier. C'est grâce à vous tous si ces années sur Saint-Nazaire ont été si chouettes. Vivent le BK, le beach-volley, le tennis, le guacamole, les jeux de sociétés et j'en passe !

Et il n'y a pas que la science dans la vie, il y a aussi la musique. J'ai eu la chance pendant ces quelques années de faire partie d'un groupe de musique irlandaise et je tiens à en remercier tous les membres pour leur accueil et leur bonne humeur ! Merci donc à Franck, Muriel, Sylvie, François, Jean-François, Jean-Christophe et Patrick. Les répétitions n'étaient pas toujours efficaces mais on rigolait bien. Je vous souhaite plein de beaux concerts à venir !

Je tiens également à remercier tous mes amis « hors Saint Nazaire ». Que ce soient mes amis de Thiers ou de Marseille, c'était toujours super de vous voir même si c'était rare et souvent trop court. A chaque fois vous m'avez soutenu et vous m'avez changé les idées. Alors merci Louise, Lucie, Lucille, Cécile, Julien, Sarah, Simon, Aude, Alicia, Elodie, Fanny, Juliette, Marion P., Marion F.,...

Merci également à toute ma famille qui me soutient depuis toujours. Les retrouvailles régulières ont été essentielles pour moi. Merci pour tous ces moments. En particulier, je remercie ma sœur, Aline, qui m'a toujours écoutée quand j'en avais besoin et qui a toujours été de très bon conseil.

Bien sûr, je remercie Antoine, mon compagnon qui m'a supportée pendant ces années et qui continue de le faire. Cette thèse s'est souvent immiscée dans nos week-end et dans nos vacances alors merci d'avoir été patient et compréhensif. Tu as toujours eu le bon mot pour me faire rire et relativiser. Merci également pour tous tes conseils même s'il n'était pas toujours bien approprié de les appliquer.

Et finalement je remercie mes parents qui ont toujours été d'un grand soutien. Entre biologie et mathématiques, je pense que ma thèse est un bon mélange de ce que vous m'avez transmis. Papa, tu m'as toujours encouragé à faire ce que j'aimais dans la vie et Maman, tu m'as appris la valeur du travail bien fait. Tout cela m'a énormément servi pendant ces années de thèse. Merci à vous d'être mes modèles.

Liste des communications

Publications :

Xu, K., Lavaud, J., Perkins, R., Austen, E., Bonnanfant, M., Campbell, D.A., (2018). Phytoplankton σ PSII and Excitation Dissipation; Implications for Estimates of Primary Productivity. *Front. Mar. Sci.* 5.

Bonnanfant, M., Jesus, B., Pruvost, J., Mouget, J.-L. and Campbell, D. A. (2019). Photosynthetic electron transport transients in *Chlorella vulgaris* under fluctuating light, *Algal Research*, **44**, pp. 101713. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101713.

Communications internationales :

Bonnanfant M., Jesus B., Mouget J.L., Pruvost J., Campbell D.A. Transient acceleration and inhibition of Electron Transport Rate in *Chlorella vulgaris* and *Haslea* diatom. (Aquafluo II, Sydney, Dec 2017). Poster.

Bonnanfant M., Jesus B., Mouget J-L, Pruvost J.. Estimating growth and photosynthesis efficiency by using online Chlorophyll a fluorescence in microalgae culture systems. (IWAAlgae 2019, Valladolid, Jul 2019). Communication orale.

Pruvost J., Gonçalves O., Titica M., Bonnanfant M., Assaf A., Farjon J., Bouillaud D., Giraudeau P.. Advanced monitoring for the real-time optimization of microalgae solar culture systems. (AlgaEurope 2019, Paris, Dec 2019). Communication Orale.

Communications nationales :

Bonnanfant M., Jesus B., Mouget J-L, Pruvost J. Photosynthetic mechanisms and light energy conversion by microalgae in solar photobioreactors. (Atlantic Microalgae Consortium Conference, Nantes, June 2018). Communication orale.

Bonnanfant M., Marec H. Jesus B., Mouget J-L, Pruvost J. Etude en photobioréacteur contrôlé de l'impact de boucles sombres sur la croissance de microalgues. (SFGP 2019, Nantes, Oct 2019). Communication orale.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1. La culture solaire de micro-algues : problématiques et enjeux	5
1.1 L'intérêt industriel des micro-algues	5
1.1.1 Le marché des micro-algues	5
1.1.2 Les verrous économiques et énergétiques	5
1.1.3 Intérêts de <i>Chlorella vulgaris</i>	6
1.2 Physiologie des micro-algues vertes	6
1.2.1 La cellule micro-algale	6
1.2.2 Les réactions biochimiques se déroulant en présence de lumière	7
1.2.3 Les réactions biochimiques se déroulant à l'obscurité	18
1.2.4 Causes et conséquences des réactions biochimiques	20
1.3 Les systèmes de production des micro-algues	20
1.3.1 Les systèmes ouverts	20
1.3.2 Les systèmes clos ou photobioréacteurs	21
1.3.3 Exemple d'un photobioréacteur de laboratoire	21
1.4 Les paramètres influençant la culture des micro-algues	22
1.4.1 La lumière	22
• Les variations de lumières externes au PBR	31
• Les variations de lumières dues à l'hydrodynamique dans le PBR	32
• Problématique des boucles sombres	35
1.4.2 Les nutriments	36
1.4.3 Le pH	38
1.4.4 La température	39
1.4.5 Le dioxygène dissous	39

1.5	Ingénierie des PBRs.....	40
1.5.1	Mode de fonctionnement des PBRs	40
1.5.2	Productivité des systèmes de culture.....	41
1.5.3	Modèle cinétique de croissance des micro-algues	42
1.6	Etude de la physiologie des micro-algues	43
1.6.1	Concentration en biomasse et teneurs en pigments.....	43
1.6.2	Bilan sur les gaz	43
1.6.3	La fluorescence in vivo de la chlorophylle <i>a</i>	44
1.7	Conclusions et objectifs de l'étude	53
Chapitre 2. Accélération transitoire du transport des électrons chez <i>Chlorella vulgaris</i> lors de variations de lumière		55
Photosynthetic electron transport transients in <i>Chlorella vulgaris</i> under fluctuating light.		56
2.1	Introduction	57
2.1.1	Photo-bioreactors and light environments.....	57
2.1.2	Time dependencies in photosynthesis processes and mechanisms.	57
2.1.3	σ_{PSII}' and $1/\tau'$ determine achieved Photosystem II electron transport.....	58
2.1.4	<i>Chlorella vulgaris</i> as a model and industrial organism	59
2.2	Material and methods	60
2.2.1	Culture protocol.....	60
2.2.2	Light treatment and Fast Repetition Rate fluorescence measurement	60
2.2.3	Fluorescence parameters	62
2.2.4	Data analyses.....	64
2.3	Results and discussion	65
2.3.1	Electron transport rate light responses and hysteresis.....	65
2.3.2	Changes in Y_{PSII} driven by σ_{PSII}' and $1/\tau'$ explain hystereses in ETR_{PSII} responses	66
2.3.3	PSII inactivation, repair and non-photochemical dissipation.....	70

2.4	Conclusions	74
	Supplemental figures.....	75
Chapitre 3.	Etude de la réponse photosynthétique de <i>Chlorella vulgaris</i> aux variations de lumière en photobioréacteur.....	77
	Investigation of the photosynthetic response of <i>Chlorella vulgaris</i> to light changes in photobioreactors	78
3.1	Introduction	79
3.2	Material and methods	80
3.2.1	Pre-culture protocol.....	80
3.2.2	Cultures protocol	80
3.2.3	Analyses	83
3.2.4	Determination of the light attenuation conditions.....	84
3.2.5	Photoacclimation model	85
3.3	Results	88
3.3.1	Cultures in continuous light	88
3.3.2	Culture in dynamic light conditions	90
3.3.3	Comparison between model and experimental data for <i>C. vulgaris</i> photoacclimation	99
3.4	Discussion.....	102
3.4.1	Use of MRPA to correlate biomass and pigment concentration evolutions	102
3.4.2	Sudden changes in MRPA induce a slow evolution of biomass and pigment concentration	103
3.4.3	Different biological mechanisms involved between increasing and decreasing PFD transitions.....	105
3.5	Conclusion	106
Chapitre 4.	Intérêt de l'utilisation de la fluorescence de chlorophylle <i>a</i> de type PAM pour le suivi de cultures en photobioréacteurs solaires	107
	Interest of using chlorophyll <i>a</i> PAM fluorescence to monitor solar photobioreactors	108

4.1	Introduction	109
4.2	Materials and methods.....	110
4.2.2	Off-line analyses	113
4.2.3	Determination of the fluence rate inside the PBR.....	113
4.2.4	Determination of parameters related to photosynthesis	114
4.2.5	Determination of the rate of O ₂ production (rO ₂).....	115
4.2.6	Data analyses.....	118
4.3	Results and discussion.....	119
4.3.1	Comparison between online and off-line PAM chlorophyll <i>a</i> fluorescence measurements.....	119
4.3.2	The use of online fluorescence to detect negative growth conditions.....	124
4.3.3	The use of PAM chlorophyll <i>a</i> fluorescence to estimate biomass productivity	126
4.3.4	Strategy to use PAM chlorophyll <i>a</i> fluorescence measurements in solar PBRs	132
4.4	Conclusion.....	133
Chapitre 5. Utilisation d'un photobioréacteur contrôlé pour l'étude de l'effet de boucles sombre sur la culture de <i>Chlorella vulgaris</i>		135
Use of a control photobioreactor to study the effect of design dark fractions on <i>Chlorella vulgaris</i> culture.....		136
5.1	Introduction	137
5.2	Materials and methods.....	138
5.2.1	Culture protocol.....	138
5.2.2	Off-line analyses	140
5.2.3	Determination of the light transfer conditions in the PBR.....	141
5.2.4	Determination of volumetric and surface productivities.....	142
5.2.5	Online analyses	142
5.3	Results and discussion.....	144

5.3.1	Validation of a LED panel for dark fractions simulation.....	144
5.3.2	Impact of dark fractions on surface productivity and pigment content.....	145
5.3.3	Study of dynamic responses to dark fractions.....	148
5.3.4	Attempt to describe the mechanisms responsible for the loss of productivity .	152
5.4	Conclusion.....	156
Conclusions et perspectives		159
Références bibliographiques		167
Annexes		191

Liste des figures

Figure 1 : Photographie au microscope électronique d'une cellule de <i>Chlorella vulgaris</i> en coupe longitudinale. Abréviations : cw – paroi cellulaire, ch – chloroplaste, t – thylakoïdes, st – amidon, n- noyau, nl – nucléole, m – mitochondrie. Echelle : 1 µm. (Tomaselli, 2007).....	7
Figure 2 : Comparaison du spectre d'absorption de la chlorophylle et des pigments accessoires par rapport au spectre solaire (Williams and Laurens, 2010).....	8
Figure 3 : Produits majoritaires lors des réactions claires et sombres de la photosynthèse (Masojidek <i>et al.</i> , 2013).	9
Figure 4 : Schéma en Z du transport des électrons lors de la photosynthèse (Modifié d'après Govindjee <i>et al.</i> , 2017).....	10
Figure 5 : Réactions permettant la fixation du CO ₂ et sa transformation en hydrates de carbone lors du cycle de Calvin-Benson (Mojgane, 2015).....	11
Figure 6 : Représentation de la photosynthèse et de la photorespiration, deux mécanismes compétitifs (Peterhansel <i>et al.</i> , 2010).....	12
Figure 7 : Représentation simplifiée de la dissipation régulée de chaleur nommée qE chez les plantes supérieures (Lavaud, 2007).....	13
Figure 8 : Cycle des xanthophylles des micro-algues vertes (Goss et Jakob, 2010).....	13
Figure 9 : Représentation des mécanismes se produisant lors du cycle autour du Photosystème II (Lavaud <i>et al.</i> , 2007).....	14
Figure 10 : Représentation des réactions impliquées dans le cycle eau-eau (Miyake, 2010)..	15
Figure 11 : Comparaison du devenir des photons absorbés chez <i>P. tricornutum</i> et <i>C. vulgaris</i> cultivés en lumière fluctuante (FL) ou sinusoïdale (SL) (Ralph <i>et al.</i> , 2010).....	15
Figure 12 : Représentation du mécanisme de transition d'état se produisant chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Kargul et Barber, 2008).	16
Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation moléculaire du PSII. Les protéines constituantes majoritaires du PSII sont CP43, CP47, Cyt b ₅₅₉ , D1 et D2. Les sous-unités D1 et D2 sont liées à la plupart des accepteurs d'électrons (Masojidek <i>et al.</i> , 2013).....	18
Figure 14 : La respiration mitochondriale (ac-Grenoble, no date).....	19
Figure 15 : Bassin de type « raceway » pour la culture de micro-algues (Seambiotic Ltd, Israël, no date).	20
Figure 16 : Photobioréacteurs tubulaires (a4f, Portugal, no date).....	21

Figure 17 : Photobioréacteur torique (GEPEA, (Pruvost <i>et al.</i> , 2017)).	22
Figure 18 : Rayonnement solaire à la surface d'un PBR (Pruvost <i>et al.</i> , 2011).	23
Figure 19 : Représentation d'une courbe P/I (Malapascua <i>et al.</i> , 2014).	24
Figure 20 : Représentation schématique de l'obtention des propriétés radiatives des micro-algues (Artu, 2016 d'après Kandilian <i>et al.</i> , 2016).	26
Figure 21 : Evolution du coefficient d'absorption (a) et de diffusion (b) massique de <i>C. vulgaris</i> en fonction de la longueur d'onde pour une teneur en pigments égale à 6,5 % _{Cx} (Cercles noirs) ou 1,2 % _{Cx} (Losanges rouges) (Artu, 2016 d'après Kandilian <i>et al.</i> , 2016).	27
Figure 22 : Représentation schématique du modèle à deux flux (Takache, 2010).	28
Figure 23 : Les trois différents profils d'atténuation lumineuse dans le cas d'un PBR plan : régime photolimité (a), régime luminostat (b) et régime cinétique (c) (Pruvost et Cornet, 2012).	30
Figure 24 : Cycles jours/nuits correspondants au flux moyen annuel (losange), au flux moyen hivernal (triangle) et au flux moyen estival (cercle) (Artu, 2016).	32
Figure 25 : Représentation du déplacement des cellules dans le gradient de lumière d'un PBR plan éclairé d'un seul côté (Takache <i>et al.</i> , 2012).	32
Figure 26 : Régime d'éclairement subi en PBR torique pour un PFD (ici noté q_0) égal à 200 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, une vitesse de moteur égale à 300 tours/min et une concentration en biomasse égale à 1 g L ⁻¹ (Pruvost <i>et al.</i> , 2008a).	33
Figure 27 : Représentation des réponses types de la croissance par photosynthèse à un éclairage intermittent. A gauche : éclairage imposé. A droite: réponse avec intégration, sans intégration et avec intégration partielle à la lumière reçue (Takache <i>et al.</i> , 2015).	35
Figure 28 : Influence de la fraction sombre f_d sur la productivité de <i>C.vulgaris</i> . A : $f_d = 0 \%$. B : $f_d = 20 \%$ (Pruvost <i>et al.</i> , 2016).	36
Figure 29 : Représentation des fractions molaires de carbone dissous en fonction du pH à 25 °C (Artu, 2016 d'après Kaplan <i>et al.</i> , 2017).	37
Figure 30 : Principe de la fluorescence chlorophyllienne (d'après Kolber et Falkowski, 1993).	45
Figure 31 : Principe de la fluorescence de type FRR. Une succession de flashes permet la réduction successive des Q_A et augmente la fluorescence émise par les cellules photosynthétiques. Ces flashes peuvent être appliqués sur des cultures adaptées à l'obscurité ou à une lumière actinique. La phase de relaxation est réalisée dans le noir. F_s correspond à la fluorescence minimale obtenue lors d'une exposition à une lumière actinique. Il est possible de	

mesurer une valeur de F_o' lorsqu'une deuxième succession de flashes est appliquée après 1 à 2 secondes d'obscurité. La différence entre F_m et F_m' correspond au quenching non photochimique de la fluorescence (NPQ).	46
Figure 32 : Principe de la mesure de la fluorescence chlorophyllienne de type PAM (d'après (Consalvey <i>et al.</i> , 2005b).	47
Figure 33 : Réactions compétitives d'ordre 1 de désexcitation dans le PSII (Klughammer and Schreiber, 2008).	48
Figure 34 : Comparaison de la productivité en oxygène mesurée par fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> et par électrode de Clark chez <i>Phaeodactylum tricornutum</i> lors d'une culture en turbidostat en présence d'une lumière sinusoïdale (Ralph <i>et al.</i> , 2010).....	53
Figure 35 : Fluorescence measurement and light treatment protocols. 1A, FRRf protocol applied at each light step, with an induction/relaxation curve applied on top of actinic light, and then again after 2.5 s of darkness to allow re-opening of PSII. 1B, 10 s, 1C, 60 s and 1D, 300 s durations for light exposure periods in treatment protocols. Arrows indicate timing of applications of the FRRf measures during the light treatment protocols.	61
Figure 36 : ETR_{PSII} ($e^- PSII^{-1} s^{-1}$) as a function of instantaneous actinic light level in <i>C. vulgaris</i> cultures. Each light period lasted for 10 s (A, B), 60 s (C, D) or 300 s (E, F). Cultures were grown at $30 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ (low light, A, C, E) or $330 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ (high light, B, D, F). Arrows show direction of increasing time of treatment; dashed lines show light steps done after the maximum applied actinic light, to emphasize hystereses of response. Error bars represent standard deviation of three replicates. ETR_{PSII} was estimated according to Eqn. 5.....	65
Figure 37 : YPSII quantum yield for PSII electron transport measured under actinic light levels in <i>C. vulgaris</i> cultures. Each light period lasted for 10 s (A, B), 60 s (C, D) or 300 s (E, F). Cultures were grown at $30 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ (low light, A, C, E) or $330 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ (high light, B,D,F). Arrows show direction of increasing time of treatment. Dashed lines show light steps done after the maximum applied actinic light to emphasize hystereses of response. Error bars represent standard deviation of three replicates.	66
Figure 38 : σ_{PSII} effective absorption cross section for PSII measured after 2 s dark as a function of immediately preceding actinic light level in <i>C. vulgaris</i> cultures. Each light period lasted for 10 s (A, B), 60 s (C, D) or 300 s (E, F). Cultures were grown at $30 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ (low light, A, C, E) or $330 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ (high light, B, D, F). Arrows show direction of increasing time of treatment. Dashed lines show light steps done after the maximum applied actinic light to	

emphasize hysteresis of response. Error bars represent standard deviation of three replicates.

..... 68

Figure 39 : $1/\tau$ rate constant for re-opening of PSII, measured after 2 s dark as a function of immediately preceding actinic light level in *C. vulgaris* cultures. Each light period lasted for 10 s (A, B), 60 s (C, D) or 300 s (E, F). Cultures were grown at $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (low light, A, C, E) or $330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high light, B, D, F). Arrows show direction of increasing time of treatment. Dashed lines show light steps done after the maximum applied actinic light to emphasize hysteresis of response. Error bars represent standard deviation of three replicates.

..... 69

Figure 40 : Actinic light levels (black trace) plotted vs. duration of light exposures PSII_{ETR} ($\text{e-PSII}^{-1} \text{s}^{-1}$) in *C. vulgaris* control cultures (A and B) and in presence with DTT (C and D) shown by symbol size and colour scale. Cultures were grown at $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Low light, A and C) and $330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (High light, B and D). PSII_{ETR} was estimated according to Eq. 2-6.

..... 70

Figure 41 : F_v/F_m' quantum yield of PSII under light acclimated state for *C. vulgaris* (left Y axes) measured after 2 s dark immediately following the preceding actinic light period (grey trace, right Y axis), plotted vs. elapsed time. Cultures were grown at $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A, low light) or $330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B, high light). Blue squares: control cultures. Red circles: cultures with DTT to block the xanthophyll cycle which mediates NPQ. Green triangles: cultures with lincomycin to block PSII repair. Error bars represent standard deviation of three replicates..

Figure 42 : Fraction of open PSII centres $[1-C]$ for *C. vulgaris* (left Y axes) measured at each actinic light level (grey trace, right Y axis), plotted vs. elapsed time. Cultures grown at $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (low light, A) or $330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high light, B). Blue squares: control cultures. Red circles: cultures with DTT to block the xanthophyll cycle. Green triangles: cultures with lincomycin to block PSII repair. Error bars represent standard deviation of three replicates..

Figure 43 : YNPQ for *C. vulgaris* (left Y axes) measured at each actinic light level (grey trace, right Y axis), plotted vs. elapsed time. Each light period lasted for 10 s (A, B), or 300 s (C, D). Cultures were grown at $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (low light, A,C) or $330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high light, B, D). Blue squares: control cultures. Red circles: cultures with DTT to block the xanthophyll cycle. Error bars represent standard deviation of three replicates.

Figure 44 : Controlled photobioreactor used for the study of photoacclimation of *C. vulgaris*.

..... 81

Figure 45 : PFD step transition applied during the investigation of photoacclimation of <i>C. vulgaris</i> in light changing conditions. Arrows show times of samplings.	82
Figure 46 : Pigment content obtained for each steady-state, as a function of the $MRPA_{Cx}$ values (A) or the $MRPA_{pig}$ values (B), in diluted (red circles) and concentrated (blue squares) cultures of <i>C. vulgaris</i> . Error bars show standard deviations ($n = 3$). Linear regressions were calculated (dashed line). For values of $MRPA_{Cx}$ between 5 and 15 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ g}^{-1}_{Cx} \text{ s}^{-1}$, the equation is $y=9.0785 - 0.2853x$ and $R^2 = 0.9578$. For values of $MRPA_{pig}$ between 0.07 and 0.32 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ mg}^{-1}_{pigments} \text{ s}^{-1}$, the equation is $y=8.2091 - 11.4930x$ and $R^2 = 0.9358$	89
Figure 47 : Biomass concentration (blue circles, left axis) and pigment content (green squares, right axis) evolutions of <i>C vulgaris</i> over the time during a PFD step from 75 (black line) to 765 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (grey line) and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Error bars represent standard deviations ($n= 3$).....	91
Figure 48 : Pigment composition of <i>C. vulgaris</i> during a PFD step from 75 to 766 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and from 766 to 75 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Green squares show chlorophyll <i>a</i> content, blue circles show chlorophyll <i>b</i> content and orange triangles show total carotenoids. Error bars represent standard deviations ($n=3$).	92
Figure 49 : $MRPA_{Cx}$ (black circles, left axis) over the time during the PFD steps from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (grey line, right axis) in <i>C. vulgaris</i> culture.....	93
Figure 50 : Changes in F_v/F_m (blue squares) and YNPQ (black circles, left axis) with time during light transitions from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (grey line, right axis) in <i>C. vulgaris</i> culture.....	94
Figure 51 : Biomass concentration (blue circles, left axis) and pigment content (green squares, right axis) of <i>C. vulgaris</i> over the time during the first 24 hours of the rising PFD step from 75 (black line) to 765 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (grey line). Error bars represent standard deviation ($n=3$).	94
Figure 52 : Biomass specific $MRPA_{Cx}$ (black circles, left axis) over the time during the first 24 hours of the rising PFD step from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (grey line, right axis) in <i>C. vulgaris</i> culture.....	95
Figure 53 : Pigments specific $MRPA_{pig}$ (black circles, left axis) over the time during the first 24 hours of the rising PFD step from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (grey line, right axis) in <i>C. vulgaris</i> culture.....	96

Figure 54 : Changes in F_v/F_m (blue squares) and YNPQ (black circles, left axis) with time during the first 24 hours of the rising PFD step from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis) in <i>C. vulgaris</i> culture.....	96
Figure 55 : Biomass concentration (blue circles, left axis) and pigment content (green squares, right axis) of <i>C. vulgaris</i> over the time during the first 120 hours after a PFD step from 765 (grey line) to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (black line). Error bars represent standard deviation (n=3).	97
Figure 56 : Biomass specific MRPA (black circles, left axis) over the time during the first 120 hours after a light change from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis) in <i>C. vulgaris</i> culture.....	98
Figure 57 : Changes in F_v/F_m (blue squares) and YNPQ (black circles, left axis) with time during the first 120 hours of a PFD step from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis) in <i>C. vulgaris</i> culture.....	98
Figure 58 : Model simulations (dashed line) and experimental data (circles) of biomass concentration (A) and pigment content (B) time evolution after a PFD step transition from 100 to 400 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Error bars show standard deviation (n =3).....	100
Figure 59 : Model simulations (dashed line) and experimental data (circles) of biomass concentration and pigment content time evolution after two successive PFD step transitions from 75 to 765 and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Error bars show standard deviation (n=3).	101
Figure 60 : Photograph of the PAM sensor, used to measure the Chlorophyll <i>a</i> fluorescence at the PBR surface.....	111
Figure 61 : Light step transitions applied onto the culture, arrows indicate culture sampling times.	112
Figure 62 : Light cycle applied onto the culture, arrows indicate culture sampling times. ...	113
Figure 63 : Calibration curve between F_o and chlorophyll <i>a</i> concentration. The equation is $F_o = 1.79 [\text{chl}a] + 95.1$ and $R^2 = 0.9805$	118
Figure 64 : YPSII (Left axis) measured over the time during a light cycle (A) and during two successive light transitions (B) (Grey lines, right axis). Blue squares show on-line measurements and red circles show off line measurements.....	120
Figure 65 : YNPQ (left axis) over the time during a light transition from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis). Blue squares show online measurement and red circles show offline measurements. Arrows show sampling times and 15 min dark periods.....	122

Figure 66 : YNPQ (A, left axis) and chlorophyll <i>a</i> concentration (B, left axis) over the time during the same light cycle (grey line, right axis). On panel A, blue squares show on-line measurements of YNPQ and red circles show off line measurements of YNPQ.	123
Figure 67 : On-line YPSII (A, left axis) and off line F_v/F_m (B, left axis) evolutions over the time during the same light cycle (grey line, right axis). During the measurement, a deprivation of inorganic carbon occurred.	125
Figure 68 : YPSII (blue squares, left axis) and dissolved oxygen concentration (red circles, right axis) measured over the time during 90 hours after a PFD step transition from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	125
Figure 69 : Measurement of chlorophyll <i>a</i> concentration (left axis) over the time during a light transition from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis). Red circles show off-line measurements of chlorophyll <i>a</i> and green squares show online measurements, from F_0 measurements.	127
Figure 70 : $r\text{ETR}_{\text{PSII}}$ (A, blue mark, left axis) measured with online PAM chlorophyll <i>a</i> fluorescence, $r\text{O}_2\text{gas}$ (A, red mark, right axis) measured from gas mass balance and the ratio between these two measurements (B) over the time during two light step transitions from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The first light change is at time = 0 h and the second is at time = 480 h. The black band corresponds to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and the grey band corresponds to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	128
Figure 71 : Estimation of oxygen production rate measured with online chlorophyll <i>a</i> fluorescence (A, blue mark), oxygen production rate measured from gas mass balance (A, red mark) and the estimation of the quantum yield for oxygen production (B) over the time during two successive PFD step transitions from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The first light change was at time = 0 h and the second at time = 480 h. The black band corresponds to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and the grey band corresponds to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	130
Figure 72 : Schematic representation of a dark derivation in order to measure fluorescence of Chlorophyll <i>a</i> in solar PBR.	133
Figure 73 : Pigment content obtained for several steady-states, as a function of the MRPA values, in <i>C. vulgaris</i> cultivated with (red circles) or without dark fraction (blue squares). Error bars show standard deviations (n=3). Linear regression (dashed line) was calculated for steady states only obtained without dark period and for MRPA values between 5 and 15 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1} \text{C}_x \text{s}^{-1}$	147

Figure 74 : Quantum yield for photochemical electron transport YPSII (blue squares, left axis) and quantum yield of non-photochemical quenching YNPQ (black circles, left axis) during culture at $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) with a 30 % dark fraction (grey line, right axis) and during a culture at $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) with a 30 % dark fraction (grey line, right axis).	148
Figure 75 : Specific ETR_{PSII} determined from PAM measurement (black circle, left axis) during a culture at $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) with a 30 % dark fraction (grey line, right axis) and during a culture at $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) with a 30 % dark fraction (grey line, right axis).	150
Figure 76 : Rate of oxygen production (rO_2gas) measured with a gas mass balance (black circle, left axis) during culture at $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) with a 30 % dark fraction (grey line, right axis) and during a culture at $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) with a 30 % dark fraction (grey line, right axis). rO_2gas values were arbitrary shifted to decrease during dark periods and increase during light periods.	151
Figure 77 : Evolution of the O_2 content measured with the gas micro chromatography at the outlet of the PBR filled with water after a switch from N_2 to Air bubbling (A) or a switch from air to N_2 (B) at the inlet of the PBR. In each experiment, the gas switch occurred at time = 0 min. Data from triplicates are plotted on each graph. The gas flowrate was equal to 129 mL min^{-1}	152
Figure 78 : Time averaged values of YPSII measured during light periods as a function of the PFD imposed to the culture. Measurements were done on culture without dark fractions (blue squares), with an f_d equal to 10 % (green triangle) and with an f_d equal to 30 %.	155

Liste des tableaux

Tableau 1 : Paramètres du modèle de croissance de <i>Chlorella vulgaris</i>	43
Table 2 : Culture conditions applied to <i>C. vulgaris</i> for the study of photoacclimation in constant light.....	82
Table 3 : List of all parameters used for modeling photoacclimation in <i>C. vulgaris</i>	87
Table 4 : Summary of biomass concentrations, pigment concentrations, illuminated fractions and transmittances obtained at steady states for cultures under different incident photon flux density (PFD) and dilution rates (D) conditions. Errors are standard deviations (n=3).....	88
Table 5 : Summary of the different light conditions applied to the <i>C. vulgaris</i> cultures. Dilution rate was 0.02 h ⁻¹	140
Table 6 : Surface productivities (S _X) of <i>C. vulgaris</i> grown in presence of dark fractions. The dark fractions were either obtained by the addition of a true physical derivation (Kazbar, <i>et al.</i> , 2019) or by light and darkness alternations (this study). For all cultures, the incident photon flux density was equal to 250 μmol _{photons} m ⁻² s ⁻¹ , the dilution rate was 0.02 h ⁻¹ and the dark period t _d was 300 s.....	145
Table 7 : Surface productivities (S _X) and pigment contents (w _{pig}) of cultures exposed to continuous light or regularly subjected to dark periods. Averaged PFD is the averaged PFD over the time, PFD corresponds to the light applied during light periods, f _d corresponds the dark fraction and t _d corresponds to the residence time in darkness. Dilution rate was 0.02 h ⁻¹	146
Table 8 : Time averaged values of γ measured during light periods, S _X , MRPA, ETR _{PSII} and rO ₂ gas for <i>C. vulgaris</i> cultures at different conditions of PFD and dark fractions. Dilution rate was 0.02 h ⁻¹	153

Listes des abréviations

[1-C]: proportion de PSII ouverts

a^* : surface d'absorption des cellules ($\text{m}^2 \text{ cell}^{-1}$)

a_s : surface spécifique (m^{-1})

A : vitesse spécifique locale d'absorption de photons ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

$\langle A \rangle$: vitesse spécifique moyenne d'absorption de photons ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ kg}^{-1}$)

AEC: cycles alternatifs des électrons

b_2 : ratio de retro-diffusion

C : concentration (kg m^{-3})

Chl a : chlorophylle a

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

DTT : dithiothréitol

E : énergie photonique (J)

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

E_s : coefficient massique de diffusion ($\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$)

(r)ETR: vitesse (relative) du transport des électrons (Electron Transport Rate)

f : fraction non éclairée du volume du PBR (du fait de boucles sombres)

F (ou F_s): niveau de fluorescence en présence de lumière actinique

F_m : fluorescence maximale

F_o : fluorescence minimale

FRR(f): fluorescence à taux rapide de répétition (Fast Repetition Rate)

F_v/F_m : rendement quantique maximal de conversion photochimique dans le PSII

G : irradiance ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

G : débit gazeux molaire (mol s^{-1})

HL: fortes lumières (High Light)

I : intensité lumineuse ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

J_{O_2} : vitesse spécifique locale de production d'oxygène ($\text{mol}_{O_2} \text{ kg}_{Cx}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

J_{NADH_2} : vitesse spécifique locale de régénération du co-facteur NADH₂ ($\text{mol}_{NADH_2} \text{ kg}_{Cx}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

K_A : constante de demi-saturation de la captation de l'énergie lumineuse par les PSU ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

K_r : constante pour l'inhibition de la respiration à la lumière ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

L: épaisseur du PBR (m)
 (R)LC: courbe de réponse (rapide) à la lumière ((Rapid) Light Curve)
 L/D cycles: cycles lumière/obscurité (Light/Dark cycle)
 LL: faibles lumières (Low Light)
 LRPA: vitesse locale d'absorption de photons (Local Rate of Photon Absorption)
 m: indice de réfraction complexe d'une particule
 MRPA: vitesse moyenne d'absorption de photons (Mean Rate of Photon Absorption)
 n: partie réelle de l'indice de réfraction d'une particule
 NPQ: extinction non photochimique de la fluorescence (Non Photochemical Quenching)
 P: productivité ($\text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$)
 PAM: fluorescence à amplitude modulée du signal (Pulse Amplitude Modulated)
 PAR: rayonnement utilisé pour la photosynthèse (Photosynthetically Active Radiation)
 PBR: photobioréacteur
 PFD: densité de flux de photons (Photon Flux Density)
 PQ: plastoquinone
 PSI: photosystème I
 PSII: photosystème II
 PSU: unités photosynthétiques (Photosynthetic Units)
 q_0 : densité de flux de photons incident ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
 q_p : coefficient de l'extinction photochimique
 Q : débit volumique gazeux ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)
 r: vitesse volumique de production ($\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$ or $\text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$)
 ROS: dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
 S_{light} : surface éclairée (m^2)
 S_x : productivité surfacique ($\text{kg m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
 T: transmittance
 t: temps de passage des cellules (s)
 V: volume (m^3)
 y: fraction molaire gazeuse
 YNO: rendement quantique de la perte non régulée d'énergie dans le PSII
 YNPQ: rendement quantique de la perte d'énergie régulée et non photochimique dans le PSII
 YPSII: rendement quantique de la conversion photochimique de l'énergie dans le PSII
 z: coordonnées de profondeur dans le PBR (m)

γ : fraction éclairée dans le volume de culture

$v_{\text{NADH}_2-\text{O}_2}$: coefficient stœchiométrique pour la régénération du cofacteur NADH_2

v_{O_2-x} : coefficient stœchiométrique pour la production d'oxygène

ρ : coefficient de connectivité des excitons (paramètre FRRf)

ρ_M : rendement maximal de la conversion des photons en énergie lors de la photosynthèse

σ_{PSII} : surface efficace d'absorption pour la photochimie dans le PSII

$1/\tau'$: constante de vitesse pour la réouverture des PSII (après un flash saturant ST)

$\overline{\varphi'}_{\text{O}_2}$: rendement quantique pour la production d' O_2 dans le modèle cinétique de croissance

$\overline{\varphi}_{\text{O}_2|e^-}$: rendement quantique de production d' O_2 du PSII calculé à la lumière par combinaison de la production en oxygène obtenue par bilan matière sur les gaz et de la mesure de l'ETR par fluorescence de la chlorophylle *a*

Φ_e : rendement quantique théorique de production d' O_2 dans le PSII

Indices

2 s: relatif à une mesure FRRf effectuée après 2 s d'obscurité suivant la période lumineuse

c: relatif au point de compensation

Cx or x: relatif à la concentration en biomasse

d: obscure

in: à l'entrée du réacteur

λ : relatif à des valeurs spectrales

L or light: éclairé

MT: relatif à la fluorescence de type « Multiple Turnover »

out: à la sortie du réacteur

photo: relatif à la photosynthèse

pig: relatif aux pigments

PSII: relatif au photosystème II

resp: relatif à la respiration

ST: relatif à la fluorescence de type « Single Turnover »

Exposants :

gas: relatif à des mesures obtenues par bilan matière sur les gaz

PAM: relatif à des mesures obtenues par fluorescence de la chlorophylle *a* de type PAM

« ' »: relatif à des mesures de fluorescence chlorophyllienne réalisées sur des cellules acclimatées à la lumière

Introduction

Certaines activités humaines débutées à grande échelle il y a plus d'un siècle, en particulier la déforestation et la combustion des énergies fossiles, ont des impacts écologiques significatifs. Des chercheurs ont appelé cette période « l'ère anthropocène » (Crutzen, 2006; Lewis et Maslin, 2015), où le changement climatique proviendrait principalement de ces activités humaines. La date de début de cette ère fait débat. Certains estiment qu'elle aurait vu le jour il y a plusieurs milliers d'année (Ruddiman, 2003) alors que d'autres ont montré qu'elle aurait débuté dans les années 1960, en conséquence directe des activités industrielles (Turney *et al.*, 2018).

Un des arguments utilisé pour définir cette ère anthropocène est la concentration, plus élevée que jamais, de gaz à effet de serre comme le dioxyde de carbone (CO₂) ou le méthane (CH₄) (Crutzen, 2006). La concentration atmosphérique en CO₂ a augmenté de 46 % depuis 1750 (IPCC, 2001; US Department of Commerce). Cette augmentation en gaz à effet de serre entraine une élévation de la température, évoluant linéairement avec les émissions cumulées en CO₂ (CCE) (Allen *et al.*, 2009; Lacis *et al.*, 2010).

Depuis les années préindustrielles (1850-1900), la température moyenne à la surface de la Terre a augmenté de 0.6 °C. Un réchauffement climatique de seulement 2 °C conduirait à l'extinction d'espèces, notamment au niveau de la mer de glace arctique et des massifs de coraux. Par ailleurs les événements météorologiques tels que les fortes vagues de chaleurs, les fortes précipitations et les inondations côtières seraient de plus en plus fréquents. Les populations actuellement les plus démunies seraient les plus fortement impactées (Patz *et al.*, 2005). De manière globale, la biodiversité ainsi que l'économie mondiale seraient touchées (Chavaillaz *et al.*, 2019; Pérez-Méndez *et al.*, 2016). A plus long terme, si un réchauffement climatique soutenu persistait (≤ 4 °C), la couche glacière du Groenland pourrait disparaître en un millénaire, conduisant à une augmentation du niveau des océans de 7 m (IPCC, 2014).

En réponse à ce dérèglement, l'accord de Paris a été signé en décembre 2015 par 195 pays, et vise à limiter le réchauffement climatique mondial bien en dessous de 2 °C et à poursuivre les efforts pour le contenir en dessous de 1,5 °C, le tout grâce à une diminution des émissions des gaz à effet de serre et notamment du CO₂ (UNFCCC, 2015).

A travers la photosynthèse, les végétaux ont la capacité, grâce à l'énergie solaire, de fixer le CO₂ atmosphérique pour le transformer en hydrate de carbone, tout en libérant de l'oxygène.

Du fait de leur rapide taux de croissance, en comparaison avec les plantes terrestres, les micro-algues sont capables de fixer le carbone atmosphérique avec une plus grande efficacité (Arbib *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2008). Parallèlement, par leur composition, ces micro-organismes peuvent aussi avoir des intérêts pour divers secteurs industriels tels que la cosmétique, l'agriculture ou l'alimentation animale. Ils sont en effet riches en lipides, protéines polysaccharides, vitamines et antioxydants. La recherche concernant ces applications reste cependant récente, ayant réellement commencé dans les années 1950 (Becker, 2007). Aujourd'hui, la production mondiale de micro-algues est estimée entre 10 000 et 20 000 t par an (Delattre *et al.*, 2016). Dans le futur, les micro-algues pourraient également avoir des applications dans les secteurs de l'énergie et de l'agroalimentaire. Mais pour atteindre ces marchés, des volumes importants sont nécessaires tout en maintenant de faibles coûts de production, permettant de concurrencer les industries actuelles (Person, 2011). L'un des verrous majeurs à cela est la capacité de cultiver les micro-algues à grande échelle, de façon optimisée et contrôlée (Richmond, 2008).

Par ses recherches et son lien étroit avec la plate-forme Algosolis, l'équipe Bioprocédés Appliqués aux Micro-algues du laboratoire GENIE des Procédés Environnement Agroalimentaire (GEPEA) mène plusieurs activités visant de façon générale l'optimisation de procédés de production et de raffinage de biomasse micro-algale (Clavijo Rivera *et al.*, 2018; Kandilian *et al.*, 2019; Kazbar *et al.*, 2019; Thobie *et al.*, 2017). Par ailleurs, à travers des programmes de recherche, ce laboratoire collabore régulièrement avec des laboratoires spécialistes de la physiologie de ces organismes. En particulier, le programme AMI (Atlantic Microalgues), financé par la région Pays de la Loire, a permis une collaboration étroite entre le GEPEA et les équipes nantaises et mancelles du laboratoire Mer Molécule Santé (MMS). De plus le programme européen H2020 GHaNA (The Genus *Haslea*, New marine resource for Aquaculture) a permis des collaborations internationales, dont une avec l'Université Mount Allison située à Sackville (NB) au Canada.

La conversion de l'énergie lumineuse est un élément clé pour l'optimisation des cultures de micro-algues. Dans le cas des cultures de masse, la lumière provient généralement du soleil. Par ailleurs, pour limiter les contaminations, les micro-algues sont souvent cultivées dans des enceintes closes laissant pénétrer la lumière et appelées photobioréacteurs (PBR) (Richmond, 2008). Dans ces systèmes, en particulier lors de cultures solaires, l'intensité lumineuse varie fortement. A l'échelle du réacteur, les variations sont dues aux cycles jour/nuit et à la météo

(Le Borgne, 2011). A l'échelle de la cellule, elles sont plus fréquentes et correspondent soit au mélange intervenant dans le sens de l'atténuation de la lumière (Takache *et al.*, 2015), soit par circulation de la culture dans des parties du réacteur, qui par conception ne sont pas éclairées, aussi appelées boucles sombres (Kazbar *et al.*, 2019). Face à ces variations de lumières, les micro-algues possèdent des mécanismes de protection à court terme (Asada, 2000; Goss et Jakob, 2010; Kargul et Barber, 2008; Lavaud, 2007; Prasil *et al.*, 1996) ou d'acclimatation à plus long terme (Dubinsky et Stambler, 2009). Des outils pour mesurer ces phénomènes ont vu le jour à la fin du siècle dernier. En particulier, la mesure *in vivo* de la fluorescence de la chlorophylle *a* est une méthode non invasive permettant d'estimer certains paramètres photosynthétiques (Kolber et Falkowski, 1993). Deux techniques sont actuellement utilisées, la technique Pulse Amplitude Modulated (Consalvey *et al.*, 2005) et la technique Fast Repetition Rate (Kolber *et al.*, 1998). Comprendre et prévoir les mécanismes de photoprotection et de photoacclimatation des micro-algues lors de variations de lumière est un des leviers qui permettrait l'optimisation des cultures solaires.

Cette thèse fait partie du programme AMI. Elle est le résultat d'une collaboration entre le MMS et le GEPEA et a été réalisée sous les tutelles du Mans Université et de l'Université de Nantes. Par ailleurs, le programme GHANA a permis, en début de doctorat, un séjour scientifique de 6 mois dans le laboratoire du Dr D.A. Campbell de l'Université Mount Allison. En regroupant les connaissances du MMS et l'expertise du GEPEA, l'objectif de cette thèse était de comprendre et d'optimiser la conversion photosynthétique de l'énergie lumineuse en PBR solaire. Cette problématique a été traitée sous trois aspects principaux, qui sont la compréhension des mécanismes physiologiques, la mise en place de contrôles de cultures et l'utilisation d'outils de modélisation permettant un meilleur dimensionnement dans le futur.

Le premier chapitre se présente sous forme d'une revue bibliographique visant à aborder les différents thèmes de ce travail de thèse. Il permet de définir les aspects qui seront traités dans les chapitres suivants et d'actualiser les connaissances pour permettre une analyse approfondie des résultats. En particulier ont été précisés les systèmes de production des micro-algues, les paramètres clés d'optimisation de la culture, la grande variabilité de la lumière et la réponse physiologique des micro-algues associée à ces changements. Les outils de modélisation et d'analyse nécessaires à ce travail de thèse, comme la mesure *in vivo* de la fluorescence de la chlorophylle *a* ont été présentés.

Le deuxième chapitre traite de la réponse de *Chlorella vulgaris* à une lumière variable à l'échelle de la cellule. Ces résultats ont été obtenus à l'Université Mount Allison. L'utilisation

de la mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* de type FRR a permis d'étudier les conséquences de la variation de la lumière sur la vitesse de transport des électrons (ETR) et d'en comprendre les mécanismes impliqués. Les réponses de cellules acclimatées à différentes intensités lumineuses ont été comparées.

Les résultats des chapitres suivants ont été obtenus au laboratoire GEPEA dans un PBR d'étude de forme torique de volume 1,5 L.

Le troisième chapitre a permis la compréhension à l'échelle du photobioréacteur, des phénomènes de photoacclimatation et de photoprotection de *C. vulgaris*. Dans un premier temps à l'état stationnaire, une relation entre teneur en pigments et conditions de lumière dans le PBR a été établie. Dans un second temps, lors de transitions lumineuses, les temps caractéristiques de réponses de la photoacclimatation ont été étudiés et expliqués par les mécanismes photosynthétiques impliqués. La photoacclimatation étant un processus lent, dans le cas de culture solaires où l'intensité lumineuse varie en permanence, les micro-algues sont constamment dans un état transitoire d'adaptation. Cela a conforté l'utilisation d'outils tels que la mesure *in vivo* de la fluorescence de la chlorophylle *a* pour contrôler ce type de culture.

En conséquence, dans le quatrième chapitre l'usage de la mesure en ligne de la fluorescence de la chlorophylle *a* de type PAM a été étudié en tant qu'outil pour contrôler une culture de *C. vulgaris* en présence d'une lumière variable. Cet outil a été testé pour la détection de conditions de culture défavorables, et pour l'estimation de la réponse cinétique de la biomasse. Par ailleurs, il a également été testé pour étudier, de manière dynamique, la réponse physiologique aux changements de lumière.

Dans le cinquième chapitre, l'impact de la présence de boucles sombres, présentes sur le PBR par conception, sur la croissance de *C. vulgaris* a été étudié. Un panneau de LED a été utilisé pour simuler, par l'alternance de phases lumineuses et obscures, le passage régulier des cellules dans ces parties non éclairées. L'utilisation de l'outil en ligne développé a permis une étude de la dynamique de la réponse physiologique des micro-algues aux changements lumineux. Puis, combiné à la mesure de la vitesse de production d'oxygène, cet outil a permis d'expliquer la perte de productivité observée en présence de boucles sombres.

Chapitre 1. La culture solaire de micro-algues : problématiques et enjeux

1.1 L'intérêt industriel des micro-algues

1.1.1 Le marché des micro-algues

Les micro-algues sont connues depuis des siècles pour leurs vertus nutritives (Costa et de Morais, 2011). Cependant elles ne sont cultivées et commercialisées que depuis quelques décennies. La recherche concernant leur potentielle application industrielle a commencé au début des années 1950. L'objectif premier était de trouver des sources alternatives de protéines face à l'accroissement de la population mondiale (Becker, 2007).

Aujourd'hui, la production mondiale annuelle de micro-algues est estimée entre 10 000 et 20 000 t (Delattre *et al.*, 2016). Les espèces les plus produites sont *Arthrospira*, *Chlorella* et *Dunaliella salina*. Elles sont essentiellement produites en Chine, aux Etats-Unis, au Japon, en Allemagne et en Inde (Spolaore *et al.*, 2006).

Les composés tels que les lipides, les vitamines, les polysaccharides, les protéines, les pigments et les antioxydants sont intéressants pour de nombreux secteurs tels que l'alimentation animale, l'agriculture ou la cosmétique.

1.1.2 Les verrous économiques et énergétiques

Pour les applications à grande échelle et à faible valeur ajoutée telles que l'industrie alimentaire ou l'énergie, une production de masse est nécessaire.

En 2010, avec les technologies connues, un hectare de culture de micro-algues permettait de produire théoriquement entre 60 et 300 barils équivalents pétrole (Person, 2011). Or l'industrie pétrolière utilise le million de barils comme unité de base. Ainsi, pour le domaine de l'énergie, les technologies existantes pour la production de micro-algues ne permettent pas, à ce jour, de concurrencer les énergies fossiles.

La lumière est un paramètre clé pour la culture des micro-algues. L'utilisation de l'énergie solaire permet de diminuer les coûts énergétiques. Cependant, en culture solaire, de nombreux verrous existent au niveau de la production. Ils sont liés en particulier, aux coûts d'investissement élevés, aux coûts énergétiques importants pour le maintien d'une température optimale et à une utilisation non optimale de l'énergie lumineuse disponible.

Ainsi, une meilleure utilisation de l'énergie lumineuse permettrait de diminuer les coûts de production des micro-algues.

1.1.3 Intérêts de *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris est une micro-algue verte d'eau douce, de forme sphérique, décrite pour la première fois en 1890 par Beyerinck (Beyerinck, 1890). Cette espèce est utilisée comme modèle dans de nombreuses études (Kok, 1956; Malapascua *et al.*, 2014; Serôdio *et al.*, 2017). Elle est également produite à grande échelle en raison de ses vertus nutritionnelles. Par ailleurs, sa capacité à auto-fermenter son amidon en fait un bon candidat pour la production d'éthanol (Person, 2011). La production commerciale de *C. vulgaris* a débuté en 1961 par Nihon Chlorella Inc. (Richmond, 2008). En 2009, sa production a atteint 2000 t par an (Spolaore *et al.*, 2006). Etant à la fois une micro-algue verte d'étude et une espèce cultivée industriellement, les recherches présentées dans ce manuscrit porteront exclusivement sur *C. vulgaris*.

1.2 **Physiologie des micro-algues vertes**

1.2.1 La cellule micro-algale

Au sens large, les micro-algues sont tous les microorganismes contenant de la chlorophylle a, ayant un thalle non différencié en racines, tiges et feuilles. Ainsi, dans la définition générale des micro-algues, se retrouvent les algues eucaryotes microscopiques et les bactéries photosynthétiques oxygéniques ou cyanobactéries, bien que ce soient des organismes procaryotes. Dans la suite du manuscrit, le terme micro-algues référera uniquement aux algues microscopiques eucaryotes (Tomaselli, 2007).

Une photographie de *Chlorella vulgaris* est présentée sur la Figure 1. Cette espèce mesure 2 à 10 µm de diamètre. Comme toutes les micro-algues eucaryotes, elle possède un noyau délimité par une double membrane, contenant le génome de la cellule. Son cytoplasme est différencié en organites assurant chacun des fonctions spécifiques. Parmi eux nous pouvons citer les chloroplastes, formés de thylakoïdes et sièges de la photosynthèse, et les mitochondries, où se déroule la respiration. La reproduction de *C. vulgaris* est asexuée. Une cellule mère se divise en quatre cellules filles toutes les 24 h environ dans des conditions optimales (Safi *et al.*, 2014).



Figure 1 : Photographie au microscope électronique d'une cellule de *Chlorella vulgaris* en coupe longitudinale. Abréviations : cw – paroi cellulaire, ch – chloroplaste, t – thylakoïdes, st – amidon, n – noyau, nl – nucléole, m – mitochondrie. Echelle : 1 µm. (Tomaselli, 2007).

1.2.2 Les réactions biochimiques se déroulant en présence de lumière

1.2.2.1 *Les pigments*

Tous les organismes photosynthétiques contiennent des pigments leur permettant d'absorber l'énergie lumineuse. Ces pigments photosynthétiques peuvent être divisés en trois catégories : les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobilines. Ces catégories de pigments n'absorbent pas la lumière aux mêmes longueurs d'onde (Figure 2).

Les micro-algues vertes contiennent majoritairement les chlorophylles *a* et *b* et des caroténoïdes (Tomaselli, 2007). La chlorophylle *a* est un composant majeur des centres réactionnels des photosystèmes et de leurs antennes collectrices de la lumière. La chlorophylle *b* est un des pigments accessoires qui permet d'élargir la surface et le spectre d'absorption. Parmi les caroténoïdes, certains sont photosynthétiques et d'autres sont photoprotecteurs. Les caroténoïdes photosynthétiques absorbent la lumière à des longueurs d'ondes comprises entre 400 et 550 nm et transfèrent l'énergie lumineuse à la chlorophylle *a* (Masojidek *et al.*, 2013). C'est le cas par exemple du β -carotène. Les caroténoïdes photoprotecteurs, comme les xanthophylles, évitent la dégradation des cellules suite à des expositions à de fortes intensités lumineuses car ils ont la capacité de dissiper un excès d'énergie d'excitation sous forme de chaleur et de neutraliser les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). En effet, lorsque l'énergie absorbée par les cellules est trop forte, des chlorophylles peuvent être élevées à des états triplets

d'excitation selon la réaction suivante : $\text{Chl} + \text{lumière} \rightarrow {}^1\text{Chl}^* \rightarrow {}^3\text{Chl}^*$. Or, si les centres réactionnels des photosystèmes sont saturés et, s'il n'est pas possible d'utiliser l'énergie excédentaire pour réaliser la photochimie, le nombre de chlorophylles dans un état triplet d'excitation augmente et ces molécules peuvent réagir avec le dioxygène pour former des ROS : ${}^3\text{Chl}^* + \text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{O}_2$. Ces ROS sont dangereux pour la cellule et ils entraînent une diminution de l'efficacité photosynthétique. Les caroténoïdes photoprotecteurs peuvent transformer les triplets d'excitation de la chlorophylle et les ROS grâce aux deux réactions suivantes : ${}^3\text{Chl}^* + \text{Car} \rightarrow \text{Chl} + {}^3\text{Car}^*$ et ${}^1\text{O}_2^* + \text{Car} \rightarrow \text{O}_2 + {}^3\text{Car}^*$. ${}^3\text{Car}^*$ retrouve un état stable d'excitation par dégagement de chaleur (Lavaud, 2007).

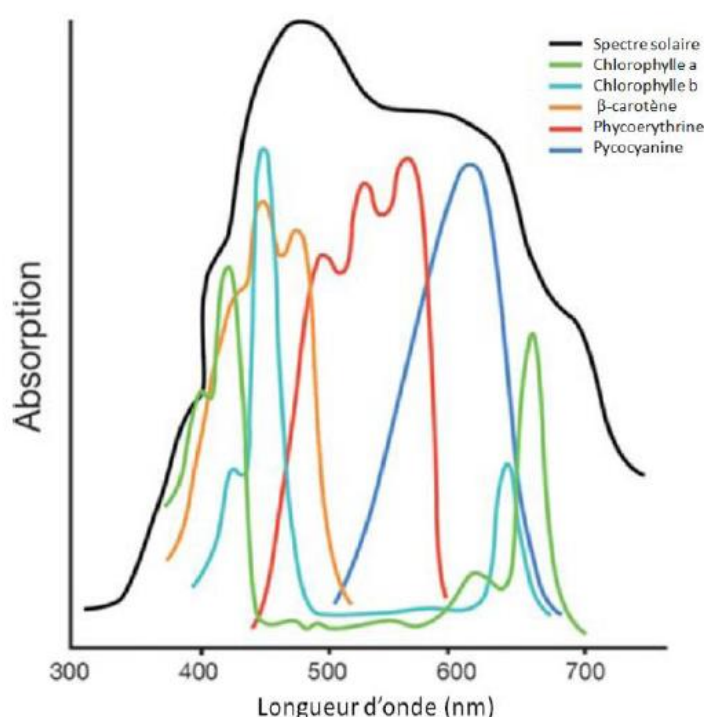
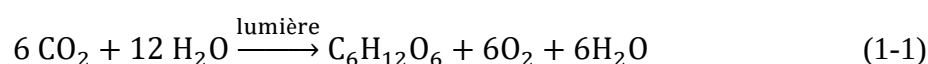


Figure 2 : Comparaison du spectre d'absorption de la chlorophylle et des pigments accessoires par rapport au spectre solaire (Williams et Laurens, 2010).

1.2.2.2 Les réactions claires et sombres de la photosynthèse

La photosynthèse est un ensemble de réactions au cours desquelles l'énergie provenant du soleil, ou d'une autre source de lumière, est utilisée pour fixer le dioxyde de carbone (CO_2) et le transformer en hydrates de carbone organiques, en utilisant des agents réducteurs issus de la dissociation de molécules d'eau et en libérant du dioxygène. L'équation générale de la photosynthèse est la suivante :



La photosynthèse se déroule dans les chloroplastes et peut-être divisée en deux étapes : les réactions claires et les réactions sombres (Figure 3).

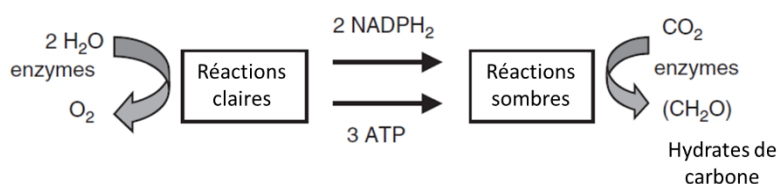
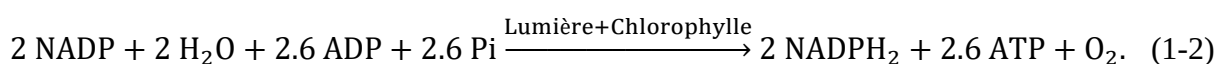
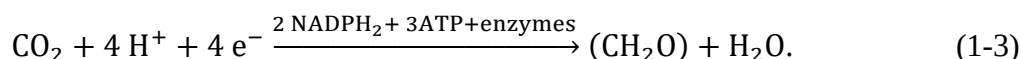


Figure 3 : Produits majoritaires lors des réactions claires et sombres de la photosynthèse (Masojidek *et al.*, 2013).

Lors des réactions claires, au niveau des membranes des thylakoïdes, l'énergie lumineuse est utilisée pour produire un réducteur biochimique, le NADPH et de l'énergie sous forme d'ATP selon l'équation suivante :



Lors des réactions sombres, au niveau du stroma, le NADPH et l'ATP sont utilisés pour transformer le CO₂ en hydrates de carbone selon l'équation suivante (Masojidek *et al.*, 2013) :



Les transferts d'électrons qui se déroulent lors des réactions claires peuvent être décrits par le schéma dit « en Z » qui permet de représenter le potentiel d'oxydo-réduction des couples impliqués dans les réactions (Figure 4).

Lors d'une exposition à la lumière, l'énergie est absorbée par les antennes collectrices de lumière (Crofts et Wraight, 1983). Grâce au photosystème II (PSII), les photons sont absorbés avec une section d'absorption σ_{PSII} . Puis, l'énergie des photons est transmise au centre réactionnel du PSII, P680, un complexe protéique contenant de la chlorophylle *a*. Ce complexe est oxydé et un électron est transféré au 1^{er} accepteur, une phaeophytine A, puis à une quinone Q_A, puis à une quinone Q_B en 200 μ s. Simultanément, une molécule d'eau est oxydée et des électrons ainsi que des protons sont libérés. Les protons sont utilisés pour la réduction de P680⁺ qui prend moins de 1 μ s. Une fois réduit, Q_B rejoint le pool de plastoquinone (PQ) qui devient un plastoquinol PQH₂. La constante de temps de l'oxydation de PQH₂ est nommée τ et elle est comprise entre 2 et 15 ms (Sukenik *et al.*, 1987). Le cytochrome b₆f est ensuite oxydé et un électron est transmis à la plastocyanine (PC) qui le transmet au centre réactionnel du photosystème I (PSI), P700⁺, préalablement excité par un nouveau photon (Govindjee *et al.*, 2017). L'électron traverse la chaîne d'accepteurs d'électrons du PSI pour atteindre la Ferrédoxine-NADP⁺ réductase et former le NADPH. Le NADPH est nécessaire à la fixation du carbone lors de la phase sombre de la photosynthèse.

$1/\tau$ correspond à la vitesse maximale, lors d'une intensité lumineuse saturante, du passage d'un électron de l'eau à l'accepteur final d'électrons (Kolber et Falkowski, 1993).

Parallèlement, le gradient de protons formé dans le lumen est utilisé pour synthétiser de l'ATP grâce à l'ATP synthétase (phosphorylation oxydative).

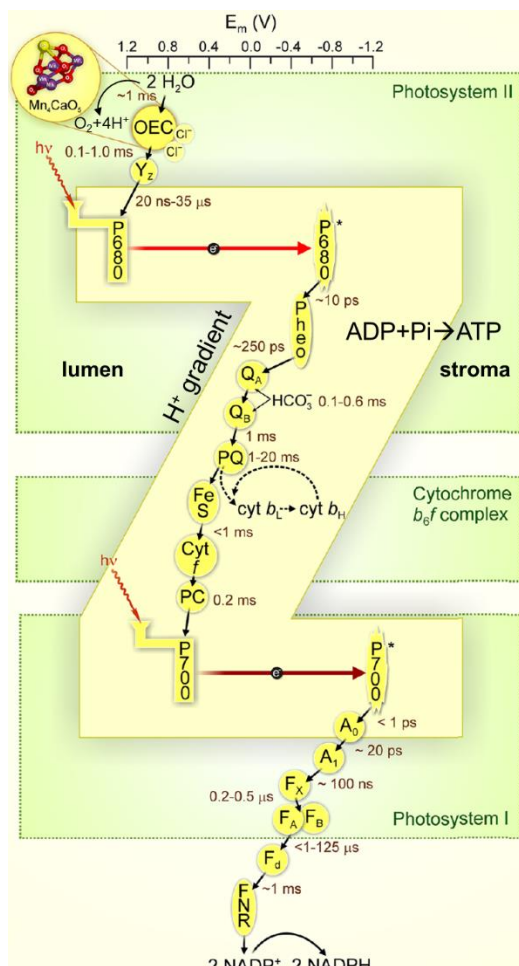


Figure 4 : Schéma en Z du transport des électrons lors de la photosynthèse (Modifié d'après Govindjee *et al.*, 2017)).

Les réactions dites sombres peuvent se dérouler indifféremment à la lumière ou à l'obscurité. Elles correspondent au cycle de Calvin (Figure 5) et peuvent être définies en 4 étapes (Masojidek *et al.*, 2013) :

- 1) Une étape de fixation du CO_2 ou carboxylation. 3 molécules de CO_2 sont ajoutées à 3 molécules de ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) pour former 6 molécules de 3-phosphoglycérate (3-PGA). Ces réactions sont catalysées par l'enzyme clé de la photosynthèse : la ribulose bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO).
- 2) Une étape de réduction. Cette étape utilise l'ATP et le NADPH produits lors des réactions claires pour réduire le 3-PGA en glycéraldéhyde-3-phosphate (GA3P). Ainsi,

de l'ADP et du NADP^+ sont produits.

- 3) Une étape de régénération. 5 molécules de GA3P sont utilisées pour régénérer le RuBP pour les futures étapes de fixation du CO_2 . Cette étape consomme 3 molécules d'ATP.
- 4) Une étape de production. Cette étape ne fait pas réellement partie du cycle. En effet, elle a pour objectif l'obtention du produit primaire de la photosynthèse. Une molécule de GA3P est ainsi utilisée pour produire une demi-molécule de glucose.

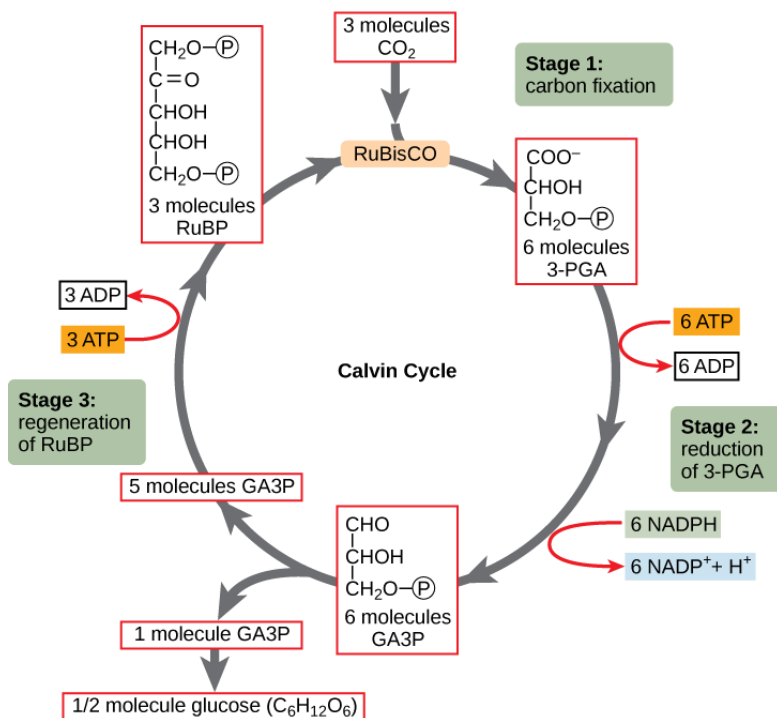


Figure 5 : Réactions permettant la fixation du CO_2 et sa transformation en hydrates de carbone lors du cycle de Calvin-Benson (Mojgane, 2015).

1.2.2.3 La photorespiration

Il existe chez les micro-algues un autre mécanisme se produisant à la lumière et entrant en compétition avec l'étape de carboxylation du cycle de Calvin (Masojidek *et al.*, 2013). Il s'agit de la photorespiration (Figure 6) via laquelle, le carbone organique peut être ultimement transformé en CO_2 . Lors de ce mécanisme, la RuBisCO catalyse la réaction d'oxygénation du RuBP par une molécule d' O_2 pour former du phosphoglycolate qui, après plusieurs étapes est converti en sérine, ammoniac et CO_2 .

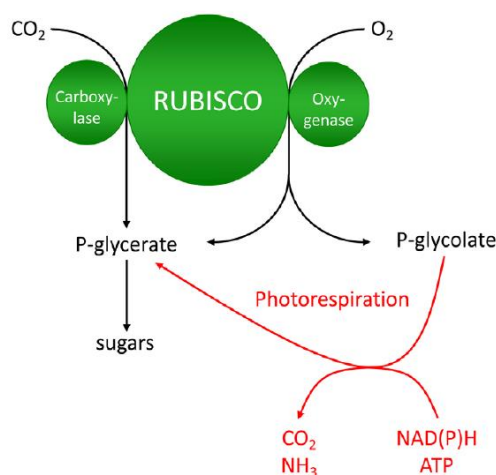


Figure 6 : Représentation de la photosynthèse et de la photorespiration, deux mécanismes compétitifs (Peterhansel *et al.*, 2010).

La photorespiration s'effectue lorsque le ratio O_2/CO_2 est élevé (Peterhansel *et al.*, 2010; Richmond, 2008).

Ce mécanisme entraîne des coûts énergétiques supplémentaires pour la fixation du carbone par la cellule. Cependant il permet la réduction d'intermédiaires métaboliques toxiques tels que le glyoxylate ou l'ammoniaque et il représente également une voie alternative de transport d'électrons, ce qui évite la formation de ROS (Wingler *et al.*, 2000).

1.2.2.4 La photoprotection

En cas d'exposition à de fortes intensités lumineuses, des mécanismes de photoprotection se mettent en place et évitent ainsi la dégradation des cellules.

- Le cycle des xanthophylles et la dissipation régulée de chaleur qE.

Le cycle des xanthophylles permettant la transformation de l'excès d'énergie lumineuse en chaleur est probablement le processus le plus important qui protège les cellules contre les fortes intensités lumineuses.

Chez les micro-algues vertes, le cycle des xanthophylles correspond au cycle de la violaxanthine (Yamamoto *et al.*, 1962). Lorsque l'intensité lumineuse augmente, un gradient de protons se forme dans le lumen des thylakoïdes et le pH diminue. Le gradient de protons a pour première conséquence la protonation des protéines LHC des antennes collectrices (Figure 7). Chez les plantes supérieures, il s'agit de Psbs, mais cette protéine n'est pas présente chez les micro-algues vertes, où elle est remplacée par les protéines Lhcsr (Peers *et al.*, 2009). L'acidification de ces protéines entraîne un changement de conformation et l'agglomération des antennes.

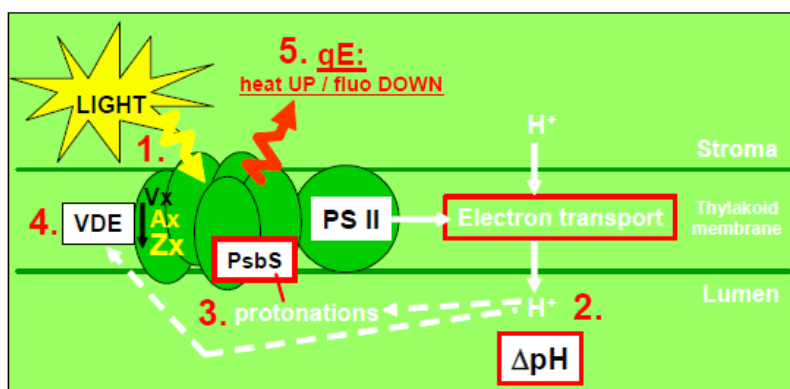


Figure 7 : Représentation simplifiée de la dissipation régulée de chaleur nommée qE chez les plantes supérieures (Lavaud, 2007).

