



HAL
open science

Étude et analyse de la cinétique de mise en réserve du carbone chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* cultivée en conditions de limitation par la source d'azote : vers une conduite avancée d'un procédé continu bi-étagé de production d'hydrogène

Fernando Robert Ferrel Ballestas

► **To cite this version:**

Fernando Robert Ferrel Ballestas. Étude et analyse de la cinétique de mise en réserve du carbone chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* cultivée en conditions de limitation par la source d'azote : vers une conduite avancée d'un procédé continu bi-étagé de production d'hydrogène. Génie des procédés. Nantes Université, 2023. Français. NNT : 2023NANU4029 . tel-04338575

HAL Id: tel-04338575

<https://theses.hal.science/tel-04338575v1>

Submitted on 12 Dec 2023

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

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 602

Sciences de l'Ingénierie et des Systèmes

Spécialité : Génie des procédés et bioprocédés

Par

Fernando Robert FERREL BALLESTAS

Étude et analyse de la cinétique de mise en réserve du carbone chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* cultivée en conditions de limitation par la source d'azote.

Vers une conduite avancée d'un procédé continu bi-étagé de production d'hydrogène

Thèse présentée et soutenue à Saint Nazaire, le 14 novembre 2023

Unité de recherche : Laboratoire GEPEA CNRS UMR 6144

Rapporteurs avant soutenance :

Sihem TEBBANI Professeure, CentraleSupélec – Université Paris Saclay
Éric TRABLY Directeur de Recherche, INRAe Narbonne

Composition du Jury :

Président :	Claude-Gilles DUSSAP	Professeur, Université Clermont-Auvergne
Examineurs :	Gilles PELTIER Jérémy PRUVOST	Directeur de Recherche, CEA Cadarache Professeur, Nantes Université
Dir. de thèse :	Jack LEGRAND	Professeur, Nantes Université
Co-dir. de thèse :	Guillaume COGNE	Maître de conférence, Nantes Université
Co-encadrante de thèse :	Mariana TITICA	Maître de conférence, Nantes Université

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'Université de Nantes, le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation Français ainsi qu'au Ministère des Science et Technologies (MINCIEN) Colombien pour leur participation au financement de cette thèse.

Ensuite, je remercie le Pr. Jeremy Pruvost, Directeur du Laboratoire GEPEA, d'avoir apprécié ma candidature spontanée pour effectuer une thèse au sein de son unité de recherche et de m'avoir mis en contact avec mes futurs encadrants de thèse. Je tiens également à remercier Jack Legrand, mon directeur de thèse, ainsi que Guillaume Cogne et Mariana Titica, mes co-encadrants, pour ces années de travail ensemble. Je les remercie pour tous les conseils, les connaissances et la rigueur scientifique qu'ils m'ont apportée. J'ai vécu les moments les plus durs de ma vie pendant la thèse et votre soutien a été essentiel pour amener à bien ce manuscrit.

Je tiens à remercier le Pr. Laurent Pilon de l'UCLA pour avoir accepté de collaborer avec nous dans le cadre de la thématique portant sur transfert radiatif. Je remercie également le Pr. Sihem Tebbani de CentraleSupélec et le Directeur de Recherche Eric Trably de l'INRAe Narbonne d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je remercie pareillement le Directeur de Recherche Gilles Peltier du CEA Cadarache et le Pr. Claude-Gilles Dussap de l'Université Clermont-Auvergne d'avoir fait partie de mon CSI durant mes années de thèse et pour accepter d'être examinateurs de ma thèse.

Je voudrais également exprimer ma gratitude envers tout le personnel technique du laboratoire GEPEA (Catherine Dupré, Delphine Drouin, Raphaëlle Touchard, Hélène Marec, Guillaume Roelens, Laurence Lavenant) qui, grâce à leur excellent travail, permettent que toutes les manipulations se passent de la meilleure manière possible. Je remercie tout particulièrement Hélène Marec pour son travail et son aide précieuse malgré les difficultés.

Je tiens à remercier toutes les personnes (stagiaires, doctorants, enseignants-chercheurs, ingénieurs, secrétaires) que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse pour chaque discussion et moment partagé, que ça soit dans le cadre de la « vie » dans le laboratoire,

mais aussi pour nos sorties à l'extérieur. Je remercie spécialement Rosine, Charlène, Antoinette, Vladimir, Marlène, Shuli, Myriam, Erika, Armel, Khadija, Abdallah, Flora, Julie, Meriem, Putty, Nourhene, Samy, Hugo, Julien et Joris pour leur amitié et leur soutien moral. Je remercie Diana, qui a réalisé son stage de fin de Master avec moi, pour sa contribution à ce manuscrit de thèse. Je tiens à exprimer mes remerciements aussi à toute l'équipe d'Algosolis (Benjamin, Jordan, Laura, Emmanuelle) qui m'ont accueilli pour la dernière grande manipulation de ma thèse (Chapitre 6).

J'ai aussi une pensée spécial pour ma famille en Colombie. Je remercie avec tout mon cœur à mon père, mon ami, mon exemple, Fernando, qui nous a quittés il y a deux ans, pour m'avoir transmis l'amour pour la langue Française et la France. Bien que le vide laissé par son départ persiste, ses valeurs et sa persévérance, vivent en moi. Je remercie ma mère et ma sœur de m'accompagner, de me soutenir et d'être mes guides durant ces années de thèse. Je vous aime à l'infini.

Finalement, je tiens à exprimer un grand merci à Nesrine pour avoir été la plus belle rencontre de ma thèse. Merci pour ton soutien, ta patiente et ta compagnie.

Liste de communications

Publications

- Radiations Characteristics and Light Absorption Rate Predictions of *Chlamydomonas reinhardtii* Cultivated Under a Progressive Nitrogen Starvation and Accumulating Carbon Reserves. Ferrel Ballestas F., Titica M., Legrand J., Pilon L., Cogne G. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer (2023).
- Elaboration Of An Estimation Tool For Monitoring Carbon Reserve Storage In Microalgae Based On Gas Balance Analysis. Ferrel Ballestas F., Marec H., Legrand J., Titica M., Cogne G. (en cours de préparation).
- A Tool For On-Line Monitoring of Microalgal Bioprocesses Based On Gas Balance Analysis. Cogne G., Ferrel Ballestas F., Urbain B., Legrand J., Titica M. (en cours de préparation).
- Biochemically-Structured Modelling of Growth and Carbon Reserves Storage in *Chlamydomonas reinhardtii* Cultivated Under Nitrogen-Limiting Conditions. Ferrel Ballestas F., Legrand J., Titica M., Cogne G. (en cours de préparation).
- Continuous Hydrogen Photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* Using a Novel Two-Stage Process Strategy. Ferrel Ballestas F., Lemasson C., Legrand J., Titica M., Cogne G. (en cours de préparation).

Communications internationales

- Study of starch accumulation dynamics in nitrogen starved *Chlamydomonas reinhardtii* using controlled torus photobioreactor. Ferrel Ballestas F. Cogne G. Titica M. Legrand J. ECCE12&ECAB5 Congres, 15-19 September 2019, Florence, Italy. Communication orale.
- Tool for estimating carbon reserve storage in the green microalgae *C. reinhardtii* cultivated under nitrogen-limiting conditions based on gas balance analysis. Ferrel Ballestas F., Marec H., Titica M., Legrand J., Cogne G. ECCE14&ECAB7 Congres, 17-21 September 2023, Berlin, Italy. Communication orale.

Communications nationales

- Étude de la mise en réserve d'amidon par la micro-algue *Chlamydomonas reinhardtii* en photo-bioréacteur contrôlé en vue de la production en continu d'hydrogène dans un procédé bi-étagé. Ferrel Ballestas F., Cogne G., Titica M., Legrand J. Congrès de la société française de génie chimique SFGP 2019. 15-17 Octobre 2019, Nantes, France. Communication orale.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction générale	1
I. Chapitre bibliographique	4
I.1 Introduction	4
I.1.1 Contexte global et environnemental	4
I.1.2 Le potentiel de l'hydrogène moléculaire (H ₂) comme solution énergétique....	7
I.1.3 L'hydrogène biologique ou bio-hydrogène.....	10
I.2 Les microalgues : une alternative pour la production de l'énergie du futur...	10
I.2.1 Généralités sur les micro-organismes photosynthétiques	10
I.2.2 Intérêt et applications des microalgues	12
I.2.3 Production de biocarburants à partir de microalgues.....	13
I.2.4 La microalgue d'étude Chlamydomonas reinhardtii.....	16
I.2.5 Métabolisme énergétique d'une microalgue unicellulaire eucaryote	18
I.2.5.1 Photosynthèse	19
I.2.5.2 Respiration	27
I.2.6 Étude de la culture de microalgues en photobioréacteur	29
I.2.6.1 Systèmes de culture.....	29
I.2.6.2 Mode de conduite des photobioréacteurs.....	34
I.2.6.3 Paramètres influençant la culture en photobioréacteur	37
I.3 Interaction entre les microorganismes photosynthétiques et la lumière à l'échelle du photobioréacteur.....	39
I.3.1 Introduction.....	39
I.3.2 Propriétés radiatives d'une culture de microalgues	40
I.3.3 Transfert radiatif dans un photobioréacteur	43
I.3.4 Vitesse spécifique d'absorption de photons.....	45
I.3.5 Régimes de lumière dans un photobioréacteur	45
I.4 Production de biohydrogène (H ₂) avec des microorganismes photosynthétiques.	48
I.4.1 Organismes modèles pour la photo-production de biohydrogène	48
I.4.1.1 Bactéries photosynthétiques.....	48
I.4.1.2 Cyanobactéries et microalgues.....	49
I.4.2 Mécanismes de production de l'hydrogène par des micro-organismes photosynthétiques	50

I.4.2.1	Enzymes responsables de la production d'H ₂	50
I.4.2.2	Voies biologiques de production d'H ₂	53
I.4.3	Stratégies de culture pour la photo-production de biohydrogène	58
I.4.3.1	Production d'H ₂ induite par un stress nutritionnel.....	59
I.4.3.2	Production d'H ₂ avec des microalgues modifiées génétiquement.....	62
I.4.3.3	Cellules immobilisées	66
I.4.3.4	Co-culture de microalgues et bactéries	67
I.4.3.5	Production d'H ₂ induite sans stress nutritionnel	67
I.4.3.6	Système de culture bi-étagé de photoproduction de biohydrogène en continu	
	70	
I.5	Conclusions et objectifs de la thèse.....	73

II. Développement d'un protocole expérimental pour l'étude en conditions dynamiques de l'accumulation de réserves carbonées chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* lors d'une carence azotée progressive. 74

II.1	Introduction.....	74
II.2	Matériels et méthodes	76
II.2.1	Dispositif expérimental	76
II.2.1.1	Photobioréacteur	76
II.2.1.2	Régulations	77
II.2.1.3	Analyse de la composition gazeuse	78
II.2.1.4	Pilotage des conditions opératoires.....	80
II.2.1.5	Caractéristiques biologiques de la souche	80
II.2.2	Démarche expérimentale.....	81
II.2.2.1	Choix du mode de fonctionnement du photobioréacteur.....	81
II.2.2.2	Phase biologique d'intérêt lors de la culture de <i>C. reinhardtii</i> en conditions de carence progressive par la source d'azote.....	81
II.2.2.3	Plan d'expériences	81
II.2.3	Suivi de culture	82
II.2.3.1	Concentration en biomasse	82
II.2.3.2	Concentration et teneur en sucres totaux	83
II.2.3.3	Concentration en ammonium	83
II.2.3.4	Détermination de la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène....	83
II.3	Résultats et discussion	85

II.3.1	Culture discontinue avec balayage du réacteur à débit de gaz constant et inoculum de type « Erlenmeyer CO ₂ ».	85
II.3.2	Culture en batch avec régulation de l'oxygène dissous de type PI et inoculum de type « erlenmeyer ».	89
II.3.3	Culture en batch avec régulation de l'oxygène dissous de type PI et inoculum de type « PBR Airlift ».	91
II.3.4	Culture en batch avec régulation de l'oxygène dissous de type PI, inoculum de type « PBR Airlift » et bullage avec mélange standard O ₂ /N ₂ . 93	
II.4	Conclusions.....	95
III.	Prédiction des propriétés radiatives et de la vitesse d'absorption de photons d'une microalgue verte cultivée en conditions de carence azotée progressive et accumulant des réserves carbonées en vue de la création d'une base de données d'expérimentale de propriétés radiatives.	97
III.1	Introduction.....	101
III.2	Current state of knowledge	103
III.2.1	Chlamydomonas reinhardtii.....	103
III.2.2	Determination of the radiation characteristics of microalgae culture	104
III.2.2.1	Experimental measurements	104
III.2.2.2	Theoretical predictions.....	106
III.2.3	Light transfer modeling in photobioreactors.....	108
III.3	Materials and methods	110
III.3.1	Species and culture	110
III.3.2	Progressive nitrogen starvation strategy	110
III.3.3	Physiological dynamics characterization	111
III.3.3.1	Total and catalytic biomass concentrations	112
III.3.3.2	Cell density, size distribution, and starch volume fraction	112
III.3.3.3	Pigment concentration and mass fraction	114
III.3.3.4	Starch concentration and mass fraction	114
III.3.3.5	Inorganic nitrogen concentration in the culture	115
III.3.4	Radiation characteristics	115
III.3.4.1	Experimental measurements	115
III.3.4.2	Theoretical predictions.....	116
III.3.5	Light transfer in PBR.....	118

III.4	Results and Discussion	120
III.4.1	Physiological dynamics	120
III.4.1.1	Biomass, inorganic nitrogen concentration and cell count	120
III.4.1.2	Starch mass fraction	121
III.4.1.3	Pigment mass fractions	123
III.4.2	Comparison of theoretical and experimental radiation characteristics	124
III.4.2.1	Measurements of cell size distribution and starch volume fraction.....	124
III.4.2.2	Theoretical predictions of cell mean radius and starch volume fraction	126
III.4.2.3	Measured vs. predicted mass absorption and scattering cross-sections.....	127
III.4.2.4	Local rate of photon absorption (LRPA)	129
III.5	Conclusion	132
III.6	Appendix.....	133
III.6.1	Radiation characteristics database of <i>C. reinhardtii</i> cultivated under progressive nitrogen starvation and accumulating carbon reserves.....	133
III.6.1.1	Considerations.....	133
III.6.1.2	Algorithm for the database creation and 5D-matrix interpolation.....	134
IV.	Développement d'un outil pour le suivi en ligne de la croissance et de l'accumulation de réserves carbonées chez la microalgue verte <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.	136
IV.1	Introduction.....	138
IV.2	Materials and Methods.....	140
IV.2.1	Experimental setup.....	140
IV.2.1.1	Studied microalgae, culture media and inoculum preparation.....	140
IV.2.1.2	Photobioreactor setup.....	140
IV.2.1.3	Gas monitoring system	141
IV.2.1.4	Operational conditions of progressive nitrogen-starved batch cultures.....	142
IV.2.1.5	Experimental protocol.....	142
IV.2.2	Measurements	143
IV.2.2.1	Biomass concentration and cell density	143
IV.2.2.2	Ammonium and inorganic nitrogen concentration	144
IV.2.2.3	Starch concentration and cell mass content	144
IV.2.2.4	Determination of the net volumetric oxygen production rate	144
IV.3	Compartment stoichiometric model.....	146

IV.3.1	Verbal statement of phenomena that summarize the complex microalgae biological response to nutritional stress	146
IV.3.2	Model structure development	146
IV.3.2.1	Biomass compartmentalization	146
IV.3.2.2	Stoichiometry	147
IV.3.2.3	Kinetic formulation	150
IV.3.2.4	Model state equations	151
IV.3.2.5	Model parameter identification	151
IV.4	Results and discussion	152
IV.4.1	Microalgae growth and starch accumulation dynamic	152
IV.4.2	On-line indirect measurement of r_{O_2} by gas analysis	153
IV.4.3	Simulation results.....	155
IV.4.4	Model validation	158
IV.5	Conclusion	159
IV.6	Appendix.....	160
IV.7	Supplementary material and methods.....	161
V.	Analyse de la cinétique d'accumulation des réserves carbonées chez la microalgue verte <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en conditions de limitation par la source d'azote.....	163
V.1	Introduction.....	164
V.2	Matériels et méthodes	164
V.2.1	Régime de lumière dans un photobioréacteur.....	164
V.2.2	Présentation de l'étude cinétique	166
V.2.2.1	Compagne expérimentale.....	166
V.2.2.2	Validation des conditions de rayonnement imposées	166
V.2.2.3	Suivi de culture	167
V.2.3	Analyse de l'efficacité de la captation des photons par la photosynthèse ...	167
V.2.3.1	Détermination du rendement primaire de la photosynthèse.....	167
V.2.3.2	Détermination expérimentale de la constante de demi-saturation de la photosynthèse (K)	168
V.2.4	Calcul de la vitesse moyenne d'absorption de photons (MRPA)	169
V.3	Résultats et discussion	169

V.3.1	Dynamique d'accumulation des réserves carbonées chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cultivée en conditions de limitation par la source d'azote.....	169
V.3.2	Adaptation pigmentaire chez <i>C. reinhardtii</i> en conditions de carence azotée 172	
V.3.2.1	Changement dans le contenu pigmentaire	172
V.3.2.2	Changement dans la distribution pigmentaire.....	174
V.3.2.3	Relations entre adaptation pigmentaire et captation de la lumière	176
V.3.3	Évolution de la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène	178
V.3.4	Impact de la lumière sur l'accumulation des réserves de carbone.....	179
V.4	Conclusions.....	181
VI.	Mise en place d'un système de culture bi-étagé pour la photoproduction de biohydrogène en continu par la microalgue <i>C. reinhardtii</i>	183
VI.1	Introduction.....	184
VI.2	Matériels et méthodes	185
VI.2.1	Présentation du système de culture bi-étagé	185
VI.2.1.1	Photobioréacteurs.....	185
VI.2.1.2	Mesure de la composition gazeuse.....	185
VI.2.1.3	Régulation des conditions de culture	186
VI.2.1.4	Raccordement des PBRs et contrôle des temps de séjour.....	186
VI.2.1.5	Complexité technique de la mise en œuvre d'un système de culture bi-étagé en continu.....	188
VI.2.2	Stratégie de conduite de culture pour la production d'H ₂	191
VI.2.2.1	Suivi de culture	192
VI.2.3	Caractérisation de la production d'H ₂	193
VI.3	Résultats et discussion	194
VI.3.1	Évolution de l'état physiologique des cultures	194
VI.3.2	Production de biohydrogène	198
VI.4	Conclusions.....	200
	Conclusion générale et perspectives.....	201
	Références	205

LISTE DE FIGURES

Figure I-1. Approvisionnement total en énergie dans le monde selon IEA International Energy Agency, 2020. A-Évolution de la demande en énergie dans le monde par ressource entre 1973 et 2018. B-Comparaison de la consommation d'énergie par ressource entre 1973 et 2018.	6
Figure I-2. Évolution de la demande annuelle en hydrogène depuis 1975. DRI : production d'acier par réduction directe du fer. Le raffinage, l'ammoniac et « autres purs » représentent la demande pour des applications spécifiques qui nécessitent de l'hydrogène avec seulement de faibles niveaux d'additifs ou de contaminants tolérés. Le méthanol, le DRI et les « autres mélanges » représentent la demande d'applications qui utilisent l'hydrogène dans un mélange de gaz, comme le gaz de synthèse, comme combustible ou comme charge d'alimentation. Tiré de IAE (International Energy Agency) (2019).....	8
Figure I-3. Micrographies de (A) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , (B) cellule de <i>Synechocystis sp.</i> en forme d'haltère flottant librement et immédiatement après la division cellulaire (en médaillon), (C) <i>Anabaenopsis sp.</i> , (D) <i>Anabaena cylindrica</i> , (E) une colonie de la microalgue <i>B. braunii</i> , et (F) <i>Pleodorina californica</i> . Tiré de Pilon & Kandilian, 2016.	12
Figure I-4. Application de la culture de microalgues. (A) secteurs industriels d'intérêt (Khan et al., 2018), (B) exemple de produits issus de microalgues commercialisés dans plusieurs secteurs industriels (Oncel, 2013).	13
Figure I-5. Schéma de production de biocarburants de 3 ^e génération issus de microalgues par des transformation ou procédés intermédiaires (Oncel, 2013).	15
Figure I-6. Structure cellulaire de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . A-Micrographie électronique à transmission (TEM) d'une cellule. B-Dessin basé sur l'image (TEM) avec les différents organites cellulaires. Tiré de Salomé & Merchant, 2019.	16
Figure I-7. Les cycles de reproduction sexuée et végétatif (asexuée) de <i>C. reinhardtii</i> . Tiré de Salomé & Merchant, 2019.	17
Figure I-8. Mécanisme global de la photosynthèse.	19
Figure I-9. Coefficient d'absorption spécifique E_a des Chlorophylles <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , des caroténoïdes photosynthétiques (PSC) et photoprotecteurs (PPC), ainsi que de la	

phycoérythrobiline (PEB) et de la phycourobiline (PUB). Tiré de Pilon & Kandilian, 2016.	20
Figure I-10. Structure générale d'un photosystème et le parcours d'un photon vers le centre réactionnel.....	21
Figure I-11. Illustration de la membrane thylakoïde du chloroplaste montrant le fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons photosynthétique et la photophosphorylation non-cyclique. La chaîne est composée de trois complexes: le photosystème (PS) I, le complexe du cytochrome <i>bf</i> et le PS II. Deux transporteurs d'électrons diffusables relient les trois complexes. La plastoquinone (PQ) relie le PSII au complexe du cytochrome <i>bf</i> , et la plastocyanine (PC) relie le complexe du cytochrome <i>bf</i> au PSI. Le flux d'électrons induit par la lumière pompe les protons à travers la membrane thylakoïde et génère un gradient de protons, qui peut ensuite être utilisé pour fabriquer de l'ATP via l'ATP synthase. L'eau est la source d'électrons et le complexe d'évolution de l'oxygène (OEC) produit de l'oxygène. Tiré de Willey et al., 2019.	22
Figure I-12. Schéma en Z du transport des électrons lors de la photosynthèse. Tiré de Willey et al., 2019.	23
Figure I-13. Schéma général des étapes du cycle de Calvin-Benson permettant la fixation du dioxyde de carbone pour la biosynthèse de glucose ou fructose. Tiré de Willey et al., 2019.	25
Figure I-14. Biosynthèse d'amidon chez les microalgues (de Carvalho Silvello et al., 2022)	27
Figure I-15. Étapes constituant la respiration cellulaire. Tiré de Lemasson, 2015.	28
Figure I-16. Systèmes de culture de microalgues. (A) système ouvert raceways, (B) PBR tubulaire (Borowitzka & Moheimani, 2013), (C) PBR à colonne (Plouviez et al., 2017), (D) PBR plan à échelle laboratoire de type Air-lift, (E) PBR plan rectangulaire à échelle pilote de type Air-lift, (F) PBR plan à haute productivité, Algofilm (Legrand, 2016)..	31
Figure I-17. Photobioréacteurs toriques opérant en conditions contrôlées. Les PBRs disposent d'une régulation de l'oxygène dissous, du pH, du niveau et il est adapté pour la mesure des gaz en sortie via une micro-chromatographie gazeuse (μ GC).	33
Figure I-18. Mode de conduite des photobioréacteurs. Les variables Q , V et C_{XT} représentent respectivement le débit, le volume du réacteur et la concentration en	

biomasse à différents instants. (A) mode de conduite en batch ou en discontinu, (B) mode de conduite fed-batch, (C) Mode de conduite en continu, (D) mode de conduit semi-continu.35

Figure I-19. Espèces de carbone dissous en fonction du pH à 25°C. Tiré de Artu, 2016.

38

Figure I-20. Transfert de lumière locale dans une suspension de cellules de microalgues. Tiré de Pilon & Kandilian, 2016.41

Figure I-21. Équipements nécessaires pour la mesure expérimentale des propriétés radiatives d'une culture de microalgues. (A) spectrophotomètre avec un module de sphère d'intégration pour le calcul expérimental des coefficient massique d'absorption et diffusion, (B) montage « maison » d'un néphélomètre pour la détermination de la fonction de phase, tiré de Pilon et al. (2011). Figures des propriétés radiatives tirées de Kandilian et al. (2016).43

Figure I-22. Représentation graphique du modèle à deux flux. Tiré de Takache, 2010. 44

Figure I-23. Régimes de rayonnement dans une culture en photobioréacteur. Tiré de Pruvost & Cornet, 2012.47

Figure I-24. Schéma de production d'hydrogène par les enzymes hydrogénases. (A) hydrogénase de type [Fe-Fe], (B) hydrogénase de type [Fe-Ni]. Tiré de A. Singh & Rathore, 201751

Figure I-25. Schéma global du processus biologique de la photofermentation. Dans un premier temps les acides organiques sont métabolisés en dioxyde de carbone et pouvoir réducteur NADH. Ce dernier réduit la ferrédoxine, qui est le donneur final d'électrons de la nitrogénase, via le transport d'électrons inverse impliquant les complexes membranaires chez les bactéries photosynthétiques appelés RNF ou FixABC. Ces complexes utilisent la force proton motrice établie par la photosynthèse bactérienne (photosystème I) pour réaliser la réaction globale de production d'hydrogène autrement thermodynamiquement défavorable. Tiré de Sağır and Hallenbeck (2019).54

Figure I-26. Processus biologiques de production de biohydrogène par la voie directe et indirecte (voies PSII-dépendante et PSII-indépendante) et fermentation obscure. Tiré de K. Batyrova & Hallenbeck, 2017. En conditions anoxiques, la biophotolyse direct débute avec la séparation de la molécule d'eau en oxygène et protons pour le transfert des

électrons dans la chaîne photosynthétique jusqu'à la hydrogénase par la ferrédoxine (Fd). Dans la biophotolyse indirecte les électrons proviennent du catabolisme des sucres de réserve (amidon) générant du pouvoir réducteur NADH. Les électrons rentrent dans la chaîne photosynthétique entre le PSII et PSI au niveau des plastoquinones (PQ) via la NADPH-plastoquinone oxydoréductase (NPQR) ou une NADH déshydrogénase de type II (NDA2) et sont transférés jusqu'à l'hydrogénase par l'intermédiaire de la ferrédoxine (Fd). La fermentation obscure a lieu en absence de lumière et en conditions anoxiques suite à la dégradation des sucres de réserve. Le catabolisme de l'amidon produit du pyruvate, qui est ensuite oxydé en Acétyl-CoA et dioxyde de carbone par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (PFR1) qui transfère les électrons à l'hydrogénase à travers de la réduction de la ferrédoxine (Fd).55

Figure I-27. Schéma du métabolisme fermentaire chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. À l'obscurité, la dégradation des réserves carbonées sous la forme d'amidon produit du pyruvate. Le pyruvate peut ensuite être oxydé pour la formation des produits fermentaires tel que le lactate, le formate, l'acétate et l'éthanol. La production d'hydrogène a lieu lors de la conversion du pyruvate en dioxyde de carbone et Acétyl-CoA par l'enzyme pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (PFR1). Les électrons issus de cette réaction d'oxydation permettent la réduction de la ferrédoxine (Fd) qui transfère les électrons finalement à l'hydrogénase pour la production d'hydrogène. Les différentes enzymes impliquées dans la production des autres composés fermentaires sont la pyruvate décarboxylase (PDC), l'alcool déshydrogénase (ADH), la lactate déshydrogénase (LDH), le pyruvate formate lyase (PFL), la phototransacétylase (PTA) et l'acétate kinase (AK). Tiré de Lemasson, 2015 et inspiré de Gfeller and Gibbs (1984).

58

Figure I-28. Niveaux d'amélioration biologique pour une photoproduction d'H₂. Tiré de Dubini & Gonzalez-Ballester, 2016.62

Figure I-29. Protocole d'hypoxie pour la photoproduction d'H₂. À gauche le schéma des étapes du protocole basé sur le contrôle de la fraction volumique éclairée. À droite les résultats obtenus par Degrenne et al., 2011.69

Figure I-30. Production d'H₂ obtenue à partir d'une culture de *C. reinhardtii* soumise à des cycles de lumière et d'obscurité (S. Kosourov et al., 2018). (A) culture photoautotrophe,

(B) culture photohétérotrophe, (C) cellules cultivées avec le protocole des cycles de lumière/obscurité, (D) cellules cultivées en lumière continue.	70
Figure I-31. Schématisation du système bi-étagé pour la photoproduction d'H ₂ . Tiré de Lemasson 2015.	72
Figure II-1. Ligne de progression stratégique pour la maîtrise d'une culture en limitation azotée accumulant des réserves carbonées : étape caractéristique du premier étage du procédé bi-étagé de production d'H ₂ . La ligne bleue en discontinu correspond à la première étude à réaliser et étant traitée dans ce chapitre.	75
Figure II-2. PBR torique en PMMA utilisé lors des cultures en batch de <i>C. reinhardtii</i> en conditions de carence azotée progressive.	77
Figure II-3. Principe de mesure dans la chambre d'analyse d'un spectromètre de masse. Tiré de Lemasson, 2015.	79
Figure II-4. États physiologiques initiaux des cultures en batch de <i>C. reinhardtii</i> en conditions de carence azotée progressive. La ligne bleu en discontinu marque la limite de teneur en sucres totaux répertoriée pour une culture en conditions non-limitantes.	87
Figure II-5. Suivi de la phase biotique (concentration en biomasse et teneur en sucres totaux) et de la phase abiotique (concentration en ammonium, débit d'aération à l'entrée du PBR et concentration en oxygène dissous donnée en pourcentage par rapport à la saturation de l'oxygène dans l'air) pour les batchs 1 et 2.	89
Figure II-6. Suivi de la phase biotique (concentration en biomasse et teneur en sucres totaux) et de la phase abiotique (concentration en ammonium, débit d'aération à l'entrée du PBR et concentration en oxygène dissous donnée pourcentage par rapport à la saturation de l'oxygène dans l'air) pour les batchs 3.	90
Figure II-7. Suivi de la phase biotique (concentration en biomasse et teneur en sucres totaux) et de la phase abiotique (concentration en ammonium, débit d'aération à l'entrée du PBR, vitesse volumétrique de production d'oxygène et concentration en oxygène dissous donnée pourcentage par rapport à la saturation de l'oxygène dans l'air) pour le batch 4.	92
Figure II-8. Suivi de la phase biotique (concentration en biomasse et teneur en sucres totaux) et de la phase abiotique (concentration en ammonium, débit d'aération à l'entrée du PBR, débit de CO ₂ à l'entrée du PBR, vitesse volumétrique de production d'oxygène	

et concentration en oxygène dissous donnée en pourcentage par rapport à la saturation de l’oxygène dans l’air) pour les batchs 5. Le mélange gazeux a une composition molaire standard de 4.5% pour l’O₂ et 95.5 % pour le N₂.94

Figure III-1. Green microalgae cell *C. reinhardtii* compartmentalization into the catalytic biomass and the carbon reserves accumulated such as starch. (A) During progressive nitrogen starvation, the starch in the form of non-absorbing granules, is accumulated in the microalgae chloroplast, (B) The total biomass is composed of the catalytic biomass and accumulated starch. The first is responsible for the light absorption (red lines) and light scattering (yellow line), whereas the second is involved only in light scattering (yellow lines). The artificial or natural light is only absorbed by the catalytic biomass while the photons are scattered by the whole biomass, *i.e.*, the catalytic biomass and the starch.....111

Figure III-2. Theoretical method developed for predicting microalgae radiation characteristics ($\bar{A}_{abs,\lambda}$ and $\bar{S}_{sca,\lambda}$) and the light absorption rate of microalgae culture in PBR under progressive nitrogen starvation conditions and accumulating carbon reserves. The method uses the total biomass, starch and pigment concentrations to establish the effective complex refractive index m_λ and the microalgae size distribution $f(r_{eq})$. The cross-sections ($\bar{C}_{abs,\lambda}$ and $\bar{C}_{sca,\lambda}$) and phase function $\Phi_{T,\lambda}(\theta)$ are calculated using the Lorenz-Mie Theory. From these, radiations characteristics are determined and the backward scattering ratio b_λ can be estimated from the phase function (but assumed constant in this work). Then, the predicted radiation characteristics are used to calculate the fluence rate $G'_\lambda(z)$ and the rates of photon absorption.....119

Figure III-3. Physiological changes of *C. reinhardtii* batch culture under a progressive nitrogen starvation condition. Temporal evolution of (A) the total C_{XT} and catalytic C_{XC} biomass concentrations, (B) ammonium concentration and cell density, and (C) starch mass content. Temporal evolution of (D) the pigment mass fractions in the total biomass w_{pig} , (E) the pigment mass fraction in the catalytic biomass w'_{pig} , and of (F) the pigment distribution w''_{pig} 122

Figure III-4. Measured cell size distribution $f(r_{eq})$ and fitted log-normal distribution of *C. reinhardtii* under progressive nitrogen starvation in batch culture for different starch mass fractions namely (A) $w_{st} = 0.133$ after 16 h, (B) $w_{st} = 0.304$ after 27 h, (C) $w_{st} = 0.455$ after 52 h, and (D) $w_{st} = 0.536$ after 69 h.125

Figure III-5. Comparison of the theoretical predictions and experimental measurements of (A) the mean equivalent radius \bar{r}_{eq} and (B) the starch volume fraction $f_{v,st}$ in microalgae cells for different starch mass fractions accumulated during progressive nitrogen starvation in a batch culture.127

Figure III-6. Comparison between experimentally measured and theoretically predicted average spectral mass absorption cross-section $\bar{A}_{abs,\lambda}$ of *C. reinhardtii* under progressive nitrogen deprivation in batch culture for different starch mass fractions namely (A) $w_{st} = 0.133$ after 16 h, (B) $w_{st} = 0.304$ after 27 h, (C) $w_{st} = 0.455$ after 52 h, and (D) $w_{st} = 0.536$ after 69 h.129

Figure III-7. Comparison between experimentally measured and theoretically predicted average spectral mass scattering cross-section $\bar{S}_{sca,\lambda}$ of *C. reinhardtii* under progressive nitrogen starvation in batch culture for different starch mass fractions namely (A) $w_{st} = 0.133$ after 16 h, (B) $w_{st} = 0.304$ after 27 h, (C) $w_{st} = 0.455$ after 52 h, and (D) $w_{st} = 0.536$ after 69 h.130

Figure III-8. Comparison of the PAR-averaged local rate of photon absorption LRPA $\mathcal{A}_{PAR,CR}(z)$ and simplified LRPA $\mathcal{A}_{PAR,CR,simp}(z)$ predicted using the complete or simplified two-flux approximation for the calculation of $G'_\lambda(z)$ and $G'_{\lambda,simp}(z)$, and experimentally measured and theoretically predicted radiation characteristics of *C. reinhardtii* under progressive nitrogen starvation in batch culture for different starch mass fractions namely (A) $w_{st} = 0.133$ after 16 h, (B) $w_{st} = 0.304$ after 27 h, (C) $w_{st} = 0.455$ after 52 h, and (D) $w_{st} = 0.536$ after 69 h.131

Figure III-9. Schematic representation of the prediction methodology for the mass absorption cross-section $\bar{A}_{abs,\lambda}$, used in the algorithm implementation to create a 5D-database of $\bar{A}_{abs,\lambda}$ as a function of biological parameters w'_{pig} , w''_{chla} , w_{st} , w_{TAG} and the wavelength w134

Figure IV-1. Experimental setup used for *C. reinhardtii* controlled-batch cultures. The cultivating system setup was composed of a sampling system, pH and dissolved oxygen regulations, instrumentalized PBR, homemade computer program and a gas analyzer for the gas balance analysis. (1) fresh medium, (2) gas filter, (3) culture sample, (4) pump, (5) pure CO₂ gas, (6) standard N₂/O₂ gas mixture, (7) flow-meter system, (8) PMMA PBR, (9) stirring motor, (10) oxygen probe, (11) pH and temperature probe, (12)

Desiccant cartridge, (13) flow-meter reader, (14) mass spectrometer, (15) Micro Gas Chromatography (μ GC), (16) oxygen dissolved and pH transmitters, (17) LabVIEW homemade program. Two gas analyzers were implemented: the mass spectrometer was used for estimator development (culture 1 and 2) and the μ GC for estimator validation (culture 3).141

Figure IV-2. Compartment stoichiometric model structure for total biomass. Microalgae biomass is divided into catalytic biomass and carbon reserves namely starch and/or lipid reserves such as triglycerides (TAG).....147

Figure IV-3. *C. reinhardtii* growth and starch storage dynamic. (A) total biomass concentration, (B) inorganic nitrogen concentration, (C) starch concentration, (D) starch content. Black and red symbols represent culture 1 and culture 2, respectively. Vertical discontinued red and black lines refer to the time of total inorganic nitrogen consumption.

153

Figure IV-4. Time-evolution of the net volumetric oxygen production rate obtained by gas analysis technique. Black and red color correspond to the culture 1 and 2, respectively. The shaded regions show the relative error of the indirect measurement of the r_{O_2}154

Figure IV-5. Schematic operation of the compartment stoichiometric model as a monitoring tool of growth and carbon reserves storage in microalgae cultivated under nitrogen-limiting conditions.155

Figure IV-6. Model simulations vs experimental data. (A)-(E) total biomass concentration, (B)-(F) inorganic nitrogen concentration and cell density, (C)-(G) carbon reserves concentration in the form of starch and TAG (magenta), (D)-(H) carbon reserves content in the form of starch and TAG (magenta). Color black and red correspond to culture 1 and 2, respectively. Symbols represents experimental measurements and continued lines model predictions. Shaded regions represent the model relative error.

157

Figure IV-7. Model validation. (A) on-line indirect measurement of r_{O_2} , (B) total biomass concentration, (C) inorganic nitrogen concentration, (D) carbon reserves concentration in the form of starch and TAG (magenta). Blue color corresponds to culture 3. Symbols represents experimental measurements and continued lines model predictions. Shaded regions represent the model relative error.159

Figure IV-8. Time evolution of the controlled dissolved oxygen (black lines) and standard gas mixture flow-rate (blue lines) during progressive nitrogen starvation batch cultures leading to carbon reserves accumulation. (A) culture 1, (B) culture 2.....	161
Figure IV-9. Time evolution of the pH regulation (black lines), carbon dioxide flow-rate (red lines) and total inorganic carbon concentration (green line) during progressive nitrogen starvation batch cultures leading to carbon reserves accumulation. (A) culture 1, (B) culture 2.....	162
Figure V-1. Évolution de la fraction éclairée γ dans les cultures en discontinu en régime cinétique (en bleu) et photolimité (en rouge).	167
Figure V-2. Dynamique de la mise en réserves des cultures en discontinu de <i>C. reinhardtii</i> cultivées en conditions de carence azotée progressive et opérant en régime cinétique (bleu) et photolimité (rouge). (A) Concentration en biomasse totale, (B) concentration en biomasse catalytique, (C) concentration en amidon, (D) teneur en amidon (E) concentration en ions ammonium.....	171
Figure V-3. Adaptation pigmentaire chez <i>C. reinhardtii</i> lors d'une carence azotée progressive pour différentes cultures en discontinu opérant en régime cinétique (en bleu) et photolimité (en rouge). (A) fraction massique des pigments totaux dans la biomasse catalytique, (B) fraction massique en Chl <i>a</i> dans la biomasse catalytique, (C) fraction massique en Chl <i>b</i> dans la biomasse catalytique, (D) Fraction massique en PPC dans la biomasse catalytique.....	174
Figure V-4. Évolution de la distribution pigmentaire et du rendement photosynthétique maximum dans les cultures discontinues de <i>C. reinhardtii</i> effectuées en conditions de carence azotée progressive opérant en régime cinétique (en bleu) et photolimité (en rouge). (A) fraction massique en chl <i>a</i> dans les pigments totaux, (B) fraction massique en chl <i>b</i> dans les pigments totaux, (C) fraction massique en PPC dans les pigments totaux, (D) rendement photosynthétique maximum ϕ_{PSII} mesuré par fluorimétrie PAM.	176
Figure V-5. Corrélation linéaire entre la fraction massique en chl <i>a</i> ($w''_{chl a}$) au sein des pigments totaux et le rendement photosynthétique maximum normalisé. Les données expérimentales correspondent aux cultures de <i>C. reinhardtii</i> effectuées en conditions de carence azotée progressive en régime cinétique (en bleu) et photolimité (en rouge)....	177

Figure V-6. Évolution de la constante de demi-saturation de la photosynthèse K en fonction du temps (A) et de la teneur massique en chl a dans le pool de pigments totaux, w''_{chla} avec une corrélation linéaire entre w''_{chla} et K présentée avec une ligne discontinue (B). 178

Figure V-7. Évolution de la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène r_{O_2} dans les cultures en discontinues de *C. reinhardtii* en conditions de carence azotée progressive. 179

Figure V-8. Vitesse moyenne d'absorption de photons (MRPA) vs teneur en amidon (w_{st}) pour les cultures discontinues de *C. reinhardtii* en conditions de carence azotée progressive en régime cinétique (A) et photolimité (B).180

Figure V-9. Relation entre l'accumulation d'amidon (en noir) et l'accès à la lumière par les cellules représentée par la fraction éclairée γ (en rouge). Les points en carrés et en diamant correspondent, respectivement, à la culture C et D.180

Figure VI-1. Schéma du système de culture bi-étagé de photoproduction en continu d' H_2 . (1) Débitmètre massique CO_2 , (2) débitmètre massique N_2 , (3) débitmètre massique pour purge de la μGC avec N_2 , (4) bouteilles gaz, (5) pompe entrée de milieu, (6) milieu de culture frais, (7) point d'échantillonnage PBR, (8) condenseur, (9) PBR, (10) Balance, (11) Moteur pour agitation, (12) Boitier des sondes pH/Température et O_2 dissous, (13) pompe pour connexion des PBRs et pour la régulation du volume du PBR1 (14) Purge issu de la pompe de connexion des PBRs, (15) pompe pour la régulation du volume du PBR 2, (16) récolte du système bi-étagé, (17) sélecteur de voie, (18) analyseur gaz μGC . 187

Figure VI-2. Modes de conduite des taux de dilution D dans le système de culture bi-étagé en continu.188

Figure. VI-3. Interface utilisateur du programme LabVIEW de pilotage du système de culture bi-étagé.190

Figure VI-4. Étapes pour la mise en place du système de culture bi-étagé.192

Figure VI-5. Évolution de l'état physiologique des PBR 1 (A) et PBR 2 (B), représentés par la dynamique de la concentration en biomasse totale, de la densité cellulaire, de la teneur en amidon et de la concentration en ammonium195

Figure. V-6. Évolution de la vitesse volumétrique nette de production d'oxygène (r_{O_2}) durant les étapes en mode continu et bi-étagé des PBR 1 et 2.	196
Figure V-7. Évolution de la teneur en pigments dans la biomasse catalytique w'_{pig} . En noir, rouge et bleu la teneur massique de la Chl <i>a</i> , Chl <i>b</i> , et caroténoïdes totaux PPC dans la biomasse catalytique, respectivement notés, w'_{chla} , w'_{chlb} , w'_{PPC} . Le symbole cercle et carré désignent les w'_{pig} dans le PBR 1 et PBR 2, respectivement.....	197
Figure VI-8. Évolution de la concentration en oxygène dissous C_{O_2} dissous(%) dans les PBR 1 et 2 au cours des étapes en mode continu et bi-étagé (lignes continues) comparé à la consigne transmise au contrôleur PID.	198
Figure VI-9. Production de biohydrogène par la microalgue <i>C. reinhardtii</i> en système bi-étagé. Cette production a été caractérisée par la vitesse volumétrique nette de production d' H_2 (r_{H_2}) et le volume d' H_2 produit par rapport au volume de culture (I_{H_2}).	199

LISTE DE TABLEAUX

Tableau II-1. Conditions opératoires étudiées pour les cultures réalisées lors du développement d'un protocole d'étude de la mise en réserve de l'amidon chez <i>C. reinhardtii</i> à flux lumineux incident constant de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	82
Tableau II-2. États physiologiques initiaux des cultures en batch.	85
Table III-1. Experimental measurements of four physiological states during a progressive nitrogen starvation batch culture.	124
Table IV-1. Controlled parameters and operating conditions applied to progressive nitrogen starvation batch cultures.....	143
Table IV-2. Molar yields of catalytic biomass, starch and TAG derived from their composition.	149
Table IV-3. List of the model parameters with their descriptions, units and values.	152
Tableau V-1. Conditions opératoires des cultures en discontinu de <i>C. reinhardtii</i> soumises à une carence azotée progressive. Pour l'ensemble des cultures, le pH a été régulé à 7.5 et l'oxygène dissous à 130% par rapport la saturation de l'air.....	166
Tableau V-2. Distribution pigmentaire pendant la phase de croissance dans les cultures discontinues.	175
Tableau VI-1. Conditions de culture pour les 3 étapes ayant lieu lors du lancement du système bi-étagé de production d' H_2	192
Tableau VI-2. Mesure et dosages réalisées pour les phases biotique, liquide et gaz dans les 3 étapes du procédé bi-étagée de production d' H_2	193

Introduction générale

La production des vecteurs énergétiques alternatifs et durables, tels que l'hydrogène (H_2), est devenue une priorité pour faire face au phénomène actuel du réchauffement climatique. Ce phénomène est essentiellement provoqué par la surproduction de CO_2 , lequel, une fois libéré, s'accumule dans l'atmosphère et génère un effet de serre important sur la planète. L'hydrogène possède une densité énergétique qui est trois fois supérieure à celle des combustibles fossiles classiques tels que le méthane, le gaz naturel ou l'essence. De plus, sa combustion n'entraîne aucune production de CO_2 mais uniquement de l'oxygène et de l'eau, ce qui fait d'elle une molécule énergétique intéressante. Parmi les différents moyens et ressources technologiques permettant une production d' H_2 (photolyse de l'eau, reformage du méthane, etc.), nous nous intéresserons dans ce manuscrit de thèse à la production d' H_2 à partir de micro-organismes photosynthétiques, tels que les microalgues. En effet, les microalgues dans des conditions de culture bien particulières peuvent produire de l' H_2 . Cette production d' H_2 pourrait être envisagée à partir de ressources entièrement renouvelables et peu coûteuses telles que l'eau, la lumière et quelques minéraux.