De plus, quand le pH atteint 5-6, l'enzyme Violaxanthine Dé-Epoxydase (VDE) se lie à la membrane des thylakoïdes grâce au monogalactosyldiacylglycérol et atteint la violaxanthine (Vx) qui est convertie en anthéroxanthine (Ax) puis en zéaxanthine (Zx) par perte successive de deux liaisons époxydes (Figure 8). Ce procédé se met en place en 60 secondes environ. Zx joue un rôle allostérique pour l'agglomération des antennes. L'agglomération des antennes permet une meilleure dissipation sous forme de chaleur de l'énergie lumineuse excédentaire. La zéaxanthine époxydase (ZEP) est activée en permanence mais la réaction d'époxydation est dix fois plus longue que la réaction opposée. Ainsi, une balance s'opère entre les deux mécanismes antagonistes et lorsque le pH augmente à nouveau, Zx gagne deux groupements époxydes et est à nouveau convertie en Vx. En parallèle, les protéines LHC retrouvent leur conformation initiale (Goss et Jakob, 2010; Lavaud, 2007).

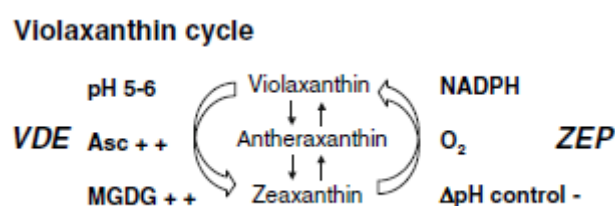


Figure 8 : Cycle des xanthophylles des micro-algues vertes (Goss et Jakob, 2010).

Cette dissipation régulée d'énergie se traduit par un quenching non photochimique de la fluorescence chlorophyllienne (NPQ) qui est mesurable (Voir partie 1.6.3.4).

- Les cycles alternatifs des électrons (AEC)

Si de très hautes lumières sont rencontrées, un cycle autour de PSII s'opère et empêche la saturation des transporteurs d'électrons après ce dernier (Figure 9). En effet, lorsque l'ensemble

du pool de PQ oxydées diminue, environ 15 % des Q_A^- peuvent être directement ré-oxydées grâce à la réduction de P_{680}^+ , sans oxydation de l'eau (Prasil *et al.*, 1996). L'état d'oxydo-réduction des PQ et le cytochrome b559 semblent être les paramètres clés pour l'induction de ce cycle (Falkowski *et al.*, 1986). Ce cycle permet la limitation de production de ROS et de ce fait, est une des premières lignes de défense contre des expositions à de fortes intensités lumineuses (Lavaud *et al.*, 2007).

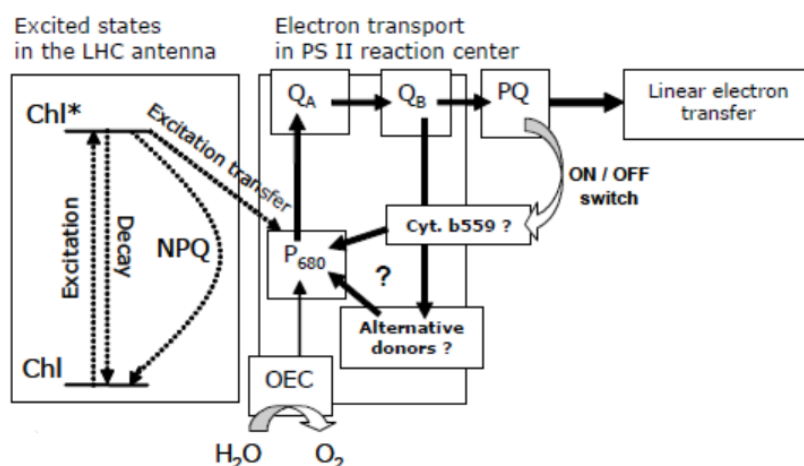


Figure 9 : Représentation des mécanismes se produisant lors du cycle autour du Photosystème II (Lavaud *et al.*, 2007).

De même, un cycle autour du photosystème I peut également s'opérer. Les électrons produits au niveau du PSI sont redirigés à travers la ferredoxine (Fd) pour réduire le cytochrome b6f ou le pool de plastoquinones (Joliot et Joliot, 2002; Miyake, 2010).

Le cycle eau-eau est un autre AEC qui vise à éviter la photoinhibition (Figure 10). Dans ce cycle, le dioxygène est photo-réduit au niveau du PSI par des électrons provenant du PSII, pour former un radical superoxyde (O_2^-) lors de la réaction de Mehler. Ce superoxyde est converti en H_2O_2 grâce à la superoxyde dismutase (SOD). Lors de cette réaction, du dioxygène (O_2) est libéré. Finalement, le H_2O_2 est réduit en H_2O par l'ascorbate peroxidase (APX), l'ascorbate (Asc) étant donneur d'électrons.

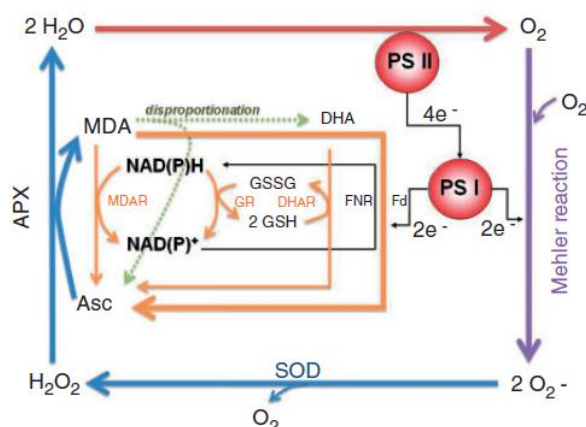


Figure 10 : Représentation des réactions impliquées dans le cycle eau-eau (Miyake, 2010).

Le cycle eau-eau confère plusieurs avantages aux cellules lors d'expositions à de fortes intensités lumineuses. Il permet la dissipation d'un excès d'énergie d'excitation et d'électrons, la dégradation des ROS et l'induction du cycle des xanthophylles grâce au gradient de protons qui se forme lors de l'oxydation du NADPH en NADP pour la régénération de l'ascorbate (Asada, 2000; Miyake, 2010).

La fraction des AEC est dépendante de l'espèce et des conditions de culture (Ralph *et al.*, 2010). Sur la Figure 11 sont représentées les fractions des différents destins des photons absorbés par *Phaeodactylum tricornutum* et *Chlorella vulgaris* lors d'une exposition à une lumière fluctuante avec une fréquence d'une demie heure ou lors d'une exposition à une lumière sinusoïdale.

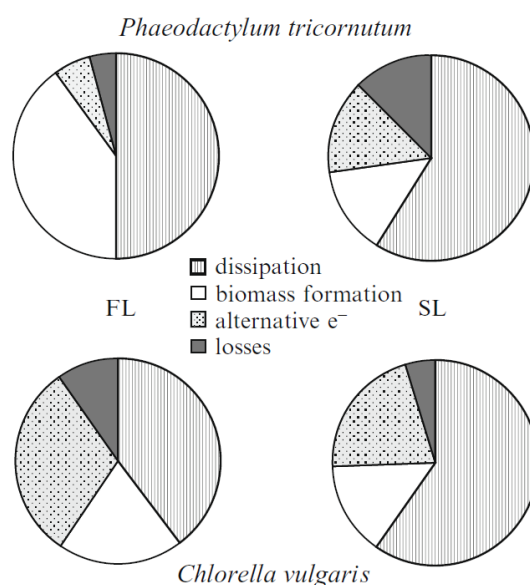


Figure 11 : Comparaison du devenir des photons absorbés chez *P. tricornutum* et *C. vulgaris* cultivés en lumière fluctuante (FL) ou sinusoïdale (SL) (Ralph *et al.*, 2010).

La fraction des AEC est dans les deux conditions de culture plus importante chez *C. vulgaris* que chez *P. tricornutum*. Chez *C. vulgaris*, la fraction des AEC est plus importante en présence

d'une lumière fluctuante que sinusoïdale. Cependant, en lumière sinusoïdale, il y a plus de dissipation sous forme de chaleur ou de fluorescence.

- Les transitions d'état

Lors de fortes intensités lumineuses, les micro-algues vertes sont capables de moduler l'énergie d'excitation entre PSII et PSI pour maintenir un taux de photosynthèse optimal (Figure 12). Ce processus se nomme la transition d'état et apparaît après 5 à 20 minutes. Comme évoqué dans la partie 1.2.2.2, lorsque le PSII est soumis à de l'énergie lumineuse, le pool de PQ est réduit en plastoquinol PQH₂. Ce plastoquinol peut alors se lier au cytochrome b₆f. Cela active une kinase au niveau des membranes des thylakoïdes qui vient phosphoryler l'antenne mobile LCHII (Allen, 2003 ; Kargul et Barber, 2007). Cette dernière peut ensuite se détacher du PSII et se lier au PSI. De ce fait il y a une redistribution énergétique entre le PSII et le PSI. Ces transitions d'états sont dépendantes de l'état d'oxydation du pool de PQ, du cytochrome b₆f et du couple thiorédoxine/ferrédoxine. Quand le PSI devient à son tour sur-oxydé, la kinase est désactivée et l'antenne mobile LCHII est déphosphorylée. Elle se détache donc du PSI pour se lier au PSII (Allen, 2003; Kargul et Barber, 2008).

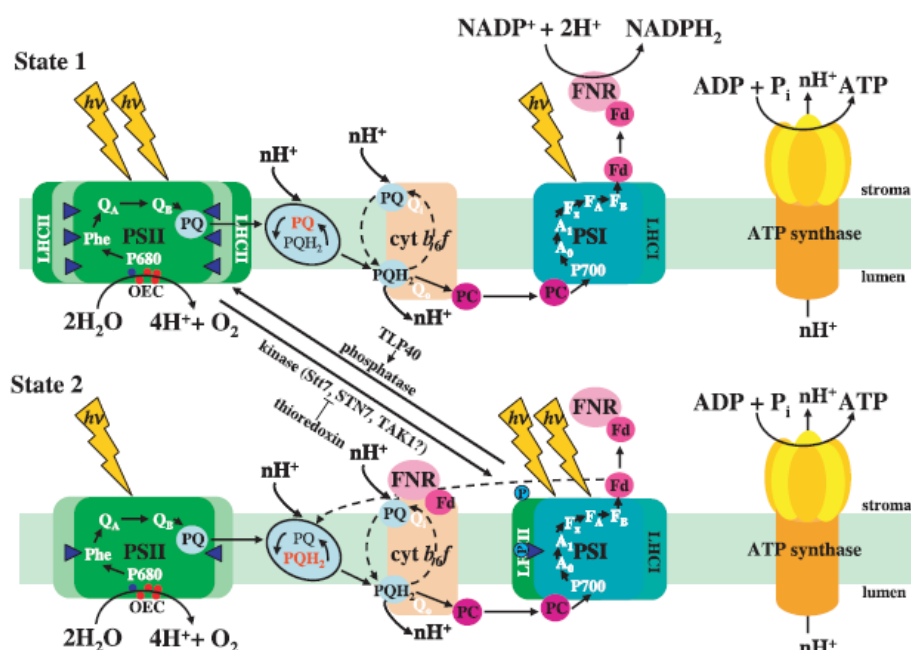


Figure 12 : Représentation du mécanisme de transition d'état se produisant chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Kargul et Barber, 2008).

1.2.2.5 La photoacclimatation

Lorsque les cellules sont exposées à une nouvelle intensité lumineuse pendant plusieurs heures, il y a une réorganisation des chloroplastes qui modifie la captation et l'utilisation de l'énergie lumineuse. Ce processus est appelé photoacclimatation et dure de quelques heures à plusieurs jours. Lors d'une exposition à une faible intensité lumineuse, les chloroplastes sont bien distribués et il y a une grande surface d'absorption. Par ailleurs dans ces conditions, le nombre de thylakoïdes, et donc la teneur en pigments photosynthétiques, sont élevés. Dans le cas contraire, lors d'une exposition à une forte intensité lumineuse, les chloroplastes sont condensés, la surface d'absorption résultante est plus petite et la teneur en pigments photosynthétiques est faible (Berner *et al.*, 1989; Brunet *et al.*, 2011; Dubinsky et Stambler, 2009; Falkowski *et al.*, 1985). La photoacclimatation, lors d'une transition d'une faible à une forte intensité lumineuse est plus rapide que la photoacclimatation lors de la transition opposée (Prézelin *et al.*, 1991). En effet, quand l'intensité lumineuse augmente, la diminution de la teneur en pigments est facilitée par la dilution due à la division cellulaire. Or lorsque l'intensité lumineuse diminue, pour que le contenu pigmentaire augmente, la vitesse de production des pigments doit être plus grande que la vitesse de division cellulaire. Comparés aux pigments photosynthétiques, les pigments photoprotecteurs montrent la relation inverse avec la lumière. Toutefois il a été rapporté que ces changements pigmentaires étaient moins importants dans des conditions dynamiques de lumière (Garcia-Mendoza *et al.*, 2002).

1.2.2.6 Le cycle de réparation du photosystème II et la photoinhibition

La protéine D1 constitue l'une des sous-unités du PSII (Figure 13). Il existe chez les micro-algues un renouvellement permanent de cette protéine (Ohad *et al.*, 1984). Lorsque, du fait d'une exposition à une forte lumière, le gradient de protons augmente, les protéases responsables de la dégradation des protéines D1 endommagées sont activées. Cette acidification permet également la synthèse de nouvelles protéines D1 (Li *et al.*, 2018; Peter Nixon *et al.*, 2010).

Cependant, lorsque l'énergie lumineuse devient trop importante, la vitesse de dégradation du PSII peut devenir plus importante que la vitesse de renouvellement de la protéine D1, ce qui entraîne une baisse de l'efficacité photosynthétique dépendante de la lumière. Ce phénomène est appelé photoinhibition (Han, 2000; Kok, 1956).

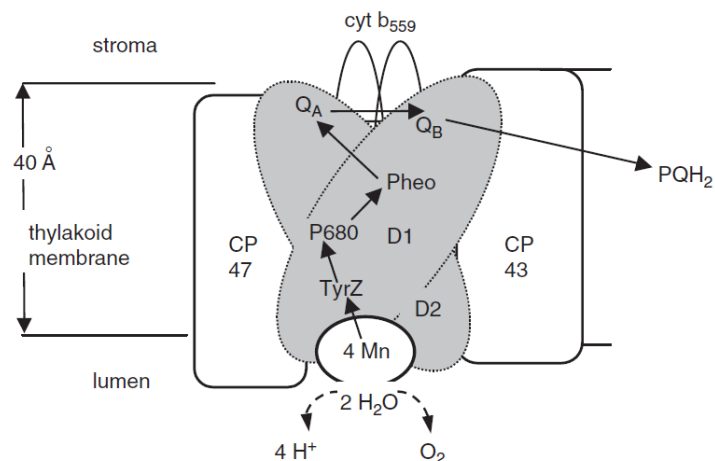


Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation moléculaire du PSII. Les protéines constitutives majoritaires du PSII sont CP43, CP47, Cyt b₅₅₉, D1 et D2. Les sous-unités D1 et D2 sont liées à la plupart des accepteurs d'électrons (Masojidek *et al.*, 2013).

L'exposition prolongée à une forte intensité lumineuse n'est pas la seule cause de la photoinhibition et d'autres conditions environnementales peuvent aussi être à l'origine de ce phénomène. Une limitation en carbone, une température non optimale ou un stress salin peuvent également entraîner une photoinhibition du fait d'un déséquilibre induit dans la conversion photosynthétique (Murata *et al.*, 2007).

1.2.3 Les réactions biochimiques se déroulant à l'obscurité

1.2.3.1 La respiration cellulaire

A l'obscurité, les hydrates de carbone formés au niveau du cycle de Calvin sont utilisés par la respiration cellulaire, dans le cytosol puis dans la mitochondrie, pour former de l'énergie, sous forme d'ATP et des intermédiaires nécessaires à la biosynthèse (Figure 14).

La respiration cellulaire s'effectue en trois étapes :

- 1) La glycolyse : le glucose est oxydé en acide pyruvique. Lors de cette étape, 2 molécules d'ATP sont synthétisées par phosphorylation au niveau du substrat. Les produits de la glycolyse sont dirigés vers la mitochondrie pour les étapes suivantes.
- 2) Le cycle de Krebs : il se déroule dans la mitochondrie. L'acide pyruvique est dégradé grâce à des décarboxylases et des déshydrogénases. Lors de cette étape, du CO₂ et 2 molécules d'ATP (phosphorylation au niveau du substrat) sont produits et des transporteurs sont réduits.
- 3) La phosphorylation oxydative : une série d'enzymes et de transporteurs d'électrons, forment la chaîne de transport des électrons (ETC). Les enzymes oxydent les transporteurs précédemment réduits lors du cycle de Krebs, assurant le transfert des

électrons jusqu'à l'accepteur final, le dioxygène. Cela génère un gradient de protons qui active les ATP-synthases et permet la formation de 32 molécules d'ATP par molécule de glucose.

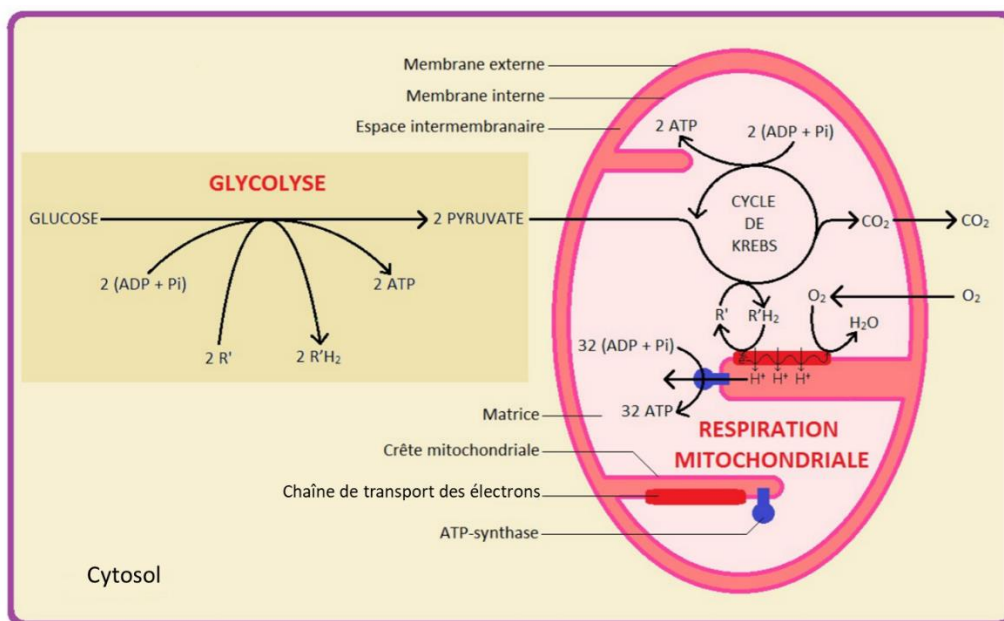


Figure 14 : La respiration mitochondriale (ac-Grenoble)

Il est important de noter que bien que principalement présent à l'obscurité, ce mécanisme se produit également en présence de lumière. Ce phénomène est appelé respiration à la lumière et est essentiel pour maintenir le pool d'ATP cellulaire en partie nécessaire lorsque la vitesse de la photosynthèse est élevée (Hoefnagel *et al.*, 1998; Kromer, 1995).

1.2.3.2 La chlororespiration

A l'obscurité ou sous faible lumière, la chlororespiration est une voie de transport des électrons qui se déroule dans les thylakoïdes mais qui consomme de l' O_2 . Le terme « chlororespiration » a été pour la première fois évoqué par Bennoun (1982), en opposition avec la respiration mitochondriale. Ce phénomène implique deux types d'activités enzymatiques agissant sur l'état d'oxydoréduction du couple PQ/PQH_2 . Une NAD(P)H:PQ oxydoréductase réduit le pool de PQ se trouvant dans les membranes des thylakoïdes puis une PQH_2 :oxygène oxydoréductase appelée **PTOX** (pour **Plastid terminal Oxydase**) oxyde les PQH_2 et produit de l'eau. Ces mécanismes successifs permettent le transfert d'électrons au dioxygène (Hoefnagel *et al.*, 1998; Nixon, 2000; Peltier et Cournac, 2002).

Lors d'une exposition à une lumière intermittente, il a été montré que les **PTOX**, responsables en partie de la chlororespiration, jouaient un rôle sur le rendement photosynthétique et la croissance des micro-algues. Cela maintient un gradient de pH, même à l'obscurité, ce qui évite

une acidification trop brusque du lumen, source de photoinhibition, en cas de forte lumière (Nawrocki *et al.*, 2019).

1.2.4 Causes et conséquences des réactions biochimiques

Dans les parties 1.2.2 et 1.2.3, plusieurs réactions biochimiques ont été décrites. Certaines sont dépendantes de la lumière et d'autres non. Les conditions de cultures peuvent induire certains mécanismes. En particulier, l'intensité lumineuse joue entre autre sur la photoacclimatation et l'efficacité de la photosynthèse, les phases d'obscurité influencent la respiration et la chlororespiration, et la concentration en oxygène dissous peut influencer à la fois la photosynthèse et la photorespiration. Les conséquences de ces mécanismes sont diverses. Il peut s'agir d'une perte de productivité lors d'une photoinhibition par exemple, d'une meilleure utilisation de l'énergie lumineuse grâce à la photoacclimatation ou d'un découplage entre efficacité photosynthétique et production de dioxygène lorsque des cycles alternatifs de transport d'électrons se produisent en présence de lumière.

1.3 **Les systèmes de production des micro-algues**

1.3.1 Les systèmes ouverts

Dans l'industrie, les micro-algues sont majoritairement produites dans des systèmes ouverts car ils ont l'avantage d'être peu onéreux. Ces systèmes peuvent être de simples lagunes, des bassins agités ou des systèmes de type « raceway » (Figure 15) agités par roue à aube et présentant une chicane centrale. Toutefois, les systèmes ouverts sont propices aux contaminations et laissent peu de moyens de contrôle des conditions de cultures, le tout résultant en de faibles productivités et un nombre limité d'espèces cultivables (Tredici, 2007).



Figure 15 : Bassin de type « raceway » pour la culture de micro-algues (Seambiotic Ltd, Israël).

1.3.2 Les systèmes clos ou photobioréacteurs

Afin de limiter les contaminations et permettre un meilleur contrôle des conditions de cultures, des systèmes clos aussi appelés photobioréacteurs (PBRs) ont été mis au point. Les géométries les plus couramment utilisées sont les PBRs plans ou de forme tubulaire comme présenté sur la Figure 16. Dans le cas des réacteurs tubulaires, des tubes transparents sont connectés en série et ces PBRs peuvent être horizontaux ou verticaux. L'ajout des nutriments se fait généralement dans une cuve séparée. La circulation de la culture et des gaz au sein du système est assurée par une pompe.

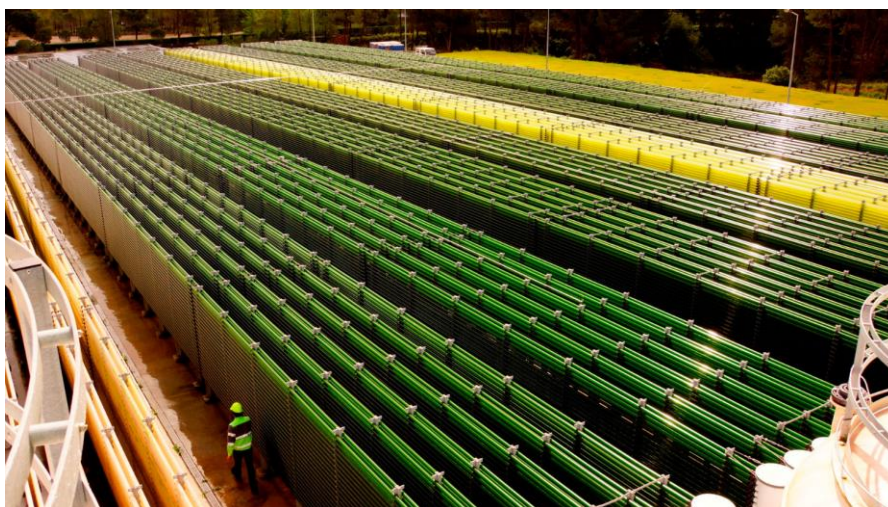


Figure 16 : Photobioréacteurs tubulaires (a4f, Portugal).

Toutefois, ces systèmes clos présentent des inconvénients, notamment l'apparition de biofilms sur les parois du réacteur et, des températures et des concentrations en oxygène dissous souvent élevées (Irving et Allen, 2011; Tredici, 2007).

1.3.3 Exemple d'un photobioréacteur de laboratoire

Afin d'étudier le comportement des micro-algues dans un environnement particulier, des PBRs d'études ont été mis en place. Comparés aux systèmes de production, ces réacteurs, généralement de faible volume, permettent un contrôle accru des conditions de culture. En particulier, le réacteur torique développé par le laboratoire GEPEA et présenté sur la Figure 17 a permis de nombreuses études sur la modélisation et l'optimisation de la production de biomasse, sur l'hydrodynamique, sur la conversion photosynthétique ou encore sur la production d'hydrogène (Degrenne *et al.*, 2011; Kazbar *et al.*, 2019; Souliès *et al.*, 2016; Takache *et al.*, 2012).



Figure 17 : Photobioréacteur torique (GEPEA, Pruvost *et al.*, 2017).

Ce réacteur, de 1,5 L, est caractérisé par la forme en tore du volume de culture qui, combinée à l'agitation mécanique assurée par une hélice marine, permet un mélange efficace, sans zone morte et avec de faibles contraintes de cisaillements. Un panneau de LEDs permet l'éclairage artificiel de ce réacteur qui présente une surface illuminée de 0,0325 m². Ce PBR peut être équipé de plusieurs outils de contrôle comme une sonde pH et température, une sonde d'oxygène dissous, et des débitmètres pour la mesure des gaz (Pruvost *et al.*, 2006; Pruvost *et al.*, 2017).

1.4 Les paramètres influençant la culture des micro-algues

1.4.1 La lumière

1.4.1.1 Définition de la lumière utilisée par les micro-algues

La lumière est constituée d'un ensemble d'ondes électromagnétiques. Les micro-algues peuvent absorber la lumière du PAR (Photosynthetically Active Radiation), c'est-à-dire les longueurs d'ondes comprises entre 380 nm et 750 nm. Il s'agit de la lumière visible (400-700 nm), 380-400 nm correspondant à la lumière violette et 700-750 nm correspondant à une fraction de l'infrarouge (Masojidek *et al.*, 2013).

Pour représenter la lumière, on utilise le flux photonique car la photosynthèse est sensible à la quantité de photons. L'énergie d'un photon (E) est égale à sa fréquence (ν) multipliée par la constante de Planck notée h :

$$E = h\nu, \quad (1-4)$$

avec $h = 6,63 \times 10^{-34}$ J s.

Dans ce manuscrit, l'énergie lumineuse sera exprimée sous forme de flux photonique en μmol de photons par unités de surface et de temps ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

La lumière peut être représentée par plusieurs grandeurs. Du fait du spectre formant la lumière blanche, ces grandeurs sont par définition spectrales. Mais pour plus de simplicité, elles peuvent être moyennées sur l'ensemble du PAR. De manière pratique les grandeurs spectrales sont différenciées des grandeurs moyennées par un λ en indice (Pruvost et Cornet, 2012).

On définit en premier lieu l'intensité I à partir de laquelle les autres grandeurs sont calculées. Il s'agit du rapport entre l'énergie apportée et la surface de réception. Cette intensité est associée à une direction donnée.

Puis dans le cas des PBR, on définit q_0 , la densité de flux de photons incidents (PFD) qui est apportée en surface du PBR. Comme représenté sur la Figure 18, ce PFD est la somme du flux direct $q_{//}$ et du flux diffus $q_{\perp}$, notamment en conditions solaires (Pruvost *et al.*, 2011).

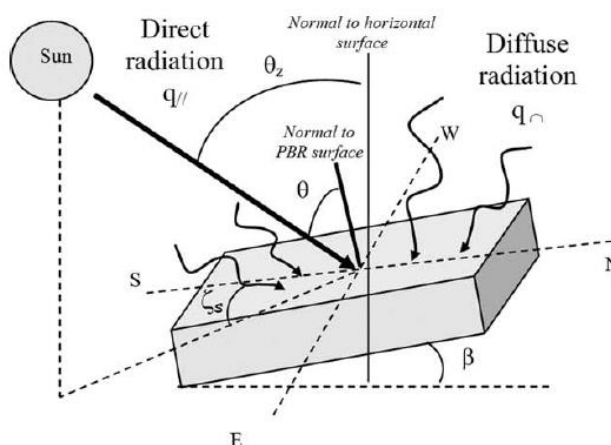


Figure 18 : Rayonnement solaire à la surface d'un PBR (Pruvost *et al.*, 2011).

Dans le cas d'une illumination contrôlée, q_0 est un paramètre opératoire qui détermine les conditions d'illumination de la culture. Il peut être mesuré grâce à des capteurs quantiques.

Enfin, l'irradiance, notée G , correspond, à l'échelle de la micro-algue, à l'énergie lumineuse disponible pour la photosynthèse.

1.4.1.2 Efficacité de l'utilisation de la lumière

La lumière est un paramètre clé pour l'optimisation de la culture des micro-algues car il détermine directement l'efficacité de la photosynthèse. La courbe photosynthèse/intensité lumineuse (notée P/I ou P/E) représente la vitesse de la photosynthèse en fonction de l'intensité lumineuse appliquée (Figure 19).

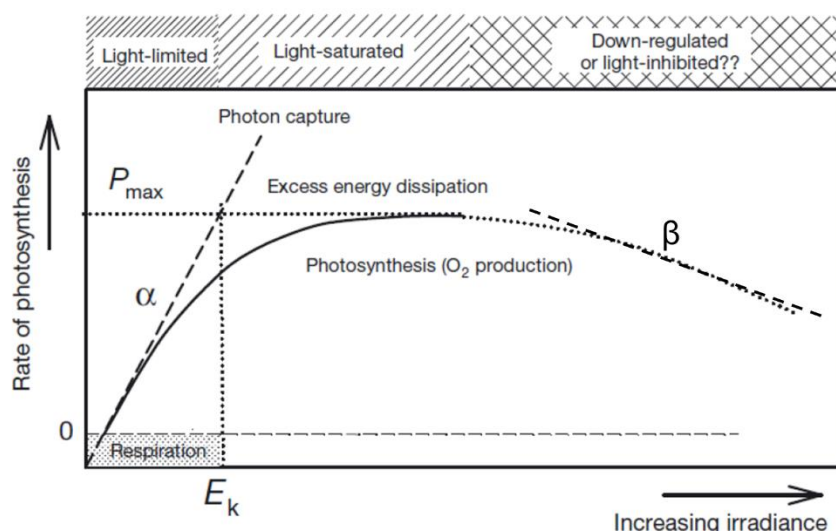


Figure 19 : Représentation d'une courbe P/I (Malapascua *et al.*, 2014).

Cette courbe, obtenue en culture diluée, est très utilisée pour connaître la lumière optimale à appliquer à une micro-algue dans des conditions données. Cette courbe P/I peut être obtenue par mesure du dioxygène produit grâce à une électrode de Clark ou par mesure de la fluorescence émise par la chlorophylle *a* (Walker *et al.*, 1987). Cette dernière technique sera développée dans la partie 1.6.3.

Sur la courbe P/I trois zones peuvent être distinguées (Consalvey *et al.*, 2005; Malapascua *et al.*, 2014; Vonshak et Torzillo, 2007).

La première zone correspond à la photo-limitation. La vitesse de la photosynthèse est proportionnelle à la lumière appliquée aux cellules. La pente de la partie linéaire de la courbe est notée α et elle représente l'efficacité maximale de l'utilisation de la lumière. Ce paramètre peut être normalisé par la concentration en biomasse ou en Chlorophylle *a*, il est alors noté α^* . La deuxième zone correspond à la photo-saturation. La vitesse de la photosynthèse est alors indépendante de la quantité de lumière appliquée à la culture. La vitesse maximale de photosynthèse, P_{max} , est atteinte. E_k (ou I_k) représente l'intensité lumineuse saturante et est définie comme l'abscisse de l'intersection de P_{max} et α . Si l'intensité lumineuse est supérieure à E_k , la vitesse d'absorption de photons est supérieure à la capacité de transport des électrons. Ainsi, à partir de cette valeur, le surplus d'énergie n'est pas utilisé et est principalement converti en chaleur par les mécanismes décrits dans la partie 1.2.2. Il en résulte une diminution de l'efficacité d'utilisation de la lumière. E_k permet de comparer l'affinité pour la lumière de deux espèces. Par ailleurs il s'avère être un bon indicateur de la photoacclimatation des cellules (Vonshak et Torzillo, 2007).

Dans la troisième zone, la lumière devient inhibitrice et la vitesse de la photosynthèse diminue avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. Il s'agit généralement d'une photoinhibition avec un endommagement du photosystème. Cette diminution de la photosynthèse peut être caractérisée par sa pente, β (Consalvey *et al.*, 2005).

Enfin, une quatrième zone peut être définie. Il s'agit de la zone de la respiration. En effet, l'irradiance de compensation G_C est définie comme l'irradiance à laquelle la photosynthèse compense la respiration, c'est-à-dire lorsque la somme de la production de dioxygène par photosynthèse et de sa consommation par respiration est nulle. Lorsque l'intensité lumineuse est inférieure à ce point de compensation, le mécanisme de respiration est dominant (Cornet, 1992).

1.4.1.3 Modèles de transferts radiatifs

Comme évoqué précédemment, la lumière joue un rôle prépondérant sur l'activité photosynthétique. C'est pourquoi, pour comprendre la réponse d'une culture de micro-algues à la lumière, il est important de connaître l'irradiance au sein du photobioréacteur.

Ainsi, des modèles de transferts radiatifs sont utilisés pour cela. Les modèles les plus simples utilisent l'équation de Beer-Lambert qui décrit l'atténuation lumineuse dans une culture (Lee, 1999). Cependant, ce modèle ne tient compte que de l'absorption due aux pigments mais il ne prend pas en considération la diffusion de la lumière par les cellules. Pour une prédiction idéale, la théorie générale des transferts radiatifs devrait être directement appliquée aux modèles de transfert d'énergie lumineuse en photobioréacteurs. Mais la résolution des équations de transferts radiatifs dans le cas des photobioréacteurs est souvent trop complexe. En effet les photobioréacteurs sont des systèmes dynamiques, et aux géométries variables.

C'est pourquoi, des modèles à une dimension de type modèle à deux flux ont été développés. Ils représentent un bon compromis, en introduisant la prise en compte de la diffusion de la lumière. Ces modèles ont été appliqués à plusieurs géométries de photobioréacteurs et à diverses espèces de micro-algues (Cornet *et al.*, 1992; Cornet *et al.*, 1995; Pottier *et al.*, 2005; Souliès *et al.*, 2016). Ils seront présentés dans la section suivante.

De tels modèles radiatifs nécessitent la connaissance des propriétés radiatives des micro-algues. De nombreux paramètres peuvent impacter ces propriétés radiatives tels que la teneur en pigments, le profil pigmentaire, la concentration cellulaire, la taille des cellules et des effets synergiques entre les cellules (packaging effect) (Davies-Colley *et al.*, 1986).

- Détermination des propriétés radiatives des micro-algues

Les propriétés radiatives des micro-algues sont nécessaires pour appliquer les équations de transferts radiatifs dans les PBRs. Pour le modèle à deux flux, il s'agit du coefficient massique d'absorption à la lumière ($E_{a,\lambda}$ en $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$), du coefficient massique de diffusion de la lumière ($E_{s,\lambda}$ en $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$) et du coefficient de rétro-diffusion ($b_{2,\lambda}$, sans unité). Ces propriétés peuvent être calculées grâce à la théorie de Lorenz-Mie, ou être déterminées de manière expérimentale. Pour les déterminer de manière théorique, il est nécessaire de connaître l'indice de réfraction de la cellule m_λ , sa taille et l'indice de réfraction du milieu entourant les cellules $n_{m,\lambda}$ (Dauchet *et al.*, 2015; Pottier *et al.*, 2005).

La démarche globale pour l'obtention théorique des propriétés radiatives des micro-algues est représentée en Figure 20.

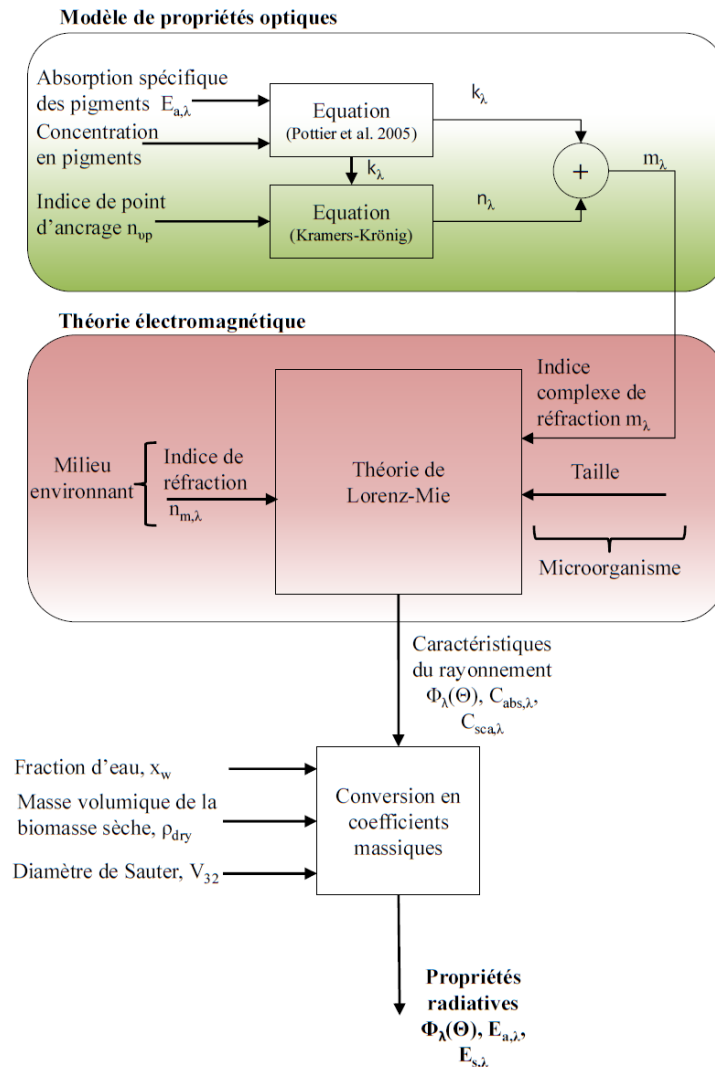


Figure 20 : Représentation schématique de l'obtention des propriétés radiatives des micro-algues (Artu, 2016 d'après Kandilian *et al.*, 2016).

Par la démarche expérimentale, le coefficient de rétrodiffusion $b_{2\lambda}$ est obtenu par intégration de la fonction de phase ($p_\lambda(\theta, \theta')$) qui peut être déterminée par néphélométrie. La fonction de phase représente la probabilité qu'un photon aille dans une direction donnée. Le coefficient massique de diffusion Es_λ peut être obtenu par mesure de la transmittance normale-normale d'une culture diluée, et le coefficient massique d'absorption Ea_λ peut être déterminé par mesure de la transmittance normale-hémisphérique de cette même culture diluée, à l'aide d'un spectrophotomètre avec sphère d'intégration (Kandilian *et al.*, 2016; Pilon *et al.*, 2011). Pour une meilleure représentativité du modèle, ces mesures sont réalisées sur des cultures ayant différentes teneurs en pigments. Concernant *C. vulgaris*, les coefficients massiques d'absorption Ea_λ et de diffusion Es_λ ont été déterminés par Kandilian *et al.* (2016) (Figure 21).

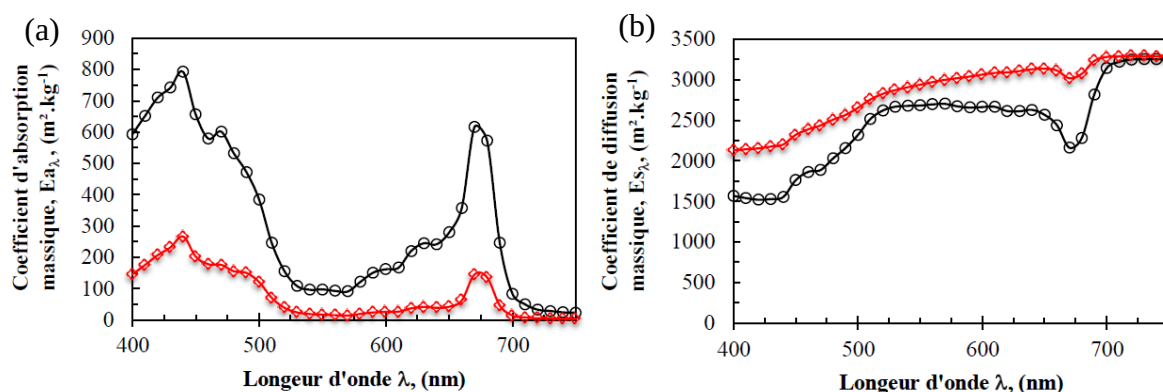


Figure 21 : Evolution du coefficient d'absorption (a) et de diffusion (b) massique de *C. vulgaris* en fonction de la longueur d'onde pour une teneur en pigments égale à 6,5 % C_x (Cercles noirs) ou 1,2 % C_x (Losanges rouges) (Artu, 2016 d'après Kandilian *et al.*, 2016).

- Le modèle à deux flux

Le modèle à deux flux provient de l'équation générale de transfert radiatif. Dans un but de simplification, il est supposé une atténuation monodimensionnelle le long de la profondeur de culture z . Cette approximation est notamment valable dans les réacteurs de type plan. A noter que ce modèle a été initialement développé pour représenter l'atténuation lumineuse dans le brouillard (Schuster, 1905).

Le modèle à deux flux repose sur plusieurs hypothèses qui sont un milieu absorbant, diffusant et non fluorescent.

Ce modèle prend en compte la propagation de la lumière à une longueur d'onde donnée sur la même direction mais dans deux sens opposés (Figure 22).

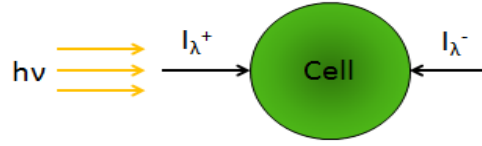


Figure 22 : Représentation schématique du modèle à deux flux (Takache, 2010).

Voici l'équation représentant ce modèle :

$$G_\lambda = \iint_{4\pi} I_\lambda d\omega = I_\lambda^+ + I_\lambda^- . \quad (1-5)$$

L'irradiance G_λ correspondant à l'intégration de I_λ sur 4π est ici assimilée à la somme de l'intensité provenant de la source lumineuse I_λ^+ et de la partie rétrodiffusée du rayonnement I_λ^- .

Ainsi, le système d'équations différentielles à résoudre est décrit ci-dessous :

$$\begin{cases} \frac{dI_\lambda^+}{dz} = -Ea_\lambda \times C_x I_\lambda^+ - Es_\lambda \times C_x b_{2\lambda} (I_\lambda^+ + I_\lambda^-) \\ \frac{dI_\lambda^-}{dz} = -Ea_\lambda \times C_x I_\lambda^- - Es_\lambda \times C_x b_{2\lambda} (I_\lambda^- + I_\lambda^+) \end{cases} \quad (1-6)$$

Il tient compte de la profondeur de culture z , de l'absorption (Ea_λ) et de la diffusion (Es_λ et $b_{2\lambda}$). C_x correspond à la concentration en biomasse.

Les conditions aux limites dépendent de la géométrie du PBR. Dans le cas d'un réacteur plan, avec un flux lumineux collimaté et une face arrière en acier inoxydable avec un coefficient de réflexivité noté ρ , les conditions aux limites sont les suivantes :

$$\begin{cases} z = 0, & I_\lambda^+ = q_{\lambda,0} \\ z = L, & I_\lambda^- = \rho I_\lambda^+ \end{cases} \quad (1-7)$$

L représente l'épaisseur de la culture et $q_{\lambda,0}$ le flux incident de photons à la surface du PBR.

Considérant ces conditions aux limites et les hypothèses précédemment évoquées, l'atténuation de G_λ est calculée comme suit (Pottier *et al.*, 2005):

$$\frac{G_\lambda(z)}{q_{\lambda,0}} = 2 \frac{[\rho(1 + \alpha_\lambda)e^{-\delta_\lambda L} - (1 - \alpha_\lambda)e^{-\delta_\lambda L}]e^{\delta_\lambda z} + [(1 + \alpha_\lambda)e^{\delta_\lambda L} - \rho(1 - \alpha_\lambda)e^{\delta_\lambda L}]e^{-\delta_\lambda z}}{(1 + \alpha_\lambda)^2 e^{\delta_\lambda L} - (1 - \alpha_\lambda)^2 e^{-\delta_\lambda L} - \rho(1 - \alpha_\lambda^2)e^{\delta_\lambda L} + \rho(1 - \alpha_\lambda^2)e^{-\delta_\lambda L}}, \quad (1-8)$$

avec α_λ le module de diffusion linéaire compris entre 0 et 1:

$$\alpha_\lambda = \sqrt{\frac{Ea_\lambda}{Ea_\lambda + 2b_\lambda Es_\lambda}}, \quad (1-9)$$

et δ_λ le coefficient d'extinction du modèle à deux flux :

$$\delta_\lambda = C_x \sqrt{Ea_\lambda (Ea_\lambda + 2b_\lambda Es_\lambda)}. \quad (1-10)$$

- La vitesse d'absorption de photons A

Comme mentionné précédemment, G_λ représente la quantité de lumière disponible pour réaliser la photosynthèse. Cependant, selon leur forme, leur taille, leur profil pigmentaire et leur état de photoacclimatation, toutes les micro-algues n'absorbent pas la même quantité de lumière. C'est pourquoi, pour comparer la réponse à la lumière entre plusieurs espèces ou entre différentes conditions d'acclimatation pour une même espèce, il est nécessaire d'introduire une nouvelle grandeur représentant la vitesse spécifique d'absorption des photons, notée A ou LRPA (Kandilian *et al.*, 2014; Pruvost et Cornet, 2012). Cette grandeur est exprimée en quantité de photons absorbés par unités de biomasse et de temps ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{kg}_{\text{Cx}}^{-1} \text{s}^{-1}$).

Le LRPA est calculé par intégration sur le PAR du produit de l'irradiance G_λ et du coefficient massique d'absorption $E_{a\lambda}$ (Cassano *et al.*, 1995) :

$$\text{LRPA ou } A = \int_{\text{PAR}} E_{a\lambda} G_\lambda d\lambda. \quad (1-11)$$

En moyennant cette valeur sur le volume du PBR ou, dans le cas du modèle à deux flux, sur la profondeur z du PBR, la vitesse moyenne spécifique d'absorption des photons ($\langle A \rangle$ ou MRPA) est obtenue :

$$\text{MRPA} = \frac{1}{L} \int_0^L A(z) dz. \quad (1-12)$$

1.4.1.4 Profils de lumière dans un photobioréacteur

Comme évoqué dans la partie 1.4.1.1, les conditions d'illumination représentées par le PFD incident sont des paramètres opératoires importants pour la culture de micro-algues. Cependant, du fait de l'atténuation lumineuse se produisant le long de la profondeur du réacteur, elle-même impactée par les phénomènes de photoacclimatation, la conséquence directe du PFD appliqué est difficile à estimer. C'est pourquoi une grandeur, la fraction volumique éclairée du PBR notée γ , a été définie (Cornet *et al.*, 1992; Cornet et Dussap, 2009; Degrenne *et al.*, 2010; Takache *et al.*, 2010). Pour obtenir cette grandeur, il est nécessaire de diviser le réacteur en deux zones : une zone éclairée et une zone sombre. Dans le cas d'une atténuation lumineuse monodimensionnelle, la frontière entre ces deux zones correspond à la profondeur à laquelle l'irradiance de compensation G_C (voir section 1.4.1.2) est atteinte (Pruvost et Cornet, 2012). Cela correspond également à la profondeur où la vitesse de compensation d'absorption A_C de photons est atteinte.

Ainsi, dans le cas d'une atténuation lumineuse monodimensionnelle, γ est calculé comme suit :

$$\gamma = \frac{V_{\text{éclairé}}}{V_{\text{PBR}}} = \frac{z(G_C)}{L} = \frac{z(A_C)}{L}. \quad (1-13)$$

Dans le cas de *C. vulgaris*, lors d'une résolution spectrale du modèle, A_C est égale à $2800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{kg}_{C_X}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Souliès *et al.*, 2016).

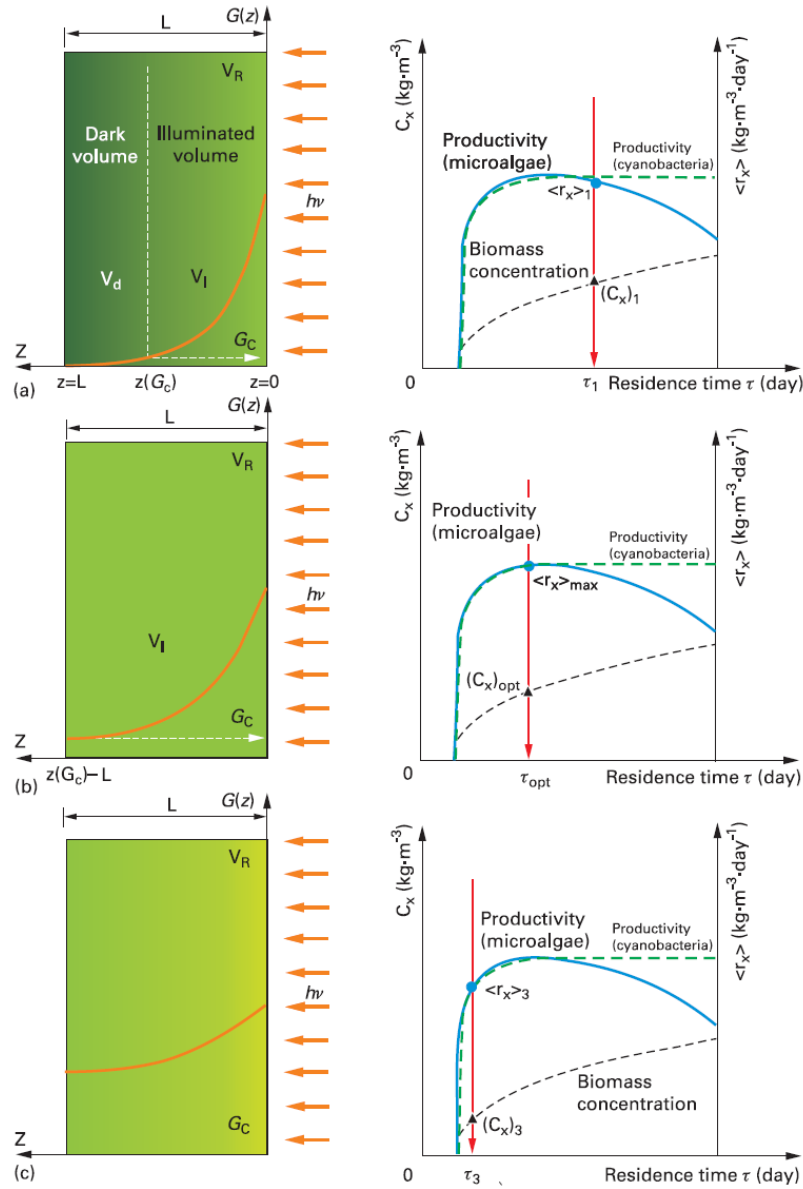


Figure 23 : Les trois différents profils d'atténuation lumineuse dans le cas d'un PBR plan : régime photolimité (a), régime luminostat (b) et régime cinétique (c) (Pruvost et Cornet, 2012).

A partir de ce γ , pour un PFD donné, trois profils lumineux de culture sont définis : un régime photolimité (Figure 23.a), un régime luminostat (Figure 23.b) et un régime cinétique (Figure 23.c).

Lorsque la concentration en biomasse est trop faible, ce qui peut être dû à un court temps de séjour dans le réacteur, une partie de la lumière incidente n'est pas absorbée par la culture et cette énergie n'est pas utilisée pour la photosynthèse. Le régime est alors dit cinétique et la culture est diluée. Par définition dans ce régime, on a $\gamma > 1$. Ce profil lumineux est très enclin

aux phénomènes de photoinhibition car les cellules ont tendance à être fortement exposées. Au contraire, lorsque la concentration est trop élevée, lors d'un trop long temps de séjour, un volume sombre apparaît. La contribution de la respiration est alors accentuée, résultant à une perte de productivité. Ce régime est dit photolimité. Ce régime est défini pour $\gamma < 1$. Le dernier profil correspond au régime luminostat et il est défini pour $\gamma=1$. En luminostat, le flux lumineux incident est absorbé dans sa totalité mais aucune zone sombre n'est présente. Ce régime permet d'obtenir une productivité maximale. En effet, il n'y a pas de perte d'énergie lumineuse et la perte de productivité due à la respiration est minimisée.

Contrairement aux cultures concentrées, lors d'une culture diluée, γ est hypothétiquement supérieur à 1 mais il est impossible de lui attribuer une valeur réelle, car il n'y a pas de zone sombre dans le réacteur. C'est pourquoi, afin de décrire un profil en régime cinétique, il est possible d'utiliser la transmittance T , correspondant à la fraction du PFD incident traversant la profondeur du réacteur :

$$T = \frac{G(z=L)}{q_0}. \quad (1-14)$$

1.4.1.5 Variabilité de la lumière

En culture solaire et à l'échelle des micro-algues, le flux de photons est fortement dynamique. Ceci est dû à divers phénomènes externes ou internes au PBR. Ces variations de lumière ont des caractéristiques de temps allant de la seconde à plusieurs jours.

- Les variations de lumières externes au PBR

Les variations de lumière externes au PBR comprennent celles dues aux cycles jours/nuits avec l'impact de la nuit et les variations dues à la météo.

En effet, en raison de la trajectoire du soleil, la lumière à la surface du PBR (PFD) change pendant la journée et les micro-algues sont sujettes à des alternances de périodes lumineuses et de périodes sombres lors desquelles leur métabolisme est différent (voir partie 1.2.2). Par ailleurs, ces variations ne sont pas les mêmes au fil des saisons. Par exemple, en hiver, à Nantes (France), pour un PBR horizontal, en moyenne, le lever et le coucher du soleil ont respectivement lieu à 9 heures et à 19 heures et le PFD maximal atteint est de $440 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Mais pendant les mois d'été, en moyenne, le lever puis le coucher du soleil ont lieu respectivement à 6 h et à 21 h et le PFD maximal moyen atteint est de $1270 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 24). Dans les deux cas, l'intensité lumineuse maximale est atteinte de 12h à 14h (Le Borgne, 2011).

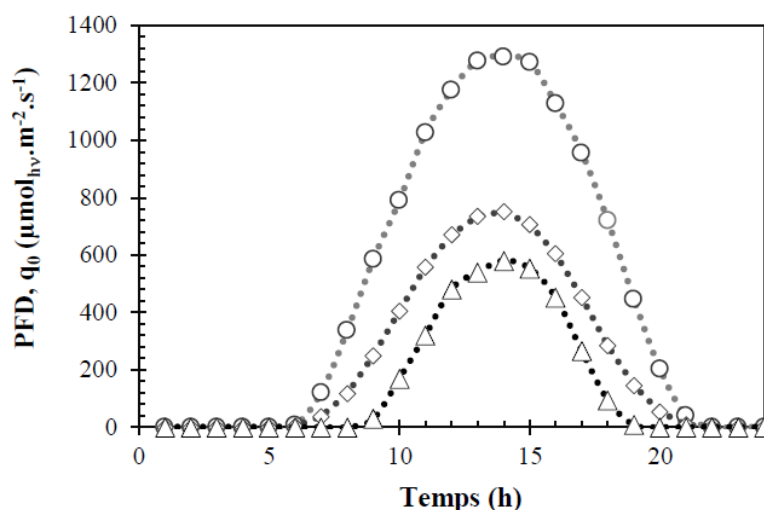


Figure 24 : Cycles jours/nuits correspondants au flux moyen annuel (losange), au flux moyen hivernal (triangle) et au flux moyen estival (cercle) (Artu, 2016).

En plus des cycles diurnes, le PFD est influencé par les changements météorologiques. Le rayonnement solaire peut être obstrué par les nuages pendant des minutes ou des heures (Duffie et Beckman, 2013).

- Les variations de lumières dues à l'hydrodynamique dans le PBR

Au sein du PBR, les cultures sont continuellement mélangées. Certaines variations rapides de la lumière sont ainsi dues au déplacement des cellules le long du gradient de lumière qui se forme dans les cultures (Figure 25).

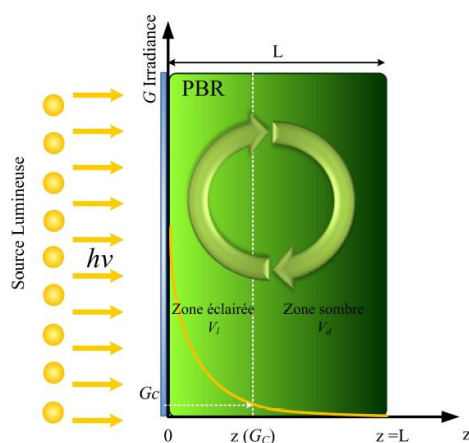


Figure 25 : Représentation du déplacement des cellules dans le gradient de lumière d'un PBR plan éclairé d'un seul côté (Takache *et al.*, 2012).

En quelques secondes, lors de cultures denses, les micro-algues passent de l'obscurité à une lumière saturante (Figure 26) (Pruvost *et al.*, 2008). Ces variations sont appelées cycles lumière/obscurité ou cycles L/D.

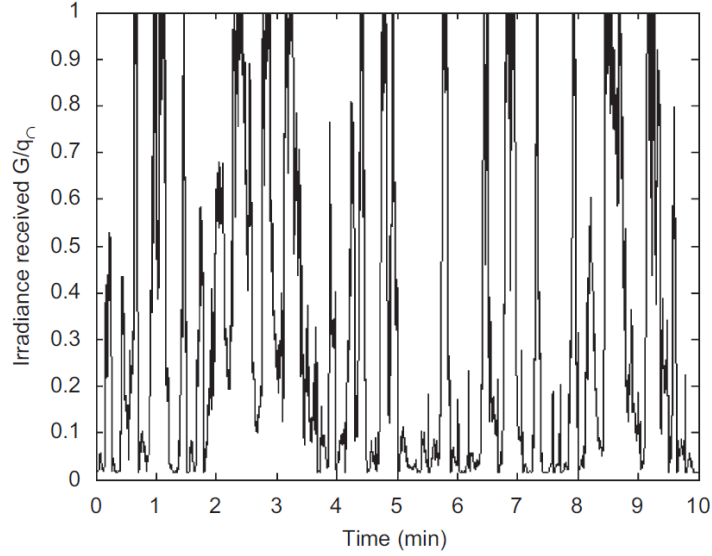


Figure 26 : Régime d'éclairement subi en PBR torique pour un PFD (ici noté q_n) égal à $200 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, une vitesse de moteur égale à 300 tours/min et une concentration en biomasse égale à 1 g L^{-1} (Pruvost *et al.*, 2008a).

Lorsque les temps caractéristiques de ces cycles sont de l'ordre de la micro seconde, une meilleure productivité peut être observée, probablement due à une meilleure utilisation de l'énergie lumineuse. En effet, ces cycles très courts correspondent au temps nécessaire pour qu'après absorption d'un photon, l'électron délocalisé traverse la chaîne photosynthétique. Tant que le centre réactionnel est fermé, aucun autre photon ne peut être absorbé. Ainsi lorsqu'il y a une parfaite synchronisation entre les cycles L/D et le transfert d'électrons dans la chaîne photosynthétique, la productivité s'en trouve améliorée. Cet effet est nommé «flashing light effect » (Janssen *et al.*, 2001; Phillips et Myers, 1954; Vejrazka *et al.*, 2011). Par ailleurs, dans le cas d'un PFD très élevé ($> 1500 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la présence de ces cycles pourrait faciliter la réparation des cellules suite à une photoinhibition (Merchuk *et al.*, 1998; Nedbal *et al.*, 1996). Cependant, en PBR, les cycles L/D rencontrés sont généralement plus longs. Leur fréquence est inférieure à 1 Hz (Pruvost *et al.*, 2008a). Dans ces cas-là, des études ont mis en évidence une baisse de productivité en présence de cycles L/D comparés à une exposition à une lumière continue (Janssen *et al.*, 2001; Takache *et al.*, 2015).

Ces cycles peuvent être définis par la période où les cellules sont à la lumière (t_L), celle où elles sont à l'obscurité (t_D) et par la fraction de temps à la lumière ε , correspondant au ratio de t_L par rapport à la durée totale d'un cycle ($t_C = t_L + t_D$) (Janssen *et al.*, 2001) :

$$\varepsilon = \frac{t_L}{t_C} = \frac{t_L}{t_L + t_D}. \quad (1-15)$$

Il est également important de préciser le PFD auquel les micro-algues sont exposées car, comme évoqué précédemment, la réponse des cellules en présence de cycles L/D n'est pas la même dans le cas d'une exposition à une faible ou à une forte lumière.

Comme représentées dans la Figure 27, plusieurs réponses aux cycles L/D sont définies (Terry, 1986) :

- Une réponse sans intégration si la lumière perçue est instantanément utilisée avec la même efficacité que lors d'une exposition à une lumière continue. Ainsi dans ce premier cas, la vitesse moyenne de production de biomasse $\langle r_X \rangle$ est calculée de la sorte :

$$\langle r_X \rangle_{wi} = \varepsilon \langle r_X(PFD) \rangle_{cl} + (1 - \varepsilon) \langle r_{X,D} \rangle_{cl}. \quad (1-16)$$

L'indice « wi » signifie que la productivité est calculée sans intégration de la lumière et l'indice « cl » définit des conditions en lumière continue. $r_X(PFD)$ correspond à la vitesse de production de biomasse au PFD appliqué, et $r_{X,D}$ correspond à la vitesse de perte de biomasse à l'obscurité.

- Une réponse avec une intégration totale qui suppose que la croissance est le résultat d'une énergie lumineuse moyenne absorbée et que la micro-algue ne répond pas dynamiquement aux changements de lumière. Dans ce deuxième cas, la productivité peut être calculée comme suit :

$$\langle r_X \rangle_{fi} = \langle r_X(\varepsilon \times PFD) \rangle_{cl}. \quad (1-17)$$

L'indice « fi » signifie que la productivité est calculée avec une intégration totale de la lumière.

- Une réponse avec une intégration partielle qui est intermédiaire aux deux premières. Cela signifie que les réactions biochimiques sont sensibles à la dynamique des cycles L/D mais que la réponse n'est toutefois pas immédiate. Cette réponse nécessite l'introduction d'un temps de relaxation pour l'activation noté τ_a , lors du passage de l'obscurité à la lumière, et d'un temps de relaxation pour la désactivation τ_d lors de la transition contraire (Takache *et al.*, 2015). A noter que si t_L est très supérieur à τ_a et t_D est très supérieur à τ_d , alors la réponse devient une réponse sans intégration.

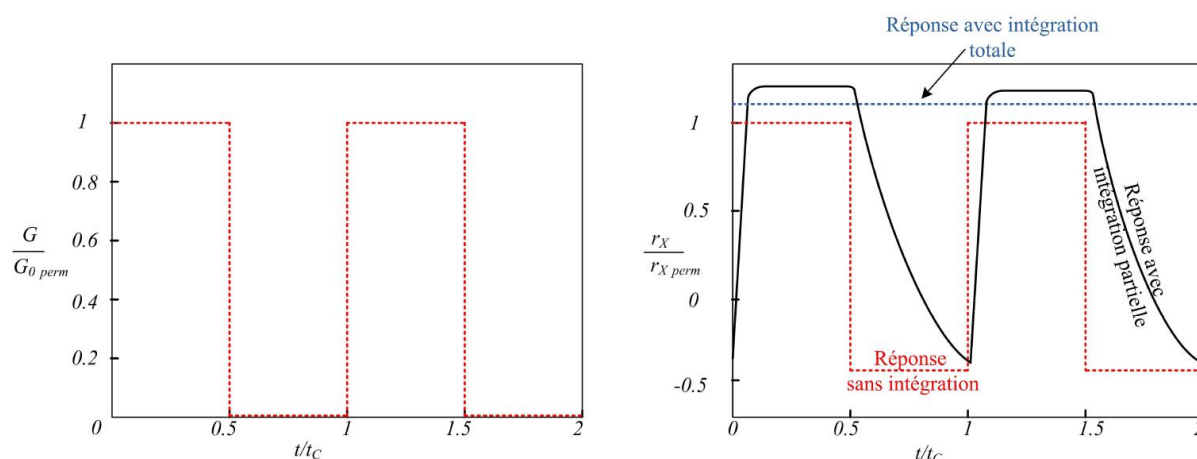


Figure 27 : Représentation des réponses types de la croissance par photosynthèse à un éclairage intermittent. A gauche : éclairage imposé. A droite: réponse avec intégration, sans intégration et avec intégration partielle à la lumière reçue (Takache *et al.*, 2015).

Ces réponses types peuvent également être utilisées pour modéliser la réponse d'autres mécanismes biochimiques aux cycles L/D comme la photoacclimatation.

- Problématique des boucles sombres

Par conception, la plupart des systèmes de cultures de micro-algues rencontrés en industrie présentent des parties qui ne sont pas éclairées. Il peut s'agir de pompes, de réservoirs, ou de boucles de recirculation pour la mise en place de capteurs. Ces boucles sombres peuvent représenter plus de 20 % du volume éclairé du PBR (Kazbar *et al.*, 2019).

Dans le but de monter à l'échelle des procédés de production d'hydrogène par *Chlamydomonas reinhardtii*, Torzillo *et al.* (2014) ont mis en évidence des pertes de productivité lors de la présence de telles boucles sombres et suggèrent de maintenir le volume sombre inférieur ou égal à 5 % du volume total du PBR. Ces résultats sont en accord avec ceux de Pruvost *et al.* (2016) montrant une baisse de productivité d'un facteur 2 lors de la présence d'une boucle sombre représentant 20 % du volume total du PBR, et ce, peu importe la géométrie du réacteur (Figure 28).

Cet impact a également été étudié par Kazbar *et al.* (2019) et il a été montré une perte de productivité n'excédant pas 4 % lors de la présence d'une boucle sombre représentant 10 % du volume total du PBR. Cependant cette perte atteint 47 % lorsque la boucle sombre représente 30 % du réacteur et que le temps de résidence des micro-algues dans la boucle sombre est égal à 300 s.

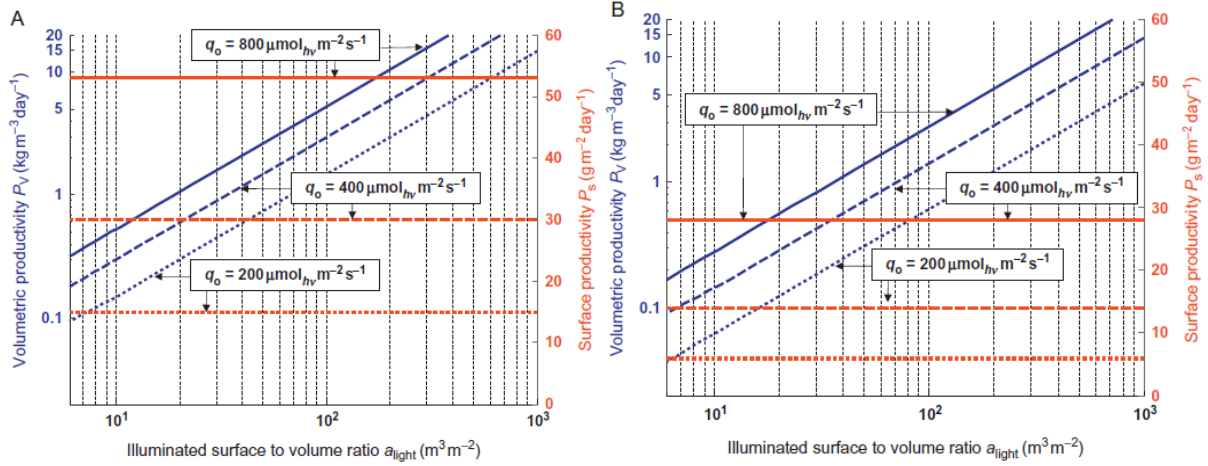


Figure 28 : Influence de la fraction sombre f_d sur la productivité de *C. vulgaris*. A : $f_d = 0\%$. B : $f_d = 20\%$ (Pruvost *et al.*, 2016).