La production photosynthétique d' H_2 par les microalgues a été observée pour la première fois il y a plus de 80 ans, lorsque des cellules au sortie d'une période d'obscurité avaient été éclairées, produisant transitoirement de l' H_2 dans des conditions de culture où la concentration en oxygène dissous était très faible (Gaffron & Rubin, 1942). En effet, il s'est avéré que la production d' H_2 par les microalgues nécessitait des conditions anoxiques pour induire la synthèse d'une enzyme clé, appelée hydrogénase, qui catalyse la réaction de formation d' H_2 . Les électrons nécessaires à la formation de l' H_2 peuvent être fournis par la chaîne photosynthétique soit directement à partir de la photolyse de l'eau au niveau du photosystème II (voie directe), soit indirectement par oxydation de réserves carbonées intracellulaires dans la cellule (voie indirecte). Cependant, l'hydrogénase est rapidement inhibée par l'oxygène, ce qui nécessite de devoir mettre en place des stratégies pour imposer et maintenir des conditions anoxiques tout en gardant une activité photosynthétique afin de produire l' H_2 et maintenir la viabilité cellulaire.

Pour cela, un système bi-étagé continu de production d' H_2 a été proposé par le laboratoire GEPEA. Ce système de culture consiste en deux photobioréacteurs (PBR) couplés en

série. Chaque PBR permet d'imposer des états physiologiques différents, au travers de conditions de culture choisies. Le premier étage permet la formation d'une biomasse enrichie en amidon et le deuxième étage est dédié à la production d'H₂ proprement dite. La carence en azote imposée dans l'étage 1 permet de limiter la production d'oxygène et favoriser l'accumulation de réserves en amidon pouvant être remobilisé vers la production d'hydrogène ensuite dans l'étage 2, où des conditions anoxiques sont instaurées par un contrôle rigoureux de la lumière au sein du système de culture. Pour cela, l'objectif du protocole développé au laboratoire vise à ce que l'oxygène produit par l'activité photosynthétique réduite tende à compenser la prise d'oxygène dans les zones sombres du photobioréacteur. En tant que procédé multi-étagé, la stabilité globale du système dépend de la stabilité individuelle de chaque étage. En l'occurrence, l'étape clé pour domestiquer la production d'hydrogène est de contrôler l'état physiologique des cellules qui doivent être amené en conditions anoxiques (Lemasson, 2015). C'est la raison pour laquelle l'étage 1 nécessite une attention particulière. Dans cet étage, *C. reinhardtii* est cultivée en conditions de limitation par la source d'azote, induisant une réponse biologique complexe avec des changements importants au niveau de l'appareil photosynthétique, de la division cellulaire et de l'accumulation des réserves carbonées. Tout ceci rend difficile la mise en œuvre du système bi-étagé sans une compréhension fine des phénomènes mise en jeu dans ce premier étage.

Cette thèse a donc porté sur une étude approfondie de la mise en réserve du carbone chez *C. reinhardtii* en conditions autotrophe et de limitation par la source d'azote, en vue de piloter un système bi-étagé de photoproduction continue d'H₂. Par ailleurs, un pilote de production continue d'H₂ a été mise en place et testé expérimentalement. Le manuscrit de thèse est divisé en six chapitres :

- **Chapitre I** : Ce chapitre bibliographique présente d'abord le contexte global et le l'intérêt portée à une production d'hydrogène par voie biologique. Ensuite, des généralités sur les cultures de micro-organismes photosynthétique, et particulièrement de *C. reinhardtii*, sont abordées. Enfin, une section dédiée à la production d'H₂ par les micro-organismes photosynthétiques est présentée. Cette section aborde les types d'organismes, les enzymes, les voies métaboliques et les stratégies impliquées dans la production d'H₂. La dernière partie de ce chapitre introduit en détails le système de culture bi-étagé et les objectifs de la thèse.

- **Chapitre II** : Dans le but d'étudier l'impact uniquement d'une limitation azotée sur la réponse biologique de *C. reinhardtii* cultivé en PBR, un protocole de culture a été élaboré afin d'étudier la cinétique de mise en réserve du carbone en conditions contrôlées.
- **Chapitre III** : Dans ce chapitre, une méthodologie pour prédire les propriétés radiatives de *C. reinhardtii* en conditions de limitation par la source d'azote a été développé et validé expérimentalement. Ces données sont importantes pour pouvoir caractériser la cinétique d'absorption du rayonnement dans le PBR et le développement de protocoles de culture optimisés, ou à termes la modélisation cinétique de la réponse biologique dans les conditions étudiées.
- **Chapitre IV** : Ce chapitre présente un modèle stœchiométrique dynamique permettant d'estimer le niveau de réserves en amidon lors d'une culture carencée en azote. Le modèle repose sur une mesure indirecte de la vitesse nette de production d'oxygène et permet de prédire l'évolution de la concentration en azote inorganique, en réserves carbonées (amidon et triglycérides) et en biomasse totale. Pour ce faire, des termes cinétiques de ont été introduit afin de décrire les changements de réaction (bascule métabolique) entre la formation d'une biomasse catalytique et celle des réserves intracellulaires en carbone. Ce modèle pourra être utilisé in fine pour le suivi en ligne de l'état physiologique d'une culture soumise à une carence progressive en azote.
- **Chapitre V** : Si l'objet de l'étude décrite jusqu'à présent visait à appréhender l'impact seul d'une limitation azotée sur la cinétique de mise en réserve, les micro-organismes photosynthétiques cultivés en PBR se retrouvent la plupart du temps limités par l'accès à leur source d'énergie (lumière). Ainsi, dans ce chapitre, une étude expérimentale spécifique a été réalisé pour comparer et analyser l'impact d'une limitation azotée sans limitation par le transport de la lumière (régime cinétique) et d'une double limitation azotée et par l'accès à la lumière (régime photolimité) sur la cinétique d'accumulation de l'amidon.
- **Chapitre VI** : Dans ce chapitre, un système bi-étagé de photoproduction d' H_2 a été mise en place auquel plusieurs améliorations techniques et opérationnelles ont pu être apportées. De plus, un suivi complet de la culture portant à la fois sur la phase biotique et abiotique a été réalisé. Enfin, une expérience d'une durée de 30 jours conduite avec le pilote de production d' H_2 bi-étagé amélioré, est présentée.

Chapitre I

I. Chapitre bibliographique

I.1 Introduction

I.1.1 Contexte global et environnemental

Le réchauffement climatique est probablement le problème le plus difficile auquel l'humanité est confrontée. Il est causé par la pollution atmosphérique avec des gaz à effet de serre (GES) déclenchant une augmentation des températures moyennes mondiales. À l'origine de cette crise climatique se trouvent essentiellement l'augmentation de la population et l'industrialisation mondiale entraînant une demande sans cesse croissante de ressources naturelles importantes (eau douce et nourriture) et de carburant au cours du dernier demi-siècle (Moshood et al., 2021; Tsita & Pilavachi, 2013). Une des principales préoccupations du changement climatique est son effet sur l'agriculture et la sécurité alimentaire mondiale, représentant ainsi une menace réelle pour la survie de la race humaine sur la planète Terre (IEA International Energy Agency, 2016; Tai et al., 2014; Wheeler & von Braun, 2013).

De plus, les conséquences de la crise climatique peuvent inclure des migrations massives, une instabilité sociale et politique, voire des conflits militaires. D'autres problèmes environnementaux majeurs connexes sont la hausse du niveau des mers issu de la diminution des glaces arctiques, des vagues de chaleur extrêmes, la fréquence des sécheresses, la désertification, l'acidification des océans et l'augmentation de la mortalité due à la pollution de l'air (Kroecker et al., 2013; Lam et al., 2019; Schaeffer et al., 2012). En effet, la contamination de l'atmosphère avec des GES est principalement due à l'utilisation de combustibles fossiles pour la production de l'énergie libérant du dioxyde de carbone (CO₂) (IEA International Energy Agency, 2015b). Le changement climatique affecte le monde entier et nécessite une solution énergétique propre à l'échelle mondiale.

Face à cette menace pour notre avenir, les dirigeants de la plupart des pays ont convenu de conjuguer leurs efforts pour réduire les émissions des GES et limiter le réchauffement planétaire par rapport aux températures mondiales moyennes de l'ère préindustrielle dans le cadre de l'accord de Paris sur les changements climatiques en 2015. Réduire les émissions mondiales des GES sans compromettre la croissance économique est un

énorme défi qui nécessite de modifier les politiques motivées par l'intérêt national vers des politiques pour une solution globale. En France, une politique nationale vise la réduction des GES jusqu'à l'année 2050 à travers de la stratégie Nationale Bas-Carbone (SNBC) adoptée en 2015 et introduite par la loi de Transition Énergétique pour la Croissance Verte (LTECV). Cette stratégie a deux objectifs précis : (i) attendre la neutralité carbone à l'horizon 2050 en France et (ii) réduire l'empreinte carbone de la consommation des Français (Ministère de la transition écologique et solidaire, 2015).

Il faut savoir qu'au niveau mondial le secteur de l'énergie est le principal contributeur aux émissions humaines de GES. Il est dominé par les combustibles fossiles, et leur utilisation représente 66 % des émissions totales de GES (IEA International Energy Agency, 2015b). Le charbon est le combustible fossile le plus abondant et le moins cher, mais aussi le plus polluant. Les combustibles fossiles sont des vecteurs énergétiques riches en carbone et le produit de deux étapes de transformation. La première est la photosynthèse, qui consiste à utiliser l'énergie solaire et l'eau pour transformer le CO₂ en composés organiques riches en carbone. La seconde est la désoxygénation de la matière organique, un processus qui prend des millions d'années à haute température et pression sous la croûte terrestre (Bayro-Kaiser & Nelson, 2017).

Les combustibles fossiles ont une densité énergétique élevée et sont des vecteurs énergétiques très flexibles. Leur extraction ne nécessite pas beaucoup d'efforts et ils peuvent être transportés dans le monde entier avant d'être facilement transformés en différents types d'énergie dont l'homme a besoin. En 2018, les combustibles fossiles couvraient 81,3 % du total des 19 térawatts par an (TW/an) ou 14282 tonnes d'équivalent pétrole (Mtoe) de la demande énergétique mondiale (Figure I-1B) (IEA International Energy Agency, 2020). Ils ne sont pas consommés comme un vecteur énergétique renouvelables. Au contraire, ils sont exploités comme une source d'énergie primaire. La poursuite de l'utilisation des combustibles fossiles au rythme actuel entraînerait une transformation indésirable de notre atmosphère et l'épuisement à terme de notre principale source d'énergie. Au cours des dernières décennies, il est devenu évident que la vitesse de consommation de combustibles fossiles par l'homme ne peut être compensé par la vitesse de fixation photosynthétique du CO₂ et la production de nouvelles ressources énergétiques fossiles. En effet, la consommation totale de ces énergies a augmenté presque 2,5 fois entre les années 1973 et 2018 (Figure I-1A) (IEA International Energy Agency, 2020).

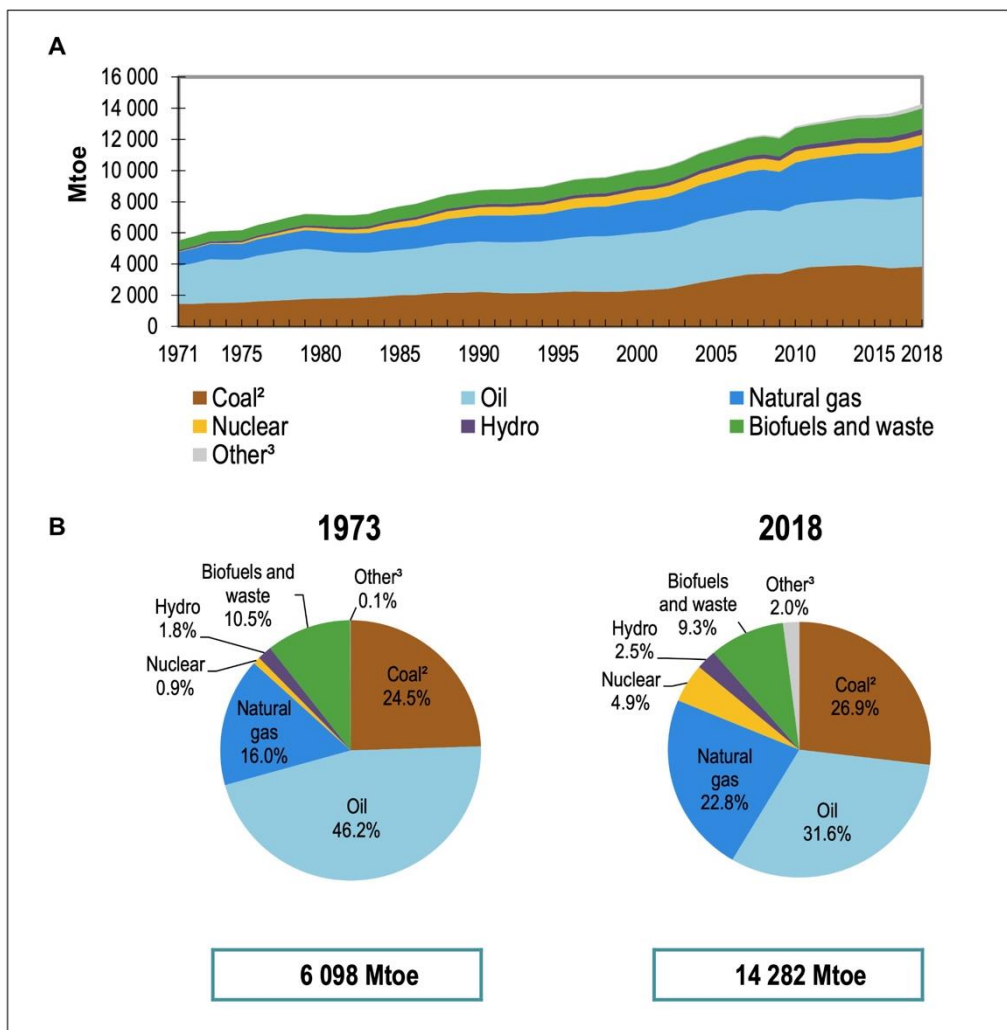


Figure I-1. Approvisionnement total en énergie dans le monde selon l' . A-Évolution de la demande en énergie dans le monde par ressource entre 1973 et 2018. B-Comparaison de la consommation d'énergie par ressource entre 1973 et 2018.

Une transformation complète du secteur énergétique en un système relativement propre et soutenable sera nécessaire pour limiter le réchauffement de la planète et assurer une sécurité énergétique durable. L'énergie nucléaire et l'énergie hydraulique sont actuellement les principales sources d'énergie sans émissions de GES. Toutefois, elles n'auront pas la capacité de remplacer les combustibles fossiles et de couvrir la demande énergétique croissante.

L'énergie nucléaire est une technologie très déployée avec environ 400 réacteurs en exploitation dans le monde. Ils ont couvert 1,5 % de la demande énergétique mondiale en 2013 (IEA International Energy Agency, 2015a). Une accélération massive du déploiement mondial de cette technologie amplifierait les problèmes liés à l'énergie

nucléaire (par exemple, l'élimination des déchets radioactifs, le déclassement des centrales, la sécurité civile) à un niveau inacceptable (Bayro-Kaiser & Nelson, 2017).

De l'autre côté, l'énergie hydraulique est aussi très intéressante dans le contexte environnemental actuel. L'énergie solaire est naturellement convertie en énergie potentielle gravitationnelle par évaporation de l'eau, et le ruissellement d'eau douce qui en résulte est utilisé pour produire de l'électricité. Cette approche de l'utilisation de l'énergie solaire est durable, propre, invariable et économiquement viable, mais l'efficacité de la conversion de l'énergie solaire en énergie potentielle gravitationnelle est inférieure à 0,01 %. De plus, on peut s'attendre à des dommages initiaux considérables pour les écosystèmes établis (Bayro-Kaiser & Nelson, 2017).

Par conséquent, l'identification de sources alternatives d'énergie renouvelable est devenue l'un des principaux défis de ce siècle pour parvenir à une énergie plus durable et plus verte pour l'avenir. Les sources d'énergie renouvelables telles que l'énergie solaire, l'énergie éolienne, l'énergie hydraulique et l'énergie provenant de la biomasse et des déchets, font l'objet de développements constants et sont utilisées avec succès par différentes nations pour limiter l'utilisation des combustibles fossiles (Lam et al., 2010). Néanmoins, seule l'énergie produite à partir de la combustion de la biomasse et des déchets a apporté une contribution significative, indiquant d'immenses possibilités pour la biomasse dans le secteur énergétique. En d'autres termes, la recherche et le développement de technologies vertes utilisant la biomasse pour produire de l'énergie devraient être largement encouragés afin de renforcer cette source renouvelable pour la diversification de l'approvisionnement énergétique sur le marché mondial des carburants en conscience de l'enjeu environnemental mondial actuel (Lam et al., 2019).

I.1.2 Le potentiel de l'hydrogène moléculaire (H₂) comme solution énergétique.

L'hydrogène est l'élément le plus abondant sur terre, constituant les molécules d'eau et de plusieurs composés organiques. Dans sa forme gazeuse (H₂), il est considéré comme le carburant renouvelable le plus propre à notre disposition, car le produit de sa combustion n'est autre que de l'eau, sans émission de CO₂ dans l'atmosphère (Brentner et al., 2010). De plus, l'hydrogène a une densité énergétique spécifique plus élevée (142 MJ/kg) que le méthane (56 MJ/kg), le gaz naturel (54 MJ/kg) ou l'essence (47 MJ/kg) (Lam & Lee, 2011). Ces caractéristiques font de l'hydrogène le parfait candidat pour devenir le carburant le plus important à l'avenir.

À ce jour, environ 96 % de l’approvisionnement mondial en H₂ provient de procédés non renouvelables et chimiques, tels que le reformage du méthane à la vapeur (en anglais SMR pour Steam Methane Reforming), le raffinage du pétrole et la gazéification du charbon (Balat, 2008; Srirangan et al., 2011). Une attention particulière a été portée sur le reformage du méthane à la vapeur car ce procédé est rentable et actuellement disponible à une échelle commercialisable (Jin et al., 2008). Cependant, la réaction SMR est une réaction endothermique ayant lieu à des températures élevées dans laquelle une énergie externe (par exemple, celle de la combustion de carburants) doit être fournie pour permettre la réaction (Fan et al., 2009). En outre, l’utilisation du méthane pour la production d’hydrogène n’est pas viable à long terme, car la plupart du méthane est actuellement dérivé de combustibles fossiles, et donc n’est pas renouvelable (Khetkorn et al., 2017).

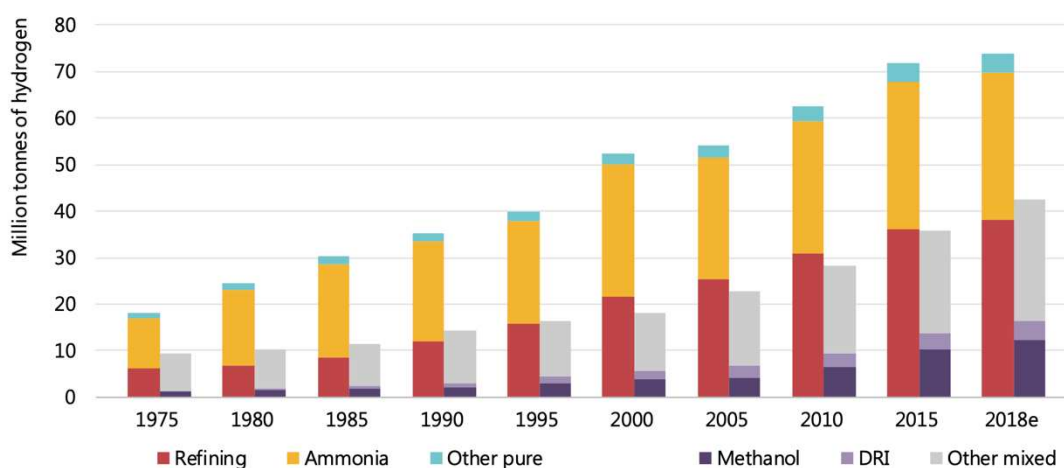


Figure I-2. Évolution de la demande annuelle en hydrogène depuis 1975. DRI : production d’acier par réduction directe du fer. Le raffinage, l’ammoniac et « autres purs » représentent la demande pour des applications spécifiques qui nécessitent de l’hydrogène avec seulement de faibles niveaux d’additifs ou de contaminants tolérés. Le méthanol, le DRI et les « autres mélanges » représentent la demande d’applications qui utilisent l’hydrogène dans un mélange de gaz, comme le gaz de synthèse, comme combustible ou comme charge d’alimentation. Tiré de IAE (International Energy Agency) (2019).

La demande en hydrogène, qui a plus que triplé depuis 1975, continue d’augmenter (Figure 2). En effet, la demande en H₂ sous sa forme la plus pure est d’environ 70 millions de tonnes par an (MTH₂/an). Cette forme d’hydrogène est presque entièrement fournie par des combustibles fossiles, 6 % du gaz naturel et 2 % du charbon des réserves mondiales étant consacrées à la production d’H₂. En conséquence, à l’heure actuelle la

production d'hydrogène est responsable d'une émission de CO₂ d'environ 830 millions de tonnes par an (MTCO₂/an), soit l'équivalent des émissions de CO₂ de l'Indonésie et du Royaume-Uni réunis. En termes d'énergie, la demande annuelle totale d'hydrogène dans le monde est d'environ 330 millions de tonnes d'équivalent pétrole (Mtoe), soit plus que l'approvisionnement en énergie primaire de l'Allemagne (IAE International Energy Agency, 2019).

L'H₂ peut avoir différentes utilisations. Il peut servir à générer de l'électricité en utilisant des piles à combustible. Il peut être utilisé comme carburant dans le transport grâce aux avancées dans la construction automobile ainsi que dans l'industrie aéronautique (Anwar et al., 2019; Ramachandran & Menon, 1998). De plus, l'hydrogène moléculaire est un gaz industriel et une matière première importante dans de nombreuses applications et procédés (Figure I-2). Cependant, le coût de production élevé, les difficultés de stockage et de transport et le manque d'infrastructures pour l'hydrogène posent des problèmes de viabilité économique en tant que source majeure de carburant (Chu & Majumdar, 2012; Oey et al., 2016; Rashid et al., 2013). Par conséquent, les méthodes de stockage et de transport ainsi que le développement de l'infrastructure sont essentiels pour une économie durable de l'hydrogène (Krishnan Unni et al., 2017; Moreno-Benito et al., 2017).

La France a déployé une stratégie nationale pour le développement de l'hydrogène décarboné dans l'optique de la décarbonation de l'industrie française, visant à réduire les émissions de 81 % d'ici 2050 par rapport à 2015 (Ministère de l'économie, des finances et de la relance, 2020). Dans le cadre du plan de relance, une enveloppe de 2 milliards d'euros est d'ores et déjà attribuée au développement de l'hydrogène décarboné. Au total, un financement de 7 milliards d'euros de soutien public est prévu jusqu'en 2030. L'hydrogène décarboné envisagé à l'heure actuelle par le gouvernement est basé sur le progrès de la technologie de l'électrolyse, par un apport d'électricité, à condition que l'électricité ayant servi à le produire soit elle-même produite sans utiliser d'énergies fossiles. Toutefois, la technologie de l'électrolyse de l'eau à partir de l'énergie solaire capté par des panneaux photovoltaïques reste encore coûteuse et non-suffisante pour satisfaire la demande nationale et mondiale, dont approximativement 4 % de l'hydrogène produit est issu de cette technologie (Mahidhara et al., 2019).

C'est ainsi que d'autres alternatives ont vu le jour, comme la production biologique d'hydrogène que l'on appelle plus souvent bio-hydrogène. Dans cette voie de production,

l'hydrogène est obtenu à partir d'une ressource microbienne qui rend le processus économiquement compétitif et « eco-friendly » avec une obtention d'un hydrogène propre et entièrement renouvelable.

I.1.3 L'hydrogène biologique ou bio-hydrogène

La production d'hydrogène biologique provient de la mise en œuvre de micro-organismes. La production d'hydrogène par des micro-organismes photosynthétiques a suscité l'intérêt de toute une communauté scientifique en raison de son potentiel en tant que vecteur d'énergie renouvelable et qui peut être produit en utilisant des ressources présentes en abondance dans la nature, à savoir l'énergie solaire et l'eau. En effet, l'utilisation du rayonnement du soleil pour la génération d'hydrogène apparaît comme une solution idéale voire nécessaire afin d'envisager une production d'énergie durable et propre (Chatzitakis et al., 2013). Ainsi, la production d'hydrogène par voie biologique offre plusieurs avantages tels que la gestion des déchets, le remplacement des combustibles fossiles par un biocarburant durable et la diminution des émissions de CO₂ (Anwar et al., 2019; Schipper et al., 2019; Zebda et al., 2018). Il existe plusieurs micro-organismes photosynthétiques et non-photosynthétiques capables de produire de l'hydrogène, à savoir les microalgues, les cyanobactéries, les bactéries photosynthétiques et les bactéries fermentaires sombres. Ces micro-organismes ont une physiologie et un métabolisme très diversifiés qui leur permettent de produire de l'hydrogène à partir différentes voies métaboliques qui s'expriment pour différentes conditions de culture (cf. section I.4.1) (Khetkorn et al., 2017).

I.2 Les microalgues : une alternative pour la production de l'énergie du futur.

I.2.1 Généralités sur les micro-organismes photosynthétiques

Le terme « micro-organisme photosynthétique » se réfère au groupe de micro-organismes eucaryotes ou procaryotes capables de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique par le biais de la photosynthèse, qui est notamment utilisée pour la division cellulaire. Parmi les micro-organismes intégrant cette catégorie se trouvent les cyanobactéries, les microalgues et les bactéries photosynthétiques. Ces micro-organismes photosynthétiques diffèrent dans leur complexité intracellulaire, les divisant en organismes procaryotes (cyanobactéries et bactéries photosynthétiques) et eucaryotes (microalgues). Les procaryotes sont les organismes les plus anciens et leur structure interne ne possède pas d'organites intracellulaires ni de noyau, contrairement aux

microalgues. Ainsi, les processus métaboliques essentielles, tels que la respiration et la photosynthèse, nécessaires pour l'obtention d'énergie chimique sous forme d'adénosine-triphosphate (ATP), sont réalisées indépendamment dans des organites dédiés chez les microalgues, à savoir, la mitochondrie et le chloroplaste. En revanche, chez les cyanobactéries, ces deux processus ne peuvent pas avoir lieu au même temps (Mullineaux, 2014).

Une attention particulière a été portée ces dernières années aux microalgues qui présentent une grande diversité en termes de structures intracellulaires, de morphologie (Figure I-3) et de mode de vie, pouvant offrir un large éventail d'applications biotechnologiques. Les microalgues peuvent être cultivé à partir de différentes sources nutritives : sur milieu organique où l'acétate, le glucose ou encore d'autres composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone, en présence de lumière (photohétérotrophie) et en absence de lumière (chimiohétérotrophie). De même, elles peuvent croître sur milieu minéral en présence de lumière avec le CO₂ comme seule source de carbone (photoautotrophie).

Les microalgues sont classées selon des critères spécifiques tels que l'organisation intracellulaire, le nombre de membranes sur les chloroplastes (2 ou 4), le compartiment cellulaire de stockage de réserves (à l'intérieur ou à l'extérieur du chloroplaste), le type de molécule de réserve de carbone, le type de flagelle, les méthodes de reproduction et les principaux pigments présents (Barsanti & Gualtieri, 2014). Les groupes de microalgues les plus étudiés sont les algues vertes (*Chlorophyta* et *Charophyta*), les algues rouges (*Rhodophyta*), les diatomées (*Bacillariophyceae*), les coccolithophores (*Haptophyta*) et les euglènes.

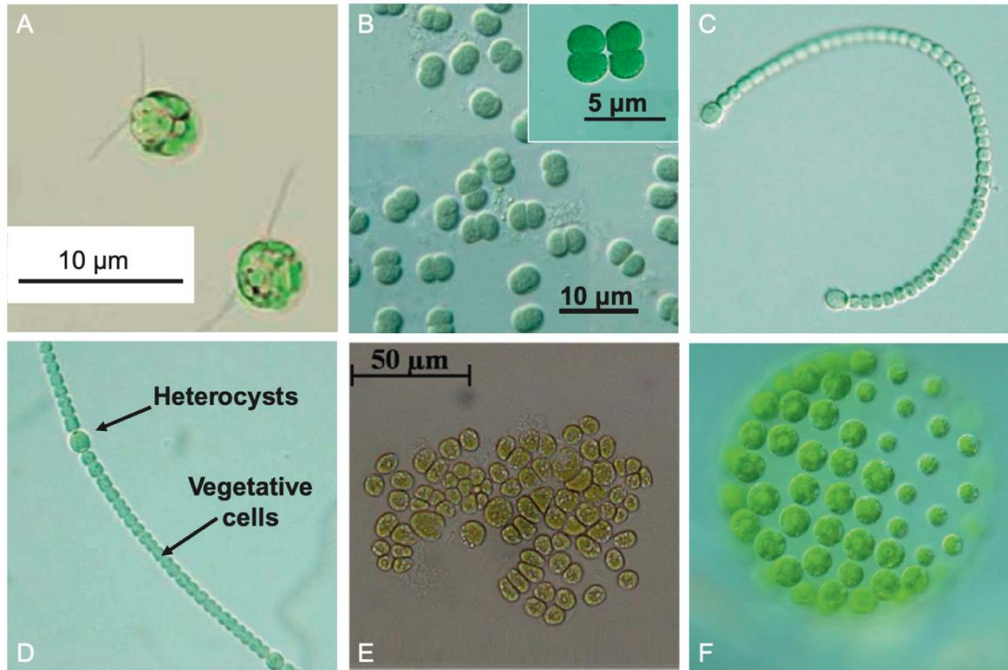


Figure I-3. Micrographies de (A) *Chlamydomonas reinhardtii*, (B) cellule de *Synechocystis sp.* en forme d'haltère flottant librement et immédiatement après la division cellulaire (en médaillon), (C) *Anabaenopsis sp.*, (D) *Anabaena cylindrica*, (E) une colonie de la microalgue *B. braunii*, et (F) *Pleodorina californica*. Tiré de Pilon & Kandilian, 2016.

I.2.2 Intérêt et applications des microalgues

Les microalgues sont des micro-organismes photosynthétiques pouvant former des filaments et des colonies et qui ont une grande capacité d'adaptation, pouvant même occuper des habitats écologiques extrêmes. Elles ont la capacité de s'adapter à des conditions environnementales défavorables, ne rentrent pas en concurrence pour l'utilisation des terres arables et peuvent même être cultivées dans des eaux usées en raison de leur capacité de biofixation et remédiation des polluants métalliques en surface des cellules mais aussi due à leur potentiel épuratoire au regard des résidus azotés et phosphatés (Oncel, 2013; Udayan et al., 2021).

Grâce à sa diversité biologique et métabolique les microalgues peuvent produire des molécules à valeur ajoutée dans des conditions de cultures spécifiques. Ces produits biochimiques sont très variés, et recouvrent des carbohydrates, des protéines, des lipides, des vitamines, des antioxydants, des pigments, entre autres (Figure I-4B) (Eriksen, 2008; Pulz & Gross, 2004; Rumin et al., 2021; Spolaore et al., 2006). La production commerciale actuelle de microalgues touche des domaines d'application intéressant plus

particulièrement l'industrie cosmétique, l'industrie alimentaire humaine et animale, la production de compléments alimentaires, l'industrie chimique, pharmaceutique et des biocarburants (Udayan et al., 2021) (Figure I-4A).

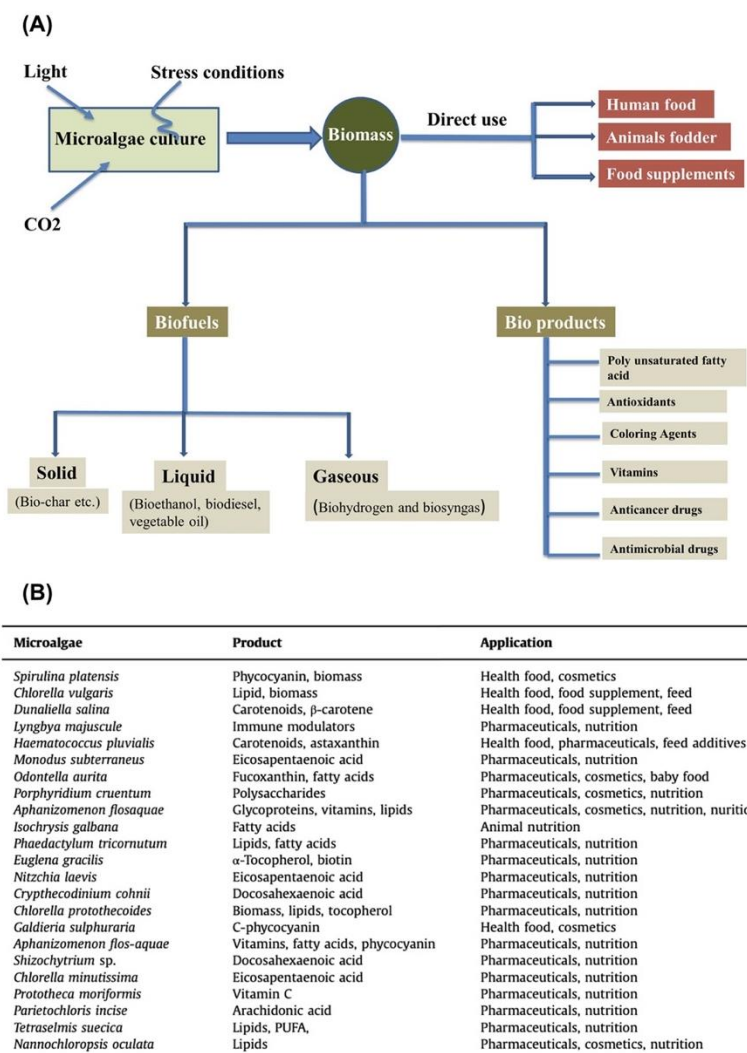


Figure I-4. Application de la culture de microalgues. (A) secteurs industriels d'intérêt (Khan et al., 2018), (B) exemple de produits issus de microalgues commercialisés dans plusieurs secteurs industriels (Oncel, 2013).

I.2.3 Production de biocarburants à partir de microalgues.

Un biocarburant est un carburant obtenu ou dérivé d'une biomasse ou de matière organique, usuellement d'origine végétale (Mahapatra et al., 2021). Les biocarburants peuvent être produits par diverses méthodes, notamment biologiques, chimiques et physiques. Ils sont classifiés en 4 générations :

- Biocarburants de 1^{re} génération
- Biocarburants de 2^e génération

- Biocarburants de 3^e génération
- Biocarburants de 4^e génération

Les biocarburants de première génération sont obtenus principalement à partir de cultures fourragères ou d'autres produits alimentaires (Jeswani et al., 2020). La fabrication de ces biocarburants fait appel à plusieurs technologies et procédés de premier plan, notamment la fermentation, la distillation et la transestérification, ce qui explique que ces biocarburants soient également considérés comme des « biocarburants conventionnels » (Jeswani et al., 2020). Le processus se concentre principalement sur la production de carburant uniquement, et le reste de la matière non combustible est jetée comme déchet. Il s'agit notamment de l'éthanol issu de la canne à sucre et du maïs, ainsi que du biodiesel issu de l'huile de palme, de l'huile de colza et de l'huile de soja (Gasparatos et al., 2013). Environ 37 % de la production de maïs et d'huile végétale des États-Unis et de l'Europe sont affectées à cette génération de biocarburant (Groth & Bentzen, 2013).

Les biocarburants de deuxième génération sont entièrement produits à partir de matières premières non-alimentaires telles que des culture énergétique (espèce végétale à valorisation énergétique), des plantes lignocellulosiques, des résidus agricoles, des résidus forestiers et d'autres déchets (Jeswani et al., 2020). Par rapport à la production de biocarburants de première génération, la deuxième génération est une méthode améliorée qui se concentre à la fois sur une récupération accrue du carburant, la réduction du coût énergétique global et de la quantité de déchets produits, ce qui en fait une méthode économiquement viable (Mahapatra et al., 2021).

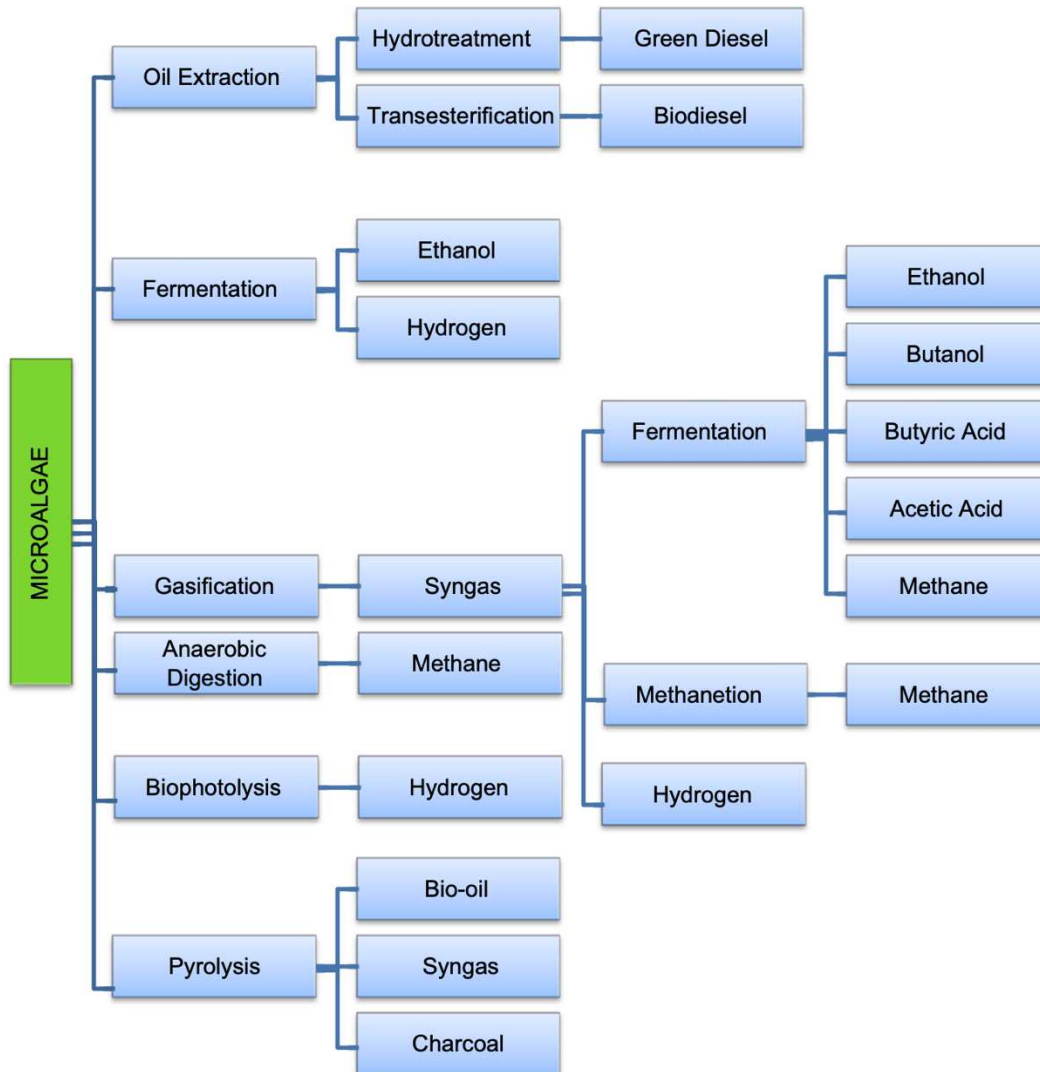


Figure I-5. Schéma de production de biocarburants de 3^e génération issus de microalgues par des transformation ou procédés intermédiaires (Oncel, 2013).