Pour étudier l'impact de ces boucles sombres, plusieurs grandeurs sont définies :

- La fraction sombre (f_d) représentant le ratio du volume sombre (V_d) sur le volume total du PBR (V_R) correspondant à la somme du volume sombre et du volume éclairé (V_L) :

$$f_d = \frac{V_d}{V_d + V_L}. \quad (1-18)$$

- Le temps de résidence des cellules à l'obscurité (t_d) :

$$t_d = \frac{V_d}{Q}, \quad (1-19)$$

avec Q représentant le débit en $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$.

- Le temps de résidence des cellules à la lumière (t_L) :

$$t_L = \frac{V_L}{Q}. \quad (1-20)$$

Les différentes réponses appliquées aux cycles L/D peuvent également être utilisées pour déterminer l'impact des boucles sombres.

1.4.2 Les nutriments

La plupart des espèces de micro-algues sont photoautotrophes. Leur énergie provient de la lumière et elles nécessitent seulement l'apport supplémentaire de minéraux pour se développer. Cependant certaines micro-algues peuvent également avoir un métabolisme hétérotrophe en présence de composés organiques. Elles sont ainsi capables de les utiliser pour produire leur énergie (Grobbelaar, 2007). Certaines espèces, comme *C. vulgaris*, sont aussi capables d'utiliser simultanément l'énergie lumineuse et l'énergie provenant de carbone organique (Pagnanelli *et al.*, 2014). Ce métabolisme est appelé mixotrophie.

Concernant les organismes photoautotrophes, il est nécessaire d'apporter une trentaine d'éléments dans le milieu de cultures. Ces derniers peuvent être différenciés en deux catégories : les macroéléments devant être apportés en concentration importante, de l'ordre du g L^{-1} et les microéléments pour lesquels les concentrations nécessaires sont de l'ordre du mg L^{-1} (Grobbelaar, 2007).

Les principaux nutriments pour la croissance autotrophe sont le carbone, l'azote et le phosphore.

1.4.2.1 Le carbone

Le carbone est le constituant majeur des micro-algues, il représente entre 36 et 65 % de la matière sèche (Van Den Hende *et al.*, 2012). Il peut être apporté sous forme de CO_2 ou d'ion HCO_3^- dans le cas d'une culture autotrophe. Dans l'air, la concentration en CO_2 étant trop faible pour obtenir une forte croissance cellulaire, une source supplémentaire en carbone est donc nécessaire (CO_2 et/ou bicarbonate de sodium). Par ailleurs, le carbone inorganique est trouvé sous plusieurs formes qui sont dépendantes du pH du milieu (Figure 29). A pH acide, le carbone dissous est sous forme CO_2 principalement et il y a beaucoup de désorption. Lorsque le pH devient basique, en particulier lors de la photosynthèse, le carbone est majoritairement trouvé sous forme carbonate et il y a peu de désorption (Le Gouic, 2013).

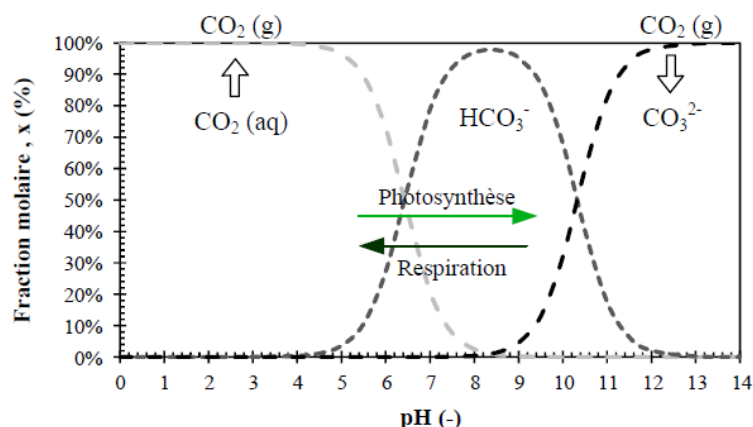


Figure 29 : Représentation des fractions molaires de carbone dissous en fonction du pH à 25 °C (Artu, 2016 d'après Kaplan *et al.*, 1986).

1.4.2.2 L'azote

L'azote est le deuxième élément le plus important chez les micro-algues. Il représente entre 1 % et 10 % de la matière sèche. Cette fraction peut varier entre les espèces et au sein d'une même espèce en fonction de l'apport en azote disponible. L'azote peut être apporté sous forme nitrate NO_3^- ou ammonium NH_4^+ (Grobbelaar, 2007). Dans la cellule, l'ammonium étant une forme réduite de la forme nitrate, due à l'action de réductases, l'azote est assimilé plus efficacement

sous sa forme ammonium (Kazbar, 2018; Payne, 1973). Cependant, toutes les espèces ne sont pas capables d'absorber l'ammonium. Un apport en azote sous forme ammonium acidifie le milieu alors qu'un apport en nitrate augmente le pH. L'azote intervient principalement dans la synthèse des protéines fonctionnelles et structurales. Les carences en azote sont souvent utilisées pour induire des métabolismes particuliers pour la formation de lipides ou de sucres (Antal, 2018; Park *et al.*, 2015).

1.4.2.3 Le phosphore

Le phosphore représente moins d'1 % de la matière sèche. Cependant il est essentiel, entre autres, pour le transport de l'énergie sous forme d'ATP et pour la biosynthèse de l'ADN. Il est principalement assimilé sous forme phosphate PO_4^{3-} . A noter qu'en pratique, les risques de précipitation, notamment avec les ions carbonates, sont élevés et il devient alors non assimilable par les cellules (Grobbelaar, 2007).

1.4.2.4 Les microéléments.

Les microéléments représentent moins d'1 % de la composition micro-algale. Ils sont présents en quantités variables dans les milieux naturels et doivent être ajoutés en milieux artificiels. Il s'agit entre autres du magnésium, du fer, du manganèse, du cuivre, du cobalt, du zinc et du bore. Ils peuvent par exemple être utiles pour leur propriétés d'oxydo-réduction en tant que co-facteurs lors de réactions enzymatiques ou être indispensables à la synthèse de composés (Grobbelaar, 2007; Hu, 2007a).

1.4.2.5 Obtention d'un milieu non limitant

Réaliser l'analyse élémentaire d'une micro-algue permet de connaître ses besoins en macroéléments. En effet, l'établissement de l'équation stœchiométrique permet de formuler le milieu afin d'obtenir la concentration en biomasse désirée. Les concentrations en macroéléments peuvent ensuite être validées par chromatographie ionique dans la culture. Concernant les microéléments, des essais de cultures sont nécessaires pour déterminer leurs concentrations optimales. La formulation d'un milieu de culture non limitant est une condition *sine qua non* pour l'obtention d'un régime uniquement photolimité (Busnel, 2018; Nghiem-xuan, 2019).

1.4.3 Le pH.

En fonction de leur habitat naturel, toutes les espèces de micro-algues ont un pH optimal. Alors que le pH optimal de *C. vulgaris* est situé entre 7,5 et 8,0, celui de *Arthrospira platensis* est situé entre 9,5 et 9,8 (Hu, 2007b; Rachlin et Grosso, 1991).

Par consommation du CO₂, en réalisant la photosynthèse, les organismes photosynthétiques rendent le milieu plus basique. Un apport en CO₂ permet de réguler le pH (Kaplan *et al.*, 1986). Par ailleurs, comme vu dans la partie 1.4.2.2, la source d'azote joue également un rôle sur le pH.

Un pH élevé favorise la précipitation de certains sels du milieu, en particulier les ions calcium, magnésium ou phosphates lorsqu'ils sont présents en grande quantité, ce qui peut entraîner la floculation de la biomasse (Vandamme *et al.*, 2012).

1.4.4 La température

Cultiver des micro-algues à leur température optimale est une des conditions pour obtenir une productivité maximale. En effet, une température non optimale affecte les réactions métaboliques, les vitesses de transport dans la cellule et les régulations. En présence de stress lumineux, une faible température inhibe la synthèse de nouvelles protéines D1 pour la réparation du photosystème II et donc accentue la perte de productivité due à la photoinhibition (Murata *et al.*, 2007). Une forte température, quant à elle, entraîne une dégradation des protéines et une augmentation du stress oxydatif, le tout pouvant mener à la mort cellulaire (Serra-Maia *et al.*, 2016).

Cependant, les espèces de microalgues n'ont pas toutes les mêmes températures optimales. Les températures optimales des espèces mésophiles sont situées entre 20 °C et 25 °C (Ras *et al.*, 2013). Les espèces psychrophiles, comme *Chlamydomonas nivalis*, ont des températures optimales inférieures à 15 °C et les espèces thermophiles, comme *Synechococcus elongatus* ont des températures optimales supérieures à 50 °C. On parle d'espèces hyperthermophiles lorsque leurs températures optimales sont supérieures à 80 °C (Varshney *et al.*, 2015).

Chlorella vulgaris est une espèce mésophile qui a une température optimale de croissance autour de 25 °C (Serra-Maia *et al.*, 2016).

En photobioréacteur solaire, la température est un paramètre particulièrement difficile à contrôler du fait de l'effet de serre qui intervient. Cependant, plusieurs modèles thermiques ont été développés afin de prédire la température des cultures de micro-algues pour ensuite optimiser la régulation thermique (Béchet *et al.*, 2011; Goetz *et al.*, 2011; Pruvost *et al.*, 2019).

1.4.5 Le dioxygène dissous

En réalisant la photosynthèse, les micro-algues produisent du dioxygène et augmentent la concentration en dioxygène dissous dans leur milieu. Ces concentrations varient d'une géométrie de PBR à l'autre. Comparées aux concentrations maximales en dioxygène dissous

généralement obtenues en bassins ouverts, celles observées en PBR clos tubulaires sont deux fois plus élevées du fait du confinement. Cela dépend du transfert de masse gaz-liquide au sein du réacteur (Weissman *et al.*, 1988). En PBR clos, des concentrations allant jusqu'à 80 mg L⁻¹, soit plus de 1000 % de saturation de l'air peuvent être observées (Richmond, 2013).

Or de fortes concentrations en dioxygène ont des impacts négatifs sur la productivité des micro-algues. Chez *C. vulgaris*, une perte de productivité est observée à partir de 10 mg L⁻¹ en dioxygène dissous et lorsque la concentration en dioxygène dissous est égale à 20 mg L⁻¹, la perte de productivité s'élève à 50 % (Todisco, 2019).

En présence d'une forte concentration en dioxygène dissous, des mécanismes alternatifs à la photosynthèse se mettent en place. En effet, de nombreuses études montrent que dans ces conditions, le ratio CO₂/O₂ diminue ce qui favorise des phénomènes de photorespiration (Kliphuis, Martens, *et al.*, 2011; Raso *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2013). Chez *C. vulgaris*, la perte de productivité en présence d'une forte concentration en dioxygène dissous a aussi été expliquée par une augmentation de l'activité respiratoire (Kazbar *et al.*, 2019).

Afin de diminuer la concentration en dioxygène dissous, il est possible d'augmenter l'aération de la culture à l'aide par exemple d'un bullage à l'azote. Cependant une trop forte aération n'a pas pour seule conséquence la diminution de la concentration en O₂ mais également la diminution de la concentration en CO₂, nécessaire à la fois à la croissance des micro-algues et à la régulation du pH. C'est pourquoi des régulations combinées du pH et de l'oxygène dissous sont parfois mises en place en PBR (Titica *et al.*, 2018).

1.5 Ingénierie des PBRs

1.5.1 Mode de fonctionnement des PBRs

Différents modes de fonctionnement peuvent être appliqués aux PBRs (Lee et Shen, 2007).

En mode batch, tous les nutriments sont apportés en début de culture aux micro-algues. Seuls les gaz comme le CO₂ sont apportés au cours de la culture. En batch, la concentration cellulaire augmente jusqu'à ce qu'une limitation en nutriments ou en lumière apparaisse.

Le mode de fonctionnement opposé est le mode continu. Dans ce cas, du milieu frais est continuellement apporté aux micro-algues et parallèlement, la culture est récoltée. Le débit d'apport en milieu frais est supposé égal au débit de récolte. De ce fait, le volume de culture est constant. Il est possible de définir un taux de dilution, noté D (en h⁻¹), correspondant au ratio entre le débit de renouvellement de milieu et le volume de culture. Lors de ce mode de fonctionnement, en théorie, les cellules se divisent en permanence. La concentration devient

constante et un état stationnaire est obtenu lorsque la vitesse spécifique de croissance des cellules est égale à D . Le temps de séjour des micro-algues dans le réacteur correspond à l'inverse de D et est noté τ_p . Deux modes continus existent ; le mode chemostat et le mode turbidostat. En mode chemostat, le taux de dilution est constant. Le mode turbidostat est une amélioration du mode chémostat. Il vise à maintenir une concentration en biomasse constante par ajustement du taux de dilution. Pour cela, une boucle de retro contrôle est appliquée entre la mesure de la concentration en biomasse et l'alimentation en milieu.

Un mode de fonctionnement intermédiaire entre le mode batch et le mode continu existe. Il s'agit du semi-continu. Lors de ce mode, le milieu frais est ajouté en continu ou de manière intermittente et la culture est récoltée périodiquement. Seul un état quasi stationnaire peut ainsi être atteint.

1.5.2 Productivité des systèmes de culture

En mode batch, la productivité volumique P_X (en $\text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$) est donnée par :

$$P_X = \frac{C_{X_{\text{finale}}} - C_{X_{\text{initiale}}}}{T_{\text{final}} - T_{\text{initial}}}, \quad (1-21)$$

avec $C_{X_{\text{finale}}}$ la concentration en biomasse (en kg m^{-3}) au temps T_{final} (en h) et $C_{X_{\text{initiale}}}$ la concentration en biomasse (en kg m^{-3}) au temps T_{initial} (en h).

En mode continu, lorsque l'état stationnaire est atteint, P_X est fonction de la concentration C_X dans le PBR et du taux de dilution D ou du temps de passage τ_p :

$$P_X = D \times C_X = \frac{C_X}{\tau_p}. \quad (1-22)$$

Le ratio entre la surface éclairée S_{light} (en m^2) et le volume du réacteur V_{PBR} (en m^3), aussi appelé surface spécifique et notée a_s , est un paramètre important pour le design d'un PBR afin d'optimiser la productivité volumique. La plupart du temps, plus cette surface spécifique est élevée, plus la concentration cellulaire est importante et plus la productivité volumique obtenue est grande (Tredici, 2007).

Ainsi, afin de comparer différentes géométries de PBRs n'ayant pas la même surface spécifique, la productivité peut être ramenée à la surface de captation de lumière S_{light} . Il s'agit alors d'une productivité surfacique, notée S_X (en $\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$) et calculée comme suit :

$$S_X = \frac{P_X}{a_s} = P_X \frac{V_R}{S_{\text{light}}}. \quad (1-23)$$

Dans le cas d'un réacteur plan, la surface spécifique a_s augmente lorsque l'épaisseur L (en m) du PBR diminue.

Dans ce cas, a_s est déterminée de la manière suivante :

$$a_s = \frac{S_{light}}{V_{PBR}} = \frac{1}{L}. \quad (1-24)$$

1.5.3 Modèle cinétique de croissance des micro-algues

La vitesse volumique de production de biomasse r_X (en $\text{kg}_{CX} \text{ m}^{-3} \text{ s}^{-1}$) peut être déterminée à partir de la vitesse spécifique de production ou de consommation de dioxygène notée J_{O_2} (en $\text{mol}_{O_2} \text{ kg}_{CX}^{-1} \text{ s}^{-1}$). En effet une relation stœchiométrique relie ces deux valeurs :

$$r_X = \frac{J_{O_2} C_X M_X}{v_{O_2-X}}, \quad (1-25)$$

avec M_X la masse C-molaire de la biomasse et v_{O_2-X} le rapport stœchiométrique entre production de dioxygène et production de biomasse.

J_{O_2} peut être relié à la vitesse spécifique d'absorption de photons A (Cornet et Dussap, 2009). Afin de représenter la croissance des micro-algues, il est nécessaire d'introduire un terme de respiration à la lumière, en particulier lorsqu'une zone sombre apparaît dans le PBR (Cogne *et al.*, 2011; Takache *et al.*, 2012). Ainsi, J_{O_2} peut être déterminé (Pruvost *et al.*, 2015; Pruvost *et al.*, 2016) :

$$J_{O_2} = \left[\rho_M \frac{K_A}{K_A + A} \overline{\varphi'}_{O_2} A - \frac{J_{NADH_2}}{v_{NADH_2-O_2}} \times \frac{K_r}{K_r + A} \right], \quad (1-26)$$

où ρ_M correspond au rendement maximal de la photosynthèse, K_A à la constante de demi-saturation de captation des photons par les unités photosynthétiques (en $\mu\text{mol}_{photons} \text{ kg}_{CX}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et $\overline{\varphi'}_{O_2}$ au rendement quantique molaire de production d' O_2 lors de la photosynthèse (en $\text{mol}_{O_2} \mu\text{mol}_{photons}^{-1}$). Dans le terme de respiration, J_{NADH_2} représente la vitesse spécifique de régénération du cofacteur dans la chaîne respiratoire (en $\text{mol}_{NADH_2} \text{ kg}_{CX}^{-1} \text{ s}^{-1}$) reliée au rapport stœchiométrique $v_{NADH_2-O_2}$ et K_r correspond à la constante décrivant l'inhibition du phénomène de respiration à la lumière. Le terme J_{O_2} est positif lorsque A (ou G) est supérieur à A_C (G_C) et négatif lorsque A (ou G) est inférieur à A_C (ou G_C).

K_r est déterminé par l'irradiance de compensation G_C et est dépendant de J_{NADH_2} (Takache *et al.*, 2012) :

$$K_r = \frac{G_C}{\frac{J_{NADH_2}}{v_{NADH_2-O_2} \rho_M \overline{\varphi'}_{O_2} E_a} \left[\frac{1}{G_C} + \frac{1}{K} \right] - 1}. \quad (1-27)$$

Les paramètres utilisés dans ce modèle sont intrinsèques à l'espèce. Ils ont été déterminés par Souliès *et al.* (2016) pour *C. vulgaris* (Tableau 1).

Par combinaison des équations (1-25) et (1-26), on voit que r_X résulte de la distribution de la lumière dans le PBR (voir 1.4.1.4) et est donc une valeur locale. Une vitesse volumétrique

moyenne de production de biomasse peut être déterminée en moyennant r_X sur le volume V_R du réacteur :

$$\langle r_X \rangle = \frac{1}{V_R} \iiint_{V_R} r_X dV. \quad (1-28)$$

Tableau 1 : Paramètres du modèle de croissance de *Chlorella vulgaris*.

Paramètre	Valeur	Unités
ρ_M	0,8	-
J_{NADH_2}	$1,8 \times 10^{-3}$	$\text{mol}_{NADH_2} \text{ kg}_{C_X}^{-1} \text{ s}^{-1}$
v_{O_2-X}	1,13	$\text{mol}_{O_2} \text{ mol}_{C_X}^{-1}$
$\overline{\phi'}_{O_2}$	$1,1 \times 10^{-7}$	$\text{mol}_{O_2} \text{ mol}_{\text{photons}}^{-1}$
M_X	0,024	$\text{kg}_{C_X} \text{ C-mol}^{-1}$
$v_{NADH_2-O_2}$	2	$\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ kg}_{C_X}^{-1} \text{ s}^{-1}$
K_{A_λ}	40 000	$\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ kg}_{C_X}^{-1} \text{ s}^{-1}$
K_{r_λ}	500	$\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ kg}_{C_X}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Dans le cas de cultures parfaitement agitées en mode continu, la concentration en biomasse C_X dépend de $\langle r_X \rangle$ et peut être obtenue par résolution de l'équation de bilan matière suivante :

$$\frac{dC_X}{dt} = \langle r_X \rangle - DC_X \quad (1-29)$$

1.6 Etude de la physiologie des micro-algues

1.6.1 Concentration en biomasse et teneurs en pigments

Afin de déterminer expérimentalement la productivité des cultures de micro-algues, il est nécessaire de déterminer les concentrations en biomasse et les concentrations en pigments. Les concentrations en biomasse peuvent être estimées par mesure de densité optique, par mesure de matière sèche ou par comptage cellulaire (Andersen, 2005). Les concentrations en pigments peuvent être mesurées par dosage spectrophotométrique ou par chromatographie après extraction (Jesus *et al.*, 2008; Ritchie, 2006; Wright, 1991).

1.6.2 Bilan sur les gaz

Comme la vitesse de production de biomasse est liée à la vitesse de production de dioxygène (Eq. 1-25), il est intéressant de mesurer la vitesse volumique d'évolution nette d' O_2 , notée r_{O_2} (en $\text{mol}_{O_2} \text{ m}^{-3} \text{ s}^{-1}$), dans le PBR. Pour cela, les débits gazeux en entrée, la concentration en oxygène dissous dans le PBR et les fractions gazeuses en sortie doivent être mesurés. Dans le

cas d'un PBR parfaitement agité, avec apport en N_2 et CO_2 , la vitesse volumétrique de production d'oxygène est obtenue comme suit (Urbain, 2017) :

$$r_{O_2} = \frac{G_{out} y_{O_2out}}{V_R} - D (C_{O_2in} - C_{O_2out}), \quad (1-30)$$

avec G_{out} le débit gazeux molaire en sortie de PBR, y_{O_2out} la fraction molaire en O_2 dans la phase gazeuse en sortie de PBR et C_{O_2out} et C_{O_2in} respectivement les concentrations en O_2 dans la phase liquide du PBR et dans le milieu en entrée de réacteur. G_{out} est déterminé par bilan gazeux sur le diazote qui est un gaz inerte :

$$G_{out} = \left(\frac{P Q_{in}}{RT} \right) \left(\frac{y_{N_2in}}{y_{N_2out}} \right) \quad (1-31)$$

P correspond à la pression totale dans le réacteur, Q_{in} au débit des gaz en entrée, R à la constante des gaz, T à la température et y_{N_2in} et y_{N_2out} sont respectivement les fractions molaires en N_2 en entrée et en sortie de réacteur.

1.6.3 La fluorescence in vivo de la chlorophylle a

1.6.3.1 *Principe général*

La fluorescence chlorophyllienne *in vivo* est une approche riche en informations, rapide et non invasive pour surveiller la performance photosynthétique et l'état d'acclimatation des cellules. Comme illustré sur la Figure 30, par l'action d'un photon, une molécule de chlorophylle peut se retrouver dans un état excité. Mais cet état est transitoire et plusieurs mécanismes permettent à la molécule de perdre son énergie excédentaire et de retrouver son état initial (Consalvey *et al.*, 2005) :

- elle peut être transmise à une molécule de chlorophylle avoisinante par résonance
- elle peut être utilisée pour initier la première réaction de la photosynthèse (délocalisation d'un électron, séparation de charge, ou encore photochimie)
- elle peut être évacuée sous forme de chaleur
- elle peut être évacuée sous forme d'un photon émis dans l'infra-rouge, c'est-à-dire de fluorescence.

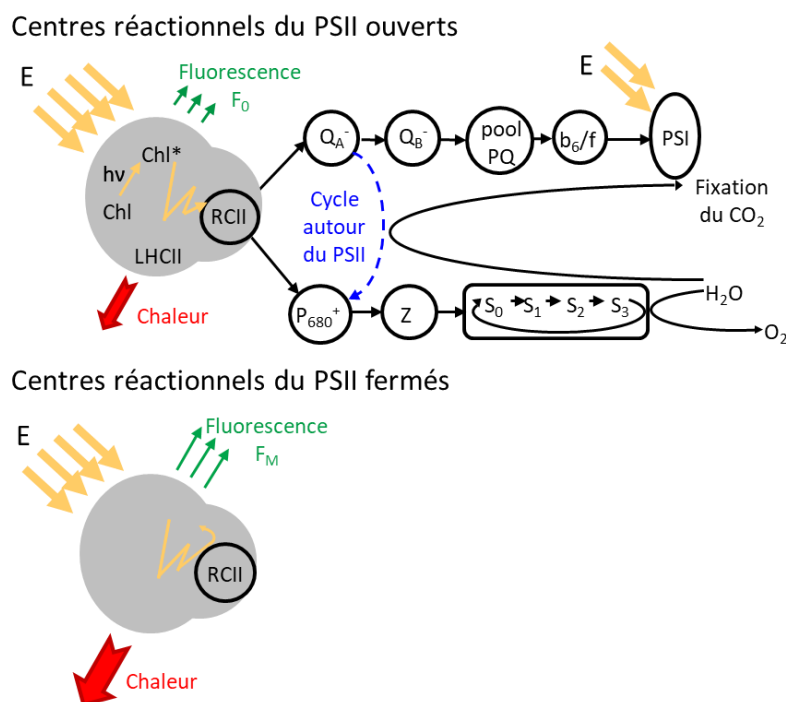


Figure 30 : Principe de la fluorescence chlorophyllienne (d'après Kolber and Falkowski, 1993).

Selon l'état d'acclimation des cellules, les probabilités de chaque mécanisme diffèrent (Huot et Babin, 2010). Lorsque les cellules sont acclimatées à l'obscurité, Q_A est oxydée donc les centres réactionnels sont ouverts, et l'énergie d'excitation peut être utilisée pour la photochimie. Dans ce cas-là, la probabilité pour que l'énergie soit réémise sous forme de fluorescence est environ égale à 0,02, la fluorescence émise est alors minimale (F_0). Mais lorsque les micro-algues sont exposées à une forte dose de lumière, Q_A est entièrement réduite, donc les centres réactionnels sont fermés, et la probabilité pour que l'énergie excédentaire soit réémise sous forme de fluorescence est maximale (F_m), pouvant atteindre 0,05. Entre ces deux états, une fluorescence F est émise et cette dernière augmente avec l'état de réduction de Q_A (Kolber et Falkowski, 1993). Lorsque les cellules sont acclimatées à la lumière, la fluorescence minimale est noté F_0' et la fluorescence maximale est notée F_m' . Cependant, du fait des nombreux mécanismes alternatifs à la photosynthèse (Partie 1.2.2), la fluorescence n'est en réalité pas exactement inversement proportionnelle à la photochimie.

1.6.3.2 Mesure de la fluorescence chlorophyllienne

Afin de mesurer la fluorescence *in vivo* de la chlorophylle *a*, plusieurs techniques sont disponibles, en particulier la technique Fast Repetition Rate (FRR) et la technique Pulse Amplitude Modulated (PAM). Ces deux techniques seront décrites puis comparées dans cette partie.

- La fluorescence de type FRR

La technique FRR mesure la fluorescence émise lors d'une succession de flashes induisant la fermeture progressive des centres réactionnels par réduction des Q_A (Figure 31). L'intensité, la durée des flashes et l'intervalle entre ces flashes peuvent être contrôlés (Gorbunov *et al.*, 1999; Kolber *et al.*, 1998).

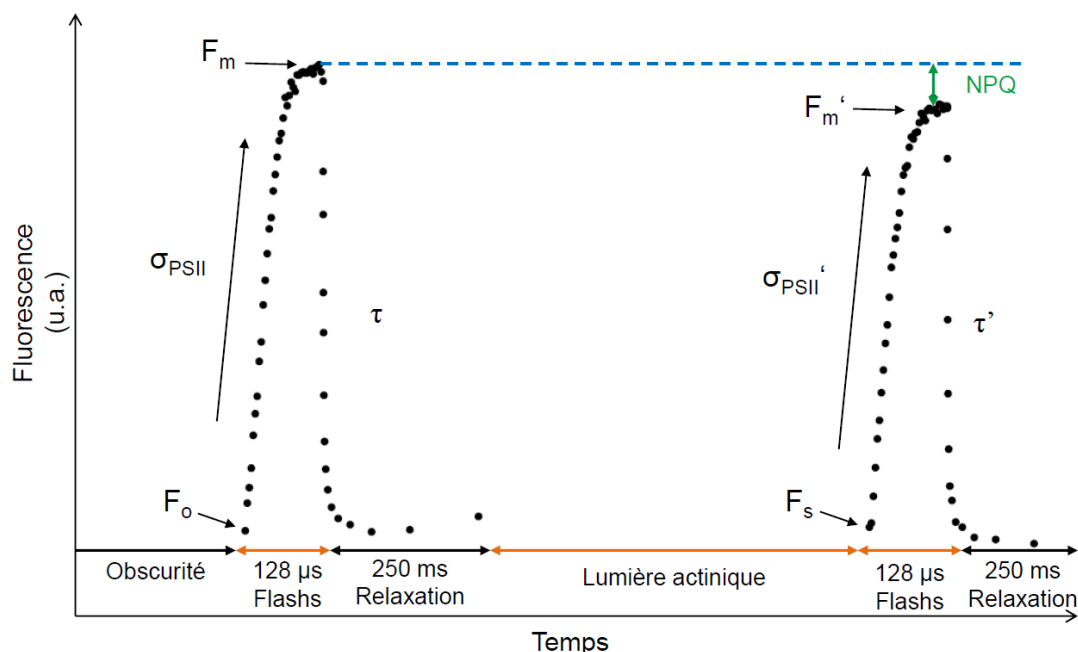


Figure 31 : Principe de la fluorescence de type FRR. Une succession de flashes permet la réduction successive des Q_A et augmente la fluorescence émise par les cellules photosynthétiques. Ces flashes peuvent être appliqués sur des cultures acclimatées à l'obscurité ou à une lumière actinique. La phase de relaxation est réalisée dans le noir. F_s correspond à la fluorescence minimale obtenue lors d'une exposition à une lumière actinique. Il est possible de mesurer une valeur de F_o' lorsqu'une deuxième succession de flashes est appliquée après 1 à 2 secondes d'obscurité. La différence entre F_m et F_m' correspond au quenching non photochimique de la fluorescence (NPQ).

La section efficace d'absorption pour la photochimie dans le PSII, σ_{PSII} , est un paramètre contrôlant la capture de l'énergie d'excitation ainsi que sa délivrance au PSII. Il peut être extrait par ajustement (fitting) de l'augmentation de la fluorescence entre F_o et F_m . Comparé à des cellules acclimatées à l'obscurité, en présence d'une lumière actinique, la valeur de σ_{PSII}' peut diminuer ou augmenter, du fait de la photoprotection qui se met en place. Ce paramètre est dépendant de l'espèce, de son état physiologique et de l'intensité lumineuse imposée à la culture.

Lorsque les PSII sont entièrement fermés du fait de l'excitation délivrée par σ_{PSII} , une phase d'obscurité permet la relaxation des centres réactionnels. Lors de cette phase, les électrons se dirigent vers de nouveaux accepteurs, permettant ainsi la réouverture de PSII pour la

photochimie. Le paramètre $1/\tau$ correspond à la constante de vitesse pour la ré-ouverture des centres réactionnels (Perkins *et al.*, 2018).

- La fluorescence de type PAM

Le principe de la technique PAM est représenté sur la Figure 32 (Consalvey *et al.*, 2005). Trois lumières différentes sont utilisées pour mesurer la fluorescence de la chlorophylle *a*. Une faible lumière modulée déclenche une émission synchrone de fluorescence tout en ayant une énergie trop faible pour permettre la photochimie (Schreiber *et al.*, 1986). Lorsque les cellules sont acclimatées à l'obscurité, cette fluorescence correspond à la fluorescence minimale F_o . Une lumière actinique permet l'induction du transport linéaire des électrons dans la chaîne photosynthétique. Une fluorescence F est alors mesurée. Enfin, un flash de lumière sature et ferme entièrement les centres réactionnels. La fluorescence alors émise est maximale (F_m ou F_m').

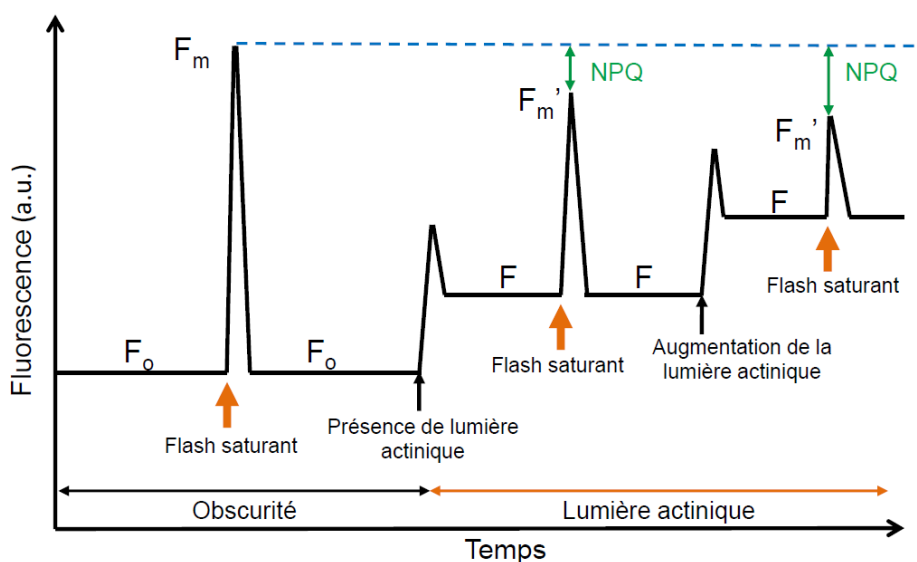


Figure 32 : Principe de la mesure de la fluorescence chlorophyllienne de type PAM (d'après (Consalvey *et al.*, 2005)).

Cette technique peut être utilisée pour réaliser des courbes de réponse photosynthétique à la lumière (LC ou courbes P/I ou P/E). Pour cela, des augmentations successives de l'intensité de la lumière actinique sont appliquées entre chaque flash saturant. A chaque palier de lumière, des paramètres photosynthétiques sont calculés. On parle de courbe rapide à la lumière lorsque chaque palier est égal ou inférieur à 60 secondes (Perkins *et al.*, 2010).

- Comparaison des deux techniques de mesure de la fluorescence chlorophyllienne

Les méthodes PAM et FRR ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Comparée à la technique PAM, un avantage majeur de la technique FRR est la mesure directe de la section

efficace d'absorption du PSII, σ_{PSII} . Cependant, un des avantages de la technique PAM est la possibilité de mesurer F_0 , du fait de la présence de la lumière modulée. La mesure de F_0 par la technique FRR étant en réalité une approximation.

Par ailleurs, alors que la technique FRR induit un unique événement de fermeture des centres réactionnels (Single Turnover, ST), la technique PAM en induit plusieurs (Multiple Turnover, MT). Et, par conséquent, la technique FRR réduit entièrement les Q_A mais a peu d'impact sur Q_B et PQ alors que la technique PAM réduit entièrement Q_A , Q_B et PQ (Suggett *et al.*, 2003). Ainsi, les niveaux de fluorescence atteints ne sont pas les mêmes entre ces deux techniques. La valeur de la fluorescence maximale atteinte après un flash de type MT peut être jusqu'à 50 % plus élevée que celle obtenue après un flash de type ST (Kromkamp et Forster, 2003).

1.6.3.3 Paramètres photosynthétiques issus de la fluorescence chlorophyllienne

A partir des mesures de fluorescence de la chlorophylle *a*, de nombreux paramètres photosynthétiques peuvent être déterminés. Un modèle basé sur les réactions compétitives d'ordre 1 de désexcitation au sein du PSII a été proposé par Klughammer et Schreiber (2008). Il est représenté sur la Figure 33. Il fait l'hypothèse d'un modèle de type lac, c'est-à-dire que tous les centres réactionnels ouverts sont en compétition dans le lit pigmentaire pour être excités et l'efficacité photochimique dépend du nombre de Q_A oxydées (Kramer *et al.*, 2004). Comme évoqué précédemment, 4 mécanismes sont possibles pour permettre à la molécule de chlorophylle de retrouver son état initial. Pour chaque réaction de désexcitation d'ordre 1, une constante de vitesse est définie avec k_P pour la réaction de photochimie, k_{NPQ} pour la dissipation régulée à travers le quenching non photochimique de la fluorescence (NPQ, voir partie 1.2.2.4), k_F pour la dissipation sous forme de fluorescence et k_D pour la dissipation sous forme de chaleur non régulée.

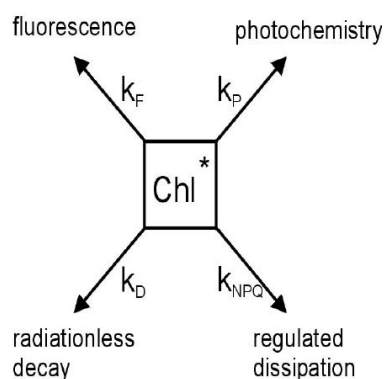


Figure 33 : Réactions compétitives d'ordre 1 de désexcitation dans le PSII (Klughammer et Schreiber, 2008).

En fonction de l'acclimatation des cellules k_p et k_{NPQ} varient. Quant à k_F et k_D , ils sont supposés constants.

Ainsi, le rendement quantique de dissipation par fluorescence est défini par :

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_D + k_{NPQ} + k_p} = \frac{k_F}{\sum k_i} \quad (1-32)$$

Lorsque les cellules sont acclimatées à l'obscurité, il n'y a pas de NPQ et k_{NPQ} est nul. Si un flash lumineux est appliqué, tous les centres réactionnels sont fermés et k_p est également nul. Dans ce cas, la fluorescence maximale F_m est atteinte et dans ces conditions, $\Phi_F(F_m)$ devient :

$$\Phi_F(F_m) = \frac{k_F}{k_F + k_D} ; \quad k_{NPQ} = 0 ; \quad k_p = 0. \quad (1-33)$$

Lorsqu'un flash lumineux est appliqué sur des cellules exposées à la lumière, une partie des centres réactionnels sont encore fermés mais le NPQ est présent. La fluorescence maximale alors atteinte diminue du fait du NPQ, elle est notée F_m' . Dans ce cas, $\Phi_F(F_m')$ devient :

$$\Phi_F(F_m') = \frac{k_F}{k_F + k_D + k_{NPQ}} ; \quad k_p = 0. \quad (1-34)$$

Des rendements quantiques complémentaires peuvent alors être définis, à savoir le rendement quantique pour la conversion photochimique de l'énergie dans le PSII (YPSII), le rendement quantique de dissipation régulée de l'énergie sous forme de chaleur (YNPQ) et le rendement quantique de dissipation non régulée de l'énergie (YNO). La somme de ces différents rendements est égale à 1. Ces rendements sont calculés comme suit :

$$YNO = \frac{k_D + k_F}{\sum k_i} = \frac{F}{F_m}, \quad (1-35)$$

$$YNPQ = \frac{k_{NPQ}}{\sum k_i} = \frac{F}{F_m'} - \frac{F}{F_m}, \quad (1-36)$$

$$YPSII = \frac{k_p}{\sum k_i} = \frac{F_m' - F}{F_m'}. \quad (1-37)$$

Le rendement quantique maximal pour la conversion photochimique de l'énergie dans le PSII ($YPSII_{max}$ ou F_v/F_m), obtenu pour une culture acclimatée à l'obscurité, est un paramètre souvent utilisé pour déterminer l'état physiologique des cellules (Borowitzka et Vonshak, 2017; Masojidek *et al.*, 2013). Le F_v/F_m diffère du YPSII dans le sens où ces deux paramètres ne représentent pas les mêmes procédés. Alors que le F_v/F_m dépend de l'état redox des premiers accepteurs du PSII et correspond à un procédé se déroulant essentiellement dans les antennes collectrices et les centres réactionnels, le YPSII est influencé par tout ce qui a un impact sur l'état de réduction du pool de PQ et sur le NPQ. Ainsi, le YPSII intègre des procédés en aval du PSII (Kromkamp et Forster, 2003). La valeur du F_v/F_m dépend de l'espèce et des conditions de cultures. Tout facteur environnemental ayant un impact sur l'appareil photosynthétique modifie ce rendement. Ce peut être le cas d'une exposition prolongée à une forte lumière,

induisant une photoinhibition, ou une limitation en nutriments. Chez les micro-algues vertes, un F_v/F_m inférieur à 0,7 signifie un stress cellulaire (Greene *et al.*, 1992; Malapascua *et al.*, 2014). Aussi, la valeur du F_v/F_m dépend de la technique utilisée pour le mesurer. Du fait de la différence de valeur de F_m entre technique PAM et technique FRR, le F_v/F_m est généralement plus élevé lorsqu'il est mesuré avec la technique PAM (Kromkamp et Forster, 2003).

D'autres paramètres photosynthétiques peuvent être calculés à partir de la fluorescence chlorophyllienne. Par exemple q_p indiquant la fraction des Q_A oxydés, et donc le degré d'ouverture des centres réactionnels est défini de la manière suivante (Kramer *et al.*, 2004) :

$$q_p = (F'_m - F_s)/(F'_m - F'_o). \quad (1-38)$$

Concernant la photoprotection, le NPQ résultant de l'équation de Stern-Volmer est plus souvent utilisée que le YNPQ. Ce dernier est calculé comme suit (Bilger et Björkman, 1990):

$$NPQ = \frac{F_m - F'_m}{F'_m}. \quad (1-39)$$

Un autre modèle est proposé par Serôdio et Lavaud (2011) pour le calcul du NPQ en fonction de l'énergie lumineuse. Ce modèle considère que le NPQ est principalement dû au cycle des xanthophylles couplé au gradient de pH qui opère dans l'espace transthylakoïdien, également référencé comme q_E (Muller *et al.*, 2001). Ce modèle s'appuie sur le modèle de Hill et est le suivant :

$$NPQ(E) = NPQ_m \frac{E^n}{E_{50}^n + E^n}, \quad (1-40)$$

avec NPQ_m , la valeur maximale du NPQ atteinte lors d'une courbe LC, E_{50} l'énergie lumineuse pour laquelle la valeur de NPQ est égale à la moitié de NPQ_m et n le coefficient de Hill. $NPQ(E)$ représente la fraction des xanthophylles dé-époxydées.

Afin de déterminer la capacité des micro-algues à générer du NPQ, E_{50} peut être comparé à E_k paramètre de saturation du transport d'électrons dans le PSII en présence de lumière. De même, NPQ_{E_k} , correspondant à la fraction de NPQ à l'approche de la saturation du transport des électrons, peut être calculé de la sorte :

$$NPQ_{E_k} = \frac{NPQ(E_k)}{NPQ_m}. \quad (1-41)$$

1.6.3.4 Utilisation de la fluorescence chlorophyllienne pour estimer la productivité des micro-algues

Les paramètres photosynthétiques obtenus à partir des mesures de la fluorescence de la chlorophylle *a* peuvent être utilisés pour calculer la vitesse de transfert des électrons à travers le photosystème II (ETR_{PSII}).

Lorsque la mesure de fluorescence de type PAM est utilisée, il est nécessaire de connaître la section optique d'absorption des cellules, a^* pour calculer l' $ETR_{PSII(MT)}$ (Kromkamp et Forster, 2003) :

$$ETR_{PSII(MT)} = a^* \times 0,5 \times YPSII \times E. \quad (1-42)$$

Le paramètre a^* peut être mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre avec sphère d'intégration (Tassan et Ferrari, 1998). L'utilisation de cette formule suppose que 50 % des photons absorbés le sont par le PSI et que 50 % sont absorbés par le PSII. Ainsi le produit de cette proportion et de a^* correspond à la section optique d'absorption du PSII, a^*_{PSII} . Cependant, la section efficace d'absorption du PSII par rapport au PSI peut varier selon les espèces et les conditions d'illumination du fait de la photoacclimatation. C'est pourquoi, connaissant a^*_{PSII} et le nombre de PSII par mg de chlorophylle a , n_{PSII} , l' ETR peut être calculé de manière plus précise comme suit :

$$ETR_{PSII(MT)} = a^*_{PSII} \times n_{PSII} \times YPSII \times E. \quad (1-43)$$

Lorsque a^*_{PSII} , n'est pas connu, un transport relatif des électrons (rETR) est souvent calculé de la façon suivante (Perkins *et al.*, 2010) :

$$rETR = YPSII \times E. \quad (1-44)$$

Le rETR peut être calculé à chaque palier de lumière d'une courbe LC. Ainsi, la courbe obtenue correspond à la courbe P/I représentée en Figure 199 et les coefficients α , β et E_k peuvent être obtenus de la même façon. Cependant, du fait de la grande variation de a^*_{PSII} , il est impossible de comparer le rETR entre deux conditions de culture ou espèces différentes.

Comme évoqué précédemment, un des avantages de la technique FRR est la mesure directe de la section efficace d'absorption du PSII, σ_{PSII} . Ce paramètre correspond au produit de a^*_{PSII} et du rendement maximal de la photochimie pour des cellules acclimatées à la lumière F_v'/F_m' (Kolber *et al.*, 1998). Ainsi, l' ETR_{PSII} peut être calculé de la manière suivante (Suggett *et al.*, 2010) :

$$ETR_{PSII(ST)} = \frac{\sigma_{PSII}}{F_v'/F_m'} \times YPSII \times E. \quad (1-45)$$

Il est également possible d'utiliser la fraction des centres réactionnels ouverts, q_P , afin de calculer l' ETR_{PSII} qui devient alors (Perkins *et al.*, 2010) :

$$ETR_{PSII(ST)} = \sigma_{PSII} \times n_{PSII} \times q_P \times E. \quad (1-46)$$

Du fait des différences mentionnées dans le paragraphe 1.6.3.2 entre la technique PAM et la technique FRR, pour une même irradiance, l' $ETR_{PSII(MT)}$ et l' $ETR_{PSII(ST)}$ peuvent avoir des valeurs différentes (Kromkamp et Forster, 2003).

A partir des mesures de fluorescence de la chlorophylle *a*, il est également possible d'estimer la productivité en oxygène ($P_{O_2}^B$, en $\text{mol}_{O_2} (\text{g Chl } a)^{-1} \text{ temps}^{-1}$). Pour cela, il est nécessaire de connaître le rendement quantique de production d'oxygène dans le PSII (Φ_e , en $\text{mol}_{O_2} (\text{mol}_e)^{-1}$). Lorsqu'à faible irradiance, q_P est égal à 1, 4 transferts d'électrons sont nécessaires pour générer une molécule d' O_2 , et donc Φ_e est égal à 0,25. Cependant si la vitesse de la première réaction de photochimie dépasse la constante de vitesse pour la ré-ouverture des centres réactionnels ($1/\tau$), certains électrons transférés à Q_A sont perdus du fait de l'indisponibilité des accepteurs d'électrons. Dans ce cas, le rendement Φ_e diminue. Cela s'exprime de la manière suivante (Kolber et Falkowski, 1993) :

$$\begin{aligned} \Phi_e &= 0,25 & \text{si } E \times \sigma_{PSII} \times q_P \leq 1/\tau, \\ \Phi_e &= 0,25 / (E \times \sigma_{PSII} \times q_P \times \tau) & \text{si } E \times \sigma_{PSII} \times q_P > 1/\tau. \end{aligned} \quad (1-47)$$

Connaissant ce rendement, il est alors possible de relier la productivité en oxygène aux paramètres photosynthétiques (Kolber and Falkowski, 1993) :

$$P_{O_2}^B = \sigma_{PSII} \times \Phi_{RC} \times q_P \times \Phi_e \times f \times n_{PSII} \times E = ETR_{PSII(ST)} \times f \times \Phi_e, \quad (1-48)$$

avec Φ_{RC} , le rendement quantique de la photochimie dans le PSII égal à 1 et f , la fraction de PSII actifs. Cependant d'après Kromkamp et Forster (2003), f peut être retirée de l'équation car l'efficacité de la séparation de charges est déjà prise en compte dans σ_{PSII} .

Dans le cas où σ_{PSII} ne peut pas être mesuré, il peut être remplacé par le produit de a^*_{PSII} et de F_v'/F_m' . Or, Y_{PSII} correspond lui-même au produit de F_v'/F_m' et de q_P . Ainsi l'Eq. 1-48 devient (Kromkamp et Forster, 2003; Suggett *et al.*, 2003) :

$$P_{O_2}^B = a^*_{PSII} \times Y_{PSII} \times \Phi_e \times n_{PSII} \times E = ETR_{PSII(MT)} \times \Phi_e. \quad (1-49)$$

D'après Wagner *et al.* (2006), si ces productivités en oxygène $P_{O_2}^B$, calculées à partir de la vitesse du transfert des électrons à travers le PSII, sont comparées à des productivités en oxygène mesurées à l'aide d'une électrode de Clark, un décalage est observé (Figure 34). Cela est principalement dû aux cycles alternatifs de transport des électrons se produisant en présence d'une forte irradiance (voir partie 1.2.2.4). Ce décalage est d'autant plus important que l'énergie lumineuse apportée aux cellules est élevée.

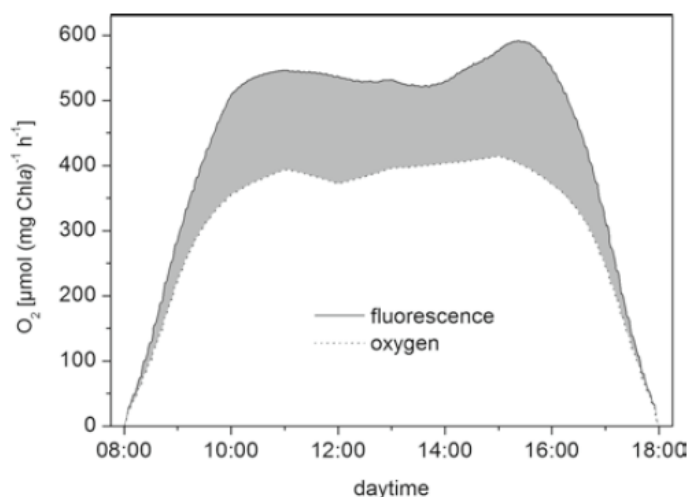


Figure 34 : Comparaison de la productivité en oxygène mesurée par fluorescence de la chlorophylle *a* et par électrode de Clark chez *Phaeodactylum tricornutum* lors d'une culture en turbidostat en présence d'une lumière sinusoïdale (Ralph *et al.*, 2010).

Afin de suivre l'évolution de cultures de micro-algues, il est possible d'utiliser la mesure en ligne de la fluorescence de la chlorophylle *a* (Malapascua *et al.*, 2014). En particulier, le YPSII mesuré en ligne permet de connaître l'état de stress d'une culture.

1.7 Conclusions et objectifs de l'étude

Cette recherche bibliographique a mis en évidence l'importance d'optimiser la production de micro-algues notamment pour des applications nécessitant une culture à grande échelle. Or, un des paramètres clés de l'optimisation de ces cultures est l'efficacité de l'utilisation de la lumière qui, dans le cas de cultures solaires, présente de fortes fluctuations.

Par ailleurs, suite à un effort de recherche ces dernières années, des modèles cinétiques et des outils de caractérisation comme la fluorescence de la Chlorophylle *a* ont été développés permettant l'analyse des réponses biologiques des micro-algues à leur environnement.

L'objet de la présente étude est donc d'utiliser et de développer ces outils pour l'étude et le contrôle des réponses des micro-algues, en particulier de *C. vulgaris*, aux changements de lumière pouvant se produire en PBR solaire. L'étude portera à la fois sur la réponse à l'échelle de la cellule seule (Chapitre 2) et à l'échelle du photobioréacteur dans son ensemble (Chapitres 3, 4 et 5).

Chapitre 2. Accélération transitoire du transport des électrons chez *Chlorella vulgaris* lors de variations de lumière

Ce chapitre a été publié sous : “Bonnanfant, M., Jesus, B., Pruvost, J., Mouget, J.-L. and Campbell, D. A. (2019). Photosynthetic electron transport transients in *Chlorella vulgaris* under fluctuating light, *Algal Research*, 44, pp. 101713. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101713.”

Résumé:

Chlorella sp. est utilisée comme modèle pour l'étude de la photosynthèse chez les algues vertes et elle est également produite en photobioréacteurs (PBR) à l'échelle industrielle. Dans les PBRs, les cellules se déplacent à travers des gradients de lumière avec des vitesses déterminées par le dimensionnement du PBR, par la vitesse d'agitation, par la densité de culture et par l'intensité lumineuse incidente. Nous avons utilisé des mesures non invasives et rapides de fluorescence de la chlorophylle *a* pour montrer que *Chlorella vulgaris* tolérait des expositions de courte durée à une irradiance sursaturante, en accélérant de façon transitoire le transport des électrons à la sortie du photosystème II (PSII). Cette capacité n'a duré que 10 à 20 s, et des expositions plus longues à une telle irradiance ont eu un impact négatif sur la vitesse du transport des électrons, causé par un ralentissement de la sortie des électrons en aval du PSII, l'induction d'un « quenching » non photochimique et une photoinactivation nette du PSII. Les cellules précédemment acclimatées à une forte intensité lumineuse ont pu partiellement se rétablir, en 300-600 s, après l'exposition aux lumières sursaturantes. En revanche, les cellules précédemment acclimatées à une faible intensité lumineuse ont été impactées de manière plus durable. Ces mesures peuvent être utilisées *a posteriori* pour choisir les taux de dilution, les vitesses d'agitation et les régimes de lumière dans les PBR afin d'améliorer les productivités.

Photosynthetic electron transport transients in *Chlorella vulgaris* under fluctuating light.

Abstract:

Chlorella sp. is both an important model for green algal photosynthesis and is produced using industrial scale photobioreactors. In photobioreactors, cells travel through steep gradients of illumination at rates determined by photobioreactor design, mixing rates, culture density and surface irradiance levels. We used non-invasive, rapid fluorescence measures to show that *Chlorella vulgaris* tolerates short-term exposures to super-saturating irradiance by transiently accelerating electron transport away from Photosystem II. This capacity lasts for only 10-20 s, and longer exposures to supersaturating irradiance induced down-regulation of electron transport through slowing of down-stream electron sinks, induction of non-photochemical quenching and net Photosystem II photoinactivation. Cells previously acclimated to high growth light were able to partially recover from the down regulation within 300-600 s, but cells previously acclimated to low growth light suffered more sustained down-regulation after exposure to super-saturating light. These metrics can be used to guide and constrain culture density, mixing rate and irradiance regime decisions in photobioreactors.

2.1 Introduction

2.1.1 Photo-bioreactors and light environments.

Light conversion is a key aspect in the optimisation of microalgal cultures. For large scale applications, mass photoautotrophic production is necessary, usually in open ponds or in closed photobioreactors (PBR). Growth rate in these cultivation methods is limited by light, which most of the time, for mass cultures, is obtained from the sun (Richmond, 2008). In such solar cultures, cells experience light fluctuation dynamics across different time scales. Firstly, light fluctuations are driven on an hourly scale by diurnal cycles as sunlight at the surface of the photobioreactor, the photon flux density (PFD), changes during the day. These diel variations shift predictably with season and latitude (Le Borgne, 2011). Secondly, PFD is also impacted by weather and can be obstructed by clouds for less than minutes to hours (Duffie and Beckman, 2013). Furthermore, some fast light variations result from cell displacement due to mixing through the strong light gradient in dense cultures which steeply attenuate light with depth. In a few seconds, light can vary from near-dark to super-saturating level (Pruvost *et al.*, 2008a). Depending on the light and dark periods, these mixing cycles can lead to a better growth or can have a negative impact compared to continuous light (Graham *et al.*, 2017; Janssen *et al.*, 2001; Takache *et al.*, 2015; Vejrazka *et al.*, 2011). Finally, most microalgae culture systems include cell transits through unlit regions including pumps. Those designed dark fractions can represent more than 20 % of the nominally illuminated volume of the PBR, with residence times from seconds to several minutes. The impact of these dark regions can be quantitatively compared to the impact of L/D cycles (Kazbar, 2018).

2.1.2 Time dependencies in photosynthesis processes and mechanisms.

Upon light exposure, photons are absorbed by light harvesting complexes (Crofts and Wraight, 1983) which form an effective absorption cross-section serving Photosystem II (σ_{PSII}) or Photosystem I (σ_{PSI}). In PSII, photon energy is transmitted to the reaction centre chlorophyll *a*-protein that contains the primary electron donor P680. P680 is oxidised and an electron is transferred *via* pheophytin to the quinone acceptor quinone acceptor Q_A and then to the plastoquinone acceptor Q_B within 200 μs (Consalvey *et al.*, 2005).

Four such photochemical electron transfers result in a water molecule oxidized, with an O_2 and 4 protons released. These electrons from water are used to reduce the oxidized form of P680 within 1 μs . Reduced Q_B joins the plastoquinone pool (PQ pool) and becomes a plastoquinol PQH_2 . PQH_2 is re-oxidised by cytochrome *b6-f* within a life time, termed τ , between 2 and 15

ms (Sukenik *et al.*, 1987). Then, electrons pass through Photosystem I to carbon fixation or to other sinks, notably back to oxygen (Kolber and Falkowski, 1993).

Under high light some mechanisms pre-empt saturation of downstream electron transporters. For example there is an electron cycle around PSII, when the oxidized PQ pool decreases, through which about 15 % of the Q_A^- can be directly re-oxidized, without oxidising water (Prasil *et al.*, 1996). The water to water cycle is another alternative electron cycle (AEC) in which dioxygen (O_2) is photoreduced, *via* PSI, by the electrons originating from PSII, to re-form water, so that excess photons and electrons are dissipated. This path does not generate net reductant but may contribute to generating trans-membrane electrochemical gradient of protons (Asada, 2000; Valle *et al.*, 2014). Green microalgae are also able to modulate the allocation of excitation energy between PSII and PSI. This process, termed a state transition, operates over 5 to 20 minutes (Allen, 2003; Kargul and Barber, 2008). Beyond these mechanisms of photoprotection, Non Photochemical Quenching (NPQ) is probably the most important process that protects cells from excess light. In this regulated process, excess light energy which cannot be used for photosynthesis, is dissipated as heat. This process is induced in a timescale of seconds to a few minutes (Goss and Lepetit, 2015). However, when cells are exposed to a change in the irradiance level for a longer time, they change their pigment content through processes of photoacclimation over generational timescales (Dubinsky and Stambler, 2009). Finally, if the light energy capture outruns protective processes, then PSII photochemical damage can in turn outrun counteracting repair processes, leading to net photoinhibition. Nevertheless, in many taxa, rapid turnover of PSII protein subunits mediates PSII repair after photoinactivation (Kok, 1956; Nixon *et al.*, 2010).

2.1.3 σ_{PSII}' and $1/\tau'$ determine achieved Photosystem II electron transport

Chlorophyll fluorescence is an information rich, rapid and non-invasive approach to monitoring photosynthetic performance and acclimation state. Chlorophyll fluorescence-based estimators of PSII electron transport are founded upon incident irradiance (I), σ_{PSII}' , a parameter for the capture and delivery of excitation to PSII, and a counteracting parameter, $1/\tau'$, for the capacity to carry electrons away from the excited PSII (Huot and Babin, 2010). Both functional parameters show a genomically-determined range of short-term regulatory and longer-term acclimatory responses to the environment.

σ_{PSII} can be extracted from a fit of fluorescence rise from F_0 towards F_M in response to cumulative incident photons m^{-2} (Kolber *et al.*, 1998), applied by a train of flashlets in the widely used Fast Repetition & Relaxation fluorescence (FRRf) protocol (Kolber *et al.*, 1998).

Under illumination σ_{PSII}' can be down- or up-regulated through photoprotection mechanisms from levels observed in darkness (Xu *et al.*, 2018). Induction of regulatory responses to increasing light can provoke down-regulation of σ_{PSII}' , with evidence for thresholds for the progressive induction of NPQ down regulation, in response to the degree of closure of the PSII pool, to the length of time held above an induction threshold, and/or the influence of photoreceptor mediated signalling (Lepetit *et al.*, 2016; Valle *et al.*, 2014).

Once a PSII is closed by excitation delivered through σ_{PSII} , $1/\tau'$ acts to re-open PSII for further photochemistry. Note that $1/\tau'$ is estimated as a rate constant for re-opening of PSII after a single turnover saturating flash, which, because of AEC, does not imply that all the electrons leaving PSII are directed towards assimilatory biosynthesis. A variable fraction of photochemical electrons, dependent upon time and growth rate, is indeed retained in biomass (Felcmanová *et al.*, 2017; Halsey *et al.*, 2010; Halsey and Jones, 2015). Upon illumination $1/\tau'$ can accelerate or decelerate (Perkins *et al.*, 2018) depending upon physiological state and the illumination level. σ_{PSII}' and $1/\tau'$ show both short and longer term responses to changing irradiance (Falkowski and Owens, 1978; Perkins *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018), so that the resultant rate of electron transport through PSII, termed ETR_{PSII} , observed at a given irradiance can vary and may show hysteresis (Perkins *et al.*, 2006) depending upon the short- and longer-term history of the illuminated sample.

2.1.4 Chlorella vulgaris as a model and industrial organism

Chlorella vulgaris is a freshwater green microalgae, first described in 1890 by Beyerinck (Beyerinck, 1890). This species has been used as a model in many studies (Kok, 1956; Malapascua *et al.*, 2014; Serôdio *et al.*, 2017) and is also produced on large scales because of its nutritional benefits (Richmond, 2008).

Using the model green alga *Chlorella* we used non-sequential light curves (Perkins *et al.*, 2018; Perkins *et al.*, 2006) of different durations to investigate the interactive effects of light and time upon achieved electron transport rates, as mediated through up- and down- regulation of σ_{PSII}' and $1/\tau'$ extracted from FRRf measures. Such non-invasive measures are amenable to rapid, low-cost real time monitoring of bioreactor performance across mixing and irradiance regimes.

2.2 Material and methods

2.2.1 Culture protocol

Chlorella vulgaris CCAP 21119 was grown in a modified Bold's Basal Medium at 23 °C under 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (low light, LL) or 330 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high light, HL). Light in growth chambers was provided by warm white T8 fluorescent tubes and measured with a microspherical quantum sensor (Walz, Effeltrich, Germany). All cultures were grown in 250 mL Erlenmeyer flasks. The photoperiod started at 07:00 and stopped at 19:00 giving 12:12 L:D cycle. To track growth, chlorophyll fluorescence was measured at 680 nm with an excitation at 440 nm before and after dilutions in new fresh medium. Growth rate was estimated on the basis of change in chlorophyll fluorescence as:

$$\mu = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_0)}{\Delta t} \quad (2-1)$$

where N_t is the chlorophyll fluorescence emitted by the culture at time t and N_0 the fluorescence at time 0. Subculturing was every 2-3 days to maintain cells in exponential phase (Ni *et al.*, 2016).

2.2.2 Light treatment and Fast Repetition Rate fluorescence measurement

Depending on the culture concentration, dilutions were made into fresh medium prior to optical measurements. 2 mL of each culture were loaded into a 1 cm spectrophotometer cuvette. For each light treatment protocol a parallel sample with +inhibitor was prepared by adding 50 μL of 20 mM dithiothreitol (DTT) into the cuvette to inhibit the xanthophyll cycle (Bilger and Björkman, 1990) that mediates accumulation of much of the NPQ in green algae. For samples for treatments with cumulative light exposures of at least 30 min, a second sample +inhibitor was made by adding 20 μL of 50 g L^{-1} lincomycin (Bachmann *et al.*, 2004; Six *et al.*, 2007) stock solution in the cuvette to block the PSII repair cycle. Triplicates were made for each condition. The culture was mixed in the cuvette with a stir bar and maintained at 23 (± 1) °C. The culture was then dark acclimated for 15 min to allow action of the inhibitor, if any, and relaxation of the growth light acclimation state.

An FL3500 fluorometer Superhead (Photon Systems Instruments, Drasov, Czech Republic) was used to both apply light treatments and to measure the Chl *a* fluorescence using a Fast Repetition Rate fluorescence (FRRf) induction protocol (Kolber *et al.*, 1998; Laney, 2003) following previous works (Perkins *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018). Figure 35 presents schematic summaries of the measurement (Figure 35.A) and light treatment protocols (Figure 35.B, C and D) we applied to *C. vulgaris*. Figure 35.A shows a representative example of the double FRRf

protocol applied at each light step. At the end of each light period (Figure 35.B, C and D) a FRRf induction/relaxation flashlet series ($\{1.2 \mu\text{s flashlet} + 2 \mu\text{s darkness}\} \times 40 = 128 \mu\text{s}$, at $27527 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ of blue (455 nm) light) was applied on top of the actinic light, if any (Figure 35.A). These FRRf settings were sufficient to drive the samples to saturated maximum F_M level within 30 of 40 consecutive flashlets (Figure 35.A) (Perkins *et al.*, 2018). After the rapid train of 40 cumulatively saturating flashlets we then applied a further 15 flashlets logarithmically spaced over 250 ms. This allowed downstream electron transport time to progressively re-open the pool of PSII between each probe flashlet, thereby generating an negative exponential curve. Then a 2 s dark period intervened to allow PSII to fully re-open, and we applied a second FRRf induction/relaxation (Figure 35.A). We applied the protocol in a sequence of actinic light periods, ranging from 0 to $1490 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, as shown schematically in Figure 35.B, C and D. The duration of light periods was 10 s (Figure 35.B), 60 s (Figure 35.C) or 300 s (Figure 35.D), depending upon the protocol. Note that the three light treatment protocols plotted here in sequence across the X axes (Figure 35.B, C and D) were actually applied to separate culture samples to limit issues with progressive photoinhibition or acclimation. Nevertheless we chose the 10, 60 and 300 s treatment period durations so that each light treatment trajectory overlapped with the duration of the first steps of the next longest trajectory. Arrows (Figure 35.B, C and D) indicate the timing of applications of the FRRf measures during the light treatment protocols.

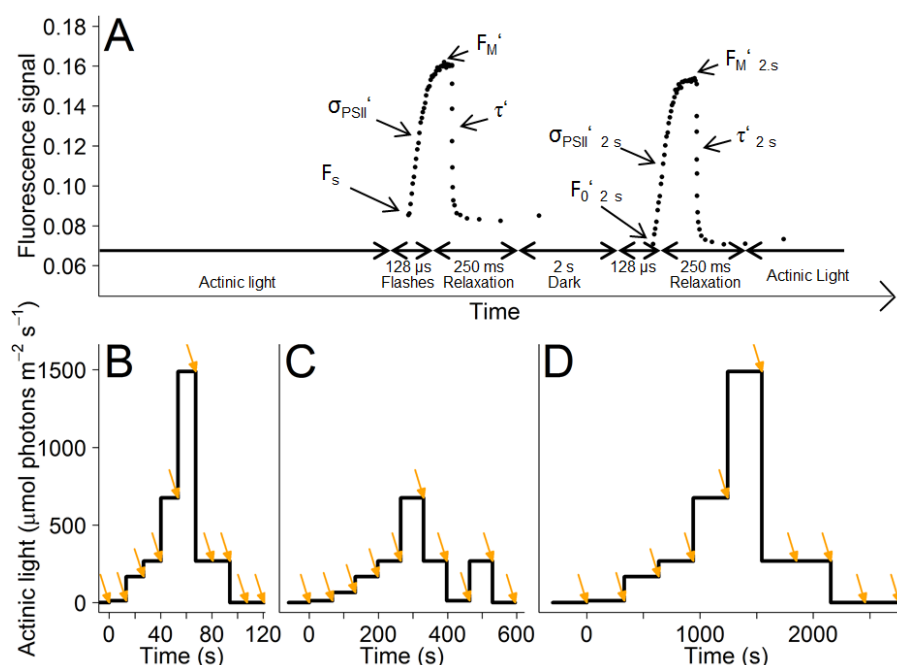


Figure 35 : Fluorescence measurement and light treatment protocols. 1A, FRRf protocol applied at each light step, with an induction/relaxation curve applied on top of actinic light, and then again after 2.5 s of darkness to allow re-opening of PSII. 1B, 10 s, 1C, 60 s and 1D, 300 s durations for light exposure periods in treatment protocols. Arrows indicate timing of applications of the FRRf measures during the light treatment protocols.

2.2.3 Fluorescence parameters

For each FRR induction and relaxation curve we exported the data from the FluorWin data capture software (Photon Systems Instruments, Drasov, Czech Republic). We used the psifluo package (Jesus *et al.*, 2018) running under the R statistical programming environment (R Core Team, 2017) to fit the fluorescence rise profile using a model (Kolber *et al.*, 1998) with four parameters:

- minimal fluorescence, F_o , before any closure provoked by the sequence of flashlets;
- maximal fluorescence, F_m , once all PSII are closed by the cumulative action of the sequence of flashlets;
- the effective absorption cross section for PSII photochemistry, σ_{PSII} ($A^2 PSII^{-1}$), which is based upon a target concept whereby incident photons are captured by the pigments serving PSII and thereby drive an increase in fluorescence; and
- the coefficient of excitonic connectivity ρ which measures the departure of the rise profile from a simple exponential function, and which is believed to reflect equilibration of excitation among PSII centres during the sequence of flashlets.