En général, les matières premières pour les biocarburants de troisième génération sont des biomasses microscopiques pouvant être produites dans des environnements artificiels réglementés et qui sont moins dépendantes de ressources limitées comme les cultures vivrières, les terres arables et l'eau (Chowdhury & Loganathan, 2019; Nigam & Singh, 2011). Dans ce cadre, rentrent les microalgues, pouvant utiliser des nutriments provenant de flux de déchets tels que les eaux usées urbaines et les émissions de carbone des centrales électriques pour sa croissance (Udayan et al., 2021). Lorsqu'elles sont traitées par des réactions chimiques ou biologiques, les microalgues peuvent fournir différents types de biocarburants renouvelables (Figure I-5). Il s'agit principalement du biodiesel, du biohydrogène, du bioéthanol et du biométhane. En ce qui concerne les carburants à

base de microalgues, l'accent est mis sur la production de biodiesel. La production de biohydrogène est également populaire en raison de son potentiel dans des applications modernes comme les piles à combustible. Les deux autres, le bioéthanol et le biométhane, sont considérés comme faisant partie de processus intégrés (Figure I-5) (Oncel, 2013). Finalement, les biocarburants de quatrième génération concernent les avancées les plus récentes en matière de génie métabolique, de modification génétique et de biologie synthétique. Ils visent à découpler ou à améliorer le métabolisme de la cellule pour sur-exprimer des métabolites servant à la production des biocarburants (Abdullah et al., 2019; Maeda et al., 2018).

I.2.4 La microalgue d'étude *Chlamydomonas reinhardtii*

L'objectif de cette thèse porte sur le potentiel des microorganismes photosynthétiques et plus particulièrement de la microalgue modèle *Chlamydomonas reinhardtii* comme microorganisme d'étude pour la photo-production biologique d'hydrogène.

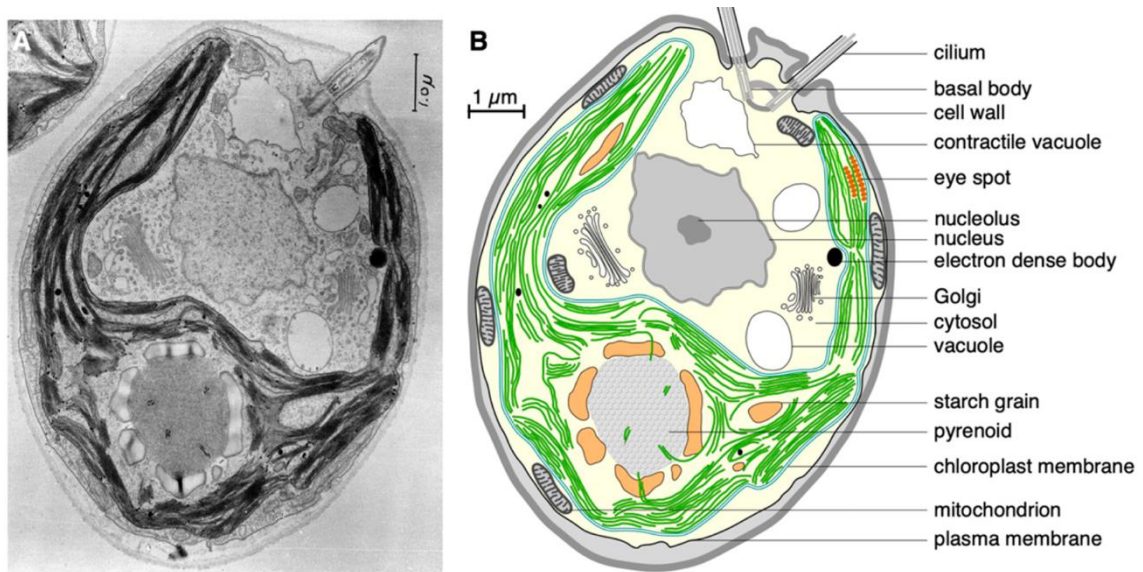


Figure I-6. Structure cellulaire de *Chlamydomonas reinhardtii*. A-Micrographie électronique à transmission (TEM) d'une cellule. B-Dessin basé sur l'image (TEM) avec les différents organites cellulaires. Tiré de Salomé & Merchant, 2019.

Chlamydomonas reinhardtii est une microalgue verte unicellulaire eucaryote de la classe des *Chlorophyceae*, de forme ovale, mesurant approximativement 10 μm de diamètre. Les espèces de *Chlamydomonas sp.* sont largement répandues dans le monde entier dans le sol et l'eau douce. La cellule est entourée d'une membrane cellulaire composée de glycoprotéines et de carbohydrates dont l'arabinose, le mannose, le galactose et le glucose

sont les sucres prédominants (Harris et al., 2009; Salomé & Merchant, 2019). Les cellules individuelles sont mobiles, avec la présence de deux flagelles isoformes situées sur le côté antérieur (Figure I-6).

L'espèce est capable de se reproduire à la fois de façon asexuée et sexuée (Harris et al., 2009). Lorsque les ressources nutritionnelles et de lumière ne sont pas limitées, *Chlamydomonas* se multiplie asexuellement par simple division mitotique (Salomé & Merchant, 2019). La reproduction sexuée se produit par isogamie entre les cellules, mais elle est rarement observée en dehors de conditions de stress telles que la limitation en azote (Gallaher et al., 2015) (Figure I-7). Les cellules alternent entre une phase haploïde planctonique motile (flagellée) où les cellules augmentent en taille et une phase de division mitotique où les cellules mères perdent leurs flagelles et se divisent pour produire des tétrades de zoospores. Le temps de génération peut varier entre 8 et 16 heures en fonction des conditions de croissance.

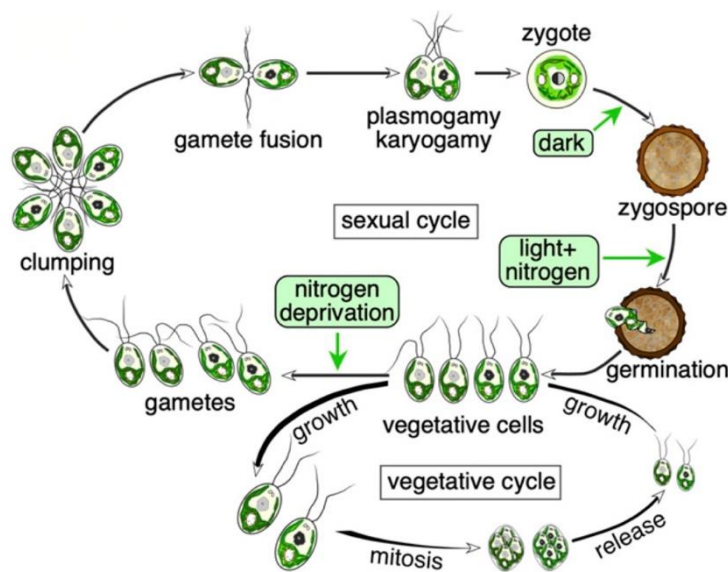


Figure I-7. Les cycles de reproduction sexuée et végétatif (asexuée) de *C. reinhardtii*. Tiré de Salomé & Merchant, 2019.

C. reinhardtii est un organisme modèle pratique pour étudier divers processus physiologiques et métaboliques, y compris la biogenèse des plastides, la photosynthèse, les réponses au stress et les mécanismes de régulation cellulaire (Harris, 2001). À ce jour, un génome séquencé, des protocoles de transcriptomique, de protéomique et de métabolomique sont disponibles pour *C. reinhardtii*, ce qui rend cette algue appropriée pour différentes analyses « omiques » (Aucoin et al., 2016; Rolland et al., 2009; Toepel

et al., 2011). Le séquençage récent de l'ensemble de son génome (Merchant et al., 2007), la disponibilité de nombreux outils moléculaires y compris la transformation des trois génomes (nucléaire, plastidial et mitochondrial), et l'existence d'un cycle sexuel permettant des études génétiques font de *C. reinhardtii* un modèle attractif pour les investigations moléculaires (Grossman et al., 2007).

Les voies métaboliques de base semblent être organisées de manière similaire chez les algues vertes, comme *C. reinhardtii*, et les plantes supérieures dont l'énergie est captée par la photosynthèse et le CO₂ est utilisé comme source de carbone leur permettant de se développer des conditions dites photoautotrophes, (chimio et photo) hétérotrophes et mixotrophes. De plus, la plupart des souches de *Chlamydomonas* de type sauvage peuvent s'acclimater efficacement à une anaérobiose (environnement sans oxygène) prolongée à la lumière et à l'obscurité (Antal, 2018).

Chlamydomonas sp. peut accumuler de grandes quantités de réserves en carbone intracellulaire sous la forme d'amidon ou de lipides lorsqu'elle est cultivée en présence d'une limitation nutritionnelle (Antal, 2018; Gifuni et al., 2017; Johnson and Alric, 2013; Siaux et al., 2011). Ces réserves carbonées sont les matières premières utilisées dans la production de biocarburants de 3^{ème} génération comme le biodiesel, le bioéthanol, le biométhane ou le biobutanol (Chisti, 2007; Ho et al., 2013; Markou et al., 2012; Siaux et al., 2011). Toute de même, le potentiel majeur de *C. reinhardtii* semble s'ouvrir pour sa capacité de produire du biohydrogène en conditions photoautotrophes. Elle possède l'une des enzymes de type hydrogénase les plus performantes parmi les micro-organismes photosynthétiques, et qui est exprimée en conditions anaérobies mais très sensiblement inhibée par la présence d'oxygène (Anwar et al., 2019; Eroglu & Melis, 2016; Khetkorn et al., 2017). La section 3 de ce chapitre décrit en détails les mécanismes de photo-production de bio-hydrogène par les microorganismes photosynthétique dont *C. reinhardtii*.

I.2.5 Métabolisme énergétique d'une microalgue unicellulaire eucaryote

L'énergie chimique en forme d'ATP chez les microalgues est obtenue par deux processus que sont la respiration et la photosynthèse. Ces deux mécanismes sont basés sur un transfert d'électrons via un ensemble de réactions d'oxydo-réduction entre un accepteur et un donneur d'électrons via une chaîne de transport d'électrons. La différence entre ces deux réactions provient de la source initiale des électrons alimentant la chaîne

réactionnelle : (i) la photosynthèse utilise l'énergie de la lumière et une molécule d'eau pour fournir les électrons à la chaîne photosynthétique, produisant de l'oxygène moléculaire (O₂) et de l'énergie sous forme d'ATP et pouvoir réducteur NADPH⁺, H⁺. (ii) dans le processus de respiration, l'énergie provient de l'oxydation de composés organiques pour former du CO₂ et de l'eau.

I.2.5.1 Photosynthèse

I.2.5.1.1 Vue globale de la photosynthèse

La photosynthèse est un processus qui consomme du CO₂ pour produire de composés organiques réduits et qui est catalysé par l'énergie convertie des photons récoltés. Les électrons nécessaires à la réduction du CO₂ proviennent de la photolyse des molécules d'eau, libérant ainsi de l'O₂ moléculaire [Équation (I.1)].

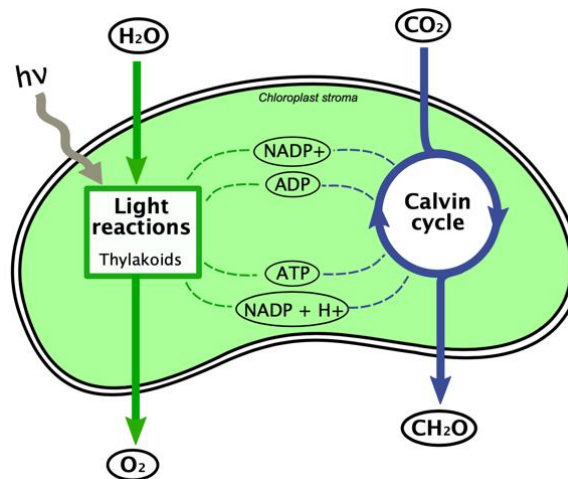
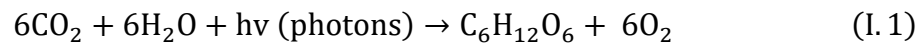


Figure I-8. Mécanisme global de la photosynthèse.

La photosynthèse a lieu dans un organe spécialisé appelé chloroplaste et peut se résumer en 3 étapes (Masojídek et al., 2013; Willey et al., 2019) : i) Capture de l'énergie lumineuse par les pigments photosynthétiques. (ii) Transformation de l'énergie capturée pour produire de l'énergie chimique sous la forme d'ATP et de pouvoir réducteur sous la forme de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH, H⁺), (iii) Utilisation de l'ATP et le NADPH, H⁺ produits pour fixer le dioxyde de carbone et produire des composés organiques. Les deux premières étapes ont lieu impérativement en présence de lumière, d'où l'appellation « réactions dépendante de la lumière ». La troisième étape représentant la formation des composés organiques via le cycle de Calvin-

Benson à partir du CO₂ se déroule de façon indépendante de la présence de lumière, raison pour laquelle cette étape est appelée la « phase obscure » ou « phase sombre » de la photosynthèse (Figure I-8).

I.2.5.1.2 Réactions biochimiques dépendantes de la lumière.

Tous les organismes photosynthétiques contiennent des pigments leur permettant d'absorber l'énergie de la lumière. Ces pigments photosynthétiques peuvent être divisés en trois catégories : les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobilines. Ces catégories de pigments ne possèdent le même spectre d'absorption de la lumière (Figure I-9). En effet, l'absorption de l'énergie lumineuse par les micro-organismes photosynthétique se fait dans la région appelée domaine de radiation photosynthétiquement active ou PAR (pour Photosynthetically Active Radiation), comprise entre 400-750 nm (Pilon & Kandilian, 2016).

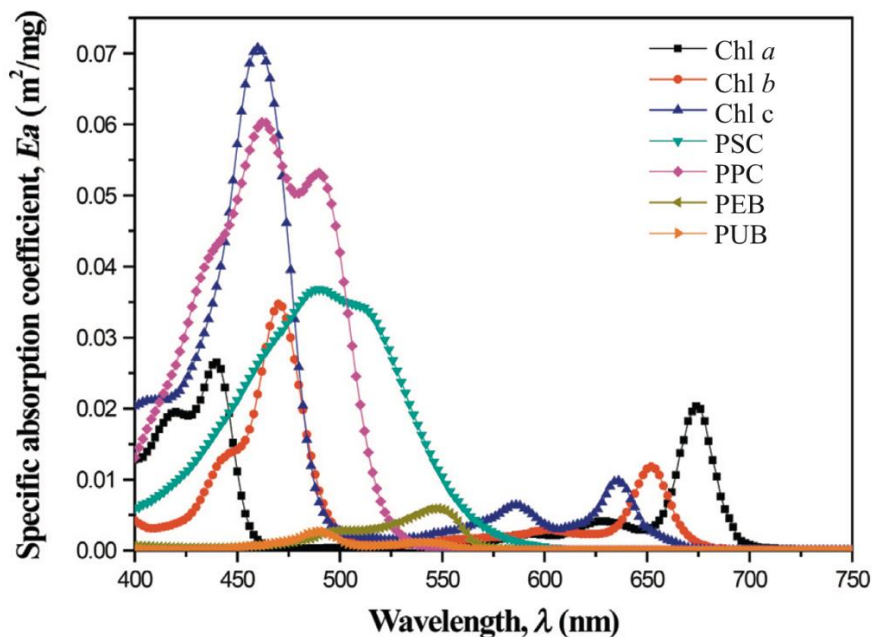


Figure I-9. Coefficient d'absorption spécifique E_a des Chlorophylles a, b, c, des caroténoïdes photosynthétiques (PSC) et photoprotecteurs (PPC), ainsi que de la phycoérythrobiline (PEB) et de la phycourobiline (PUB). Tiré de Pilon & Kandilian, 2016.

Le cœur des réactions photochimiques dépendantes de la lumière repose sur les unités photoréceptrices appelées photosystèmes. Ces photosystèmes sont responsables de la captation de l'énergie lumineuse et de sa conversion en énergie chimique. Un photosystème (Figure I-10) est constitué de deux parties : l'antenne collectrice formée

des pigments accessoires (caroténoïdes), et le centre réactionnel contenant les pigments actifs (chlorophylle *a*) (Crofts & Wraight, 1983) . Il existe deux types de photosystèmes qui fonctionnent en série : le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII), constitués des complexes P_{700} et P_{680} respectivement, dans leurs centres réactionnels. Ces photosystèmes sont associés à différents complexes moléculaires protéiques pour former la chaîne photosynthétique de transport d'électrons, intégrée dans la membrane des thylacoïdes (ensemble de membranes à l'intérieur des chloroplastes), délimitant le lumen (intérieur du thylacoïde) et le stroma du chloroplaste (extérieur du thylacoïde).

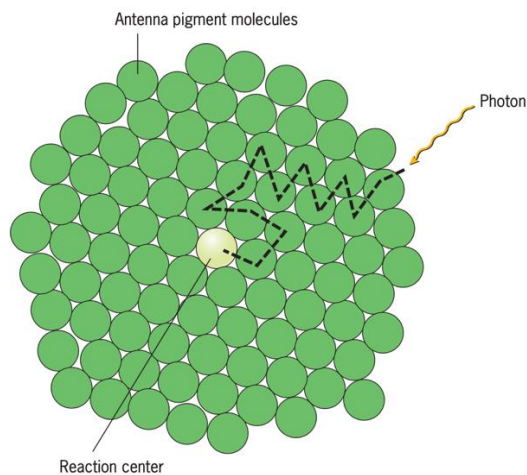


Figure I-10. Structure générale d'un photosystème et le parcours d'un photon vers le centre réactionnel.

Lorsque la lumière est absorbée par des molécules de chlorophylles du centre réactionnel dans un photosystème, les molécules de chlorophylle passent d'un potentiel de réduction standard très positif à un potentiel de réduction standard très négatif. En d'autres termes, l'absorption de la lumière fait que les molécules de chlorophylle (P_{680}) des centres réactionnels deviennent d'excellents donneurs d'électrons. L'ensemble du processus de transport d'électrons (Figure I-11) commence tout d'abord avec le complexe P_{680} du PSII, lorsqu'il absorbe la lumière, il passe à un état excité P_{680}^* et donne des électrons à une série de transporteurs d'électrons (plastoquinones (PQ), complexe cytochrome *bf* et la plastocyanine (PC), qui finissent par les donner au P_{700} du PSI. Le flux d'électrons au travers la chaîne de transport d'électrons associé au P_{680} génère un gradient de protons donnant lieu à une force motrice, qui peut être utilisé par l'ATP synthase pour fabriquer

de l'ATP à partir d'ADP et de Pi en transportant les protons du lumen des thylacoïdes vers le stroma (Figure I-11).

Entre-temps, le PSI absorbe également de la lumière et passe par un état excité P_{700}^* dans lequel ses chlorophylles fournissent les électrons à une petite chaîne de transporteur d'électrons (Ferredoxine, *Fd* et pyridine nucleotide réductase pour les plantes, ou Ferrédoxine-NAD⁺ reductase, FNR) qui transfère finalement les électrons au NADP⁺, produisant du NADPH, H⁺. Ainsi, lorsque les deux photosystèmes fonctionnent ensemble, l'ATP et le NADPH, H⁺ sont produits. Comme les électrons circulent de manière non-cyclique, on parle de flux d'électrons non-cyclique, et on dit que l'ATP produit est issu d'une photophosphorylation oxydative non-cyclique.

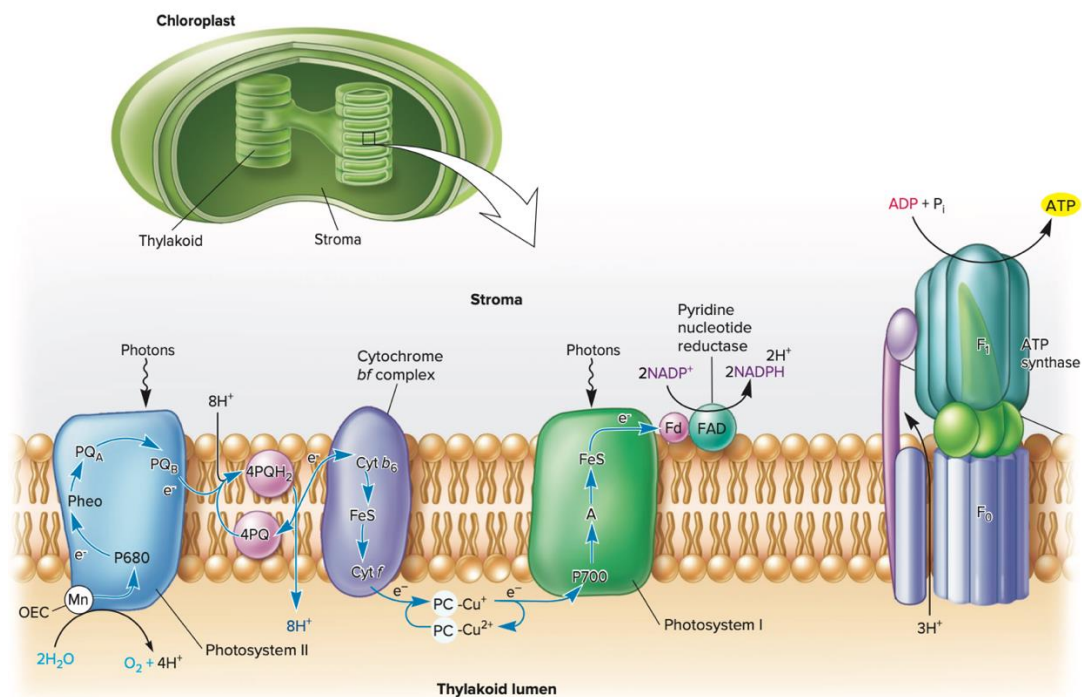


Figure I-11. Illustration de la membrane thylakoïde du chloroplaste montrant le fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons photosynthétique et la photophosphorylation non-cyclique. La chaîne est composée de trois complexes: le photosystème (PS) I, le complexe du cytochrome *bf* et le PS II. Deux transporteurs d'électrons diffusibles relient les trois complexes. La plastoquinone (PQ) relie le PSII au complexe du cytochrome *bf*, et la plastocyanine (PC) relie le complexe du cytochrome *bf* au PSI. Le flux d'électrons induit par la lumière pompe les protons à travers la membrane thylakoïde et génère un gradient de protons, qui peut ensuite être utilisé pour fabriquer de l'ATP via l'ATP synthase. L'eau est la source d'électrons et le complexe d'évolution de l'oxygène (OEC) produit de l'oxygène. Tiré de Willey et al., 2019.

À ce stade, la cellule a un problème. Lorsque le P_{700} du PSI a été oxydé, ses électrons ont été remplacés par des électrons provenant de l'oxydation de P_{680} du PSII. Mais, pour que le P_{680} continue à absorber de la lumière, ses électrons doivent être remplacés. Il s'avère que le potentiel de réduction standard du P_{680}^* est plus positif que celui de la paire redox conjuguée oxygène et eau. Cela signifie que l' H_2O peut être utilisé pour donner des électrons au P_{680}^* , ce qui entraîne la libération d'oxygène gazeux. Cette opération est réalisée par une enzyme contenant du manganèse (Mn^{2+}) dans son site active, appelée complexe d'évolution de l'oxygène (OEC) ou complexe de division de l'eau, qui est étroitement associée au PSII (Cady et al., 2008). En effet, lorsque le P_{680} du PSII absorbe la lumière, les atomes de $Mn^{2+(3+)}$ de l'OEC sont de plus en plus oxydés, ce qui leur permet d'extraire les électrons de l'eau et de les transmettre via une protéine du PSII au P_{680}^* . Usuellement, le transport d'électrons se représente via le schéma Z de la photosynthèse montrant les variations de potentiel redox, ou autrement dit, le contenu énergétique des électrons circulant de l'eau jusqu'au NADPH, H^+ (Figure I-12).

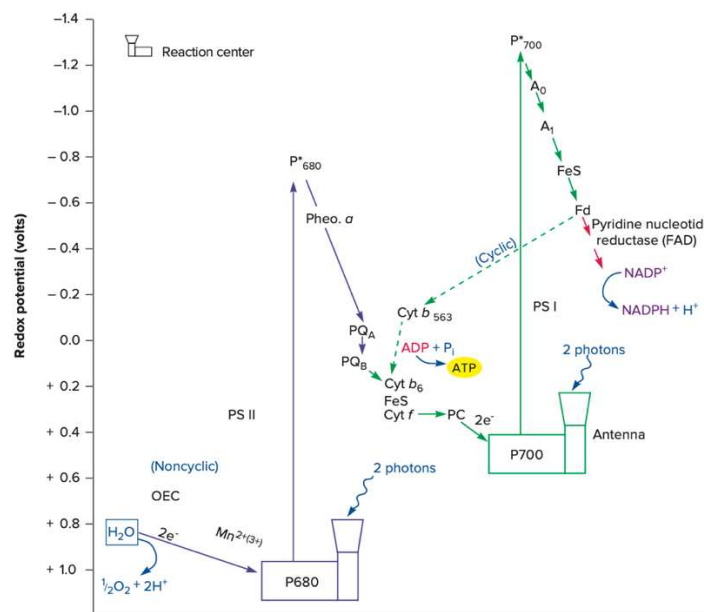


Figure I-12. Schéma en Z du transport des électrons lors de la photosynthèse. Tiré de Willey et al., 2019.

D'autre part, le PSI peut aussi fonctionner individuellement : lorsque les électrons sont donnés par le P_{700}^* à la chaîne de transport d'électrons associée au PSI, ils atteignent un point de branchement au niveau de la ferrédoxine (Fd) et les électrons circulants vont de la Fd vers le complexe cytochrome bf . De là, les électrons retournent à nouveau au P_{700}^* . Dans ce cas, les électrons ont été transportés de manière cyclique. Cela génère encore un

gradient de protons, qui peut être utilisé pour synthétiser de l'ATP, et c'est ce qu'on appelle la photophosphorylation cyclique. Il est important de noter également qu'étant donné que les électrons ont été détournés au niveau de la *Fd*, aucun électron n'était disponible pour réduire le NADP^+ en NADPH, H^+ . Ainsi, lorsque le photosystème I fonctionne cycliquement, seul l'ATP est mise à la disposition de la cellule. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, ce mécanisme fait intervenir une protéine spécifique nommée PGRL1 (Proton Gradient Regulation Like 1). En permettant de réguler la quantité d'électrons transmis à l'enzyme pyridine nucléotide réductase et ainsi la formation de NADPH, la voie cyclique permet de palier la sur-réduction du stroma (Figure I-12) (Munekage et al., 2004).

I.2.5.1.3 Réactions biochimiques indépendantes de la lumière

Chez les organismes autotrophes eucaryotes dont les microalgues, les réactions du cycle de Calvin-Benson se produisent dans le stroma du chloroplaste. Chez les cyanobactéries, et certaines bactéries fixant le CO_2 , le cycle a lieu à l'intérieur des micro-compartiments appelées carboxysomes. Ces structures polyédriques contiennent l'enzyme essentielle au cycle de Calvin-Benson nommée RuBisCO et constituent le site de fixation du CO_2 de ces derniers (Willey et al., 2019).

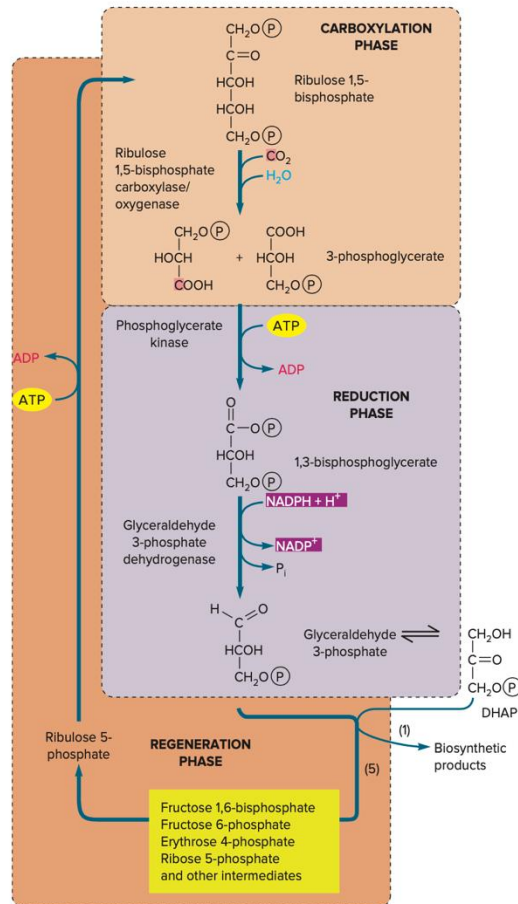


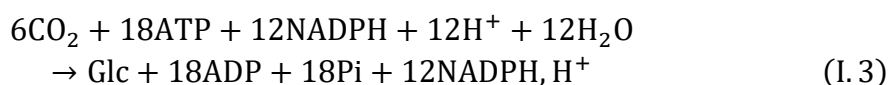
Figure I-13. Schéma général des étapes du cycle de Calvin-Benson permettant la fixation du dioxyde de carbone pour la biosynthèse de glucose ou fructose. Tiré de Willey et al., 2019.

Le cycle de Calvin-Benson est traditionnellement divisé en trois phases : (i) la phase de carboxylation, (ii) la phase de réduction et (iii) la phase de régénération (Figure I-13). Au cours de la phase de carboxylation, l'enzyme ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) catalyse l'addition de CO_2 à la molécule de 5 carbones ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP), formant un intermédiaire de 6 carbones qui se divise rapidement et spontanément en deux molécules de 3-phosphoglycerate (PGA). Ensuite, dans la phase de réduction du cycle de Calvin-Benson, le PGA est réduit en glycéraldéhyde 3-phosphate (GA3P) par deux réactions dépendant de l'ATP et du pouvoir réducteur NADPH. Enfin, dans la phase de régénération, le RuBP est reformé, de sorte que le cycle puisse se répéter. En effet, pour synthétiser le fructose 6-phosphate (F6P) ou le glucose 6-phosphate (Glc-6P), précurseur des monosaccharides essentiels glucose et fructose, à partir du CO_2 , le cycle doit fonctionner six fois afin de produire l'hexose

souhaité et reformer les six molécules de RuBP [Équation (I.2)]. D'ailleurs, quelques auteurs décrivent le cycle de Calvin-Benson comme constitué de 4 étapes en rajoutent une étape de production dont le Fru-6P et Glc-6P sont synthétisés (Masojídek et al., 2013).



Ainsi donc, l'incorporation d'une molécule de CO₂ dans la matière organique via le cycle de Calvin-Benson nécessite de trois ATP et de deux NADPH. La formation du glucose à partir du CO₂ peut donc être résumée par l'équation suivante :



Il est important à souligner que l'enzyme RuBisCO possède également une activité oxygénase, bien que son affinité pour le CO₂ soit beaucoup plus élevée. La fixation de l'O₂ est la première étape de la photorespiration, un processus qui entraîne une perte nette d'énergie. Elle pourrait jouer un rôle comme voie de dissipation de l'énergie dans les cas où l'O₂ est en excès (Wingler et al., 2000). De plus, en raison des faibles niveaux de CO₂ dans la nature, en particulier dans les environnements aquatiques, les microorganismes photosynthétiques ont développé plusieurs mécanismes afin de limiter la photorespiration en pompant et en concentrant activement le CO₂ près de l'enzyme RuBisCO (Badger et al., 1998). La photorespiration devient beaucoup moins problématique dans les environnements artificiellement riches en CO₂, comme ceux que l'on trouve couramment dans les systèmes de cultures appelés photobioréacteurs (PBR).

I.2.5.1.4 Biosynthèse de l'amidon.

L'amidon est un polymère de D-glucose de haut poids moléculaire lié par des liaisons α-1,4 glycosidiques, il est synthétisé et stocké temporairement dans les chloroplastes sous forme de granules insolubles (Figure I-14) (Masojídek et al., 2013). La matière première pour la biosynthèse de l'amidon est le glucose 1-phosphate obtenu du fructose 1,6-phosphate (Chen et al., 2013). La biosynthèse de l'amidon nécessite trois étapes: l'activation du glucose, l'allongement de la chaîne et la ramification de la chaîne (de Carvalho Silvello et al., 2022). Le mécanisme d'activation du glucose est le plus important, car il est converti en nucléoside-diphosphate-glucose (ADP-glucose), qui agit comme le donneur des groupes glycosyl responsable de l'allongement de la chaîne

d'amidon. L'enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase catalyse la formation d'ADP-glucose par condensation du glucose 1-phosphate avec l'ATP (Ran et al., 2019). Ensuite, l'enzyme amidon synthase transfère les résidus de glucose de l'ADP-glucose aux molécules d'amidon préexistantes (Chen et al., 2013). La synthèse d'ADP-glucose est l'étape limitante, affectant directement la formation d'amidon (de Carvalho Silvello et al., 2022). L'une des stratégies étudiées pour favoriser l'accumulation d'amidon chez les microalgues est la régulation de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (Choix et al., 2014). De même, les techniques de culture, le mode opératoire, les nutriments et les types de réacteurs peuvent jouer un rôle très important dans l'accumulation de glucides de réserves chez les microalgues (de Carvalho Silvello et al., 2022).

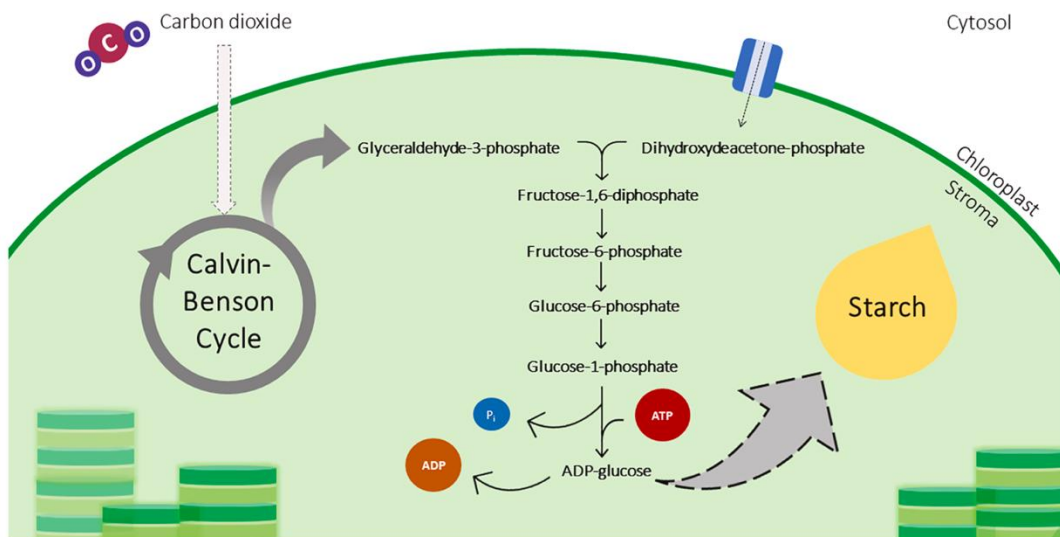


Figure I-14. Biosynthèse d'amidon chez les microalgues (de Carvalho Silvello et al., 2022).

I.2.5.2 Respiration

Le processus de respiration cellulaire permet à la cellule de générer de l'énergie sous la forme d'ATP par l'oxydation de la matière organique fourni dans le milieu de culture ou formée au niveau du cycle de Calvin-Benson (consommation des réserves intracellulaire tels que l'amidon). L'obtention d'ATP à partir d'un substrat organique, tel que le glucose, se déroule dans 3 étapes commençant dans le cytosol puis dans la mitochondrie (Figure I-15) (Willey et al., 2019) :

- La Glycolyse ou aussi connu sous le nom de voie d'Embden-Meyerhof : elle permet d'oxyder le glucose en pyruvate et d'obtenir 2 molécule d'ATP et 2

NADH, H⁺. La glycolyse a lieu dans le cytoplasme et leur produits sont dirigés vers la mitochondrie pour suivre les étapes suivantes.

- Cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques : tout d’abord le pyruvate est oxydé par une enzyme deshydrogénase en Acetyl-CoA, produisant du pouvoir réducteur NADH, H⁺. L’acetyl-CoA peut ainsi entrer officiellement dans le Cycle de Krebs, au cours duquel elle va être dégradée en deux molécules de CO₂ et va produire du pouvoir réducteur en forme de NADH, H⁺ et FADH₂.
- Phosphorylation oxydative: Comme pour la photophosphorylation oxydative lors de la photosynthèse, dans la membrane mitochondriale une série de complexes protéiques et de transporteur d’électrons constituent la chaîne de transport d’électrons (CTE). Les donneurs initiaux d’électrons NADH et FADH₂ obtenus dans les 2 étapes précédentes vont céder des électrons à la CTE jusqu’à une molécule d’O₂ pour former de l’H₂O. Les passages des électrons dans les complexes de la CTE laissent passer des protons de la matrice mitochondriale vers l’espace intermembranaire, en générant un gradient exerçant une force motrice permettant la formation d’ATP. Notons donc que la respiration proprement dite correspond au processus de phosphorylation oxydative.

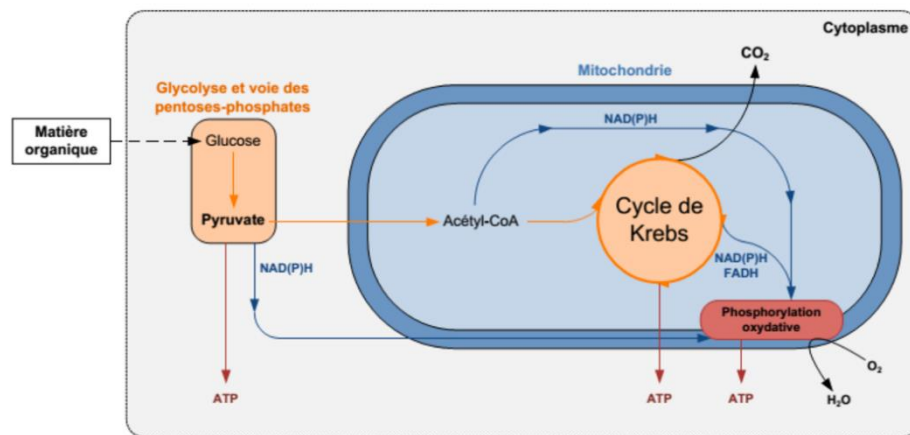


Figure I-15. Étapes constituant la respiration cellulaire. Tiré de Lemasson, 2015.

I.2.6 Étude de la culture de microalgues en photobioréacteur

I.2.6.1 Systèmes de culture

Les unités utilisées pour la culture de microalgues, connues sous le nom de photobioréacteurs (PBR), sont classifiées en systèmes ouverts et fermés (ou clos) (Borowitzka & Vonshak, 2017; Verdelho Vieira et al., 2022). Les premiers sont des systèmes en forme de bassins exposés à l'environnement et à la lumière du soleil, leur permettant d'utiliser des ressources naturelles peu coûteuses (Figure I-16A). Ils peuvent être de simples lagunes ou des bassins agités par roue à aube et présentant une chicane centrale, appelés sous le nom de « raceways » (Zuccaro et al., 2020). Les productivités en biomasse sont très faibles dans ce type de systèmes, principalement en raison d'un accès à la lumière réduit (forte épaisseur de culture). D'autres inconvénients peuvent également limiter les performances des « raceways » tels que le manque de contrôle avancé des conditions de culture et les éventuels contaminations (Brennan & Owende, 2010). Les deuxièmes sont des systèmes clos pouvant présenter différentes caractéristiques distinctives, telles que : (i) le volume effectif de culture (ii) la géométrie du système et (iii) le type de lumière utilisée, qu'elle soit artificielle ou solaire. Deux prérequis sont usuellement demandés aux PBRs en fonction de leur application et leur objectif de production, en premier lieu qu'ils permettent de contrôler efficacement les conditions opératoires (pH, température, lumière, apport en nutriments, etc) mais aussi qu'ils soient économiquement viables, pratique à utiliser et, selon les applications ciblées, qu'ils soient faciles à augmenter en échelle. Les systèmes clos les plus utilisés et étudiés sont les PBRs tubulaires, à colonne et plan.

I.2.6.1.1 PBR Tubulaire

Les PBRs tubulaires sont principalement utilisés pour la culture de microalgues à grande échelle et en extérieur. Ils sont généralement fabriqués en verre ou en plastique, composés de plusieurs unités assemblées, ce qui les rend modulables (Figure I-16B). Ils peuvent être disposés dans plusieurs orientations, par exemple, de façon horizontale, inclinée, verticale ou hélicoïdale, afin de maximiser la captation de la lumière solaire. La circulation de la culture à l'intérieur du réacteur peut se faire par pompage ou bien, par injection d'un mélange gazeux de type air-CO₂ selon le principe d'un air-lift. Les tubes qui les composent ont généralement un diamètre compris entre 10 et 60 mm, et une longueur qui peut atteindre 100 m. Un petit diamètre de 10 mm est privilégié lorsque

l'objectif est d'intensifier la production de biomasse (Posten, 2009). Le PBR tubulaire peuvent présenter plusieurs inconvénients tels que la limitation de l'efficacité photosynthétique à cause de l'accumulation d'O₂, un accès difficile à la lumière au centre des tubes, des limitations dans le transfert gaz/liquide et la formation de biofilms (Zuccaro et al., 2020). Toute de même, la productivité de ce type de PBR s'est avérée d'environ 2-3 fois plus élevée que celle des « raceways » (Zittelli et al., 2013).

I.2.6.1.2 PBR à Colonne à bulles

Les PBRs à colonne à bulles sont de simples systèmes cylindriques verticales dont le rayon ne doit pas dépasser 0,2 m, et la hauteur est d'environ 2,5 à 4 m pour éviter les problèmes liés à la faible disponibilité de la lumière au centre du PBR et à la faible résistance des matériaux souvent utilisés pour leur conception (Figure I-16C). L'agitation de la culture est réalisée par injection d'un mélange d'air et de CO₂ comprimé en bas de colonne. Ce type de PBR présente de faibles forces de cisaillement, un transfert gaz/liquide élevé, et par conséquent une grande efficacité d'utilisation du CO₂ (Zuccaro et al., 2020). Cependant, des problèmes liés à la sédimentation et à l'accès à la lumière au centre du tube peuvent affecter les productivités obtenues dans ce type de système. En effet, les productivités obtenues peuvent être généralement inférieures à celles des PBR tubulaires (Brennan & Owende, 2010; Zittelli et al., 2013).