We thereby determined F_o , F_m , σ_{PSII} , ρ after the initial dark period. We then used the same measurement and fitting protocol to determine F_s , F_m' , σ_{PSII}' , ρ' for each actinic light period; and $F_o'_{2s}$, $F_m'_{2s}$, ρ'_{2s} , $\sigma_{PSII}'_{2s}$ following 2 s of darkness immediately after each actinic light period (Figure 1). We could then estimate variable fluorescence in the illuminated state, F_v' , as $F_m'_{2s} - F_o'_{2s}$. In parallel we used the psifluo package (Jesus *et al.*, 2018) to fit the re-opening curves with a single phase exponential model to estimate an overall lifetime for re-opening of PSII (Cao and Govindjee, 1990), τ , or τ' if measured immediately after illumination. The reciprocal $1/\tau'$ is then a rate constant for re-opening of the PSII pool following complete closure.

We estimated the quantum yield for PSII photochemistry under light acclimated conditions but with all PSII opened as:

$$F_v'/F_m'_{2s} = \frac{(F_m'_{2s} - F_o'_{2s})}{F_m'_{2s}}. \quad (2-2)$$

We estimated the yield (Genty *et al.*, 1989; Klughammer and Schreiber, 2008) of photochemical electron transport (YPSII) under actinic illumination as:

$$YPSII = \frac{(F_m' - F_s')}{F_m'}. \quad (2-3)$$

YPSII is arithmetically equivalent to F_v'/F_m' multiplied by the fraction of PSII remaining open under the given illumination (Eq. 2-7).

We estimated the yield of non-photochemical quenching (YNPQ) as:

$$\text{YNPQ} = F_s/F_m' - F_s/F_m, \quad (2-4)$$

and the yield of non-regulated excitation dissipation (YNO) as:

$$\text{YNO} = F_s/F_m. \quad (2-5)$$

In some cases in phytoplankton the maximum of F_m or F_m' is not found from measures taken in darkness, but rather from measures taken under, or just after, low to moderate light levels. We therefore followed Serôdio *et al.* (Serôdio *et al.*, 2005) and used the maximum value of F_m (F_m') attained for a given sample, not necessarily the value measured after initial dark acclimation, as our basis for estimation of YNPQ and YNO. This avoids confusing values for YNPQ or YNO when plotted vs. a series of light levels.

Electron transport rate was estimated as (Suggett *et al.*, 2009) :

$$\begin{aligned} \text{ETR}_{\text{PSII}} (\text{e PSII}^{-1} \text{ s}^{-1}) &= \frac{\sigma_{\text{PSII}}}{\frac{F_v}{F_m}} \times \text{YPSII} \times I \\ &\times (6.022 \times 10^{17} \text{ photons } \mu\text{mol}^{-1}) \\ &\times (1 \times 10^{-20} \text{ m}^2 \text{ A}^{-2}) \end{aligned} \quad (2-6)$$

Where I is actinic irradiance ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

σ_{PSII} convolutes both the absorption cross section for PSII, and an implicit quantum yield for conversion of absorbed excitation to photochemistry. In this formulation we use σ_{PSII} measured in darkness, which we divide by our metric of maximum quantum yield measured in darkness, F_v/F_m . This cancels the quantum yield implicit in σ_{PSII} , leaving us with an absorption cross section serving PSII in darkness. We then multiply by YPSII, the quantum yield for photochemistry under illumination, which as discussed above is arithmetically equivalent to the fraction of PSII still open under illumination (Eq. 2-7) multiplied by F_v'/F_m' . This apparently overly convoluted equation allows us to use σ_{PSII} and F_v/F_m reliably measured in darkness and YPSII, which can usually be reliably measured even under high actinic light. In contrast, although σ_{PSII}' can be estimated under actinic light the fitting routine for extraction of the parameters can become unreliable for FRRf induction curves obtained under high actinic light. We estimated the coefficient of photochemical quenching (q_P) as a metric of the fraction of open PSII centres derived from fluorescence levels (Kramer *et al.*, 2004):

$$\begin{aligned} q_P &= (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0') \\ q_P &= \frac{(F_m' - F_s')}{(F_m' - F_0')}; \end{aligned} \quad (2-7)$$

Alternately, a model can be used to estimate a conceptually equivalent metric of the fraction of PSII centres, and then ETR_{PSII} (Huot and Babin, 2010), solely from parameters derived from

the shape of a single fluorescence induction and relaxation profile, thereby avoiding use of absolute fluorescence levels, which can be technically challenging to estimate or compare across samples or instruments.

$$[PSII]_{open} \leftrightarrow [PSII]_{closed} \quad (2-8)$$

Under some steady state irradiance:

$$[PSII]_{open} \times I \times \sigma_{PSII}' = [PSII]_{closed} \times 1/\tau' \quad (2-9)$$

where I is the irradiance in photons $m^{-2} s^{-1}$, σ_{PSII}' has units of $m^2 \text{ quanta}^{-1}$, and $1/\tau'$ has units of s^{-1} .

Assuming that:

$$[PSII]_{open} + [PSII]_{closed} = [PSII]_{total} \quad (2-10)$$

We can then re-arrange Eq. 2-9 to:

$$[PSII]_{open}/[PSII]_{total} = \frac{1}{(1 + (\sigma_{PSII}' \times I \times \tau'))} = [1 - C] \quad (2-11)$$

where $[1-C]$ is the proportion of open PSII, a metric comparable to the more familiar q_p derived from steady state fluorescence levels (Figure Supp. 1), and where again I is the irradiance in photons $m^{-2} s^{-1}$, σ_{PSII}' has units of $m^2 \text{ quanta}^{-1}$, and $1/\tau'$ has units of s^{-1} .

The rate of electron transport through PSII (Hughes *et al.*, 2018; Huot and Babin, 2010; Suggett *et al.*, 2009) can then be estimated as:

$$ETR_{PSII} (e PSII^{-1} s^{-1}) = I \times \sigma_{PSII}' \times [1 - C] \quad (2-12)$$

Note that all of the parameters for Eq. 2-12 can be extracted from a single FRRf induction/relaxation profile applied at a given irradiance I , with a total measurement time of $\sim 1-2$ s, thereby eliminating any requirement for cross-comparison of metrics taken from different FRRf induction curves under different conditions. In Figure Supp. 2 we compare the ETR_{PSII} estimates from Eq. 2-6 and 2-12, showing that the equations display differential sensitivity to the presence of inhibitors.

2.2.4 Data analyses

The following R (R Core Team, 2017) packages were run under the RStudio (RStudio Team, 2018) environment for data analyses and presentation: *psifluo* (Jesus *et al.*, 2018), *MinPack.lm* (Elzhov *et al.*, 2016), *MASS* (Venables and Ripley, 2002), *nlstools* (Baty *et al.*, 2015), *ggplot2* (Wickham, 2009), *tidyverse* (Wickham, 2017), *ggpubr* (Kassambara, 2017), *grid* (R Core Team, 2017), *gridExtra* (Auguie, 2017) and *shape* (Soetaert, 2018).

2.3 Results and discussion

2.3.1 Electron transport rate light responses and hysteresis

Figure 36 shows ETR_{PSII} ($e^- PSII^{-1} s^{-1}$), estimated using Eq. 2-6, as a function of instantaneous actinic light level in *C. vulgaris* cultures. Arrows show the direction of increasing time of treatment; dashed lines show steps that follow the maximum applied actinic light, to emphasize hystereses of responses. *C. vulgaris* shows an acceleration of ETR_{PSII} under saturating light after brief (10-20 s) exposure to super-saturating light (Figure 36.A, B). This pattern holds true for cultures from both low light and from high light, although the effect is more marked for the low light cultures (Figure 36.A vs. 2.B). This acceleration is, however, only transient because exposure to 60-120 s of super-saturating light (Figure 36.C, D) leads to a small drop in light-saturated ETR_{PSII} , while more prolonged exposures for 300-600 s lead to a strong inhibition of ETR_{PSII} (Figure 36.E, F).

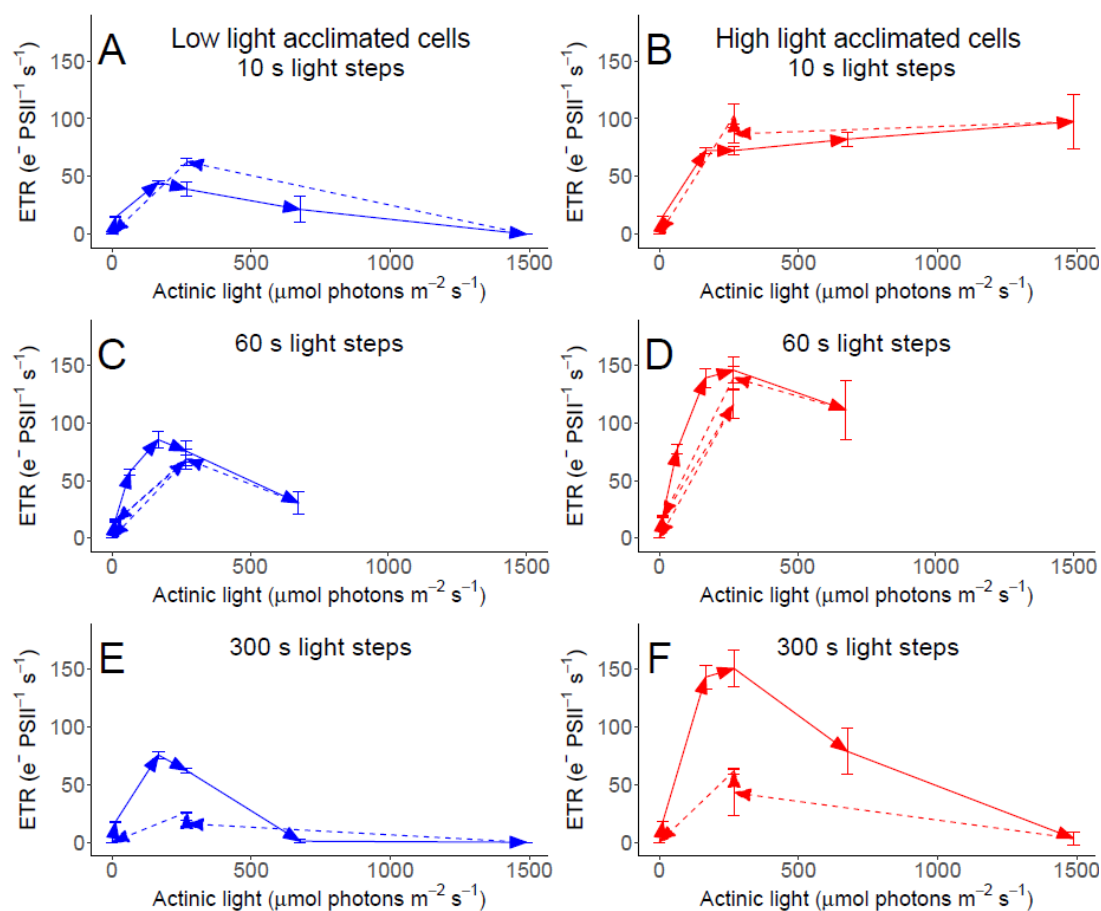


Figure 36 : ETR_{PSII} ($e^- PSII^{-1} s^{-1}$) as a function of instantaneous actinic light level in *C. vulgaris* cultures. Each light period lasted for 10 s (A, B), 60 s (C, D) or 300 s (E, F). Cultures were grown at 30 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ (low light, A, C, E) or 330 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ (high light, B, D, F). Arrows show direction of increasing time of treatment; dashed lines show light steps done after the maximum applied actinic light, to emphasize hystereses of response. Error bars represent standard deviation of three replicates. ETR_{PSII} was estimated according to Eq. 2-6.

At the level of ETR_{PSII} , *C. vulgaris* can thus exploit transient exposures to inhibitory super-saturating light by accelerating electron transport upon a return to saturating light levels. Longer super-saturating exposures, however, impose a sustained penalty upon return down to saturating light levels. We next sought to understand the mechanism(s) underlying these interactive responses to light and time.

2.3.2 Changes in Y_{PSII} driven by σ_{PSII}' and $1/\tau$ explain hystereses in ETR_{PSII} responses

The averaged ($n = 3$) ETR_{PSII} estimates presented in Figure 36 are based upon Eq. 2-6. For a given sample exposed to a given trajectory of light periods σ_{PSII} and F_v/F_m are constant inputs to the estimates of ETR_{PSII} . Therefore the dynamics and hystereses seen in Figure 36 derive from the light and time responses of Y_{PSII} within a replicate, compounded by any variations in σ_{PSII} and F_v/F_m among replicates. The patterns of Y_{PSII} as a function of instantaneous actinic light level in *C. vulgaris* cultures are illustrated in Figure 37. Note that Y_{PSII} was measured in the presence of actinic illumination.

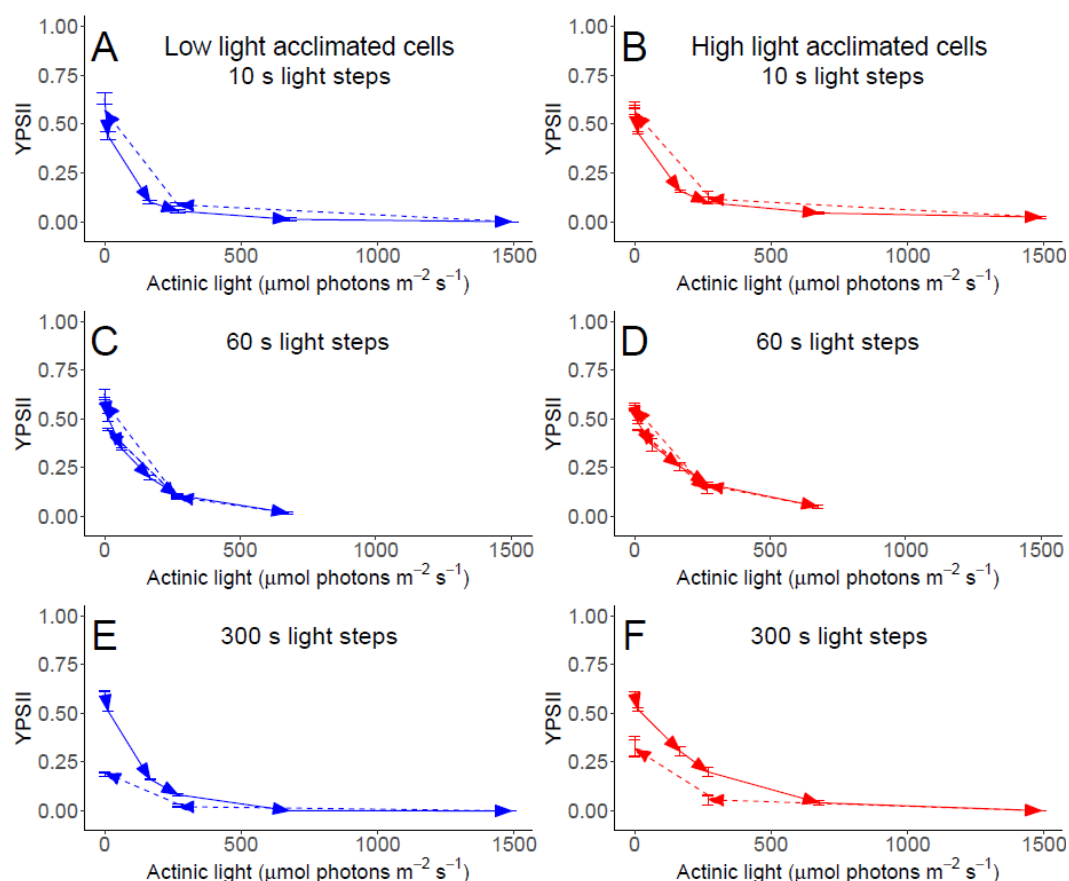


Figure 37 : Y_{PSII} quantum yield for PSII electron transport measured under actinic light levels in *C. vulgaris* cultures. Each light period lasted for 10 s (A, B), 60 s (C, D) or 300 s (E, F). Cultures were grown at $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (low light, A, C, E) or $330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high light, B,D,F). Arrows show direction of increasing time of treatment. Dashed lines show light steps done after the maximum applied actinic light to emphasize hystereses of response. Error bars represent standard deviation of three replicates.

As in Figure 36 we see a positive hysteresis with a small increase in YPSII after brief (10-20 s) of supersaturating light (Figure 37.A, B). This positive effect disappears with exposures of 60-120 s of supersaturating light (Figure 37.C, D), and reverses to a sustained inhibition of YPSII after 300-600 s exposure to supersaturating light (Figure 37.E, F).

YPSII is in turn an integrative measure of the quantum yield of electron transport through open PSII centres, encompassing both changes in the delivery of excitation to drive PSII photochemistry through $\sigma_{PSII}' \times I$, and changes in the re-opening of PSII after a photochemical event, which is determined by the down-stream capacity to remove photochemically generated electrons from PSII, $1/\tau'$. Therefore changes in YPSII are driven by changes in I (the X axes of Figure 37), but any hysteresis in the response of YPSII to changing light instead reflects changes in σ_{PSII}' , and/or $1/\tau'$ over the course of the light treatment protocol (Figure 35.B, C and D).

Figure 38 therefore shows $\sigma_{PSII}'_{2s}$ as a function of actinic light in *C. vulgaris* cultures. We used the $\sigma_{PSII}'_{2s}$ measures taken after 2 s of darkness, to allow re-opening of PSII to support consistently reliable estimates of $\sigma_{PSII}'_{2s}$ across the light protocol steps. Our estimates of σ_{PSII}' under actinic illumination were in some cases scattered (data not shown) because σ_{PSII}' derives from a fit of the change in variable fluorescence (Figure 35.A) and under actinic illumination the amplitude of remaining variable fluorescence can be small. The drawback of this approach is that over the 2 s dark re-opening period some fraction of non-photochemical quenching may also relax, leading to potential discrepancies from estimates of σ_{PSII}' taken under actinic light (Ni *et al.*, 2016). Induction of non-photochemical quenching mechanisms would be expected to cause a drop in $\sigma_{PSII}'_{2s}$ (Xu *et al.*, 2018). Instead, across our data we observed either no hystereses in $\sigma_{PSII}'_{2s}$ (Figure 38.A, F) or upward shifts in $\sigma_{PSII}'_{2s}$ (Figure 38.B,C, D, E) following transient exposures to super-saturating light, particularly in cells from high light growth after 10-120 s exposure to super-saturating irradiance (Figure 38.B,D). Thus, we found no evidence for down-regulation of $\sigma_{PSII}'_{2s}$ in response to transient exposures to super-saturating light up to 600 s duration, and in some cases we observed increases in $\sigma_{PSII}'_{2s}$.

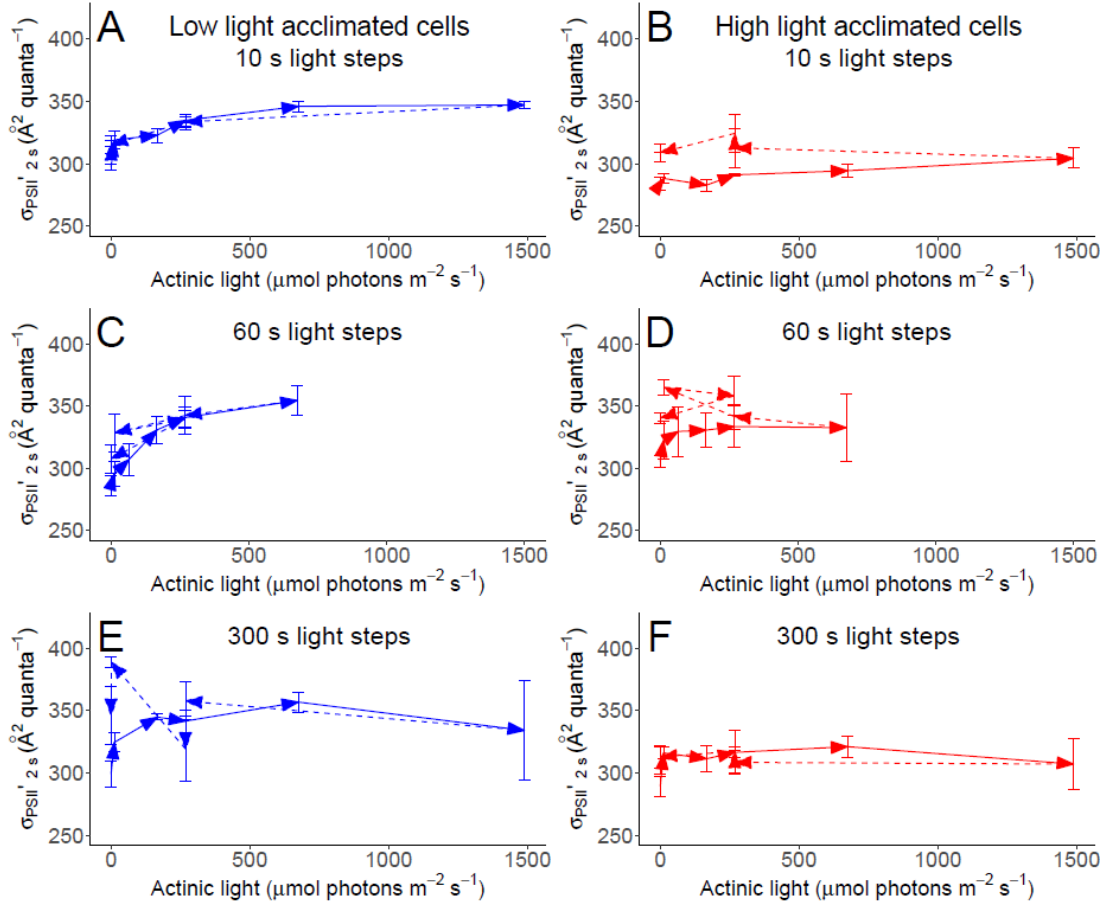


Figure 38 : σ_{PSII} effective absorption cross section for PSII measured after 2 s dark as a function of immediately preceding actinic light level in *C. vulgaris* cultures. Each light period lasted for 10 s (A, B), 60 s (C, D) or 300 s (E, F). Cultures were grown at 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (low light, A, C, E) or 330 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (high light, B, D, F). Arrows show direction of increasing time of treatment. Dashed lines show light steps done after the maximum applied actinic light to emphasize hysteresis of response. Error bars represent standard deviation of three replicates.

Increases in σ_{PSII} therefore contribute to some cases of acceleration in ETR_{PSII} in high light cells transiently exposed to super-saturating irradiance (compare Figure 36.B and Figure 38.B) but in the other cases changes in ETR_{PSII} are not explicable by changes in $\sigma_{\text{PSII}f\ 2\text{ s}}$ (Compare Figure 36.C, D, E and F with Figure 38.C, D, E and F).

Figure 39 shows the change in $1/\tau_{2\text{ s}}$, the rate constant for re-opening of PSII in *C. vulgaris* cultures after 2 s in darkness, as a function of the immediately preceding actinic light level. Now we have our final mechanistic contribution to the accelerations in ETR_{PSII} after transient exposures to super-saturating light (compare Figure 36.A, B with Figure 39.A, B). $1/\tau_{2\text{ s}}$ increases substantially after 10-20 s exposure to supersaturating light. After 60-120 s of exposure to supersaturating light $1/\tau_{2\text{ s}}$ shows scattered responses when cells return to saturating light. But after 300-600 s of exposure to supersaturating light $1/\tau_{2\text{ s}}$ clearly drops when cells return to saturating light. Thus the explanation for the transient acceleration of

ETR_{PSII} lies largely in a transient opening of electron sink(s) downstream of PSII, in response to super-saturating light.

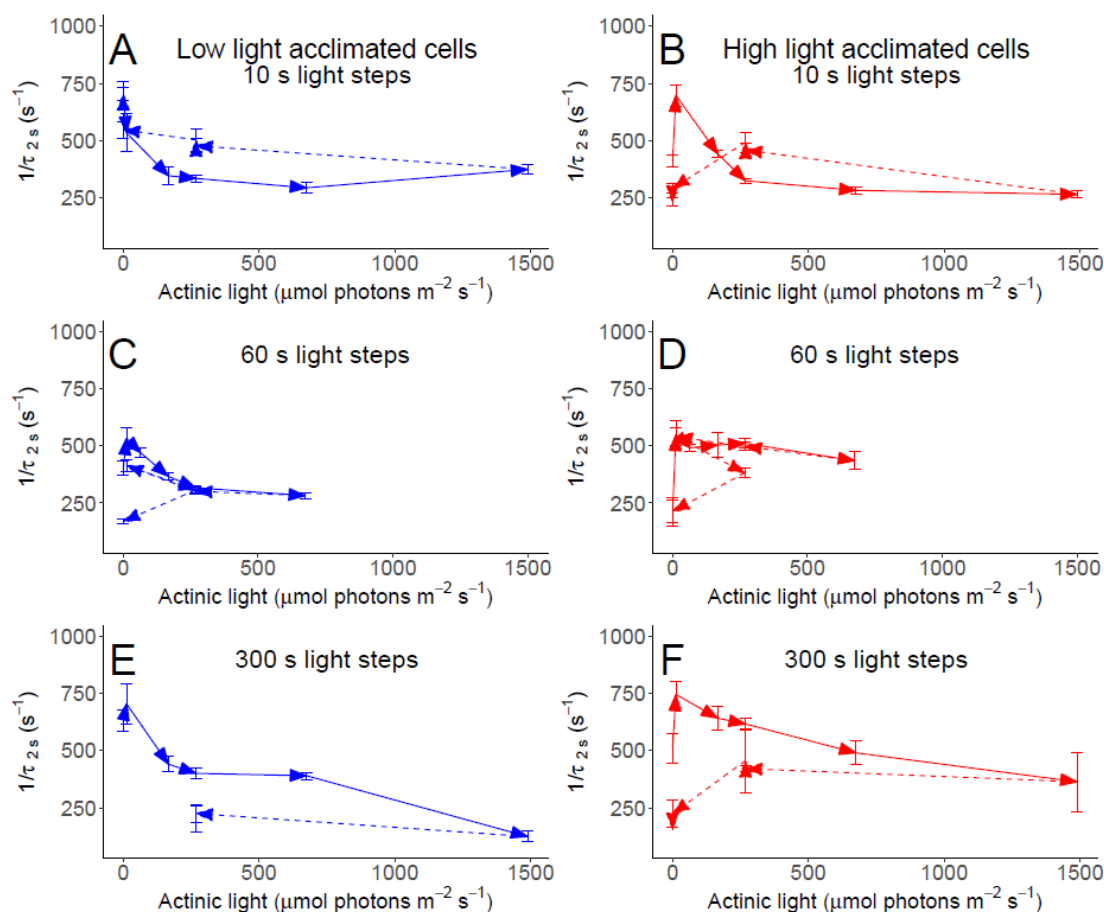


Figure 39 : $1/\tau$ rate constant for re-opening of PSII, measured after 2 s dark as a function of immediately preceding actinic light level in *C. vulgaris* cultures. Each light period lasted for 10 s (A, B), 60 s (C, D) or 300 s (E, F). Cultures were grown at $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (low light, A, C, E) or $330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high light, B, D, F). Arrows show direction of increasing time of treatment. Dashed lines show light steps done after the maximum applied actinic light to emphasize hysteresis of response. Error bars represent standard deviation of three replicates.

For *C. vulgaris* grown at both growth limiting ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figure 39.A, E and C) and growth-saturating ($330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figure 39.B, D and F) light, the response patterns of $1/\tau_{2s}$ are broadly similar, so the transient opening of electron sink(s) is consistent in cells from both of light acclimations.

To summarize these patterns Figure 40 shows responses of ETR_{PSII} ($e^- \text{PSII}^{-1} \text{s}^{-1}$) to actinic light level and duration of light exposure in *C. vulgaris* without and with DTT.

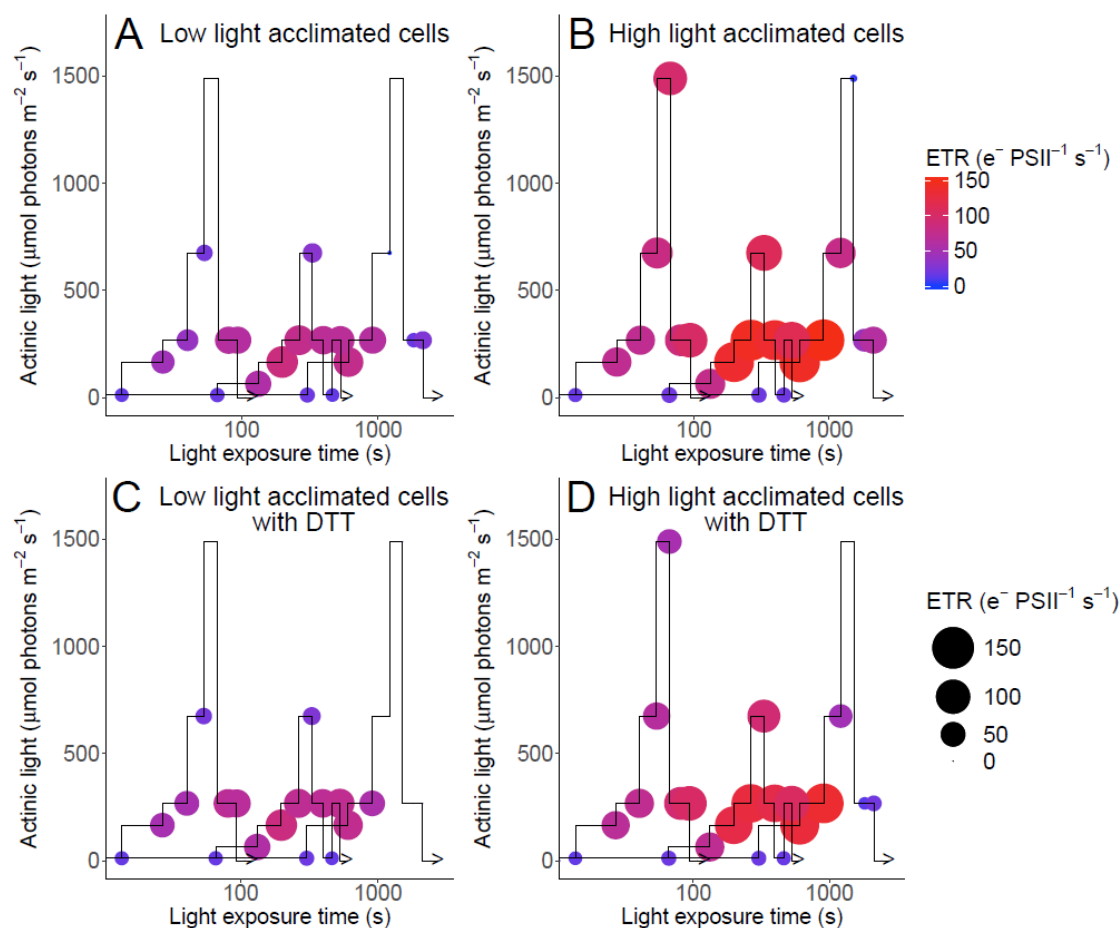


Figure 40 : Actinic light levels (black trace) plotted vs. duration of light exposures $PSII_{ETR}$ ($e^- PSII^{-1} s^{-1}$) in *C. vulgaris* control cultures (A and B) and in presence with DTT (C and D) shown by symbol size and colour scale. Cultures were grown at $30 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ (Low light, A and C) and $330 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ (High light, B and D). $PSII_{ETR}$ was estimated according to Eq. 2-6.

Electron transport rates reach higher maxima in high light acclimated cells (compare Figure 40.A, B). By comparing achieved ETR_{PSII} across equal levels of instantaneous actinic light (Figure 40.A, B) we see strong hystereses in responses, depending upon the previous light history of the sample. In particular the ETR_{PSII} reached its maxima only after short, but not prolonged, prior exposure to super-saturating irradiance. Prolonged exposure to super-saturating irradiance was, in contrast, strongly inhibitory. In cultures incubated with DTT, ETR_{PSII} was inhibited under high irradiance, particularly in cultures acclimated to growth at high light (compare Figure 40.B, D).

2.3.3 PSII inactivation, repair and non-photochemical dissipation

Figure 41 plots the quantum yield of PSII in the light acclimated state measured after 2 s dark, $F_v'/F_m'_{2s}$ (left Y axes) as a function of time (X axes) with the 300 s period light treatment protocol (grey line, right Y axes) in *C vulgaris* cultures grown at $30 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ (low light, A) and at $330 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ (high light, B).

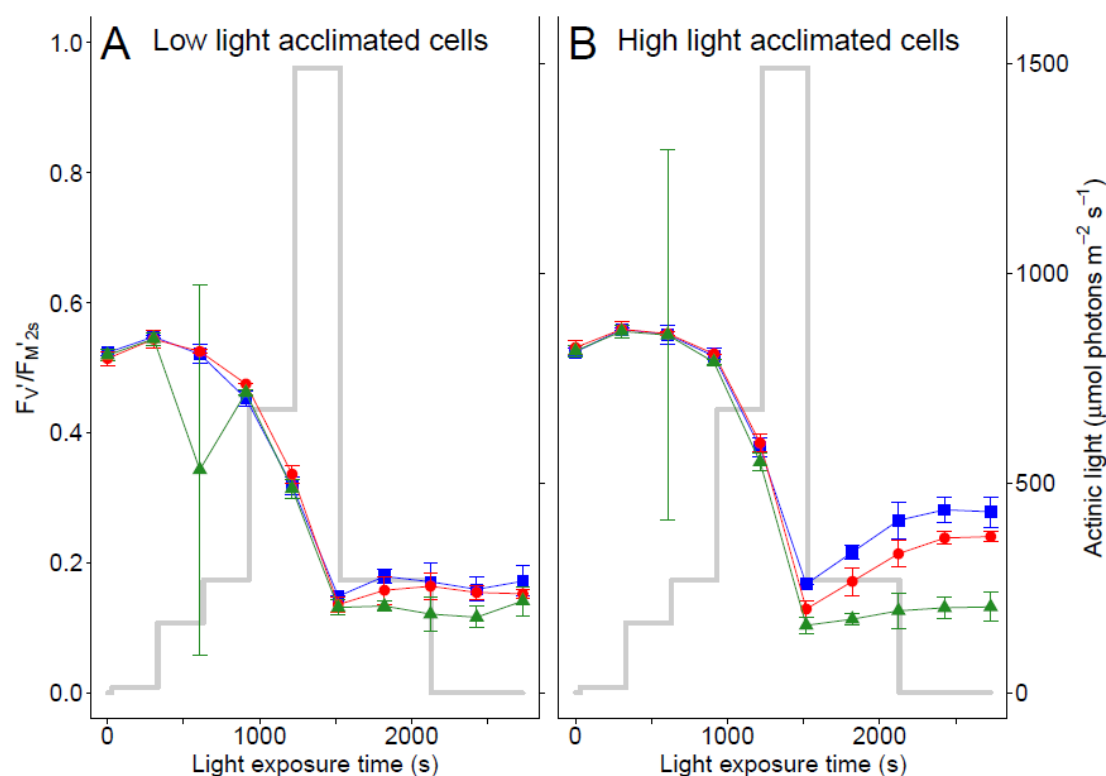


Figure 41 : F_v/F_m' quantum yield of PSII under light acclimated state for *C. vulgaris* (left Y axes) measured after 2 s dark immediately following the preceding actinic light period (grey trace, right Y axis), plotted vs. elapsed time. Cultures were grown at 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A, low light) or 330 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B, high light). Blue squares: control cultures. Red circles: cultures with DTT to block the xanthophyll cycle which mediates NPQ. Green triangles: cultures with lincomycin to block PSII repair. Error bars represent standard deviation of three replicates.

Across the exposure periods 1-3 at low to moderate light, $F_v/F_m'_{2s}$ showed modest up regulation from darkness to measures taken under low light (all traces). Upon exposures to super-saturating light periods 4 & 5, $F_v/F_m'_{2s}$ dropped sharply (all traces), reflecting induction of non-photochemical quenching and/or photoinactivation of PSII. Upon a return to a moderate light for 600 s (periods 6 & 7), $F_v/F_m'_{2s}$ remained almost steady in the cultures acclimated to low light (Figure 41.A, all traces). It is worth noting that for a same light level, $F_v/F_m'_{2s}$ was severely inhibited in period 6 as compared to 3. In the cultures grown under high light, $F_v/F_m'_{2s}$ recovered partially over periods 6 & 7 towards initial levels (Figure 41.B, blue control and red DTT trace). Over the final dark periods 9 & 10, $F_v/F_m'_{2s}$ remained steady and never reached the initial values (Figure 41 all traces).

Multiple factors interact to influence the instantaneous $F_v/F_m'_{2s}$. Sustained forms of NPQs (Goss and Lepetit, 2015; Lavaud and Lepetit, 2013; Wu *et al.*, 2011) can keep $F_v/F_m'_{2s}$ down-regulated even through 2 s of dark relaxation applied to allow photochemical re-opening of PSII (Figure 35). Adding the inhibitor DTT (red trace) to block xanthophyll cycling, which mediates some NPQ mechanisms had little effect upon the observed patterns of down regulation or

recovery of $F_v'/F_m'_{2s}$. Thus NPQ responding dynamically through xanthophyll cycle regulation had only a modest influence in cultures acclimated to saturating growth light (Figure 41.B, compare blue control and red DTT traces).

When exposed to high light, PSII can be subject to photoinactivation through multiple mechanisms (Murphy *et al.*, 2017; Oguchi *et al.*, 2011), which are countered through a PSII repair cycle (Nixon *et al.*, 2010) which depends upon removal and replacement of PSII subunits dependent on chloroplastic protein degradation and synthesis systems. In cells acclimated to growth-limiting light, inhibition of chloroplast protein synthesis had marginal influences on responses of $F_v'/F_m'_{2s}$ (Figure 41.A, compare blue control and green lincomycin traces). In contrast in cells acclimated to growth-saturating light inhibition of chloroplast protein synthesis accelerated the decline of F_v'/F_m' under 600 s of super-saturating light and blocked subsequent partial recovery under 600 s of low light (Figure 41.B, compare blue control and green lincomycin traces). Furthermore as expected for a chlorophyte, the PSII recovery stopped in darkness, because chlorophyte PSII repair depends upon photosynthetic energization (Edelman Marvin, 2008) in these taxa. Thus, net photoinactivation of PSII function under 300-600 s of supersaturating light contributed to the down-regulation of ETR_{PSII} upon a return to saturating light (Figure 36C, D). Cells acclimated to growth-saturating light up-regulate their capacity for the repair of PSII photoinactivation and so show stronger responses to loss of PSII repair through lincomycin inhibition.

The evolution with time of the fraction of open PSII centres ($[1-C]$) measured in *C. vulgaris* cultures at each actinic light level is shown in Figure 42. Cells acclimated to low or to high growth light showed similar trajectories of PSII closure in response to changing light, at least at the level of resolution afforded by the changes in irradiance of our protocol. Two independent metrics of PSII closure under excitation ($[1-C]$ and q_p) track each other closely (Figure Supp. 1). There is a linear relationship between these two parameters with R^2 equal to 0.9595.

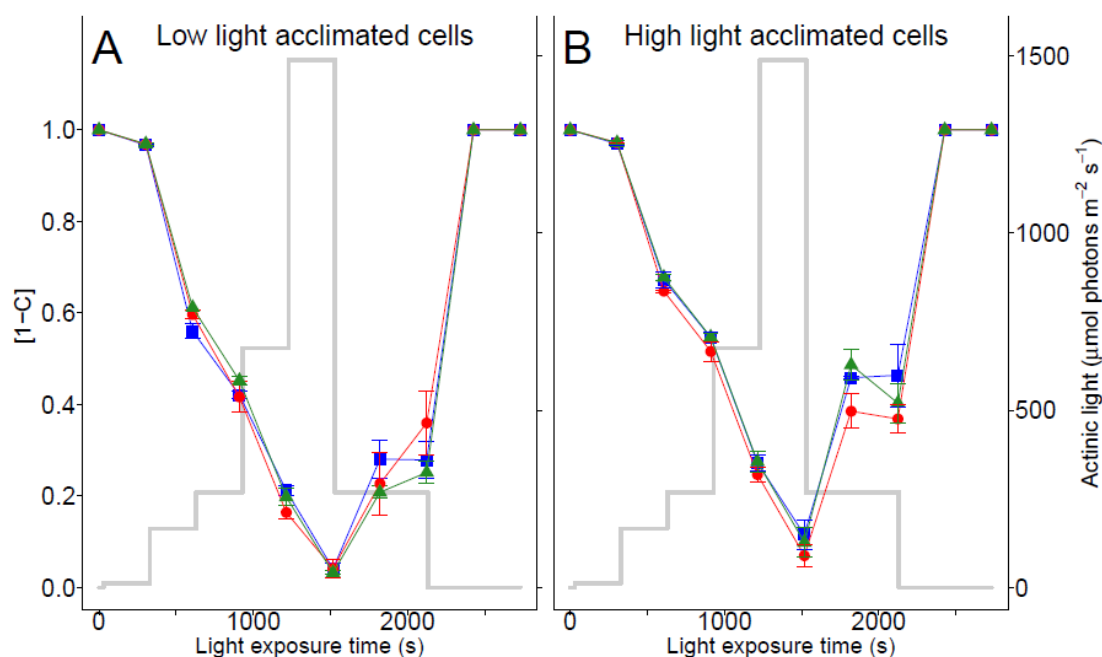


Figure 42 : Fraction of open PSII centres $[1-C]$ for *C. vulgaris* (left Y axes) measured at each actinic light level (grey trace, right Y axis), plotted vs. elapsed time. Cultures grown at $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (low light, A) or $330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high light, B). Blue squares: control cultures. Red circles: cultures with DTT to block the xanthophyll cycle. Green triangles: cultures with lincomycin to block PSII repair. Error bars represent standard deviation of three replicates.

Figure 43 shows YNPQ for *C. vulgaris* measured at each actinic light level (grey trace, right Y axis), plotted versus time. In cells acclimated to low growth light YNPQ does not accumulate significantly in the shorter light treatment sequence of less than 10 min (Figure 43.A). In contrast the cells acclimated to higher growth light were able to induce significant YNPQ within 10-30 s exposure to moderate light (Figure 43.B). For cells acclimated to either low or high growth light and exposed to longer light treatments (Figure 43.C, D) YNPQ accumulated only after exposure to $\sim 675 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sufficient to drive the fraction of open PSII down to ~ 0.2 (Figure 42). Above that threshold YNPQ induction proceeded at comparable rates in both cultures acclimated to low light or to high light (Figure 43.C, D). Addition of DTT caused a moderate drop in the rate of induction of YNPQ (Figure 43.C, D), while addition of lincomycin to block PSII repair had negligible influence on accumulation of YNPQ (data not shown). This induction of YNPQ corresponded to only marginal down-regulation of σ_{PSII} (Figure 38.E, F), consistent with findings (Xu *et al.*, 2018) that measured induction of YNPQ does not result in proportional down regulation of σ_{PSII} , but does coincide with the significant down-regulation of YPSII (Figure 37E, F) and F_v'/F_m' (Figure 41).

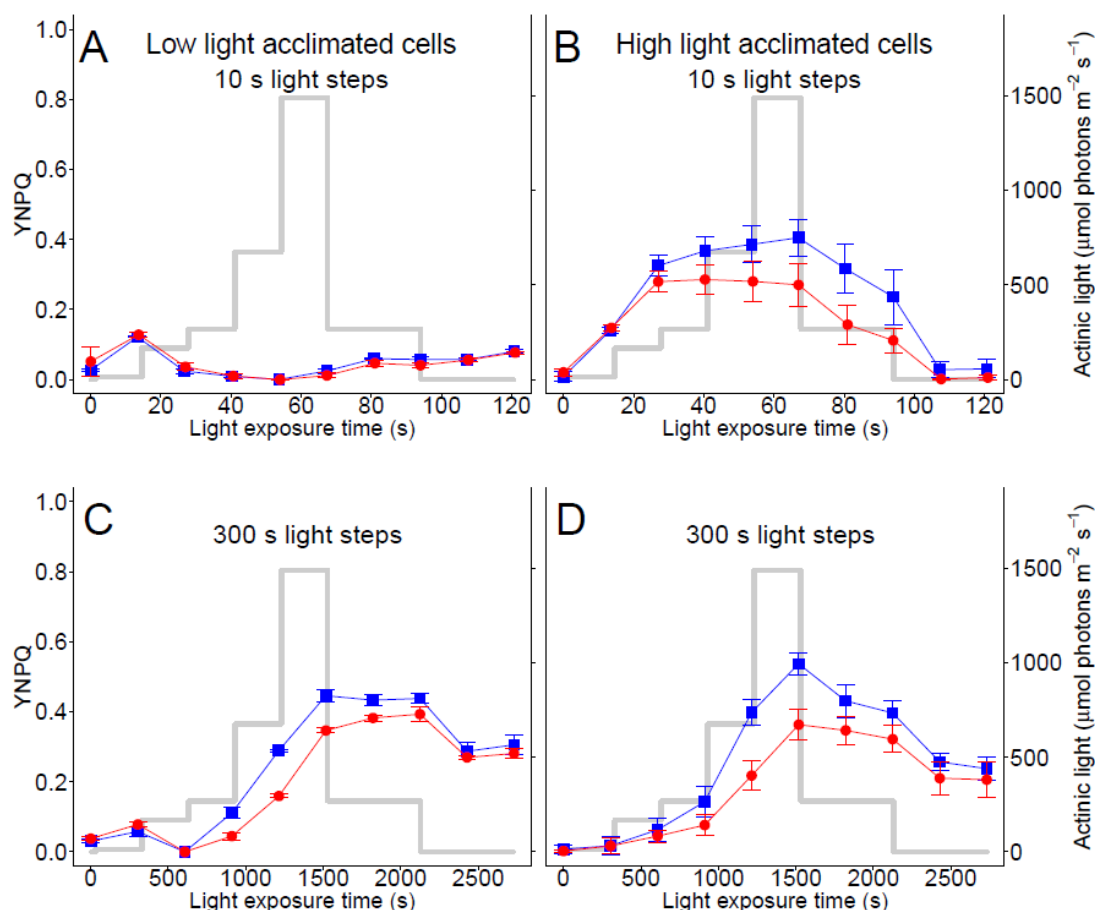


Figure 43 : YNPQ for *C. vulgaris* (left Y axes) measured at each actinic light level (grey trace, right Y axis), plotted vs. elapsed time. Each light period lasted for 10 s (A, B), or 300 s (C, D). Cultures were grown at 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (low light, A,C) or 330 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high light, B, D). Blue squares: control cultures. Red circles: cultures with DTT to block the xanthophyll cycle. Error bars represent standard deviation of three replicates.

2.4 Conclusions

Chlorella vulgaris tolerated transient 10-20 s exposures to supersaturating light by transiently accelerating electron transport away from PSII. This mechanism was saturated or overwhelmed by 60-120 s of supersaturating light exposure. With more prolonged exposures induction of YNPQ was induced although in the present work this phenomenon did not significantly down-regulate the effective absorption cross section controlling PSII photochemistry efficiency.

Further experiments will aim to translate these results to the conditions encountered in photobioreactors, where the cells undergo significant variations in light, with characteristic times of the order of 10-120 s. Our analysis also demonstrates that kinetic phases of the different mechanisms displayed by the algae to tolerate or exploit fluctuating light are accessible from rapid, non-invasive FRRf measures compatible with online monitoring of photobioreactor performance under mixing and irradiance regimes. This methodology and approach could thus

be of great use to control and optimize the phenomenon of light conversion in microalgal solar cultures at large scale.

Supplemental figures

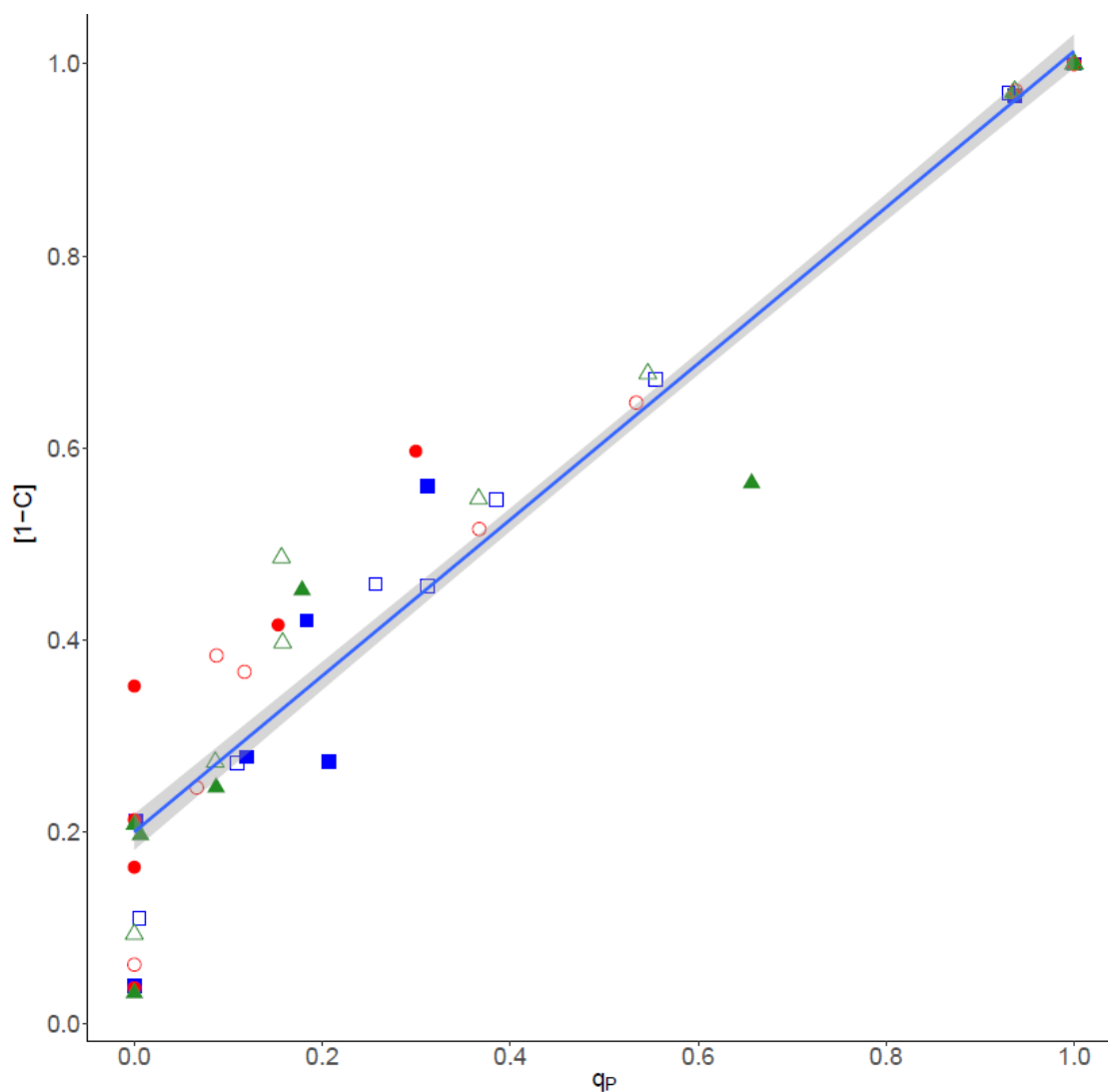


Figure Supp. 1 : Two independent metrics of PSII closure under excitation $[1-C]$ vs. q_P for *C. vulgaris* grown at $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (low light, closed symbols) or $330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high light, open symbols). Parameters were measured during 300 s light steps treatment as shown in Fig1D. Blue squares: control culture. Red circles: cultures with DTT to block the xanthophyll cycle. Green triangles: cultures with lincomycin to block PSII repair. Blue trace is the linear regression of all measures with a R-squared factor equal to 0.9595. $[1-C] = 0.81q_P + 0.2$.

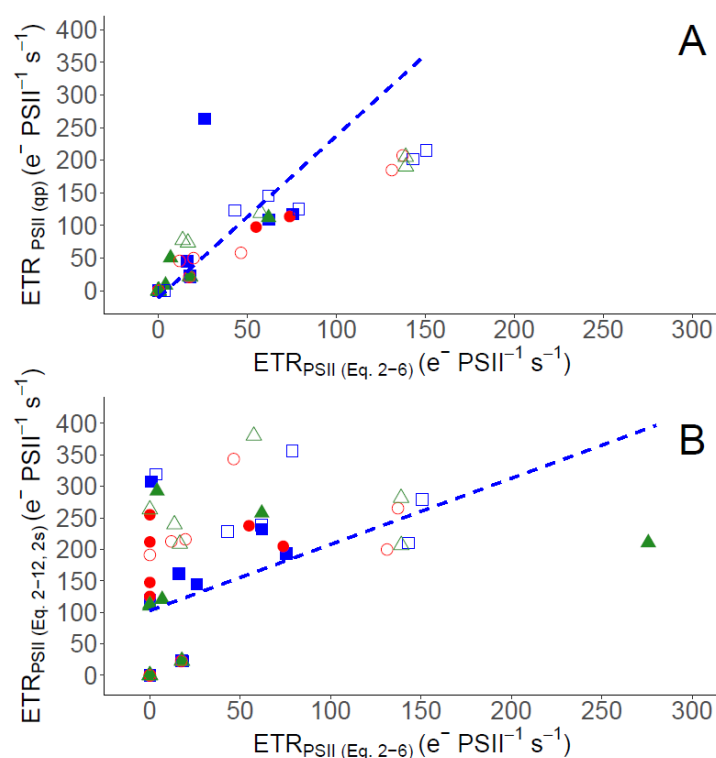


Figure Supp. 2 : Comparisons of metrics of ETR_{PSII} for *C. vulgaris* grown at 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (low light, closed symbols) or 330 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high light, open symbols). Fluorescence parameters were measured during 300 s light steps treatment as shown in Figure 35.D. Blue squares: control culture. Red circles: cultures with DTT to block the xanthophyll cycle. Green triangles: cultures with lincomycin to block PSII repair. Blue traces are the linear regressions of all measures plotted.

ETR_{PSII} calculated as the product of σ_{PSII} , q_p and I compared with ETR_{PSII} calculated with Eq. 2-6 (A); $\text{ETR}_{\text{PSII}}(\text{qp}) = 2.48 \text{ ETR}_{\text{PSII}}(\text{Eq. 2-6}) - 10.8$; $R^2 = 0.73$.

ETR_{PSII} calculated with Eq. 2-12 using parameters extracted from induction/relaxation profiles measured after 2 s dark immediately following the preceding actinic light periods compared with ETR_{PSII} calculated with Eq. 2-6 (B); $\text{ETR}_{\text{PSII}}(\text{Eq. 2-12, 2 s}) = 1.05 \text{ ETR}_{\text{PSII}}(\text{Eq. 2-6}) + 102.8$; $R^2 = 0.22$.

Chapitre 3. Etude de la réponse photosynthétique de *Chlorella vulgaris* aux variations de lumière en photobioréacteur

Résumé:

Une utilisation efficace de la lumière est essentielle pour atteindre une bonne productivité en micro-algues, en particulier dans les systèmes de culture de masse en conditions solaires où la lumière est très dynamique (cycles jour/nuit, météo). Les micro-algues présentent des mécanismes leur permettant d'optimiser l'efficacité de l'utilisation de la lumière. À court terme, en cas de forte luminosité, elles peuvent développer des mécanismes de photoprotection afin d'éviter l'endommagement des cellules. À long terme, lorsque les cellules sont exposées à une intensité lumineuse différente, elles sont capables de modifier leur contenu pigmentaire lors d'un processus appelé photoacclimatation. L'objectif de ce chapitre est d'étudier la réponse photosynthétique des cultures de *Chlorella vulgaris* cultivées dans un photobioréacteur (PBR) fermé sous lumière constante et dynamique. Au cours de cette étude, dans des conditions de lumière dynamique, des réponses à court et à long terme ont été observées. En outre, la vitesse moyenne d'absorption de photons (MRPA) s'est avérée être un paramètre intéressant pour relier l'effet de la lumière reçue par les cellules, et leurs réponses correspondantes dans des conditions de lumière constante et dynamique.

Investigation of the photosynthetic response of *Chlorella vulgaris* to light changes in photobioreactors

Abstract:

An effective use of light is essential to reach good productivities of microalgae, particularly in mass cultivation systems under solar conditions where light is highly dynamic (*e.g* Day/Night cycles, weather). Microalgae display mechanisms to optimize the efficiency of the light utilization. In the short term, when high light is encountered, they can develop several processes of photoprotection to avoid cells damages. In the long term, when cells are exposed to a different light intensity, they are able to change their pigment content within a process named photoacclimation. The purpose of this study is to investigate the photosynthetic response of *Chlorella vulgaris* cultures grown in a closed photobioreactor (PBR) under constant light and under dynamic light. During this study, in dynamic light conditions, short-term and long-term responses were observed. Furthermore the Mean Rate of Photon Absorption (MRPA) was found of interest to relate the effect the light received by cells, and their corresponding responses under constant light and dynamic light conditions.

3.1 Introduction

An effective use of light is essential to reach good productivities of microalgae, particularly in mass cultivation systems under solar conditions where light is highly dynamic (Richmond, 2013). These variations are mainly due to the diurnal cycles during which the incident photon flux density (PFD or q_0) is changing from null to very high values, beyond $1200 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in summer (Le Borgne, 2011).

In order to avoid contaminations by bacteria, fungus or other microalgal cells, microalgae are often cultivated in closed photobioreactors (PBRs). In these systems, the distribution of light is heterogeneous. Due to the photosynthetic cells, light is absorbed, creating a gradient of light level along the culture depth (Pruvost *et al.*, 2008). Depending on external conditions such as PFD and dilution rate, even when the PFD applied onto the PBR is the same, the light attenuation profile, and thus light regimes can be very different.

Microalgae cells absorb the light energy by light harvesting complexes and use it for carbon fixation through photosynthesis (Crofts and Wraight, 1983). However, if the light energy is too high, the photosynthetic apparatus becomes overexcited and harmful reactive oxygen species (ROS) are produced. In some cases, it results in cell photoinhibition leading to a loss of biomass productivity (Kok, 1956; Nixon *et al.*, 2010). On the contrary, if light energy is too low, other mechanisms such as respiration, occur in the PBR, also leading to productivity loss.

To prevent these phenomenon, microalgae display mechanisms to optimize the efficiency of the light utilization. In the short term, when high light is encountered, they can develop several processes of photoprotection to avoid cell damages (Asada, 2000; Kargul and Barber, 2008; Lavaud, 2007; Prasil *et al.*, 1996). Among them, the non-photochemical quenching (NPQ) of fluorescence is an important mechanism, which allows microalgae to respond to a rapid increase in irradiance and avoid photodamage. In this process, due to the de-epoxidation of some xanthophylls, excess light energy which cannot be used for photosynthesis is dissipated as heat (Goss and Lepetit, 2015).

In the long term, when cells are exposed to a different light intensity, they are able to change their pigment content within a process named photoacclimation. When cells are exposed to a lower light, they increase their pigment content, which allows them to absorb more photons. On the contrary, when there are exposed to a higher light, they decrease their pigment content to reduce the production of ROS and the oversaturation effect (Dubinsky and Stambler, 2009).

In PBRs, the pigment concentration has a direct impact on the light transfer and therefore on the biomass productivity. So photoacclimation process can influence reactor performances (Pruvost *et al.*, 2015).

The purpose of this study is to investigate the photoacclimation of *Chlorella vulgaris* cultures grown in a closed PBR. At first, the photoacclimation regarding pigment content will be studied in PBR operating at constant light. Then the dynamics of the acclimation processes will be examined during light step transitions. Results will be compared to predicted data obtained from model previously developed for the photoacclimation of *Chlamydomonas reihardtii* which will be here adapted to *Chlorella vulgaris*.

3.2 Material and methods

3.2.1 Pre-culture protocol

The strain *Chlorella vulgaris* CCAP 21.119 was grown in a modified Bold's Basal Medium (BBM) in 250 mL Erlenmeyer flasks under $60 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Andersen, 2005). The culture was continuously stirred. Algae were subcultured every 2 weeks, 1 mL from old culture was inoculated in 100 mL of new fresh BBM (Appendix 1).

3.2.2 Cultures protocol

3.2.2.1 *Cultivation system*

The torus photobioreactor shown in Figure 44 was used to study the photoacclimation of *C. vulgaris* under continuous and dynamic lights.

For these experiments, *C. vulgaris* cultures were carried out in Sueoka medium supplemented with Hutner solution (Sueoka, 1960) (Appendix 2).

The concentration of nutrients was adjusted to be in excess, so that microalgae growth was only light-limited (Kazbar *et al.*, 2019; Souliès *et al.*, 2016).

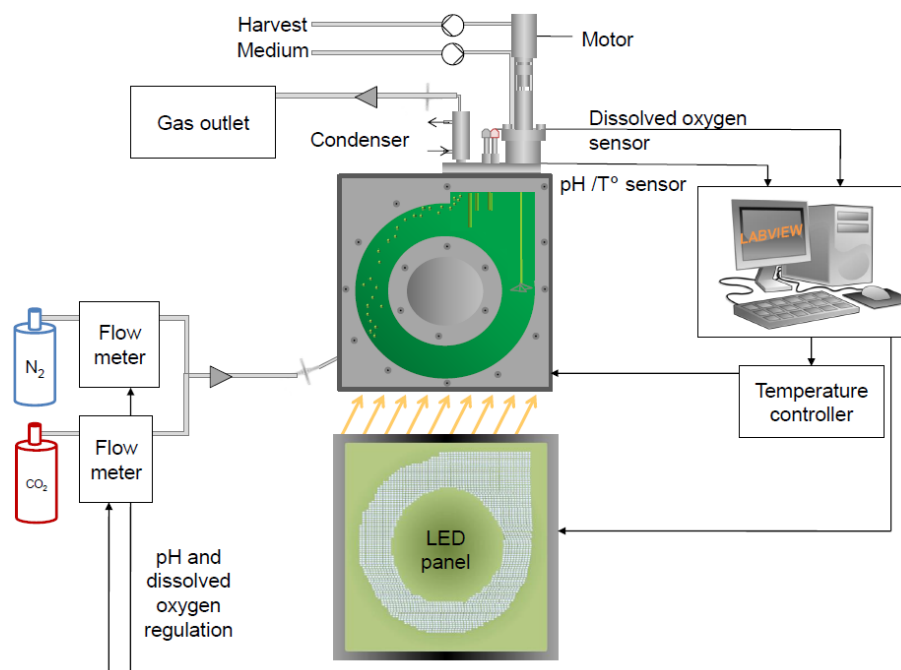


Figure 44 : Controlled photobioreactor used for the study of photoacclimation of *C. vulgaris*.

All cultures were carried out in a continuous chemostat mode and the artificial incident PFD was provided by a LEDs panel. The light from the LEDs panel was calibrated with a quantum sensor (Li- COR 250A, USA). Agitation was mainly provided by a marine impeller. During experiments, the temperature was maintained at 25 °C by automatic water cooling, the pH was monitored (InPro 3253i Mettler Toledo, USA) and maintained at 7.5 by automatic CO₂ injection and the dissolved oxygen concentration was measured (InPro 6860i Mettler Toledo, USA) and controlled by automatic N₂ bubbling for degassing. Both pH and oxygen concentrations were regulated with a Proportional Integral Derivative (PID) controller (Ifrim *et al.*, 2014; Titica *et al.*, 2018). All regulations were done by using Labview software (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench, National Instrument, USA). The data were online recorded.

3.2.2.2 Culture conditions in constant light

In order to investigate the photoacclimation of *C. vulgaris* in constant light, several cultures were carried out in a continuous mode with different incident PFD and dilution rates (D) (Table 2). The imposed PFD ranged between 50 and 800 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and the imposed dilution rate ranged between 0.01 and 0.07 h^{-1} .

For each condition, the culture was carried out in the PBR for at least 5 resident times to allow obtaining a steady-state (*i.e.* constant biomass and pigment concentrations). When steady-state was reached, 30 to 50 mL of culture were sampled for analyses. The samplings were done in triplicate in order to validate the steady state regime.

Table 2 : Culture conditions applied to *C. vulgaris* for the study of photoacclimation in constant light.

Condition n°	Incident PFD ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Dilution rate D (h^{-1})
1	50	0.01
2	50	0.02
3	100	0.02
4	100	0.05
5	250	0.02
6	250	0.05
7	400	0.02
8	400	0.07
9	800	0.02
10	800	0.01
11	800	0.04

3.2.2.3 Incident light transitions

To study the photoacclimation of *C. vulgaris* under dynamic light, two successive step transitions in incident PFD were done (Figure 45).

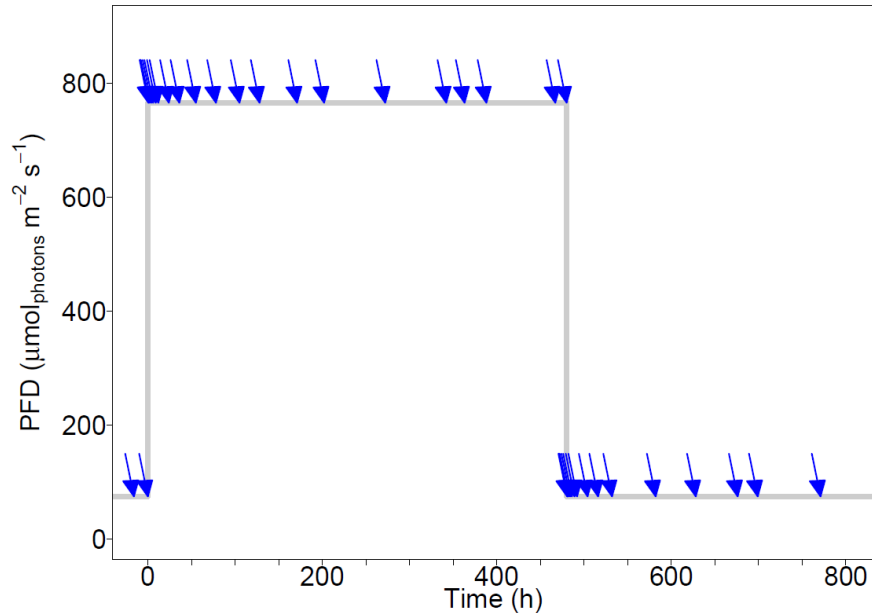


Figure 45 : PFD step transition applied during the investigation of photoacclimation of *C. vulgaris* in light changing conditions. Arrows show times of samplings.

A first steady-state was reached for an incident PFD equal to $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and then the light was changed to $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. When the second steady-state was reached, the incident PFD was reduced back to $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ until the third steady-state was reached. Immediately after each PFD step, several culture samples were regularly taken and the sampling was more spread over time thereafter. For each sample, about 30 mL of culture were taken. After each sampling, the harvest by pump was stopped until the culture volume reached its pre-sampling value.

3.2.3 Analyses

3.2.3.1 PAM chlorophyll *a* fluorescence parameters

To measure photosynthetic parameters, off-line PAM chlorophyll *a* measurements were done using a PAM fluorometer (WaterPAM, Walz, Germany). Immediately after each sampling, some volume of culture was diluted in Sueoka medium in a quartz cuvette so that the fluorescence yield was close to 200 units (Heinz Walz GmbH, 2001). The dilution depended on the chlorophyll *a* concentration. The culture was left for 10 to 15 minutes in darkness in order to allow the total oxidation of PSII reaction centers.

After dark acclimation, a rapid light curve (RLC) was applied to the culture (Perkins *et al.*, 2010) with eight incremental light levels, *i.e.* 0, 75, 109, 165, 245, 346, 479, 773 and $1127 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. After 1.5 min exposure to each light level, a saturating flash was applied for 0.8 s to close all open reaction centers. After each light level the following parameters were measured: F' , F_m' , F_o (at the 1st measurement), F_m (at the 1st measurement).

Then, maximal PSII quantum yield for photochemical energy conversion in PSII (F_v/F_m) was calculated as follows (Kolber and Falkowski, 1993) :

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_o}{F_m}. \quad (3-1)$$

PSII quantum yield of regulated non-photochemical energy loss (YNPQ) was calculated as follows (Klughammer and Schreiber, 2008):

$$\text{YNPQ} = \frac{F}{F_m'} - \frac{F}{F_m}. \quad (3-2)$$

In this formula, F_m' was measured for the actinic light equal to the average fluence rate of the culture (G_{mean} , see section 3.2.4.1).

3.2.3.2 Biomass concentration

The biomass concentration was determined based on dry matter measurement. Depending on the microalgae concentration, a known volume of culture (between 6 and 15 mL) was filtered

on a pre-weighted dry glass microfiber filter with a pore size of 0.7 μm . Then the filters were dried at 105 °C. At least 24 h later, the filters were cooled in a desiccator and weighted again.