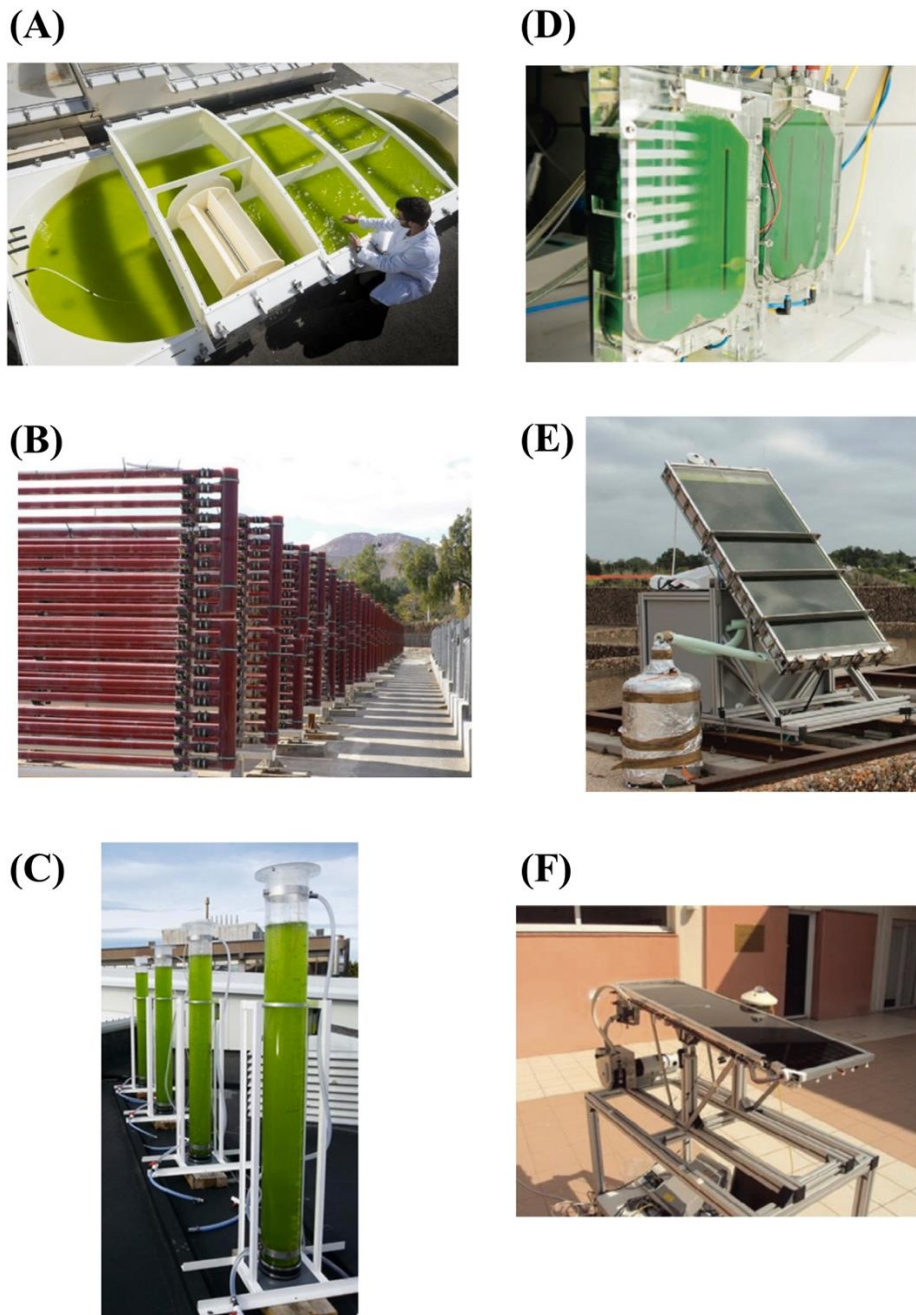


Figure I-16. Systèmes de culture de microalgues. (A) système ouvert raceways, (B) PBR tubulaire (Borowitzka & Moheimani, 2013), (C) PBR à colonne (Plouviez et al., 2017), (D) PBR plan à échelle laboratoire de type Air-lift, (E) PBR plan rectangulaire à échelle pilote de type Air-lift, (F) PBR plan à haute productivité, Algofilm (Legrand, 2016).

I.2.6.1.3 PRB plan

Les PBRs plans sont souvent utilisés pour cultiver des micro-organismes photosynthétiques à l'échelle laboratoire (Figure I-16D à Figure I-16E), mais aussi à l'échelle pilote ou semi-industrielle. Ils ont, dans la plupart des cas, une forme

rectangulaire et ils sont fabriqués en verre, polycarbonate ou autres matériaux transparents dont l'épaisseur est variable, pouvant aller de quelques centimètres à atteindre les quelques millimètres (PBR à haute productivité). Ils peuvent être orientables et/ou inclinés en fonction de l'intensité ou de la direction de la source lumineuse, qui peut être artificielle ou naturelle. Ce type de réacteur présente de nombreux avantages : un rapport élevé entre la surface spécifique éclairée et le volume du PBR, de faibles forces mécaniques sur les cellules lors du mélange, des coefficients de transfert gaz-liquide élevé (systèmes air-lift uniquement), et un bon mélange assuré par le bullage d'air ou l'agitation mécanique. Il est aussi possible d'implémenter une régulation de la température et du pH : la première via un échangeur thermique (système à double enveloppe) ou par refroidissement par évaporation, et la deuxième par injection de CO₂ ou d'un acide/base. Les PBRs plans de type air-lift présentent également une accumulation de l'oxygène dissous moindre et une efficacité photosynthétique élevée par rapport aux PBRs tubulaires. Du fait que les PBRs plans peuvent maximiser l'absorption de la lumière, ils peuvent également atteindre des productivités en biomasse bien supérieures en comparaison aux systèmes de culture décrits précédemment (Pruvost et al., 2017).

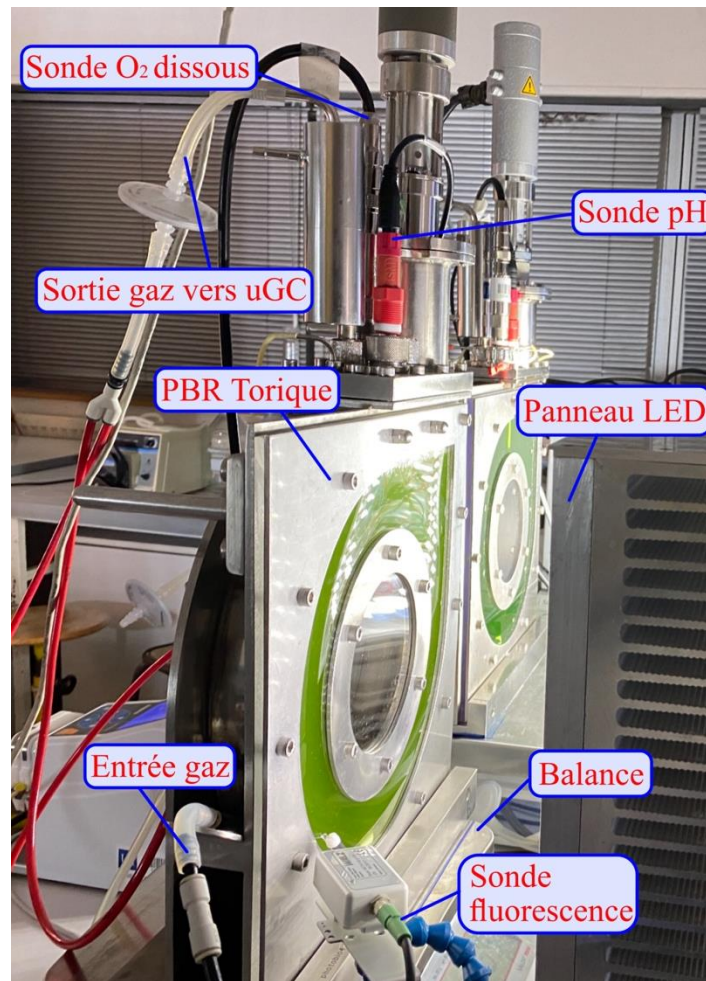


Figure I-17. Photobioréacteurs toriques opérant en conditions contrôlées. Les PBRs disposent d'une régulation de l'oxygène dissous, du pH, du niveau et il est adapté pour la mesure des gaz en sortie via une micro-chromatographie gazeuse (μ GC).

A l'échelle laboratoire, un PBR plan de géométrie torique a été largement utilisé au laboratoire GEPEA pour des études approfondies de la réponse biologique face à diverses conditions de cultures. Ce réacteur est fabriqué en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) ou en acier inoxydable, possède un volume utile de 1,5 L, et est équipé d'un système d'agitation mécanique utilisant des hélices marines. Les PBR toriques peuvent être facilement couplés à un analyseur de gaz, ce qui permet de réaliser des bilans gazeux (Degrenne et al., 2010 ; Fouchard et al., 2008 ; Urbain, 2017), et leur géométrie permet un mélange et une homogénéisation efficaces du milieu de culture avec une faible contrainte de cisaillement (Pruvost et al., 2006). De plus, étant un réacteur plan, il est possible de caractériser le transfert radiatif en tenant compte uniquement de l'atténuation de la lumière en une dimension. Enfin, les PBR toriques peuvent être instrumentalisés dans le but de mener des cultures avec un suivi avancé de l'état physiologique de la culture

(Figure I-17). En effet, plusieurs capteurs telles qu'une sonde pH et température, une sonde oxygène dissous, une sonde optique pour la mesure du carbone inorganique, une sonde pour mesurer la fluorescence de la chlorophylle *a* et des débitmètres à l'entrée du PBR pour la mesure des débits gazeux d'aération (Pruvost et al., 2006, 2011, 2017) peuvent être installés sur ce système de culture. Un panneau de LEDs est en général utilisé comme source d'éclairage pour ce réacteur, qui présente une surface illuminée de 0,0325 m². Ainsi, les PBR toriques ont été utilisés dans le cadre de multiples thématiques de recherche fondamentales, telles que la modélisation cinétique et le contrôle des conditions de cultures, l'optimisation de production de biomasse, la conversion photosynthétique ainsi que la production de biohydrogène (Degrenne et al., 2010; Fouchard et al., 2008; Ifrim et al., 2014; Kazbar et al., 2019; Takache et al., 2012; Titica et al., 2018; Urbain, 2017).

I.2.6.2 Mode de conduite des photobioréacteurs

De façon générale, la culture de micro-organismes en PBR peut se réaliser avec différents modes de fonctionnement ou mode de conduite, indépendamment du système utilisé. La caractéristique supplémentaire à tenir en compte pour la culture de microalgues par rapport aux cultures d'autres microorganismes comme les bactéries ou les levures, est l'apport en lumière. Dans les systèmes à éclairage artificielle la lumière peut être fournie en continu ou par cycles jour/nuit. Les paramètres de fonctionnement classiques d'une installation expérimentale à l'échelle du laboratoire sont présentés ci-dessous (Figure

I-18). De même, les modes de conduites seront définis en fonction de l'apport en milieu (de culture) liquide, puisque l'aération des PBRs se fait de façon continue dans la plupart des technologies évoquées jusqu'à présent.

I.2.6.2.1 Mode batch ou discontinu

Dans ce mode de fonctionnement le milieu de culture est fourni uniquement au début de la culture et il est ensuite inoculé avec un volume d'une suspension de cellules de concentration connue (Figure I-18A). Les cellules vont se développer jusqu'à que la lumière soit limitante ou l'un des autres éléments nutritionnels dans le milieu de culture soit épuisé, dans ce cas de figure, la culture se dit en conditions de carence nutritionnelle. En effet, le mode de culture en batch s'agit d'un système fermé, c'est-à-dire, sans entrée ni sortie de masse au regard de la phase liquide. Ce mode de conduite est souvent utilisé

pour l'étude en conditions dynamiques de la production de biomasse. Lors de la fin d'une culture en batch, la biomasse est récoltée, normalement en phase stationnaire. Il est donc possible de parler de batch séquencés lorsqu'un volume de culture d'un lot est réutilisé pour démarrer une nouvelle culture en discontinu, répétant ce cycle plusieurs fois (3-10 fois).

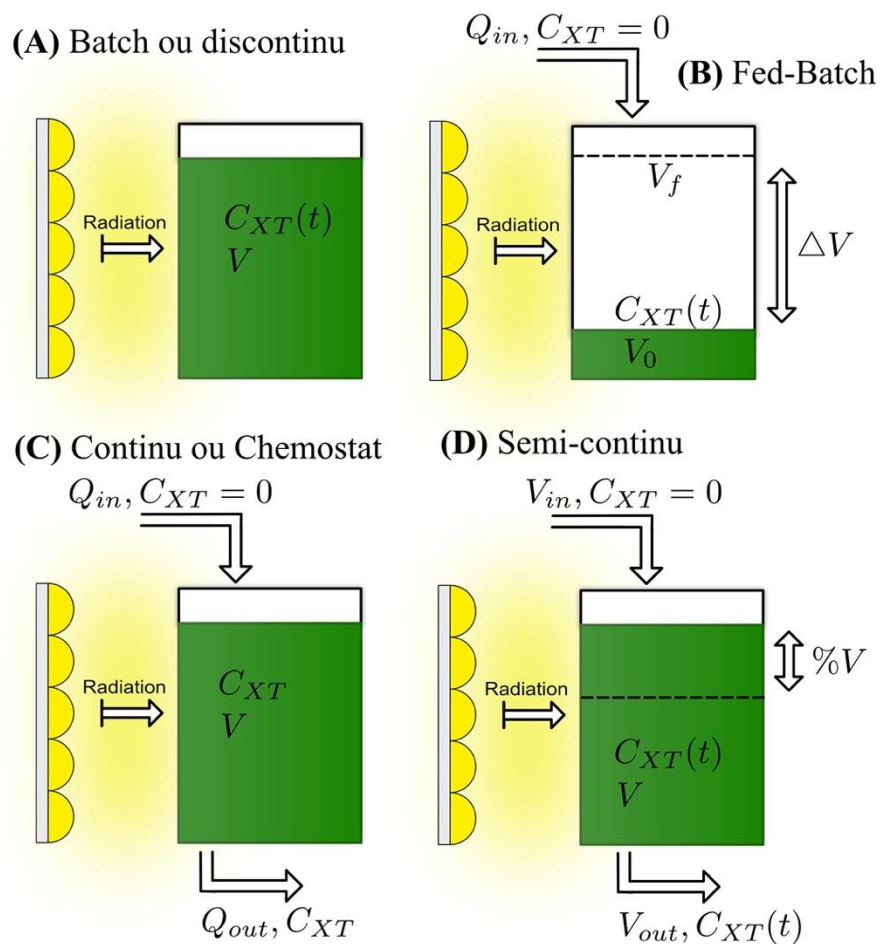


Figure I-18. Mode de conduite des photobioréacteurs. Les variables Q, V et C_{XT} représentent respectivement le débit, le volume du réacteur et la concentration en biomasse à différents instants. (A) mode de conduite en batch ou en discontinu, (B) mode de conduite fed-batch, (C) Mode de conduite en continu, (D) mode de conduit semi-continu.

I.2.6.2.2 Mode fed-Batch

Une culture en mode Fed-Batch se caractérise par l'ajout de milieu de culture jusqu'à atteindre un volume final de travail dans le réacteur (Figure I-18B). Dans un premier temps, le réacteur est rempli avec un volume opérationnel nettement inférieur au volume final de travail et puis alimentée progressivement en milieu jusqu'à avoir le volume

souhaité. De cette manière, le volume de culture varie dans le temps et le système permet juste une entrée de matière sans sortie. Ce mode de conduite permet de surveiller la croissance et d'optimiser la productivité dans les cas où une inhibition par les substrats est possible.

I.2.6.2.3 Mode semi-continu ou séquentiel

Lorsqu'on travaille en mode dit semi-continu, initialement le réacteur est rempli de milieu de culture et de l'inoculum. Ensuite, un volume de la culture est récolté ponctuellement dans le temps et remplacé par du milieu frais (Figure I-18D). Usuellement, le pourcentage de volume de culture récolté peut varier selon les applications mais peut varier généralement entre 10 % et 50 %. Ainsi, une entrée et une sortie ponctuelles sont effectuées dans le réacteur, mais elle n'est pas continue dans le temps.

I.2.6.2.4 Mode continu

Le mode de conduite en continu, aussi connu sous le nom de « chemostat », consiste à alimenter en milieu frais et à récolter la culture avec un débit d'entrée et de sortie fixe, afin de maintenir ainsi un volume de culture constant dans le temps, et donc un système sans accumulation de masse (Figure I-18C). Le milieu de culture peut être non-limitant (composés en excès) ou limité (présence d'un composé ou plusieurs en quantités réduites vis-à-vis les besoins nutritionnels) par un composé nutritionnel comme l'azote, le soufre, le phosphore ou autre. Le critère opérationnel est le taux de dilution (D) ou le temps de séjour ($\tau = 1/D$). Les cellules sont censées atteindre un état stabilisé où l'ensemble de variables d'état deviennent indépendantes du temps. Ce mode est particulièrement bien adapté à une analyse approfondie de la réponse biologique à des conditions contrôlées opératoires spécifiques. En effet, comparé à d'autres mode de conduites, comme le cultures en batch, le mode de fonctionnement en continu ou en semi-continu peuvent donner lieu à des procédés stables et robustes avec des productivités plus élevées (Benvenuti, 2016). Une variante du mode de culture en continu est le mode connu comme « turbidostat », où la biomasse est le paramètre maintenu constant par une boucle de contrôle fermée (par rétroaction) entre la mesure de la biomasse et l'alimentation en milieu frais.

I.2.6.3 Paramètres influençant la culture en photobioréacteur.

A part la lumière, la température, le pH, l'oxygène dissous, l'apport en carbone et en nutriments minéraux, sont les principales variables susceptibles de limiter la croissance photosynthétique et donc de réduire la productivité des systèmes de cultures se déroulant en conditions axéniques. Ces paramètres peuvent être contrôlés et fixés à des valeurs optimales ou quasi optimales grâce à des procédures d'ingénierie et d'exploitation appropriées.

I.2.6.3.1 Température

La température est un paramètre important pour la culture de n'importe quel micro-organisme. Dans les cas de la culture de microalgues, une température non-optimale peut conduire à des pertes de productivité et à la mort cellulaire en raison de l'impact de cette dernière sur 3 aspects physiologiques différents (Serra-Maia et al., 2016):

1. Le transfert et solubilité du CO₂ et O₂ dans le milieu de culture affectant l'équilibre et la cinétique des réactions biologiques (Renaud et al., 2002).
2. Une température élevée induit une dégradation des protéines pouvant conduire à la mort cellulaire.
3. L'augmentation du stress oxydatif par la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) provoquant des dommages progressifs pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire (Das & Roychoudhury, 2014).

De façon générale et jusqu'à une limite où se trouve la plage optimale, plus la température est élevée, plus le taux de croissance (μ) est important. En effet, la température optimale des microalgues va dépendre essentiellement de l'espèce et se trouve usuellement entre 18 et 35°C (Bernard & Rémond, 2012; Debnath et al., 2021; Ras et al., 2013). La souche sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii* est une microalgue mésophile et sa plage optimale de température optimale est aux alentours de 20 et 25 °C mais elle peut se développer sans nuisance significatives jusqu'à des température de 32 à 34 °C (Harris et al., 2009).

I.2.6.3.2 pH et apport en carbone

La culture de microalgues devrait idéalement se faire en conditions photoautotrophes, c'est-à-dire en utilisant le carbone inorganique (CO₂ dissous) comme source unique de carbone. De ce fait, l'apport en carbone dissous va dépendre du coefficient de transfert

gaz-liquide dans le PBR. Il est important à noter que le carbone inorganique dissous peut se trouver sous 3 formes, à savoir, CO_2 , HCO_3^- et CO_3^{2-} selon le pH du milieu de culture (Figure I-19).

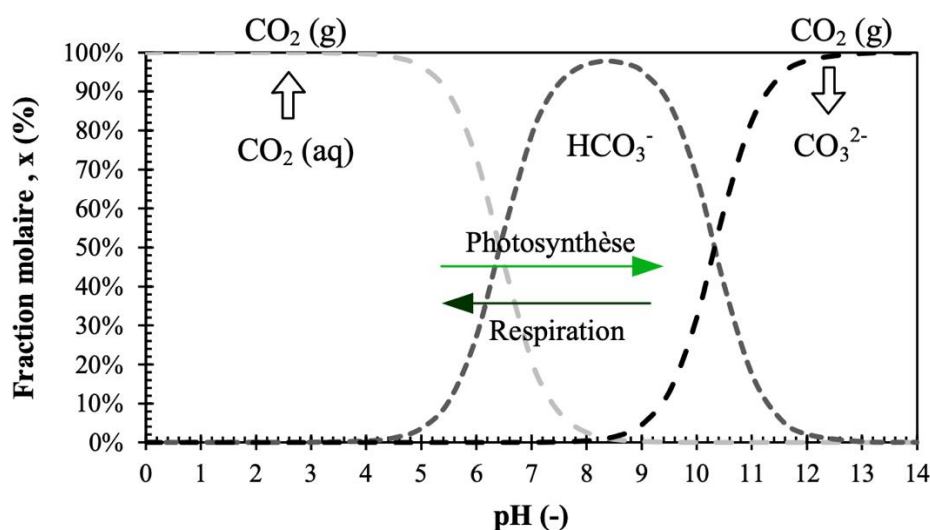


Figure I-19. Espèces de carbone dissous en fonction du pH à 25°C. Tiré de Artu, 2016.

Lors de la croissance photosynthétique le milieu de culture devient basique, le carbone se trouve sous la forme de carbonate et il y a peu de désorption (Le Gouic, 2013). En conséquence, une régulation du pH est nécessaire afin d'éviter toute limitation carbonée, en apportant du carbone inorganique assimilable pour les microalgues sous la forme de dioxyde de carbone et bicarbonate $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. Le bicarbonate assimilé entraîne la libération d'ions hydroxydes selon la réaction : $\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{OH}^-$, provoquant une augmentation du pH (Legrand, 2016). Dans la plupart de cas, le barbotage de CO_2 entraînant l'acidification ainsi que l'alimentation en carbone du milieu, est suffisant pour assurer cette régulation.

Pour tout type de milieu, mais surtout pour les milieux hautement concentrés en sels, comme c'est le cas pour ceux qui sont basés sur de l'eau de mer, la régulation du pH peut être critique car un pH élevé favorise la précipitation des ions calcium, magnésium, phosphates ou la formation des cristaux de ces sels.

I.2.6.3.3 Oxygène dissous

La croissance photosynthétique des microalgues libère de l'oxygène (O_2) pur dans le milieu de culture. Selon la géométrie du système de culture utilisé, l'accumulation de l' O_2 dissous peut être très élevée (Weissman et al., 1988). Les réacteurs clos ont une

prédisposition à accumuler plus d'oxygène dissous du fait de leur confinement. Il a été démontré que cette augmentation de l'O₂ dissous entraîne une perte de productivité chez les microalgues. En effet, une concentration supérieure à 31 mg/L présente un effet négatif sur la croissance de la microalgue *C. vulgaris* (Kazbar et al., 2019). Cependant, il semblerait que des pertes de productivité sont observées dès 10 mg/L, pouvant atteindre jusqu'à des pertes de 50% pour des valeurs d'O₂ dissous supérieures à 20 mg/L (Todisco, 2019). L'impact défavorable constaté de l'O₂ dissous sur la culture de microalgues a été expliqué par le changement du ratio CO₂/O₂. En effet, une diminution de ce ratio augmente l'affinité de l'enzyme RuBisCO par l'O₂, promouvant les phénomènes de photorespiration et l'activité respiratoire (Kazbar et al., 2019; Kliphuis et al., 2011; Raso et al., 2012; Sousa et al., 2013). Il est donc nécessaire d'implémenter une régulation de l'O₂ dissous afin de diminuer sa concentration dans la culture dans des systèmes tels que les PBR toriques. Pour ce faire, il est possible d'améliorer le transfert gaz/liquide en augmentant l'aération de la culture à l'aide par exemple d'un bullage à l'azote. Cependant, une aération trop importante va également affecter le transfert de CO₂ et donc le contrôle du pH. Une régulation combinée du pH et de l'oxygène dissous doit donc être implémentée en PBR fermé pour le contrôle dynamique des gaz au sein de la culture (Titica et al., 2018).

I.3 Interaction entre les microorganismes photosynthétiques et la lumière à l'échelle du photobioréacteur

I.3.1 Introduction

La lumière est formée d'un ensemble d'ondes électromagnétiques qui peuvent être classées selon un spectre dépendant de la longueur d'onde. Comme expliqué précédemment, les microalgues peuvent absorber uniquement la lumière dans le spectre visible, grâce aux pigments dont elle dispose dans les chloroplastes, et plus précisément dans la région dénommée PAR (par Photosynthetically Active Radiation) comprise entre 400-750 nm. Pour la représentation de l'énergie lumineuse, on parle souvent d'un flux photonique (quantité de photons) donnée par unité de surface et de temps, qui peut s'écrire de façon spectrale ou bien moyennée dans la région du PAR (Pruvost & Cornet, 2012). Pour la culture de microalgues, l'intensité d'énergie lumineuse apportée à la surface d'un photobioréacteur est définie comme le flux de lumière incident (PFD, par photon flux density) q_0 , exprimé en $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Le PFD est associé à une direction, notamment dans le cas des cultures en conditions solaires puisque la source d'énergie

lumineuse change de position au long d'une journée (Pruvost et al., 2011). Pour les cultures éclairées avec la lumière artificielle, la source d'énergie lumineuse est contrôlée et provient souvent d'un panneau LED émettant de la lumière blanche collimatée. D'autre part, la quantité d'énergie lumineuse arrivant aux cellules localement au long de l'épaisseur « z » du PBR pour réaliser la photosynthèse est appelée irradiance $G_\lambda(z)$ et elle est donnée en $\mu\text{mol}_{\text{hv}}/\text{m}^2\text{s}$. De façon similaire, la vitesse à laquelle la lumière est absorbée par la suspension de microalgues dans le PBR est nommée $\mathcal{A}_\lambda(z)$ et elle est souvent donnée en $\mu\text{mol}_{\text{hv}}/\text{g}_x/\text{s}$ ou $\text{mol}_{\text{hv}}/\text{kg}_x/\text{h}$. Ces grandeurs sont importantes pour décrire le transfert radiatif ayant lieu au sein du volume de culture.

I.3.2 Propriétés radiatives d'une culture de microalgues

La quantité d'énergie lumineuse absorbée et diffusée par une suspension de cellules de microalgues dépend de ses propriétés radiatives, à savoir, du coefficient d'absorption et de diffusion ainsi que de la fonction de phase. Les deux premières propriétés décrivent en fait la section transversale de lumière absorbée et diffusée par cellule (m^2) ou rapporté à la masse de cellules ($\text{m}^2/\text{kg}_{\text{XT}}$), et la troisième propriété correspond à la probabilité que la diffusion d'un photon se déplaçant dans la suspension de cellules se fasse dans une direction donnée. Les propriétés radiatives des microalgues sont données de façon spectrale mais peuvent aussi être moyennée dans la région du PAR.

Le transport des photons à l'intérieur d'une culture de microalgues, représenté par l'intensité de radiation spectrale I_λ au long de la direction \hat{s} , à la longueur d'onde λ et dans la position r de la culture, est gouverné par l'équation de transfert radiatif (RTE) en assumant que la suspension de cellules est homogène, absorbante, diffusante et non-émettrice de lumière (Figure I-20) (Pilon et al., 2011; Pilon & Kandilian, 2016):

$$\hat{s} \cdot \nabla I_\lambda(r, \hat{s}) = -k_\lambda I_\lambda(r, \hat{s}) - \sigma_{s,\lambda} I_\lambda(r, \hat{s}) + \frac{\sigma_{s,\lambda}}{4\pi} \int_{4\pi} I_\lambda(r, \hat{s}_i) \Phi_{T,\lambda}(\hat{s}_i, \hat{s}) d\Omega_i \quad (\text{I. 4})$$

Avec k_λ et $\sigma_{s,\lambda}$ les coefficients effectifs d'absorption et diffusion en m^{-1} , respectivement, et $\Phi_{T,\lambda}(\hat{s}_i, \hat{s})$ la fonction de phase de la suspension de cellules dans la position \hat{s}_i au long de la direction \hat{s} . Les deux premiers termes dans l'équation (I.4) correspondent à l'atténuation de l'intensité de radiation due à l'absorption par les cellules et la diffusion vers l'extérieur de la culture (out-scattering), tandis que le dernier terme représente

l'augmentation de la radiation due à la diffusion de la lumière par une cellule vers une autre dans la suspension (in-scattering) (Figure I-20).

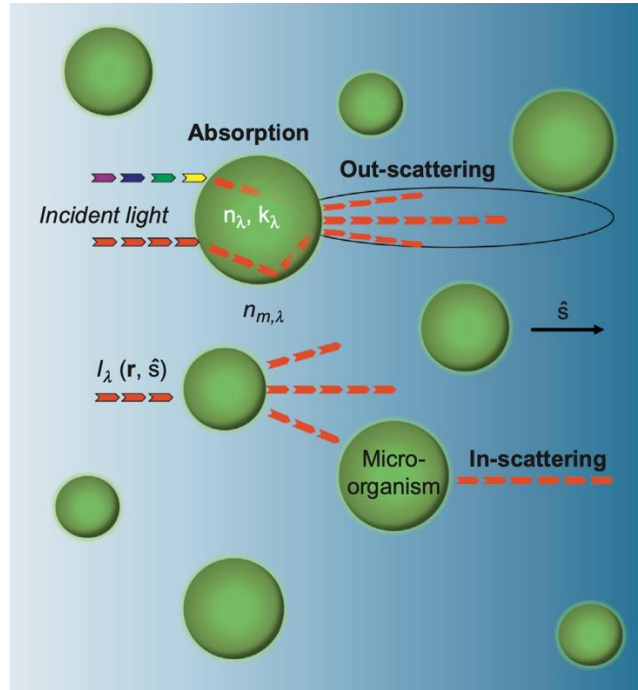


Figure I-20. Transfert de lumière locale dans une suspension de cellules de microalgues. Tiré de Pilon & Kandilian, 2016.

La fonction de phase $\Phi_{T,\lambda}$ est souvent utilisée pour calculer des termes plus simples décrivant la diffusion des photons vers l'avant et vers l'arrière d'une particule, en l'occurrence, d'une cellule de microalgues. Ces termes sont connus comme le facteur d'asymétrie g_λ et la fraction retro-diffusée b_λ . Le facteur d'asymétrie peut varier entre -1 et 1, correspondant aux cas limites où la diffusion totale de photons a lieu vers l'arrière ou vers l'avant des cellules, respectivement (Pilon et al., 2011):

$$g_\lambda = \frac{1}{2} \int_0^\pi \Phi_{T,\lambda}(\Theta) \cos\Theta \sin\Theta d\Theta \quad (\text{I.5})$$

Avec Θ l'angle de diffusion entre la direction \hat{s}_i et \hat{s} donnée en radians. De façon similaire, la fraction rétrodiffusée peut varier entre 0, 0.5 et 1 pour une diffusion de photons vers l'avant, isotropique ($\Phi_{T,\lambda} = 1, g_\lambda = 0$) et vers l'arrière, respectivement (Pottier et al., 2005):

$$b_\lambda = \frac{1}{2} \int_{\pi/2}^{\pi} \Phi_{T,\lambda}(\Theta) \sin\Theta d\Theta \quad (I.6)$$

Les microalgues diffusent la lumière presque dans sa totalité vers l'avant étant donné la différence de taille d'une cellule comparé à la longueur d'onde. Ainsi, généralement dans une suspension de microalgues, g_λ tend vers 1 et b_λ vers 0 (Pilon & Kandilian, 2016). Finalement, les coefficients d'absorption $\bar{C}_{abs,\lambda}$ et de diffusion $\bar{C}_{sca,\lambda}$ d'une suspension de microalgues donnés en m^{-1} peuvent s'écrire en fonction des coefficients effectifs spectrales k_λ et $\sigma_{s,\lambda}$ suivant (Pilon et al., 2011; Pilon & Kandilian, 2016) :

$$\bar{C}_{abs,\lambda} = \frac{k_\lambda}{N_T} \text{ et } \bar{C}_{sca,\lambda} = \frac{\sigma_{s,\lambda}}{N_T} \quad (I.7)$$

Avec N_T la densité cellulaire de la suspension donnée cellules/ m^3 . De façon alternative, ces deux coefficients peuvent être définis, à convenance, en fonction de la concentration en biomasse au lieu du nombre de cellules (J. F. Cornet et al., 1992; Kandilian, Pruvost, et al., 2014; Kandilian, Tsao, et al., 2014; Pilon & Kandilian, 2016; Takache et al., 2010, 2012). Dans ce cas, les coefficients d'absorption et de diffusion deviennent des coefficients massiques $\bar{A}_{abs,\lambda}$ et $\bar{S}_{sca,\lambda}$, respectivement, exprimés en m^2/kg_{XT} :

$$\bar{A}_{abs,\lambda} = \frac{k_\lambda}{C_{XT}} \text{ et } \bar{S}_{sca,\lambda} = \frac{\sigma_{s,\lambda}}{C_{XT}} \quad (I.8)$$

Il est important de noter que le coefficient d'absorption d'une suspension de microalgues varie selon l'état physiologique de la culture c'est-à-dire selon la concentration et distribution des pigments au sein des cellules. De la même manière, le coefficient de diffusion et la fonction de phase peuvent varier en fonction de la taille moyenne des cellules et de l'accumulation de réserves carbonées. Par conséquent, les propriétés radiatives doivent être déterminées pour chaque condition de culture à étudier.

Les propriétés radiatives d'une suspension de microalgues peuvent être calculées de façon expérimentale à partir de mesures de transmittances faites avec un spectrophotomètre avec sphère d'intégration et des données issus d'un néphélomètre (Figure I-21). De même, elles peuvent être calculées par des méthodes théoriques (Monte Carlo, T-matrix, Théorie de Mie-Lorenz, parmi d'autres). Les méthodes théoriques permettent de créer des bases de données de propriétés radiatives nécessaires pour le couplage de la vitesse d'absorption de la lumière par les cellules aux modèles de croissance. Les détails sur les

méthodes théoriques et expérimentales seront développés dans le chapitre 3 de cette thèse dans lequel une nouvelle méthode prédictive a été développée pour les cultures de *C. reinhardtii* menées en conditions de carence ou limitation azotée et accumulant de réserves carbonées sous la forme d'amidon et/ou lipides de réserves.

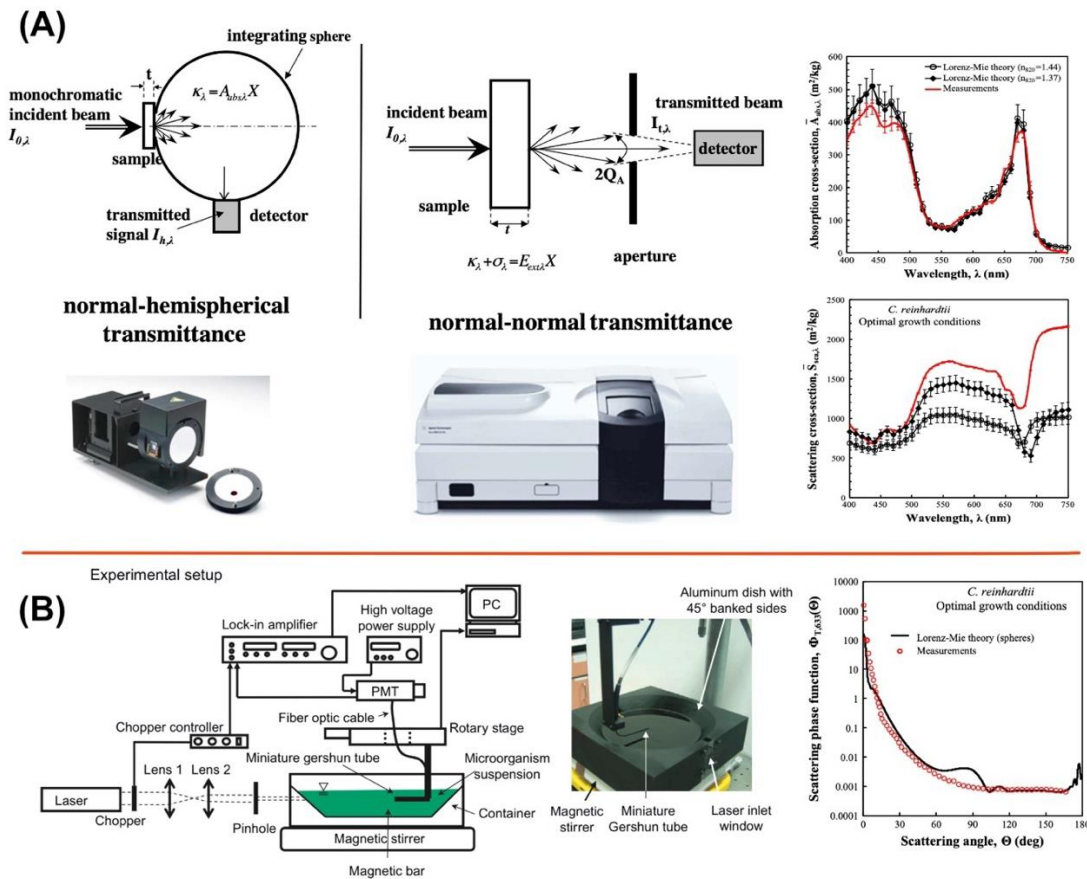


Figure I-21. Équipements nécessaires pour la mesure expérimentale des propriétés radiatives d'une culture de microalgues. (A) spectrophotomètre avec un module de sphère d'intégration pour le calcul expérimental des coefficient massique d'absorption et diffusion, (B) montage « maison » d'un néphélomètre pour la détermination de la fonction de phase, tiré de Pilon et al. (2011). Figures des propriétés radiatives tirées de Kandilian et al. (2016).

I.3.3 Transfert radiatif dans un photobioréacteur

La lumière est l'un des paramètres les plus importants dans la culture des microalgues. En effet, en fonction de la concentration cellulaire, les cellules individuelles sont exposées à des irradiances lumineuses différentes selon leur position dans le système de culture. Néanmoins, dans les systèmes parfaitement agités, les cellules subissent des cycles de lumière courts au cours desquels elles passent de zones très lumineuses à des zones presque sombres (Béchet et al., 2013). Pour tenir compte des gradients de lumière et

finalement maximiser la croissance de la biomasse de microalgues et la productivité des métabolites d'intérêt à partir des protocoles expérimentales ou des modèles cinétiques, tout en minimisant les coûts d'investissement et d'exploitation, l'intensité lumineuse doit également être optimisée (Bekirogullari et al., 2020). Pour ce faire, il est nécessaire de décrire le transport de lumière dans un photobioréacteur afin d'avoir accès au profil d'atténuation lumineuse.

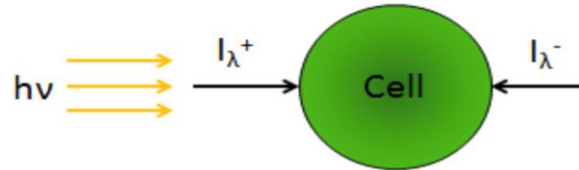


Figure I-22. Représentation graphique du modèle à deux flux. Tiré de Takache, 2010.

Le transport de lumière au sein d'un système de culture de microalgues va dépendre de l'orientation de la source de la lumière, la géométrie du photobioréacteur et la dynamique d'agitation des cellules. Une première approximation pour estimer le profil d'atténuation lumineuse est le modèle de Beer-Lambert qui tient en compte uniquement de l'intensité de la lumière incidente dans la culture et du coefficient d'absorption. Cependant, nous nous sommes intéressés au modèle à deux flux pouvant décrire localement l'irradiance dans le PBR et tenir en compte des coefficients d'absorption et diffusion de la culture de microalgues (Bekirogullari et al., 2020). De plus, ce modèle est bien adapté aux systèmes de culture plan puisqu'il ne prend en compte qu'une seule dimension dans le transfert de la lumière, qui se produit dans deux sens opposés (Figure I-22), ce qui simplifie la résolution de l'équation de transfert radiatif [équation (I.4)].

Le modèle d'atténuation lumineuse à deux flux $G_\lambda(z)$ exprimé en $\mu\text{mol}_{\text{hv}}/\text{m}^2\text{s}$ est donc défini en fonction de la profondeur dans le PBR z , du coefficient de réflectance du PBR ρ_λ , et le flux de lumière incident $q_{\lambda,0}$ comme suit (J. F. Cornet et al., 1992; E. Lee et al., 2014; Pottier et al., 2005) :

$$\frac{G_\lambda(z)}{q_0} = 2 \frac{[\rho_\lambda(1 + \alpha_\lambda)e^{-\delta_\lambda L} - (1 - \alpha_\lambda)e^{-\delta_\lambda L}]e^{\delta_\lambda z} + [(1 + \alpha_\lambda)e^{\delta_\lambda L} - \rho_\lambda(1 - \alpha_\lambda)e^{\delta_\lambda L}]e^{-\delta_\lambda z}}{(1 + \alpha_\lambda)^2 e^{\delta_\lambda L} - (1 - \alpha_\lambda)^2 e^{-\delta_\lambda L} - \rho_\lambda(1 - \alpha_\lambda^2)e^{\delta_\lambda L} + \rho_\lambda(1 - \alpha_\lambda^2)e^{-\delta_\lambda L}} \quad (\text{I.9})$$

Avec α_λ le module de diffusion linéaire compris entre 0 et 1 et δ_λ le coefficient d'extinction du modèle à deux flux. Ces deux termes sont dépendant des propriétés radiatives de la culture de microalgues :

$$\alpha_\lambda = \sqrt{\frac{\bar{A}_{abs,\lambda}}{\bar{A}_{abs,\lambda} + 2b_\lambda \bar{S}_{sca,\lambda}}} \quad \text{et} \quad \delta_\lambda = C_{XT} \sqrt{\bar{A}_{abs,\lambda}(\bar{A}_{abs,\lambda} + 2b_\lambda \bar{S}_{sca,\lambda})} \quad (\text{I. 10})$$

I.3.4 Vitesse spécifique d'absorption de photons

Si bien le modèle à deux flux est une bonne approximation permettant de connaître l'irradiance locale en fonction de la profondeur du PBR, il est également nécessaire de savoir la cinétique d'absorption de la lumière, c'est-à-dire, la vitesse à laquelle les photons sont absorbés par la culture de microalgues, puisque ce sont finalement les photons pouvant potentiellement participer à l'activité photosynthétique des cellules. Ainsi, une nouvelle grandeur est introduite appelée vitesse spécifique locale d'absorption de photons, abrégée LRPA (en anglais Local Rate of Photon Absorption) et notée $\mathcal{A}_\lambda(z)$, pour décrire la quantité de photons absorbés par unité de biomasse et de temps ($\text{mol}_{\text{hv}}/\text{kg}_{\text{XCh}}$) en fonction de la profondeur z dans le PBR. La valeur de $\mathcal{A}_\lambda(z)$ dépend ainsi du coefficient massique d'absorption et l'irradiance locale (J. F. Cornet et al., 1992):

$$\mathcal{A}_\lambda(z) = \bar{A}_{abs,\lambda} G_\lambda(z) \quad (\text{I. 11})$$

Puisque $\bar{A}_{abs,\lambda}$ peut varier selon la longueur d'onde, la valeur de $\mathcal{A}_\lambda(z)$ est souvent calculée moyennée dans le PAR :

$$\mathcal{A}_{PAR}(z) = \int_{400}^{700} \mathcal{A}_\lambda(z) d\lambda \quad (\text{I. 12})$$

De plus, si la valeur de $\mathcal{A}_\lambda(z)$ est également moyennée sur la profondeur du PBR, on parle de vitesse moyenne d'absorption de photons, abrégée MRPA (en anglais, Mean Rate of Photon Absorption) :

$$\langle \mathcal{A} \rangle_{PAR} = \frac{1}{L} \int_{400}^{700} \int_0^L \bar{A}_{abs,\lambda} G_\lambda(z) dz d\lambda \quad (\text{I. 13})$$

I.3.5 Régimes de lumière dans un photobioréacteur

La distribution de la lumière dans un photobioréacteur plan est considérée hétérogène dû aux phénomènes d'absorption et de diffusion des photons dans le volume de culture par les cellules de microalgues. En effet, pour une culture classique éclairée d'un seul côté, l'irradiance locale sera maximale au niveau de la surface éclairée et diminue avec la profondeur du PBR. Cette atténuation lumineuse décrite par le modèle à deux flux serait

plus prononcée avec l'augmentation de la densité cellulaire ou autrement dit, de la concentration en biomasse. Ainsi, il est possible de considérer que le système de culture est divisé en deux zones principales : une première zone que nous appellerons zone éclairée, où la lumière est disponible et donc l'activité photosynthétique est présente, et une deuxième zone que nous définirons comme une zone sombre, où la lumière disponible est suffisamment faible pour que l'activité respiratoire soit dominante. La frontière entre les deux zones correspond à la profondeur dans le PBR, $z(G_c)$, à laquelle l'irradiance de compensation, G_c , est atteinte. Notons ainsi qu'au-delà de l'irradiance de compensation l'activité photosynthétique devient prépondérante.

Il est donc possible d'introduire le terme fraction volumique éclairée $\gamma(-)$ pour décrire le profil de rayonnement dans un PBR (J. F. Cornet et al., 1992; J.-F. Cornet & Dussap, 2009; Takache et al., 2010) à partir de l'équation suivante:

$$\gamma(-) = \frac{V_{\text{éclairée}}}{V_{\text{PBR}}} = \frac{z(G_c)}{L} \quad (\text{I. 14})$$

avec $z(G_c)$ la profondeur où se trouve le point (irradiance) de compensation G_c et L la profondeur du PBR. Il est important de noter que la valeur de G_c varie selon la souche d'étude et dans le cas de *C. reinhardtii* elle a été estimée à $10 \mu\text{mol}_{\text{h}\nu}/\text{m}^2/\text{s}$ (Takache, 2010).

Lors de la définition de la fraction volumique éclairée, trois régimes de rayonnement ont été initialement proposés selon la valeur de $\gamma(-)$ (Figure I-23) (Pruvost & Cornet, 2012):

1. Régime cinétique ($\gamma > 1$): Ce régime a lieu dans les cultures diluées où un temps de séjour court est appliqué de manière que la concentration cellulaire reste faible dans le PBR. Par conséquent, une partie de la radiation incidente n'est pas absorbée par la culture et n'est pas utilisée pour la photosynthèse. Ce profil de rayonnement peut être inconvenient pour les souches de microalgues photosensibles puisque les cellules peuvent être exposées à des irradiances critiques inhibitrices (Figure I-23c).
2. Régime photo-limitée ($\gamma < 1$): Au contraire du régime cinétique, dans le régime photo-limité, la concentration de la culture de microalgues est très élevée dû à un temps de séjour imposé très long. La zone sombre devient donc très importante et l'activité respiratoire est significatif, ce qui entraîne une perte de productivité (Figure I-23a).

3. Régime luminostat ($\gamma = 1$): Dans ce régime de rayonnement, la totalité du flux de lumière incident est absorbé sans apparition de phase sombre. Ce régime permettrait d'obtenir théoriquement une productivité maximale en biomasse puisque les pertes par une activité respiratoire sont très faibles, voire négligeables (Figure I-23b).

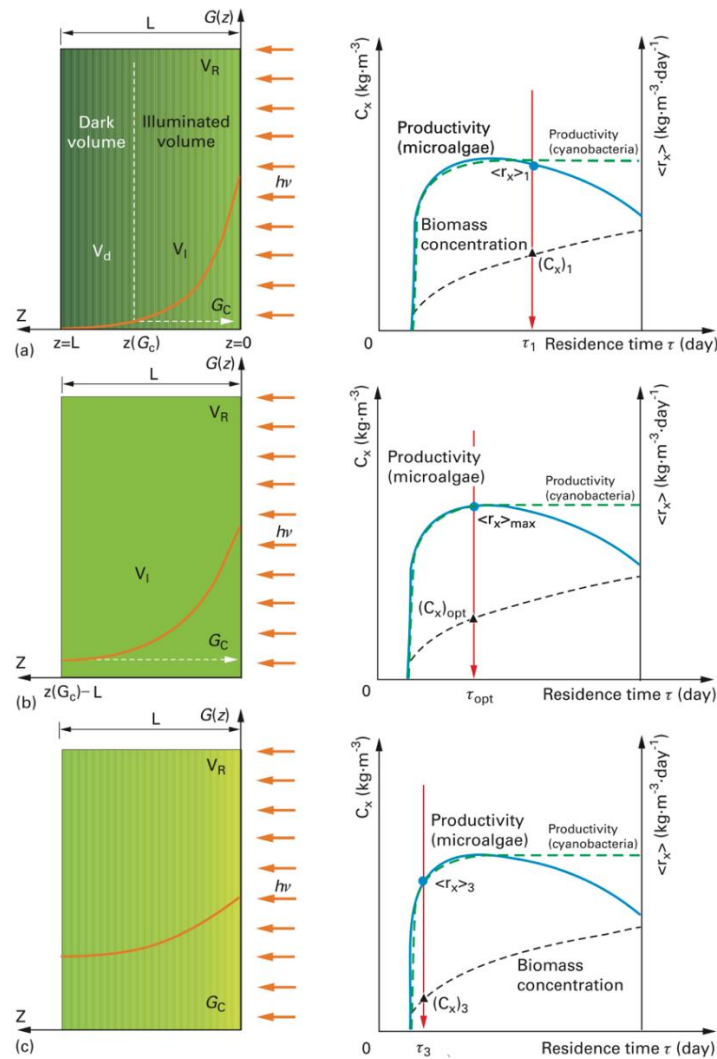


Figure I-23. Régimes de rayonnement dans une culture en photobioréacteur. Tiré de Pruvost & Cornet, 2012.

Il est important de mentionner que si bien une fraction volumique éclairée supérieur à 1 n'a pas de sens physique, puisque cela impliquerait une profondeur du PBR plus grand que celle réellement existante ($z(G_c) > L$), elle pourrait permettre de définir le $\gamma > 1$ pouvant entraîner une photo-inhibition et perte de la culture, notamment pour les cultures conduites en conditions solaires. Pour cette thèse, nous parlerons juste de deux régimes de rayonnement, à savoir, régime cinétique et photolimité, et par conséquent des valeurs

de fraction volumique éclairées oscillant entre $1 \geq \gamma \geq 0$. Ceci sera développé en détail dans le chapitre V de ce manuscrit.

I.4 Production de biohydrogène (H₂) avec des microorganismes photosynthétiques.

I.4.1 Organismes modèles pour la photo-production de biohydrogène

La production de biohydrogène peut être effectuée principalement par 3 groupes de micro-organismes photosynthétiques : les bactéries photosynthétiques, les cyanobactéries et les microalgues. Ces micro-organismes unicellulaires peuvent sous certaines conditions physiologiques exprimer des enzymes spécifiques (hydrogénases et nitrogénases) capables de produire de l'hydrogène moléculaire (H₂).

I.4.1.1 Bactéries photosynthétiques

Les bactéries photosynthétiques (BPS) sont des micro-organismes procaryotes anaérobies photohétérotrophes pouvant utiliser l'énergie solaire pour convertir des sucres simples (glucose, fructose, etc) ou des acides organiques (comme l'acide acétique, lactique, malique, butyrique) en CO₂ et en H₂ à travers d'une enzyme nitrogénase (H. Singh et al., 2022; Q. Zhang & Zhang, 2018). Ce processus est connu sous le nom de photo-fermentation. Les BPS sont divisées en quatre phyla à savoir les bactéries pourpre sulfureuses (*Chromatiaceae*), les bactéries pourpres non-sulfureuses (*Rhodospirillaceae*), les bactéries vertes sulfureuses (*Chlorobiaceae*) et les bactéries vertes non-sulfureuses (*Chloroflexus*) (Chen et al., 2011). Les BPS plus couramment utilisées sont les bactéries pourpres non-sulfureuses qui possèdent des pigments photosynthétiques (bactériochlorophylle) pour la photo-production de biohydrogène (Adessi & De Philippis, 2012, 2014). Cependant, elles sont dépourvues du photosystème II (PS II) et sont donc incapables d'utiliser l'eau pour ce propos, mais le sulfure d'hydrogène et d'autres composés organiques comme donneur d'électrons pendant la photosynthèse. Un autre inconvénient des BPS est qu'ils sont sensibles aux souches contaminantes et nécessitent des conditions aseptiques strictes pendant l'inoculation et la culture (O-Thong et al., 2011). Les espèces sauvages et mutantes de *Rhodospseudomonas sp*, *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* et *Rhodobacter sulphidophilum* sont les plus étudiées pour la photo-production de biohydrogène (H. Singh et al., 2022; Q. Zhang & Zhang, 2018).

I.4.1.2 Cyanobactéries et microalgues

Les cyanobactéries et les microalgues sont des micro-organismes photoautotrophes producteurs d'oxygène, procaryotes et eucaryotes respectivement, pouvant utiliser essentiellement l'énergie solaire et l'eau pour produire du biohydrogène via la photosynthèse et une enzyme hydrogénase (Morales-Ibarria et al., 2022).

Les cyanobactéries, également appelées algues bleu-vertes, se trouvent dans les océans, les lacs, les rivières et les déserts (H. Singh et al., 2022). Elles sont les organismes les plus primitifs à effectuer une photosynthèse oxygénique et de nombreuses souches se prêtent à une transformation génétique facile. De plus, la plupart d'entre elles sont faciles à cultiver en masse, et les souches peuvent être isolées dans des environnements extrêmes allant du psychrophile (en dessous de zéro degré) au thermophile (jusqu'à environ 75°C), y compris les espèces d'eau douce et d'eau de mer (Posten & Walter, 2012). Elles peuvent être classées en non-hétérocyste et hétérocyste. Certaines espèces de cyanobactéries peuvent aussi synthétiser une enzyme nitrogénase productrice d'hydrogène.

Les microalgues de leur côté prospèrent dans les eaux marines, douces ou le sol. Elles peuvent présenter des teneurs élevées en carbohydrates, en protéines et en lipides dues à leur capacités métaboliques complexes pour produire différentes molécules (Gifuni et al., 2017; H. Singh et al., 2022; Uggetti et al., 2014). En effet, elles peuvent posséder un métabolisme photoautotrophe, hétérotrophe et mixotrophe. Plusieurs facteurs affectent leur croissance, leur contenu pigmentaire (en Chlorophylle *a*, Chlorophylle *b* et caroténoïdes) et leur composition biochimique, à savoir la température, la salinité, la lumière et une limitation ou déficience nutritionnelle. (H. Singh et al., 2022). Un certain nombre de microalgues appartenant aux genres *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Synechocystis*, *Tetraspora*, *Anabaena*, ont été les plus étudiées pour la photo-production d'H₂ (Anwar et al., 2019; Eroglu & Melis, 2016). C'est grâce à leur diversité biologique et métabolique couplé à des avancées modernes dans le développement des souches, la connaissance de leur génome et les technologies de séquençage du génome permettant d'éclaircir et comprendre les mécanismes moléculaires liés aux processus biologiques d'intérêt, comme la photo-production de biohydrogène, que les microalgues sont probablement les micro-organismes photosynthétiques avec plus de potentiel pour l'obtention des biocarburants de 3^e génération dont l'hydrogène moléculaire (Anwar et al., 2019; Fu et al., 2019).

I.4.2 Mécanismes de production de l'hydrogène par des micro-organismes photosynthétiques

I.4.2.1 Enzymes responsables de la production d'H₂.

I.4.2.1.1 Hydrogénases

Les hydrogénases sont des métalloenzymes dotées d'un cluster fer-soufre au niveau du site actif, qui catalysent la réaction réversible de production d'hydrogène suivante (Morales-Ibarría et al., 2022) :



Le potentiel redox des substrats et de l'enzyme détermine la direction de la réaction biologique. En présence d'H₂ et d'un accepteur d'électrons, l'hydrogénase agit comme une enzyme consommant de l'hydrogène, mais en présence d'un donneur d'électrons à faible potentiel redox, elle peut utiliser des protons comme accepteurs d'électrons et libérer de l'H₂ (Franck et al., 2017). Selon sa composition métallique dans leur sites actifs, les hydrogénases sont classées en hydrogénases de type [Fe-Fe], hydrogénases [Ni-Fe] et hydrogénases [Fe] (Figure I-24) (Lu & Koo, 2019). Les cyanobactéries sont capables de synthétiser à la fois des hydrogénases de type [Fe-Fe] et [Ni-Fe] mais on y trouve surtout le type [Ni-Fe], alors que les espèces eucaryotes, dont les microalgues, ne possèdent que des hydrogénases de type [Fe-Fe] (Ludwig et al., 2006). D'autre part, les hydrogénases de type [Fe] sont synthétisées exclusivement par des espèces d'archées méthanogènes (Franck et al., 2017; A. Singh & Rathore, 2017). Toutes les types d'hydrogénases sont inhibées irréversiblement par la présence d'oxygène (O₂), à l'exception des hydrogénases de type [Ni-Fe]. Il a été démontré que l'O₂ entraîne une forte diminution de l'expression génétique et de la maturation de ces enzymes (Li et al., 2022), ainsi qu'une inhibition de leur sites actifs . En effet, l'O₂ forme un ligand au niveau du site actif de l'enzyme, lequel accepte des électrons et est réduit en espèce réactive de l'oxygène (ROS) piégée dans l'enzyme. Cela peut conduire à des dommages permanents lorsque les ROS survivent suffisamment longtemps pour attaquer le centre catalytique.

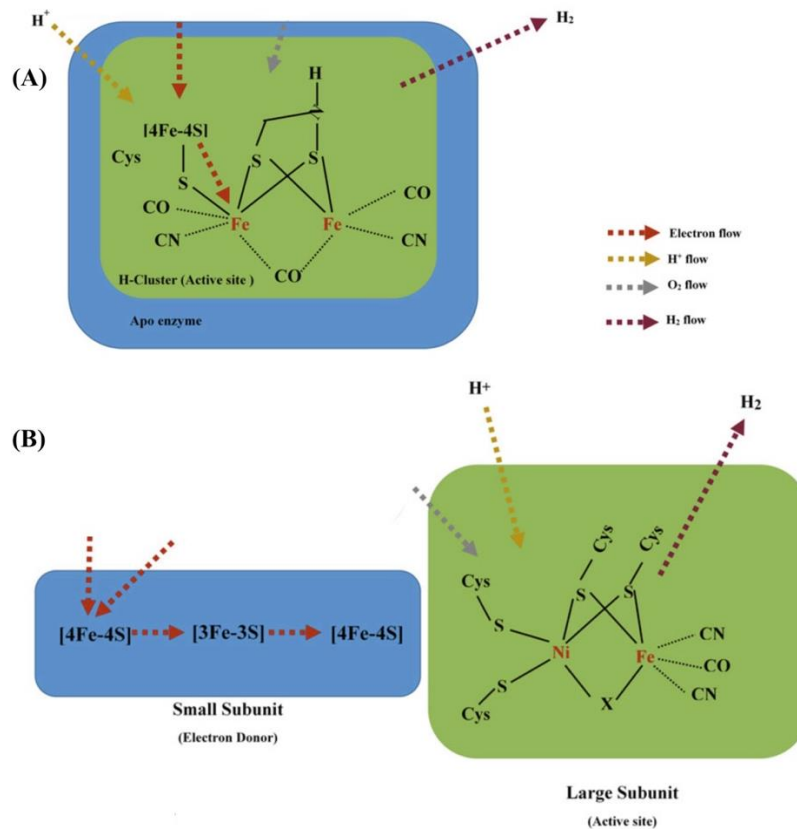


Figure I-24. Schéma de production d'hydrogène par les enzymes hydrogénases. (A) hydrogénase de type [Fe-Fe], (B) hydrogénase de type [Fe-Ni]. Tiré de A. Singh & Rathore, 2017.

- Hydrogénases de type [Fe-Fe]

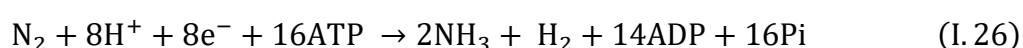
Les hydrogénases de type [Fe-Fe] sont principalement des enzymes monomères. Leur centre catalytique est conformé des atomes de Fer binucléaire unis à un ligand de [4Fe-4S] par un pont de cystéine (Figure I-24). Ce centre actif unique conduit à une activité environ 100 fois plus élevée que pour les autres types d'hydrogénases (Frey, 2002; Vogt et al., 2008). Il a été montré que certaines des enzymes hydrogénases de ce type peuvent générer approximativement 10^4 molécules d' H_2 par seconde à température ambiante (Lubitz et al., 2014). Bien que la réaction de production d'hydrogène est bidirectionnel, les hydrogénases de type [Fe-Fe] sont généralement plus impliquées dans l'élimination de l'excès de pouvoir réducteur généré pendant la fermentation dans des conditions anaérobies que dans l'absorption de l' H_2 (Franck et al., 2017). Cependant, les hydrogénases de type [Fe-Fe] sont les plus sensibles à l' O_2 car l'enzyme est irréversiblement endommagée après une exposition à de faibles concentrations en O_2 .

- Hydrogénase de type [Fe-Ni]

Les hydrogénases de type [Ni- Fe] sont composées de deux sous-unités : une petite et une grande, formant un hétérodimère. Leurs sites actifs bimétalliques comportent des liaisons Ni et Fe, et 3 ligands de [Fe-S] attachés à des ions métalliques (Lubitz et al., 2014) (Figure I-24). Le cluster Ni-Fe est situé dans la grande sous-unité et la petite sous-unité contient les ligands qui conduisent les électrons du site actif vers l'accepteur ou le donneur d'électrons physiologique (Franck et al., 2017; Lubitz et al., 2014; A. Singh & Rathore, 2017). Le site actif de ce type d'hydrogénase est plus tolérant à l'oxygène (Kim & Kim, 2011) car l'O₂ les inhibe de façon réversible mais son activité spécifique reste inférieure à celle des hydrogénases de type [Fe- Fe]. La plupart des hydrogénases de type [Ni- Fe] des cyanobactéries ont une forte affinité par l'H₂ et sont impliquées principalement dans l'oxydation de l'H₂ pour fournir des électrons à la machinerie cellulaire (Franck et al., 2017), mais possèdent également d'autres hydrogénases de type [Ni- Fe] qui interviennent dans la production d'H₂ afin d'équilibrer le potentiel redox dans les cellules (Sakurai et al., 2013).

I.4.2.1.2 Nitrogénases

Les enzymes nitrogénases ou aussi connu sous le nom de dinitrogénases catalysent la réduction de l'azote moléculaire N₂ en ammoniac NH₃, nécessaire pour la croissance et la maintenance des cellules. La réaction catalysée par la nitrogénase génère aussi de l'hydrogène et consomme de l'ATP :



Comme elles sont aussi inhibée par l'oxygène (O₂), ces enzymes ne se trouvent que dans des cellules procaryotes dans lesquelles un environnement anaérobie peut être maintenu. En effet, Les enzymes nitrogénases sont principalement présentes dans les bactéries non sulfurées pourpres et certaines espèces de cyanobactéries (Kim & Kim, 2011; A. Singh & Rathore, 2017). Il est important de noter qu'une enzyme nitrogénase est formée d'un complexe polyprotéique composé de deux parties: l'une est la dinitrogénase réductase (métalloprotéine de Fe) et l'autre la dinitrogénase (métalloprotéine de Mo-Fe) (Li et al., 2022). De ce fait, elles peuvent aussi produire de l'hydrogène dans l'absence de N₂ avec également une dépense d'ATP mais qui s'avère moindre :

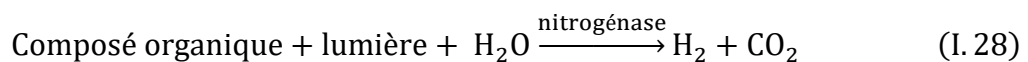


Ainsi, une vitesse de production d'H₂ peut être obtenue jusqu'à 4 fois plus importante pour les nitrogénases en absence d'azote moléculaire. Ce dernier pouvant être remplacé par l'argon ou un autre gaz inerte lors de cultures avec de cyanobactéries (Franck et al., 2017). D'un autre côté, les cyanobactéries qui forment des hétérocystes isolent spatialement le milieu anaérobie producteur d'hydrogène de la phase aérobie extérieur grâce à leur structure unique d'hétérocystes. On pense que les hétérocystes sont un mécanisme de protection de ces enzymes contre un environnement hautement oxygéné. En effet, l'organisation de leur paroi épaisse ne permet qu'à des traces d'oxygène de pénétrer dans la cellule. En plus, les hétérocystes ne possèdent pas de PSII actif où l'oxygène est généré. En revanche, ils ont des taux de respiration très élevés, pouvant fournir de l'ATP nécessaire pour les enzymes nitrogénases (Leite & Hallenbeck, 2014; A. Singh & Rathore, 2017). Les espèces non-hétérocystes requièrent de plus d'attention en raison de la sensibilité de ces enzymes à l'oxygène. Même si les nitrogénases sont sensibles à l'oxygène, leur seuil de tolérance est plus élevé que celui des hydrogénases, ce qui se traduit par une diminution de la dégradation des nitrogénases dans des conditions oxygénées (Kufryk, 2013).

I.4.2.2 Voies biologiques de production d'H₂

I.4.2.2.1 Photofermentation

Le processus biologique de photofermentation est un type spécial de fermentation réalisée par les bactéries photosynthétiques (BPS). Elle réalise la conversion des substrats organiques en biohydrogène et dioxyde de carbone en présence de lumière par l'intermédiaire d'une enzyme nitrogénase (Figure I-25) (Kalam Azad & Masud Kamal Khan, 2021; Q. Zhang & Zhang, 2018). Les BPS peuvent dégrader une large gamme de composés organiques pour la production d'hydrogène en conditions anoxiques allant du glucose et fructose jusqu'à des acides organiques tel que l'acide acétique et malique. La réaction globale de la photofermentation peut s'écrire comme suit :



Le potentiel de la photofermentation réside dans la dégradation des déchets organiques issu de l'activité humaine, à savoir, l'agriculture, les eaux usées, la production de biocarburants, l'alimentation humaine ou animale, etc., pour la production d'hydrogène. La photofermentation peut aussi être utilisé pour la conversion de la biomasse

lignocellulosique issue des forêts et de l'industrie forestière en biohydrogène (Q. Zhang & Zhang, 2018). Dans ce cas particulier, la biomasse est prétraitée afin de générer des sucres simples assimilables par les BPS. Toute de même, le rendement de conversion de l'énergie solaire en hydrogène dans le processus de photofermentation est estimé faible et étant d'environ 10% sans tenir en compte dans le bilan global l'énergie investie pour l'obtention des substrats organiques (Cournac et al., 2012; Sołowski, 2018). De même, il faut souligner que la nitrogénase nécessite de l'ATP pour effectuer la réaction de formation d'H₂, ce qui réduit l'efficacité globale du processus biologique (Sağır & Hallenbeck, 2019).

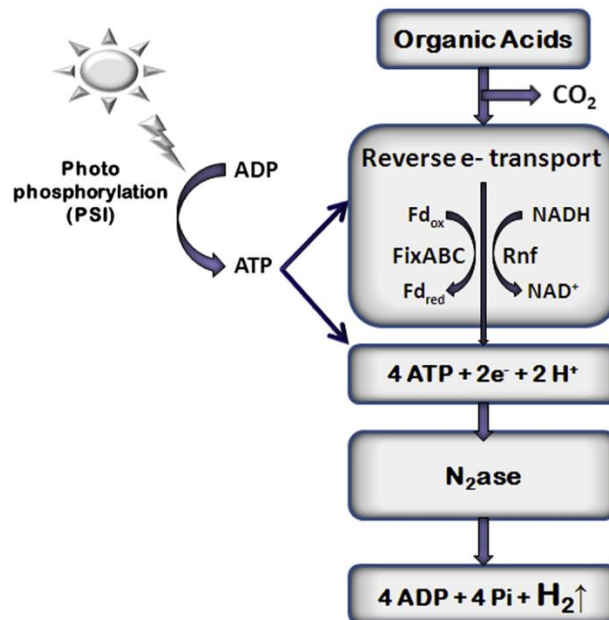


Figure I-25. Schéma global du processus biologique de la photofermentation. Dans un premier temps les acides organiques sont métabolisés en dioxyde de carbone et pouvoir réducteur NADH. Ce dernier réduit la ferrédoxine, qui est le donneur final d'électrons de la nitrogénase, via le transport d'électrons inverse impliquant les complexes membranaires chez les bactéries photosynthétiques appelés RNF ou FixABC. Ces complexes utilisent la force proton motrice établie par la photosynthèse bactérienne (photosystème I) pour réaliser la réaction globale de production d'hydrogène autrement thermodynamiquement défavorable. Tiré de Sağır and Hallenbeck (2019).

I.4.2.2.2 Voies de production PSII-dépendante (directe) et PSII-indépendante (indirecte).

La voie de production PSII-dépendante, ou aussi connu sous le nom de voie directe, et la voie PSII-indépendante, également connu sous le nom de voie indirecte, sont les deux voies photosynthétiques par lesquelles les microalgues et les cyanobactéries produisent

de l'hydrogène grâce à une enzyme hydrogénase. Dans la voie PSII-dépendante les électrons nécessaires à la formation de la molécule d' H_2 sont issus de la séparation d'une molécule d'eau lors de la photosynthèse, tandis que dans la voie PSII-indépendante le donneur initial d'électrons est le pouvoir réducteur NADPH ou $FADH_2$ issu du catabolisme des carbohydrates de réserves comme l'amidon (Figure I-26) (Morales-Ibarria et al., 2022).

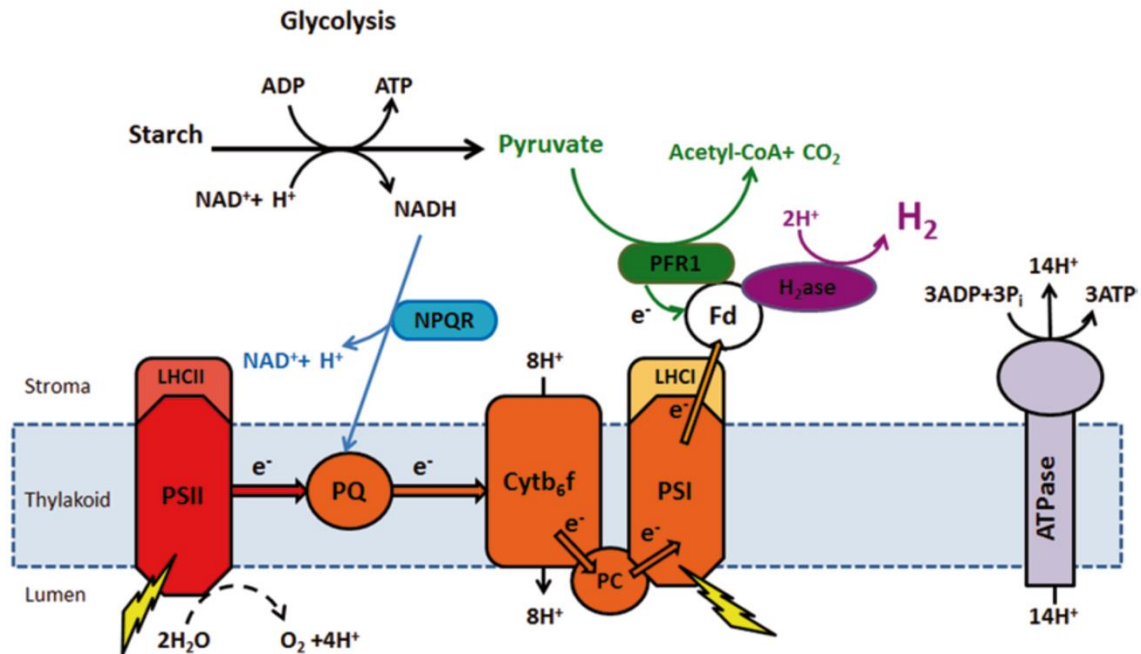
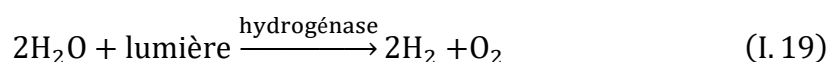


Figure I-26. Processus biologiques de production de biohydrogène par la voie directe et indirecte (voies PSII-dépendante et PSII-indépendante) et fermentation obscure. Tiré de K. Batyrova & Hallenbeck, 2017. En conditions anoxiques, la biophotolyse direct débute avec la séparation de la molécule d'eau en oxygène et protons pour le transfert des électrons dans la chaîne photosynthétique jusqu'à la hydrogénase par la ferrédoxine (Fd). Dans la biophotolyse indirect les électrons proviennent du catabolisme des sucres de réserve (amidon) générant du pouvoir réducteur NADH. Les électrons rentrent dans la chaîne photosynthétique entre le PSII et PSI au niveau des plastoquinones (PQ) via la NADPH-plastoquinone oxydoréductase (NPQR) ou une NADH déshydrogénase de type II (NDA2) et sont transférés jusqu'à l'hydrogénase par l'intermédiaire de la ferrédoxine (Fd). La fermentation obscure a lieu en absence de lumière et en conditions anoxiques suite à la dégradation des sucres de réserve. Le catabolisme de l'amidon produit du pyruvate, qui est ensuite oxydé en Acetyl-CoA et dioxyde de carbone par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (PFR1) qui transfère les électrons à l'hydrogénase à travers de la réduction de la ferrédoxine (Fd).

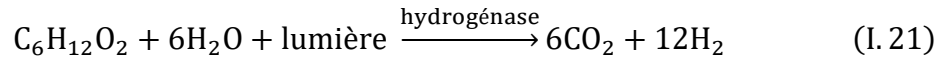
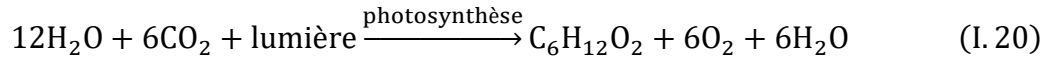
La voie PSII-dépendante est étroitement similaire à la photosynthèse, les électrons issus de la dissociation d'une molécule d'eau sont transportés dans la chaîne photosynthétique entre les photosystème II (PSII) et le photosystème I (PSI) jusqu'à la ferrédoxine (Fd) qui

au lieu de former du pouvoir réducteur NADPH via la ferrédoxine-NADP⁺ réductase, transfère les électrons vers l'enzyme hydrogénase pour la formation d'hydrogène (Figure I-26). La réaction globale réalisée par la voie PSII-dépendante est un processus naturellement transitoire qui se produit pendant une courte durée de temps puisque la séparation initiale d'une molécule d'eau produit également du dioxygène favorisant ainsi l'inhibition de l'hydrogénase. En effet, en raison de la forte sensibilité à l'oxygène par l'hydrogénase, la production d'H₂ par la voie PSII-dépendante reste un processus difficile à mettre en place pour une production à long terme de biohydrogène (Li et al., 2022; Mona et al., 2020). La réaction globale de la voie PSII-dépendante peut s'écrire comme suit :



D'autre part, dans la voie PSII-indépendante l'H₂ est produit à partir de la dégradation des réserves carbonées sous la forme d'amidon ou glycogène respectivement pour les microalgues ou les cyanobactéries en présence de lumière et en conditions anoxiques (Kaushik & Sharma, 2017). En effet, le catabolisme endogène des sucres de réserves par la glycolyse et le cycle de l'acide citrique fournit les électrons à la chaîne de transport d'électrons au milieu des deux photosystèmes. Plus précisément, il a été montré que ces électrons sont injectés par l'intermédiaire d'une NADPH-plastoquinone oxydoréductase (NPQR) ou aussi connue comme NADPH déshydrogénase de type II (NDA2) chez *Chlamydomonas reinhardtii* réduisant le pool plastoquinones (PQ). Par la suite les électrons sont transportés jusqu'à la ferrédoxine (*Fd*) qui les cède finalement à l'hydrogénase (K. Batyrova & Hallenbeck, 2017; Chochois, 2009; Lemasson, 2015) (Figure I-26). Ce mécanisme a été démontré lorsqu'une production d'hydrogène a été observée en présence de l'inhibiteur du PSII 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (DCMU) à la lumière qui n'a pas entraîné la formation d'oxygène mais de dioxyde de carbone (Cournac et al., 2002). Il est important à noter que la production d'hydrogène avec cette voie métabolique s'est avérée plus faible par rapport à une production d'hydrogène observée en présence du PSII actif (Cournac et al., 2012). La production indirecte d'H₂ résout, d'un point de vue théorique, le problème de la sensibilité à l'oxygène de l'hydrogénase en séparant temporellement les réactions de production de production d'oxygène et d'hydrogène en deux étapes distinctes, couplées par la fixation du dioxyde de carbone et la remobilisation des réserves carbonées (Bharathiraja et al.,

2016; Morales-Ibarría et al., 2022; Nagarajan et al., 2017). Par conséquent, la réaction globale de la voie PSII-indépendante peut être résumé en deux étapes, comprenant la formation des sucres de réserves et sa transformation en hydrogène comme suit :



I.4.2.2.3 Fermentation obscure

Les microalgues peuvent également produire de l'hydrogène en absence de lumière et en conditions anoxiques via la conversion de substrats organiques (Li et al., 2022; Show et al., 2019). Lors de la fermentation à l'obscurité, les composés organiques issus des sucres de réserves comme l'amidon sont convertis en pyruvate via la glycolyse. Le pyruvate est le métabolite principal pour générer les produits finaux de la fermentation obscure tel que l'acétate, le lactate, le formate et l'éthanol (Figure I-27). Au cours de l'oxydation du pyruvate, la production d'hydrogène et de dioxyde de carbone est observée. Plus précisément, la production d'hydrogène a lieu lorsque le pyruvate est dégradé en Acétyl-CoA et dioxyde de carbone réduisant la ferrédoxine (*Fd*) par l'intermédiaire de l'enzyme PFR1 (Figure I-27). Ensuite, la ferrédoxine va finalement céder les électrons à l'hydrogénase pour la production d'hydrogène à l'obscurité. Il est important de noter que la coexistence des deux voies de production de hydrogène par la voie directe et indirecte peut avoir lieu dans la cellule microalgale se traduisant globalement dans une production d'hydrogène accrue en présence de lumière par rapport à la production à l'obscurité (Gfeller & Gibbs, 1984; Klein & Betz, 1978).

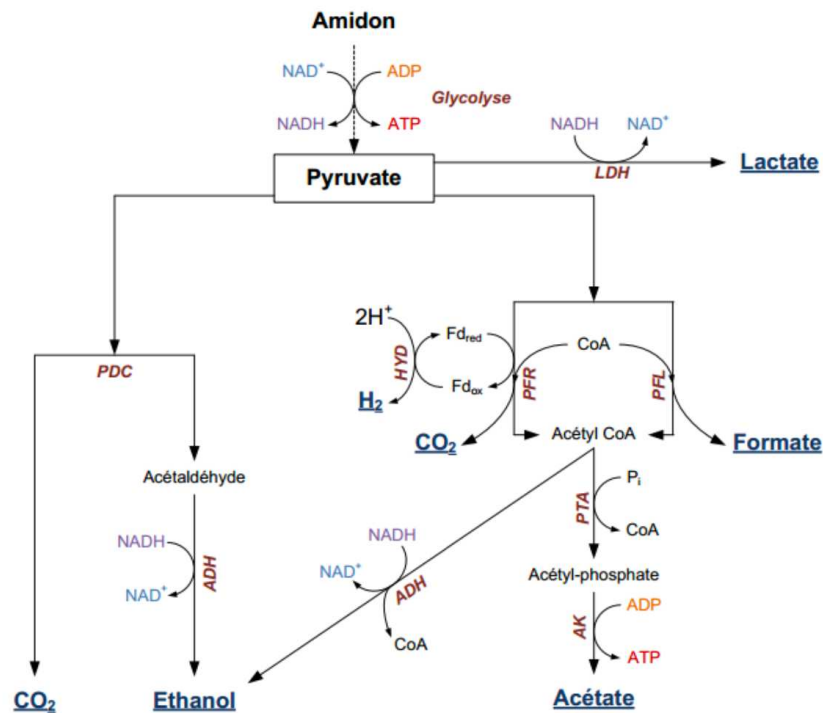


Figure I-27. Schéma du métabolisme fermentaire chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. À l'obscurité, la dégradation des réserves carbonées sous la forme d'amidon produit du pyruvate. Le pyruvate peut ensuite être oxydé pour la formation des produits fermentaire tel que le lactate, le formate, l'acétate et l'éthanol. La production d'hydrogène a lieu lors de la conversion du pyruvate en dioxyde de carbone et Acétyl-CoA par l'enzyme pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (PFR1). Les électrons issus de cette réaction d'oxydation permettent la réduction de la ferrédoxine (Fd) qui transfère les électrons finalement à l'hydrogénase pour la production d'hydrogène. Les différentes enzymes impliquées dans la production des autres composés fermentaires sont la pyruvate décarboxylase (PDC), l'alcool déshydrogénase (ADH), la lactate déshydrogénase (LDH), le pyruvate formate lyase (PFL), la phototransacétylase (PTA) et l'acétate kinase (AK). Tiré de Lemasson, 2015 et inspiré de Gfeller and Gibbs (1984).

I.4.3 Stratégies de culture pour la photo-production de biohydrogène

Pour obtenir une production de biohydrogène avec des microalgues, il est nécessaire de réduire l'activité photosynthétique et/ou d'augmenter la prise d'oxygène notamment mitochondriale, de façon à que les niveaux d'oxygène dans la culture permettent l'expression d'une activité l'hydrogénase. Cependant, l'anoxie ne suffit pas à elle seule pour produire de l'hydrogène. Le métabolisme cellulaire, notamment celui des chloroplastes, doit être orienté de manière à ce que les électrons et les protons s'accumulent dans le stroma, car ce sont les substrats nécessaires à l'hydrogénase. Comme expliqué précédemment (cf. section I.4.2.2.2), les électrons et les protons sont fournis directement par l'activité photosynthétique ou indirectement par du pouvoir réducteur tels

que le NAD(P)H et FADH₂ (Antal, 2018; Anwar et al., 2019; Dubini & Gonzalez-Ballester, 2016). En effet, dans des conditions de production d'hydrogène, ces réducteurs sont moins sollicités par le métabolisme cellulaire et s'accumulent dans le chloroplaste. Par ailleurs, l'activité catalytique de certaines réactions enzymatiques ayant lieu dans la fermentation obscure, telles que celles impliquant l'enzyme PFR, peut également fournir des électrons à l'hydrogénase (Antal et al., 2015). Par conséquent, différentes stratégies de production d'H₂ par les microalgues ont été étudiées dans le but de maintenir les conditions mentionnées précédemment, c'est-à-dire une faible concentration d'oxygène et une accumulation d'électrons ou d'équivalents réducteurs, pendant de longues périodes sans compromettre la viabilité des cellules.

I.4.3.1 Production d'H₂ induite par un stress nutritionnel

La carence ou la limitation d'un macronutriment tel que le soufre, l'azote, le phosphore ou encore le magnésium peut induire la production d'hydrogène chez plusieurs espèces de microalgues, dont *C. reinhardtii* (Antal, 2018; Dubini & Gonzalez-Ballester, 2016). Le stress nutritionnel entraîne chronologiquement l'arrêt de la division cellulaire, l'accumulation de réserves carbonées sous la forme d'amidon et/ou des lipides, ainsi que la dégradation de l'appareil photosynthétique et la diminution du contenu pigmentaire dans les cellules (Antal, 2018; Dubini & Gonzalez-Ballester, 2016; Park et al., 2015; Wase et al., 2014). Ainsi, la vitesse de fixation du carbone et le métabolisme anabolique diminuent considérablement, ce qui entraîne une diminution de la demande en NADPH. Celui-ci s'accumule dans le chloroplaste et empêche la réoxydation de la chaîne d'électrons photosynthétique, rendant ainsi plus d'électrons potentiellement disponibles pour l'hydrogénase (Dubini & Gonzalez-Ballester, 2016). En même temps, la diminution de l'activité photosynthétique finit par imposer des conditions anoxiques et donc une production de biohydrogène peut être observée.