3.2.3.3 Pigment concentration

Depending on the culture concentration, a known volume (V_{samp}) of culture (between 0.1 to 2 mL) was centrifuged for 10 min at 13400 g (MiniSpin Eppendorf, Germany). Supernatant was removed and the pellet was re-suspended in 1.5 mL of methanol. The tubes were left for 45 min at 45 °C to allow the extraction of pigments in the methanol. After centrifugation, a white pellet was obtained, which proved the total extraction of the pigments. The absorbance was measured with a spectrophotometer (Jasco V-630, France) at 430 nm, 652 nm, 665 nm and 750 nm. The following equations were used to estimate the concentrations of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoids (Ritchie, 2006) :

$$[\text{Chlorophyll } a] = \frac{1.5}{V_{\text{samp}}} (-8.0962 \times A_{652} + 16.5169 \times A_{665}), \quad (3-3)$$

$$[\text{Chlorophyll } b] = \frac{1.5}{V_{\text{samp}}} (27.4405 \times A_{652} + 12.1688 \times A_{665}), \quad (3-4)$$

$$[\text{Total carotenoids}] = \frac{1.5}{V_{\text{samp}}} (4 \times A_{480}), \quad (3-5)$$

with A_{652} the absorbance at 652 nm, A_{665} the absorbance at 665 nm and A_{480} the absorbance at 480 nm. Total pigment concentration (C_{pig}) was calculated by adding these different concentrations together.

The total pigment (w_{pig}), chlorophyll *a* (w_{Chla}), chlorophyll *b* (w_{Chlb}) and total carotenoid (w_{car}) contents were calculated by dividing the pigment concentrations by the dry biomass concentration.

3.2.3.4 Inorganic carbon concentration

Inorganic carbon concentration was measured on some samples to check that the carbon was not in a limiting concentration (*i.e.* inferior to 5 mM (Le Gouic, 2013)). For that purpose, 15 mL of culture were centrifuged at 4146 g (Hettich Mikro 22R, Germany) for 10 min. Then, the supernatant was filtered and inorganic carbon concentration was measured with a carbon analyzer (TOC-L, Shimadzu, Japan).

3.2.4 Determination of the light attenuation conditions

3.2.4.1 Radiative transfer modelling

A two-flux model was used to determine the spectral value of the fluence rate $G_{\lambda}(z)$ (in $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in the PBR (See Chapter 1, Pottier *et al.*, 2005). The averaged fluence rate

G_{mean} was then found by integrating $G_{\lambda}(z)$ over the Photosynthetically Active Radiations (PAR) and over the culture volume.

The biomass specific rate of photon absorption A_{Cx} (in $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{kg}_{Cx}^{-1} \text{s}^{-1}$) was obtained by integrating the product of G_{λ} with the mass absorption coefficient Ea_{λ} of *C. vulgaris* over the PAR (Souliès *et al.*, 2016):

$$A_{Cx} = \int_{\text{PAR}} Ea_{\lambda} G_{\lambda} d\lambda. \quad (3-6)$$

By integrating A_{Cx} over the culture volume, the mean biomass specific rate of photons absorption (MRPA $_{Cx}$) was determined. The radiative properties of *C. vulgaris*, necessary for this model, were function of the pigment content. They were obtained according to the protocol of Kandilian *et al.* (2016).

In the present study, the specific mean rate of photon absorption was also expressed per unit of total pigment (MRPA $_{\text{pig}}$, in $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{kg}_{\text{pig}}^{-1} \text{s}^{-1}$). It was calculated by dividing this MRPA $_{Cx}$ by the total pigment content w_{pig} .

3.2.4.2 Light attenuation profile

For any microalgae species, a rate of photon absorption at which photosynthesis compensates for respiration can be defined. This rate of photon absorption is named A_C , and it was estimated equal to $2800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{kg}_{Cx}^{-1} \text{s}^{-1}$ in *C. vulgaris* (Souliès *et al.*, 2016).

In the PBR used for the experiments, the light attenuation is one-dimensional (Pottier *et al.*, 2005). In this case, an illuminated fraction can be defined and is equal to:

$$\gamma = \frac{V_{\text{light}}}{V_{\text{PBR}}} = \frac{z(A_C)}{L}, \quad (3-7)$$

where V_{light} is the light volume of the PBR (i.e. where $A_{Cx} > A_C$), V_{PBR} is the volume of the whole PBR, $z(A_C)$ is the depth where A_C is reached and L the thickness of the PBR.

When γ is inferior to 1, there is a dark volume, and when γ is superior to 1, the culture volume is fully illuminated without dark volume (Pruvost and Cornet, 2012). For $\gamma > 1$ conditions, the transmittance T was also calculated, to estimate the fraction of the incident PFD passing through the reactor depth:

$$T = \frac{G(z=L)}{q_0}. \quad (3-8)$$

3.2.5 Photoacclimation model

3.2.5.1 General description

A model developed for *Chlamydomonas reinhardtii* (Urbain, 2017) was adapted to simulate the photoacclimation of *C. vulgaris*. The aim was not here to fully represent the photoacclimation

response of *C. vulgaris*, but only to evaluate if the previously developed model could catch the main dynamics of the phenomena involved.

Equations of the model are given in Appendix 3. The model was implemented in MATLAB (Version 2016a for MacOS 10.11).

Same parameters as for *C. reinhardtii* were used for *C. vulgaris* except the maximal maintenance rate J_m^* , the saturation constant for photosynthesis K , the maximal pigment content x_{pig}^* , the saturation constant for maintenance K_r and the C-molar mass of pigment and biomass respectively M_{pig} and M_x . Some of those parameters could be obtained by dedicated experiments, which was out of the scope of our study. As a consequence J_m^* , K , x_{pig}^* and K_r were identified and optimized by quadratic programming of constrained problems. This initial parameters optimization was realised using biomass and pigment concentrations of steady states cultures obtained with conditions described in part 3.2.2.2 (except those of the culture grown under condition #11). M_{pig} and M_x were obtained from the elemental composition of the *C. vulgaris* biomass produced on Sueoka medium (Souliès *et al.*, 2016).

Table 3 gives all the parameters used for the elaboration of the model for *C. vulgaris* photoacclimation.

3.2.5.2 Evaluation of the model

Model predictions were compared to experimental data obtained for two different continuous cultures exposed to light step transitions.

Firstly, the culture was exposed to a PFD step transition from 100 to 400 $\mu\text{mol}_{photons} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A first steady-state was reached for an incident PFD equal to 100 $\mu\text{mol}_{photons} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, then the light was changed to 400 $\mu\text{mol}_{photons} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ until a second steady state was reached for this PFD.

Secondly, the PFD step transitions described in part 3.2.2.3, from 100 to 800 $\mu\text{mol}_{photons} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 800 to 100 $\mu\text{mol}_{photons} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, was applied.

During these experiments, biomass and pigment concentrations were measured following protocols described respectively in part 3.2.3.2 and 3.2.3.3.

Table 3 : List of all parameters used for modeling photoacclimation in *C. vulgaris*.

Type	Parameters	Values	Units	Description	Source
Biological demand	M_x	23.0×10^{-3}	kg C-mol ⁻¹	Biomass C-molar mass	Souliès <i>et al.</i> , 2016
	$Y_{p,x}$	3.816	mol _{ATP} C-mol _x ⁻¹	ATP demand for biomass	Urbain, 2017
	$f_{p,x}^\emptyset$	0.889	(-)	Fraction of ATP moles from photosynthesis, needed for biomass	
	M_{pig}	15.5×10^{-3}	kg C-mol ⁻¹	Pigment C-molar mass	
	$Y_{p,pig}$	4.019	mol _{ATP} C-mol _{pig} ⁻¹	ATP demand for pigments	
	$f_{p,pig}^\emptyset$	0.979	(-)	Fraction of ATP moles from photosynthesis, needed for pigments	
Energetics	P_o	2.5	(-)	Energetic ratio at the respiratory chain	This study
	K	93.48	mol _γ kg _{XT} ⁻¹ h ⁻¹	Saturation constant for photosynthesis	
	P_{2e}	1.45	(-)	Energetic ratio at the photosynthetic chain	Urbain, 2017
	n	14/3	(-)	H ⁺ over ATP ratio	
Maintenance	J_m^*	4.26	mol _{ATP} kg _{XT} ⁻¹ h ⁻¹	Maximal maintenance rate	This study
	K_r	10.26	mol _γ kg _{XT} ⁻¹ h ⁻¹	Saturation constant for maintenance	
Pigments	x_{pig}^*	0.108	kg _{pig} kg _{XT} ⁻¹	Maximal theoretical pigment content	

3.3 Results

3.3.1 Cultures in continuous light

Table 4 summarizes the values of biomass and pigment concentrations obtained at steady states for different cultures conditions. According to the PFD and dilution rate conditions, either diluted ($\gamma > 1$) or concentrated ($\gamma < 1$) cultures were obtained. The illuminated fraction γ was calculated for concentrated cultures and the transmittance T was calculated for diluted cultures.

Table 4 : Summary of biomass concentrations, pigment concentrations, illuminated fractions and transmittances obtained at steady states for cultures under different incident photon flux density (PFD) and dilution rates (D) conditions. Errors are standard deviations (n=3).

Condition n°	PFD ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	D (h^{-1})	C_X (g L^{-1})	C_{pig} (mg L^{-1})	γ	T
1	50	0.01	$0.395 \pm 0,023$	29.2 ± 0.8	0.31	0
2	50	0.02	0.174 ± 0.003	13.7 ± 0.3	0.84	0
3	100	0.02	0.409 ± 0.016	30.1 ± 0.8	0.52	0
4	100	0.05	0.179 ± 0.29	11.7 ± 2.0	> 1	0.43
5	250	0.02	0.670 ± 0.073	40.3 ± 4.8	0.60	0
6	250	0.05	0.370 ± 0.016	18.4 ± 1.1	> 1	0.25
7	400	0.02	1.211 ± 0.035	78.7 ± 1.0	0.41	0
8	400	0.07	0.323 ± 36.5	14.0 ± 1.7	> 1	0.33
9	800	0.02	1.331 ± 79.9	66.9 ± 7.1	0.58	0
10	800	0.01	1.796 ± 0.036	105.6 ± 1.2	0.40	0
11	800	0.04	1.013 ± 0.012	49.9 ± 1.9	0.80	0

Figure 46 gives the pigment content obtained for each steady-state, as a function of the MRPA_{C_X} (Figure 46A) and MRPA_{pig} values (Figure 46B).

For MRPA_{C_X} ranging from 5 to 15 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$, pigment content presented a linear evolution as a function of MRPA_{C_X} (R^2 equal to 0.9578) whatever the light attenuation condition. For example, a concentrated culture with γ equal to 0.40 revealed the same MRPA_{C_X} as a diluted culture with $\gamma > 1$ and T equal to 0.43. Both cultures exhibited same pigment content, about 6 %. It must be noticed that both light regimes into the culture volumes were very different. Indeed a γ equal to 0.40 means that more than half of the culture volume was not illuminated. And a T equal to 0.43 means that all the culture volume was illuminated, and almost the half of the incident PFD reached the bottom of the culture. Note also that the diluted culture

($T = 0.43$) was obtained for an incident PFD equal to $100 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a dilution rate equal to 0.05h^{-1} , resulting in a biomass concentration of 0.179g L^{-1} . The concentrated culture ($\gamma = 0.40$) was obtained for an incident PFD equal to $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a dilution rate equal to 0.02h^{-1} , resulting in a biomass concentration of 1.796g L^{-1} . Very different conditions were then achieved in both cases.

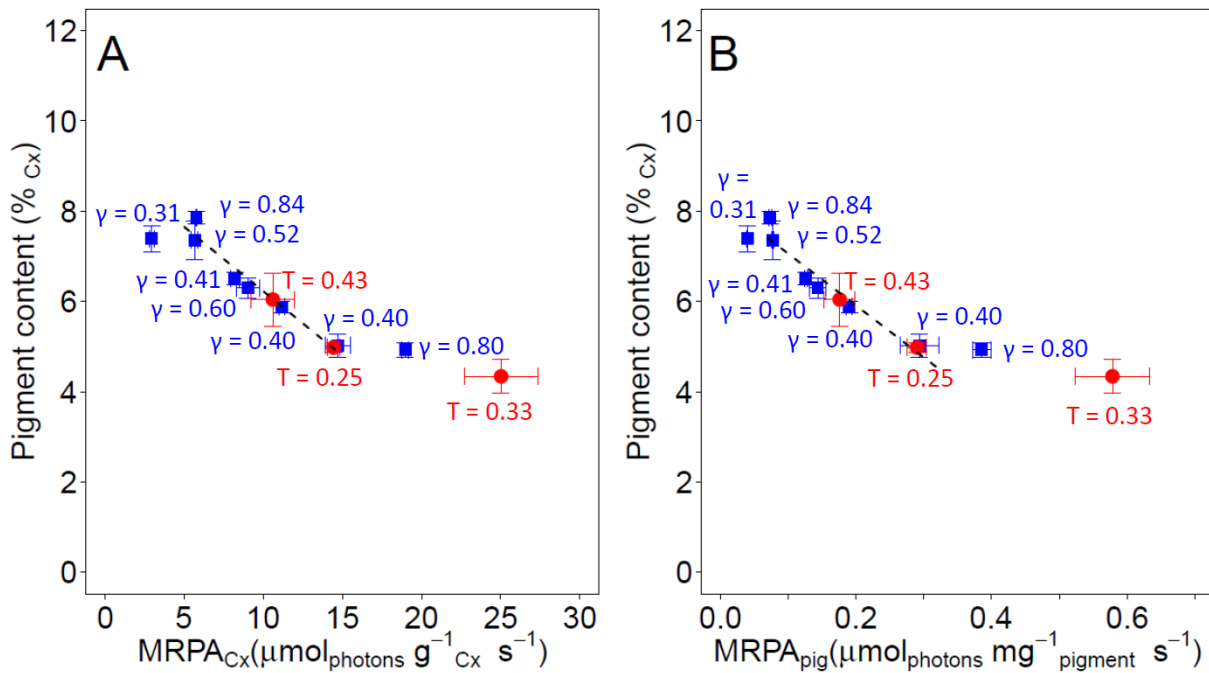


Figure 46 : Pigment content obtained for each steady-state, as a function of the MRPA_{Cx} values (A) or the MRPA_{pig} values (B), in diluted (red circles) and concentrated (blue squares) cultures of *C. vulgaris*. Error bars show standard deviations ($n = 3$). Linear regressions were calculated (dashed line). For values of MRPA_{Cx} between 5 and $15 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1} \text{Cx s}^{-1}$, the equation is $y = 9.0785 - 0.2853x$ and $R^2 = 0.9578$. For values of MRPA_{pig} between 0.07 and $0.32 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{mg}^{-1} \text{pigments s}^{-1}$, the equation is $y = 8.2091 - 11.4930x$ and $R^2 = 0.9358$.

A similar observation can be made for the MRPA_{Cx} values at $15 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1} \text{Cx s}^{-1}$, with two different light attenuation conditions ($T = 0.25$ and $\gamma = 0.40$) resulting in the same pigment content ($5.0 \%_{\text{Cx}}$).

Using MRPA_{pig} as a reference value resulted in the same conclusion. In this case, the correlation shows a linear evolution (R^2 equal to 0.9358) for MRPA_{pig} between 0.07 and $0.32 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{mg}^{-1} \text{pigments s}^{-1}$.

It is worth to note that for the largest values of MRPA_{Cx} , an asymptotic behaviour was observed, as the pigment content never decreased under $4 \%_{\text{Cx}}$. This corresponded to an MRPA_{Cx} about $25 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1} \text{Cx s}^{-1}$ ($0.58 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{mg}_{\text{pig}}^{-1} \text{s}^{-1}$), which was reached for an incident PFD

equal to $400 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a dilution rate equal to $0,07 \text{ h}^{-1}$. The resulting biomass concentration was 0.323 g L^{-1} .

3.3.2 Culture in dynamic light conditions

As a first assessment of what happens regarding photoadaptation and photoprotection under dynamic light conditions, two successive light step transitions from 75 to $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 765 to $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were applied to a *C. vulgaris* culture. Instead of light cycles, the choice of applying light transitions was made to allow the measure of characteristic times after a single increasing or decreasing light change. A large amplitude between the two PFD levels was chosen to facilitate the observations. During the successive steps in PFD, biomass and pigment concentrations, and photosynthetic parameters were measured.

3.3.2.1 Investigation of the culture stabilization with time

- Biomass concentration and pigment content

Figure 47 shows the biomass concentration and the total pigment content during the two successive light step transitions. After the first PFD change from 75 to $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the biomass concentration needed between 150 and 200 h to almost stabilize around $1.45 (\pm 0.12, n = 12) \text{ g L}^{-1}$. Pigment content reached its lowest value of $4.5 \%_{\text{C}_x}$ in the first 12 hours and then it increased again to reach $5.6 (\pm 0.2, n = 9) \%_{\text{C}_x}$ after 100 to 150 h. The culture was found highly unstable under $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (*i.e.* biomass concentration and pigment content not constant). For this reason, it was difficult to define a precise time for stabilization of biomass concentration but it seemed that the increase in biomass concentration took more time than the decrease. Instability of the culture under $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was probably due to both high value of dissolved oxygen concentration (around 250 % of saturation) and strong agitation ($50 \text{ to } 100 \text{ mL}_{(\text{N}_2)} \text{ min}^{-1}$) to maintain this concentration. It must be noticed that a stronger agitation would have led to a risk of CO_2 limitation due to high degassing (Kazbar *et al.*, 2019).

When the PFD decreased from 765 to $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pigment content took about 100 h to reach a stable value around $7.9 (\pm 0.1, n = 5) \%_{\text{C}_x}$. The biomass concentration was found again to exhibit a longer stabilization time, about 150 h, to reach a biomass concentration about $0.34 (\pm 0.01, n = 4) \text{ g L}^{-1}$. At the end of the experiment, at steady-state, biomass concentration and pigment content reached the same values as at the beginning of the experiment before the first light change.

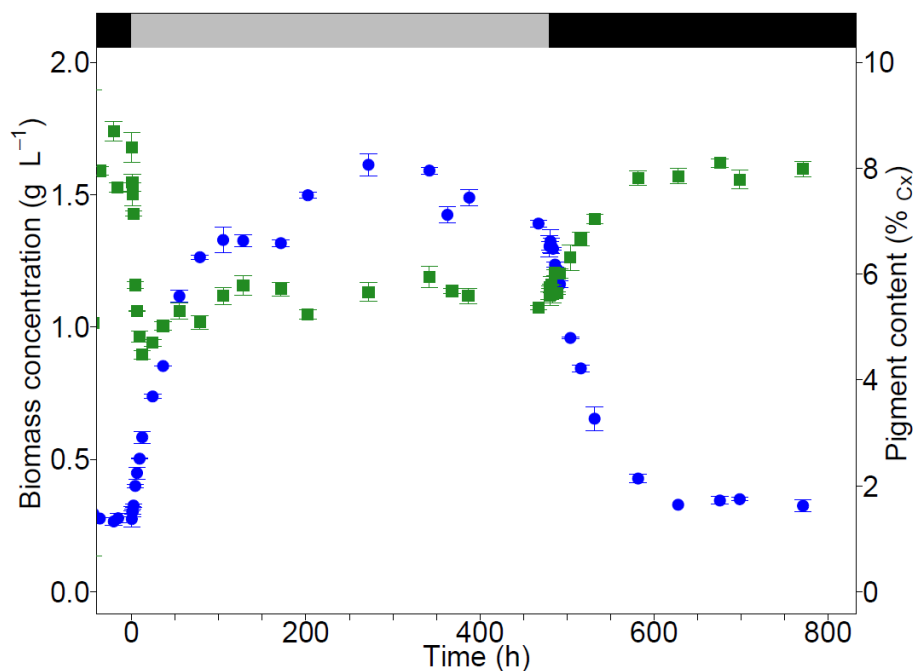


Figure 47 : Biomass concentration (blue circles, left axis) and pigment content (green squares, right axis) evolutions of *C. vulgaris* over the time during a PFD step from 75 (black line) to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line) and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Error bars represent standard deviations ($n= 3$). Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

Figure 48 shows the pigment composition (% of total pigment) during the two successive light transitions.

The composition was found identical during the whole experiment, with chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids representing respectively 67 %, 16 % and 17 % of the total pigment. We can then conclude that even if the total pigment content changed significantly during the successive light transitions, pigment profile remained the same. The chlorophyll *a* to carotenoids ratio was found identical, indicating especially that no marked light stress was observed, which should have induced an increase in carotenoid relative concentration, a well-known effect of light stress response (Dubinsky and Stambler, 2009).

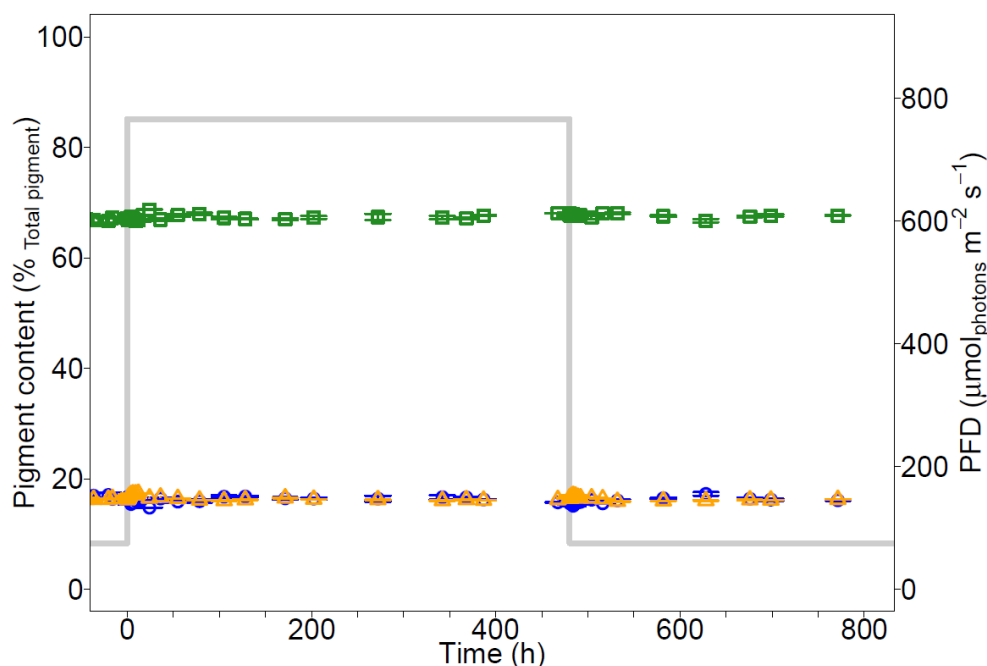


Figure 48 : Pigment composition of *C. vulgaris* during a PFD step from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Green squares show chlorophyll *a* content, blue circles show chlorophyll *b* content and orange triangles show total carotenoids. Error bars represent standard deviations ($n=3$). Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

- MRPA values

Figure 49 gives MRPA_{Cx} as a function of time during the two successive light step transitions. When the PFD increased from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2}$, MRPA_{Cx} values instantly increased from 6 to 63 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1}_{\text{Cx}} \text{s}^{-1}$. These values of MRPA_{Cx} were much higher than those obtained at steady-state (see section 3.3.1). In solar cultures, due to high light fluctuations, these values of MRPA_{Cx} are often encountered (Pruvost *et al.*, 2017). It took about 100 h for MRPA_{Cx} values to decrease and stabilise around $13 (\pm 1.0, n=12) \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1}_{\text{Cx}} \text{s}^{-1}$. This decrease was the result of biomass concentration increase and pigment content decrease. When the PFD decreased to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, MRPA_{Cx} values instantly decreased to $1.4 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1}_{\text{Cx}} \text{s}^{-1}$. Then MRPA_{Cx} values increased again to reach, after about 150 h, the same values as at the beginning of the experiment. It should be noted that the stabilization time for MRPA_{Cx} was the same as for biomass concentration or pigment concentration.

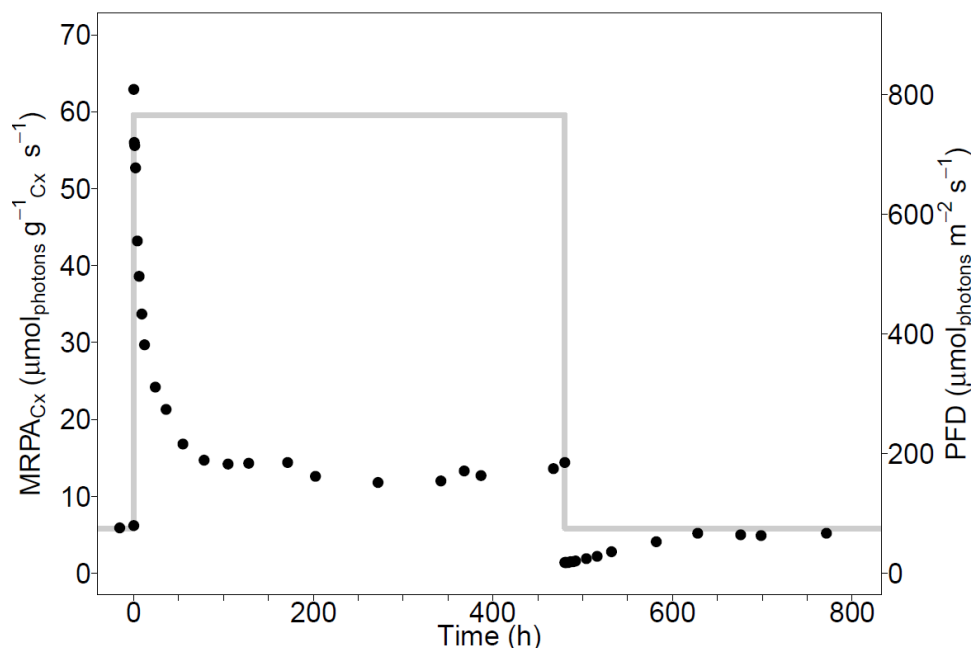


Figure 49 : MRPA_{Cx} (black circles, left axis) over the time during the PFD steps from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis) in *C. vulgaris* culture. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

- Photosynthetic parameters

In the previous sections, it was found a slow evolution of biomass and pigment concentrations with time despite values of MRPA, larger from those encountered at steady-states. As microalgae are known to have different mechanisms to avoid damages caused by light stress, it was then decided to study the effect of the PFD steps on these potential mechanisms by using PAM chlorophyll *a* fluorescence measurements. Some photosynthetic parameters were used to assess photoprotection and photoinhibition mechanisms.

Figure 50 gives the evolution of F_v/F_m and YNPQ during the two successive PFD steps from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. At the rising light step, F_v/F_m instantly decreased from 0.72 to 0.64 and fell below 0.6 after 24 h. After about 150 h, F_v/F_m almost returned to its initial value. Then F_v/F_m progressively decreased over the next 300 h. When the light was set back at 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, F_v/F_m increased again after several hours to 0.72, and then slowly decreased over the time to stabilize at 0.67.

During the whole experiment, YNPQ remained below 0.1. An increase was only observed at the beginning of the first light transition, corresponding to the largest MRPA values.

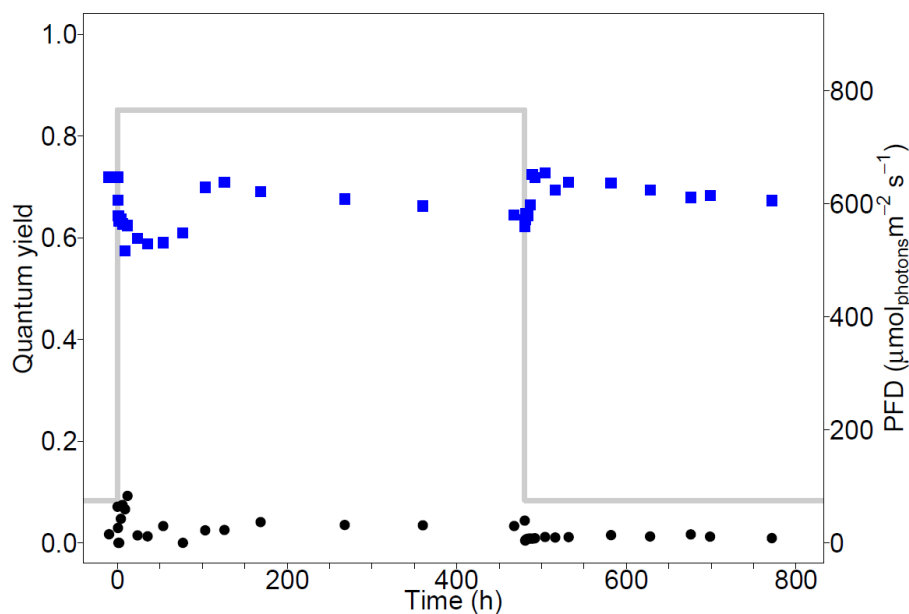


Figure 50 : Changes in F_v/F_m (blue squares) and YNPQ (black circles, left axis) with time during light transitions from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis) in *C. vulgaris* culture. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

All these results indicate a different behaviour between rising and falling steps. Both were investigated in details in the following sections.

3.3.2.2 Rising light step

- Biomass concentration and pigment content

Figure 51 shows the biomass concentration and the pigment content time evolutions over the first 24 hours after the rising light change.

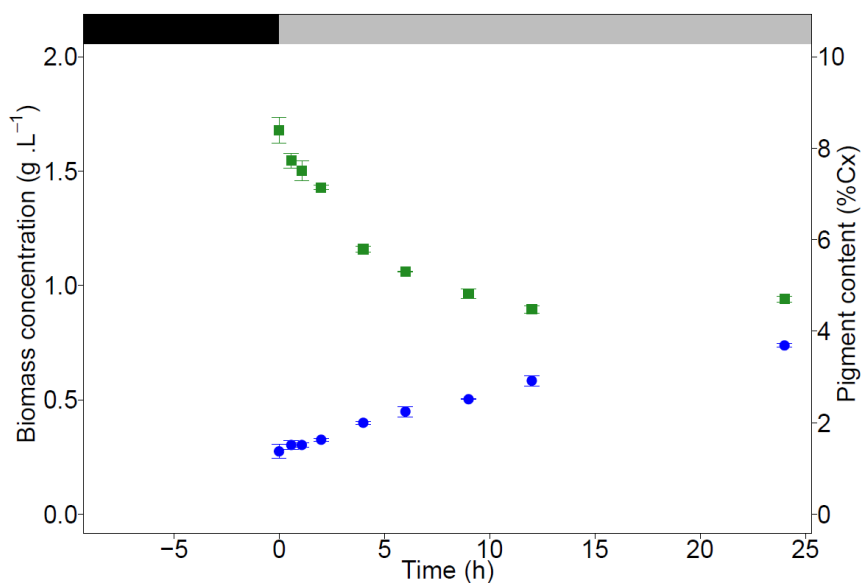


Figure 51 : Biomass concentration (blue circles, left axis) and pigment content (green squares, right axis) of *C. vulgaris* over the time during the first 24 hours of the rising PFD step from 75 (black line) to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line). Error bars represent standard deviation ($n=3$). Dilution rate was 0.02

h^{-1} .

The biomass concentration increased immediately but the rate was low during the first 2 hours, from 0.27 to 0.33 g L^{-1} . Then the increase became a little higher for the next 8 hours, and biomass concentration reached 0.58 g L^{-1} . During the first 4 hours, pigment content strongly decreased, from 8.4 to 5.8 % $_{\text{Cx}}$. From 4 h to 12 h, the rate was lower, from 5.8 to 4.5 % $_{\text{Cx}}$. From the 12th hour, it must be noted that pigment content slowly increased.

- MRPA values

Figure 52 gives the time evolution of MRPA_{Cx} values, resulting from biomass and pigment acclimation. As seen before, MRPA_{Cx} instantly increased from 6 to 63 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1}_{\text{Cx}} \text{s}^{-1}$ just after the rising PFD step. Then it quickly decreased at a high rate during the first 4 hours, from 63 to 42 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$ and then the decrease slowed down to 30 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$ during the following 10 hours.

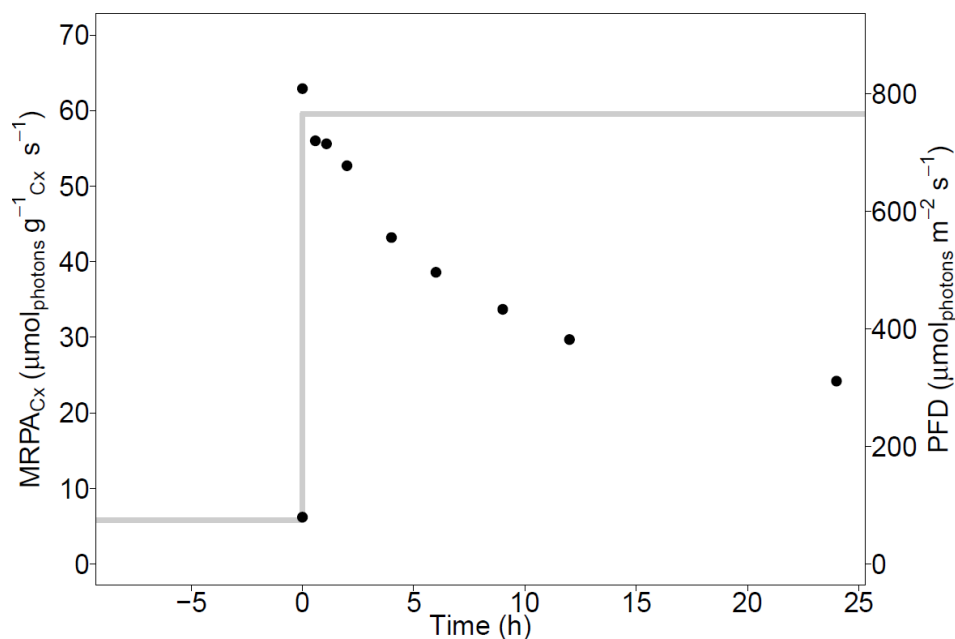


Figure 52 : Biomass specific MRPA_{Cx} (black circles, left axis) over the time during the first 24 hours of the rising PFD step from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis) in *C. vulgaris* culture. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

Interestingly, if the pigment specific MRPA_{pig} is observed, it can be noted that at the beginning of the light transition, after increasing, MRPA_{pig} was not found to decrease and it stayed constant around $0.74 (\pm 0.01, n = 5) \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{mg}^{-1}_{\text{pigments}} \text{s}^{-1}$ for 4 h (Figure 53).

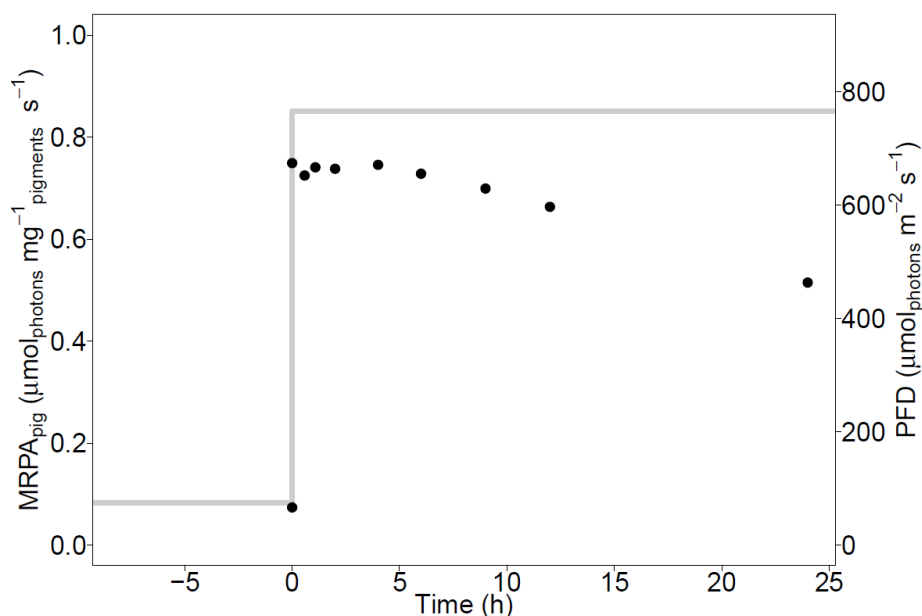


Figure 53 : Pigments specific MRPA_{pig} (black circles, left axis) over the time during the first 24 hours of the rising PFD step from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis) in *C. vulgaris* culture. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

- Photosynthetic parameters

Figure 54 shows F_v/F_m and YNPQ along the first 24 hours after the rising step. As seen before, F_v/F_m decreased from 0.72 to 0.64. But this decrease was not instantaneous, and took about 2 h. Just after the PFD change, YNPQ decreased from 0.07 to 0 and after 4 h, it started to increase to reach 0.09 after 12 h. 24 h after the light increase, YNPQ was found almost equal to 0. It can be noted that the first decreases in F_v/F_m and in YNPQ have the same characteristic times, around 5 hours.

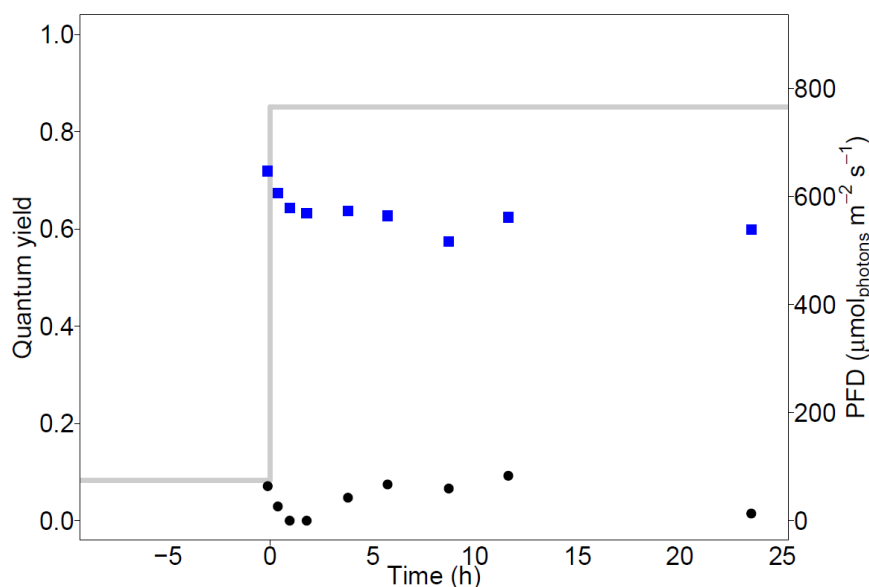


Figure 54 : Changes in F_v/F_m (blue squares) and YNPQ (black circles, left axis) with time during the first 24 hours of the rising PFD step from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis) in *C. vulgaris*

culture. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

3.3.2.3 Falling light step

- Biomass concentration and pigment content

Figure 55 shows the changes in biomass concentration and pigment content over time after the decrease in light from 765 to $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

During the very first hours after the light decrease, no evolution was clearly observed. The biomass concentration remained at the same level, at $1.31 (\pm 0.01, n=5) \text{ g L}^{-1}$ during the first 4 hours, and then it decreased linearly to reach 0.65 g L^{-1} after 50 h ($R^2=0.9924$). This decrease in biomass concentration corresponds to a loss of $0.013 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

After 50 h, the decrease became slower (loss of $0.0045 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Pigment content was found almost constant during the first 12 hours, and stayed between 5.6 and $6.0 \%_{\text{C}_x}$. Then, pigment content started to increase and reached $7.8 \%_{\text{C}_x}$ after 100 h.

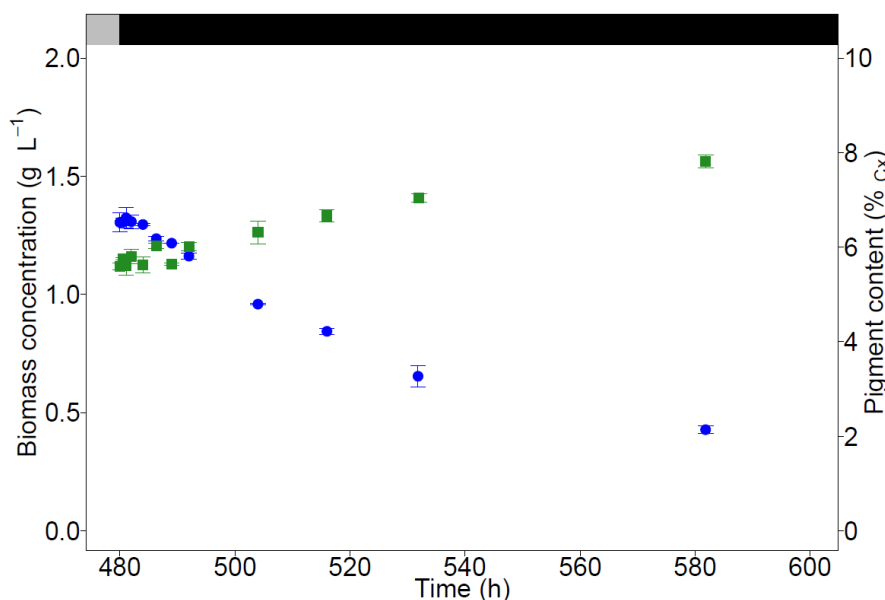


Figure 55 : Biomass concentration (blue circles, left axis) and pigment content (green squares, right axis) of *C. vulgaris* over the time during the first 120 hours after a PFD step from 765 (grey line) to $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (black line). Error bars represent standard deviation ($n=3$). Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

- MRPA values

Figure 56 gives MRPA_{C_x} time evolution. The rate of photon absorption at compensation point (A_c) is also shown (A_c is equal to $2.8 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ g}^{-1} \text{ C}_x \text{ s}^{-1}$ (Souliès *et al.*, 2016)). Below this value, respiration prevails over photosynthesis, resulting in a negative growth.

Just after the PFD decrease, MRPA_{C_x} decreased from 14.4 to $1.4 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ g}^{-1} \text{ C}_x \text{ s}^{-1}$. This value was found below A_c , so at this time, respiration should be predominant. MRPA_{C_x} stayed at this

same level for 6 h. Then it started to increase and reached A_C value, 50 hours after the light decrease. $MRPA_{C_X}$ stabilised around $5 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1}_{C_X} \text{s}^{-1}$ after 150 h at the new PFD level.

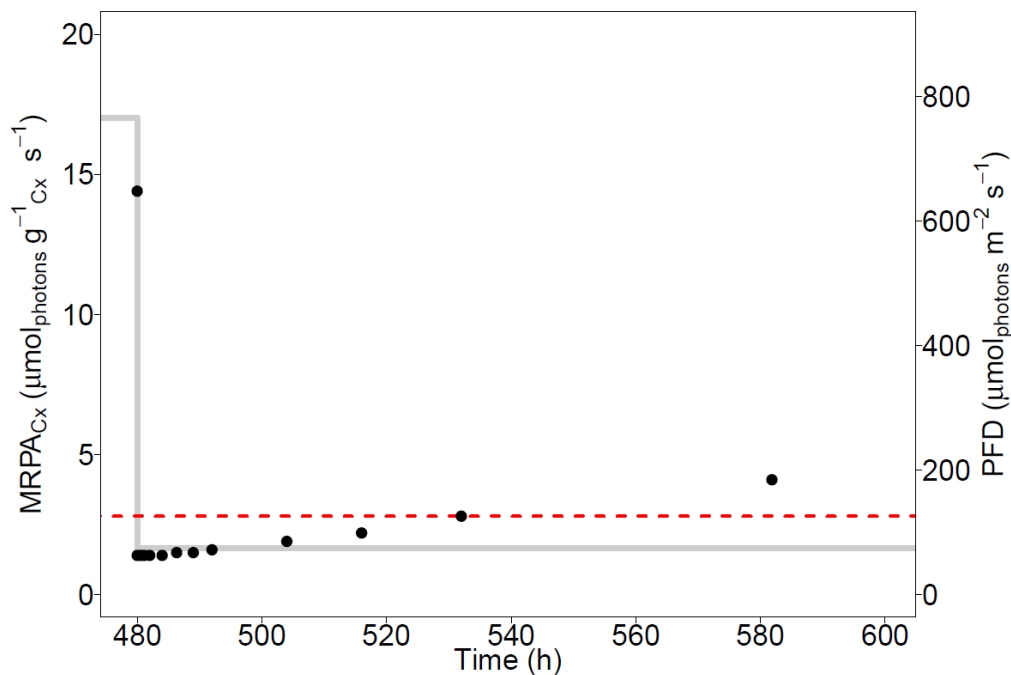


Figure 56 : Biomass specific MRPA (black circles, left axis) over the time during the first 120 hours after a light change from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis) in *C. vulgaris* culture. Dilution rate was 0.02 h^{-1} . The dashed line represents the compensation point A_C , equal to 2.8 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1}_{C_X} \text{s}^{-1}$ (Souliès *et al.*, 2016).

- Photosynthetic parameters

Figure 57 shows the evolution with time of F_v/F_m and YNPQ.

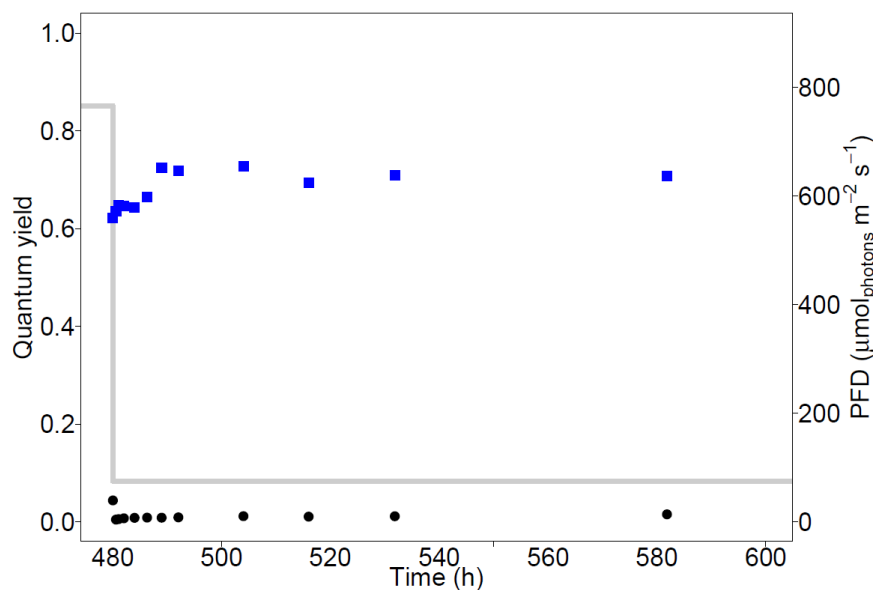


Figure 57 : Changes in F_v/F_m (blue squares) and YNPQ (black circles, left axis) with time during the first 120 hours of a PFD step from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis) in *C. vulgaris*

culture. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

When the incident light decreased, F_v/F_m took 8 h to reach a maximal value, from 0.62 to 0.72. Then it remained almost stable. YNPQ instantly decreased from 0.04 to 0 after the light change, and it stayed at 0 during the whole experiment.

3.3.3 Comparison between model and experimental data for *C. vulgaris* photoacclimation

Experimental and predicted (Section 3.2.5) data of biomass concentrations and pigment contents are compared during the light step transition from 100 to $400 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ on Figure 58.

At the beginning of the light transition, experimental biomass concentration was equal to 0.41 and simulated biomass concentration was equal to 0.40 g L^{-1} (Figure 58.A). Predicted values were found to follow the same dynamics as experimental ones. Experimental and simulated values of biomass concentrations increased and stabilized after 100 hours at the new light level, around respectively $1.17 (\pm 0.07, n = 6) \text{ g L}^{-1}$ and $1.15 (\pm 0.01, n = 4446) \text{ g L}^{-1}$. Very close values were then obtained. During this light step transition, experimental and simulated biomass concentration data showed a Spearman correlation factor of 0.92 (with a p-value of 5.23×10^{-7}). The dynamics of the biomass evolution was then well-predicted by the model. Same conclusion can be obtained for the pigment content. At the beginning of the light transition, experimental value was equal to 7.14 % C_x and it increased to 8.16 % C_x after 30 min at the new light level (Figure 58.B). Simulated pigment content was equal to 6.44 % C_x (its maximal value) from the beginning of the light transition. Then experimental and simulated data decreased and reached a minimal value equal respectively to 5.70 % C_x and 5.65 % C_x after 24 hours at the new light level, and both pigment content values slowly increased and stabilized after 150 hours. Experimental pigment content value reached at the end of the experiment $6.60 (\pm 0.17, n = 5) \text{ \%C}_x$ and simulated pigment content data reached $6.29 (\pm 0.03, n = 3475) \text{ \%C}_x$. For the whole transition, experimental and simulated pigment content data showed a Spearman correlation factor of 0.81 (with a p-value of 1.72×10^{-4}). Except at the beginning of the light transition, the dynamics of the pigment content evolution was well-predicted by the model. However it seems that the amplitude of the pigment content was smaller in simulations than in experiments.

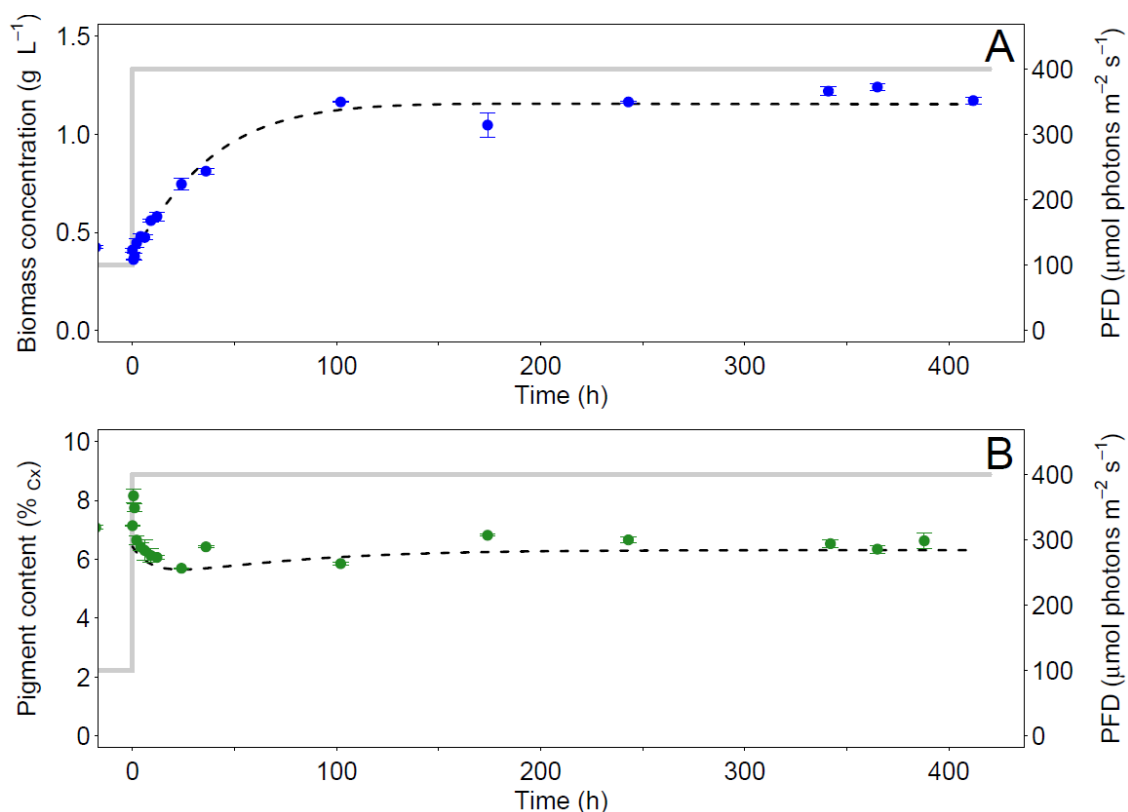


Figure 58 : Model simulations (dashed line) and experimental data (circles) of biomass concentration (A) and pigment content (B) time evolution after a PFD step transition from 100 to 400 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Error bars show standard deviation ($n=3$). Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

Figure 59.A compares experimental and simulated data of biomass concentration during the two successive light transitions from 75 to 765 and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

At the beginning of the first light transition, experimental biomass concentration was equal to 0.28 g L^{-1} and simulated biomass concentration was equal to 0.40 g L^{-1} (Figure 59.A). Then both values increased. Simulated biomass concentration stabilised at 1.71 g L^{-1} after 150 hours at the high light level. As mentioned in section 3.3.2.1, culture was found very unstable experimentally. Biomass concentration seemed to stabilise around 1.45 (± 0.12 , $n=12$) g L^{-1} after 150 to 200 hours at 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Note that experimental data never reached steady state values as observed with prediction.

When the light was set back to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, experimental and simulated biomass concentration values decreased. Experimental data stabilised at 0.34 (± 0.01 , $n=4$) g L^{-1} after 150 hours and simulated data stabilised at 0.42 g L^{-1} after 200 hours at the new light level. A good correlation (Spearman coefficient of 0.97 with a p-value inferior to 2.2×10^{-16}) was found between experimental and simulated data which means that even if the simulated biomass concentration values were always higher than experimental values, dynamics of the biomass

concentration evolution over the time during the two successive light transitions was well estimated by the model.

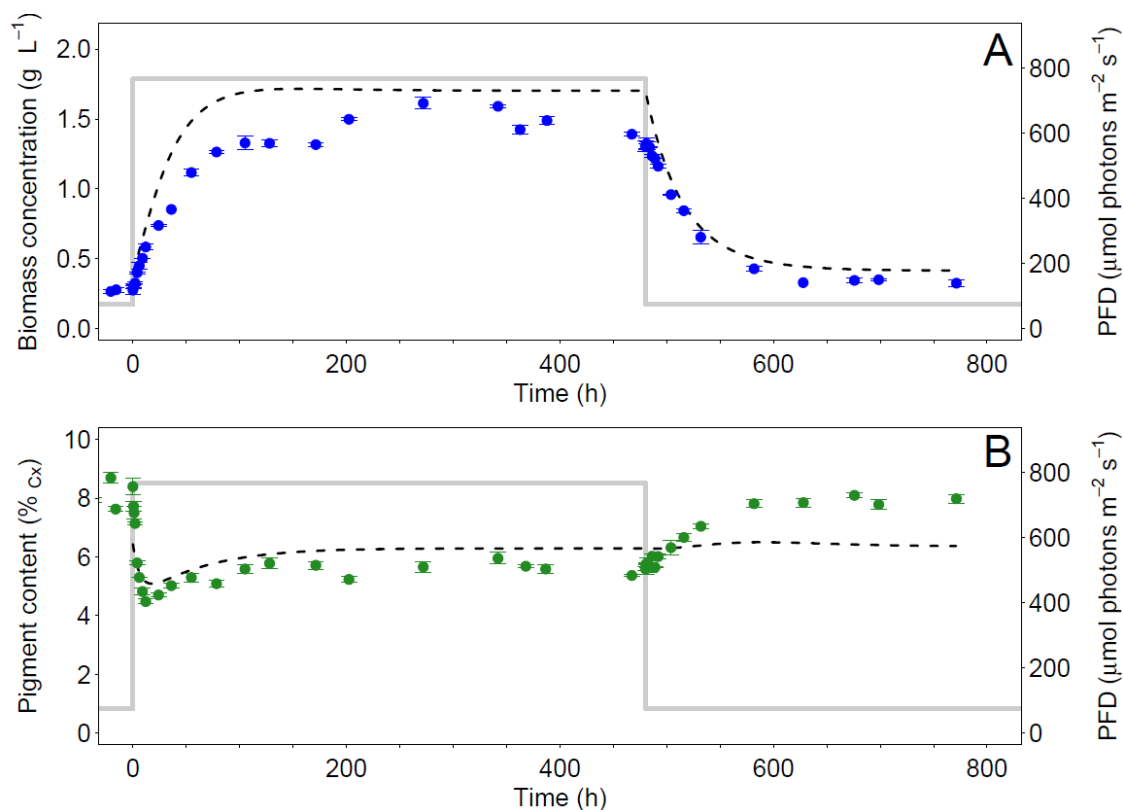


Figure 59 : Model simulations (dashed line) and experimental data (circles) of biomass concentration and pigment content time evolution after two successive PFD step transitions from 75 to 765 and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Error bars show standard deviation (n=3). Dilution rate was 0.02 h⁻¹.

Figure 59.B gives results for the pigment content evolution during the two successive light transitions from 75 to 765 and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

At the beginning of the first light transition from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, experimental pigment content was equal to 8.40 %C_x whereas simulated pigment content was equal to 6.44 %C_x. Then both values decreased to reach a minimum. The minimal experimental value of 4.47 %C_x was reached after 12 hours and the minimal simulated value of 5.09 %C_x was found after 18 hours at the new light level. Pigment content values increased and stabilised after 150 hours at 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Experimental and simulated values respectively reached 5.60 (± 0.22 , n = 9) %C_x and 6.27 (± 0.03 , n = 4321) %C_x. When the PFD was set back to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, experimental pigment content increased and reached 7.93 (± 0.14 , n = 5) %C_x after 150 hours at the new light level. However, simulated pigment content values were not found to be impacted by this PFD decrease.

For the whole experiment, a weak correlation (Spearman factor of 0.74 with p-value of 1.24×10^{-7}) was found between simulated and experiment pigment content values. This is explained by the amplitude of values which is much higher in simulations than in experiments.

As conclusion, our model used to predict the photoacclimation of *C. vulgaris* during light changes was found well adapted to simulate the dynamics of biomass concentration evolution over the time for a culture exposed to light changes. However, compared to experimental values, estimated values were more accurate during the PFD transition from 100 to 400 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ than during the 100 to 800 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ transition. This could be the consequence of phenomena occurring at 800 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ which was not taken into account in the modelling process. They can for example be a lack of nutrients such as microelements or high concentration in dissolved oxygen. About pigment content, in all light transitions, simulated values showed a lower amplitude than experimental values. However, the predicted dynamics of pigment content evolution followed the same trend as the one observed experimentally. A further refinement of the model could certainly improve this aspect.

3.4 Discussion

3.4.1 Use of MRPA to correlate biomass and pigment concentration evolutions

In steady-state cultures under continuous light, a decreasing linear correlation was found between total pigment content and MRPA. The linearity was found for MRPA_{Cx} between 5 and 15 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{g}^{-1}\text{s}^{-1}$. Moreover this correlation was found valid whatever the light attenuation profile, as concentrated cultures (illumination fraction equal to 0.40) led to the same result as diluted cultures (transmittance equal to 0.43). This could be considered a surprising observation because having or not a dark volume in a PBR is well known to result in very different kinetic performances (e.g. averaged growth rate) of the microalgae culture (Acien *et al.*, 2013; Takache *et al.*, 2012). In this study, the light attenuation profile (with or without dark volume) was not found to affect the pigment content in *C. vulgaris*. Only the averaged MRPA was found to have an influence.

It must be noticed also that the linear evolution was not verified for an MRPA_{Cx} over 15 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{g}^{-1}\text{s}^{-1}$. At this high level of MRPA_{Cx} , pigment was found to remain stable at a minimum value of 4 % $_{\text{Cx}}$. It can be suggested that this is the minimal total pigment content which can be obtained in *C. vulgaris* when cultivated in such nutrient-enriched conditions and continuous light.

Under light dynamic conditions, MRPA values were found to have an amplitude larger than under continuous light conditions. Such high MRPA_{Cx} ($> 50 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{g}^{-1}_{\text{Cx}} \text{s}^{-1}$) are often encountered in solar cultures (Pruvost *et al.*, 2017). During the PFD light steps, biomass concentration, pigment content and MRPA_{Cx} were closely linked. In both light transitions, the same stabilization times were observed for these parameters (around 150 hours). Moreover, at the beginning of the rising light transition, a similar evolution of pigment content and MRPA_{Cx} was observed, with a decrease of both parameters. This can be explained by the decrease in pigment content that led to a decrease in the capacity of the cells absorption. As a consequence, less photons were absorbed for the same biomass concentration. Considering MRPA_{pig} instead of the MRPA_{Cx} , it remained at the same level for a few hours after the light increase. This tends to illustrate the relation between MRPA and the pigment changes during photoacclimation, as already observed at steady-state, when a linear evolution between MRPA and pigment content was observed. Under dynamic light conditions, a large variation of MRPA values can be obtained, inducing a pigment content evolution. When expressing MRPA values as a function of pigment content, it tends to reduce the variation of MRPA in contrast to values determined as a function of biomass concentration.

All these results tend to indicate a universal relation between MRPA and pigment content values when *C. vulgaris* is cultivated in continuous light. And when a light step transition is applied, the MRPA changes and the photosynthetic growth in the culture system is disrupted. From this point, both the biomass concentration and the pigment content evolve to reach a new steady-state, in which the relation between MRPA and pigment content is again verified.

As already shown in a previous study (Pruvost *et al.*, 2017), MRPA is an interesting parameter as it enables to relate various quantities such as biomass concentration, pigment content (*i.e.* radiative properties), PFD and PBR design (*i.e.* culture depth). Our result demonstrates the reliability of MRPA as the right coupling quantity between PFD, biomass and pigment concentration, and metabolism. Here, the MRPA was found to govern pigment content of *C. vulgaris* which also influences in turn the resulting MRPA.

3.4.2 Sudden changes in MRPA induce a slow evolution of biomass and pigment concentration

In both PFD transitions (high to low vs. low to high), MRPA values instantly changed after the light change. However the resulting changes in biomass concentration and pigment content remained very slow. In the rising transition the pigment content decreased instantly at a high rate but this decrease was probably accentuated by the dilution rate and biomass increase was

slow during the few first hours. After the PFD decrease, both biomass concentration and pigment content were found to remain at the same values for a few hours. In both transitions, biomass concentration and pigment content took more than 100 hours to stabilize.

Note that the increase in biomass concentration took more time than its decrease. This could be explained by the fact that in continuous chemostat cultures, a dilution rate is applied. As a consequence, to have a marked increase in the biomass concentration in such systems, a large increase in the biosynthesis rate is required and the energetic demand for this increase is high. In both transitions, pigment content stabilized faster than biomass concentration. Times for pigment content stabilization were almost the same after rising or falling light transition. However some authors found that, the pigment dilution is facilitated by the increase in cells doubling, thus the transition during increasing light is supposed to be faster than during the opposite transition (Prézelin *et al.*, 1991). In our case, the lowest value of pigment content was reached 10 hours after the first light change, which was very fast compared to biomass. But because the biomass concentration also increased after the increasing PFD step, the light into the PBR decreased and the pigment content increased again. It could be supposed that this increase needed a synthesis of new pigments; so it took more time than the previous decrease. Contrary to biomass and pigment dynamics, parameters related to photosynthesis were found to respond quickly after both PFD transitions (and MRPA changes). F_v/F_m and YNPQ were found to decrease a few minutes after the light increase. YNPQ increased again after a few hours. A few minutes after the opposite light step transition, YNPQ decreased and YPSII started to increase.

In summary, our study shows that a sudden transition in MRPA led to slow responses of biomass concentration and pigment content (characteristic times in the range of hours). But, on the other hand, it was found a rapid response time of parameters related to photosynthesis. From this, it is deduced that rising and falling MRPA values have a direct impact on photosynthesis but it takes more time for the whole metabolism to respond and adapt to these light changes. This illustrates the short-term and long-term photoacclimation phenomena (Brunet *et al.*, 2011). We can also note that the time to reach a steady-state was superior to one day after both transitions. As a consequence, in actual day-night cycles, microalgae will never have enough time to reach steady-state. In such conditions, cells and culture can be always considered in a transitory regime.

3.4.3 Different biological mechanisms involved between increasing and decreasing PFD transitions

Increasing and decreasing incident lights were found to lead to different response times. This can be explained by the different photosynthetic mechanisms involved during these transitions. When the PFD increased, the main parameters found to change were F_v/F_m and YNPQ. A decrease in F_v/F_m was observed and it became below 0.7. It can be a sign of photoinhibition (Malapascua *et al.*, 2014) which corresponds to a damage of the photosynthetic apparatus leading to a decrease in the photosynthesis efficiency (Kok, 1956; Nixon *et al.*, 2010). So as long as F_v/F_m was low, the microalgae were not able to use the light with the best efficiency to grow. F_v/F_m reached its initial value at the same time as pigment content stabilized. This supposes that the photoacclimation of cells allowed them to recover from photoinhibition.

In parallel, after the light increase, when YNPQ values became a little higher, biomass concentration started to increase with a higher rate and the rate for pigment content decrease was lower. YNPQ was never high but in this experiment, considering the light attenuation, the maximal mean fluence rate was about $300 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. At this level, photoprotection is known to remain low in *C. vulgaris* (Bonnafant *et al.*, 2019; Malapascua *et al.*, 2018). Thus, even being low, YNPQ might have played a role in photoprotection during the first few hours after the light increase.

Note that during the rising PFD transition, no major light stress was observed. Under high light exposure, due to photoacclimation, pigment composition is known to change in *Chlorella vulgaris* and the relative carotenoid content can increase compared to Chlorophyll *a* (Sharma, 2012). But in our study, the composition of pigments remained the same during the whole experiment, which means that no more carotenoids were produced when high light was encountered. The light level applied was probably not high enough to induce the production of carotenoids known to protect the cells against the oxidative stress (Ortega-Villasante *et al.*, 2016).

The mechanisms involved in the decreasing PFD transition were not the same as the ones found in the opposite light transition. Here, the photoacclimation response was mainly due to the limitation of light in the PBR. Indeed, when the PFD decreased, MRPA was found below A_c so the culture was light limited and respiration was predominant. As a consequence, biomass concentration decreased at a high rate, which allows an increase in the light availability for the cells (increase in MRPA). From this point, F_v/F_m reached its maximum value, reflecting the fact that microalgae photoacclimated to the new light conditions, so they were able to use the light

with the best efficiency, as a consequence the rate for biomass concentration decrease became slower.

To conclude, in the two light acclimation (high to low vs. low to high), photosynthetic mechanisms involved were not the same. When the incident light increased, YNPQ indicating that photoprotection probably played a small role, whereas it was not present when the light decreased. F_v/F_m decreased instantly when the light increased but it took several hours to start to increase after the PFD decreased. So under rising light, photoinhibition occurred almost instantly and then photoprotection mechanisms were established for some hours but after decreasing light, no photoprotection was observed and the light received by the cells was probably too low for the photosystem to photoacclimate quickly, and to reach immediately its maximal photochemical yield. It can be added that the dynamics of both biomass concentration and pigment content evolutions were well predicted by the model developed for the photoacclimation of *C. vulgaris*. Photoinhibition and photoprotection mechanisms were not taken into consideration in the model and yet, this model was found reliable enough to represent the photosynthetic response, thus these mechanisms might have a negligible impact for the modeling.

3.5 Conclusion

MRPA proved to be a representative quantity to relate photoacclimation process under light changes. In continuous light conditions, a linear decreasing evolution was found between total pigment content and MRPA for MRPA values inferior to $15 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}_{\text{Cx}}^{-1} \text{s}^{-1}$ regardless the profile of light attenuation. In our experiments, pigment content was never found below 4 % C_{Cx} . In dynamic light conditions, sudden changes in PFD induced slow changes in biomass and pigment concentrations. MRPA was also found here of interest to relate the effect of both phenomena, namely the light received by cells, and their corresponding responses.

After a light change, several biological mechanisms set-up to let the microalgae acclimate to the new conditions. Short-term and long-term responses were observed. A rising PFD step induced photoinhibition and photoprotection mechanisms whereas after a decreasing PFD step, photoprotection was not present and the culture was light limited for a few hours. Consequently, the response times for the photoacclimation were not the same between these opposite transitions. However, the time for biomass concentration and pigment content to stabilize was always found superior to 100 h. As a consequence, in actual Day/Night cycles, cultures are always in a transitory regime. Thus it is necessary to develop tools to monitor and control such cultures.

Chapitre 4. Intérêt de l'utilisation de la fluorescence de chlorophylle *a* de type PAM pour le suivi de cultures en photobioréacteurs solaires

Résumé :

En culture solaire de micro-algues, les cellules subissent diverses dynamiques dues directement (ex : lumière, température) ou indirectement (ex : changements de la concentration d'oxygène dissous ou de nutriments dus aux variations des taux de croissance photosynthétique) aux cycles jour/nuit et aux changements des conditions météorologiques. Ces variations peuvent avoir un impact sur l'efficacité de la photosynthèse et donc sur la croissance des cellules. Pour se protéger contre les fortes intensités lumineuses, les micro-algues peuvent présenter des mécanismes de photoprotection qui visent à dissiper l'excès d'énergie. Dans un objectif de suivi de culture solaire, il est possible d'utiliser des mesures de fluorescence de la chlorophylle *a*, une méthode non invasive permettant de mesurer en ligne plusieurs paramètres tels que la concentration en chlorophylle *a* et la vitesse de photosynthèse. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'utilité de l'utilisation de la fluorescence de la chlorophylle *a* de type PAM dans l'optimisation des cultures de *Chlorella vulgaris* en PBR solaire, en combinant cette technique avec des modèles de transferts radiatifs et en comparant les mesures en ligne et hors ligne. La fluorescence de type PAM s'est avérée intéressante pour la détection des cellules stressées (ex : limitations en nutriments, accumulation d'oxygène dissous) et pour obtenir des informations sur le taux de croissance (ex : la productivité). En outre, cette technique s'est avérée pertinente pour les études physiologiques visant à mesurer les réponses dynamiques aux changements environnementaux.