Cependant, il est important de souligner que la diminution de l'activité photosynthétique et la stabilité de l'anoxie dépendent du macronutriment spécifique restreint. La carence azotée induit la dégradation des protéines du PSI, PSII et du cytochrome *bf*, permettant à la cellule d'éviter une accumulation de ROS (reactive oxygen species) et en même temps de distribuer l'azote issu des enzymes RuBisCO, des protéines liées à la chaîne photosynthétiques, des protéines de ribosomes et des chlorophylles vers d'autres molécules nécessaires à la survie dans ces conditions de culture (Antal, 2018; Miller et

al., 2010; Schmollinger et al., 2014). Dans le cas d'une carence en soufre, la diminution du contenu pigmentaire cellulaire est moindre que dans le cas d'une carence azotée mais en revanche la dégradation du PSII (protéine D1 du centre réactionnel) et de l'enzyme RuBisCO est beaucoup plus marquée (Antal et al., 2011, 2015; Antal, 2018). D'ailleurs, les mécanismes de photoprotection activés pour gérer l'excès de lumière qui ne peut pas être utilisée lors d'une carence nutritionnelle semblent également varier selon le nutriment en déficience. Pour le cas d'une carence azotée, les mécanismes principaux seraient la dissipation d'énergie (Harris et al., 2009) sous forme de chaleur (NPQ) par le cycle de xanthophylles, le transport cyclique d'électrons (CEF, pour cyclic electron flow) et la chlororespiration (Juergens et al., 2015; Park et al., 2015), tandis que pour la carence en soufre, les mécanismes prédominants seraient le CEF et l'état de transition 2 du PSII (Antal et al., 2011; Antal, 2018).

D'autre part, la carence en soufre induit une formation d'amidon moins importante que dans une carence azotée mais une accumulation de lipides accrue (Antal, 2018). La paroi de *C. reinhardtii* étant formée de glycoprotéines sulfatée, ces dernières seraient donc restructurées afin de remobiliser une partie du soufre dans la cellule (Bölling & Fiehn, 2005; Takahashi et al., 2001). L'accumulation de réserves carbonées joue un rôle important sur la stabilité de l'anoxie, car l'amidon remobilisé génère un excès de NADPH dans le chloroplaste, qui peut être dissipé par l'activité de l'enzyme NDA2 pour faciliter la production d'H₂ par la voie PSII-Indépendante (Desplats et al., 2009; Jans et al., 2008). Néanmoins, l'excès de NADPH ne peut pas toujours être éliminé par la production d'H₂, ce qui active le métabolisme fermentaire et conduit à la formation des produits tel que l'acétate, l'éthanol, le formate et le lactate (Antal et al., 2015; Antal, 2018). Cependant, l'excès de ces métabolites secondaires influencent la stabilité de l'anoxie et inhibent la production d'H₂ (Touloupakis et al., 2021). Dans ce sens, la stratégie de carence en soufre a été privilégiée car il a été observé un passage en anoxie plus rapide et plus facile à maintenir par rapport aux autres carences nutritionnelles. De plus, la réduction moindre dans le contenu pigmentaire en cas de carence en soufre permet théoriquement une captation plus importante de photons, et donc une conversion en H₂ plus élevée.

Cependant, la stratégie de carence en soufre, tout comme pour les autres carences nutritionnelles pour la production d'H₂, rencontre de limites lors de sa mise en œuvre dans des systèmes de culture classiques et lors des changements d'échelle pour envisager une production industrielle (Khosravitar, 2020). D'un côté, il est nécessaire de

dissocier la production de biomasse de la carence nutritionnelle en raison des différentes compositions des milieux de culture requises à chaque étape (Khosravitar, 2020). D'un autre côté, les cellules privées de nutriment essentiels, en particulier le soufre, doivent faire face à un stress oxydatif aigu pouvant affecter la viabilité cellulaire (Eroglu & Melis, 2016; Sáenz et al., 2015).

La carence en phosphore et la carence en magnésium ont également été explorées (Antal, 2018; Dubini & Gonzalez-Ballester, 2016). Une privation en phosphore entraîne une baisse de l'activité du PSII et un passage à l'état de transition 2 du PSII, permettant ainsi d'atteindre des conditions d'anoxie en présence d'acétate (K. A. Batyrova et al., 2012; Wykoff et al., 1998). Cependant, l'anoxie est atteinte à une vitesse beaucoup plus lente car la diminution de l'activité photosynthétique n'est pas aussi rapide que pour la carence en soufre (K. A. Batyrova et al., 2012). Ceci est dû au fait que les cellules de *C. reinhardtii* accumulent de réserves de phosphore sous la forme de polyphosphates, et par conséquent, les effets de la carence nutritionnelle sont observés une fois les stocks de phosphores ont été consommés (Komine et al., 2000; Siderius et al., 1996). Comme décrit pour les autres carences minérales, la carence en phosphore induit une accumulation d'amidon, lequel est semblerait consommé pendant la production d'H₂ (Dubini & Gonzalez-Ballester, 2016). Finalement, la carence en magnésium a été étudiée, puisque cet atome fait partie des molécules de chlorophylle et de l'enzyme RuBisCO, toutes deux essentielles pour effectuer la photosynthèse et la fixation du CO₂. En effet, les cellules végétales privées de magnésium présentent une diminution de l'activité photosynthétique et du contenu pigmentaire (chlorose), ce qui conduit à une production affaiblie en oxygène (Hermans et al., 2010). Cependant, tout comme pour le phosphore, une étape d'épuisement de réserves internes de magnésium est nécessaire pour observer les effets physiologiques de la carence nutritionnelle. Des premières études comparatives sembleraient montrer une production d'H₂ plus longue avec la carence en magnésium par rapport à la carence en soufre, avec des rendements de production similaires (A. Volgusheva et al., 2014; A. A. Volgusheva et al., 2017). De cette manière, une stratégie de production d'H₂ basée sur la carence en phosphore ou en magnésium serait difficile à mettre en place en raison de l'ajout d'une étape supplémentaire consacrée à la consommation des réserves internes cellulaire en P ou Mg. En effet, cela complexifierait excessivement la mise en œuvre d'un potentiel système de production d'H₂ à une plus grande échelle avec cette stratégie.

I.4.3.2 Production d'H₂ avec des microalgues modifiées génétiquement

Bien que les conditions de culture puissent être manipulées pour améliorer la production de H₂ par les microorganismes photosynthétiques, les limites biochimiques et moléculaires inhérentes à la production d'H₂ peuvent être débloquées par la génération de souches de microalgues modifiées génétiquement, et ainsi augmenter les vitesses et rendement de production. D'après Dubini et Ghirardi (2015) et Dubini et Gonzalez-Ballester (2016) les obstacles à surmonter peuvent être divisés en 6 niveaux (Figure I-28): (1) la saturation en lumière des PS à de faibles niveaux de lumière, (2) la diminution de la régulation du transport des électrons photosynthétiques due au gradient de protons non dissipé, (3) l'établissement du CEF (cyclic electron flow) autour du PSI, (4) la compétition pour les électrons par l'hydrogénase au niveau de la Fd, (5) la sensibilité à l'O₂, la réversibilité enzymatique et les faibles niveaux d'expression des hydrogénases, et (6) la non dissipation du gradient de protons.

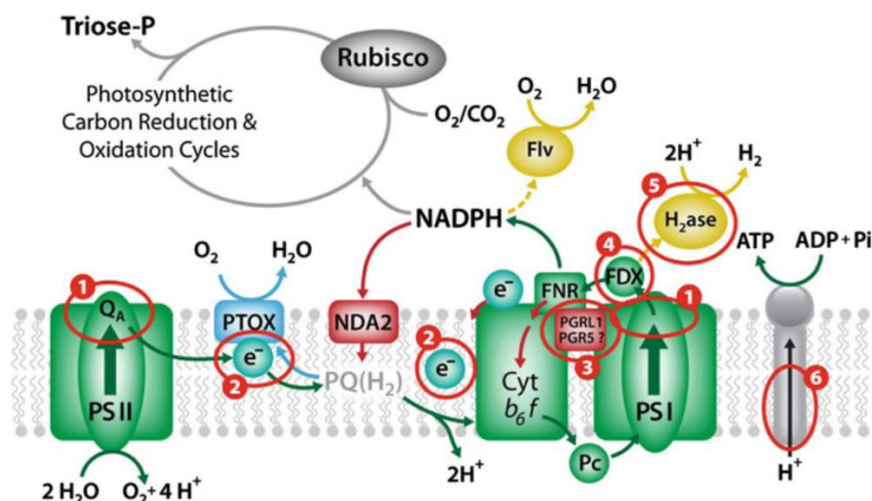


Figure I-28. Niveaux d'amélioration biologique pour une photoproduction d'H₂. Tiré de Dubini & Gonzalez-Ballester, 2016.

I.4.3.2.1 Limitation par la saturation en lumière

L'énergie lumineuse maximale théorique pouvant être utilisée pour produire de l'O₂ et de l'H₂ correspond à seulement 27 % de l'énergie radiative absorbée dans le PAR, ou autrement dit, 12 % de la radiation du soleil (spectre complet) (Dubini & Gonzalez-Ballester, 2016). Cependant, en réalité, ce chiffre serait bien plus faible en raison de l'impact sur l'activité photosynthétique des facteurs biochimiques tels que la réponse aux conditions de rayonnement (photoinhibition, faible flux incident), une vitesse de transport

d'électrons limitée entre PSII et PSI, et les mécanismes intracellulaires qui régulent l'état d'oxydoréduction de la cellule (balance entre pouvoir réducteur NADPH généré et ATP produit) (Dubini & Gonzalez-Ballester, 2016). De ce fait, une stratégie évidente pour améliorer l'efficacité de la photosynthèse lors de la production d'H₂ est de tronquer les antennes impliquées dans la captation de la lumière dans les photosystèmes (niveau d'amélioration 1). En suivant cette approche, un banc de mutants de *C. reinhardtii*, nommés *tla* (en anglais, truncated light-harvesting Chl antenna) a été généré. Un mutant particulier, *tla1*, a montré une production accrue d'H₂ à une forte lumière dans des conditions de privation en soufre lorsque les cellules étaient immobilisées (S. N. Kosourov et al., 2011). Une autre méthode cherchant à optimiser la captation de la lumière a été reportée avec des séquences de RNA d'interférence (RNAi) chez *C. reinhardtii*. L'objectif de ces séquences de RNAi consistait à altérer l'expression des gènes associées aux complexe LHCBM1, 2 et 3. Ce mutant de *C. reinhardtii* nommé *stm6Glc4* a montré une tolérance accrue à la lumière sans présenter de photoinhibition. En effet, lors de la privation en soufre, le mutant *stm6Glc4* a produit de l'H₂ presque de façon immédiate avec une vitesse de production deux fois plus élevée que la souche sauvage (Oey et al., 2013). Dans le même sens, d'autres souches mutantes ont permis d'améliorer les performances de production d'H₂ comme le mutant *Stm6* de *C. reinhardtii* possédant des modifications au niveau du métabolisme respiratoire et une accumulation d'amidon plus importante. Cela s'est traduit dans une vitesse supérieure de l'activité respiratoire comparée à celle de la production d'O₂ favorisant la mise en anoxie nécessaire pour la production d'H₂ (Kruse et al., 2005).

I.4.3.2.2 Dissipation du gradient de protons dans le stroma

En conditions de culture anoxiques, le pool de PQ est trop réduit, ce qui déclenche un passage de l'état de transition I (état basal) vers l'état de transition II. Pour s'acclimater à cette nouvelle condition, certaines protéines du LHC (light harvesting complex) du PSII se dissocient de ce dernier et s'attachent fonctionnellement au PSI, augmentant sa capacité d'absorption de la lumière aux dépens de celle du PSII. Ce phénomène s'accompagne d'une augmentation du CEF (cyclic electron flow) par rapport au LET (linear electron transport) (Finazzi et al., 2002). Le CEF n'entraîne pas de production de NADPH mais favorise la formation du gradient de protons et la biosynthèse d'ATP. La production d'H₂ est donc plus faible dans ces conditions car une grande partie des électrons est redirigée vers la CEF plutôt que vers la *Fd* et l'hydrogénase (niveau d'amélioration 3) (Tollet et

al., 2011). De plus, le gradient de protons non dissipé induit des mécanismes de NPQ à travers du cycle des xanthophylles qui diminuent l'efficacité de l'utilisation des électrons photosynthétiques, et par conséquent, l'efficacité de la production d'H₂ (niveau d'amélioration 6). Une boucle de rétroaction négative est activée ensuite par la cellule dans ces conditions physiologiques afin de réduire le transport d'électrons du PSII vers le PSI (niveau d'amélioration 2) (Antal et al., 2003; de Vitry et al., 2004; J. W. Lee & Greenbaum, 2003). Pour limiter l'implication du CEF dans la formation du gradient de protons, des mutants, appelés PGRL1 (Pour Proton Gradient Regulation Like 1), incapables de passer à l'état de transition II et restant donc bloquées dans l'état de transition I en conditions d'anoxie, ont été utilisés pour la photo-production d'H₂. Ainsi, des souches mutantes PGRL1 de *C. reinhardtii* ont présenté une production accrue d'H₂ par rapport à la souche sauvage (Lemasson, 2015; A. Volgusheva et al., 2013). De plus, des mutants PGR5 et PGR5-PGRL1 ont également été évalués et ont présenté une performance de production encore plus élevée. La vitesse de production d'H₂ montrée a été jusqu'à 4 fois supérieure par rapport à la souche sauvage (Steinbeck et al., 2015).

I.4.3.2.3 Compétition pour le pouvoir réducteur photosynthétique

Les électrons fournis à la hydrogénase pour la production d'H₂ sont donnés directement par la Ferrédoxine *Fd*, notée également comme FDX (Figure I-28). Cependant, la *Fd* est une protéine polyvalente pouvant agir en tant que donneur ou accepteurs d'électrons, raison pour laquelle elle est impliquée dans plusieurs réactions biologiques (Dubini & Gonzalez-Ballester, 2016). Ceci entraîne la compétition pour les électrons une fois ils sont au niveau de la *Fd*, réduisant ainsi techniquement l'efficacité de production d'H₂ (niveau d'amélioration 4). Chez *Chlamydomonas* 6 types de *Fd* sont connues dont seulement 2 participent à la production d'H₂, à savoir, FDX1 et FDX2. Ces deux ferrédoxines sont aussi impliquées dans les voies de réduction du NADP⁺ et la voie fermentaire de production d'H₂ avec une activité de la FDX1 étant deux fois supérieure par rapport à la FDX2 (Noth et al., 2013; Peden et al., 2013). Ainsi, différentes stratégies au niveau moléculaire ont été pensées pour réduire la compétition pour les électrons dans la chaîne photosynthétique. Par exemple, une protéine de fusion FDX-hydrogénase a été conçue et testée in vitro (Yacoby et al., 2011). L'hydrogénase de fusion a permis de détourner plus de 60 % des électrons vers la production d'H₂ contre 10 % observée dans la hydrogénase non-fusionnée. La protéine de fusion a été donc capable de surmonter l'inhibition compétitive par le NADP⁺ de l'hydrogénase (Peden et al., 2013; Yacoby et

al., 2011). De même, des souches mutantes ont été générées pour réduire la fixation du CO₂ dans le cycle de Calvin, modifiant ainsi le besoin en pouvoir réducteur NADPH de la cellule. La souche CC-2803 dépourvue de la grande sous-unité de la RuBisCO a montré une production d'H₂ plus importante que la souche sauvage dans des conditions de carence en soufre (Hemschemeier et al., 2008). De manière similaire, une souche mutante de *C. reinhardtii* avec une mutation dans la tyrosine 67 de la petite sous-unité de la RuBisCO a permis d'avoir une production jusqu'à 15 fois plus élevée par rapport à la souche sauvage (Pinto et al., 2013). Il a été démontré que cette dernière mutation nuit à la stabilité de la RuBisCO et entraîne une diminution de l'efficacité de la captation de photons (Esquivel et al., 2006; Pinto et al., 2013).

I.4.3.2.4 Augmentation de la tolérance à l'O₂ par l'hydrogénase

L'anoxie est une condition indispensable à la production d'H₂ car comme expliqué précédemment (cf. section I.4.2.1) les hydrogénases sont très sensibles à l'O₂. En effet, les transcrits des hydrogénases, la maturation et l'activité catalytique de l'enzyme sont tous sensibles à l'O₂ (Erbes et al., 1979; Forestier et al., 2003; King et al., 2006; Mulder et al., 2010; Posewitz et al., 2004; Roessler & Lien, 1984). La tolérance des hydrogénases à l'O₂ est donc l'un des principaux problèmes à résoudre pour développer un système efficace et stable de production d'H₂ par les microalgues (niveau d'amélioration 5). Bien que des simulations moléculaires accompagnées des essais de mutagenèse dirigée ont été possible pour créer des mutants produisant des enzymes hydrogénases soi-disant plus tolérantes, ces approches n'ont pas abouti à une production accrue d'H₂ dans un environnement réduit en oxygène. En fait, les enzymes hydrogénases des souches mutantes ont présentées une sensibilité accrue à l'O₂, et par conséquent, une activité plus faible comparée à la souche sauvage. Il s'est avéré que les résidus d'acides aminés modifiés, et qui composent la zone autour du cluster catalytique, sont également impliqués dans la formation des canaux de gaz de l'enzyme. Les hydrogénases des mutants sont donc incapables de replier correctement la protéine et l'enzyme devient moins tolérante à l'O₂ (Chang et al., 2007; Long et al., 2009).

Il est tout de même possible de penser à une stratégie moléculaire visant à réduire la production d'O₂ par les cellules de façon à faciliter l'expression et l'activité de l'hydrogénase. À ce sujet, une souche mutante de *C. reinhardtii* L1591-N230Y au niveau de la protéine D1 du PSII a été conçue et elle a été capable de produire 20 fois plus d'H₂

par rapport à la souche sauvage dans des conditions de carence en soufre (Scoma et al., 2012). De même, l'utilisation d'un inducteur génétique contrôlant l'expression de la protéine D2 du PSII a également permis de multiplier par 10 le taux de production d'H₂ par rapport à la souche sauvage de *C. reinhardtii* (Surzycki et al., 2007). Il a également été démontré qu'une souche mutante de *C. reinhardtii* *APRI* présentant un rapport de l'activité photosynthétique et respiratoire atténué permettait d'imposer l'anoxie à la lumière et produisait plus d'H₂ en comparaison à la souche sauvage (Rühle et al., 2008). Enfin, d'autres stratégies moléculaires visant à éliminer l'O₂ produit par la photosynthèse se sont relevées prometteuses. En effet, des souches de *C. reinhardtii* transformées génétiquement afin d'exprimer une protéine permettant de séquestrer et de transporter l'O₂, comme la leghémoglobine (LbA), ou exprimant l'enzyme pyruvate oxydase (PoX) qui consomme de l'O₂ lors de la réaction de décarboxylation du pyruvate en acétyl phosphate et dioxyde de carbone, ont présenté une production d'H₂ accrue (Wu et al., 2010; Xu et al., 2011).

I.4.3.3 Cellules immobilisées

La stratégie de carence en soufre est l'une, sinon la plus répandue, des stratégies utilisées pour induire une production d'H₂ en raison de l'anoxie prolongée qu'elle génère dans la culture. Cependant, les cultures de microalgues en croissance doivent passer d'un environnement riche en soufre à un environnement sans soufre, ce qui nécessite d'un changement de milieu de culture dans le PBR (Kosourov et al., 2018). Même si, à la fin d'un cycle de photoproduction d'H₂, les microalgues pourraient être reconditionnée en les réapprovisionnant en soufre et qu'une répétition d'un cycle de privation en soufre puis de production d'H₂ est possible (Ghirardi et al., 2000; S. N. Kosourov et al., 2018), le fait que les microalgues soient en suspension dans une phase liquide rend difficile et coûteux ce type de fonctionnement. En effet, la procédure plus fréquemment utilisée pour changer le milieu dans le PBR est par une série de centrifugations (Melis et al., 2000), qui prend du temps et consomme beaucoup d'énergie (S. N. Kosourov et al., 2018). Une solution à cette problématique serait l'immobilisation des cellules de microalgues, de manière à permettre une séparation efficace des cellules de la phase liquide à l'intérieur du PBR, facilitant ainsi les cycles entre des conditions riches en soufre et des conditions pauvres en soufre pour s'affranchir des étapes de centrifugation coûteuses (S. N. Kosourov et al., 2018).

La matrice d'immobilisation la plus utilisée a été l'alginate de calcium et une production d'H₂ a été possible avec des microalgues en appliquant la stratégie de privation nutritionnelle (soufre, phosphate) ainsi que par l'ajout de glucose et sans aucune carence minérale afin de maintenir une activité respiratoire significative (S. Kosourov et al., 2017; S. N. Kosourov & Seibert, 2009; Laurinavichene et al., 2006; Touloupakis et al., 2021). Les billes d'alginate de calcium contenant les microalgues ont été reportées comme stables avec une fuite cellulaire minimale et la conservation de la viabilité cellulaire pendant plus de 30 jours, (S. N. Kosourov et al., 2018).

I.4.3.4 Co-culture de microalgues et bactéries

Une autre stratégie étudiée pour induire des conditions anoxiques et favoriser la production d'H₂ consiste à ajouter des bactéries aérobies aux cultures de microalgues (Scognamiglio et al., 2021; Touloupakis et al., 2021). En effet, des nombreux travaux ont prouvé qu'une augmentation de la production d'H₂ par la co-culture de microalgues et de bactéries aérobies est possible (Fakhimi et al., 2019, 2020; He et al., 2018; Mona et al., 2020). Le principal avantage de la co-culture est la consommation de l'O₂ issu de la photosynthèse par de les bactéries aérobies. Au même temps, le CO₂ libéré lors de la fermentation bactérienne (d'un substrat organique fourni à la culture) peut soutenir la croissance des microalgues. En outre, de nombreux métabolites peuvent être échangés entre ces micro-organismes, tels que les sources de carbone, d'azote, de phosphore et de soufre, ainsi que les vitamines (Fuentes et al., 2016; Hom et al., 2015). Néanmoins, il faut souligner que la production à grande échelle d'H₂ avec *Chlamydomonas* ou d'autres microalgues en consortium avec des bactéries aérobies nécessiterait de comprendre et maîtriser l'interaction complexe entre les deux espèces pour créer une synergie favorisant la production d'H₂ ainsi que l'impact des bactéries sur le transfert radiatif (Touloupakis et al., 2021).

I.4.3.5 Production d'H₂ induite sans stress nutritionnel

I.4.3.5.1 Réduction physique de l'oxygène dans la culture

Afin d'imposer des conditions anoxiques, des méthodes physiques cherchant à balayer ou piéger les molécule d'O₂ ont été implémentées pour la production d'H₂ avec des microalgues, sans que cela nécessite d'une limitation nutritionnelle. L'utilisation des gaz inertes tels que l'azote (N₂) ou l'argon (Ar) peuvent être utilisés pour éliminer l'O₂ dans le PBR (Dubini & Gonzalez-Ballester, 2016; Touloupakis et al., 2016). De façon

similaire, il est possible de réduire l'O₂ dans la culture à l'aide des substances agissant comme des piègeurs. Il a été montré que le sulfite de sodium Na₂SO₃, ou le bisulfite de sodium NaHSO₃ permettent d'améliorer la production d'H₂ (Ma et al., 2011; Paramesh & Chandrasekhar, 2020). De même, l'utilisation d'un agent réducteur comme la cystéine a permis de réduire la quantité d'O₂ dans la culture et donc d'observer une production d'H₂ 5 fois plus élevée que dans le protocole de carence en soufre (Márquez-Reyes et al., 2015). De façon générale, si bien certains piègeurs de l'O₂ peuvent aider à améliorer les production d'H₂, ils peuvent aussi affecter la croissance et entraînent une amélioration plutôt dans une courte période de temps (Ma et al., 2011; Márquez-Reyes et al., 2015).

I.4.3.5.2 Contrôle de la fraction volumique éclairée

Les cultures de microalgues en PBR peuvent être opérées selon différents régime de lumière caractérisés par la valeur de la fraction volumique éclairée γ (cf. section I.3.5). De plus, les conditions de culture en PBR sont généralement définies pour atteindre un régime photolimité ($\gamma < 1$) en raison de l'augmentation de la concentration en biomasse nécessaire pour intensifier le procédé. Ainsi, il est possible de conduire une culture en régime photolimité avec une fraction volumique éclairée suffisamment faible, de manière à ce que la croissance photosynthétique atteigne un équilibre avec la perte de biomasse due à la respiration. À l'échelle du PBR, cela signifie que l'oxygène produit par l'activité photosynthétique est consommé par l'activité respiratoire dans la zone sombre du PBR. Cela permettrait donc d'obtenir une production nette d'O₂ proche de zéro et de créer les conditions anoxiques requises pour la production d'H₂.

En effet, une stratégie a été élaborée pour la mise en anoxie et la production d'H₂ avec la microalgue *C. reinhardtii* basé uniquement sur le contrôle de la fraction volumique éclairée en conditions autotrophes (Degrenne et al., 2011). Enfin, ce protocole, aussi connu sous le nom de protocole d'hypoxie, a permis de produire de l'H₂ de façon transitoire pendant 4 jours sans aucune limitation nutritionnelle et avec une fraction volumique éclairée $\gamma < 0.23$. Le protocole en question consiste en 6 étapes (Figure I-29) :

1. Début de culture en mode discontinue à faible concentration avec un flux incident $q_{0,1}$. À ce stade la lumière n'est pas totalement absorbée du fait de la faible concentration cellulaire.

2. La croissance de cellules de microalgues augmente progressivement et entraîne l'apparition d'une zone sombre dans le PBR. La lumière est donc totalement absorbée et devient limitante.
3. La concentration cellulaire augmente jusqu'à atteindre un état stationnaire donnée par la limitation de lumière. La contribution de l'activité photosynthétique et respiratoire est en équilibre.
4. La concentration en cellule se stabilise, ce qui entraîne une production d'O₂ constante et non-nulle, inhibant la production d'H₂. Pour induire l'anoxie, la culture est soumise à une période d'obscurité ($q_{0,2} = 0 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$).
5. Une fois l'anoxie obtenue par la phase d'obscurité, le flux incident $q_{0,3}$ est modifié afin de maintenir les conditions anoxiques. Pour ce faire, $q_{0,3} < q_{0,1}$.

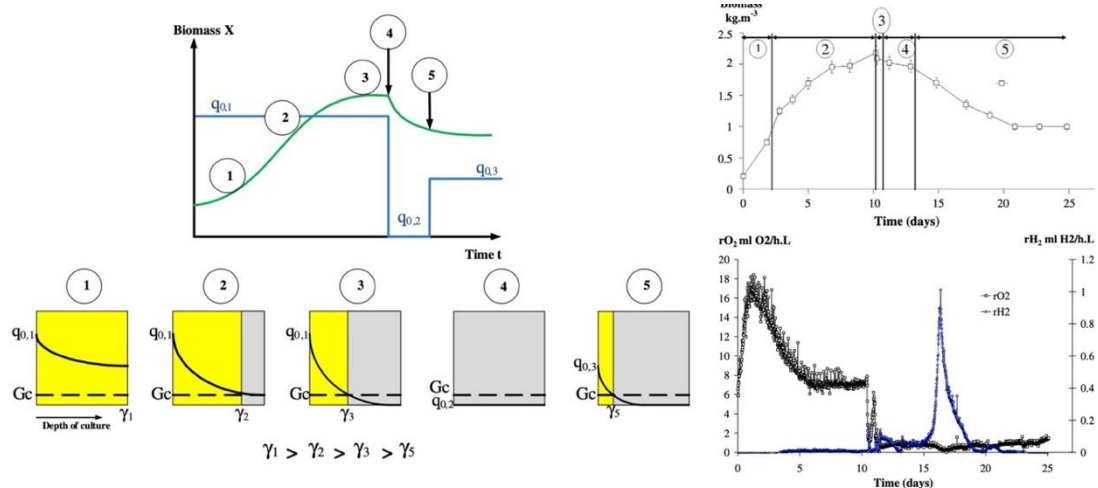


Figure I-29. Protocole d'hypoxie pour la photoproduction d'H₂. À gauche le schéma des étapes du protocole basé sur le contrôle de la fraction volumique éclairée. À droite les résultats obtenus par Degrenne et al., 2011.

I.4.3.5.3 Cycles de lumière et obscurité

Une stratégie basée sur la mise en place des cycles de lumière et obscurité sans aucune limitation nutritionnelle a été développée pour la production soutenue d'H₂ (Figure I-30) (S. Kosourov et al., 2018). Les auteurs de ce travail montrent qu'une photoproduction efficace d'H₂ a été maintenue dans des cultures de *C. reinhardtii* pendant au moins trois jours en faisant passer les suspensions de microalgues d'une lumière continue à des cycles de lumière et obscurité rapides. Chaque cycle était composé d'un pulse lumineux fort de 1 seconde suivi d'un passage à l'obscurité de 9 secondes. Le protocole est très simple,

n'endommage pas les cellules et est reproductible même dans des conditions autotrophes strictes (S. Kosourov et al., 2018).

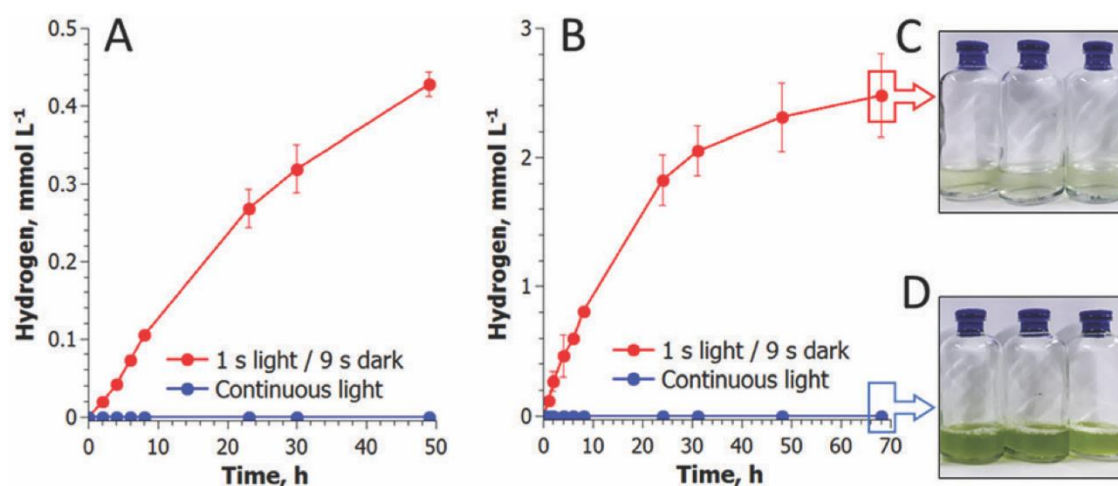


Figure I-30. Production d' H_2 obtenue à partir d'une culture de *C. reinhardtii* soumise à des cycles de lumière et obscurité (S. Kosourov et al., 2018). (A) culture photoautotrophe, (B) culture photohétérotrophe, (C) cellules cultivées avec le protocole des cycles de lumière/obscurité, (D) cellules cultivées en lumière continue.

La Figure I-30A et Figure I-30B présentent les résultats obtenus avec la stratégie basée sur les cycles rapides de lumière et d'obscurité. On observe une production soutenue d' H_2 indépendamment des conditions de culture photoautotrophe et photohétérotrophe. En revanche, les cultures en lumière continue, comme on pouvait s'y attendre, n'ont pas produit de l' H_2 et ont servi de cultures témoins. La Figure I-30C et Figure I-30D montrent que la croissance dans les cultures soumises au protocole de cycles rapides de lumière/obscurité est presque inexistante en comparaison à la culture témoin. Ces résultats ont permis de mettre en évidence la compétition pour le pouvoir réducteur photosynthétique entre l'hydrogénase et les voies de fixation du CO_2 (S. Kosourov et al., 2018). Cette stratégie peut être comparable à celle du contrôle de la fraction volumique éclairée, étant donné qu'un temps caractéristique de passage à l'obscurité et à la lumière est également imposé dans un PBR opérant avec une faible fraction volumique éclairée ($\gamma < 0.23$).

I.4.3.6 Système de culture bi-étagé de photoproduction de biohydrogène en continu

Jusqu'à présent la plupart des stratégies évoquées de production d' H_2 à partir de microalgues sont réalisées avec des cultures fonctionnant en mode discontinu, où la

formation d'H₂ se fait de façon transitoire. Même si des efforts ont été fait pour assurer une anoxie prolongée et obtenir une production soutenue d'H₂, peu des travaux sur la production en d'H₂ en mode continu ont été réalisés. À notre connaissance, deux études concernant la production d'H₂ en mode continu ont été répertoriée à partir de la culture de cyanobactéries (Dechatiwongse et al., 2015; Lichtl et al., 1997) et tandis qu'une seule étude a été relevée à partir de la culture de microalgues (Fedorov et al., 2005). De manière générale, la production d'H₂ peut être réduite à un minimum deux étapes : (i) la croissance des cellules de microalgues et (ii) l'établissement des conditions anoxiques nécessaires à la production de l'H₂ avec l'enzyme hydrogénase. Si ces étapes sont mises en œuvre dans un même système de culture, elles sont séparées dans le temps, ce qui entraîne une production d'H₂ de façon transitoire. Si les étapes sont séparées dans l'espace, on parlera alors d'un système bi-étagé pouvant être opéré en mode continu. Ainsi pour un fonctionnement en continu, deux systèmes de culture seraient disposés en série et opérés chacun avec des conditions de culture différentes, ce qui donnait lieu à deux états physiologiques différents. En fait, cette stratégie de culture à deux étages a été conduit avec succès pour augmenter la productivité de production des lipides et sucres de réserves chez les microalgues (Nagappan et al., 2019).

La seule étude portant sur la production d'H₂ en continu par *C. reinhardtii* a été réalisée avec le protocole de carence en soufre. Les auteurs ont utilisé un système bi-étagé conformé par deux PBR d'un litre chacun. Le premier PBR était consacré à la croissance cellulaire en conditions aérobies et limitées en sulfate, et le deuxième PBR à la consommation du sulfate résiduel afin de maintenir les conditions anoxiques et la production d'H₂. La concentration en sulfate du milieu alimentant le premier PBR, les taux de dilution des deux PBR et le flux incident du deuxième PBR ont été l'objet d'une étude paramétrique qui a permis, dans le meilleur des cas, une production d'H₂ pendant plus de 4000 heures (données et figures non-montrées dans la publication) (Fedorov et al., 2005).

I.4.3.6.1 Le système de culture bi-étagé d'étude

Un système de culture bi-étagée pour la photoproduction d'H₂ à partir de la microalgue *C. reinhardtii* a été proposé au laboratoire GEPEA à la suite de la thèse de Camille Lemasson (2015) (Figure I-31). Ce système de culture est composé d'un premier étage dédié à la formation d'une biomasse riche en amidon et un deuxième étage consacré

spécifiquement à la production d'H₂ à partir du protocole de contrôle de la fraction volumique éclairé expliqué précédemment. Pour le premier étage, une limitation azotée est appliquée à la culture afin de permettre la croissance cellulaire, d'induire l'accumulation de réserves d'amidon intracellulaire et de réduire l'activité photosynthétique. Pour le deuxième étage, le flux de lumière incident imposé $q_{0,2}$ est beaucoup plus faible par rapport à $q_{0,1}$ (étage 1) afin de maintenir les conditions anoxiques grâce à une zone sombre importante dans le PBR, et ainsi favoriser la production d'H₂.

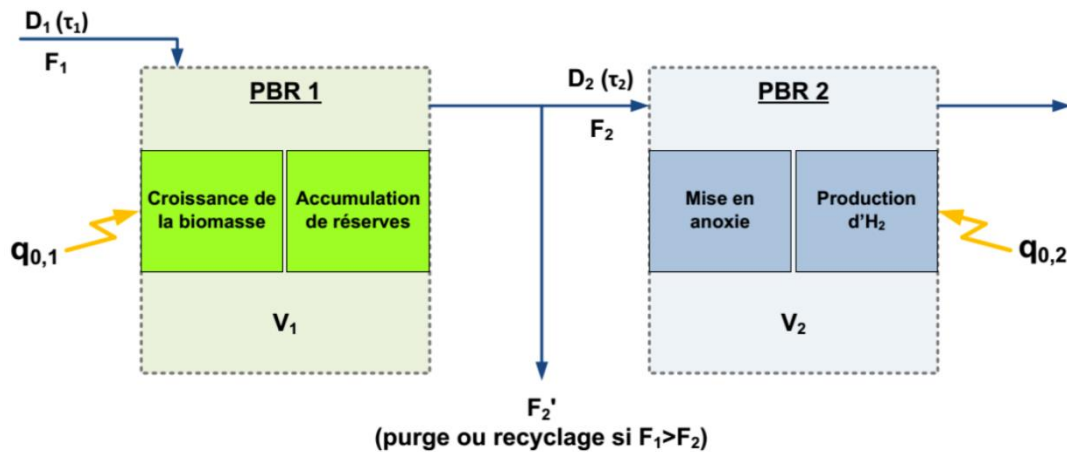


Figure I-31. Schématisation du système bi-étagé pour la photoproduction d'H₂. Tiré de Lemasson 2015.

La formation d'une biomasse riche en amidon dans l'étage 1 a été choisie dans le but de : (i) privilégier la voie de production PSII-indépendante lors de la production d'H₂ dans l'étage 2, et (ii) de diminuer la production nette d'oxygène dans l'étage 1 afin de favoriser la mise en anoxie dans l'étage 2. En effet, les premiers travaux effectués sur le système de production bi-étagé ont montré que la vitesse spécifique et le temps de production d'H₂ ont augmenté deux fois lorsqu'une culture a accumulé de l'amidon par rapport à une culture sans réserve interne. De même, le volume d'H₂ produit a été quatre fois plus élevé lorsque la culture a accumulé de l'amidon au préalable (Lemasson, 2015).

La complexité d'opérer un système de culture bi-étagé en continu réside dans la maîtrise et contrôle des états physiologiques de chaque étage, la régulation de l'état physiologique de l'étage 1 résulte clé pour le maintien de la production d'H₂ puisque les cultures limitées par la source d'azote se trouvent dans un état physiologique complexe (cf. section I.4.3.1) ce qui rend difficile le maintien de la culture à un état physiologique donnée. Il est

important à souligner que lorsqu'on parle d'état physiologique, on parle du niveau de réserves d'amidon, du contenu pigmentaire et du nombre de cellules. Enfin, en fonction l'état physiologique rentrant l'étage 2, une production d'H₂ pourrait être optimisée par la gestion de son taux de dilution D_2 (Lemasson, 2015).

I.5 Conclusions et objectifs de la thèse.

L'hydrogène est très probablement la molécule énergétique de l'avenir, et la recherche ainsi que plusieurs pays, comme la France, se mobilisent de plus en plus pour trouver des moyens de production durables et décarbonés. C'est pourquoi l'utilisation de micro-organismes photosynthétiques s'ouvre comme alternative de production d'H₂ à partir de matières premières simples, peu coûteuse et renouvelables. Cependant, la culture de microalgues doit être réalisée dans des conditions de culture particulières et favorables à la production d'H₂, ainsi que dans des systèmes de culture permettant l'étude et l'optimisation de ces conditions. Deux voies de production photosynthétique d'H₂, directe (PSII-dépendante) et indirecte (PSII-indépendante), sont possibles en fonction de la source d'électrons (biophotolyse de l'eau ou dégradation de réserves carbonées). Plusieurs stratégies de production d'H₂ à partir de microalgues ont été explorées dans le but de : (i) imposer les conditions anoxiques nécessaires à l'expression et l'activité de l'hydrogénase, l'enzyme qui catabolise la réaction de formation d'H₂, et (ii) privilégier une des deux voies de production photosynthétique d'H₂.

La stratégie d'étude choisie pour cette thèse porte sur le système de culture bi-étagé pour la photoproduction en continu d'H₂ avec la microalgue *C. reinhardtii*. Ce système permet de diviser spatialement les deux étapes clés dans la production d'H₂, à savoir, l'accumulation de réserves carbonées sous la forme d'amidon à partir d'une limitation azotée (étage 1) et l'établissement des conditions anoxiques grâce au protocole de contrôle de la fraction éclairée (étage 2). La stabilité de la production d'H₂ avec le système de culture bi-étagé dépend notamment de la maîtrise et le contrôle de l'état physiologique de l'étage 1. Par conséquent, l'objectif principal de cette thèse est d'étudier l'accumulation de réserves carbonées chez *Chlamydomonas reinhardtii* dans des conditions de limitation azotée afin de caractériser les phénomènes majeurs qui régissent la limitation nutritionnelle. De plus, la mise en place d'un système de culture bi-étagé amélioré et la validation du pilote de production d'H₂ en continu sont également considérées.

Chapitre II

II. Développement d'un protocole expérimental pour l'étude en conditions dynamiques de l'accumulation de réserves carbonées chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* lors d'une carence azotée progressive.

Résumé :

Ce chapitre a pour but de présenter la démarche scientifique suivie pour mettre en place un protocole d'étude de la mise en réserve de sucres chez la microalgue *C. reinhardtii* en conditions de limitation par la source d'azote. La définition de ce protocole est nécessaire pour l'élaboration d'une base de données expérimentales utile pour le développement d'outils de suivi et d'analyse du 1^{er} étage du procédé bi-étagé de photo-production de biohydrogène. Cette étude a porté sur l'exploration de 5 conditions opératoires différentes afin de cibler les meilleures conditions susceptibles de réaliser un suivi complet de la phase d'accumulation de sucres. Les conditions opératoires ont tenu compte des paramètres comme : le mode de régulation de l'oxygène dissous afin d'éviter un stress oxydatif important, la qualité des inocula pour assurer la répétabilité du point de départ des cultures en discontinu et la composition du gaz vecteur pour l'aération et la bonne estimation de la composition gazeuse en sortie du PBR réalisé par la méthode des bilans gazeux. Finalement, une condition opératoire a été retenue pour l'étude de la cinétique de mise en réserve en conditions de carence azotée progressive.

II.1 Introduction

À l'issue des premiers travaux portant sur la mise en place du procédé bi-étagé pour la photoproduction en continu de biohydrogène avec la microalgue *C. reinhardtii*, présenté dans la synthèse bibliographique de cette thèse (chapitre 1), la maîtrise du premier étage du procédé comprenant la conduite d'une culture en conditions de limitation azotée pour induire une accumulation d'amidon s'est avérée une étape clé pour espérer pouvoir stabiliser et contrôler une production continue d'H₂. La difficulté de l'opération de l'étage 1 réside à stabiliser dans le temps une production de biomasse enrichie en amidon qui servira à l'alimenter en continu l'étage 2 de production d'H₂. En effet, des perturbations

sur les paramètres opératoires ou sur l'état physiologique de la culture pourrait conduire à une perte des conditions stationnaires espérées, impactant la production d'H₂ dans l'étage 2. Par ailleurs, l'absence de contrôle dans l'étage 1 du procédé envisagé pourrait même conduire à gêner la mise en place des conditions anoxiques nécessaires à l'expression de l'enzyme hydrogénase par *Chlamydomonas reinhardtii* et donc empêcher la production d'H₂.

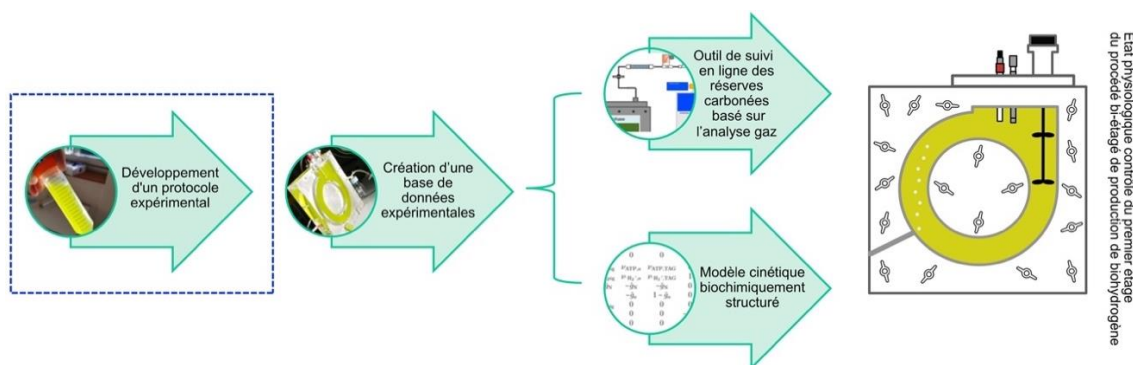


Figure II-1. Ligne de progression stratégique pour la maîtrise d'une culture en limitation azotée accumulant des réserves carbonées : étape caractéristique du premier étage du procédé bi-étage de production d'H₂. La ligne bleue en discontinu correspond à la première étude à réaliser et étant traitée dans ce chapitre.

Comme sera montré en détails dans les chapitres ultérieurs, l'approche suivie pour la maîtrise et le contrôle de l'étage 1 repose sur le développement d'outils d'analyse et de suivi, à savoir la construction d'un estimateur pour le suivi en temps réel de l'accumulation d'amidon et l'élucidation des relations cinétiques nécessaires pour la création d'un modèle biochimiquement structuré permettant de décrire la mise en réserve en conditions de limitation par la source d'azote (Figure II-1). C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'étude dynamique de la mise en réserve de l'amidon chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* pour différentes conditions d'éclairage. Ceci a conduit à l'élaboration d'une base de données expérimentales. Il a été pour cela nécessaire de mettre en place un protocole de culture rigoureux afin d'étudier l'effet d'une limitation par la seule source d'azote sur la réponse biologique de la microalgue étudiée.

L'objectif de ce chapitre est de détailler la démarche expérimentale suivie pour développer le protocole de culture de la microalgue verte *C. reinhardtii* afin d'étudier le comportement dynamique de cette dernière en conditions de limitation azotée (Figure II-1).

II.2 Matériels et méthodes

II.2.1 Dispositif expérimental

II.2.1.1 Photobioréacteur

Un photobioréacteur (PBR) plan de type torique en polyméthacrylate de méthyle acrylique (PMMA) avec un volume utile de 1.5 L et une épaisseur de 4 cm a été utilisé pour réaliser les cultures de *C. reinhardtii* en conditions de carence progressive par la source d'azote. En effet, les PBR toriques ont été abondamment utilisés au laboratoire pour cultiver et étudier le comportement cinétique des microalgues en raison de leur niveau d'instrumentation permettant un contrôle rigoureux des paramètres opératoires en cours de culture (Degrenne, 2009; Fouchard et al., 2008; Kazbar et al., 2019; Lemasson, 2015; Martzloff, 2013; Urbain, 2017). De même, le PBR torique étant un PBR plan permet de modéliser l'atténuation lumineuse à une dimension par le modèle à deux-flux (Pottier et al., 2005b) et donc de caractériser la vitesse spécifique d'absorption de photons de la suspension de microalgues. Le flux de lumière incidente q_0 dans le PBR est contrôlé à l'aide d'un panneau de LEDs et d'une courbe de calibration élaborée à partir du flux de lumière moyen dans 13 positions dans le PBR pour différents voltages imposés au panneau LED. Le PBR torique est équipé également d'une sonde pH/température (InPro 4801SG/Pt100, Mettler Toledo, Switzerland), d'une sonde optique pour la mesure de l'oxygène dissous (OxRob10 sensor attached to a FireStingO2-Mini meter, Pyroscience, Germany), un système de débitmètres massiques air et CO₂ (EL-FLOW devices - Bronkhorst High-Tech) pour la régulation de l'oxygène dissous et le pH, respectivement, ainsi que d'un analyseur gaz de type spectromètre de masse (QMG 220, Pfeiffer Vacuum) pour la mesure de la composition gazeuse (O₂, CO₂, N₂) à la sortie du PBR (Figure II-2).

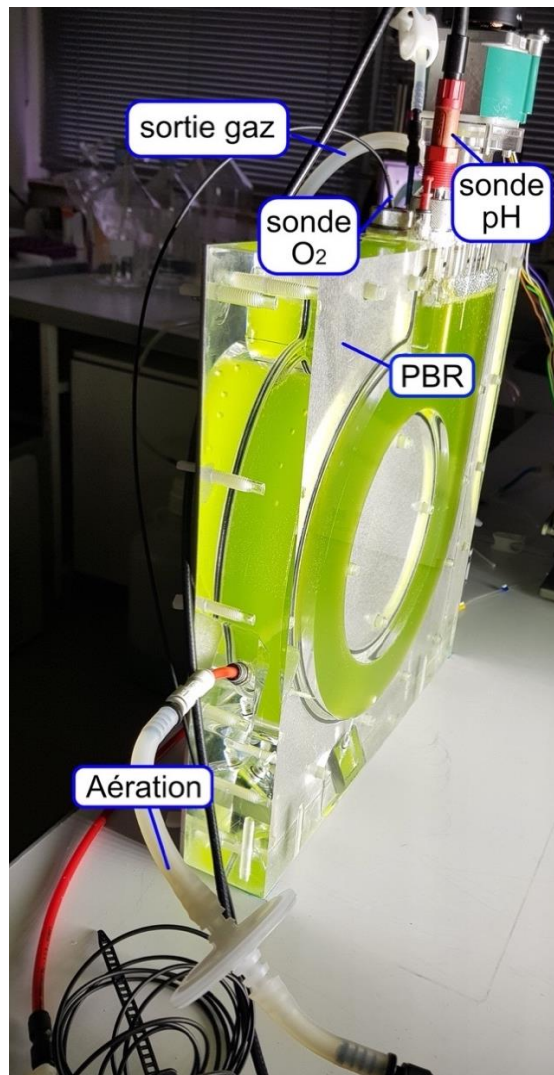


Figure II-2. PBR torique en PMMA utilisé lors des cultures en batch de *C. reinhardtii* en conditions de carence azotée progressive.

II.2.1.2 Régulations

II.2.1.2.1 pH, oxygène dissous et température

Les PBR toriques sont agités mécaniquement par une hélice marine et un bullage est possible pour la régulation de l' O_2 dissous et du pH. La régulation de l' O_2 dissous se fait via l'injection d'un gaz vecteur étant typiquement de l'air ou l'azote (N_2), et celle du pH se fait via l'injection du CO_2 pur. Pour le contrôle du pH, le CO_2 bullé acidifie le milieu de façon à garder une consigne de pH constante au cours de la culture, puisque la croissance microalgale tend à basifier le milieu de culture. De façon analogue, pour l'oxygène dissous, le débit envoyé sert à désorber l'oxygène qui est produit par les microalgues par balayage d'un gaz vecteur et donc maintenir un niveau d'oxygène dissous constant dans la culture. Ces régulations sont réalisées avec une action de type

Proportionnelle-Intégrale (PI). Il est important à noter que dans les PBR clos, comme c'est le cas des PBR toriques l'oxygène peut avoir un effet toxique pour les microalgues à trop forte concentration (Kazbar et al., 2019; Todisco, 2019; Urbain, 2017). Pour cette raison, une régulation a été mise en place de façon à contrôler la concentration en O₂ dissous (Titica et al., 2018).

Dans le cadre de notre étude, le pH a été régulé à une valeur de 7,5 et la température maintenue à environ 20°C. La concentration en oxygène dissous a été gérée de trois manières différentes pour comparaison : (i) avec un débit d'aération constant (15 mL/min) en utilisant du diazote (N₂) comme gaz de balayage afin de limiter l'accumulation du dioxygène en phase liquide par désorption ; (ii) avec une régulation de la concentration en oxygène dissous via un contrôleur de type PI (développé au laboratoire GEPEA) selon une consigne fixe de 100 % ou 130 % en oxygène dissous par rapport aux conditions de saturation avec de l'air, et (iii) avec une régulation de la concentration de l'oxygène dissous de type PI avec une consigne de 130% et un gaz de balayage de composition molaire standard de 0.45% en O₂ et 95.5% en N₂.

II.2.1.2.2 Contrôle des conditions de rayonnement

La concentration de la source d'azote inorganique dans le milieu de culture, à savoir, le chlorure d'ammonium (NH₄Cl) a été choisie de façon à ce que la limitation survienne pour une concentration en biomasse supérieure à 0.25-0.3 g/L de biomasse selon les données stœchiométriques connues de *C. reinhardtii* (Martzolff, 2013; Takache et al., 2012; Urbain, 2017). Cette concentration permettrait de découpler l'effet de la lumière et la présence d'une phase sombre sur l'accumulation de réserves carbonées en conditions de carence azotée progressive en se plaçant avant l'apparition d'une limitation par le transport de lumière.

II.2.1.3 Analyse de la composition gazeuse

Un suivi de la composition de la phase gazeuse a été réalisé avec un analyseur gaz (spectromètre de masse, micro-chromatographie gazeuse abrégé μ -GC, autre) afin de déterminer la composition gazeuse en sortie du PBR afin de mesurer la vitesse nette volumétrique de dégagement d'oxygène grâce à la méthode de bilans gazeux. L'utilisation des analyseur gaz a été implémenté dans les PBR toriques non seulement afin de mesurer la production direct des métabolites d'intérêt comme l'H₂ (Degrenne,

2009; Fouchard et al., 2008), mais également de développer des outils de suivi en temps réel de la croissance microalgale basés sur la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène r_{O_2} (Cogne et al., 2001; Urbain, 2017).

Pour les expériences présentées dans ce chapitre un spectromètre de masse (QMG 220, Pfeiffer Vacuum) a été utilisé pour déterminer la composition gazeuse en O_2 , CO_2 , N_2 en sortie du PBR. Le gaz à analyser entre dans une chambre d'analyse via un capillaire, dans laquelle il est bombardé par des électrons émis à travers d'un filament de tungstène afin d'ioniser les espèces présentes dans le gaz. Les ions obtenus, aussi connus comme ions moléculaires, sont ensuite dirigés à un analyseur quadripolaire possédant quatre électrodes cylindriques parallèles soumises à une tension électrique et agissant comme un filtre (Figure II-3). Les ions sont séparés en fonction du ratio masse sur charge, et sont collectés par un détecteur à multiplicateur d'électrons secondaires (SEM) pour amplifier le signal. Le signal brut est converti en spectre de masse par le système d'acquisition de l'appareil. Le spectre obtenu permet d'identifier l'intensité du signal pour chaque masse atomique. Le logiciel QUADERA® du fabricant permet de transformer les signaux d'intensité en quantités molaires.

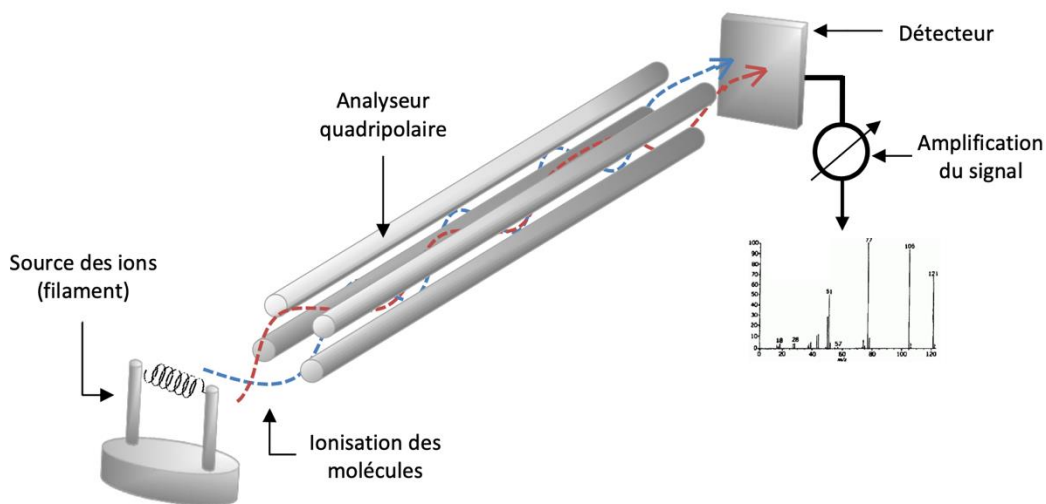


Figure II-3. Principe de mesure dans la chambre d'analyse d'un spectromètre de masse. Tiré de Lemasson, 2015

Il est pertinent de mentionner que les analyseurs de gaz nécessitent d'un débit de gaz à l'entrée minimum pour une utilisation optimale (selon la technologie utilisée). À titre d'exemple, un spectromètre de masse de l'entreprise Pfeiffer Vacuum nécessite d'un débit minimum de 8 mL/min, tandis qu'un μ -GC de l'entreprise Agilent a besoin d'un

débit supérieur à 20 mL/min. L'utilisation du spectromètre de masse a été remplacé par un μ -GC après cette étude dû à la difficile opération de l'unité (cassure du filament en tungstène très fréquent et de réparation laborieuse) et l'intégration des résultats obtenus via le programme natif d'exploitation de données à l'interface LabVIEW de pilotage.

II.2.1.4 Pilotage des conditions opératoires

Le pilotage et suivi des paramètres opératoires des cultures en discontinu tels que le flux incident q_0 , les débits gazeux à l'entrée du PBR, les consignes ainsi que le paramétrage des régulateurs PI pour le pH et l'oxygène dissous sont fixés au travers d'une interface réalisée à l'aide du logiciel LabVIEW. Le programme associé permet aussi de gérer l'acquisition des données en cours de culture.

II.2.1.5 Caractéristiques biologiques de la souche

II.2.1.5.1 Souche et milieu de culture

La souche sauvage 137 AH de la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a été utilisée pour les cultures en PBR. Cette souche a été obtenue de la souchothèque du Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA, Cadarache, France). Un milieu salin basé sur le milieu Sueoka a été utilisé pour imposer une carence progressive en azote. Le milieu contenait (en g/L) : NH_4Cl 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.14, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05, KH_2PO_4 0.3050, NaHCO_3 1.68 et 1mL/L d'une solution Hutner de microéléments (Hutner et al., 1950).

Un milieu de culture a été également utilisé pour la préparation des inocula en conditions non-limitantes. Ce milieu diffère du milieu utilisé pour l'étude en carence azotée progressive décrit auparavant, uniquement dans la concentration en chlorure d'ammonium étant égal à 0.75 g/L.

II.2.1.5.2 Préparation des inocula

Deux types de préparations d'inoculum ont été utilisés. La première façon d'élaborer les inocula nommée « Erlenmeyer CO_2 » a consisté à préparer du milieu de culture TAP (Tris-Acétate-Phosphate) sans acétate et le saturer en CO_2 par bullage. Ensuite le milieu a été filtré dans une bouteille stérile et utilisé pour réaliser les pré-cultures servant à produire les inocula nécessaires à l'ensemencement des cultures en discontinu. Ce type d'inoculum a été envisagé initialement pour adapter progressivement *C. reinhardtii* aux

conditions autotrophes et éliminer l'acétate résiduelle. La deuxième stratégie de préparation des inocula mise en place au cours de cette étude a consisté à produire en continu de la biomasse de *C. reinhardtii* dans un PBR de type airlift en conditions autotrophes et non-limitantes à l'exception de la lumière, afin de disposer d'un volume d'environ 120 mL de récolte utilisé pour ensemercer ensuite une culture discontinue en PBR.

II.2.2 Démarche expérimentale

II.2.2.1 Choix du mode de fonctionnement du photobioréacteur.

Un mode de fonctionnement discontinu des cultures en photobioréacteur (PBR) a été privilégié, afin d'étudier le comportement dynamique des microalgues en réponse à un stress azoté. Il est important à noter qu'en vue de la modélisation cinétique, l'identification des paramètres du modèles en conditions dynamiques sur différentes plages de conditions opératoires permettrait de maximiser la robustesse des modèles (Urbain, 2017),

II.2.2.2 Phase biologique d'intérêt lors de la culture de *C. reinhardtii* en conditions de carence progressive par la source d'azote.

Comme expliqué dans l'étude bibliographique présentée au chapitre I, une carence nutritionnelle en azote entraîne l'accumulation de réserves carbonées sous forme d'amidon et/ou de lipides de réserve que sont les triacylglycérides (TAG) chez *C. reinhardtii*. L'accumulation de ces deux molécules de réserve n'ont pas lieu de façon concomitante et débute par l'accumulation de sucres, comme montrée par plusieurs études (Adesanya et al., 2014; Juergens et al., 2015; Longworth et al., 2012; Park et al., 2015). Notre étude portant sur l'accumulation de réserves sous forme d'amidon, le suivi cinétique des cultures réalisées n'a pas été réalisé au-delà de l'observation d'une stagnation dans la mise en réserve pour ce dernier, s'affranchissant de la phase d'accumulation de TAGs.

II.2.2.3 Plan d'expériences

Une campagne de 5 cultures en batch avec un PBR torique à flux lumineux incident constant de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ont été effectuée dans le but de cibler les meilleures conditions de culture pour étudier la dynamique de mise en réserve de l'amidon lors d'une carence

azotée progressive. Le tableau II-1 résume les différentes conditions opératoires évaluées lors de cette étude.

Tableau II-1. Conditions opératoires étudiées pour les cultures réalisées lors du développement d'un protocole d'étude de la mise en réserve de l'amidon chez *C. reinhardtii* à flux lumineux incident constant de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

Batch	Gaz vecteur	Inoculum	Régulation	
			O ₂ dissous	pH
1	N ₂	Erlenmeyer CO ₂	Débit constant	PI
2	N ₂	Erlenmeyer CO ₂	Débit constant	PI
3	N ₂	Erlenmeyer CO ₂	PI	PI
4	N ₂	PBR Air-lift	PI	PI
5	Mélange O ₂ /N ₂ *	PBR Air-lift	PI	PI

*Mélange standard à 4.5% Mol O₂ et 95.5% Mol N₂

*PI : Proportionnelle-Intégrale

Afin d'étudier les changements opérés au sein de la phase biotique, nous avons réalisé un suivi de la concentration en biomasse totale C_{XT} et la teneur en sucres totaux w_{sug} dans le PBR au cours des différentes cultures réalisées. Pour phase abiotique, une attention particulière a été portée au suivi de la concentration en ammonium $C_{\text{NH}_4^+}$, de l'évolution de la concentration en oxygène dissous et des débits de gaz injectés à l'entrée du PBR ($Q_{\text{N}_2, \text{in}}$ ou $Q_{\text{mix}, \text{in}}$). Enfin, un suivi rigoureux de la composition de la phase gazeuse en sortie du PBR a été réalisée afin de disposer d'une mesure indirecte de la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène r_{O_2} .

II.2.3 Suivi de culture

II.2.3.1 Concentration en biomasse

Pour la détermination de la concentration en biomasse totale exprimée en gramme de masse sèche par unité de volume de culture C_{XT} en g/L, un volume connu de culture est prélevé et filtré sur un filtre en microfibre de verre (Whatman GF/F) de porosité connue ($0.7 \mu\text{m}$), préalablement séché et pesé. Le filtre avec les cellules retenues est ensuite séché dans une étuve à 110°C pendant 24 h. Le filtre est ensuite refroidi dans un dessiccateur, puis pesé. La concentration en biomasse C_{XT} est alors calculée par différence entre les deux pesées des filtres avant et après filtration en le rapportant au volume de culture filtré.

Chaque mesure est le fruit de 3 réplicas et restituée sous la forme une valeur moyenne de C_{XT} .

II.2.3.2 Concentration et teneur en sucres totaux

La concentration en glucides totaux a été déterminé par la méthode de (Dubois et al., 1956). En présence du phénol, les polysaccharides hydrolysés en monosaccharides par l'acide sulfurique concentré génèrent des composés de type furfural ou de l'hydrométhylfurfural de coloration jaune-orange dont l'intensité varie en fonction de la concentration présente en sucres dans l'échantillon. Un volume de culture est centrifugé à 6000 rpm et le culot est repris dans de l'eau distillée. Ensuite, un volume de phénol de 0,5 mL est rajouté dans un volume d'échantillon de 0,5 mL (dilué si besoin). Puis un jet d'acide sulfurique concentrée d'un volume de 2.5 mL est additionné. À compter de ce moment, l'échantillon est incubé 10 minutes à température ambiante. Passé ce temps, l'échantillon est agité à l'aide d'un vortex pendant 10 secondes et incubé à 35°C pendant 30 minutes. Finalement, l'absorbance de l'échantillon est mesurée à 483 nm avec un spectrophotomètre (Jasco V-630) contre... La conversion de l'absorbance à ... en concentration en g/L se fait au travers d'une courbe d'étalonnage réalisée préalablement à l'aide une solution mère de glucose à 0,1 g/L. La teneur en sucres totaux w_{sug} peut alors être estimé en faisant le rapport entre la concentration en sucres totaux C_{sug} présent dans la culture et la concentration en biomasse totale C_{XT} , selon le calcul suivant : $w_{sug} = C_{sug}/C_{XT} \times 100$.

II.2.3.3 Concentration en ammonium

Des kit commerciaux LCK 303 et LCK 305 de l'entreprise HACH ont été utilisés pour la mesure des ions ammonium NH_4^+ . Pour son utilisation un volume de culture d'entre 0.2 – 5 mL est filtré avec un filtre seringue à utilisation unique de taille de pores de 0.2 μm (Minisart, Sartorius) et le surnageant obtenu est ajouté dans une fiole du kit pendant 15 minutes à température ambiante. Puis, la fiole du kit est utilisée pour mesurer directement la concentration en ammonium en utilisant un spectrophotomètre dédié (HACH Lange DR2800) à une longueur d'onde de 695 nm.

II.2.3.4 Détermination de la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène

La vitesse volumétrique de production d'oxygène (r_{O_2}) a été déterminée à partir de l'écriture des bilans matière sur l'oxygène en phases gazeuse et liquide pour une culture

réalisée en mode discontinu. Compte tenu des faibles valeurs du temps de séjour dans la phase gazeuse, on peut faire une hypothèse de régime pseudo-permanent et le bilan matière sur l'oxygène en phase gazeuse s'écrit alors :

$$0 = (y_{O_2,in}G_{in} - y_{O_2,out}G_{out}) - N_{O_2} \quad (II.1)$$

avec N_{O_2} qui représente le débit molaire de transport de l' O_2 de la phase gaz vers la phase liquide. Les termes y_{O_2} se réfèrent aux fractions molaires de l'oxygène dans la phase gaz à l'entrée (in) ou à la sortie du PBR (out). La fraction d'oxygène à l'entrée est habituellement connue et à la sortie est mesurée à l'aide d'un analyseur gaz. De façon analogue, les termes G correspondent aux débits molaires globaux gazeux à l'entrée (in) et à la sortie (out) du PBR. Le débit molaire à l'entrée du PBR peut ainsi être calculé comme la somme de débits molaires des différentes espèces gazeuses injectées dans le réacteur. Quant au débit molaire à la sortie, il est calculé à partir du bilan matière sur le gaz vecteur (inerte) qui peut être soit du diazote (N_2) soit de l'argon (Ar).

Dans la phase liquide, le bilan matière molaire sur l' O_2 s'écrit comme suit (Pruvost et al., 2006) en supposant que le volume de culture reste constant et un écoulement parfaitement agité :

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = r_{O_2} + \frac{N_{O_2}}{V} \quad (II.2)$$

avec V le volume de la culture et C_{O_2} la concentration en oxygène dissous dans la phase liquide. Finalement en recombinaison les équations (II.1) et (II.2), on en déduit l'expression de la vitesse nette molaire de production d'oxygène, r_{O_2} :

$$r_{O_2} = - \left(\frac{y_{O_2,in}G_{in} - y_{O_2,out}G_{out}}{V} \right) - \frac{dC_{O_2}}{dt} \quad (II.3)$$

Il est important toutefois de noter que le terme $\frac{dC_{O_2}}{dt}$ est en règle générale négligeable compte tenu de la faible solubilité de l'oxygène, avec un erreur estimée à 2 % sur la production net de l'oxygène associée à ce terme (Urbain, 2017).

II.3 Résultats et discussion

II.3.1 Culture discontinue avec balayage du réacteur à débit de gaz constant et inoculum de type « Erlenmeyer CO₂ ».

Initialement deux cultures discontinues à flux lumineux constant de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ont été réalisées à partir d'inocula autotrophes de type « Erlenmeyer CO₂ » et une régulation de l'oxygène dissous par balayage du PBR avec débit de gaz constant (Tableau II-2). Afin de standardiser les conditions initiales en termes du nombre de cellules, une préculture concentrée d'environ 100 mL a été utilisée pour le lancement des cultures, ce qui nous a permis de partir d'une masse de cellules sensiblement constante d'environ 0.042 g/L (Figure II-4). De même, la concentration initiale en azote a été systématiquement mesurée en début des cultures afin de s'assurer des conditions d'établissement de la limitation azotée. Bien que la quantité d'ions ammonium initiale formulée dans le milieu de culture ait été préalablement défini (33,7 mg/L), il est possible que la concentration en ions ammonium résiduelle dans les inocula constitue un apport non négligeable pour la culture, comme nous avons pu effectivement le constater (Figure II-4). Le contenu cellulaire en chlorophylle *a* (Chl *a*) a été également suivi avec attention avec des teneurs dans la biomasse, variant entre 1,9 % et 2,4 %, pour les batch 1 et 2 respectivement (Figure II-4).

Tableau II-2. États physiologiques initiaux des cultures en batch.

Batch	Charge initiale en ammonium (mg/L)	Concentration initiale en biomasse (g/L)	Teneur en sucres totaux (%)	Teneur en Chl <i>a</i> (%)
B1	35,1	0,042	33,4	2,4
B2	41,8	0,042	26,2	1,9
B3	41,1	0,033	31,2	1,8
B4	32,0	0,046	18,0	2,0
B5	36,4	0,044	18,0	2,6

Il est important de noter que les états physiologiques initiaux des cultures en batch peuvent être soumis à une forte variabilité suivant la qualité des inocula. Ces derniers vont fortement impacter la dynamique de croissance pour une culture discontinue lors d'une limitation progressive par la source d'azote. Du point de vue des objectifs à atteindre, le paramètre clé pour caractériser l'état physiologique des cellules en cours de culture réside dans la mesure et le suivi de la teneur en sucres totaux, w_{sug} . En conditions nutritionnelles non-limitantes, *C. reinhardtii* possède une teneur en sucres totaux

comprise entre 18 et 20% de la masse sèche (Martzolff, 2013; Urbain, 2017). En conséquence, une valeur au début de la culture de w_{sug} supérieure à celle mesurée dans des conditions non-limitantes ne peut être expliquée que par l'accumulation de réserves ayant lieu au niveau des inocula. On observe dans la figure II-4 que pour les batch 1 et 2 avec des inocula type « Erlenmeyer CO₂ », les valeurs de w_{sug} varient entre 26 % et 33 %. Cela veut dire que ces inocula ont probablement déjà subi un stress nutritionnel entraînant un début d'accumulation de réserves sous forme de carbohydrates. Il est difficile de prouver quelle est la source nutritionnelle à l'origine de cette mise en réserve mais il est possible de spéculer sur plusieurs hypothèses. La première hypothèse porte sur une limitation en carbone inorganique étant donné que malgré la saturation initiale en CO₂ des inocula, son ajout acidifie le milieu de culture et par équilibre entre les phases gaz-liquide à pH acide, le CO₂ dissous tend à revenir sous sa forme gazeuse avant de pouvoir être consommé dans sa totalité par les cellules. Par conséquent, il se peut qu'à cause du passage d'une forte concentration en carbone inorganique vers des conditions à faible concentration comme celle présente dans l'air (0.04%) il ait eu lieu l'activation du mécanisme de concentration de carbone CCM (Carbon Concentrating Mechanism) favorisant ainsi l'accumulation des sucres de réserves (Wang et al., 2015). Il est aussi possible de penser qu'une concentration limitée des ions ammonium soit attendue dans les precultures en erlenmeyer mais cette hypothèse s'avèrerait moins crédible toutefois que les concentrations en ions ammonium trouvées au début de culture étaient plus élevées que celles prévues et mesurées dans la composition du milieu (Figure II-4). Pour les deux hypothèses suggérées, nous n'avons pas des éléments concluant nous permettant de les confirmer ou réfuter.

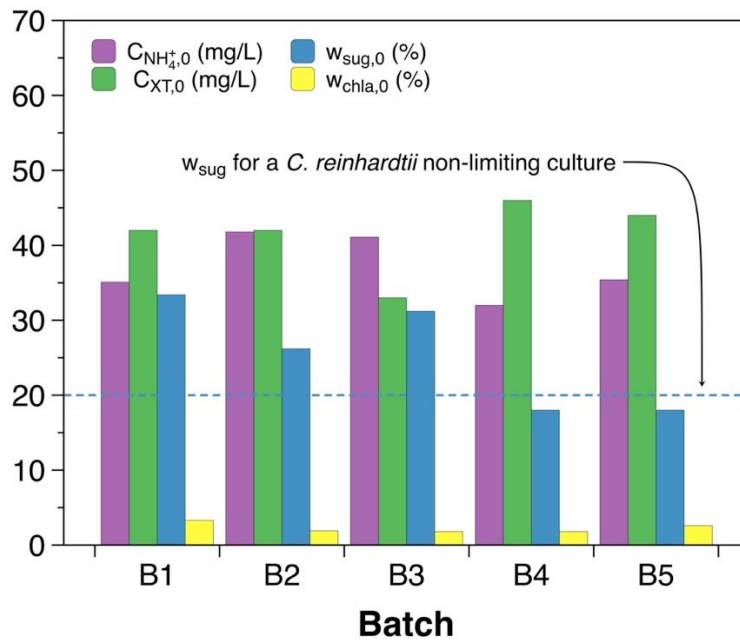


Figure II-4. États physiologiques initiaux des cultures en batch de *C. reinhardtii* en conditions de carence azotée progressive. La ligne bleu en discontinu marque la limite de teneur en sucres totaux répertoriée pour une culture en conditions non-limitantes.

La figure II-5 montre le suivi de la phase biotique et abiotique pour les batch 1 et 2. On peut observer dans la figure II-5A et II-5D qu'une concentration en biomasse totale comprise entre 0.9 et 1.0 g/L a été atteinte pendant la durée des cultures d'approximativement 60 h. On observe dans les mêmes figures que la valeur de la concentration en biomasse C_{XT} a continué d'augmenter au-delà de 35-40 h de culture après épuisement de l'ammonium dans le milieu et donc arrêt de la croissance, indiquant l'accumulation de réserves par les cellules de *C. reinhardtii*. De plus, dans les figures II-5B et II-5E on observe qu'en effet une accumulation de sucres se déroule pendant ces périodes de temps dans les deux cultures. De même, il peut être observé qu'une teneur maximale en sucres totaux d'environ 52-54 % est atteinte.

Une analyse de la phase abiotique présentée dans les figures II-5C et II-5F, a également été réalisée. Un débit fixe de 15 mL/min a été utilisé pour la régulation de l'oxygène dissous. Il a été observé dans les deux cultures une augmentation progressive de l'oxygène dissous avec la croissance cellulaire jusqu'à attendre 300 % (environ 26 mg/L d' O_2) par rapport à la saturation de l'oxygène dans l'air. Ces résultats est à mettre en perspective avec les travaux réalisées par (Kazbar et al., 2019; Raso et al., 2012; Sousa et al., 2013) qui ont montré qu'un effet négatif sur la productivité en biomasse est observé pour des concentrations en oxygène dissous égal ou supérieur à 31 mg/L (Kazbar et al.,

2019). D'autres études sur le sujet montrent une perte dans la productivité à partir des concentrations égales à 10 mg/L (Todisco, 2019). Il est donc possible que le niveau atteint en oxygène dissous ait induit un stress oxydatif important impactant la dynamique d'accumulation de réserves carbonées observée.

D'un autre côté, suite à l'épuisement de l'azote la concentration en oxygène dissous a chuté drastiquement (Figure II-5C et II-5F) entraînant un passage en anoxie puisque le gaz vecteur utilisé a été le diazote N₂. Ce passage en anoxie a empêché de continuer d'étudier la dynamique d'accumulation de réserves de sucres tant pour le batch 1 comme pour le batch 2.

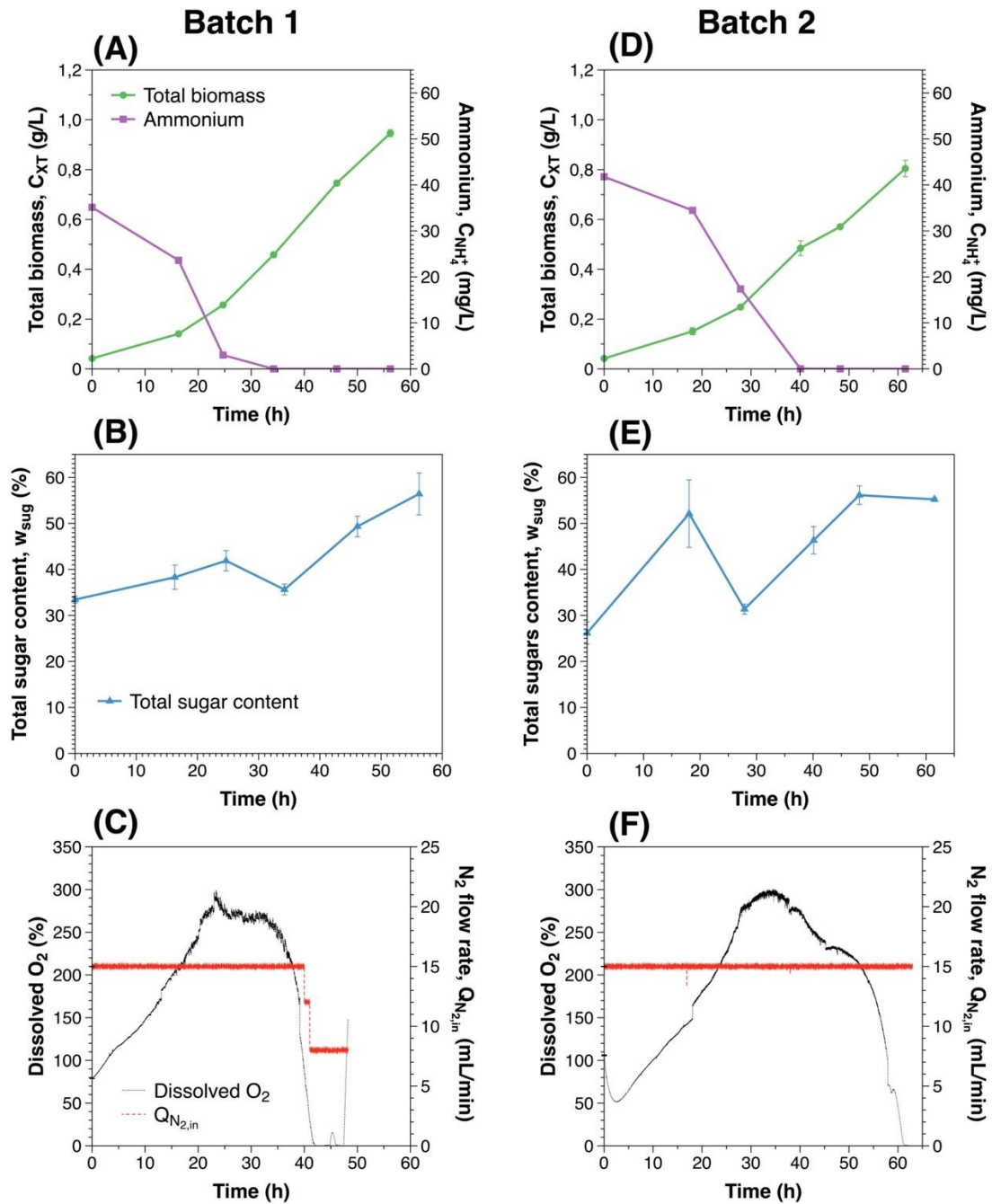


Figure II-5. Suivi de la phase biotique (concentration en biomasse C_{XT} et teneur en sucres totaux w_{sug}) et de la phase abiotique (concentration en ammonium $C_{NH_4^+}$, débit d'aération à l'entrée du PBR $Q_{N_2,in}$ et concentration en oxygène dissous donnée en pourcentage par rapport à la saturation de l'oxygène dans l'air) pour les batchs 1 et 2.

II.3.2 Culture en batch avec régulation de l'oxygène dissous de type PI et inoculum de type « erlenmeyer ».

Dans les conditions étudiées précédemment, un passage en anoxie a systématiquement été observé après épuisement de la source d'azote, et limité la plage d'observation d'une mise en réserve en termes de points expérimentaux exploitables. De ce fait, une régulation

de l'O₂ dissous a été mise en place pour le batch 3 (Figure II-6). Cette régulation visait à étendre la durée des manipulations pour pousser plus loin la phase de mise en réserve. Initialement, une consigne pour réguler la concentration en oxygène dissous dans le réacteur a été fixée à 100% la saturation de notre milieu avec de l'air. Cependant, le maintien de la concentration en oxygène dissous à cette valeur de consigne n'a seulement été possible qu'entre 20 et 35 h sur toute la durée du batch (Figure II-6C). Cela vient d'une production d'oxygène trop importante pendant la phase de croissance ne permettant pas une régulation de la concentration en oxygène dissous à la valeur de consigne souhaitée compte tenu des conditions d'aération et de transfert entre phases utilisées. Pour cette raison, une régulation à une consigne de 100% n'a pas été possible malgré la bonne dynamique du contrôleur. Toute de même, ces résultats montrent l'importance de bien dimensionner les débits d'aération en fonction de la dynamique du transfert gaz-liquide afin de réguler de façon appropriée l'oxygène dissous dans le PBR, même lors de cultures en conditions limitées ou carencées en azote. De même, il s'avère que le choix de la gamme de fonctionnement de débitmètre a été choisi pour assurer une bonne régulation simultanée du pH et de l'oxygène dissous, puisque lors qu'un débit d'aération est trop fort, cela peut entraîner une désorption rapide du CO₂. Pour les conditions d'étude du batch 3, le pH a bien été régulé à 7,5 et le débit maximum de CO₂ sollicité a été de 4 mL/min.

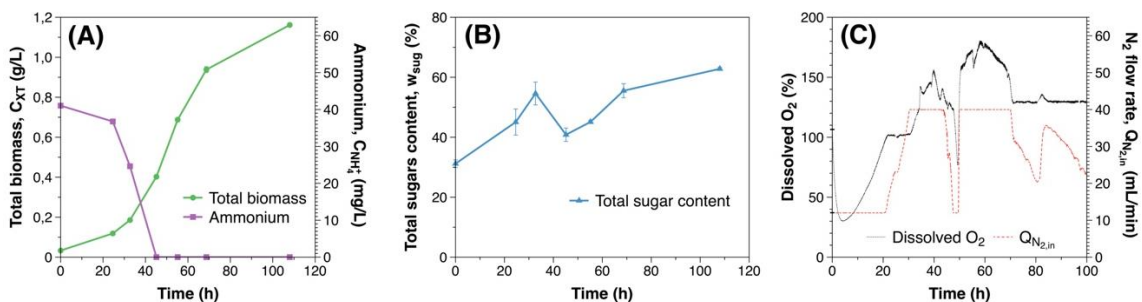


Figure II-6. Suivi de la phase biotique (concentration en biomasse C_{XT} et teneur en sucres totaux w_{sug}) et de la phase abiotique (concentration en ammonium $C_{NH_4^+}$, débit d'aération à l'entrée du PBR $Q_{N_2,in}$ et concentration en oxygène dissous donnée pourcentage par rapport à la saturation de l'oxygène dans l'air) pour le batch 3.

D'un autre côté, l'oxygène dissous a chuté à 75% après 50 heures de culture en correspondance avec l'épuisement de l'azote (Figure II-6C) et cela n'a pas conduit à un passage en anoxie mais a quand même entraîné une diminution dans la teneur en sucres totaux (Figure II-6B). Une accumulation de sucres est quand même observée à nouveau après 60h et a permis d'atteindre une teneur maximale en sucres totaux finale de 63%

(Figure II-6B), ce qui représente environ 10 % de plus par rapport à la teneur maximale reportée dans le batch 1 et 2. Le fait que l'accumulation des sucres ait été affectée par une diminution de la production d'oxygène, tout en s'affranchissant du passage en anoxie montre la complexité de décrire la mise en réserve en batch. D'autre part, la durée de phase de croissance pour le batch 3 a été de 45 heures, alors que pour les batch précédents cette phase a eu une durée moyenne de 34-40 h, reflétant une dynamique de croissance différente (Figure II-6A). Il est de même important de mentionner que l'inoculum utilisé pour le batch 3 est issu des precultures de type « CO₂ erlenmeyer » et pareillement que pour les batch 1 et 2, il suppose un point de départ conditionné par un stress au préalable qui ne permettrait pas de décrire dans sa totalité la dynamique de mise en réserve car elle est décrite jusqu'à présent à partir des teneurs moyenne supérieures à 30%.

II.3.3 Culture en batch avec régulation de l'oxygène dissous de type PI et inoculum de type « PBR Airlift ».

Une nouvelle culture en batch (batch 4) a été étudiée sous la même régulation de l'oxygène dissous que le batch 3 mais avec un inoculum issu d'une culture en PBR airlift en conditions nutritionnelles non limitantes. Comme le montre la figure II-4, la teneur en sucres totaux w_{sug} au début de la culture a été de 18% en cohérence avec les valeurs retrouvées dans littérature pour *C. reinhardtii* cultivée sans stress nutritionnel (Martzolff, 2013; Urbain, 2017). Cette manière de produire les inocula a donc permis de mieux maîtriser les conditions de démarrage la culture.