Interest of using chlorophyll *a* PAM fluorescence to monitor solar photobioreactors

Abstract :

In solar microalgal cultures, cells experience various dynamics as a direct (*e.g.* light, temperature) or indirect (*e.g.* changes in dissolved oxygen or nutrient concentrations due to variations in photosynthetic growth rates) effects of the diurnal cycles and changes in weather conditions. These variations can impact the photosynthesis efficiency and thus the cells growth. To protect themselves against high light, microalgae can display photoprotection mechanisms that aim at dissipating excess energy. In a monitoring objective of solar cultures, it is possible to use chlorophyll *a* fluorescence measurements, a non-invasive method allowing the online measurement of several parameters such as chlorophyll *a* concentration and photosynthesis rates. The objective of this study is to evaluate the utility of using PAM chlorophyll *a* fluorescence in the optimisation of *Chlorella vulgaris* cultures in solar PBRs, by combining this technique with radiative transfer models and by comparing off-line and online measurements. The PAM fluorescence was found interesting in the detection of stressed cells (*e.g.* nutrient limitations, oxygen over accumulation) and to have information on the growth rate (*e.g.* productivity). Furthermore this technique was found relevant for physiological studies to measure the dynamic responses to environmental changes.

4.1 Introduction

Microalgae mass cultivation usually occurs in solar conditions. These systems can be open ponds or they can be closed photobioreactors (PBRs) in order to limit contaminations (Tredici, 2007). Whatever the system, microalgae are subject to environmental dynamic conditions. First, sunlight will continuously change over the course of the day and cells might, for example, undergo excessive light exposure, especially around midday when the sunlight is very high (Vonshak and Torzillo, 2007).

Microalgae have developed several acclimation processes and photoprotection mechanisms to these light changes, such as alternative electron cycles or regulated dissipation of energy as heat (Asada, 2000; Goss and Lepetit, 2015; Kargul and Barber, 2008; Prasil *et al.*, 1996). Then in solar culture systems, temperature of cultures can also vary significantly. Namely, it can reach high values during the day and decrease during the night (Goetz *et al.*, 2011; Pruvost *et al.*, 2019). Low temperature is known to exacerbate photoinhibition whereas high temperature degrades proteins leading to the cell death (Murata *et al.*, 2007; Serra-Maia *et al.*, 2016). Additionally, high dissolved oxygen concentrations can occur, being toxic for cells and inducing photorespiration mechanisms that can result in a decrease in growth rate and productivity (Kazbar *et al.*, 2019; Kliphuis *et al.*, 2011).

Optimisation of solar cultures operation is mandatory to maintain the best productivity achievable in given outdoor conditions. Monitoring tools are here of primary relevance. PAM chlorophyll *a* fluorescence is a non-invasive technique which allows the measurement of several photosynthetic parameters. When light energy arrives to light-harvesting complex (LHC) of chloroplasts, it will be directed either for photochemistry, released as heat or re-emitted as fluorescence (Consalvey *et al.*, 2005). Using the measurement of the amount of emitted fluorescence, it is possible to extract information about the oxidation state of electron acceptors in the photosystem II (PSII) (Kolber and Falkowski, 1993). With this information, the quantum yield for photochemical energy conversion in PSII (YPSII) or the quantum yield of regulated non-photochemical energy loss in PSII (YNPQ) can be calculated (Klughhammer and Schreiber, 2008).

YPSII is affected by processes occurring in the light-harvesting antennae, in the PSII reaction centers and downstream of the PSII. YPSII will typically decrease with increasing light and also when non-optimal conditions are experienced by the photosynthetic organism (Kromkamp and Forster, 2003). Using PAM chlorophyll *a* fluorescence, it is also possible to estimate chlorophyll *a* concentrations and relative electron transport rates, which are usually correlated

to oxygen productivities (Kolber and Falkowski, 1993; Kromkamp and Forster, 2003; Perkins *et al.*, 2010; Suggett *et al.*, 2003).

PAM chlorophyll *a* fluorescence is currently mainly used in physiology studies, but it has also been used to study algae cultures grown under solar conditions (Figuerola *et al.*, 2013; Malapascua *et al.*, 2018; Malapascua *et al.*, 2014; Ralph *et al.*, 2010; Torzillo *et al.*, 1996).

The objective of this study is to evaluate the utility of using PAM chlorophyll *a* fluorescence in the optimisation of microalgae cultures in solar PBRs, by comparing off-line and online measurements. By combining this technique with radiative transfer models enabling to determine light attenuation conditions (Cornet *et al.*, 1995; Pottier *et al.*, 2005; Pruvost and Cornet, 2012), the use of PAM chlorophyll *a* fluorescence will be extended for the determination of the photosynthesis efficiency and for the estimation of kinetic values such as photosynthetic growth rate in optically dense cultures representative of biomass productions in PBRs. The green microalga *Chlorella vulgaris* will be used as a model species.

4.2 Materials and methods

4.2.1.1 Culture protocol

4.2.1.2 Strain and medium

Pre-cultures of the strain *Chlorella vulgaris* CCAP 21.119 were set up following the same protocol as explained in Chapter 3.

For the experiments described in this chapter, *C. vulgaris* was grown in Sueoka medium supplemented with Hutner solution (Souliès *et al.*, 2016; Sueoka, 1960) (Appendix 2). Nutrients were added in excess, so that *C. vulgaris* was only light limited (Kazbar *et al.*, 2019; Souliès *et al.*, 2016).

4.2.1.3 Cultivation system

C. vulgaris was grown using the torus-shaped PBR model described in Chapter 3, equipped with a Pulse Amplitude Modulated (PAM) chlorophyll *a* fluorescence sensor (MicroPAM, Walz, Germany). The PAM fluorometer was used to carry out all online measurements of photosynthetic parameters. The PAM fluorescence measurements were carried out using an optical fibre in contact with the optical front surface of the PBR (Figure 60). In the light transition experiments, the PBR was also equipped with a micro Gas Chromatographer (490 Micro GC, Agilent Technologies, USA) for online measurements of gas concentrations at the PBR outlet.



Figure 60 : Photograph of the PAM sensor, used to measure the Chlorophyll *a* fluorescence at the PBR surface.

Cultures were carried out in continuous chemostat mode and an artificial incident PFD with a white light spectrum was provided by a LED panel (BioConcept Technologies, France), calibrated with a quantum sensor (Li-COR 250A, USA). Mechanical agitation was provided with a marine impeller. Temperature was maintained at 25 °C by automatic water cooling, pH was measured (InPro 3253i Mettler Toledo, USA) and maintained at 7.5 with CO₂ injection and dissolved oxygen concentration was measured (InPro 6860i Mettler Toledo, USA) and controlled by automatic N₂ bubbling. Both pH and oxygen concentration were regulated with a Proportional Integral Derivative (PID) controller (Ifrim *et al.*, 2014; Titica *et al.*, 2018). All regulations were done by using Labview software (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench, National Instrument, USA) and data were recorded online.

4.1.1.1 Incident light regimes

To study the interest of using the PAM chlorophyll *a* fluorescence in solar microalgae cultures, two different light regimes were imposed to *C. vulgaris* cultures: two successive light step transitions and a typical solar cycle.

- Light step transitions

Two successive incident photon flux density (PFD) step transitions were applied on a *C. vulgaris* culture (Figure 61). A first steady-state (*i.e.* constant biomass concentration) was reached for a constant PFD equal to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, then light was increased to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ until a second steady-state was reached at this PFD, and then finally decreased again to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ until a third steady-state was reached.

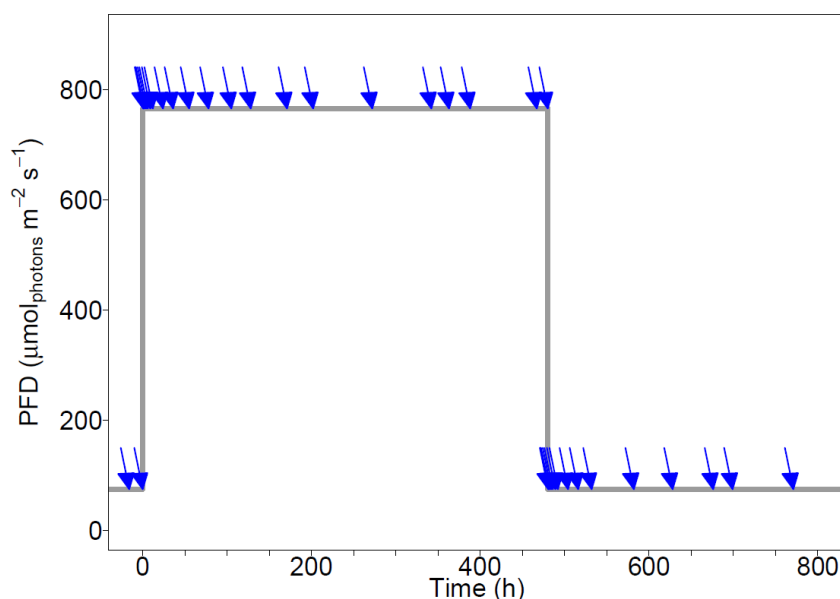


Figure 61 : Light step transitions applied onto the culture, arrows indicate culture sampling times. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

Samples were taken immediately after each light change, and then regularly but more temporally spaced until the next light transition. For each sample, about 30 mL of culture were taken and used for off-line analyses (see section 4.2.2). During this experiment, dilution rate was 0.02 h^{-1} . After each sampling, the harvest pump was stopped until the culture reached back its volume before the sampling. With this protocol, no dilution was done following the sampling.

- Typical solar cycle

Typical Day/Night cycles were applied to a *C. vulgaris* culture by using a controlled LED panel to mimic a solar cycle (Figure 62). A high dilution rate of 0.04 h^{-1} was imposed to the culture to reduce light attenuation so as to exhibit light saturation phenomena onto the cells.

Light was on for 12 hours (from 7.00 am to 9.00 pm) and incident PFD reached its maximum of $722 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ at 1.00 pm. 30 mL samples were regularly collected for off-line analyses (see section 4.2.2). After each sampling, the harvest pump was stopped until the culture reached back its volume before the sampling. With this protocol, no dilution was done following the sampling.

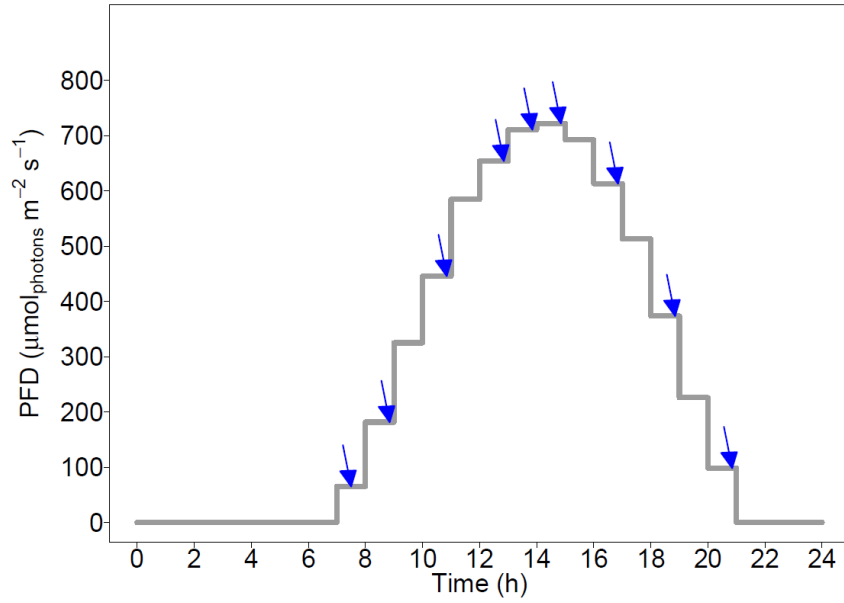


Figure 62 : Light cycle applied onto the culture, arrows indicate culture sampling times. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

4.2.2 Off-line analyses

Inorganic carbon, biomass, chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoid concentration were determined following the protocols described in Chapter 3. Briefly, inorganic carbon was measured with a total carbon analyzer (TOC-L, Shimadzu, Japan). Biomass concentration was determined by measuring dry matter. Pigments were extracted in methanol, and their absorbance measured with a spectrophotometer (Jasco V-630, France). Their concentration was determined using equations given by Ritchie (2006).

4.2.3 Determination of the fluence rate inside the PBR

Radiative transfer models were developed to predict the light quantity in PBRs (Cornet *et al.*, 1995; Pruvost and Cornet, 2012).

A two-flux radiative transfer model was used to determine the spectral value of fluence rate $G_{\lambda}(z)$ (in $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) for a given depth of culture z (Pottier *et al.*, 2005).

Chlorella vulgaris radiative properties of mass absorption cross-section Ea_{λ} (in $\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$), mass scattering cross-section Es_{λ} (in $\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$) and backward scattering ratio b_{λ} were function of the pigment content. They were obtained according to the protocol of Kandilian *et al.* (2016).

Averaged fluence rate G_{mean} was calculated by integrating $G_{\lambda}(z)$ over the Photosynthetically Active Radiations (PAR) and the PBR thickness L :

$$G_{\text{mean}} = \frac{1}{L} \int_{\text{PAR}} \int_0^L G_{\lambda}(z) dz d\lambda \quad (4-1)$$

4.2.4 Determination of parameters related to photosynthesis

4.2.4.1 *Protocol for online PAM chlorophyll *a* fluorescence determination*

Online PAM chlorophyll *a* fluorescence was measured over the time onto the optical surface of the PBR. Minimum fluorescence yield in the light acclimated state (F') was measured and recorded every 5 min. At the same period, a 0.6 s saturating flash of $9000 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was applied to measure the maximum fluorescence yield in the presence of light (F_m').

During the experiments, in order to fully oxidise PSII reaction centers and to be able to measure the minimal fluorescence yield in dark (F_o) and the maximal fluorescence yield in the dark (F_m), after each sampling, light was turned off for 10 to 15 minutes (Consalvey *et al.*, 2005). During this dark period, F_o was recorded every 5 min and a saturating flash was applied just after F_o measurement to measure F_m . Missing values of F_o and F_m were obtained from the interpolation of the two surrounding measurements.

4.2.4.2 *Protocol for off-line chlorophyll *a* PAM fluorescence measurements*

Off-line PAM chlorophyll *a* measurements were obtained using a PAM fluorometer (WaterPAM, Walz, Germany). Immediately after each sampling, some culture was diluted in Sueoka medium in a quartz cuvette so that the fluorescence yield was close to 200 units (Heinz Walz GmbH, 2001). The dilution depended on the chlorophyll *a* concentration. The culture was left for 10 to 15 minutes in darkness in order to allow PSII reaction center total oxidation.

After dark acclimation, a rapid light curve (RLC) was applied on the culture (Perkins *et al.*, 2010) with eight incremental light levels, *i.e.* 0, 75, 109, 165, 245, 346, 479, 773 and $1127 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. After 1.5 min exposure to each light level, a saturating flash was applied for 0.8 s to close all open reaction centers. After each light level the following parameters were measured: F' , F_m' , F_o (at the 1st measurement) et F_m (at the 1st measurement).

4.2.4.3 *Calculations of photosynthetic parameters*

Based on PAM chlorophyll *a* fluorescence (online and off-line), various quantities were determined.

- PSII quantum yield for photochemical energy conversion in PSII (YPSII) was calculated as follows (Klughammer and Schreiber, 2008):

$$\text{YPSII} = \frac{F_m' - F}{F_m'} \quad (4-2)$$

- PSII quantum yield of regulated non-photochemical energy loss (YNPQ) was calculated as follows (Klughammer and Schreiber, 2008):

$$\text{YNPQ} = \frac{F}{F_{m'}} - \frac{F}{F_m}. \quad (4-3)$$

- Relative electron transport rate in PSII ($\text{rETR}_{\text{PSII}}$) was calculated as follows (Perkins *et al.*, 2010):

$$\text{rETR}_{\text{PSII}} = \text{YPSII} \times \text{PFD} \times 0.5. \quad (4-4)$$

The factor 0.5 is added based on the assumption that 50 % of absorbed light goes to the photosystem I (PSI), 50 % goes to PSII, and no cycle occurs in PSI (Gilbert *et al.*, 2000). This ETR is only relative because the absolute absorption cross section of cells is unknown. Consequently, rETR units are arbitrary (Suggett *et al.*, 2003).

In order to calculate an absolute ETR in PSII (ETR_{PSII}), it was chosen to use the mean irradiance (G_{mean}) measured in the PBR because it relates to the fluence rate which is actually available for the microalgae. Moreover, it was necessary to add a parameter describing the light absorption cross section of photosynthetic pigments normalized to chlorophyll *a* (a^*_{Chla} , in $\text{m}^2 \text{mgChla}^{-1}$). Knowing this parameter, ETR_{PSII} can be calculated as follows (Kromkamp and Forster, 2003):

$$\text{ETR}_{\text{PSII}} = a^*_{\text{Chla}} \times \text{YPSII} \times 0.5 \times G_{\text{mean}}. \quad (4-5)$$

This ETR_{PSII} is expressed per unit of chlorophyll *a* ($\mu\text{mole} \cdot (\text{mgChla})^{-1} \text{s}^{-1}$).

In this study, the mass absorption cross-section E_a (in $\text{m}^2 \text{kgC}_x^{-1}$), which can be obtained from radiative properties determination (Kandilian *et al.*, 2016), was used instead of a^*_{Chla} , to calculate ETR. So the expression became:

$$\text{ETR}_{\text{PSII}} = \frac{E_a}{w_{\text{pig}} \times 10^6} \times \text{YPSII} \times 0.5 \times G_{\text{mean}}, \quad (4-6)$$

with w_{pig} being the pigment content (in % of dry weight biomass) of the culture.

4.2.5 Determination of the rate of O_2 production (r_{O_2})

The rate of O_2 production (r_{O_2}) was estimated using two different methods. First, from PAM chlorophyll *a* fluorescence measurements and secondly, calculated with gas mass balance.

The calculation of O_2 production rate from PAM chlorophyll *a* fluorescence ($r_{\text{O}_2}^{\text{PAM}}$) is based on ETR determination. However ETR takes into account the transfer of electrons in PSII when r_{O_2} is related to O_2 production in the PBR. So it is necessary to know the quantic yield for O_2 formation (Φ_e).

Knowing this, $r_{O_2}^{PAM}$ could be calculated as follows (Kromkamp and Forster, 2003; Suggett *et al.*, 2003):

$$r_{O_2}^{PAM} = E_a \times YPSII \times 0.5 \times G_{mean} \times \Phi_e \times 3600 \times 10^{-6} \times C_x. \quad (4-7)$$

The calculation of O_2 production rate is expressed in $mol_{O_2} m^{-3} h^{-1}$. The factor 3600 allows the conversion of s^{-1} to h^{-1} . The factor 10^{-6} is for the conversion of μmol to mol of electrons. This expression is multiplied by the biomass concentration (C_x) to express oxygen productivity per volume unit instead of biomass unit. In theory, if electrons acceptors are not saturated, the transfer of four electrons is necessary to produce one molecule of O_2 . In this case, Φ_e is equal to 0.25. But when photosynthesis is saturated, because of the presence of alternative electron cycles, this ratio decreases (Kolber and Falkowski, 1993). In literature, Φ_e was found to range between 0.05 and 0.12 $mol_{O_2}(mol_e)^{-1}$ in *C. vulgaris* (Ley, 1987; Suggett *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2006). Therefore, in this study it was chosen to use 0.12 as Φ_e .

The rate for oxygen production $r_{O_2}^{gas}$ was also calculated from gas mass balance using data from the gas mass flow meters, the dissolved oxygen sensor and the micro gas chromatography measurements (Urbain, 2017).

Considering the biological production, a gas mass balance was established for O_2 :

$$\frac{G_{out}}{V_r} (y_{in}(O_2) - y_{out}(O_2)) = \frac{dC_{O_2}}{dt} - r_{O_2}^{gas} - D(C_{in}(O_2) - C(O_2)), \quad (4-8)$$

with :

- $\frac{G_{out}}{V_r} (y_{in}(O_2) - y_{out}(O_2))$, the dioxygen transferred from the PBR to gas phase (in $mol_{O_2} m^{-3} h^{-1}$). G_{out} is the molar flow rate of gas at the outlet of the PBR and $y_{in}(O_2)$ and $y_{out}(O_2)$ are respectively the molar fraction of O_2 in and out of the reactor;
- $\frac{dC_{O_2}}{dt}$, the accumulation of dissolved oxygen in the PBR;
- $r_{O_2}^{gas}$, the rate of volumetric oxygen production (in $mol_{O_2} m^{-3} s^{-1}$);
- $D(C_{in}(O_2) - C(O_2))$, the dissolved oxygen supplied and removed by dilution with new medium. D is the dilution rate applied to the culture.

In experiments, only N_2 and CO_2 were supplied to the culture so $y_{in}(O_2)$ was equal to 0 and the culture medium was considered saturated in O_2 . Furthermore $\frac{dC_{O_2}}{dt}$ was found far below $\frac{G_{out}}{V_r} (y_{in}(O_2) - y_{out}(O_2))$ so this term became negligible. Thus, the rate of oxygen production was calculated as :

$$r_{O_2}^{gas} = \frac{G_{out}}{V_r} y_{out}(O_2) + (D \times (C_{sat}(O_2) - C(O_2))), \quad (4-9)$$

with $C_{\text{sat}}(\text{O}_2)$ the molar saturation concentration of O_2 and $C(\text{O}_2)$ the molar concentration of dissolved oxygen in the culture.

In Eq. 4-7, $r_{\text{O}_2}^{\text{PAM}}$ was determined with the assumption that 0.12 molecules of O_2 was produced with 1 electron transfer (Φ_e). If Φ_e is removed from Eq. 4-7, the number of electron transfers is then calculated (in $\text{mol}_e \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$). As, the number of O_2 molecules produced in the same time can be calculated from $r_{\text{O}_2}^{\text{gas}}$, the quantum yield for oxygen production (in $\text{mol}_{\text{O}_2} \text{mol}_e^{-1}$) can be estimated as follows:

$$\bar{\varphi}_{\text{O}_2|e^-} = \frac{\Phi_e \times r_{\text{O}_2}^{\text{gas}}}{r_{\text{O}_2}^{\text{PAM}}}. \quad (4-10)$$

Φ_e is determined from literature whereas $\bar{\varphi}_{\text{O}_2|e^-}$ is experimentally estimated.

- Chlorophyll *a* concentration

PAM minimal fluorescence yield (F_0) is directly related to chlorophyll *a* concentration (Huot and Babin, 2010), thus chlorophyll *a* concentration was estimated online from F_0 measurements. A calibration curve was established for that purpose between F_0 and chlorophyll *a* concentration ($[\text{Chla}]$) during a preliminary experiment. This relationship was found approximatively linear between 17 to 50 mg of chlorophyll *a* per liter (Figure 63). The equation for calibration was:

$$F_0 = 1.79 [\text{Chla}] + 95.1. \quad (4-11)$$

In all experiments, chlorophyll *a* concentration was thus determined from F_0 using Eq. 4-11. It must be noted that fluorescence measurements are sensitive to the sensor position on the PBR optical surface. Thus the sensor was always placed at the position that was used to determine the calibration equation.

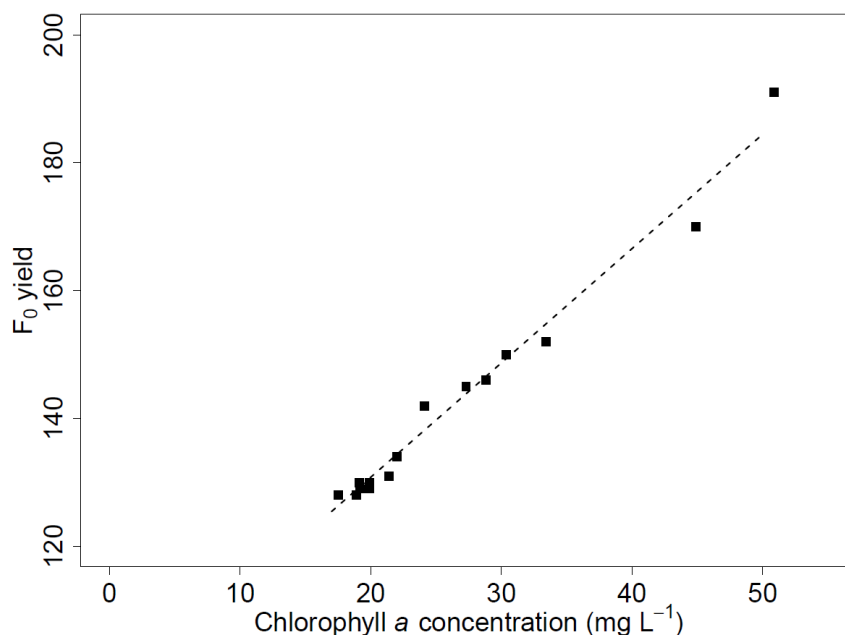


Figure 63 : Calibration curve between F_0 and chlorophyll *a* concentration. The equation is $F_0 = 1.79 [\text{chl}a] + 95.1$ and $R^2 = 0.9805$.

4.2.5.1 Comparison between online and off-line PAM fluorescence measurements

Online PAM chlorophyll *a* measurements were carried out onto the optical surface of the PBR, which will experience different light levels than the PBR core. YPSII is strongly affected by light intensity, which is not the same in the whole PBR decreasing from the border to the interior depending on the amount of self-shading. Thus, cells are also subject to Light/Dark cycles (L/D cycles) when they are mixed along this light attenuation field (Pruvost *et al.*, 2008). When light increases, the YPSII decreases because more light will be directed to non-photochemical pathway. So if the response time of chlorophyll *a* fluorescence sensor is less than the period of an L/D cycle, the YPSII measured at the optical surface of the PBR could be inferior to the averaged YPSII of the whole culture. To estimate such a bias, online PAM chlorophyll *a* fluorescence measurements were compared to off-line measurement on diluted culture at the actinic light of the RLC equal to G_{mean} .

4.2.6 Data analyses

To measure data correlation, a Spearman factor combined with a p-value was calculated. The following R packages were used for data analyses : g.data (Brahm, 2013), minpack.lm (Elzhov *et al.*, 2016), ggpubr (Kassambara, 2017) and shape (Soetaert, 2018).

4.3 Results and discussion

4.3.1 Comparison between online and off-line PAM chlorophyll *a* fluorescence measurements

4.3.1.1 *YPSII measurements*

Figure 64.A shows the comparison of online and off-line YPSII measurements over time during a typical solar light cycle. Online and off-line YPSII measurements were found significantly correlated with a Spearman correlation coefficient of 0.93 and p-value of 4.6×10^{-12} , calculated over three days of experiment. It was then concluded that online YPSII was satisfactory. As online YPSII was found equal to off-line YPSII measured for an actinic light equal to G_{mean} of the PBR, it could be hypothesized that the measurement at the optical PBR surface corresponds to the averaged YPSII value inside the PBR.

Moreover, the light from the LED panel was not found to impact the chlorophyll *a* fluorescence online measurement. It influenced YPSII value but this value was found the same when measured online or off-line. It can then be supposed that if this online PAM fluorescence sensor is used for solar PBR, same behaviour will be obtained under solar light. It should also be noted that off-line measurements were done in diluted cultures, whereas online measurements were done in concentrated cultures. Both measurements being found similar, it could be assumed that this PAM sensor could be used in concentrated cultures as it is usually found in culture systems such as PBRs (Pruvost and Cornet, 2012).

Regarding online YPSII, it was found to respond well to the dynamics of incident light level. It followed the expected pattern of decreasing with increasing incident light and increasing with decreasing light levels (Figure 64.A). YPSII values at the end of the day were similar to the ones observed at the beginning of the day. Thus values started at $0.624 (\pm 0.020, n=55)$ decreasing to a minimum of 0.28 at $722 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, also corresponding to maximum PFD, and increased again at the end of the day to $0.621 (\pm 0.025, n=84)$.

In Figure 64.B, online and off-line measurements of YPSII are also compared for the two successive PFD step transitions from 75 to $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, and from 765 to $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. During the first steady-state at $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, online YPSII was equal to $0.648 (\pm 0.022, n=123)$. When the PFD increased to $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, online YPSII was found to decrease to 0.394. The high values of online YPSII (over 0.6) which are observed under high light on Figure 64.B, were obtained after turning off the light for a few minutes to measure fluorescence values in darkness (see section 4.2.4.1). Online YPSII was found to reach

a minimal value of 0.22 after 31 hours at $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Then it oscillated and stabilized around $0.397 (\pm 0.027, n=807)$ after 400 h. The online YPSII variability could be explained by the activation of photo-protection and photo-acclimation mechanisms during the long time exposure. 12 hours after the PFD step back to $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, online YPSII was found to reach 0.663. Then it progressively decreased to 0.606 at the end of the experiment.

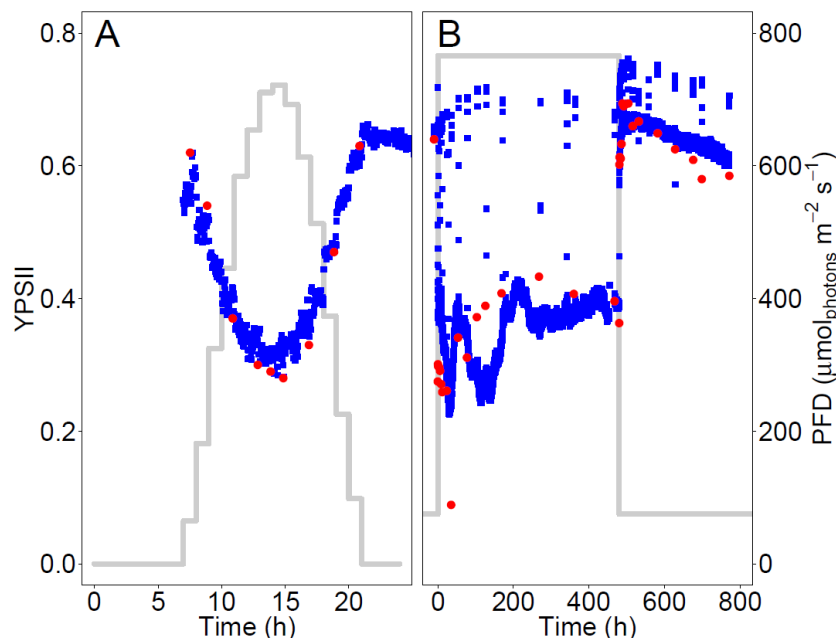


Figure 64 : YPSII (Left axis) measured over the time during a light cycle (A) and during two successive light transitions (B) (Grey lines, right axis). Blue squares show on-line measurements and red circles show off line measurements. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

The online and off-line values showed a Spearman correlation factor of 0.80 with a p-value of 1.0×10^{-8} . The correlation between both values is less significant than during the solar type cycle. In particular, online and off-line YPSII between the 100th and the 200th hour after the first light change were found to be different. During this period, off-line measurements were higher than online measurements. This can be explained by the protocol used for off-line measurements. Indeed, a dilution with new fresh medium is necessary to obtain dilute conditions for PAM measurements. If the decrease in online YPSII is the result of a lack of carbon or a high concentration in dissolved dioxygen, this decrease would not be seen off-line because of the addition of fresh medium. Thus, compared to off-line measurement, the advantage of online YPSII is that it relates to the photosynthesis efficiency in the PBR culture conditions without a potential bias due to the dilution in a new fresh medium for off-line measurements.

Good estimation of YPSII is very useful in controlling the photosynthetic status of a microalgal culture. Most of the studies using PAM chlorophyll *a* fluorescence use the maximal quantum

yield for photochemical conversion of light energy (F_v/F_m) to infer about photosynthesis efficiency or evaluate if the culture is stressed (Borowitzka and Vonshak, 2017; Masojídek *et al.*, 2010). However, F_v/F_m is measured in a dark-acclimated state and only takes into consideration processes occurring in light-harvesting antennae and reactive centers, while YPSII measures operational PSII quantum efficiency taking into consideration processes which occur in the photosynthetic apparatus after PSII. In particular, the ratio of closed PSII and the amount of non-photochemical quenching of fluorescence, both influenced by the light applied to the culture, have also an impact on YPSII (Kromkamp and Forster, 2003).

It can be concluded from this part that the online PAM fluorescence sensor was found efficient in measuring YPSII values and it revealed well suited for the PBR used in the study which was operated in representative conditions of a usual biomass production in PBR (*i.e.* optically dense culture). To measure YPSII continuously without having to sample the cultures for off-line measurements has considerable advantages for an objective of microalgal culture monitoring.

4.3.1.2 YNPQ measurements

Figure 65 shows online and off-line measurements of the quantum yield of regulated thermal energy dissipation (YNPQ) over the time during a light transition from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Online YNPQ was found equal to 0.028 (± 0.004 , $n=123$) before the rising PFD step transition. Then it increased to reach a maximum of 0.144 after 13 hours, decreased again and oscillated between 0 and 0.060 during the next 150 hours.

Over the same period, even if online and off-line YNPQ measurements followed the same trend, no correlation was observed between both measurements (Spearman factor of 0.42 with a p-value of 0.011). Several causes could explain this lack of correlation. First, YNPQ values were lower than 0.15 during the whole experiment so the amplitude of measurements was small and, with the few off-line values obtained, it was difficult to compare accurately online and off-line measurements. Secondly, in order to properly measure YNPQ it is necessary to obtain a measurement of maximum fluorescence yield when all PSII reaction centers are open (F_m), which can only be obtained after a dark-acclimation period, the duration of which depending on previous light history (Kalaji *et al.*, 2014; Perkins *et al.*, 2010). Thus, to get online YNPQ, the light of the LED panel was artificially turned off for 15 min after each sampling, and missing F_m values were obtained by interpolation between two surrounding measurements. It is possible that the dark period was not long enough to allow the total opening of reaction centers.

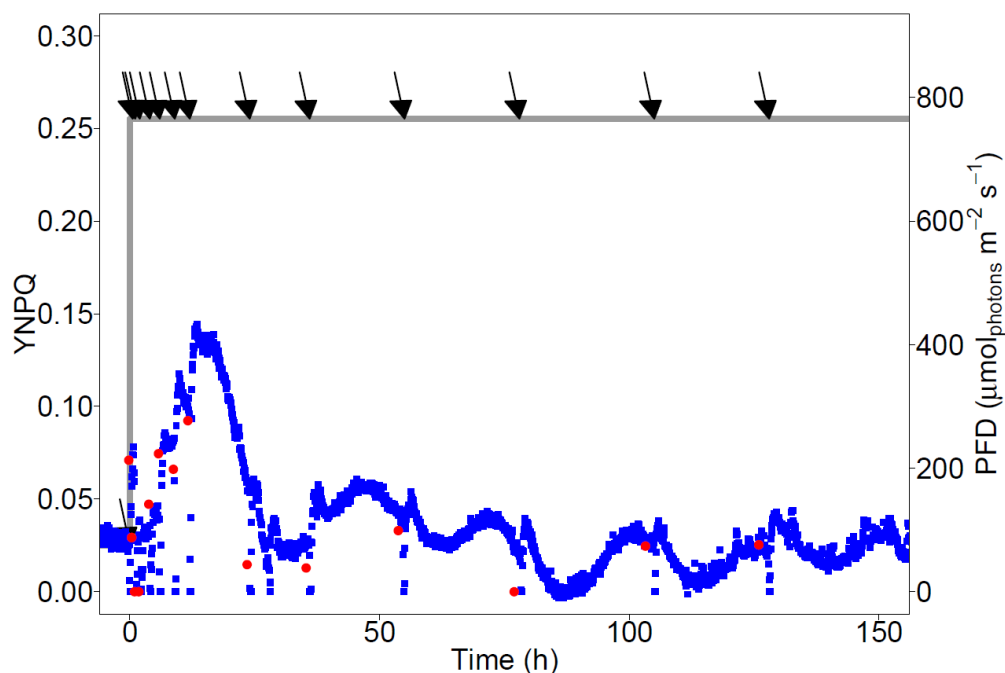


Figure 65 : YNPQ (left axis) over the time during a light transition from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis). Blue squares show online measurement and red circles show offline measurements. Arrows show sampling times and 15 min dark periods. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

Furthermore, after each dark period, YNPQ measured online increased and then decreased. Even 100 h after the light change, online YNPQ was not yet stable. It was clear that dark periods had an impact in YNPQ values over the course of the experiment. However, considering the global trend, it looks like YNPQ decreased over the course of the period of light exposure at 800 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The microalgae divided and became photoacclimated to the new light conditions by decreasing the size of their LHC antennae (Brunet *et al.*, 2011).

Even if it is difficult to get YNPQ by online measurement, it is a relevant parameter because it is directly related to the capacity of the cells to photo-regulate effectively under high light. But in actual solar conditions, turning-off the light onto the PBR will not be possible obviously. Therefore, with the objective of monitoring YNPQ in solar PBRs, F_m was measured before exposure to light and after the end of the luminous period. Interpolated values between these two measurements were used as the reference F_m over the course of the simulated day (Figure 66.A). At the beginning of the day, online YNPQ was null whereas off-line YPSII was equal to 0.03. From 8.00 am, when the PFD was equal to 181 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, online YNPQ started to increase and reached its maximum of 0.21 at 3.00 pm under 692 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Maximal off-line YNPQ of 0.16, was reached at 1.00 pm under 771 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. After reaching their maximum, online and off-line YNPQ were found to progressively decrease to reach 0 at the end of the light period. A Spearman correlation of 0.93 with a p-value of 7.5×10^{-4} was found

between online and off-line measurements so the evolutions of both measurements were well-correlated. The offset which appeared between 12.00 pm and 8.00 pm could be explained by the evolution of the concentration in chlorophyll *a* (Figure 66B).

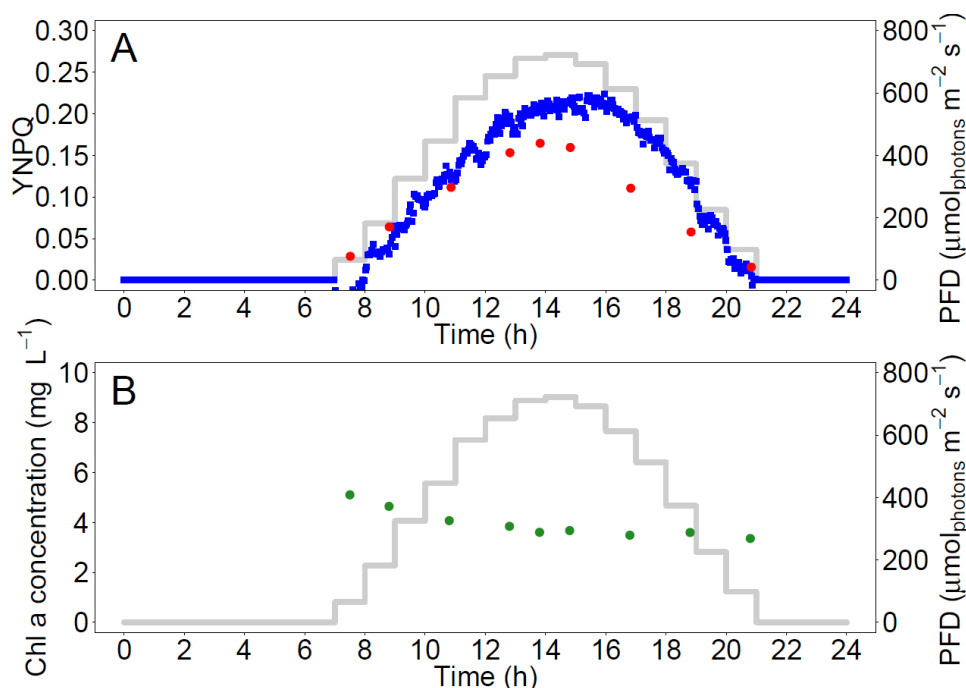


Figure 66 : YNPQ (A, left axis) and chlorophyll *a* concentration (B, left axis) over the time during the same light cycle (grey line, right axis). On panel A, blue squares show on-line measurements of YNPQ and red circles show off line measurements of YNPQ. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

Chlorophyll *a* concentration decreased indeed over the time from 5.0 to 3.3 mg L^{-1} but this decrease was not linear. The fluorescence yield F_m is related to chlorophyll *a* concentration (Huot and Babin, 2010) so it is possible that F_m had not a linear evolution either. But missing values of F_m were obtained by linear interpolation. Thus, from 12:00 pm to 8:00 pm, online F_m values were probably overestimated resulting in an overestimation of YNPQ values.

In the present experiment, the concentration of chlorophyll *a* was not found to change a lot over the day so online and off-line YNPQ measurements were found well-correlated. However, in actual solar PBRs, cultures conditions are highly variable over the days and chlorophyll *a* concentration can change a lot and in a non-linear way during the day. In such cases, the online estimation of YNPQ would be less accurate (Appendix 4).

In conclusion, online YNPQ measurements are impaired by the necessity of having a good measurement of the parameter F_m , which requires a sufficiently long dark acclimation period. In theory, if there was no change over time (*e.g.* in a chemostat), the first fluorescence measurement of the day could be used as a reference for F_m . However this was not the case, and F_m was found affected simultaneously by biomass increases and by the exposure to varying

light levels. Thus, we tried to get missing values of F_m from a linear interpolation between measurements obtained just before and just after the light period and a good correlation was observed between online and off-line YNPQ. But in solar cultures, variations of F_m can be more chaotic, which would not allow the online estimation of YNPQ with this method.

4.3.2 The use of online fluorescence to detect negative growth conditions

YPSII was found to respond well to the light dynamics, and its measurement was validated with off-line measurements. Because this parameter is directly related to the efficiency of the photosynthesis, it could also be used to detect physiological problems in microalgae cultures (Malapascua *et al.*, 2014).

Figure 67 shows online YPSII (Figure 67.A) and off-line measurements of F_v/F_m (Figure 67.B) during one light cycle in which a deprivation of inorganic carbon occurred.

At the beginning of the day, YPSII was equal to 0.63 (± 0.01 , $n=25$). As expected, it started to decrease with increasing light. Around 12.10 pm, online YPSII sharply decreased from 0.28 to 0.13 in 6 min without a change of PFD. Between 1.00 pm and 4.00 pm, online YPSII remained at this low level and off-line F_v/F_m was equal to 0.52. In other experiments (triplicates) with the same light cycle, YPSII values were higher (0.31 ± 0.06 , $n = 253$) between 1.00 and 4.00 pm (See section 4.3.1.1). Note that in *C. vulgaris* a F_v/F_m below 0.7 is the sign of a stress in the culture (Malapascua *et al.*, 2014). At 4.20 pm, YPSII increased from 0.13 to 0.27 in 10 min without a change in PFD which was equal to $613 \mu\text{mol}_{\text{photons}}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. From these results it can be assumed that YPSII was impacted by a factor other than light.

In the culture with low online YPSII values, inorganic carbon concentration was equal to 0.27 mM at 3.30 pm and a concentration below 5 mM is insufficient (Le Gouic, 2013). Sodium bicarbonate was re-added to the culture around 4.00 pm.

Because YPSII was negatively impacted by a factor other than light and because a deprivation in dissolved inorganic carbon occurred at the same time, it can be concluded that YPSII was impacted by the decrease in inorganic carbon concentration. It has been shown that this parameter responded quickly to change in carbon concentration, which seems to make it a good warning. It must be noted that off-line F_v/F_m also decreased during the carbon deprivation but this parameter remains difficult to measure online because it requires a dark acclimation period.

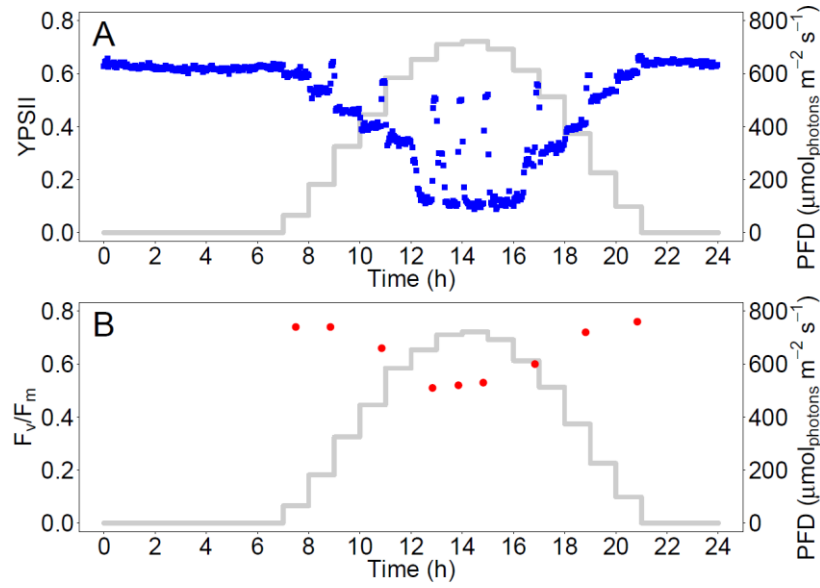


Figure 67 : On-line YPSII (A, left axis) and off line F_v/F_m (B, left axis) evolutions over the time during the same light cycle (grey line, right axis). During the measurement, a deprivation of inorganic carbon occurred. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

A lack of inorganic carbon is obviously not the only problem that can occur in microalgae cultures. A high concentration of dissolved dioxygen can also be toxic for the cells (Kazbar *et al.*, 2019). To illustrate that, the Figure 68 shows YPSII evolution over time in a *C. vulgaris* culture in which high dissolved dioxygen concentration was reached after rising PFD step from 75 to $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

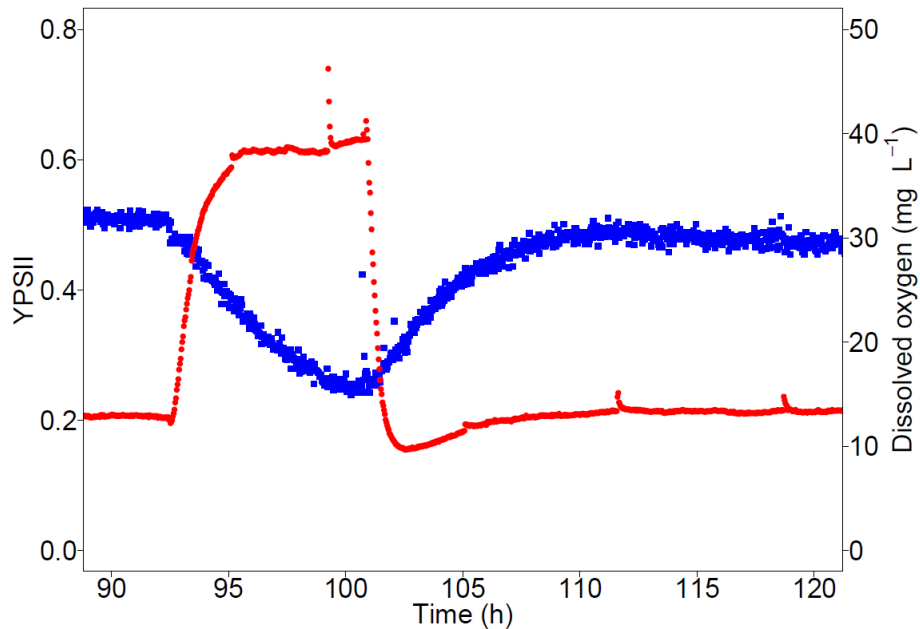


Figure 68 : YPSII (blue squares, left axis) and dissolved oxygen concentration (red circles, right axis) measured over the time during 90 hours after a PFD step transition from 75 to $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

After 90 h at $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ YPSII decreased from 0.51 to 0.26, simultaneously (due to a cut in nitrogen flowrate) dissolved oxygen increased from 12.9 to 39.4 mg L^{-1} which corresponds to more than 500 % of oxygen saturation. From 250 % oxygen saturation onwards, dissolved dioxygen concentration could have a negative impact on productivity (Kazbar *et al.*, 2019; Todisco, 2019). This is in agreement with our results, where YPSII values were found clearly negatively affected at these levels. As soon as dissolved dioxygen concentration decreased (10 h later), the YPSII values increased again to their initial values (Figure 68).

From these two examples, it can be concluded that if culture conditions with negative effects on growth are encountered, online YPSII could be used for their online detection. The main advantage is that potential problems can be detected in real-time and could be fixed immediately by an appropriate control procedure.

4.3.3 The use of PAM chlorophyll *a* fluorescence to estimate biomass productivity

4.3.3.1 *Estimation of chlorophyll *a* concentration*

PAM chlorophyll *a* fluorescence can be used to estimate chlorophyll *a*, usually using the minimum fluorescence F_0 as an estimator of chlorophyll *a* concentration (Huot and Babin, 2010). Figure 69 shows the comparison between off-line measurements of chlorophyll *a* concentration and its estimation from online measurements of F_0 (See sections 4.2.4.1 and 4.2.4.3) during two successive PFD step transitions from 75 to $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 765 to $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

At $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, off-line measurement of chlorophyll *a* concentration was equal to 14.8 ($\pm 0.6 \text{ mg L}^{-1}$, $n=6$) and online estimation was equal to 15.1 mg L^{-1} . When the PFD increased, both values increased but the online estimation reached higher values than off-line measurements. After 150 hours at $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the differences between both values became larger. Off-line measurements of chlorophyll *a* were equal to 56 (± 5 , $n=7$) mg L^{-1} whereas online estimations were equal to 68 (± 5 , $n=5$) mg L^{-1} . When the PFD was set back to $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, both values decreased but after 120 h at this new light level, off-line chlorophyll *a* measurements were found equal to 18 (± 1 , $n=4$) mg L^{-1} when online estimations were found equal to 30 (± 5 , $n=4$) mg L^{-1} . Again, the online estimation of chlorophyll *a* resulted in higher values than the off-line measurement.

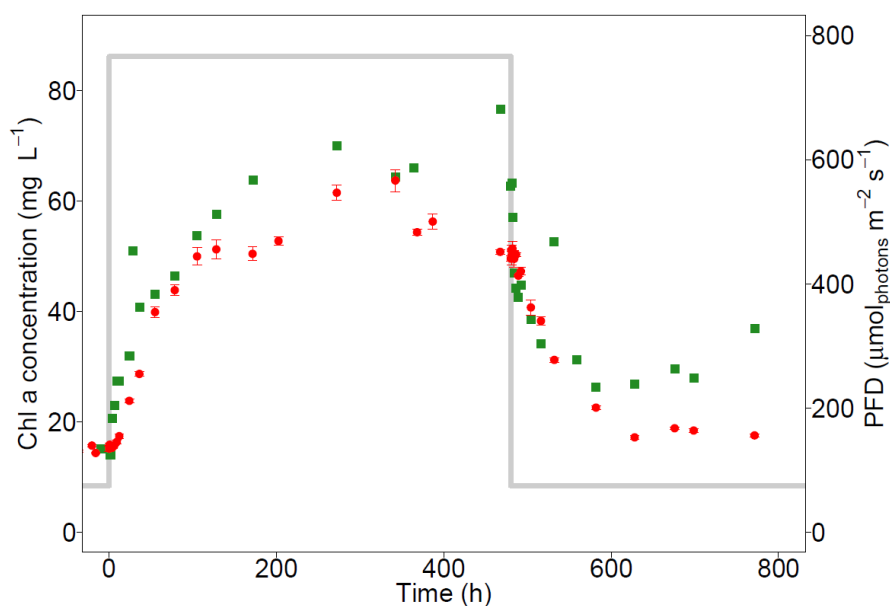


Figure 69 : Measurement of chlorophyll *a* concentration (left axis) over the time during a light transition from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (grey line, right axis). Red circles show off-line measurements of chlorophyll *a* and green squares show online measurements, from F_0 measurements. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

However, even if differences were found between off-line measurement and online estimation of chlorophyll *a* concentration, a Spearman correlation of 0.95 with a p-value inferior to 2.2×10^{-16} was found between both measurements. This correlation supposed that both values evolved with the same trend. Note that this correlation was established with a very few data.

Under $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the differences between off-line and online estimations can be explained by the fact that chlorophyll *a* concentration was higher than the highest concentration measured for the calibration curve. 120 hours after the second light change, the difference was assumed to be due to a slight change in the position of the sensor during the experiment.

Differences between online chlorophyll *a* estimation and off-line measurement could also be due to the dark period before F_0 measurement, which was possibly too short to allow the total opening of reaction centers. In this case, F_0 was overestimated and therefore the chlorophyll *a* concentration was also overestimated.

It is worth noting that, although necessary to online estimate the chlorophyll *a* concentration, several minutes of darkness can disturb the culture (See section 4.3.1.2) so a choice has to be made between disrupting culture conditions and the frequency of the measurement.

4.3.3.2 Estimation of ETR_{PSII} , an indicator for oxygen productivity

- Proportionality between $rETR_{PSII}$ and r_{O_2}

The relative ETR in photosystem II ($rETR_{PSII}$) measured from PAM chlorophyll *a* fluorescence parameters and the oxygen production rate ($r_{O_2}^{gas}$) measured from gas mass balance are compared over time during two successive PFD step transitions in Figure 70.

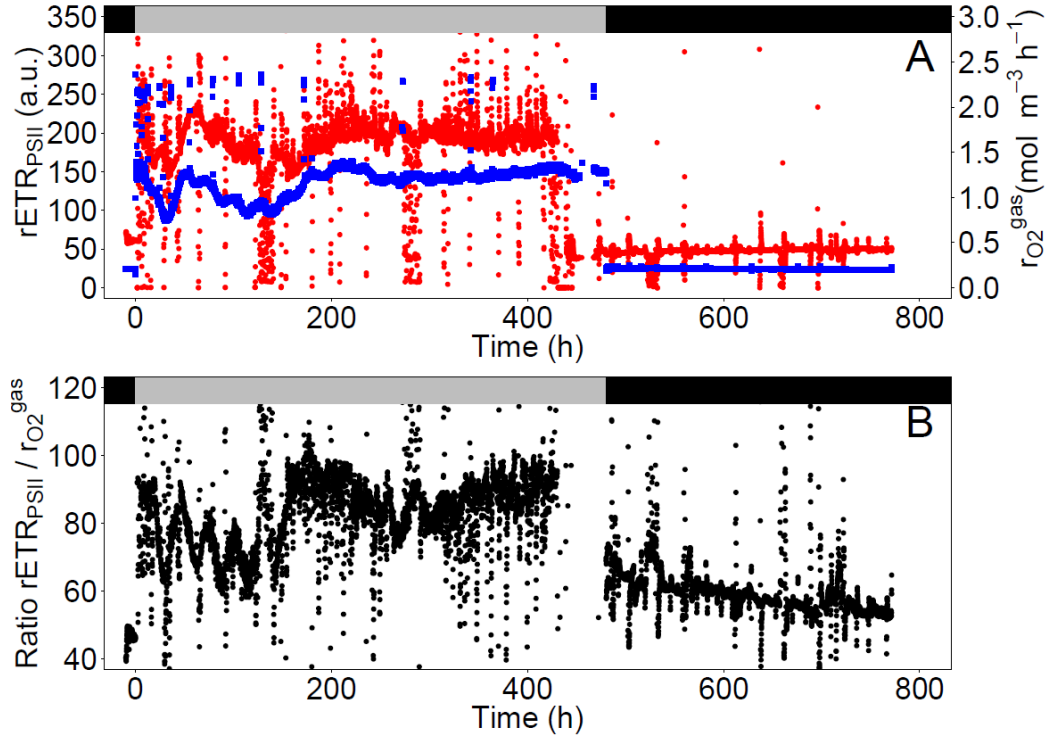


Figure 70 : $rETR_{PSII}$ (A, blue mark, left axis) measured with online PAM chlorophyll *a* fluorescence, $r_{O_2}^{gas}$ (A, red mark, right axis) measured from gas mass balance and the ratio between these two measurements (B) over the time during two light step transitions from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The first light change is at time = 0 h and the second is at time = 480 h. The black band corresponds to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and the grey band corresponds to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Dilution rate was 0.02 h⁻¹.

$r_{O_2}^{gas}$ values ranged between 0.5 and 2.0 mol_{O₂} m⁻³ h⁻¹ and $rETR_{PSII}$ varied between 25 and 160 (Figure 70.A). A quantitative measurement seems then not possible. However the trends of the two parameters seemed to follow the same pattern. If only the points for which the $r_{O_2}^{gas}$ values are between 0.3 and 2.2 $\mu\text{mol}_{O_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ are taken into consideration, a Spearman correlation of 0.65 with a p-value inferior to 2.2×10^{-16} was found between $rETR$ and $r_{O_2}^{gas}$.

The ratio $rETR_{PSII}/r_{O_2}^{gas}$ (Figure 70.B) was comprised between 40 and 100. When light first increased, this ratio also increased meaning that when more light energy was applied, for a same amount of produced oxygen, more electrons were delocalized at the PSII. This phenomena can be due to the electron cycle which occurs around PSII (Falkowski, *et al.*, 1986). Indeed, in this

case, $P680^+$ can be reduced without oxidising a new water molecule and without production of O_2 . The ratio $rETR_{PSII}/r_{O_2}^{gas}$ instantly decreased when the PFD was set back to $100 \mu mol_{photons} m^{-2}s^{-1}$ and this suggests that the electron transfer rate in photosystem II became closer to the rate of primary photochemistry.

Previous results show that ratio $rETR_{PSII}/r_{O_2}^{gas}$ could not be considered as constant, impairing the right estimation of oxygen production rate (which is related to photosynthetic growth rate) from online $rETR_{PSII}$ determination. But, in a solar culture context, the simple relative proportionality between $rETR_{PSII}$ and $r_{O_2}^{gas}$ (Appendix 5) should be sufficient to allow the rough estimation of the oxygen production rate from chlorophyll *a* fluorescence measurements. The advantage of using PAM chlorophyll *a* fluorescence is that it can be carried out using a single instrument instead of four (*i.e.* two flowrate meters, one dissolved O_2 sensor and one micro gas chromatography) necessary for gas mass balance used for $r_{O_2}^{gas}$ determination. Moreover, knowing the PFD, $rETR_{PSII}$ can be calculated instantly from the online measurement of YPSII (Eq. 4-4). It must be noticed that a limitation of the PAM fluorescence technique is that O_2 consumption (respiration) during the night period can obviously not be estimated. For deeper analyses and with the help of other measurements, it would be interesting to reconcile chlorophyll *a* fluorescence and gas measurements in future works, so as to provide a direct measurement of kinetics performances (*e.g.* biomass productivity) from an online PAM fluorescence sensor. A first attempt is given in the following section.

4.3.3.3 *Obtaining an estimation of the rate of oxygen production from online PAM chlorophyll *a* fluorescence measurement.*

Obtaining oxygen production rate from PAM chlorophyll *a* fluorescence measurements ($r_{O_2}^{PAM}$) was attempted in this study.

A comparison of $r_{O_2}^{PAM}$ (Eq. 4-7) and $r_{O_2}^{gas}$ (Eq. 4-9) over time during two successive step lights is illustrated in Figure 71.

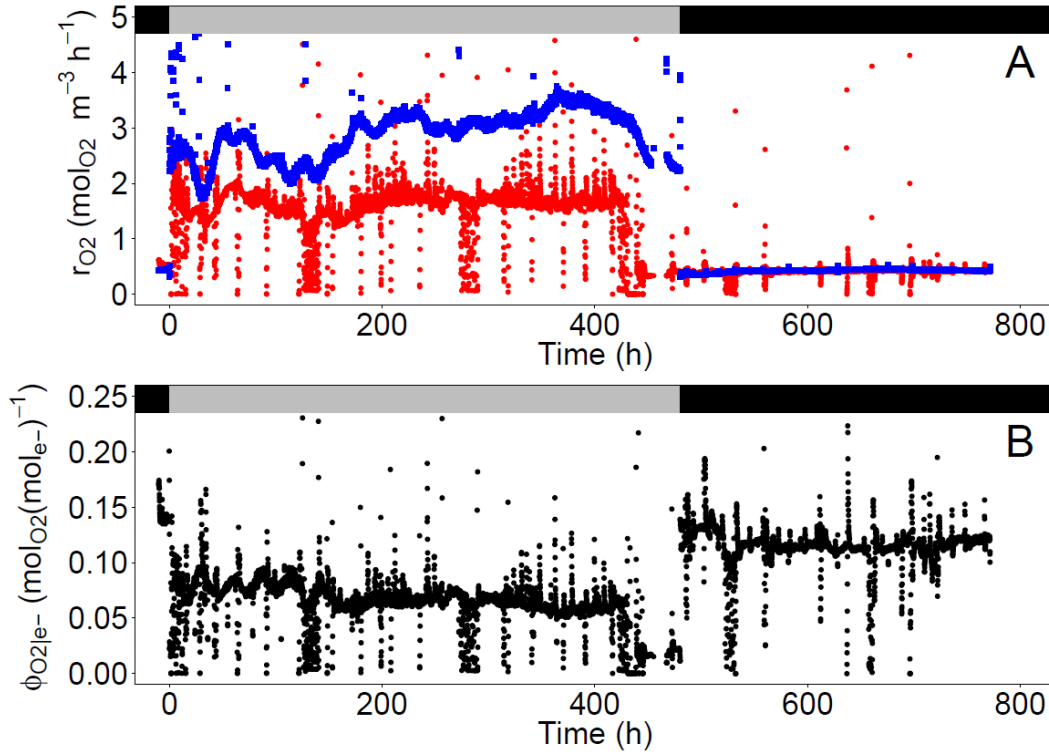


Figure 71 : Estimation of oxygen production rate measured with online chlorophyll *a* fluorescence (A, blue mark), oxygen production rate measured from gas mass balance (A, red mark) and the estimation of the quantum yield for oxygen production (B) over the time during two successive PFD step transitions from 75 to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and from 765 to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The first light change was at time = 0 h and the second at time = 480 h. The black band corresponds to 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and the grey band corresponds to 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

At 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2}$, $r_{\text{O}_2}^{\text{PAM}}$ was equal to 0.44 (± 0.02 , $n=122$) $\text{mol}_{\text{O}_2} \text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$ and $r_{\text{O}_2}^{\text{gas}}$ was equal to 0.53 (± 0.03 , $n=122$) $\text{mol}_{\text{O}_2} \text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$ (Figure 71.A). When the light increased, $r_{\text{O}_2}^{\text{PAM}}$ increased to 2.77 (± 0.63 , $n=125$) $\text{mol}_{\text{O}_2} \text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$ and $r_{\text{O}_2}^{\text{gas}}$ reached 1.34 (± 0.76 , $n=125$) $\text{mol}_{\text{O}_2} \text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$. After acclimation to the new light level, $r_{\text{O}_2}^{\text{PAM}}$ was equal to 3.33 (± 0.30 , $n=1201$) $\text{mol}_{\text{O}_2} \text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$ and $r_{\text{O}_2}^{\text{gas}}$ was equal to 1.74 (± 0.91 , $n=1201$) $\text{mol}_{\text{O}_2} \text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$. When the PFD was set back to 100 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $r_{\text{O}_2}^{\text{PAM}}$ and $r_{\text{O}_2}^{\text{gas}}$ decreased to 0.43 (± 0.03 , $n=3447$) and 0.42 (± 0.36 , $n=3447$) $\text{mol}_{\text{O}_2} \text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$ respectively and they remained at this level. Measurements were noisy due to both regular dark periods and gas pumping for concentration measurement. These results show that under high light, the difference between $r_{\text{O}_2}^{\text{PAM}}$ and $r_{\text{O}_2}^{\text{gas}}$ was larger than under low light. This is explained because the PAM fluorescence measurement of chlorophyll *a* gives information about the electron transfer in the PSII (ETR_{PSII}) and to calculate an oxygen productivity using this parameter, it is necessary to know the yield between O_2 and electron production called Φ_e (See section 4.2.4.3). For the calculation of $r_{\text{O}_2}^{\text{PAM}}$, Φ_e was assumed to be equal to 0.12 $\text{mol}_{\text{O}_2} (\text{mol}_e)^{-1}$ (Wagner *et al.*, 2006). But, this yield is not constant

and it is known to decrease under high light (Kolber and Falkowski, 1993). In the current work, if Φ_e is lower than 0.12 at $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $r_{\text{O}_2}^{\text{PAM}}$ is overestimated and it becomes higher to $r_{\text{O}_2}(\text{gas})$. Thus, it was tried to estimate the quantum yield for oxygen production ($\bar{\varphi}_{\text{O}_2|e^-}$) by using both PAM fluorescence and gas measurements (Eq. 4-10).

At the beginning of the transition from 75 to $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the $\bar{\varphi}_{\text{O}_2|e^-}$ was at its maximum, $0.14 (\pm 0.01, n=122) \text{ mol}_{\text{O}_2} (\text{mol}_e)^{-1}$ (Figure 71.B). When light increased, the ratio decreased and remained unstable for approximately 150 hours. Then it stabilised around $0.07 (\pm 0.04, n= 3147) \text{ mol}_{\text{O}_2} (\text{mol}_e)^{-1}$. The decrease is explained because some of the electrons cycle around PSII and they are used later to reduce electron acceptors in PSII without oxidizing water (Falkowski *et al.*, 1986; Ralph *et al.*, 2010). When the PFD was set back to $100 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\bar{\varphi}_{\text{O}_2|e^-}$ immediately increased to $0.13 (\pm 0.06, n=143) \text{ mol}_{\text{O}_2} (\text{mol}_e)^{-1}$. Then it slightly increased during the first 20 h after the light change, and it decreased again to reach a stable value of $0.12 (\pm 0.10, n=2705)$. As $r_{\text{O}_2}^{\text{PAM}}$ and $r_{\text{O}_2}^{\text{gas}}$ were very noisy, $\bar{\varphi}_{\text{O}_2|e^-}$ estimation was also noisy.

In the literature, the quantum yield for oxygen production was estimated between 0.05 and 0.12 mol_{O_2} per quanta (Ley, 1987; Suggett *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2006). In the present study, $\bar{\varphi}_{\text{O}_2|e^-}$ was found to range between 0.07 and 0.15. Thus our results seem to be coherent with published values. Moreover Wagner *et al.* (2006) also noticed a drop in the quantum yield for oxygen production under high light and this value reached 0.05, which is close to our value of 0.07. In their study, this ratio was calculated under sine function of light simulating the daily course of sunlight, with a 12:12 Light/Dark period so the cells were always in a transient regime. This could explain why these authors observed a lower value, as in our work.

Note that except during the first 50 hours at $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a dark volume (Pruvost and Cornet, 2012) was present in the culture volume. Thus it is possible that some respiration mechanisms occurred (Takache *et al.*, 2012), leading to O_2 consumption, and so to a decrease in the quantum yield of net O_2 production.

In conclusion, it seems that it could be possible to calculate the quantum yield for net oxygen production under dynamic light using our PBR. Having this quantum yield in line would be of interest to study microalgae light-response mechanisms to changes in ambient light. Indeed, this yield is known to decrease when alternative electron cycles (Kolber and Falkowski, 1993) or respiration mechanisms (Takache *et al.*, 2012) occur in a culture. With this tool, it would thus be possible to follow the dynamics of alternative electron cycles (in cultures without dark volume) without disturbing or sampling the culture.

It must be noted that in our case, $r_{O_2}^{PAM}$ had to be calculated off-line (Eq. 4-7). Indeed G_{mean} is estimated using the two flux model and it cannot be calculated online because E_a and G_{mean} are dependent on total pigment content and biomass concentration, which could vary with high changing conditions (Pottier *et al.*, 2005). To improve the method of calculating oxygen production rate from chlorophyll *a* PAM fluorescence measurements, it could be interesting to relate calculations to online measurements of chlorophyll *a* concentration as done in Section 4.3.3.1. Thus to do it, a method has to be developed to calculate radiative properties (E_a) and MRPA as a function of the single chlorophyll *a* concentration, instead of total pigment content.

4.3.4 Strategy to use PAM chlorophyll *a* fluorescence measurements in solar PBRs

Our study has shown that chlorophyll *a* PAM fluorescence parameters can provide important information about microalgae health and growth rate (*e.g.* productivity). However several parameters (*e.g.* YNPQ, F_v/F_m) require the estimation of F_o and F_m , which can only be measured in dark acclimated cells (Kromkamp and Forster, 2003). These values changed over the course of the experimental day (See section 4.3.1.2), thus it was not possible to use the same values between the beginning and the end of the day. Consequently, if PAM fluorescence is to be used in solar PBRs, its use will must be adapted for allowing F_o and F_m online measurements. It would be necessary for example to divert some of the culture to a dark chamber and carry out the PAM fluorescence measurements after a fixed dark acclimation period (*e.g.* 15 min) (Figure 72). A pump could be used to transport the culture into this dark derivation, and the flowrate should be adjusted to leave culture for several minutes in dark. Nevertheless, there would always be an effect of light history and it is not sure that a fixed dark-acclimation period would be enough to reverse the non-photochemical quenching of the fluorescence and measure a true F_m in every single situation. It could also be noticed that the measurement of PAM chlorophyll *a* fluorescence has a very fast response time (Falkowski *et al.*, 1986). Thus in order to measure light parameters, a second PAM sensor should be placed in the light part of the PBR. One sensor would be used to measure parameters in light acclimated cells, and one sensor would be used to measure parameters in dark acclimated cells at the same time.

By applying this procedure of measuring F_o and F_m in dark, and F' and F_m' in light, this strategy would allow the accurate measurement of YNPQ and a good estimation of the chlorophyll *a* concentration in the culture. Having YNPQ would give information on the capacity of the cell to photo-regulate against high light as it can be encountered in solar cultures, and having the chlorophyll *a* concentration would give information on the growth rate. Furthermore, the

measurement of YPSII would allow the detection of unfavorable growth conditions (*e.g.* nutrients limitations) in the culture (See section 4.3.2).

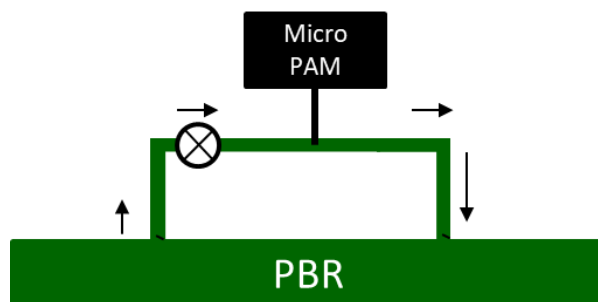


Figure 72 : Schematic representation of a dark derivation in order to measure fluorescence of Chlorophyll *a* in solar PBR.

4.4 Conclusion

This study has shown that online measurement of chlorophyll *a* PAM fluorescence is very promising for monitoring PBRs. Several meaningful parameters could be useful for control purposes like the determination of light transfer conditions in the culture system using the chlorophyll *a* concentration, the detection of stressed cells (*e.g.* nutrient limitations, oxygen over accumulation) and information on the growth rate (*e.g.* productivity). Furthermore, our experiments have shown that the online PAM chlorophyll *a* fluorescence measurements could also be used in physiological studies by measuring the dynamic responses to environmental changes. This will be investigated in the following chapter.

Chapitre 5. Utilisation d'un photobioréacteur contrôlé pour l'étude de l'effet de boucles sombre sur la culture de *Chlorella vulgaris*

Résumé:

A grande échelle, les micro-algues sont souvent cultivées dans des systèmes clos, aussi appelés photobioréacteurs (PBRs). Par conception, ces PBR peuvent présenter des parties non éclairées, appelées boucles sombres, telles que des pompes ou des dérivations hydrauliques pour l'introduction de capteurs. Ainsi, lors de leurs passages réguliers dans ces boucles sombres, les micro-algues sont sujettes à des alternances de lumière et d'obscurité. Il a été montré que la présence de boucles sombres engendrait une perte de productivité. Outre la perte brute de volume réactionnel, cela engendre des mécanismes biologiques de type respiratoires qui accentuent l'effet négatif de ces boucles sombres. Mais la présence de boucles sombres pourrait également impacter l'efficacité de la photosynthèse et les mécanismes de photoprotection présents chez les micro-algues, en particulier lors de flux élevés de photons incidents. Ce chapitre a pour objectif d'étudier l'impact de la présence d'une boucle sombre sur la productivité et la photoprotection de *Chlorella vulgaris*. Pour cela, *C. vulgaris* a été cultivée en PBR contrôlé, sur lequel était fixée une sonde de type PAM (Pulse Amplitude Modulated) pour la mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* et une micro chromatographie en phase gazeuse. Un panneau de LEDs a permis la simulation, par l'alternance de phases lumineuses et obscures, du passage régulier des micro-algues dans des boucles sombres. Cette étude a montré que la réponse des micro-algues aux alternances de lumière était dynamique. Par ailleurs, pour des fractions sombres équivalentes à 30 % du volume du PBR, la perte de productivité était principalement due à des phénomènes de respiration.

Use of a control photobioreactor to study the effect of design dark fractions on *Chlorella vulgaris* culture

Abstract:

On a large scale, microalgae are often produced in closed systems, also known as photobioreactors (PBRs). These PBRs often include parts that are not illuminated, called design dark fractions, such as pumps or recirculation loops for the installation of sensors. Thus, when cells pass through these dark fractions, they are subject to light and darkness alternations. The presence of a dark fraction is known to induce a loss of productivity. In addition to the loss of reaction volume exposed to light, this leads to respiratory mechanisms that accentuate the negative effect of these dark fractions. However, the presence of dark fractions could also impact the efficiency of photosynthesis and the photoprotection mechanisms present in microalgae, particularly during high incident photon flux. This study aims to study the impact of the presence of a design dark fraction on the productivity and the photoprotection of *Chlorella vulgaris*. For this purpose, *C. vulgaris* was grown in a controlled PBR, equipped with a chlorophyll *a* PAM (Pulse Amplitude Modulated) sensor and a micro gas chromatography. A LED panel was used to simulate the regular passage of microalgae in dark fractions by alternating light and dark periods. This study showed that the response of microalgae to alternating light was dynamic. Furthermore, for dark fractions equivalent to 30% of the volume of the PBR, the loss of productivity was mainly due to respiration mechanisms.

5.1 Introduction

Microalgae are often produced in closed photobioreactors (PBRs) to limit contaminations by bacteria, fungi or other microalgal species (Tredici, 2007). However most of these PBRs include parts that are not illuminated. These may be pumps, tanks or recirculation loops for the installation of sensors. These design dark fractions can represent more than 20 % of the illuminated PBR volume (Kazbar, *et al.*, 2019).

It has been shown that the presence of design dark fractions equivalent to more than 5 % of the PBR volume induced a loss of productivity (Torzillo *et al.*, 2014). This was dependent on the fraction of the dark volume compared to the illuminated volume, but also on the resident time of cells in each zone. It was also demonstrated that the productivity loss was usually larger than loss resulting only from the decrease of illuminated volume. It was hypothesised that this non-linear relation was caused by an increase in the respiratory activity (Kazbar *et al.*, 2019; Pruvost *et al.*, 2016).

When cells pass through these design dark fractions they undergo light and darkness alternations. In darkness, immediately after a light exposure, the rate of oxygen consumption is known to be enhanced (Geider and Osborne, 1989). In tobacco leaves, a first transient increase of respiration is observed after 15 to 20 s of darkness and a second is observed after 180 to 250 s of darkness (Atkin *et al.*, 1998; Hoefnagel *et al.*, 1998). In green microalgae these respiration rates increase with the light intensity of the previous exposure and also with dissolved oxygen concentration. This phenomenon named light enhanced dark respiration (LEDR) is closely linked to photosynthesis (Xue *et al.*, 1996). Then, oxygen produced through photosynthesis is consumed in a few minutes (4-5) in darkness (Kliphuis, Janssen, *et al.*, 2011). During the opposite transition, dark respiration is inhibited within a few second of exposure to light (Atkin *et al.*, 1998).

During light periods, microalgae exhibit several short-term photoprotection mechanisms to avoid cell damages when exposed to high light (Asada, 2000; Kargul and Barber, 2008; Lavaud, 2007; Prasil *et al.*, 1996). Namely, fluorescence non-photochemical quenching (NPQ) dissipates excess light energy *via* heat, which cannot be used for photosynthesis (Goss and Lepetit, 2015). Furthermore, when the oxidized plastoquinone (PQ) pool decreases, about 15 % of Q_A^- can be directly re-oxidized through photosystem II (PSII), without oxidising water (Prasil *et al.*, 1996). The water-to-water cycle is another alternative electron cycle (AEC) in which dioxygen (O_2) is photoreduced, *via* PSI, by the electrons originating from PSII, to reform water, so that excess excitation energy is dissipated. Contrary to NPQ, these AEC do not

result in energy loss because they lead to a production of ATP (Ralph *et al.*, 2010). In the long term, when cells are exposed to different light intensities, they are also able to change their pigment content within a process named photoacclimation (Dubinsky and Stambler, 2009).

All those results tend to emphasize a dynamic and coupling response of the photosynthetic cells to alternation of dark and light periods, as when cultivated in PBRs presenting design dark fractions.

Pulse Amplitude Modulated (PAM) chlorophyll *a* fluorescence is a non-invasive technique, which allows the measurement of dynamic evolution of several photosynthetic parameters such as the quantum yield for photochemical energy conversion in PSII (YPSII), used for the calculation of the Electron Transport Rate (ETR) in PSII, or the quantum yield of regulated non-photochemical energy loss in PSII (YNPQ) (Consalvey *et al.*, 2005; Klughammer and Schreiber, 2008; Kolber and Falkowski, 1993).

The aim of this study is to use a PBR equipped with an online PAM chlorophyll *a* fluorescence sensor to evaluate the impact of the presence of dark fractions in *C. vulgaris* cultures. The dynamics of cell response to light changes will be assessed and the causes for the loss of productivity will be investigated using photosynthetic parameters measurements, gas mass balances and radiative models.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Culture protocol

5.2.1.1 *Strain and medium*

Pre-cultures of the strain *Chlorella vulgaris* CCAP 21.119 were set up following the same protocol as explained in Chapter 3.

For the experiments described in this chapter, *C. vulgaris* was grown in Sueoka medium supplemented with Hutner solution (Souliès *et al.*, 2016; Sueoka, 1960) (Appendix 2). Nutrients were added in excess, so that *C. vulgaris* was only light limited.

5.2.1.2 *Cultivation system*

Chlorella vulgaris was grown using the torus-shaped PBR model described in Chapter 4.

A PAM chlorophyll *a* fluorometer was used to carry out all online measurements of photosynthetic parameters (MicroPAM, Walz, Germany). PAM fluorescence measurements were carried out using a fibre optic in contact with the optical front surface of the PBR. The PBR was also equipped with a micro-gas chromatographer (490 Micro GC, Agilent Technologies, USA) for online measurements of gas concentrations at the PBR outlet.

Cultures were carried out in continuous chemostat mode and an artificial incident PFD with a white light spectrum was provided by a LED panel (BioConcept Technologies, France), calibrated with a quantum sensor (Li- COR 250A, USA). Mechanical agitation was provided with a marine impeller. Temperature was maintained at 25 °C by automatic water cooling, pH was monitored (InPro 3253i Mettler Toledo, USA) and maintained at 7.5 with CO₂ injection and dissolved oxygen concentration was measured (InPro 6860i Mettler Toledo, USA) and controlled by automatic N₂ bubbling. Both pH and oxygen concentration were regulated with a Proportional Integral Derivative (PID) controller (Ifrim *et al.*, 2014; Titica *et al.*, 2018). All growing conditions were controlled using Labview software (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench, National Instrument, USA) and data were recorded online.

5.2.1.3 Simulation of dark fractions

Following Kazbar *et al.* (2019), design dark fractions can be characterized by several parameters :

- the dark fraction f_d corresponding to the ratio of dark volume V_d on the total PBR volume V_r (composed of V_d and the illuminated part of the PBR volume V_L) :

$$f_d = \frac{V_d}{V_d + V_L} = \frac{V_d}{V_r}, \quad (5-1)$$

- the residence time of cells in the design dark fraction t_d ,
- the residence time of cell in the illuminated volume t_L .

If the design dark fraction is obtained from a recirculation loop with known flow rate Q , t_d and t_L can be obtained from :

$$t_d = \frac{V_d}{Q}, \quad (5-2)$$

$$t_L = \frac{V_L}{Q}. \quad (5-3)$$

In the present study, design dark fractions were simulated by alternating dark periods (t_d in s) and light periods (t_L in s) by ON/OFF switching the LED panel. Note that it enables an accurate control of the time spent by cells in each condition, in opposite to actual design dark fraction

loops where mixing leads to uncontrolled residence time distribution in each part of the culture system.

Even if there is no real design dark fraction during the present study, the term f_d will be used to define the different light regimes. In this case, f_d is defined as:

$$f_d = \frac{t_d}{t_d + t_L}. \quad (5-4)$$

At PFD equal to $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, f_d of 10 % and 30 % were studied with a t_d equal to 300 s. At PFD equal to $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a 30 % f_d with a t_d of 300 s was studied. To compare cultures with and without dark period, a same time-averaged PFD was applied to both cultures. A summary of the different light regimes is given in Table 5.

Table 5 : Summary of the different light conditions applied to the *C. vulgaris* cultures. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

PFD ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	f_d (%)	t_d (s)	t_L (s)	Time averaged PFD ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
225	0	0	(-)	225
250	10	300	2700	225
175	0	0	(-)	175
250	30	300	700	175
560	0	0	(-)	560
800	30	300	700	560

5.2.2 Off-line analyses

For off-line analyses, samples were taken once a day at the beginning of a simulated dark fraction. Inorganic carbon, biomass, chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoid concentrations were determined following the protocols described in Chapter 3. Inorganic carbon was measured with a total carbon analyzer (TOC-L, Shimadzu, Japan). Biomass concentration was determined by measuring dry matter. Pigments were extracted in methanol, and their absorbance measured with a spectrophotometer (Jasco V-630, France). Their concentrations were determined using equations given by Ritchie (2006). More details are given in Chapter 3.

5.2.3 Determination of the light transfer conditions in the PBR

5.2.3.1 Radiative transfer modelling

A two-flux radiative transfer model was used to determine the spectral value of fluence rate $G_\lambda(z)$ (in $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for a given depth of culture z (Pottier *et al.*, 2005).

Chlorella vulgaris radiative properties of mass absorption cross-section Ea_λ (in $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$), mass scattering cross-section Es_λ (in $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$) and backward scattering ratio b_λ were function of the pigment content. They were obtained according to the protocol of Kandilian *et al.* (2016).

Averaged fluence rate G_{mean} was calculated by integrating $G_\lambda(z)$ over the Photosynthetically Active Radiations (PAR) and the PBR thickness L :

$$G_{\text{mean}} = \frac{1}{L} \int_{\text{PAR}} \int_0^L G_\lambda(z) dz d\lambda \quad (5-5)$$

In this model, the biomass specific rate of photon absorption A (in $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{kg}_{\text{Cx}}^{-1} \text{s}^{-1}$) was obtained by integrating the product of G_λ and of the mass absorption coefficient Ea_λ of *C. vulgaris* over the PAR (Souliès *et al.*, 2016):

$$A = \int_{\text{PAR}} Ea_\lambda G_\lambda d\lambda. \quad (5-6)$$

By integrating A over the culture volume, the mean biomass specific rate of photon absorption (MRPA) was determined. When cells were exposed to dark fractions, the MRPA was averaged over time.

5.2.3.2 Working illuminated volume and dark volume

For all microalgal species, a rate of photon absorption where photosynthesis compensates for respiration can be defined (A_C). In *C. vulgaris*, A_C is equal to $2800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{kg}_{\text{Cx}}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Souliès *et al.*, 2016).

In the PBR used for the experiments, the light attenuation is one-dimensional. In this case, the illuminated fraction is defined by :

$$\gamma = \frac{z(A_C)}{L}, \quad (5-7)$$

with $z(A_C)$ the depth where A_C is reached and L the thickness of the PBR.

When γ is inferior to 1, there is a dark volume, and when γ is equal to 1, the culture volume is fully illuminated without dark volume (Pruvost and Cornet, 2012). In this study, all light conditions imposed to the culture led to a dark volume ($\gamma < 1$). Note that the dark volume is different from the design dark volume, the latter being the result of an unlighted part of the PBR, while the former is obtained in the illuminated part as a result of light attenuation by the biomass.

5.2.4 Determination of volumetric and surface productivities

At steady state in chemostat cultures, the volumetric biomass productivity P_X is equal to the biomass volumetric growth rate $\langle r_X \rangle$ (Pruvost *et al.*, 2008, 2015):

$$\frac{dC_X}{dt} = 0 \rightarrow \langle r_X \rangle = DC_X = P_X, \quad (5-8)$$

with C_X the biomass concentration (in kg m^{-3}) and D the dilution rate (in h^{-1}).

Using the illuminated surface to volume ratio, named a_s (in m^{-1}), a surface productivity S_X can then be calculated:

$$S_X = \frac{P_X}{a_s}. \quad (5-9)$$

5.2.5 Online analyses

5.2.5.1 *PAM chlorophyll a fluorescence*

Online PAM chlorophyll *a* fluorescence was measured over time on the optical surface of the PBR. Minimum fluorescence yield in the light acclimated state (F') was measured and recorded every 5 min. At the same period, a 0.6 s saturating flash of $9000 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was applied to measure the maximum fluorescence yield in the presence of light (F_m').

In order to fully oxidise PSII reactive centers and to measure the maximal fluorescence in the dark F_m , immediately after each sampling (once a day), light was turned off for 15 min (Consalvey *et al.*, 2005). During this dark period, a saturating flash was applied every 5 min to measure F_M . F_M was then interpolated between two measurements.

Based on these PAM chlorophyll *a* measurements, various parameters were determined :

- PSII quantum yield for photochemical energy conversion (YPSII) was calculated as follows (Klughammer and Schreiber, 2008):

$$\text{YPSII} = \frac{F_m' - F}{F_m'}. \quad (5-10)$$

- PSII quantum yield of regulated non-photochemical energy loss (YNPQ) was calculated as follows (Klughammer and Schreiber, 2008):

$$\text{YNPQ} = \frac{F}{F_m'} - \frac{F}{F_m}. \quad (5-11)$$

- PSII quantum yield of non-regulated excitation dissipation (Klughammer and Schreiber, 2008) :

$$\text{YNO} = \frac{F}{F_m} \quad (5-12)$$

- Specific electron transport rate in PSII (ETR_{PSII})

From PAM fluorescence measurements, it is possible to estimate the specific Electron Transport Rate in PSII (ETR_{PSII}). This ETR_{PSII} is function of the rate of photon absorption used by the PSII to delocalize electrons and the efficiency of the photochemical conversion in the light harvesting antennae of PSII (*i.e.* Y_{PSII}). It can be expressed as follows (Kromkamp and Forster, 2003) :

$$ETR_{PSII} = 0.5 \times a^*_{Chla} \times E \times Y_{PSII} \quad (5-13)$$

with a^*_{Chla} the optical absorption cross section of photosynthetic pigments normalized to chlorophyll *a* (in $m^2 (mg_{Chla})^{-1}$) and E (in $\mu mol_{photons} m^{-2} s^{-1}$) the irradiance level. At room temperature, most of *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence measured by the PAM originates from PSII, and the factor 0.5 is applied because it is estimated that 50 % of the absorbed light go to the photosystem I (PSI) and 50 % to the PSII, and that no cyclic electron transport occurs in PSI (Gilbert *et al.*, 2000).

In the present study, it was chosen to use the mean fluence rate (G_{mean}) measured in the PBR for the light energy E because it well relates to the fluence rate actually available for the microalgae. In order to be able to compare ETR_{PSII} with MRPA calculated in section 5.2.3.1, the mass absorption cross-section E_a (in $m^2 kg_{Cx}^{-1}$), which can be obtained from radiative properties determination (Kandilian *et al.*, 2016), was used instead of a^*_{Chla} . So the specific ETR_{PSII} became :

$$ETR_{PSII} = 0.5 \times E_a \times G_{mean} \times Y_{PSII} \quad (5-14)$$

This specific ETR_{PSII} was expressed in $\mu mole \cdot kg_{Cx}^{-1} s^{-1}$.

5.2.5.2 Gas analysis

The rate for oxygen production $r_{O_2}^{gas}$ was calculated from gas mass balance using data from the gas mass flow meters, the dissolved oxygen sensor and the micro gas chromatography measurements (Urbain, 2017).

Considering the biological production, a gas mass balance was established for oxygen :

$$\frac{G_{out}}{V_r} (y_{in}(O_2) - y_{out}(O_2)) = \frac{dC_{O_2}}{dt} - r_{O_2}^{gas} - D(C_{in}(O_2) - C(O_2)), \quad (5-15)$$

with :

- $\frac{G_{out}}{V_r} (y_{in}(O_2) - y_{out}(O_2))$, the dioxygen transferred from the culture medium in the PBR to the gas phase (in $mol_{O_2} m^{-3} h^{-1}$). G_{out} is the molar flow rate of gas at the outlet of the PBR and $y_{in}(O_2)$ and $y_{out}(O_2)$ are respectively the molar fraction of O_2 in and

out of the reactor;

- $\frac{dC_{O_2}}{dt}$, the accumulation of dissolved dioxygen in the PBR;
- $r_{O_2}^{gas}$, the rate of volumetric dioxygen production (in $\text{mol}_{O_2} \text{ m}^{-3} \text{ s}^{-1}$);
- $D(C_{in}(O_2) - C(O_2))$, the dissolved dioxygen supplied and removed by dilution with new medium. D is the dilution rate applied to the culture.

In experiments, only N_2 and CO_2 were supplied to the culture so $y_{in}(O_2)$ was equal to 0 and the culture medium was considered saturated in O_2 . Furthermore time accumulation $\left(\frac{dC_{O_2}}{dt}\right)$ was found far below the transfer term $\left(\frac{G_{out}}{V_r}(y_{in}(O_2) - y_{out}(O_2))\right)$ so it was neglected. Thus, oxygen productivity was calculated as :

$$r_{O_2}^{gas} = \frac{G_{out}}{V_r} y_{out}(O_2) + (D \times (C_{sat}(O_2) - C(O_2))), \quad (5-16)$$

with $C_{sat}(O_2)$ the molar saturation concentration of O_2 and $C(O_2)$ the molar concentration of dissolved oxygen in the culture.

Between the culture volume and the micro-gas chromatographer (used to measure gas fractions at the outlet of the PBR noted y_{out}), there was a dead volume approximately equal to 820 (± 43) mL. This influenced the time required for the micro gas chromatography to respond to a change in gas concentration before a measurement. This response time was characterized by switching between N_2 and air bubbling into the torus PBR filled with water, and by time monitoring the O_2 content by the micro-gas chromatography in the gas phase at the outlet of the PBR. These experiments were done with the highest gas flowrate used during our following experiments (*i.e.* 129 mL min^{-1} corresponding to the averaged gas flowrate at $800 \mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ with an f_d equal to 30 %).

5.3 Results and discussion

5.3.1 Validation of a LED panel for dark fractions simulation

To validate the use of a LED panel to simulate dark fractions, the surface productivities reached in our experiments were compared to surface productivities obtained by Kazbar *et al.* (2019) with actual dark fractions. It is important to note that in their study, the authors added a real dark derivation to their culture system, and the culture volume was pumped through this physical loop. Results for surface productivities are shown on Table 6. Comparisons were done for f_d equals to 10 and 30 %, and t_d equal to 300 s.

Table 6 : Surface productivities (S_X) of *C. vulgaris* grown in presence of dark fractions. The dark fractions were either obtained by the addition of a true physical derivation (Kazbar, *et al.*, 2019) or by light and darkness alternations (this study). For all cultures, the incident photon flux density was equal to $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the dilution rate was 0.02h^{-1} and the dark period t_d was 300 s.

f_d (%)	Method of obtaining the dark fraction	S_X ($\text{g m}^{-2} \text{j}^{-1}$)
10	True physical derivation	13 (Kazbar <i>et al.</i> , 2019)
10	Light and darkness alternations	14.1 ± 0.2
30	True physical derivation	11 (Kazbar <i>et al.</i> , 2019)
30	Light and darkness alternations	10.1 ± 0.5

Results are means and standard deviations measured on three replicates.

For an f_d equal to 10 %, the surface productivity reached $13.0 \text{ g m}^{-2} \text{j}^{-1}$ with actual design dark fraction and it reached $14.1 \text{ g m}^{-2} \text{j}^{-1}$ with light and darkness alternations (difference of 8.5 %). For an f_d equal to 30 %, the surface productivity was equal to $10.1 \text{ g m}^{-2} \text{j}^{-1}$ with light and darkness alternations and it was equal to $11.0 \text{ g m}^{-2} \text{j}^{-1}$ with an actual design dark fraction (difference of 8.2 %). Both errors were inferior to 10 %, so the use of a LED panel was validated to simulate dark fractions by alternating light and dark periods.

By principle, using only light changes to simulate dark fractions allows applying a same phase (darkness or light) duration to the whole culture. With a physical derivation, and especially when the derivation is applied to a culture vessel which can be considered as a ideally stirred tank reactor (as done in Kazbar *et al.* (2019) by using a flat panel PBR), an almost infinite distribution of residence time values is obtained. Only an average residence time can be considered. Furthermore, in our case, all the cells experienced periods of darkness at the same time (*i.e.* when the LED panel was off), facilitating dynamic measurements (See section 5.3.3).

5.3.2 Impact of dark fractions on surface productivity and pigment content

In a second set of experiments, the study was extended to other PFD values (*i.e.* 250 and $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). To compare cultures with and without dark period, a same time averaged PFD was applied to both cultures. Dark fractions representing 10 % and 30 % of the PBR volume were studied.

Table 7 summarises the surface productivities (S_X) and the pigment contents (w_{pig}) obtained for cultures exposed to continuous light or subjected to regular dark periods corresponding to f_d equal to 10 or 30 %.

Table 7 : Surface productivities (S_X) and pigment contents (w_{pig}) of cultures exposed to continuous light or regularly subjected to dark periods. Averaged PFD is the averaged PFD over the time, PFD corresponds to the light applied during light periods, f_d corresponds the dark fraction and t_d corresponds to the residence time in darkness. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

Averaged PFD ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	PFD ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	f_d, t_d (%, s)	S_X ($\text{g m}^{-2} \text{ j}^{-1}$)	w_{pig} (% C_X)
225	225	0, 0	13.9 ± 0.2	7.1 ± 0.14
225	250	10, 300	14.1 ± 0.2	7.0 ± 0.01
175	175	0, 0	13.3 ± 0.3	7.3 ± 0.03
175	250	30, 300	10.1 ± 0.5	6.6 ± 0.04
560	560	0, 0	27.9 ± 0.3	6.9 ± 0.03
560	800	30, 300	23.2 ± 0.3	6.0 ± 0.04

Results are means $\pm$ standard deviations measured on three replicates.

For a same averaged PFD of $225 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a dark fraction of 10 % revealed a negligible impact on surface productivity and pigment content. With or without dark periods, S_X was approximately equal to $14 \text{ g m}^{-2} \text{ j}^{-1}$ and w_{pig} to 7 % C_X . In both cases, microalgae presented a same photoacclimation to the light regime and they seemed to use with the same efficiency the light energy to produce biomass.

On the contrary, at the averaged PFD of $175 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, with a dark fraction of 30 %, the surface productivity decreased from 13.3 to $10.1 \text{ g m}^{-2} \text{ j}^{-1}$. A similar result was observed for $560 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ with a decrease in productivity from 27.9 to $23.2 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. It corresponds to a loss of 24 % and 17 % respectively. So an f_d of 30 % revealed a negative impact on biomass productivity, although it seemed that under higher light, this loss was less important. Pigment contents were also affected by the introduction of a dark period. For an average PFD equal to $175 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, the presence of a 30 % dark fraction reduced the pigment content from 7.3 to 6.6 % C_X , and it decreased from 6.9 to 6.0 at $560 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Our results suggest a direct impact of the dark fraction on the photoacclimation. However, it must be noticed that, to have the same average PFD with and without dark fraction, a higher PFD was imposed during light periods to cultures subjected to dark fractions compared to the PFD imposed to cultures without dark fraction. Pigment content is known to decrease when light increases (Berner *et al.*, 1989; Dubinsky and Stambler, 2009). So even if cells encountered dark periods, they had also to photoacclimate to the light received during illuminated phases.

More generally, the photoacclimation status of the cells subjected to dark fractions was probably found between the photoacclimation to the mean light regime, and the photoacclimation to the light imposed during light periods only.

In Chapter 3, it was found for *C. vulgaris* cultures exposed to various light conditions, a linear decreasing evolution between total pigment content and MRPA at steady states for MRPA values inferior to $15 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$. Figure 73 shows this linear relation and the points representing the steady states of cultures obtained in the presence of dark periods were added. MRPA was averaged over time for these cultures. The pigment content of cells cultivated in presence with dark period was found to follow the same relation with MRPA as the one of cells cultivated under continuous light conditions. From this observation, it can be concluded that even if cells did not present the same photoacclimation state to the same time averaged PFD, they seem to photoacclimate in the same way to the time-averaged light received. Furthermore, it can be noted that even under fluctuating light, the MRPA seems to be a quantity which describes well the photoacclimation of cells, even in light-dark alternations, if this parameter is averaged over the time.

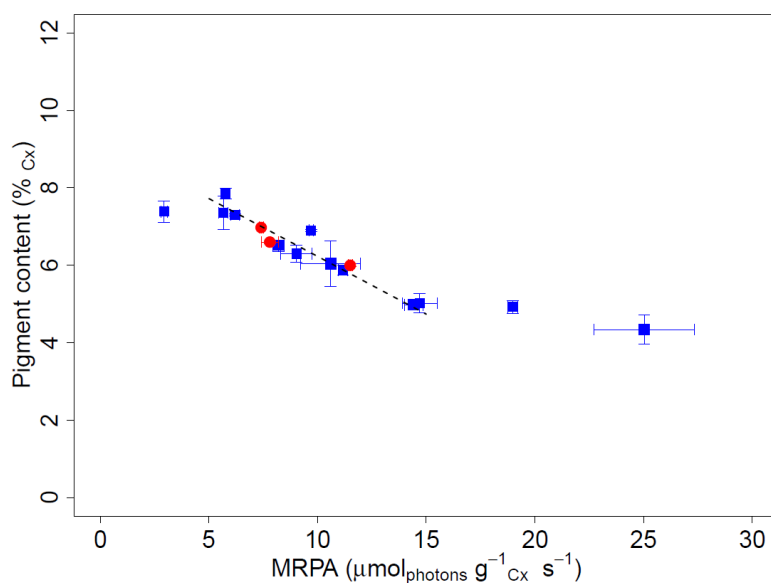


Figure 73 : Pigment content obtained for several steady-states, as a function of the MRPA values, in *C. vulgaris* cultivated with (red circles) or without dark fraction (blue squares). Error bars show standard deviations (n=3). Linear regression (dashed line) was calculated for steady states only obtained without dark period and for MRPA values between 5 and $15 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1} \text{Cx s}^{-1}$. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

The differences in the photoacclimation response to the same averaged PFD could be a partial explanation for the loss of productivity when cultures were exposed to 30 % dark fractions. Indeed, the pigment content was lower, so the light absorption capacity (*i.e.* MRPA) of cells was also lower. As the time averaged PFD available for the cultures was the same, the quantity

of absorbed photons was then lower, resulting in lower growth rate. Note that this may lead to question about the protocol used to compare culture with and without dark fractions, for example by applying same PFD in both cases. But in the literature, it was also found that the pigment content increased with f_d while applying a same PFD during light periods (Janssen *et al.*, 2000). So, using the same PFD to compare productivities between microalgae cultures with and without dark fractions would also introduce a bias to the results.

5.3.3 Study of dynamic responses to dark fractions

5.3.3.1 Photosynthetic efficiency and photoprotection through xanthophyll cycles

Photosynthetic conversion efficiency was measured to further investigate the loss of productivity for f_d value of 30 %. Figure 74 shows dynamic measurements of YPSII and YNPQ for *C. vulgaris* grown at 250 (Figure 74.A) and 800 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figure 74.B) with an f_d equal to 30 % and t_d equal to 300 s.

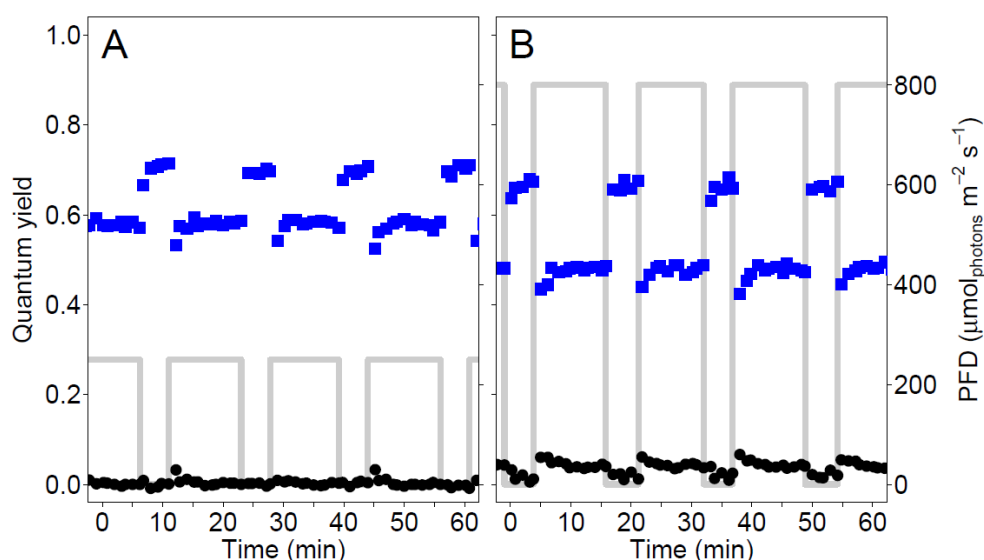


Figure 74 : Quantum yield for photochemical electron transport YPSII (blue squares, left axis) and quantum yield of non-photochemical quenching YNPQ (black circles, left axis) during culture at 250 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) with a 30 % dark fraction (grey line, right axis) and during a culture at 800 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) with a 30 % dark fraction (grey line, right axis). Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

During dark periods, YPSII increased and often tended to reach a maximal value after 3 to 5 min, which could be close to the maximal quantum yield for photochemical energy conversion in PSII of the cells (usually superior to 0.7), known as F_v/F_m (Kromkamp and Forster, 2003). This increase is explained by the progressive removal of electrons from the first PSII acceptors of the photosynthetic chain (Kolber and Falkowski, 1993). When light was switched on, YPSII values immediately decreased, below the value obtained before the dark period. It took 3 to 4 min to reach those values again. It must be noticed that the decrease in YPSII between the end

of a light period and the beginning of the next light period was the same regardless of the PFD imposed to the culture (Figure 74.A vs. Figure 74.B). YPSII dropped by 0.04 in both cases. However, values of YPSII observed after a few minutes in darkness or in light were not the same in both cultures. At $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, YPSII in darkness was equal to 0.71 and YPSII in light was equal to 0.58, while at $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the YPSII in darkness was equal to 0.68 and YPSII in light was equal to 0.48. A smaller YPSII value for a higher PFD is explained by the fact that at higher light exposure, more reactive centers are saturated, so the light is used with less efficiency. In the dark, the difference between both YPSII values could be a sign of greater stress in the culture subjected to a higher PFD. But it is worth noting that these values of YPSII in darkness were probably not stable and that it could possibly take longer dark period to obtain an actual F_v/F_m (i.e. 15 to 30 minutes following Kromkamp and Forster, 2003).

When considering YNPQ values, very low values always inferior to 0.05, were achieved for both cultures (Figure 74). For the culture exposed to $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, it was slightly higher than at $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Whatever the case, YNPQ time pattern was opposite to the YPSII one. When the light was turned off, YNPQ decreased from 0.08 to 0.04 in about 3 minutes. The amount of residual YNPQ in the dark showed that YPSII did not reach their maximal values (i.e. F_v/F_m). Note that the higher the light intensity, the longer the time required to fully reverse the non-photochemical quenching of fluorescence. When the light was turned on, YNPQ values were found equal to 0.12, so they were a bit higher than before the dark period. Then it took 4 to 5 minutes for YNPQ values to reach 0.08 again.

Consequence of the dynamics of the quantum yields, the specific ETR_{PSII} determined from PAM measurements was also dynamic. Figure 75 shows the dynamics of this parameter for *C. vulgaris* grown at 250 and $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with a f_d equal to 30 % and t_d equal to 300 s. The specific ETR_{PSII} was equal to 0 in darkness because there was no light. When the light was turned on, the specific ETR_{PSII} took 3 to 4 min to reach its maximal value. This value was about $16.5 \mu\text{mol}_{\text{e}^-} \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$ at $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and $8.0 \mu\text{mol}_{\text{e}^-} \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$ at $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The specific ETR_{PSII} was higher at higher PFD because there were more photons available.

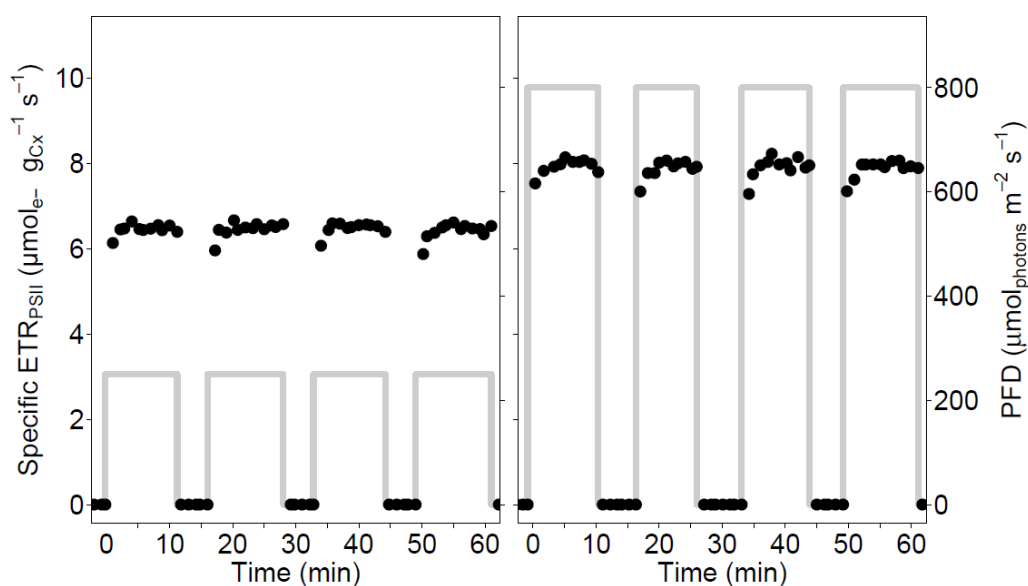


Figure 75 : Specific ETR_{PSII} determined from PAM measurement (black circle, left axis) during a culture at $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) with a 30 % dark fraction (grey line, right axis) and during a culture at $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) with a 30 % dark fraction (grey line, right axis). Dilution rate was 0.02h^{-1} .

As a conclusion to these observations, we can hypothesize that quantum yields in light periods were impacted by the dark periods in both conditions. In addition, YPSII and YNPQ never reached a full steady state, and all quantum yields followed the dynamics of light alternations. Because in the first minutes of a light period, YNPQ was not at its minimum and YPSII not at its maximum, less light energy was converted. Therefore, it could be expected a decrease in light use efficiency compared to continuous light exposure, with a lower quantum yield. This led to a dynamic specific ETR_{PSII} which was never found to be at its maximum as soon as the light was turned on. This could explain the loss in productivity compared to culture in continuous light.

Note however that measuring the specific ETR_{PSII} only gives information about mechanisms occurring during light period due to photosynthesis but it does not allow the measurement of possible respiratory mechanisms during the dark periods. It was then further investigated by measuring the rate of oxygen production ($r_{O_2}^{\text{gas}}$).

5.3.3.2 Rate of oxygen production

Because of its direct relation to photosynthetic growth, oxygen production rate ($r_{O_2}^{\text{gas}}$) was measured as first assessment of light/dark alternations on the resulting photosynthetic conversion. Figure 76 shows values of $r_{O_2}^{\text{gas}}$ for *C. vulgaris* grown at 250 and $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with an f_d equal to 30 % and a t_d equal to 300 s.

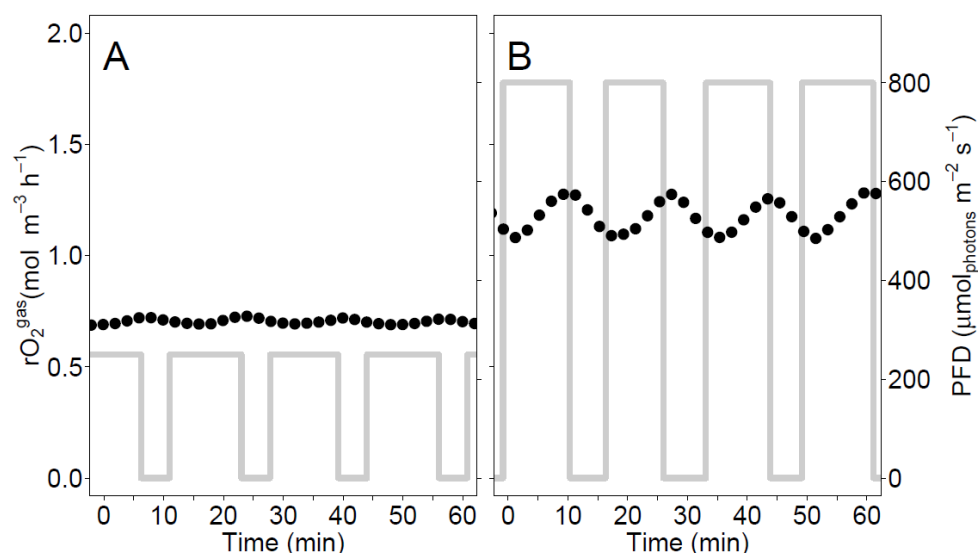


Figure 76 : Rate of oxygen production ($r_{O_2}^{gas}$) measured with a gas mass balance (black circle, left axis) during culture at $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) with a 30 % dark fraction (grey line, right axis) and during a culture at $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) with a 30 % dark fraction (grey line, right axis). $r_{O_2}^{gas}$ values were arbitrary shifted to decrease during dark periods and increase during light periods. Dilution rate was 0.02h^{-1} .

$r_{O_2}^{gas}$ values were found impacted by the alternation of light and darkness periods in both conditions. As ETR_{PSII} , $r_{O_2}^{gas}$ was found to increase with PFD. It oscillated between 0.69 and $0.73 \text{mol}_{O_2} \text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$ at $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and between 1.08 and $1.28 \text{mol}_{O_2} \text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$ at $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The amplitude was higher under high PFD.

However it was not possible to measure the accurate dynamics of the $r_{O_2}^{gas}$ response to the light and darkness alternations because of a too long stabilisation time of gas measurement by the micro-gas chromatography at the outlet of the PBR. Indeed, Figure 77 shows the evolution of O_2 content measured by the micro-gas chromatography at the outlet of the PBR filled with water after switches between air and N_2 at the entrance of the PBR. After a switch from N_2 to air, O_2 content was found to stabilise after 25 min in the new conditions. In the opposite transition, O_2 content was found to stabilise after 35 min in the new conditions. The very few minutes offset just after the switches correspond to the time for the gas to go through the dead volume. Then the shape of the response is due to the mixing of the gas volume inside the PBR. As a consequence the use of a micro-gas chromatography as set on our PBR was found to not be an appropriate method to measure a dynamic response of microalgae in the conditions of the presence study.

Thus, it was decided to arbitrary shift $r_{O_2}^{gas}$ values on Figure 76 so that they decreased during dark periods and increased during light periods. It was then observed that the decrease in $r_{O_2}^{gas}$ was longer than the duration of the dark period. This could be due to the time for O_2 content

stabilisation which was longer during the decrease than during the increase (Figure 77). However, it is important to note that a significant response time of microalgae to switch from a respiration mechanism to a photosynthesis mechanism could also occur. Indeed, it was seen in section 5.3.3.1 that ETR_{PSII} was not at its maximum as soon as the light was on. So the rate of oxygen produced *via* water splitting was probably not at its maximum instantly.

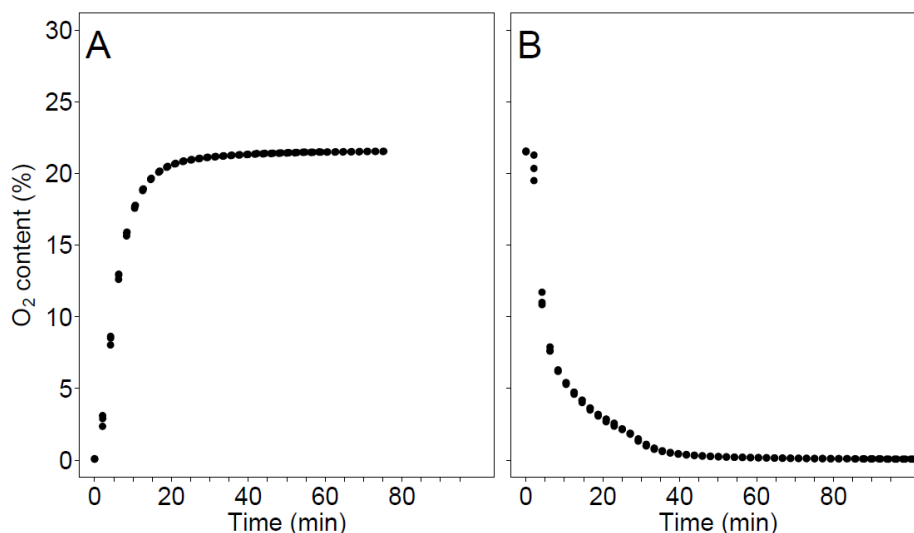


Figure 77 : Evolution of the O₂ content measured with the gas micro chromatography at the outlet of the PBR filled with water after a switch from N₂ to air bubbling (A) or a switch from air to N₂ (B) at the inlet of the PBR. In each experiment, the gas switch occurred at time = 0 min. Data from triplicates are plotted on each graph. The gas flowrate was equal to 129 mL min⁻¹.

5.3.4 Attempt to describe the mechanisms responsible for the loss of productivity

As a first attempt to explain the loss of biomass productivity when cultures are subjected to dark fractions, time-averaged values of various quantities (S_X , MRPA, γ during light periods, ETR_{PSII} and $r_{O_2}^{gas}$) are reported in Table 8.

As noticed before, for a same average PFD, the productivity in biomass decreased with the increase in the dark fraction, except for a 10 % dark fraction where no significant loss of productivity was observed.

For a same averaged PFD, the illuminated volume fraction γ was higher in culture subjected to dark fractions than in cultures without dark fractions. Indeed in cultures with dark fractions, biomass and pigment concentrations were lower, thus increasing light penetration in the culture volume. As a consequence, the contribution of respiration activity on the overall productivity during illuminated periods of cultures with dark fractions should be lower (less dark volume).

Table 8 : Time averaged values of γ measured during light periods, S_X , MRPA, ETR_{PSII} and $r_{O_2}^{gas}$ for *C. vulgaris* cultures at different conditions of PFD and dark fractions. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

PFD (time averaged PFD) ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	f_d, t_d (%, s)	S_X ($\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	γ	MRPA ($\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	ETR_{PSII} ($\mu\text{mole}^- \text{ g}_{C_X}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	$r_{O_2}^{gas}$ ($\text{mol}_{O_2} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$)
225 (225)	0, 0	13.9 ± 0.2	0.49	7.2 ± 0.9	4.2 ± 0.5	0.890 ± 0.060
250 (225)	10, 300	14.1 ± 0.2	0.52	7.4 ± 0.1	$4.2 \pm 0.1^*$	0.866 ± 0.065
175 (175)	0, 0	13.3 ± 0.3	0.43	6.2 ± 0.2	3.8 ± 0.3	0.847 ± 0.005
250 (175)	30, 300	10.1 ± 0.5	0.80	7.8 ± 0.4	$4.4 \pm 0.2^*$	0.705 ± 0.018
560 (560)	0, 0	27.9 ± 0.3	0.39	9.7 ± 0.1	5.0 ± 1.0	1.46 ± 0.01
800 (560)	30, 300	23.2 ± 0.3	0.58	11.5 ± 0.1	$6.0 \pm 0.8^*$	1.18 ± 0.08

Values are means $\pm$ standard deviations (n=3).

* standard deviations were calculated for $r_{O_2}^{PAM}$ values measured during light periods only.

As expected, MRPA increased with PFD in cultures without dark fractions. In presence of an f_d equal to 10 %, no significant change was observed in MRPA. However, for the same averaged PFD, the presence of an f_d equal to 30 % induced a significant increase in time-averaged MRPA. This increase in MRPA was found directly related to the decrease in surface productivity. At $175 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the presence of dark periods induced 24 % of productivity loss and 26 % of increase in MRPA and at $560 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the presence of a 30 % f_d induced a productivity loss equal to 17 % and an MRPA increase equal to 19 %. This is explained because the time-averaged PFD applied to the culture was the same with and without dark periods and all the light was absorbed by the culture ($\gamma < 1$). However the biomass concentration was lower in culture subjected to dark periods. As a consequence, more light was absorbed per unit biomass in these conditions, leading to higher MRPA values.

Without dark fractions, the specific ETR_{PSII} increased with PFD. No change in ETR_{PSII} was observed in culture with a 10 % dark fraction. However, an increase in ETR_{PSII} was observed for cultures subjected to dark fractions equal to 30 %. This increase was equal to 16 % at $175 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and to 20 % at $560 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. These variations of ETR_{PSII} were in-line with variations of MRPA. However, especially for f_d equal to 30 %, the increase in ETR_{PSII} was not found to be proportional to the increase in MRPA. To explain this, it was decided to analyse results obtained on the quantum yield for photochemical light energy conversion (YPSII).

Figure 78 shows the averaged YPSII measured during light periods as a function of the PFD imposed to the culture. Measurements were done on cultures without dark fractions, or subjected to dark fractions equal to 10 % or 30 %. YPSII was found to decrease with increasing PFD. At $250 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, there was no significant difference between YPSII measured in a culture with an f_d equal to 10 % and a culture with an f_d equal to 30 %. At $800 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with an f_d equal to 30 %, YPSII was lower than YPSII measured at $560 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ without f_d . It must be noticed that all values presented the same slope of evolution of YPSII values with PFD. Thus, it seems that the increase in f_d does not have any impact on YPSII values. It is therefore unlikely that the presence of a design dark fraction would interfere with the light absorption efficiency of the cells. On average, they tend to perform photosynthesis at the same rate of light utilization with or without dark fractions. Note also that no significant increase in energy loss (YNPQ or YNO) was observed in cells cultivated with dark fractions (data not shown). As a consequence the offset between increases in MRPA and increases in ETR_{PSII} at $175 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ can be due either to measurement inaccuracies or to state

transitions between the photosystem I and the photosystem II (Allen, 2003; Kargul and Barber, 2008). Indeed, ETR_{PSII} relates only on mechanisms which occur in photosystem II and the 0.5 factor in Eq. 5-14 supposes that 50 % of the absorbed light goes to the photosystem I (PSI) and 50 % goes to the PSII, which is not true in case of state transitions.

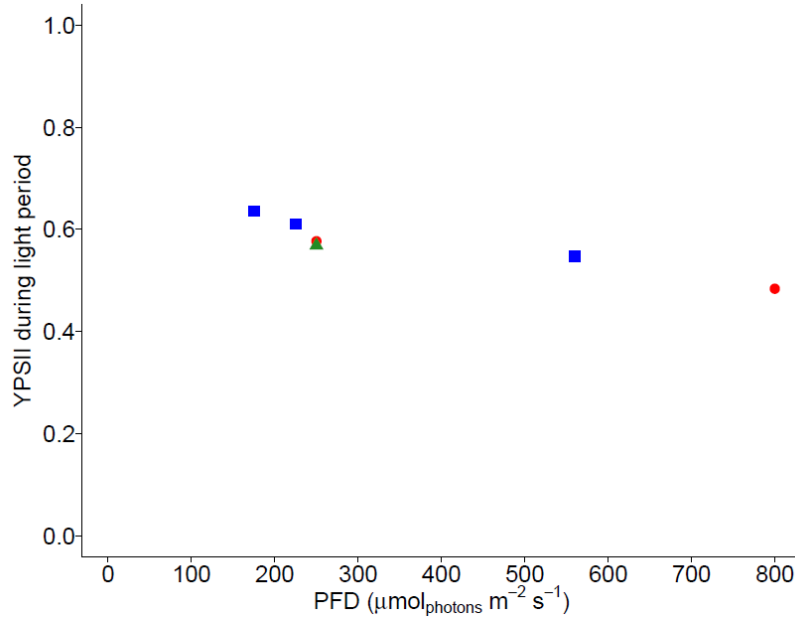


Figure 78 : Time averaged values of YPSII measured during light periods as a function of the PFD imposed to the culture. Measurements were done on culture without dark fractions (blue squares), with an f_d equal to 10 % (green triangle) and with an f_d equal to 30 %. Dilution rate was 0.02 h^{-1} .

We can note however that ETR_{PSII} only gives information about mechanisms occurring during light periods but it cannot give information about potential respiration mechanisms which can occur during dark periods. To have this information, it is necessary to look at $r_{O_2}^{gas}$ (Table 8). $r_{O_2}^{gas}$ without dark fractions increased with PFD. For a dark fraction equal to 10 %, where there was no significant loss in biomass productivity, no loss of $r_{O_2}^{gas}$ was observed. But for a same averaged PFD, a dark fraction of 30 % reduced $r_{O_2}^{gas}$. The decrease in $r_{O_2}^{gas}$ was equal to 17 % at $175 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and to 19 % at $560 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. At $560 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the decrease in $r_{O_2}^{gas}$ corresponds to the loss of the surface biomass productivity. However at $175 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the loss of biomass surface productivity was higher than the decrease in $r_{O_2}^{gas}$. This is probably due to an inaccuracy of gas fraction measurements at the outlet of the PBR. Indeed at $250 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with a dark fraction of 30 %, the gas flowrate was inferior to 40 mL min^{-1} which seems to be too low to have an accurate measurement with the micro-gas chromatography.

If $r_{O_2}^{gas}$ is compared to MRPA values obtained without dark periods, these parameters evolved similarly. However in presence of a 30 % dark fraction, for a same time averaged PFD, they

evolved in the opposite direction. It can thus be supposed that in these last conditions, respiration mechanisms occurred during dark periods.

It is important to note that electrons can be transferred in PSII without the production of an O₂ molecule due to alternative electron cycles (AEC) (Kolber and Falkowski, 1993; Prasil *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 2006). Indeed, in our experiments, during light periods, MRPA was higher for cultures exposed to dark periods compared to cultures under continuous light conditions. PQ pool was probably more reduced in these cultures, or its re-oxidation slower. As the presence of AEC depends on the RedOx state of the PQ pool, it is possible that AEC were more active in culture subjected to dark periods. In particular, the cycle around PSII and the water-water cycle (WWC) could uncouple O₂ production from the linear electron transport between PSII and PSI (Falkowski *et al.*, 1986; Geel *et al.*, 1997; Miyake, 2010; Prasil *et al.*, 1996). As a consequence, even if ETR_{PSII} increased in cultures in presence of 30 % dark fractions, it is possible that no more oxygen was produced. These AEC could also be a partial explanation for the loss of biomass productivity in cultures exposed to 30 % dark fractions. Wagner *et al.* (2006) observed that in *C. vulgaris* cultures, when the activity of alternative electron pathways was the highest, the efficiency in the conversion of photosynthetic energy into biomass was the lowest, but the loss in biomass productivity was not proportional. However, some AEC do not induce a loss of light energy conversion because they allow ATP synthesis (Lavaud *et al.*, 2002; Ralph *et al.*, 2010). So in the present case, even if they were more AEC in cultures that encountered dark periods, it is unlikely that they were responsible for the whole loss of surface productivity. To summarize, for cultures in presence of 30 % dark fractions, it can be hypothesized that some oxygen amount was consumed during dark periods through respiration mechanisms. These respiration mechanisms induced a loss of biomass productivity (*i.e.* decrease in S_x) and thus a decrease in growth rate. Consequently, in these conditions, less cells were present in the PBR. As it was decided to use the same averaged PFD to compare cultures with and without dark fractions, in cultures subjected to dark fractions, there was more light absorbed by unit biomass (*i.e.* increase in MRPA). The photosynthetic conversion responded well to this increase in MRPA as ETR_{PSII} increased without an increase in heat release (YNPQ and YNO negligible). However it is possible that, in these conditions, AEC occurred resulting in a low loss of productivity. In any case, the increase in photosynthesis rate was not sufficient to compensate for the loss of biomass productivity, which was probably mainly due to respiration mechanisms occurring during dark periods.

5.4 Conclusion

In this study, a LED panel was used to simulate design dark fractions in a PBR. This protocol allowed applying well-defined periods of light and darkness. It was here combined with the measurement of the dynamics of light response by using PAM *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence and online gas analyses.

When microalgae were subjected to regular dark periods, a loss of productivity was observed when the dark fraction was equal to 30 % of the culture volume. For the duration of the periods applied, the light response was found to be dynamic and oxygen production rate was never stable. The presence of dark fractions did not seem to be responsible for a decrease in light use efficiency. Thus it can be suggested that the loss of productivity was mainly explained by the respiratory mechanisms occurring during dark period.

Conclusions et perspectives

Le travail réalisé lors de cette thèse a eu pour objectif de faire un lien entre la physiologie des micro-algues et les bio-procédés permettant leur production. Elle fait suite à des études précédemment menées au laboratoire GEPEA, portant notamment sur l'optimisation de cultures solaires (Artu, 2016; Kazbar *et al.*, 2019; Kazbar *et al.*, 2019; Todisco, 2019). Jusqu'à présent, ces études étaient principalement basées sur l'expérimentation en photobioréacteurs (PBRs), avec des mesures des conditions de culture (lumière, température, pH, dioxygène dissous, etc) et de leur effet sur la cinétique de croissance et la composition biochimique des cellules, en vue notamment de modéliser la productivité et les réponses biologiques en fonction des conditions de culture (Pruvost et Cornet, 2012). Mais ces précédents travaux ont montré la nécessité de développer de nouveaux outils pour mieux suivre et comprendre les mécanismes physiologiques présents chez les micro-algues en cultures solaires, en vue de contrôler ces systèmes qui se révèlent très dynamiques. C'est donc dans ce cadre que s'est inscrit ce travail de thèse qui a principalement porté sur les réponses de *C. vulgaris* aux variations de lumière se produisant en culture solaire.

Dans un premier temps, ces réponses ont été étudiées hors PBR et à l'échelle de la cellule. Pour cela, des cultures diluées de *C. vulgaris* ont été acclimatées à 30 et 330 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Puis l'utilisation de la fluorescence de la chlorophylle *a* de type FRR a permis simultanément l'exposition des cellules à des variations de lumière et la mesure de paramètres photosynthétiques. La lumière appliquée était comprise entre 0 et 1490 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, avec une durée de traitement lumineux de 100, 600 ou 3000 s après 15 min d'acclimatation à l'obscurité. Par ces traitements, plusieurs facteurs ont ainsi pu être testés, à savoir l'impact de la photoacclimatation à long terme, l'impact de l'intensité lumineuse appliquée et de la durée d'exposition à de fortes intensités lumineuses sur les caractéristiques photosynthétiques.

Comparées aux cellules acclimatées à une faible lumière, celles acclimatées à 300 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ont présenté une plus grande vitesse de transport des électrons lorsqu'elles étaient exposées au traitement lumineux. Par ailleurs elles présentaient une plus grande capacité de photoprotection, en particulier lors de courtes expositions à de fortes lumières, avec une meilleure capacité de réparation après des expositions à de fortes lumières provoquant une photoinhibition. Un résultat intéressant de cette étude est l'accélération transitoire du transport des électrons qui a eu lieu après une exposition de 10 à 20 s à une lumière sursaturante.

Cependant, si cette exposition était prolongée (60-120 s), la vitesse de transport des électrons diminuait considérablement. Cette accélération transitoire a été observée quelle que soit la photoacclimatation des cellules et a été principalement expliquée par une accélération du transfert des électrons en sortie du photosystème II.

Les temps d'exposition appliqués lors de cette première étude ont été choisis pour être similaires aux temps caractéristiques des cycles lumière/obscurité (L/D cycles) pour les plus courts (10 s) (Pruvost *et al.*, 2008a), et pourraient également s'approcher des temps caractéristiques du passage des cellules dans des boucles sombres pour les plus longs (300 s) (Kazbar *et al.*, 2019). Dans la mesure où l'intensité d'exposition a joué un rôle important, de nouvelles séries d'expérience sur la même approche pourraient permettre d'estimer les durées d'exposition optimales en fonction de l'intensité lumineuse appliquée. Ainsi, en jouant sur la vitesse d'agitation de la culture dans le réacteur, ou même dans la conception de boucles sombres, la lumière pourrait être utilisée de manière plus efficace.

D'une façon plus générale cette première partie des recherches a mis en évidence l'intérêt de la mesure *in vivo* de la fluorescence de la chlorophylle *a* pour l'étude de la réponse photosynthétiques des micro-algues aux variations de lumière. Il a donc été décidé d'utiliser une technologie similaire pour faire l'étude de cette réponse en PBR. Ainsi, pour comprendre les mécanismes impliqués lors de variations de lumière à l'échelle du réacteur, différentes conditions de lumière ont été appliquées à *Chlorella vulgaris* cultivée en PBR contrôlé de laboratoire (PBR torique).

Grâce à ces expérimentations, il a pu être montré que la vitesse moyenne d'absorption de photons (MRPA) était une grandeur jouant directement sur la photoacclimatation des micro-algues en PBR. A l'état stationnaire, pour des MRPA inférieurs à $15 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{g}^{-1} \text{s}^{-1}$, une relation linéaire a été définie entre teneur en pigments et MRPA, et ce quel que soit le profil lumineux obtenu le long de la profondeur de culture ($\gamma < 1$ ou $\gamma > 1$). Puis, en conditions dynamiques, lors de transitions lumineuses de 75 à $765 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et de 765 à $75 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, les concentrations en biomasse et en pigments ont été observées comme étant étroitement liées au MRPA. Les fortes variations en MRPA ont induit des variations de ces deux concentrations (biomasse et pigments) qui jouent sur l'atténuation et l'absorption de la lumière, avec des temps de stabilisation de ces grandeurs similaires. Ces résultats confortent l'utilisation du MRPA comme grandeur essentielle à la modélisation de la croissance photosynthétique des micro-algues en PBR (Kandilian *et al.*, 2019).

Ces expérimentations ont également permis d'étudier un élément important de tout (bio)procédés, à savoir les temps caractéristiques des mécanismes réactionnels mis en jeu. Ainsi, pour des variations instantanées du MRPA avec le flux de photons, les temps de réponse des concentrations en biomasse et pigments se sont révélés les plus longs, pouvant même atteindre quelques heures. En revanche, les paramètres photosynthétiques correspondant à de la photoprotection (*via* le rendement quantique de la perte non photochimique d'énergie régulée ou YNPQ) ou de la photoinhibition (*via* le rendement quantique maximal de la conversion photochimique de l'énergie lumineuse ou F_v/F_m) ont présenté un temps de réponse plus rapide, souvent inférieur à 30 minutes. Ces mesures illustrent bien la photoacclimatation des micro-algues dite à court terme ou à long terme (Brunet *et al.*, 2011).

La photoacclimatation à court terme a permis de justifier, en partie, les différentes réponses du métabolisme entre une transition lumineuse ascendante ou descendante. Lors de la transition ascendante de 75 à 765 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la photoinhibition était quasiment immédiate, puis les mécanismes de photoprotection se sont mis en place. A partir de ce moment, la vitesse de croissance en biomasse a augmenté. La stabilisation de la teneur en pigments semblait quant à elle coïncider avec la recouvrance du F_v/F_m . Lors de la transition opposée de 765 à 75 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aucun phénomène de photoprotection n'a été logiquement observé (transition descendante). Cependant, la forte diminution de la concentration en biomasse lors des 12 premières heures a pu être expliquée par le manque de lumière dans la culture.

Cette deuxième étude a finalement permis de montrer que lors de changements brusques de lumière (sous forme de paliers), l'acclimatation des micro-algues, dont l'objectif pour la cellule est d'avoir une réponse photosynthétique optimale, était un processus long, nécessitant jusqu'à des centaines d'heures. Or, en culture solaire, la lumière varie continuellement pendant la journée (Duffie et Beckman, 2013; Le Borgne, 2011). Ainsi, dans ces conditions, les cultures n'atteignent jamais d'état stationnaire et elles sont en permanence dans un état transitoire. Ceci conforte l'idée qu'il est nécessaire de développer des outils permettant le suivi de cultures solaires afin de mieux comprendre et d'optimiser ce procédé dynamique. Ceci a donc été réalisé dans un troisième temps.

Un intérêt particulier a été porté sur l'utilisation de la fluorescence de la chlorophylle *a* de type PAM pour le suivi de culture solaire de micro-algues. Pour cela, une sonde PAM a été implémentée sur la surface du PBR d'étude lors de cultures de *C. vulgaris* menées en condition dynamique de lumière. Tout d'abord, la comparaison de mesures en ligne et hors ligne du rendement quantique de la conversion photochimique de l'énergie lumineuse dans le

photosystème II (YPSII) a mis en évidence le fait que la sonde PAM était adaptée à la mesure de paramètres photosynthétiques sur une culture dense, comme le sont généralement les cultures solaires.

La mesure en ligne du YPSII, par ailleurs, s'est avérée pertinente pour la détection de conditions de culture défavorables. Ce paramètre, qui est influencé par les procédés se déroulant à la fois en amont et en aval du photosystème II (Kromkamp et Forster, 2003), s'est révélé diminuer immédiatement lors de changements des conditions affectant alors l'appareil photosynthétique, en particulier lors d'une augmentation soudaine en oxygène dissous ou d'une carence en carbone. Cela a montré l'avantage d'une mesure en ligne de ce type, à savoir l'immédiateté de la détection du problème permettant sa rapide résolution, évitant par exemple la perte de culture. La mesure du YPSII s'est révélée également intéressante pour estimer de manière approximative la productivité de la culture. En effet, le produit du YPSII et de la lumière appliquée à la culture a présenté le même profil que la vitesse volumétrique de production de dioxygène, elle-même stœchiométriquement proportionnelle à la vitesse volumétrique de production de biomasse (Urbain, 2017).

Pour aller plus loin dans l'estimation de la productivité *via* la mesure PAM de la fluorescence chlorophylle *a*, il a été nécessaire d'effectuer des mesures sur des cultures acclimatées à l'obscurité. En particulier, la concentration en chlorophylle *a* a pu être estimée en ligne par mesure de la fluorescence minimale (Huot et Babin, 2010). Cependant, pour être mesurée en cultures solaires, une méthodologie spécifique doit être mise en place, à savoir l'installation de deux sondes PAM, l'une dans le volume éclairé de culture, et la deuxième dans une boucle non éclairée de recirculation de la culture. A noter que cette stratégie permettrait également de connaître l'état de photoprotection des cellules en rendant possible la mesure du YNPQ (Klughammer et Schreiber, 2008).

Actuellement un modèle radiatif basé sur les propriétés radiatives de *C. vulgaris*, sa concentration en biomasse, sa teneur en pigments et la lumière incidente permet de connaître la distribution de la lumière dans le volume de culture du PBR (Kandilian *et al.*, 2016; Pottier *et al.*, 2005; Pruvost et Cornet, 2012). Une reformulation de ce modèle pourrait permettre l'obtention de la distribution de la lumière en fonction de la concentration en pigments, au lieu de la teneur, qui impose de connaître également la concentration en biomasse, donnée qu'il n'est pas toujours aisé de mesurer en ligne. Dans le chapitre 3, il a été montré que dans les conditions de lumière étudiées, la composition des différents pigments, à savoir la chlorophylle *a*, la chlorophylle *b*, et les caroténoïdes totaux, ne variait pas par rapport aux pigments totaux.

Ainsi, à partir de la mesure en ligne de la concentration en chlorophylle *a* par mesure PAM seule, il pourrait être possible de connaître en temps réel la teneur en pigments totaux et donc la distribution de la lumière dans le PBR. Cela permettrait un pilotage du système basé, par exemple, sur le MRPA, pour éviter entre autre des conditions lumineuses risquées où, du fait d'un flux de photons incident très élevé et d'une concentration en pigments trop faible, les cellules risqueraient une photoinhibition irréversible. Ainsi, le taux de dilution pourrait être ajusté pour maintenir une atténuation lumineuse optimale.

Par ailleurs, en complément aux mesures de flux de gaz, la fluorescence de la chlorophylle *a* de type PAM a permis de mettre en évidence le décalage entre la vitesse du transport des électrons et la vitesse de production de dioxygène en présence de fortes lumières. Ce décalage est probablement dû aux cycles alternatifs des électrons (Falkowski *et al.*, 1986; Kolber et Falkowski, 1993).

Cependant, puisque la fluorescence est une mesure quasiment instantanée de la réponse physiologique, pouvoir mesurer ce phénomène pourrait être intéressant dans le cas d'études physiologiques sur la réponse des micro-algues aux variations de lumière. C'est pourquoi, lors de la dernière partie de cette thèse, la sonde PAM, complétée par la mesure de flux de gaz, a été utilisée pour étudier l'impact de boucles sombres, présentes par conception sur la majorité des PBR solaires, sur *C. vulgaris*. A noter que cette étude fait par ailleurs écho à la nécessité d'introduire une boucle sombre pour l'utilisation de sonde PAM en cultures solaires, si on souhaite mesurer en ligne la concentration en chlorophylle *a*.

Des alternances de périodes lumineuses et de périodes sombres, générées par un panneau de LED ont permis de simuler le passage régulier des cellules dans les parties éclairées ou sombres du PBR. Cela a notamment permis de maîtriser les temps d'exposition des micro-algues à la lumière ou à l'obscurité.

En accord avec une étude précédente sur l'influence de boucles sombres (Kazbar *et al.*, 2019), en tenant compte de la lumière moyenne apportée à la culture, une perte de productivité d'environ 20 % a été observée pour une fraction sombre équivalente à 30 % du volume du réacteur, mais aucune perte de productivité n'a été observée pour une fraction sombre de 10 %. Ces pertes de productivités ont été obtenues pour un flux de photons incident imposé égal à 250 ou 800 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. L'efficacité de la photosynthèse répondant bien aux différences de conditions lumineuses entre les cultures présentant ou ne présentant pas de boucles sombres, la présence de phénomènes de respiration à l'obscurité a été privilégiée pour expliquer cette perte de productivité. Cependant, il est fort probable que les cycles alternatifs des électrons soient

plus fréquents en présence de boucles sombres, induisant également une perte de productivité. Il serait intéressant d'approfondir cet aspect, en réalisant par exemple des expérimentations avec marquage de l'oxygène pour distinguer les phénomènes mis en jeu.

Toutefois, la sonde PAM a permis de mettre en évidence la dynamique de la réponse photosynthétique de *C. vulgaris* lors des alternances de lumière. Lorsqu'après une période sombre, la culture était de nouveau éclairée, le YPSII n'était pas immédiatement à son maximum, tout comme le YNPQ n'était pas immédiatement à son minimum. Ainsi, il est fort probable que la productivité en dioxygène résultante n'était pas à son maximum immédiatement après le retour de la lumière. De même, en présence de périodes de lumière alternant avec des périodes d'obscurité, la vitesse volumétrique de production de dioxygène oscillait continuellement. Ces informations permettent de repenser les modèles cinétiques de croissance pour y introduire des temps d'activation ou de désactivation, pour prendre en considération ces dynamiques lors de variations de lumière incidente.

Ce PBR d'étude pourrait également être utilisé pour l'étude de la réponse photosynthétique des micro-algues à d'autres variations de lumières telles que celles dues aux cycles solaires ou aux conditions météorologiques, ou à des variations de température par exemple.

En conclusion globale, cette thèse a permis l'étude des réponses dynamiques de *C. vulgaris* aux variations de lumière comme celles présentes en culture solaire. Lors de ces travaux, de nombreux temps caractéristiques ont pu être mis en évidence, que ce soit les temps caractéristiques liés à des variations d'exposition lumineuse permettant d'obtenir une accélération du transport des électrons, ou les temps caractéristiques de réponses des micro-algues aux changements de lumière qui peuvent être courts (YPSII, YNPQ, F_v/F_m) ou longs (concentrations en biomasse ou pigments). Une des perspectives de cette thèse pourrait être l'utilisation de ces temps caractéristiques pour améliorer la modélisation des cinétiques de réponse des micro-algues en présence de lumière variable, à savoir la modélisation des réponses face aux cycles L/D, aux boucles sombres ou aux variations de lumière diurnes.

Par ailleurs, lors de la mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* par la sonde PAM, le YPSII obtenu par mesure directe a permis de détecter des conditions non favorables de cultures. Finalement, cette grandeur répondait immédiatement à des modifications de flux de photons incidents, à des carences en carbone et à des augmentations de concentration en dioxygène dissous. Dans un objectif de contrôle de culture, il serait intéressant de poursuivre cette investigation afin de déterminer dans quelles proportions ce paramètre varie lorsqu'on modifie les conditions de cultures. Ainsi, par rétrocontrôle, le YPSII (et donc la conversion

photosynthétique) pourrait être maintenu à une certaine valeur en fonction de l'objectif à atteindre, comme l'obtention d'une productivité maximale en biomasse ou le maintien d'une carence pour produire un composé en particulier (lipides, sucres, pigments, etc.).

Enfin, il faut rappeler que l'objectif initial de cette thèse était l'étude de la conversion photosynthétique de l'énergie lumineuse par les micro-algues en culture solaire. Si toutes les études présentées dans ce manuscrit ont été réalisées en lumière artificielle, il est important de signaler que ce choix a été fait pour permettre un meilleur contrôle des conditions de culture. Cependant, il serait par la suite intéressant de mener cette étude en conditions solaires réelles. En particulier, la sonde PAM pourrait être implémentée sur PBRs solaires réels et être utilisée pour optimiser les cultures solaires *via* le YPSII, pour estimer la productivité en ligne ou pour étudier la photoprotection en conditions réelles de lumière. Ce serait notamment intéressant en été lorsque l'amplitude des intensités lumineuses subies par les cellules est la plus grande.

Références bibliographiques

a4f, Portugal [no date]. Available at: https://www.a4f.pt/files/1498731929_1b504be546b6cfd4c57619451a2f4c6e.jpg [Accessed 2 November 2019].

ac-Grenoble [no date] Les étapes de la respiration cellulaire. Available from: http://www.ac-grenoble.fr/lycee/elie.cartan/spip/IMG/pdf_Docs-cours-5.pdf

Acien, G., Fernandez-Sevilla, J. M. and Molina-Grima, E. (2013). Photobioreactors for the production of microalgae, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **12**. DOI: 10.1007/s11157-012-9307-6.

Allen, J. F. (2003). State Transitions--a Question of Balance, *Science*, **299**, pp. 1530–1532. DOI: 10.1126/science.1082833.

Allen, M. R., Frame, D. J., Huntingford, C., Jones, C. D., Lowe, J. A., Meinshausen, M. and Meinshausen, N. (2009). Warming caused by cumulative carbon emissions towards the trillionth tonne, *Nature*, **458**, pp. 1163–1166. DOI: 10.1038/nature08019.

Andersen, R. A. (2005, April 2). Algal Culturing Techniques - 1st Edition. Available at: <https://www.elsevier.com/books/algal-culturing-techniques/andersen/978-0-12-088426-1> [Accessed 14 February 2019].

Antal, T. K. (2018). CHAPTER 10: The Metabolic Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to Depletion of Essential Nutrients: Application for Hydrogen Production. In *Microalgal Hydrogen Production*. pp. 235–264.

Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C. and Perales, J. A. (2014). Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production, *Water Research*, **49**, pp. 465–474. DOI: 10.1016/j.watres.2013.10.036.

Artu, A. (2016). Etude et optimisation de la culture de microalgues en photobioréacteurs solaires. Nantes. Available from: <http://www.theses.fr/2016NANT4019>

- Asada, K. (2000). The water-water cycle as alternative photon and electron sinks., *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **355**, pp. 1419–1431.
- Atkin, O., Evans, J. and Siebke, K. (1998). Relationship between the inhibition of leaf respiration by light and enhancement of leaf dark respiration following light treatment, *Functional Plant Biology*, **25**, pp. 437–443. DOI: 10.1071/PP97159.
- Auguie, B. (2017). gridExtra: Miscellaneous Functions for ‘Grid’ Graphics,
- Bachmann, K. M., Ebbert, V., Adams III, W. W., Verhoeven, A. S., Logan, B. A. and Demmig-Adams, B. (2004). Effects of lincomycin on PSII efficiency, non-photochemical quenching, D1 protein and xanthophyll cycle during photoinhibition and recovery, *Functional Plant Biology*, **31**, pp. 803–813.
- Baty, F., Blume, C., Charles, S., Brutsche, M., Flandrois, J.-P. and Delignette-Muller, M.-L. (2015). A Toolbox for Nonlinear Regression in R: The Package nlstools., **66**, pp. 1–21.
- Béchet, Q., Shilton, A., Park, J. B. K., Craggs, R. J. and Guieysse, B. (2011). Universal Temperature Model for Shallow Algal Ponds Provides Improved Accuracy, *Environmental Science & Technology*, **45**, pp. 3702–3709. DOI: 10.1021/es1040706.
- Becker, W. (2007). Microalgae in Human and Animal Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology*. pp. 312–351.
- Bennoun, P. (1982). Evidence for a respiratory chain in the chloroplast, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**, pp. 4352–4356.
- Berner, T., Dubinsky, Z., Wyman, K. and Falkowski, P. G. (1989). Photoadaptation and the “Package” Effect in *Dunaliella Tertiolecta* (chlorophyceae)1, *Journal of Phycology*, **25**, pp. 70–78. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1989.00070.x.
- Beyerinck, M. W. (1890). Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen.
- Bilger, W. and Björkman, O. (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*, *Photosynthesis Research*, **25**, pp. 173–185. DOI: 10.1007/BF00033159.

- Bonnanfant, M., Jesus, B., Pruvost, J., Mouget, J.-L. and Campbell, D. A. (2019). Photosynthetic electron transport transients in *Chlorella vulgaris* under fluctuating light, *Algal Research*, **44**, pp. 101713. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101713.
- Borowitzka, M. A. and Vonshak, A. (2017). Scaling up microalgal cultures to commercial scale, *European Journal of Phycology*, **52**, pp. 407–418. DOI: 10.1080/09670262.2017.1365177.
- Brahm, D. (2013). g.data: Delayed-Data Packages (Version 2.4). Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=g.data>
- Brunet, C., Johnsen, G., Lavaud, J. and Roy, S. (2011). Pigments and photoacclimation processes. In *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*.
- Busnel, A. (2018). *Etude du potentiel de la cyanobactérie Aphanizomenon flos-aquae (AFA) pour des applications alimentaires* (thesis). Nantes. Available from : <http://www.theses.fr/2018NANT4086>
- Cao, J. and Govindjee (1990). Chlorophyll a fluorescence transient as an indicator of active and inactive photosystem II in thylakoid membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1015**, pp. 180–188. DOI: 10.1016/0005-2728(90)90018-Y.
- Cassano, A. E., Martin, C. A., Brandi, R. J. and Alfano, O. M. (1995). Photoreactor Analysis and Design: Fundamentals and Applications, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **34**, pp. 2155–2201. DOI: 10.1021/ie00046a001.
- Chavaillaz, Y., Roy, P., Partanen, A.-I., Da Silva, L., Bresson, É., Mengis, N., Chaumont, D. and Matthews, H. D. (2019). Exposure to excessive heat and impacts on labour productivity linked to cumulative CO₂ emissions, *Scientific Reports*, **9**, pp. 1–11. DOI: 10.1038/s41598-019-50047-w.
- Clavijo Rivera, E., Montalescot, V., Viau, M., Drouin, D., Bourseau, P., Frappart, M., Monteux, C. and Couallier, E. (2018). Mechanical cell disruption of *Parachlorella kessleri* microalgae: Impact on lipid fraction composition, *Bioresource Technology*, **256**, pp. 77–85. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.01.148.
- Cogne, G., Rügen, M., Bockmayr, A., Titica, M., Dussap, C.-G., Cornet, J.-F. and Legrand, J. (2011).

- A model-based method for investigating bioenergetic processes in autotrophically growing eukaryotic microalgae: application to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biotechnology Progress*, **27**, pp. 631–640. DOI: 10.1002/btpr.596.
- Consalvey, M., Perkins, R. G., Paterson, D. M. and Underwood, G. J. C. (2005). Pam Fluorescence: A Beginners Guide for Benthic Diatomists, *Diatom Research*, **20**, pp. 1–22. DOI: 10.1080/0269249X.2005.9705619.
- Cornet, J. F., Dussap, C. G. and Dubertret, G. (1992). A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: I. Coupling between light transfer and growth kinetics, *Biotechnology and Bioengineering*, **40**, pp. 817–825. DOI: 10.1002/bit.260400709.
- Cornet, J. -F., Dussap, C. G., Gros, J.-B., Binois, C. and Lasseur, C. (1995). A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors, *Chemical Engineering Science*, **50**, pp. 1489–1500. DOI: 10.1016/0009-2509(95)00022-W.
- Cornet, J.-F. (1992). *Kinetic and Energetic modelling of photobioreactors. Biochemically structured model. Applications to a closed ecological life support system.* (Theses). Université Paris XI Orsay. Available from : <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01302386>
- Cornet, J.-F. and Dussap, C.-G. (2009). A Simple and reliable formula for assessment of maximum volumetric productivities in photobioreactors, *Biotechnology Progress*, **25**, pp. 424–435. DOI: 10.1002/btpr.138.
- Costa, J. A. V. and de Morais, M. G. (2011). The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae, *Bioresource Technology*, **102**, pp. 2–9. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.014.
- Crofts, A. R. and Wraight, C. A. (1983). The electrochemical domain of photosynthesis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, **726**, pp. 149–185. DOI: 10.1016/0304-4173(83)90004-6.
- Crutzen, P. J. (2006). The “Anthropocene”. In Ehlers, E. and Krafft, T. (eds), *Earth System Science in the Anthropocene*. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 13–18.

- Dauchet, J., Blanco, S., Cornet, J.-F. and Fournier, R. (2015). Calculation of the radiative properties of photosynthetic microorganisms, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, **161**, pp. 60–84. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2015.03.025.
- Davies-Colley, R. J., Pridmore, R. D. and Hewitt, J. E. (1986). Optical properties of some freshwater phytoplanktonic algae, *Hydrobiologia*, **133**, pp. 165–178. DOI: 10.1007/BF00031865.
- Degrenne, B., Pruvost, J., Christophe, G., Cornet, J. F., Cogne, G. and Legrand, J. (2010). Investigation of the combined effects of acetate and photobioreactor illuminated fraction in the induction of anoxia for hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*, *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**, pp. 10741–10749. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2010.02.067.
- Degrenne, B., Pruvost, J. and Legrand, J. (2011). Effect of prolonged hypoxia in autotrophic conditions in the hydrogen production by the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* in photobioreactor, *Bioresource Technology*, **102**, pp. 1035–1043. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.08.009.
- Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C. and Michaud, P. (2016). Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides, *Biotechnology Advances*, **34**, pp. 1159–1179. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.08.001.
- Dubinsky, Z. and Stambler, N. (2009). Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications, *Aquatic Microbial Ecology*, **56**, pp. 163–176. DOI: 10.3354/ame01345.
- Duffie, J. A. and Beckman, W. A. (2013). *Solar Engineering of Thermal Processes*, pp. 928.
- Edelman M., M. (2008). D1-protein dynamics in photosystem II: the lingering enigma, *Photosynthesis Research*, **98**, pp. 609–620.
- Elzhov, T. V., Mullen, K. M., Spiess, A.-N. and Bolker, B. (2016). minpack.lm: R Interface to the Levenberg-Marquardt Nonlinear Least-Squares Algorithm Found in MINPACK, Plus Support for Bounds,
- Falkowski, P. G. and Owens, T. G. (1978). Effects of light intensity on photosynthesis and dark respiration in six species of marine phytoplankton, *Marine Biology*, **45**, pp. 289–295. DOI: 10.1007/BF00391815.

- Falkowski, P. G., Dubinsky, Z. and Wyman, K. (1985). Growth-irradiance relationships in phytoplankton, *Limnology and Oceanography*, **30**, pp. 311–321. DOI: 10.4319/lo.1985.30.2.0311.
- Falkowski, P. G., Fujita, Y., Ley, A. and Mauzerall, D. (1986). Evidence for Cyclic Electron Flow around Photosystem II in *Chlorella pyrenoidosa*, *Plant Physiology*, **81**, pp. 310–312.
- Falkowski, P. G., Wyman, K., Ley, A. C. and Mauzerall, D. C. (1986). Relationship of steady-state photosynthesis to fluorescence in eucaryotic algae, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **849**, pp. 183–192. DOI: 10.1016/0005-2728(86)90024-1.
- Felcmanová, K., Lukeš, M., Kotabová, E., Lawrenz, E., Halsey, K. H. and Prášil, O. (2017). Carbon use efficiencies and allocation strategies in *Prochlorococcus marinus* strain PCC 9511 during nitrogen-limited growth, *Photosynthesis Research*, **134**, pp. 71–82. DOI: 10.1007/s11120-017-0418-3.
- Figueroa, F. L., Jerez, C. G. and Korbee, N. (2013). Use of in vivo chlorophyll fluorescence to estimate photosynthetic activity and biomass productivity in microalgae grown in different culture systems, *Latin American Journal of Aquatic Research*, **41**, pp. 801–819. DOI: 103856/vol41-issue5-fulltext-1.
- Garcia-Mendoza, E., Matthijs, H. C. P., Schubert, H. and Mur, L. R. (2002). Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlorella fusca* acclimated to constant and dynamic light conditions, *Photosynthesis Research*, **74**, pp. 303. DOI: 10.1023/A:1021230601077.
- Geel, C., Versluis, W. and Snel, J. F. H. (1997). Estimation of oxygen evolution by marine phytoplankton from measurement of the efficiency of Photosystem II electron flow, *Photosynthesis Research*, **51**, pp. 61–70. DOI: 10.1023/A:1005779112140.
- Geider, R. J. and Osborne, B. A. (1989). Respiration and microalgal growth: a review of the quantitative relationship between dark respiration and growth, *New Phytologist*, **112**, pp. 327–341. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1989.tb00321.x.
- Genty, B., Briantais, J.-M. and Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **990**, pp. 87–92. DOI: 10.1016/S0304-4165(89)80016-9.

- Gilbert, M., Wilhelm, C. and Richter, M. (2000). Bio-optical modelling of oxygen evolution using in vivo fluorescence: Comparison of measured and calculated photosynthesis/irradiance (P-I) curves in four representative phytoplankton species, *Journal of Plant Physiology*, **157**, pp. 307–314. DOI: 10.1016/S0176-1617(00)80052-8.
- Goetz, V., Le Borgne, F., Pruvost, J., Plantard, G. and Legrand, J. (2011). A generic temperature model for solar photobioreactors, *Chemical Engineering Journal*, **175**, pp. 443–449. DOI: 10.1016/j.cej.2011.09.052.
- Gorbunov, M. Y., Kolber, Z. S. and Falkowski, P. G. (1999). Measuring photosynthetic parameters in individual algal cells by Fast Repetition Rate fluorometry, *Photosynthesis Research*, **62**, pp. 141–153. DOI: 10.1023/A:1006360005033.
- Goss, R. and Jakob, T. (2010). Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae, *Photosynthesis Research*, **106**, pp. 103–122. DOI: 10.1007/s11120-010-9536-x.
- Goss, R. and Lepetit, B. (2015). Biodiversity of NPQ, *Journal of Plant Physiology*, **172**, pp. 13–32. DOI: 10.1016/j.jplph.2014.03.004.
- Govindjee, Shevela, D. and Björn, L. O. (2017). Evolution of the Z-scheme of photosynthesis: a perspective. Available at: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5747858> [Accessed 10 July 2019].
- Graham, P. J., Nguyen, B., Burdyny, T. and Sinton, D. (2017). A penalty on photosynthetic growth in fluctuating light, *Scientific Reports*, **7**, pp. 1–11. DOI: 10.1038/s41598-017-12923-1.
- Greene, R. M., Geider, R. J., Kolber, Z. and Falkowski, P. G. (1992). Iron-Induced Changes in Light Harvesting and Photochemical Energy Conversion Processes in Eukaryotic Marine Algae, *Plant Physiology*, **100**, pp. 565–575. DOI: 10.1104/pp.100.2.565.
- Grobbelaar, J. U. (2007). Algal Nutrition – Mineral Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 95–115.
- Halsey, K. H. and Jones, B. M. (2015). Phytoplankton Strategies for Photosynthetic Energy Allocation, *Annual Review of Marine Science*, **7**, pp. 265–297. DOI: 10.1146/annurev-marine-010814-015813.

- Halsey, K. H., Milligan, A. J. and Behrenfeld, M. J. (2010). Physiological optimization underlies growth rate-independent chlorophyll-specific gross and net primary production, *Photosynthesis Research*, **103**, pp. 125–137. DOI: 10.1007/s11120-009-9526-z.
- Han, B.-P. (2000). Effect of photoinhibition on algal photosynthesis: a dynamic model, *Journal of Plankton Research*, **22**, pp. 865–885. DOI: 10.1093/plankt/22.5.865.
- Heinz Walz GmbH (2001). Instruction manual for PAM-CONTROL.
- Hoefnagel, M. H. N., Atkin, O. K. and Wiskich, J. T. (1998). Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark, *Biochimica et Biophysica Acta = International Journal of Biochemistry and Biophysics*. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302893110> [Accessed 18 July 2019].
- Hu, Q. (2007a). Environmental Effects on Cell Composition. In *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 83–94.
- Hu, Q. (2007b). Industrial Production of Microalgal Cell-Mass and Secondary Products - Major Industrial Species: *Arthrospira (Spirulina) Platensis*. In *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 264–272.
- Hughes, D. J., Campbell, D. A., Doblin, M. A., Kromkamp, J. C., Lawrenz, E., Moore, C. M., *et al.* (2018). Roadmaps and Detours: Active Chlorophyll- a Assessments of Primary Productivity Across Marine and Freshwater Systems, *Environmental Science & Technology*. DOI: 10.1021/acs.est.8b03488.
- Huot, Y. and Babin, M. (2010). Overview of Fluorescence Protocols: Theory, Basic Concepts, and Practice. In Suggett, D. J., Prášil, O., and Borowitzka, M. A. (eds), *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer Netherlands, pp. 31–74.
- Ifrim, G. A., Titica, M., Cogne, G., Boillereaux, L., Legrand, J. and Caraman, S. (2014). Dynamic pH model for autotrophic growth of microalgae in photobioreactor: A tool for monitoring and control purposes, *AIChE Journal*, **60**, pp. 585–599. DOI: 10.1002/aic.14290.
- IPCC (2001). TAR Climate Change 2001: The Scientific Basis — IPCC. Available at: <https://www.ipcc.ch/report/ar3/wg1/> [Accessed 14 January 2020].
- IPCC (2014). AR5 Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Available from:

- Irving, T. E. and Allen, D. G. (2011). Species and material considerations in the formation and development of microalgal biofilms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **92**, pp. 283–294. DOI: 10.1007/s00253-011-3341-0.
- Janssen, M., de Bresser, L., Baijens, T., Tramper, J., Mur, L. R., Snel, J. F. H. and Wijffels, R. H. (2000). Scale-up aspects of photobioreactors: effects of mixing-induced light/dark cycles, *Journal of Applied Phycology*, **12**, pp. 225–237. DOI: 10.1023/A:1008151526680.
- Janssen, M., Slenders, P., Tramper, J., Mur, L. R. and Wijffels, RenéH. (2001). Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles, *Enzyme and Microbial Technology*, **29**, pp. 298–305. DOI: 10.1016/S0141-0229(01)00387-8.
- Jesus, B., Ciochetti, A., Campbell, D. A. and Williamson, C. (2018). psifluo (Version 0.1.0).
- Jesus, B., Mouget, J.-L. and Perkins, R. (2008). Detection of diatom xanthophyll cycle using spectral reflectance, *Journal of Phycology*, **44**, pp. 1349–1359. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2008.00583.x.
- Joliot, P. and Joliot, A. (2002). Cyclic electron transfer in plant leaf, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, pp. 10209–10214. DOI: 10.1073/pnas.102306999.
- Kalaji, H. M., Schansker, G., Ladle, R. J., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S. I., *et al.* (2014). Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues, *Photosynthesis Research*, **122**, pp. 121–158. DOI: 10.1007/s11120-014-0024-6.
- Kandilian, R., Taleb, A., Heredia, V., Cogne, G. and Pruvost, J. (2019). Effect of light absorption rate and nitrate concentration on TAG accumulation and productivity of *Parachlorella kessleri* cultures grown in chemostat mode, *Algal Research*, **39**, pp. 101442. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101442.
- Kandilian, R., Pruvost, J., Artu, A., Lemasson, C., Legrand, J. and Pilon, L. (2016). Comparison of experimentally and theoretically determined radiation characteristics of photosynthetic microorganisms, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, **175**, pp. 30–45. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2016.01.031.
- Kandilian, R., Pruvost, J., Legrand, J. and Pilon, L. (2014). Influence of light absorption rate by

- Nannochloropsis oculata on triglyceride production during nitrogen starvation, *Bioresource Technology*, **163**, pp. 308–319. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.04.045.
- Kaplan, D., Richmond, A. E., Dubinsky, Z., Aaronson, S., Richmond, A. E., Dubinsky, Z. and Aaronson, S. (1986). Algal Nutrition, *Handbook of Microalgal Mass Culture (1986)*. DOI: 10.1201/9780203712405-7.
- Kargul, J. and Barber, J. (2008). Photosynthetic acclimation: Structural reorganisation of light harvesting antenna – role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll a/b binding proteins, *FEBS Journal*, **275**, pp. 1056–1068. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06262.x.
- Kassambara, A. (2017). ggpubr: ‘ggplot2’ Based Publication Ready Plots,
- Kazbar, A. (2018). *Etude de l’impact de la concentration en oxygène dissous sur la performance des photobioréacteurs*. Available from : <http://www.theses.fr/s130111>
- Kazbar, A., Cogne, G., Urbain, B., Marec, H., Le-Gouic, B., Tallec, J., Takache, H., Ismail, A. and Pruvost, J. (2019). Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors, *Algal Research*, **101**. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101432.
- Kazbar, A., Marec, H., Takache, H., Ismail, A. and Pruvost, J. (2019). Effect of design dark fraction on the loss of biomass productivities in photobioreactors, *Bioprocess and Biosystems Engineering*. DOI: 10.1007/s00449-019-02217-3.
- Kliphuis, A. M. J., Janssen, M., van den End, E. J., Martens, D. E. and Wijffels, R. H. (2011). Light respiration in Chlorella sorokiniana, *Journal of Applied Phycology*, **23**, pp. 935–947. DOI: 10.1007/s10811-010-9614-7.
- Kliphuis, A. M. J., Martens, D. E., Janssen, M. and Wijffels, R. H. (2011). Effect of O₂:CO₂ ratio on the primary metabolism of Chlamydomonas reinhardtii, *Biotechnology and Bioengineering*, **108**, pp. 2390–2402. DOI: 10.1002/bit.23194.
- Klughammer, C. and Schreiber, U. (2008). Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method, *PAM Application Notes*, **1**, pp. 27–35.
- Kok, B. (1956). On the inhibition of photosynthesis by intense light, *Biochimica et Biophysica Acta*,

21, pp. 234–244. DOI: 10.1016/0006-3002(56)90003-8.

Kolber, Z. and Falkowski, P. G. (1993). Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ, *Limnology and Oceanography*, **38**, pp. 1646–1665. DOI: 10.4319/lo.1993.38.8.1646.

Kolber, Z. S., Prášil, O. and Falkowski, P. G. (1998). Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1367**, pp. 88–106. DOI: 10.1016/S0005-2728(98)00135-2.

Kramer, D. M., Johnson, G., Kiirats, O. and Edwards, G. E. (2004). New Fluorescence Parameters for the Determination of QA Redox State and Excitation Energy Fluxes, *Photosynthesis Research*, **79**, pp. 209. DOI: 10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d.

Kromer, S. (1995). Respiration During Photosynthesis, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**, pp. 45–70. DOI: 10.1146/annurev.pp.46.060195.000401.

Kromkamp, J. C. and Forster, R. M. (2003). The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology, *European Journal of Phycology*, **38**, pp. 103–112. DOI: 10.1080/0967026031000094094.

Lacis, A. A., Schmidt, G. A., Rind, D. and Ruedy, R. A. (2010). Atmospheric CO₂: Principal Control Knob Governing Earth's Temperature, *Science*, **330**, pp. 356–359. DOI: 10.1126/science.1190653.

Laney, S. R. (2003). Assessing the error in photosynthetic properties determined with Fast Repetition Rate fluorometry, *Limnology and Oceanography*, **48**, pp. 2234–2242.

Lavaud, J. (2007). Fast Regulation of Photosynthesis in Diatoms: Mechanisms, Evolution and Ecophysiology, *Functional Plant Science and Biotechnonology*, **1**, pp. 267–287.

Lavaud, J., Gorkom, H. J. van and Etienne, A.-L. (2002). Photosystem II electron transfer cycle and chlororespiration in planktonic diatoms, *Photosynthesis Research*, **74**, pp. 51–59. DOI: 10.1023/A:1020890625141.

Lavaud, J. and Lepetit, B. (2013). An explanation for the inter-species variability of the photoprotective

non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in diatoms, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1827**, pp. 294–302. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2012.11.012.

Lavaud, J., Strzepek, R. F. and Kroth, P. G. (2007). Photoprotection capacity differs among diatoms: Possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate, *Limnology and Oceanography*, **52**, pp. 1188–1194. DOI: 10.4319/lo.2007.52.3.1188.

Le Borgne, F. (2011, January 1). *Développement d'un photobioréacteur solaire intensifié en vue de la production à grande échelle de biomasse microalgale* (thesis). Nantes. Available from : <http://www.theses.fr/2011NANT2025>

Le Gouic, B. (2013, May 30). *Analyse et optimisation de l'apport de carbone en photobioréacteur*.

Lee, C.-G. (1999). Calculation of light penetration depth in photobioreactors, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **4**, pp. 78–81. DOI: 10.1007/BF02931920.

Lee, Y. and Shen, H. (2007). Basic Culturing Techniques. In pp. 40–56.

Lepetit, B., Gélín, G., Lepetit, M., Sturm, S., Vugrinec, S., Rogato, A., Kroth, P. G., Falciatore, A. and Lavaud, J. (2016). The diatom *Phaeodactylum tricornutum* adjusts nonphotochemical fluorescence quenching capacity in response to dynamic light via fine-tuned Lhcx and xanthophyll cycle pigment synthesis, *New Phytologist*. DOI: 10.1111/nph.14337.

Lewis, S. L. and Maslin, M. A. (2015). Defining the Anthropocene, *Nature*, **519**, pp. 171–180. DOI: 10.1038/nature14258.

Ley, A. C. (1987). Relationships Among Cell Chlorophyll Content, Photosystem II Light-Harvesting and the Quantum Yield for Oxygen Production in *Chlorella*. In Govindjee, Barber, J., Cramer, W. A., Goedheer, J. H. C., Lavorel, J., Marcelle, R., and Zilinskas, B. A. (eds), *Excitation Energy and Electron Transfer in Photosynthesis: Dedicated to Warren L. Butler*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 43–50.

Li, L., Aro, E.-M. and Harvey Millar, A. (2018). Mechanisms of Photodamage and Protein Turnover in Photoinhibition, *Trends in Plant Science*, **23**. DOI: 10.1016/j.tplants.2018.05.004.

Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q. and Dubois-Calero, N. (2008). Biofuels from Microalgae, *Biotechnology Progress*, **24**, pp. 815–820. DOI: 10.1021/bp070371k.

- Malapascua, J. R. F., Jerez, C. G., Sergejevová, M., Figueroa, F. L. and Masojídek, J. (2014). Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: application of chlorophyll fluorescence techniques, *Aquatic Biology*, **22**, pp. 123–140. DOI: 10.3354/ab00597.
- Malapascua, J. R. F., Ranglova, K. and Masojídek, J. (2018). Photosynthesis and growth kinetics of *Chlorella vulgaris* R-117 cultured in an internally LED-illuminated photobioreactor, *Photosynthetica*. DOI: 10.32615/ps.2019.031.
- Masojídek, J., Koblizek, M. and Torzillo, G. (2013). Photosynthesis in Microalgae, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, pp. 20–39. DOI: 10.1002/9781118567166.ch2.
- Masojídek, J., Vonshak, A. and Torzillo, G. (2010). Chlorophyll Fluorescence Applications in Microalgal Mass Cultures. In *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer, Dordrecht, pp. 277–292.
- Merchuk, J. C., Ronen, M., Giris, S. and Arad, S. (Malis) (1998). Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium* sp., *Biotechnology and Bioengineering*, **59**, pp. 705–713. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980920)59:6<705::AID-BIT7>3.0.CO;2-J.
- Miyake, C. (2010). Alternative Electron Flows (Water–Water Cycle and Cyclic Electron Flow Around PSI) in Photosynthesis: Molecular Mechanisms and Physiological Functions, *Plant and Cell Physiology*, **51**, pp. 1951–1963. DOI: 10.1093/pcp/pcq173.
- Mojgane, P. A. (2015, January 4). Chapitre 3 : Photosynthèse, *BORZUYA UNIVERSITY*. Available from: <http://brussels-scientific.com/?p=2891>
- Muller, P., Li, X. and Niyogi, K. K. (2001). Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy, *Plant Physiology*, **125**, pp. 1558–1566.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. and Allakhverdiev, S. I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1767**, pp. 414–421. DOI: 10.1016/j.bbabi.2006.11.019.
- Murphy, C. D., Roodvoets, M. S., Austen, E. J., Dolan, A., Barnett, A. and Campbell, D. A. (2017). Photoinactivation of Photosystem II in *Prochlorococcus* and *Synechococcus*, *PLOS ONE*, **12**,

pp. e0168991. DOI: 10.1371/journal.pone.0168991.

Nawrocki, W. J., Buchert, F., Joliot, P., Rappaport, F., Bailleul, B. and Wollman, F.-A. (2019). Chlororespiration Controls Growth Under Intermittent Light, *Plant Physiology*, **179**, pp. 630–639. DOI: 10.1104/pp.18.01213.

Nedbal, L., Tichy, V., Xiong, F. and Grobbelaar, J. (1996). Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light, *Journal of Applied Phycology*, **8**, pp. 325–333. DOI: 10.1007/BF02178575.

Nghiem-xuan, R. (2019). *Optimisation de la culture d'Haslea ostrearia en photobioréacteur*. Available from : <http://www.theses.fr/s147452>

Ni, G., Zimbalatti, G., Murphy, C. D., Barnett, A. B., Arsenault, C. M., Li, G., Cockshutt, A. M. and Campbell, D. A. (2016). Arctic Micromonas uses protein pools and non-photochemical quenching to cope with temperature restrictions on Photosystem II protein turnover, *Photosynthesis Research*. DOI: 10.1007/s11120-016-0310-6.

Nixon, P J (2000). Chlororespiration., *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **355**, pp. 1541–1547.

Nixon, P. J., Michoux, F., Yu, J., Boehm, M. and Komenda, J. (2010). Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II, *Annals of Botany*, **106**, pp. 1–16. DOI: 10.1093/aob/mcq059.

Oguchi, R., Terashima, I., Kou, J. and Chow, W. S. (2011). Operation of dual mechanisms that both lead to photoinactivation of Photosystem II in leaves by visible light, *Physiologia Plantarum*, **142**, pp. 47–55. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2011.01452.x.

Ohad, I., Kyle, D. J. and Arntzen, C. J. (1984). Membrane protein damage and repair: removal and replacement of inactivated 32-kilodalton polypeptides in chloroplast membranes, *The Journal of Cell Biology*, **99**, pp. 481–485. DOI: 10.1083/jcb.99.2.481.

Ortega-Villasante, C., Burén, S., Barón-Sola, Á., Martínez, F. and Hernández, L. E. (2016). In vivo ROS and redox potential fluorescent detection in plants: Present approaches and future perspectives, *Methods*, **109**, pp. 92–104. DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.07.009.

Pagnanelli, F., Altimari, P., Trabucco, F. and Toro, L. (2014). Mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris*

- and *Nannochloropsis oculata*: interaction between glucose and nitrate, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **89**, pp. 652–661. DOI: 10.1002/jctb.4179.
- Park, J.-J., Wang, H., Gargouri, M., Deshpande, R. R., Skepper, J. N., Holguin, F. O., *et al.* (2015). The response of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation: a systems biology analysis, *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **81**, pp. 611–624. DOI: 10.1111/tpj.12747.
- Patz, J. A., Campbell-Lendrum, D., Holloway, T. and Foley, J. A. (2005). Impact of regional climate change on human health, *Nature*, **438**, pp. 310–317. DOI: 10.1038/nature04188.
- Payne, W. J. (1973). Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms., *Bacteriological Reviews*, **37**, pp. 409–452.
- Peers, G., Truong, T. B., Ostendorf, E., Busch, A., Elrad, D., Grossman, A. R., Hippler, M. and Niyogi, K. K. (2009). An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis, *Nature*, **462**, pp. 518–521. DOI: 10.1038/nature08587.
- Peltier, G. and Cournac, L. (2002). Chlororespiration, *Annual Review of Plant Biology*, **53**, pp. 523–550. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135242.
- Pérez-Méndez, N., Jordano, P., García, C. and Valido, A. (2016). The signatures of Anthropocene defaunation: cascading effects of the seed dispersal collapse, *Scientific Reports*, **6**, pp. 1–9. DOI: 10.1038/srep24820.
- Perkins, R. G., Mouget, J.-L., Lefebvre, S. and Lavaud, J. (2006). Light response curve methodology and possible implications in the application of chlorophyll fluorescence to benthic diatoms, *Marine Biology*, **149**, pp. 703–712. DOI: 10.1007/s00227-005-0222-z.
- Perkins, R., Williamson, C., Lavaud, J., Mouget, J.-L. and Campbell, D. A. (2018). Time-dependent upregulation of electron transport with concomitant induction of regulated excitation dissipation in *Haslea* diatoms, *Photosynthesis Research*, **137**, pp. 377–388. DOI: 10.1007/s11120-018-0508-x.
- Perkins, R. G., Kromkamp, J. C., Serôdio, J., Lavaud, J., Jesus, B., Mouget, J.-L., Lefebvre, S. and Forster, R. M. (2010). The Application of Variable Chlorophyll Fluorescence to Microphytobenthic Biofilms. In *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and*

Applications.

- Person, J. (2011). Livre turquoise : algues, filières du futur. Adebitech. Available from: <https://www.leslivresblancs.fr/livre/filieres-specialisees/chimie/livre-turquoise-algues-filieres-du-futur>
- Peterhansel, C., Horst, I., Niessen, M., Blume, C., Kebeish, R., Kürkcüoglu, S. and Kreuzaler, F. (2010). Photorespiration, *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, **8**. DOI: 10.1199/tab.0130.
- Phillips, J. N. and Myers, J. (1954). Growth Rate of Chlorella in Flashing Light., *Plant Physiology*, **29**, pp. 152–161. DOI: 10.1104/pp.29.2.152.
- Pilon, L., Berberoğlu, H. and Kandilian, R. (2011). Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, **112**, pp. 2639–2660. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2011.07.004.
- Pottier, L., Pruvost, J., Deremetz, J., Cornet, J.-F., Legrand, J. and Dussap, C. g. (2005). A fully predictive model for one-dimensional light attenuation by Chlamydomonas reinhardtii in a torus photobioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*, **91**, pp. 569–582. DOI: 10.1002/bit.20475.
- Prasil, O., Kolber, Z., Berry, J. A. and Falkowski, P. G. (1996). Cyclic electron flow around Photosystem II in vivo, *Photosynthesis Research*, **48**, pp. 395–410. DOI: 10.1007/BF00029472.
- Prézelin, B., Tilzer, M., Schofield, O. and Haese, C. (1991). The control of the production process of phytoplankton by the physical structure of the aquatic environment with special reference to its optical properties, *Aquatic Sciences*, **53**, pp. 136–186. DOI: 10.1007/BF00877058.
- Pruvost, J., Cornet, J. F., Goetz, V. and Legrand, J. (2011). Modeling dynamic functioning of rectangular photobioreactors in solar conditions, *AIChE Journal*, **57**, pp. 1947–1960. DOI: 10.1002/aic.12389.
- Pruvost, J., Cornet, J. F., Le Borgne, F., Goetz, V. and Legrand, J. (2015). Theoretical investigation of microalgae culture in the light changing conditions of solar photobioreactor production and comparison with cyanobacteria, *Algal Research*, **10**, pp. 87–99. DOI: 10.1016/j.algal.2015.04.005.

- Pruvost, J., Cornet, J.-F. and Legrand, J. (2008). Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: An energetically consistent analysis, *Chemical Engineering Science*, **63**, pp. 3679–3694. DOI: 10.1016/j.ces.2008.04.026.
- Pruvost, J., Goetz, V., Artu, A., Das, P. and Al Jabri, H. (2019). Thermal modeling and optimization of microalgal biomass production in the harsh desert conditions of State of Qatar, *Algal Research*, **38**, pp. 101381. DOI: 10.1016/j.algal.2018.12.006.
- Pruvost, J., Le Borgne, A., Artu, A. and LEGRAND, J. (2017). Development of a thin-film solar photobioreactor with high biomass volumetric productivity (AlgoFilm[®]) based on process intensification principles, *Algal Research*, **21**, pp. 120–137. DOI: 10.1016/j.algal.2016.10.012.
- Pruvost, J., Pottier, L. and Legrand, J. (2006). Numerical investigation of hydrodynamic and mixing conditions in a torus photobioreactor, *Chemical Engineering Science*, **61**, pp. 4476–4489. DOI: 10.1016/j.ces.2006.02.027.
- Pruvost, J. and Cornet, J. (2012). Knowledge models for the engineering and optimization of photobioreactors, *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*, pp. 181–224.
- Pruvost, J., Cornet, J.-F., Le Borgne, F. and Jenck, J. (2017, February 10). Production industrielle de microalgues et de cyanobactéries, *Ref: TIP142WEB - 'Chimie verte'*. Text. Available at: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/energie-durable-et-biocarburants-42494210/production-industrielle-de-microalgues-et-de-cyanobacteries-chv4030/> [Accessed 31 October 2019].
- Pruvost, J., Le Borgne, F., Cornet, J.-F. and Legrand, J. (2016). Chapter Five - Industrial Photobioreactors and Scale-Up Concepts. In Legrand, J. (ed), *Advances in Chemical Engineering*. Academic Press, 48, pp. 257–310.
- R Core Team (2017). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available from: <https://www.R-project.org/>
- Rachlin, J. W. and Grosso, A. (1991). The effects of pH on the growth of *Chlorella vulgaris* and its interactions with cadmium toxicity, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **20**, pp. 505–508. DOI: 10.1007/BF01065839.
- Ralph, P. J., Wilhelm, C., Lavaud, J., Jakob, T., Petrou, K. and Kranz, S. A. (2010). Fluorescence as a

- Tool to Understand Changes in Photosynthetic Electron Flow Regulation. In *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer, Dordrecht, pp. 75–89.
- Ras, M., Steyer, J.-P. and Bernard, O. (2013). Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **12**. DOI: 10.1007/s11157-013-9310-6.
- Raso, S., van Genugten, B., Vermuë, M. and Wijffels, R. H. (2012). Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity, *Journal of Applied Phycology*, **24**, pp. 863–871. DOI: 10.1007/s10811-011-9706-z.
- Richmond, A. (2008). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons.
- Richmond, A. (2013). Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 169–204.
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents, *Photosynthesis Research*, **89**, pp. 27–41. DOI: 10.1007/s11120-006-9065-9.
- RStudio Team (2018). RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA: RStudio, Inc. Available from: <http://www.rstudio.com/>
- Ruddiman, W. F. (2003). The Anthropogenic Greenhouse Era Began Thousands of Years Ago, *Climatic Change*, **61**, pp. 261–293. DOI: 10.1023/B:CLIM.0000004577.17928.fa.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y. and Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **35**, pp. 265–278. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.007.
- Schreiber, U., Schliwa, U. and Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer, *Photosynthesis Research*, **10**, pp. 51–62. DOI: 10.1007/BF00024185.
- Schuster, A. (1905). *Radiation Through a Foggy Atmosphere*.
- Seambiotic Ltd, Israël [no date]. Available at: <https://www.biodisol.com/wp->

<content/uploads/2009/07/seambiotic-usa-y-nasa-glenn-research-center-firman-acuerdo-para-optimizar-procesos-de-microalgas-a-gran-escala.jpg> [Accessed 2 November 2019].

- Serôdio, J., Cruz, S., Vieira, S. and Brotas, V. (2005). Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and operation of the xanthophyll cycle in estuarine microphytobenthos, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **326**, pp. 157–169. DOI: 10.1016/j.jembe.2005.05.011.
- Serôdio, J. and Lavaud, J. (2011). A model for describing the light response of the nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence, *Photosynthesis Research*, **108**, pp. 61–76. DOI: 10.1007/s11120-011-9654-0.
- Serôdio, J., Schmidt, W. and Frankenbach, S. (2017). A chlorophyll fluorescence-based method for the integrated characterization of the photophysiological response to light stress, *Journal of Experimental Botany*, **68**, pp. 1123–1135. DOI: 10.1093/jxb/erw492.
- Serra-Maia, R., Bernard, O., Gonçalves, A., Bensalem, S. and Lopes, F. (2016). Influence of temperature on *Chlorella vulgaris* growth and mortality rates in a photobioreactor, *Algal Research*, **18**, pp. 352–359. DOI: 10.1016/j.algal.2016.06.016.
- Sharma, R. (2012). Effects of Culture Conditions on Growth and Biochemical Profile of *Chlorella Vulgaris*, *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, **03**. DOI: 10.4172/2157-7471.1000131.
- Six, C., Finkel, Z., Irwin, A. and Campbell, D. (2007). Light variability illuminates niche-partitioning among marine picocyanobacteria, *PLoS ONE*. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2129112> [Accessed
- Soetaert, K. (2018). shape: Functions for Plotting Graphical Shapes, Colors,
- Souliès, A., Legrand, J., Marec, H., Pruvost, J., Castelain, C., Burghelea, T. and Cornet, J.-F. (2016). Investigation and modeling of the effects of light spectrum and incident angle on the growth of *Chlorella vulgaris* in photobioreactors, *Biotechnology Progress*, **32**, pp. 247–261. DOI: 10.1002/btpr.2244.
- Sousa, C., Compadre, A., Vermuë, M. H. and Wijffels, R. H. (2013). Effect of oxygen at low and high light intensities on the growth of *Neochloris oleoabundans*, *Algal Research*, **2**, pp. 122–126. DOI: 10.1016/j.algal.2013.01.007.

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101**, pp. 87–96. DOI: 10.1263/jbb.101.87.
- Sueoka, N. (1960). Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **46**, pp. 83–91.
- Suggett, D. J., MacIntyre, H. L., Kana, T. M. and Geider, R. J. (2009). Comparing electron transport with gas exchange: parameterising exchange rates between alternative photosynthetic currencies for eukaryotic phytoplankton, *Aquatic Microbial Ecology*, **56**, pp. 147–162. DOI: 10.3354/ame01303.
- Suggett, D. J., Oxborough, K., Baker, N. R., MacIntyre, H. L., Kana, T. M. and Geider, R. J. (2003). Fast repetition rate and pulse amplitude modulation chlorophyll a fluorescence measurements for assessment of photosynthetic electron transport in marine phytoplankton, *European Journal of Phycology*, **38**, pp. 371–384. DOI: 10.1080/09670260310001612655.
- Suggett, D., Moore, M. and Geider, R. (2010). Estimating Aquatic Productivity from Active Fluorescence Measurements. In pp. 103–127.
- Sukenik, A., Bennett, J. and Falkowski, P. (1987). Light-saturated photosynthesis — Limitation by electron transport or carbon fixation?, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **891**, pp. 205–215. DOI: 10.1016/0005-2728(87)90216-7.
- Takache, H., Christophe, G., Cornet, J.-F. and Pruvost, J. (2010). Experimental and theoretical assessment of maximum productivities for the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in two different geometries of photobioreactors, *Biotechnology Progress*, **26**, pp. 431–440. DOI: 10.1002/btpr.356.
- Takache, H., Pruvost, J. and Cornet, J.-F. (2012). Kinetic modeling of the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in a photobioreactor, *Biotechnology Progress*, **28**, pp. 681–692. DOI: 10.1002/btpr.1545.
- Takache, H., Pruvost, J. and Marec, H. (2015). Investigation of light/dark cycles effects on the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in conditions representative of photobioreactor cultivation, *Algal Research*, **8**, pp. 192–204. DOI: 10.1016/j.algal.2015.02.009.

- Tassan, S. and Ferrari, G. M. (1998). Measurement of light absorption by aquatic particles retained on filters: determination of the optical pathlength amplification by the ‘transmittance-reflectance’ method, *Journal of Plankton Research*, **20**, pp. 1699–1709. DOI: 10.1093/plankt/20.9.1699.
- Terry, K. L. (1986). Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate, *Biotechnology and Bioengineering*, **28**, pp. 988–995. DOI: 10.1002/bit.260280709.
- Thobie, C., Gadoin, E., Blel, W., Pruvost, J. and Gentric, C. (2017). Global characterization of hydrodynamics and gas-liquid mass transfer in a thin-gap bubble column intended for microalgae cultivation, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **122**, pp. 76–89. DOI: 10.1016/j.cep.2017.10.009.
- Timur V. Elzhov, Mullen Katharine M., Spiess Andrej-Nikolai and Bolker Ben (2016). minpack.lm: R Interface to the Levenberg-Marquardt Nonlinear Least-Squares Algorithm Found in MINPACK, Plus Support for Bounds,
- Titica, M., Kazbar, A., Marec, H., Pruvost, J., Ifrim, G., Barbu, M and Caraman, S. (2018). Simultaneous control of pH and dissolved oxygen in closed photobioreactor. In *2018 22nd International Conference on System Theory, Control and Computing (ICSTCC)*. Sinaia, France: IEEE, pp. 372–378.
- Todisco, É. (2019, April 10). *Microalgae Growth Optimization in Biofaçade Photobioreactors*. Available from : <http://www.theses.fr/s153634>
- Tomaselli, L. (2007). The Microalgal Cell. In *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–19.
- Torzillo, G., Accolla, P., Pinzani, E. and Masojidek, J. (1996). In situ monitoring of chlorophyll fluorescence to assess the synergistic effect of low temperature and high irradiance stresses in *Spirulina* cultures grown outdoors in photobioreactors, *Journal of Applied Phycology*, **8**, pp. 283–291. DOI: 10.1007/BF02178571.
- Torzillo, G., Scoma, A., Faraloni, C. and Giannelli, L. (2014). Advances in the biotechnology of hydrogen production with the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Critical Reviews in Biotechnology*, **35**. DOI: 10.3109/07388551.2014.900734.

- Tredici, M. (2007). Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In pp. 178–214.
- Turney, C. S. M., Palmer, J., Maslin, M. A., Hogg, A., Fogwill, C. J., Southon, J., *et al.* (2018). Global Peak in Atmospheric Radiocarbon Provides a Potential Definition for the Onset of the Anthropocene Epoch in 1965, *Scientific Reports*, **8**, pp. 1–10. DOI: 10.1038/s41598-018-20970-5.
- UNFCCC (2015). The Paris Agreement. Available at: <https://unfccc.int/process-and-meetings/the-paris-agreement/the-paris-agreement> [Accessed 13 January 2020].
- Urbain, B. (2017, December 18). Elaboration of a biochemically-based structured model for the growth of eukaryotic microalgae in photobioreactors: application to the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, <http://www.theses.fr>. Available at: <http://www.theses.fr/s115042> [Accessed 20 June 2018].
- US Department of Commerce, N. [no date] ESRL Global Monitoring Division - Global Greenhouse Gas Reference Network. Available at: <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/global.html> [Accessed 14 January 2020].
- Valle, K. C., Nymark, M., Aamot, I., Hancke, K., Winge, P., Andresen, K., Johnsen, G., Brembu, T. and Bones, A. M. (2014). System Responses to Equal Doses of Photosynthetically Usable Radiation of Blue, Green, and Red Light in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *PLOS ONE*, **9**, pp. e114211. DOI: 10.1371/journal.pone.0114211.
- Van Den Hende, S., Vervaeren, H. and Boon, N. (2012). Flue gas compounds and microalgae: (Bio-)chemical interactions leading to biotechnological opportunities, *Biotechnology Advances*, **30**, pp. 1405–1424. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.02.015.
- Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B. and Muylaert, K. (2012). Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications, *Bioresource Technology*, **105**, pp. 114–119. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.11.105.
- Varshney, P., Mikulic, P., Vonshak, A., Beardall, J. and Wangikar, P. P. (2015). Extremophilic microalgae and their potential contribution in biotechnology, *Bioresource Technology*, **184**, pp. 363–372. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.11.040.

- Vejrazka, C., Janssen, M., Streefland, M. and Wijffels, R. H. (2011). Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in flashing light, *Biotechnology and Bioengineering*, **108**, pp. 2905–2913. DOI: 10.1002/bit.23270.
- Venables W. N. and Ripley B. D. (2002). Modern Applied Statistics with S, *Springer*,
- Vonshak, A. and Torzillo, G. (2007). Environmental Stress Physiology. In *Handbook of Microbial Culture, Biotechnology and Applied Phycology*. pp. 57–82.
- Wagner, H., Jakob, T. and Wilhelm, C. (2006). Balancing the energy flow from captured light to biomass under fluctuating light conditions, *New Phytologist*, **169**, pp. 95–108. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01550.x.
- Walker, D., Walker, I. R., Walker, D. and Walker, I. R. (1987). The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis. Sheffield.
- Weissman, J. C., Goebel, R. P. and Benemann, J. R. (1988). Photobioreactor design: Mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation, *Biotechnology and Bioengineering*, **31**, pp. 336–344. DOI: 10.1002/bit.260310409.
- Wickham, H. (2009). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis, *Springer-Verlag New York*,
- Wickham, H. (2017). tidyverse: Easily Install and Load ‘Tidyverse’ Packages,
- Williams, P. and Laurens, L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics, *Energy & Environmental Science - ENERGY ENVIRON SCI*, **3**. DOI: 10.1039/b924978h.
- Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P. and Leegood, R. C. (2000). Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection., *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **355**, pp. 1517–1529.
- Wright, S. W. (1991). Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **77**, pp. 183–196. DOI: 10.3354/meps077183.
- Wu, H., Cockshutt, A. M., McCarthy, A. and Campbell, D. A. (2011). Distinctive Photosystem II Photoinactivation and Protein Dynamics in Marine Diatoms, *Plant Physiology*, **156**, pp. 2184–2195. DOI: 10.1104/pp.111.178772.

- Xu, K., Lavaud, J., Perkins, R., Austen, E., Bonnanfant, M. and Campbell, D. A. (2018). Phytoplankton σ PSII and Excitation Dissipation; Implications for Estimates of Primary Productivity, *Frontiers in Marine Science*, **5**. DOI: 10.3389/fmars.2018.00281.
- Xue, X., Gauthier, D. A., Turpin, D. H. and Weger, H. G. (1996). Interactions between Photosynthesis and Respiration in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Characterization of Light-Enhanced Dark Respiration), *Plant Physiology*, **112**, pp. 1005–1014. DOI: 10.1104/pp.112.3.1005.
- Yamamoto, H. Y., Nakayama, T. O. M. and Chichester, C. O. (1962). Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **97**, pp. 168–173. DOI: 10.1016/0003-9861(62)90060-7.

Annexes

Annexe 1 : Composition du milieu BBM utilise pour les pré-cultures de *C. vulgaris*.

Macroelements	
Chemical compound	Molar concentration (mmol L ⁻¹)
Sodium nitrate	17.6
Magnesium sulfate heptahydrate	0.913
Calcium chloride dihydrate	0.170
EDTA disodium dihydrate	0.134
Iron sulfate heptahydrate	0.0504
Dipotassium phosphate	0.861
Potassium phosphate	0.900
Sodium bicarbonate	15.0

Microelements	
Chemical compound	Molar concentration (μmol L ⁻¹)
Zinc sulfate heptahydrate	0.772
Cobalt nitrate hexahydrate	0.151
Copper sulfate	0.495
Orthoboric acid	46.3
Manganese chloride tetrahydrate	9.15
Molybdate sodium	1.07

Ce milieu est formulé pour obtenir une concentration maximale en biomasse égale à 2 g L⁻¹.

Annexe 2 : Composition du milieu Sueoka utilisé pour la culture de *C. vulgaris* en PBR.

Macroelements	
Chemical compound	Molar concentration (mmol L ⁻¹)
Ammonium chloride	27.1
Magnesium sulfate heptahydrate	1.14
Calcium chloride dihydrate	0.340
Potassium phosphate	4.48
Sodium bicarbonate	20.0

Microelements	
Chemical compound	Molar concentration (μmol L ⁻¹)
EDTA disodium dihydrate	134
Zinc sulfate heptahydrate	76.5
Orthoboric acid	184
Manganese chloride tetrahydrate	25.8
Cobalt chloride hexahydrate	6.72
Copper sulfate pentahydrate	6.41
Iron sulfate heptahydrate	18.0
Ammonium heptamolybdate tetrahydrate	0.890
Potassium hydroxide	285

Ce milieu est formulé pour obtenir une concentration maximale en biomasse égale à 2 g L⁻¹.

Annexe 3 : Equations du modèle développé pour traduire la photoacclimatation de *C. reinhardtii*, utilisé pour le développement du modèle traduisant la photoacclimatation de *C. vulgaris* (Urbain, 2017).

- Material balances in a well-mixed liquid phase :

$$\frac{dC_X}{dt} = q_{XT} M_X C_X,$$

$$\frac{dC_{pig}}{dt} = q_{pig} M_{pig} C_X,$$

with q_X and q_{pig} respectively specific rates of biomass and pigment production ($\text{mol}_X \text{ kg}_{CX}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $\text{mol}_{pig} \text{ kg}_{CX}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

- Radiative transfer equation solving (approximation of two flux model (Pottier *et al.*, 2005)) :

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

with $q_{\lambda,0}$ the spectral incident photon flux density ($\mu\text{mol}_{photons} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), z the reactor coordinates along the depth (m), L the culture depth (m) and the coefficients α_λ and δ_λ expressed as :

$$\alpha_\lambda = \sqrt{\frac{Ea_\lambda}{Ea_\lambda + 2b_\lambda Es_\lambda}},$$

$$\delta_\lambda = C_X \sqrt{Ea_\lambda (Ea_\lambda + 2b_\lambda Es_\lambda)},$$

with Ea_λ , Es_λ and b_λ respectively the spectral values of mass absorption cross section ($\text{m}^2 \text{ kg}_{CX}^{-1}$), mass scattering cross-section ($\text{m}^2 \text{ kg}_{CX}^{-1}$) and backward scattering ratio ;

$$A(z) = \int_\lambda Ea_\lambda G_\lambda(z) d\lambda$$

- Model kinetics equations :

Level of limitation of photosynthesis by light transfer in the reactor (between 0 and 1) :

$$\tilde{g}_{Y,1} = \bar{\beta} = \frac{1}{V} \int_0^L \frac{A(z)}{A(z)+K} dz ;$$

Level of inhibition of the maintenance process by light (between 0 and 1) :

$$\tilde{g}_{Y,2} = \psi = \frac{1}{V} \int_0^L \frac{K'}{A(z)+K'} dz ;$$

Quantum yield for the formation of one C-mole of biomass ($\text{mol}_{CX} \text{ mol}_Y^{-1}$) :

$$\bar{\phi}_{XT} = \frac{\bar{\phi}_P}{(1-x_{pig})f_{p,x}^\phi Y_{p,x} + x_{pig}f_{p,pig}^\phi Y_{p,pig}},$$

with $\bar{\phi}_P$ the quantum yield of photosynthetic ATP formation ($\text{mol}_{ATP} \text{ mol}_Y^{-1}$) :

$$\bar{\phi}_P = \frac{P_{2e}}{\frac{n}{2}P_{2e}+1}$$

Specific rate of efficient photons absorption ($\text{mol}_\gamma \text{ kg}_{XT}^{-1} \text{ h}^{-1}$) :

$$|q_\gamma| = \rho_{\max} K \tilde{g}_{\gamma,1}$$

Energy dissipation through the maintenance reaction ($\text{mol}_{ATP} \text{ kg}_{XT}^{-1} \text{ h}^{-1}$) :

$$J_m = J_m^* K \tilde{g}_{\gamma,2}$$

Specific rates of biomass production ($\text{mol}_X \text{ kg}_{Cx}^{-1} \text{ h}^{-1}$) :

$$q_{XT} = \bar{\phi}_{XT} \left(-q_\gamma - \frac{J_m}{\bar{\phi}_m} \right);$$

Specific rates of pigment production ($\text{mol}_{pig} \text{ kg}_{Cx}^{-1} \text{ h}^{-1}$) :

$$q_{pig} = x_{pig}^* (1 - \tilde{g}_{\gamma,1}) q_{XT};$$

- Quantities calculated at each time step :

Pigment fraction in the biomass :

$$w_{pig} = \frac{c_{pig}}{c_X} \text{ and } x_{pig} = \frac{w_{pig} M_X}{(1-w_{pig}) M_{pig} + w_{pig} M_X};$$

Molar mass of total biomass ($\text{kg}_X \text{ mol}_X^{-1}$)

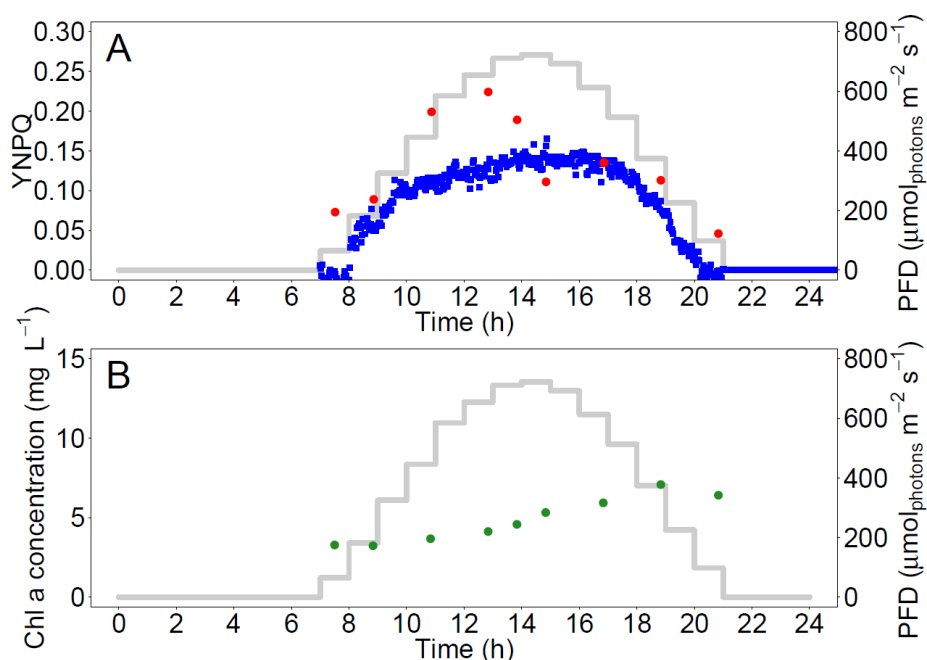
$$M_X = (1 - x_{pig}) M_x + x_{pig} M_{pig}$$

Radiative properties :

$$(\sigma_{a,\lambda}, \sigma_{b,\lambda}, b_\lambda) = f(w_{pig}) \quad (\text{interpolation from a database obtained by}$$

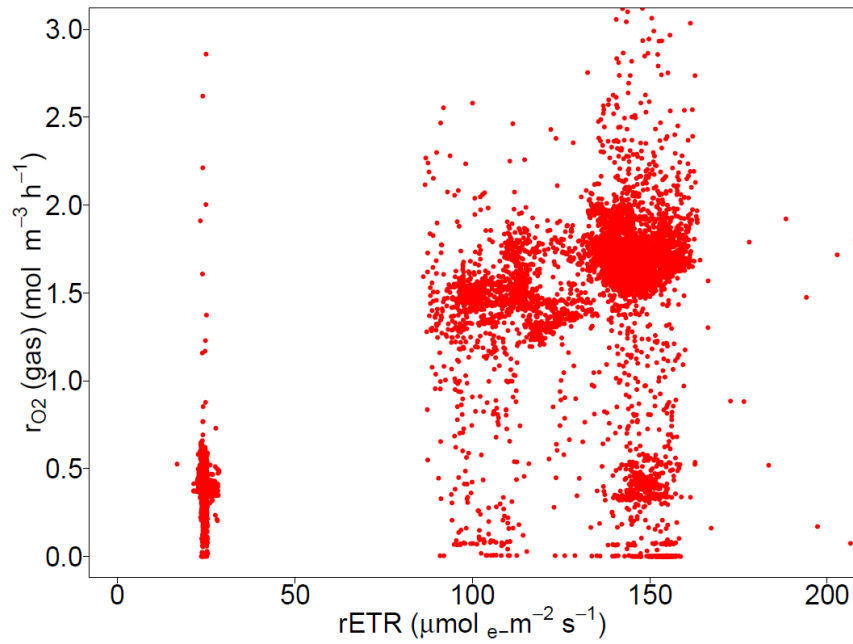
Kandilian *et al.* (2016))

Annexe 4 : Le YNPQ (A, axe de gauche) et la concentration en chlorophylle *a* (B, axe de gauche) en fonction du temps lors du même cycle de lumière (ligne grise, axe de droite) chez *C. vulgaris*.



Sur la figure A, les carrés bleu montrent les mesures en ligne du YNPQ et les ronds rouge montrent les mesures hors-ligne du YNPQ. Un coefficient de corrélation (Spearman) égal à 0,6, associé à une p-value égale à 0.10, a été trouvé entre les mesures en ligne et hors ligne du YNPQ. Voir les paragraphes 4.2.4.3 et 4.3.1.2 pour plus d'infomations.

Annexe 5 : Vitesse de production d'oxygène ($r_{O_2}^{gas}$) obtenu par bilan matière (Eq. 4-9) en fonction du rETR obtenu par mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* de type PAM (Eq. 4-4), chez *C. vulgaris*.



Titre : Etude des mécanismes de conversion photosynthétique de l'énergie lumineuse par *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur solaire.

Mots clés : *Chlorella vulgaris*, photosynthèse, photobioréacteurs solaires, photoprotection, photoacclimatation, fluorescence de la chlorophylle a

Résumé : La production à grande échelle de micro-algues est principalement réalisée en cultures solaires. Dans ces conditions, les cellules subissent de nombreuses variations de lumière à cause des cycles jour/nuit, de la météo, de leur déplacement entre la surface éclairée et le fond sombre de la culture ou de leur passage régulier dans des parties non éclairées du photobioréacteur (PBR). En réponse à ces variations, les micro-algues ont développé des mécanismes leur permettant de se protéger à court terme contre de trop fortes intensités lumineuses, par exemple en dissipant l'énergie excédentaire sous forme de chaleur, et à long terme d'utiliser l'énergie lumineuse avec la meilleure efficacité en modifiant leur teneur en pigments. Cette étude porte sur la compréhension et l'optimisation de la conversion photosynthétique de l'énergie lumineuse par *Chlorella vulgaris* en PBR solaire.

Pour cela des expériences en conditions contrôlées ont été réalisées à l'échelle du laboratoire. Au niveau de la cellule, des comportements transitoires ont pu être observés notamment en présence de lumière sursaturante. La photoacclimatation impacte les mécanismes de photoprotection et de photoinhibition des cellules. A l'échelle du PBR, les temps caractéristiques des réponses photosynthétiques de la culture ont été explorés lors de transitions lumineuses ascendantes ou descendantes. Par la suite, une sonde de mesure de la fluorescence de la chlorophylle a a été implémentée en ligne sur un PBR et son utilité a été étudiée pour le suivi de cultures solaires notamment pour le maintien de conditions favorables et l'estimation de la productivité. De plus, cette sonde a également permis de mesurer l'impact des boucles sombres sur la réponse photosynthétique de *C. vulgaris* grâce à des mesures complémentaires de flux de gaz.

Titre : Study of photosynthetic mechanisms for light energy conversion by *Chlorella vulgaris* in solar photobioreactors.

Keywords : *Chlorella vulgaris*, photosynthesis, solar photobioreactors, photoprotection, photoacclimation, chlorophyll a fluorescence

Abstract : Large-scale production of microalgae is mainly carried out in solar cultures. Under these conditions, cells experience various light fluctuation dynamics that is mostly due to day/night cycles, weather conditions, cell displacement between the light surface and the near-dark bottom of the culture, or regular passage through the design dark fractions of the photobioreactor (PBR). In response to these light variations, microalgae developed response mechanisms. In the short term, they protect themselves from supersaturating light intensity for example by dissipating excess energy as heat. In the long term they change their pigment content to use light energy with the greatest efficiency. This study aims at understanding and optimizing the photosynthetic conversion of light energy by *Chlorella vulgaris* in solar PBR. For this purpose, experiments under controlled conditions were carried out at the laboratory scale.

At the cell level, transient behaviours were observed, particularly in the presence of supersaturating light. Photoacclimation impacted photoprotection and photoinhibition mechanisms of the cells. At the reactor scale, characteristic times of photosynthetic responses were explored during increasing or decreasing light step transitions. Subsequently, an *in vivo* chlorophyll a fluorescence measurement sensor was implemented online on a PBR and its usefulness was studied for monitoring solar cultures, particularly for maintaining good culture conditions and estimating productivity. In addition, this probe supplemented by gas flux measurements also made it possible to measure the impact of PBR dark fractions on the photosynthetic response of *C. vulgaris*.