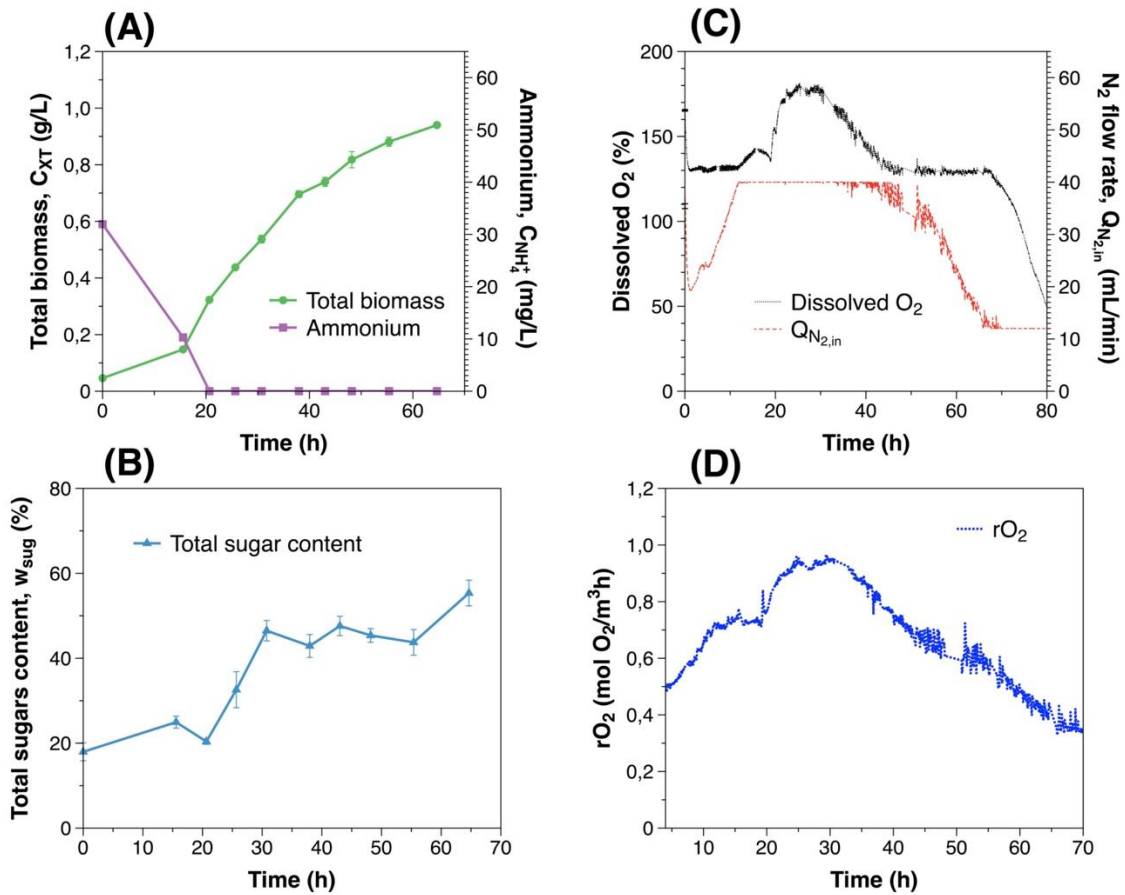


Figure II-7. Suivi de la phase biotique (concentration en biomasse C_{XT} et teneur en sucres totaux w_{sug}) et de la phase abiotique (concentration en ammonium $C_{NH_4^+}$, débit d'aération à l'entrée du PBR $Q_{N_2,in}$, vitesse volumétrique de production d'oxygène r_{O_2} et concentration en oxygène dissous donnée pourcentage par rapport à l'oxygène dans l'air) pour le batch 4.

Comme observé dans les figure II-7A et II-7B, cette nouvelle stratégie de culture a rendu possible une observation de la phase d'accumulation de sucres totaux plus longue (2 fois par rapport au batch 1 et 2) avec une durée de 45 h et une teneur en sucres totaux w_{sug} maximale de 55 %. Ces observations peuvent en partie s'expliquer par le fait de compter avec une biomasse non-stressée dès le début de la culture, permettant ainsi de passer par des points de teneur en sucres totaux w_{sug} jusqu'à maintenant non-décrits. De même, il est important à souligner que la régulation de l'oxygène dissous a été possible pendant 18 h mais malgré un set-point fixé à une valeur plus élevée par rapport au batch 3 et égal à 130%, la régulation s'est retrouvée débordée (Figure II-7C). L'oxygène dissous est monté jusqu'à 180 % lors de la phase de croissance et puis redescendu lors de la carence azotée (Figure II-7A et Figure II-7C). Même si une phase d'anoxie a été empêchée, il est probable que pendant la période de saturation du débitmètre d'aération la concentration

atteinte en oxygène dissous (environ 16 mg/L) puisse avoir impactée la mise en réserve. En effet, on peut noter que pendant la période non-réglée, la valeur de w_{sug} a stagné et puis est remontée dès que la régulation de l'oxygène dissous est revenue à 130 %.

Cette culture a aussi permis de valider la bonne mesure de la vitesse volumétrique de production d'oxygène r_{O_2} comme le montre la figure II-7D, où la phase de croissance et la phase de carence azotée peuvent bien se distinguer. Pendant les premières 20-25 h durant la phase de croissance la r_{O_2} a augmenté jusqu'à presque 1 mol O₂/m³/h et puis a chuté lors de la consommation totale de l'azote.

II.3.4 Culture en batch avec régulation de l'oxygène dissous de type PI, inoculum de type « PBR Airlift » et bullage avec mélange standard O₂/N₂.

Un nouveau batch (batch 5) a été effectué dans le but d'implémenter le même système de régulation de l'oxygène dissous utilisé pour le batch 4 mais avec un débitmètre d'aération disposant d'une gamme de fonctionnement mieux adaptée allant jusqu'à 200 mL/min. De même, un mélange gazeux standard avec une concentration molaire de 4.5% en O₂ et 95.5 % en N₂ a été utilisé comme gaz vecteur pour le bullage afin d'éviter tout risque d'anoxie. Ce choix de concentration en O₂ à l'entrée du PBR a été privilégié pour éviter la perte de la sensibilité dans la mesure de la composition gazeuse à la sortie du PBR et donc de la mesure de la vitesse volumétrique de production d'oxygène r_{O_2} .

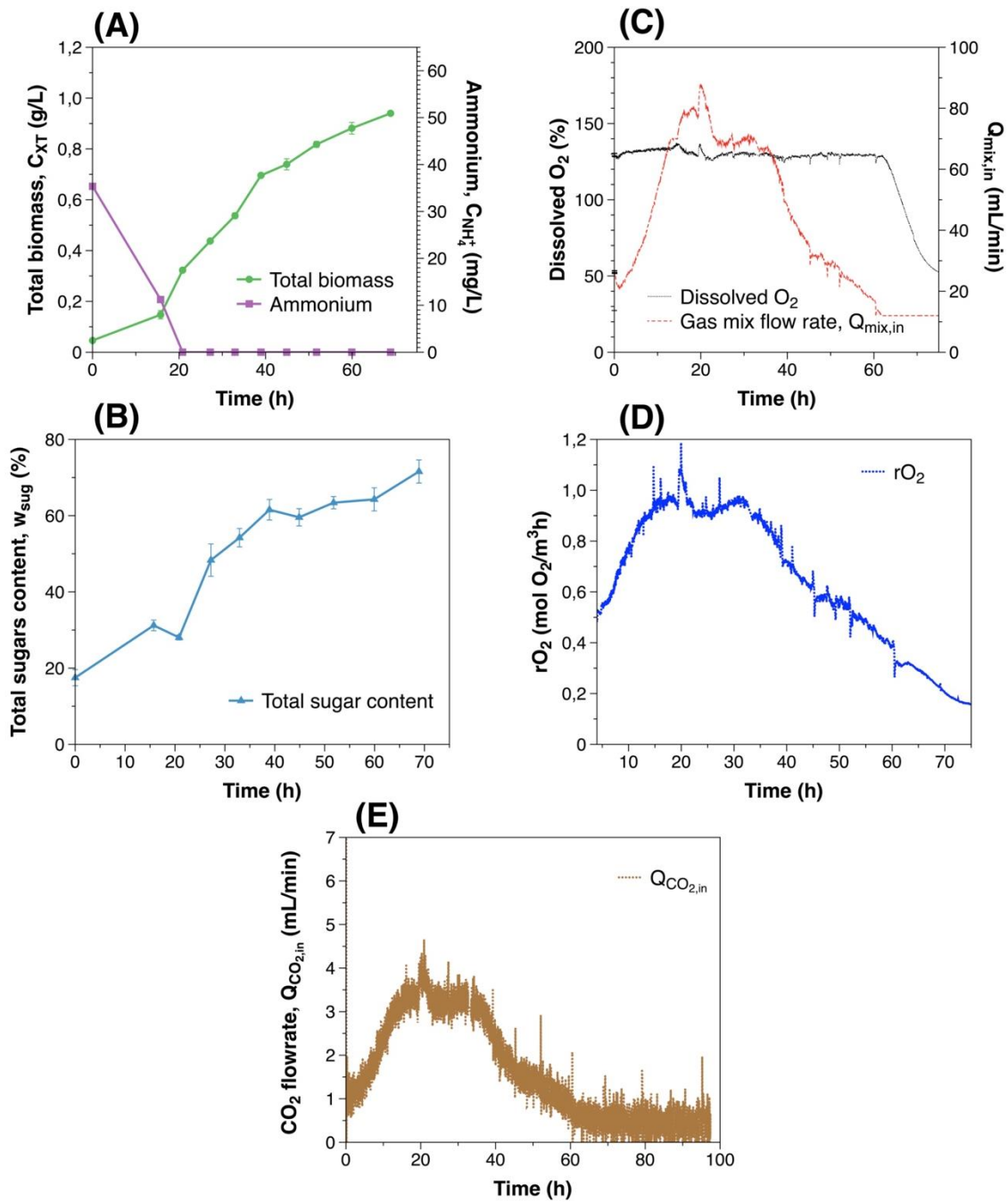


Figure II-8. Suivi de la phase biotique (concentration en biomasse C_{XT} et teneur en sucres totaux w_{sug}) et de la phase abiotique (concentration en ammonium $C_{NH_4^+}$, débit d'aération à l'entrée du PBR $Q_{mix,in}$, débit de CO_2 à l'entrée du PBR $Q_{CO_2,in}$, vitesse volumétrique de production d'oxygène r_{O_2} et concentration en oxygène dissous donnée en pourcentage par rapport à la saturation de l'oxygène dans l'air) pour les batchs 5. Le mélange gazeux a une composition molaire standard de 4.5% pour l' O_2 et 95.5 % pour le N_2 .

Les nouvelles conditions de culture appliquées ont permis de décrire la dynamique de mise en réserve plus en détails. Notez que l'accumulation de sucres totaux se fait pour la première fois d'une façon progressive après la consommation de l'azote (Figure II-8A et

Figure II-8B). De plus, la valeur maximale de teneur en sucres totaux est montée jusqu'à 72 %, correspondant à la valeur maximale jusqu'à ici obtenue dans tous les batch. D'autre part, l'utilisation d'un mélange gazeux standard O_2/N_2 a permis non seulement d'éviter tout risque d'anoxie pendant la culture mais aussi de mesurer correctement la r_{O_2} comme montré dans la figure II-8D. La r_{O_2} a augmenté en concordance avec la croissance pendant les premières 20 h de culture et puis a décliné lors de l'épuisement de l'ammonium. La valeur de maximale de r_{O_2} a été d'environ 1 mol $O_2/m^3/h$ comme observée également dans le batch 4 (Figure II-7D).

Il est important à souligner que le choix d'un débitmètre avec une meilleure gamme de fonctionnement a permis de bien réguler l'oxygène dissous à 130 % tout au long de la culture en batch (Figure II-8C). Pendant cette période, le débitmètre a atteint un débit maximal de 175 mL/min. Il est quand même possible de penser qu'avec un débit gazeux aussi élevé, on puisse affecter la régulation du pH. Cependant, le pH a bien été régulé à 7.5 et le débit maximum demandé en CO_2 a été de 4.5 mL/min (Figure II-8E). Il a été donc possible avec la configuration des débitmètres choisie de bien réguler simultanément le pH et l'oxygène dissous.

Finalement, cette dernière stratégie a été retenue comme protocole pour l'étude en dynamique de l'accumulation de réserves carbonées (sous la forme de carbohydrates) en conditions de carence azotée progressive. Ce protocole est le suivant :

- i. Une régulation de type PI simultanée de l'oxygène dissous et du pH.
- ii. Un inoculum issu d'une culture non-limitée en PBR airlift.
- iii. L'utilisation d'un mélange gazeux standard comme gaz vecteur pour le bullage des cultures assurant de s'affranchir d'un passage en anoxie et de la bonne détermination de la composition gazeuse en sortie de PBR.

II.4 Conclusions

La démarche entreprise pour l'obtention d'un protocole expérimental de suivi de la cinétique d'accumulation des réserves carbonées lors d'une culture de *C. reinhardtii* en conditions de carence azotée progressive en PBR torique a été expliquée et présentée dans ce chapitre. Pour y arriver, différentes conditions opératoires et physiologiques ont été testées, à savoir différentes qualités d'inocula, de stratégie visant à réguler la concentration en oxygène dissous et de composition du gaz vecteur. Il s'est avéré que les

conditions opératoires retenues permettent de s'affranchir des problématiques pouvant arriver lors de cultures en batch soumises à des carences azotées en PBR, à savoir, l'apparition d'un stress oxydant, les passages en anoxie et les problèmes liés à la qualité et répétabilité des inoculum. Le protocole développé sera ensuite utilisé pour étudier la dynamique de mise en réserve pour la création d'une base de données expérimentale qui sera à la fois consacrée au développement d'un estimateur en temps réel des réserves carbonées basé sur l'analyse des gaz et d'un modèle biochimiquement structuré de la mise en réserve, qui sont tous les deux des outils de suivi et d'analyse d'une culture de microalgues en condition de stress azotée pour une application dans le premier étage du procédé bi-étagé en continu de photo-production d'hydrogène.

Chapitre III

III. Prédiction des propriétés radiatives et de la vitesse d'absorption de photons d'une microalgue verte cultivée en conditions de carence azotée progressive et accumulant des réserves carbonées en vue de la création d'une base de données d'expérimentale de propriétés radiatives.

Les résultats de ce chapitre sont présentés dans la publication ci-dessus acceptée dans le Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfert.

Résumé :

Ce chapitre vise à développer une méthodologie de calcul pour la prédiction de propriétés radiatives de la microalgue verte *C. reinhardtii* lors d'une limitation par la source d'azote en tenant en compte des modifications physiologiques induites par le stress nutritionnel. Tout d'abord, les propriétés radiatives de *C. reinhardtii* ont été prédites par l'intermédiaire de la théorie de Lorenz-Mie et en utilisant des propriétés optiques spectrales qui tiennent compte des changements physiologiques opérés tels que la variation dans la teneur en pigments, l'arrêt de la division cellulaire, le changement de volume et de taille des cellules, ainsi que l'accumulation de réserves carbonées sous la forme d'amidon. Les coefficients massiques théoriques d'absorption et de diffusion prédits pour les différentes fractions massiques d'amidon concordent très bien avec les mesures expérimentales. Ensuite, les propriétés radiatives théoriques et expérimentales ont été utilisées pour déterminer, respectivement, la vitesse spécifique locale d'absorption de photons (en anglais LRPA) théorique et expérimentale dans la région photosynthétiquement actif (en anglais PAR) en utilisant l'approximation à deux flux et l'approximation à deux flux simplifiés pour estimer l'atténuation lumineuse dans le photobioréacteur. La différence moyenne des LRPA entre les mesures expérimentales et les prédictions numériques a été inférieure à 9 % pour la teneur massique en amidon la plus élevée et inférieure à 1 % pour la teneur massique en amidon intermédiaire. En outre, l'influence du coefficient massique de diffusion dans les calculs du LRPA s'est avérée négligeable malgré l'accumulation des granules d'amidon dans les cellules, étant donné que l'absorption reste le phénomène

majoritaire dans les conditions physiologiques étudiées. Finalement, la méthodologie de calcul développée dans ce travail a été utilisée comme outil pour la génération d'une base de données de propriétés radiatives nécessaire à la modélisation cinétique de la croissance et de l'accumulation des réserves carbonées dans les cultures de microalgues en limitation azotée.

Abstract

This paper aims to develop a new method to predict the radiation characteristics of the green microalgae *C. reinhardtii* during progressive nitrogen starvation that accounts for the physiological changes induced by nutritional stress. First, the radiation characteristics of *C. reinhardtii* cultivated under progressive nitrogen starvation were predicted in the photosynthetically active radiation (PAR) region based on Lorenz-Mie theory using effective spectral optical properties of cells accounting for pigment contents, cessation of cell division, cell volume and size, and carbon reserve storage in the form of starch. The predictions of the spectral mass absorption and scattering cross-sections agreed very well with experimental measurements for a wide range of starch mass fractions. Second, the predicted and measured radiation characteristics were used to determine the local rate of photon absorption (LRPA) in the PAR region using the two-flux approximation and simplified two-flux approximation. The LRPA PAR-averaged relative difference between experimental calculation and numerical predictions was less than 9% for all starch mass content considered. In addition, the influence of the mass scattering cross-section on the PAR-averaged LRPA was found to be negligible despite the starch accumulation in microalgae cells. Finally, the numerically-validated tools developed in this study could be used for generating a database of radiation characteristics helpful in order to model growth and carbon reserve accumulation kinetics in microalgae.

Keywords: radiation characteristics; starch; light absorption; nitrogen starvation; microalgae; photobioreactors.

Nomenclature

\mathcal{A}	local rate of photon absorption, mol _{hv} /kgh
$\langle \mathcal{A} \rangle$	mean specific rate of photon absorption, mol _{hv} /kgh
$\bar{A}_{abs,\lambda}$	average mass spectral absorption cross section, m ² /kg
b_λ	backward scattering ratio
$\bar{C}_{abs,\lambda}$	average cell spectral absorption cross section, m ²
$\bar{C}_{sca,\lambda}$	average cell spectral scattering cross section, m ²
C	concentration, kg/m ³
Ea	specific absorption cross-section of individual pigments, m ² /kg
f	frequency
f_v	volume fraction
G_λ	fluence rate using total biomass, μmol _{hv} /m ² s
G'_λ	fluence rate using catalytic biomass, μmol _{hv} /m ² s
l	optical thickness
m_{XC}	mass of one individual cell, kg
m_λ	spectral complex refractive index
n_{vp}	refractive index at the anchor point
n_λ	spectral refractive index
N_T	cell density, #/mL
$q_{\lambda,0}$	incident spectral radiation, μmol/m ² s
r_{eq}	cell equivalent radius, μm
\bar{r}_{eq}	mean cell equivalent radius, μm
$\bar{S}_{sca,\lambda}$	average mass spectral scattering cross section, m ² /kg
T	transmittance
V	volume, m ³
w	mass fraction
w_{pig}	pigment mass fraction based on total biomass concentration, wt.%
w'_{pig}	pigment mass fraction based on catalytic biomass concentration, wt.%
w''_{pig}	pigment mass fraction within total pigment concentration, wt.%
x_w	water fraction in cells
z	photobioreactor depth, m

Greek symbols

β_λ	spectral extinction coefficient, m ⁻¹
ϵ_n	scattering correction factor
ϵ_h	contribution of the forward scattered light to $T_{nh,\lambda,C_{XT}}$
θ	scattering angle, rad
θ_a	acceptance angle of the detector, rad
ρ_{dry}	dry biomass density, kg/m ³
ρ_λ	diffuse reflectance of the PBR back wall
κ_λ	spectral absorption coefficient, m ⁻¹
λ	refers to wavelength, nm

$\sigma_{s,\lambda}$	spectral scattering coefficient, m^{-1}
σ	standar deviation, μm
$\Phi_{T,\lambda}$	scattering phase function

Subscripts

<i>abs</i>	refers to absorption
<i>basal</i>	refers to basal or starting value
<i>cell</i>	refers to cell particle
<i>Chl</i>	refers to total chlorophylls
<i>Chla</i>	refers to chlorophyll <i>a</i>
<i>Chlb</i>	refers to chlorophyll <i>b</i>
<i>CR</i>	refers to cultivating conditions leading to carbon reserves accumulation
<i>eff</i>	refers to effective properties
<i>hv</i>	refers to photons of light
<i>LRPA</i>	refers to local rate of photon absorption
<i>MeOH</i>	refers to methanol
<i>nn</i>	refers to normal-normal configuration
<i>nh</i>	refers to normal-hemispherical configuration
<i>PAR</i>	refers to averaged over the PAR region
<i>PBR</i>	refers to photobioreactor
<i>PBS</i>	refers to phosphate buffer saline solution
<i>pig</i>	refers to pigments
<i>PhPC</i>	refers to photoprotective carotenoids
<i>PSC</i>	refers to photosynthetic carotenoids
<i>PPC</i>	refers to photoprotective and photosynthetic carotenoids
<i>r</i>	refers to carbon reserves
<i>ref</i>	refers to reference
<i>sca</i>	refers to scattering
<i>simp</i>	refers to simplified
<i>s</i>	refers to sample
<i>st</i>	refers to starch
<i>TAG</i>	refers to triacylglycerides
<i>T</i>	refers to total
<i>V</i>	refers to volume
<i>XT</i>	refers to total biomass
<i>XC</i>	refers to catalytic biomass

III.1 Introduction

Microalgae have the ability to sequester CO₂ and convert solar energy absorbed in the photosynthetically active radiation (PAR) region into chemical energy via photosynthesis. Several strains are metabolically "equipped" to synthesize value-added molecules including pigments, polysaccharides such as starch, lipids to be converted into biodiesel, and biohydrogen (Borowitzka, 2013; Rumin et al., 2021; Udayan et al., 2021). In fact, although the biomass of microalgae has been studied and used in different fields (e.g., food, cosmetics, pharmaceuticals) (Borowitzka, 2013; Oncel, 2013), their contemporary significance is, arguably, as a sustainable source of biofuels.

Particular focus has been placed on microalgal biomass as feedstock for next generation biofuels. Nutrient limitation or deprivation is the typical method used to induce the accumulation of carbon reserves in the form of starch and/or lipids within the cells. Indeed, the metabolic response of microalgae to deficient culture conditions in terms of elements such as N, S, P, Ca, and Mg, can be quite complex (Antal, 2018). A deficiency in one of these elements induces a decrease in photosynthetic activity due to the degradation of the photosystems, the cessation of the cell division, and the storage of carbon reserves (e.g., sugars and lipids) (Antal, 2018). Moreover, if the nutritional stress is carried out under anoxic conditions, then biohydrogen production can be observed (Antal, 2018).

Nitrogen is often considered to carry out nutritional limitation or starvation in microalgae cultures (de Carvalho Silvello et al., 2022; Ran et al., 2019). In fact, during a nitrogen-stressed culture, generally a starch-accumulation phase occurred first to give way to triacylglycerides (TAG) accumulation once starch levels reached a certain threshold (Adesanya et al., 2014; Longworth et al., 2012; Park et al., 2015). Thus, controlling the starch-accumulation phase has appeared to be crucial for the production of both biodiesel and biohydrogen. Many metabolic studies have demonstrated that starch accumulation is used by microalgae as precursor for lipid production during nitrogen-limiting conditions (Juergens et al., 2015; Longworth et al., 2012; Park et al., 2015). Similarly, the degradation of starch accumulated during sulfur-deprived culture was shown to play an important role in biohydrogen production (Chochois et al., 2009; Torzillo et al., 2015).

Nitrogen-limited cultures are typically grown in photobioreactors (PBRs) with artificial light or sunlight. Several kinetic models have been proposed and validated for coupling

light transfer in PBR to biomass, starch, and lipids productivities (Adesanya et al., 2014; Bekirogullari et al., 2020; J. F. Cornet et al., 1992; Figueroa-Torres et al., 2017; Takache et al., 2012). These models are important to perform techno-economic analysis and sustainability assessment, to optimize microalgal bioprocesses, as well as to scale-up the process from benchtop to industrial scales. These models require knowledge of the microalgae radiation characteristics over the PAR region to predict the local fluence rate and the local rate of photon absorption (LRPA).

Experimental methods have been developed for measuring the radiation characteristics of microalgae suspensions for cells of any arbitrary shape (Pilon et al., 2011; Pilon & Kandilian, 2016). Note that the radiation characteristics measurements must be repeated for each medium composition and growth conditions including pH, temperature, and illumination. This is particularly true when nutritional stress is imposed such as nitrogen starvation resulting in time-dependent cell composition and pigment content (Kandilian, Pruvost, et al., 2014; Kandilian et al., 2019; Pruvost et al., 2009; Van Vooren et al., 2012).

Radiation characteristics of quasi-spherical microalgae can be also be predicted theoretically based on the Lorenz-Mie theory (Berberoglu et al., 2007; Dauchet et al., 2015; Hoeniges et al., 2020; Jonasz & Fournier, 2007; Pottier et al., 2005). The cells are approximated as homogeneous spheres with volume-equivalent radius and effective spectral complex index of refraction $m_\lambda = n_\lambda + ik_\lambda$ where n_λ and k_λ are the cell's effective refractive and absorption indices, respectively. For spherical cells with a strongly refracting wall, the cells can be treated as coated spheres while filamentous cells can be treated as infinity long and randomly oriented cylinders (Heng et al., 2015; Kandilian et al., 2015; E. Lee & Pilon, 2013). Difficulties in predicting the radiation characteristics of microalgae lie in the fact that the cell size and biochemical compositions (e.g., pigment, starch, or lipid concentrations) may change during nutritional limitations.

This study aims to develop a theoretical model capable of predicting the spectral radiation characteristics over the PAR-region of green microalgae *C. reinhardtii* cultivated under progressive nitrogen starvation and accumulation of carbon reserves in the form of starch. Predictions were compared with experimental measurements over the PAR region as microalgae underwent physiological changes in the pigment and starch concentrations, cell volume and size, and cessation of cell division. The results were then used to predict changes in the LRPA under these various conditions.

III.2 Current state of knowledge

III.2.1 *Chlamydomonas reinhardtii*

C. reinhardtii is an eukaryotic unicellular green microalgae with an oblate spheroid shape measuring about 8-10 μm in diameter (Harris et al., 2009). It is considered as a model organism used as a biological platform to study physiological and metabolic processes such as biogenesis, photosynthesis, stress responses, and regulatory mechanisms (Antal, 2018; Harris et al., 2009). Like in many other green microalgae, the photosynthetic pigments of *C. reinhardtii* are composed of chlorophyll *a* (Chl *a*) and *b* (Chl *b*) along with photoprotective and photosynthetic carotenoids (PPC). Pigment light absorption take place in the PAR region and the spectral absorption peaks of Chl *a* and *b* are centered at 435, 630, and 676 nm and those of PPC present between 400 and 500 nm (Pilon & Kandilian, 2016).

The interest in *C. reinhardtii* is primarily due to its potential to produce renewable biofuels. Indeed, thanks to its ability to grow under various conditions (autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions), *C. reinhardtii* can accumulate large amounts of carbon storage molecules such as starch and/or triacylglycerides (TAGs) under nutritionally deficient conditions. It can also acclimate to prolong anaerobiosis conditions both under light and dark conditions to produce biohydrogen (Antal, 2018).

The impact of light on the biomass growth as well as on the production of metabolites of interest, such as lipids or pigments, have been studied extensively for the green microalgae *C. reinhardtii* for two purposes (1) to optimize the operation protocols and (2) for kinetics modeling (J. F. Cornet et al., 1992; Kandilian, Pruvost, et al., 2014; Kandilian et al., 2019; E. Lee et al., 2014; Takache et al., 2010, 2012). Determination of the radiation characteristics of *C. reinhardtii* has been carried out under optimal growth (Dauchet et al., 2015; Kandilian, Pruvost, et al., 2016; Pilon et al., 2011; Pottier et al., 2005) and nitrogen-limitation conditions (Kandilian, Pruvost, et al., 2016). However, previous studies conducted under nitrogen-stress conditions did not consider the effect of accumulation of carbon reserves on the radiation characteristics of *C. reinhardtii*.

III.2.2 Determination of the radiation characteristics of microalgae culture

III.2.2.1 Experimental measurements

Pilon et al., 2011 presented a method to measure experimentally the radiation characteristics of microalgae suspensions based on three assumptions: (i) the microalgae suspension was well mixed and the cells were randomly oriented, (ii) the suspension was sufficiently diluted to ensure that single scattering prevailed, and (iii) the scattering phase function was assumed to be essentially in the forward direction, time-invariant, and independent of wavelength over the PAR region.

The average mass absorption and scattering cross-section $\bar{A}_{abs,\lambda}$ and $\bar{S}_{sca,\lambda}$ of a microalgae suspension can be defined as in terms of total dry biomass concentration C_{XT} (Pilon et al., 2011):

$$\bar{A}_{abs,\lambda} = \frac{\kappa_\lambda}{C_{XT}} \text{ and } \bar{S}_{sca,\lambda} = \frac{\sigma_{s,\lambda}}{C_{XT}} \text{ (in m}^2\text{/kg dry weight)} \quad (\text{III. 1})$$

where κ_λ and $\sigma_{s,\lambda}$ are the absorption and scattering coefficients (in m^{-1}), respectively. The apparent extinction β_λ^* and absorption κ_λ^* coefficients can be obtained from normal-normal $T_{nn,\lambda,C_{XT}}$ and normal-hemispherical $T_{nh,\lambda,C_{XT}}$ transmittance measurements for different diluted microalgae suspensions of known total biomass concentration C_{XT} placed in a cuvette of pathlength l according to (Pilon et al., 2011) :

$$\beta_\lambda^* = -\frac{1}{l} \ln \left(\frac{T_{nn,\lambda,C_{XT}}}{T_{nn,\lambda,ref}} \right) \text{ and } \kappa_\lambda^* = -\frac{1}{l} \ln \left(\frac{T_{nh,\lambda,C_{XT}}}{T_{nh,\lambda,ref}} \right) \quad (\text{III. 2})$$

where $T_{nn,\lambda,ref}$ and $T_{nh,\lambda,ref}$ are the normal-normal and normal-hemispherical transmittances of the medium alone in the cuvette, respectively. Microalgae are usually suspended in phosphate buffer saline (PBS) solution to eliminate any absorption and scattering by the medium (Pilon et al., 2011).

The apparent extinction coefficient β_λ^* can be expressed in terms of the actual absorption κ_λ and scattering $\sigma_{s,\lambda}$ coefficients as (Pilon et al., 2011):

$$\beta_\lambda^* = \kappa_\lambda + (1 - \epsilon_n) \sigma_{s,\lambda}. \quad (\text{III. 3})$$

Here, ϵ_n is a correction factor representing the fraction of light scattered in the forward direction and detected by the spectrometer. Under ideal conditions, ϵ_n is equal to zero so that $\beta_\lambda^* = \beta_\lambda$. However, the acceptance angle θ_a of the detector is finite so ϵ_n is strictly

positive and is assumed to be constant over the PAR region. It can be calculated from the suspension's scattering phase function $\Phi_{T,\lambda}(\theta)$ as (Pilon et al., 2011):

$$\epsilon_n = \frac{1}{2} \int_0^{\frac{\theta_a}{2}} \Phi_{T,\lambda}(\theta) \sin\theta d\theta. \quad (\text{III. 4})$$

The correction factor ϵ_n for *C. reinhardtii* suspensions cultivated under optimal and nitrogen-limiting conditions was reported as 0.67 and 0.72, respectively (Kandilian, Pruvost, et al., 2016). Thus, the correction factor ϵ_n does not seem to be affected significantly by nitrogen limitation. Then, the actual extinction coefficient $\beta_\lambda = \kappa_\lambda + \sigma_{s,\lambda}$ can be determined according to (Pilon et al., 2011):

$$\beta_\lambda = \frac{\beta_\lambda^* - \epsilon_n \kappa_\lambda}{1 - \epsilon_n}. \quad (\text{III. 5})$$

Similarly, the apparent absorption coefficient κ_λ^* is related to the actual absorption coefficient κ_λ and scattering $\sigma_{s,\lambda}$ coefficient according to (Pilon et al., 2011) :

$$\kappa_\lambda^* = \kappa_\lambda + (1 - \epsilon_h) \sigma_{s,\lambda}. \quad (\text{III. 6})$$

Here, ϵ_h corresponds to the scattered light fraction measured by the detector connected to the integrating sphere. In particular, when all the scattered light is accounted for, ϵ_h is equal to 1. Moreover, at $\lambda = 750$ nm green microalgae are known to be non-absorbing, *i.e.*, $\kappa_{750} = 0 \text{ m}^{-1}$. Then, evaluating Equations (III.5) and (III.6) at this wavelength yield ϵ_h and the actual absorption κ_λ and scattering coefficients $\sigma_{s,\lambda}$ can be expressed as (Pilon et al., 2011):

$$\kappa_\lambda = \kappa_\lambda^* - \kappa_{750}^* \left(\frac{\beta_\lambda^* - \kappa_\lambda^*}{\beta_{750}^* - \kappa_{750}^*} \right) \quad \text{and} \quad \sigma_{s,\lambda} = \beta_\lambda - \kappa_\lambda. \quad (\text{III. 7})$$

The mass cross-sections $\bar{A}_{abs,\lambda}$ and $\bar{S}_{sca,\lambda}$ determined by this method are independent of the biomass concentration. Indeed, single scattering must prevail, *i.e.*, photons undergo at most one scattering event as they travel through the microalgae suspension. In practice, it is verified that single scattering prevails by repeating the measurements for two or three diluted microalgae suspensions with different biomass concentrations (Pilon & Kandilian, 2016).

III.2.2.2 Theoretical predictions

C. reinhardtii cells growing under non-limiting conditions have been successfully modeled as homogeneous spheres with effective complex index of refraction $m_\lambda = n_\lambda + ik_\lambda$ and size distribution $f(r_{eq})$ where r_{eq} is the volume-equivalent radius (Berberoglu et al., 2007; Dauchet et al., 2015; Hoeniges et al., 2020; Jonasz & Fournier, 2007; Kandilian, Pruvost, et al., 2016; Pottier et al., 2005). In fact, it has been demonstrated that *C. reinhardtii* can be treated as homogeneous spherical particles despite their heterogeneous cell composition (Bhowmik & Pilon, 2016). It is important to mention that unlike other green microalgae such as *Chlorella sp.*, *Chlamydomonas reinhardtii* does not have a cell wall but only a cell membrane whose optical effects are negligible (Kandilian, Pruvost, et al., 2016). Then, theoretical predictions of their average absorption $\bar{C}_{abs,\lambda}$ and scattering $\bar{C}_{sca,\lambda}$ cross-sections (in m^2) as well as the scattering phase function $\Phi(r_{eq}, \theta)$ can be obtained by the Lorenz-Mie theory. In order to couple metabolic response of microalgae and light transfer so as to predict biomass productivity and concentration evolution in photobioreactors, one can consider the average mass absorption $\bar{A}_{abs,\lambda}$ and scattering $\bar{S}_{sca,\lambda}$ cross-section defined as (Pottier et al., 2005) :

$$\bar{A}_{abs,\lambda} = \frac{\bar{C}_{abs,\lambda}}{V_{32}\rho_{dry}(1-x_w)} \text{ and } \bar{S}_{sca,\lambda} = \frac{\bar{C}_{sca,\lambda}}{V_{32}\rho_{dry}(1-x_w)} \quad (\text{in } m^2/\text{kg dry weight})(\text{III. 8})$$

where V_{32} (in m^3) is the Sauter mean volume of the cell, $\rho_{dry} = 1400 \text{ kg/m}^3$ is the density of dry biomass, and $x_w = 0.8$ is the average mass fraction of water in the cells (Pottier et al., 2005).

The methodology used for the theoretical predictions of radiation characteristics of microalgae cells has been described in detail by Dauchet et al., 2015 and Kandilian, Pruvost, et al., 2016. First, the cells effective absorption index k_λ can be calculated according to (Pottier et al., 2005):

$$k_\lambda = \frac{\lambda}{4\pi} \sum_j C_{pig,j} E a_j = \frac{\lambda}{4\pi} \rho_{dry}(1-x_w) \sum_j w_{pig,j} E a_j \quad (\text{III. 9})$$

where $C_{pig,j}$ is the concentration of j^{th} pigment in the cell (in kg/m^3), while $w_{pig,j} = C_{pig,j}/C_{XT}$ is the mass fraction of the j^{th} pigment in the total biomass. Moreover, $E a_j$ (in m^2/kg) is the specific absorption cross-section of any pigment j reported by Bidigare et

al., 1990. Note that this expression has been validated experimentally for *C. reinhardtii* cultures cultivated under non-limiting nutritional conditions (Dauchet et al., 2015; Kandilian, Pruvost, et al., 2016; Pilon & Kandilian, 2016; Pottier et al., 2005).

Second, the spectral refractive index n_λ of *C. reinhardtii* can be assumed to be constant over the PAR region and equal to 1.55 (Pottier et al., 2005). Dauchet et al., 2015 relaxed this assumption and predicted the spectral refractive index n_λ using the subtractive Kramers-Kronig relation, based on the spectral absorption index $k_\lambda = k_\nu$ given by Equation (III.9) according to (Dauchet et al., 2015):

$$n_\lambda = n_{\nu_p} + 2 \frac{\nu^2 - \nu_p^2}{\pi} P \int_{\nu_{min}}^{\nu_{max}} \frac{\nu' k_{\nu'}}{(\nu' - \nu^2)(\nu' - \nu_p^2)} d\nu' \quad (\text{III. 10})$$

where $\nu = c/\lambda$ is the frequency of the electromagnetic wave, c is the speed of light in vacuum, and P is the Cauchy principal value. Here, ν_p is the so-called anchor frequency selected such that the cell absorption index vanished, *i.e.*, $k_{\nu_p} = 0$. Moreover, the anchor refractive index n_{ν_p} must be known or retrieved experimentally. Dauchet et al., 2015 retrieved a value of $n_{\nu_p} = 1.44$ for the green microalgae *C. reinhardtii* using an inverse method consisting in minimizing the difference between the experimentally measured and the theoretically predicted normal-hemispherical transmittance at 820 nm. Predictions were obtained by solving the RTE using the Monte Carlo method and the predicted radiation characteristics of the spherical microalgae predicted by Lorenz-Mie theory.

On the other hand, E. Lee et al., 2013 retrieved the complex index of refraction of *C. reinhardtii* cultivated under non-limiting nutritional conditions using an inverse method minimizing the difference between predictions by the Lorenz-Mie theory using the measured surface area equivalent cell radius distribution $f(r_{eq})$ and the experimentally measured spectral mass cross-sections $\bar{A}_{abs,\lambda}$ and $\bar{S}_{sca,\lambda}$. The retrieved refractive index n_λ was in the range of 1.35-1.37 over the PAR region.

Finally, Kandilian, Pruvost, et al., 2016 compared the theoretically determined and experimentally measured radiation characteristics of *C. reinhardtii* cultivated under limiting and non-limiting nitrogen conditions using the Kramers-Kronig relation with two different anchor refractive index, $n_{\nu_p} = 1.37$ and $n_{\nu_p} = 1.44$ at the anchor frequency ν_p of 820 nm. The comparison showed that the prediction of the average mass spectral

absorption cross-section $\bar{A}_{abs,\lambda}$ for *C. reinhardtii* growing whether under nitrogen-limiting conditions or optimal conditions were quite similar for the two values of n_{vp} considered. Thus, the nutritional growing conditions and the choice of the anchor refractive index n_{vp} did not have a significant influence on the theoretical predictions of $\bar{A}_{abs,\lambda}$. Predictions of the mass absorption cross-section $\bar{A}_{abs,\lambda}$ for *C. reinhardtii* grown under nitrogen-limiting conditions agreed relatively well with the measurements with a PAR-averaged relative difference of 14-16%. However, the relative difference between predictions and measurements of $\bar{A}_{abs,\lambda}$ reached up to 53% between 450 and 550 nm corresponding to the absorption band of photosynthetic and photoprotective carotenoid pigments. On the other hand, the mass scattering cross-section $\bar{S}_{sca,\lambda}$ was slightly better predicted with n_{vp} equal to 1.44 compared to n_{vp} equal to 1.37. Note that Kandilian, Pruvost, et al., 2016 reported the radiation characteristics of *C. reinhardtii* cultivated under optimal and nitrogen-limiting conditions at arbitrary times. However, the authors did not specify the stress degree due to nitrogen deprivation in the culture and ignored the impact of carbon reserve content on the predictions of $\bar{A}_{abs,\lambda}$ and $\bar{S}_{sca,\lambda}$.

III.2.3 Light transfer modeling in photobioreactors

Microalgae culture suspension is considered as an absorbing and scattering media in which the spectral light attenuation profile is given by the local fluence rate $G_\lambda(z)$. It can be obtained by solving the radiative equation (RTE) using various methods depending on the PBR geometry. For a one-dimensional flat-plate PBR filled with microalgae suspension scattering strongly in the forward direction, it has been demonstrated that the two-flux approximation provides satisfactory predictions of the local fluence rate $G_\lambda(z)$ given in $\text{mol}_{hv}/\text{m}^2\text{h}$ at depth z expressed as (J. F. Cornet et al., 1992; E. Lee et al., 2014; Pottier et al., 2005):

$$\frac{G_\lambda(z)}{q_{\lambda,0}} = 2 \frac{[\rho_\lambda(1 + \alpha_\lambda)e^{-\delta_\lambda L} - (1 - \alpha_\lambda)e^{-\delta_\lambda L}]e^{\delta_\lambda z} + [(1 + \alpha_\lambda)e^{\delta_\lambda L} - \rho_\lambda(1 - \alpha_\lambda)e^{\delta_\lambda L}]e^{-\delta_\lambda z}}{(1 + \alpha_\lambda)^2 e^{\delta_\lambda L} - (1 - \alpha_\lambda)^2 e^{-\delta_\lambda L} - \rho_\lambda(1 - \alpha_\lambda^2)e^{\delta_\lambda L} + \rho_\lambda(1 - \alpha_\lambda^2)e^{-\delta_\lambda L}} \quad (\text{III. 11})$$

where $q_{\lambda,0}$ is the incident spectral radiation flux and ρ_λ is the diffuse reflectance of the PBRs back wall and the coefficients α_λ and δ_λ are defined as (Pottier et al., 2005) :

$$\alpha_\lambda = \sqrt{\frac{\bar{A}_{abs,\lambda}}{\bar{A}_{abs,\lambda} + 2b_\lambda \bar{S}_{sca,\lambda}}} \quad \text{and} \quad \delta_\lambda = C_{XT} \sqrt{\bar{A}_{abs,\lambda}(\bar{A}_{abs,\lambda} + 2b_\lambda \bar{S}_{sca,\lambda})}. \quad (\text{III. 12})$$

Here, $\bar{A}_{abs,\lambda}$ and $\bar{S}_{sca,\lambda}$ are the average mass absorption and scattering cross-sections (in $\text{m}^2/\text{kg}_{XT}$) of the microalgae in suspension, respectively. The backward scattering ratio b_λ is approximately constant over the PAR region and is estimated from the microalgae scattering phase function $\Phi_{T,\lambda}(\theta)$.

The experimental measurements and theoretical predictions of b_λ for a culture of *C. reinhardtii* cultivated under nitrogen-limiting conditions were reported by Kandilian, Pruvost, et al., 2016. The authors measured $b_\lambda = 0.008$ for *C. reinhardtii* grown in either optimal or nitrogen-limited conditions compared with theoretical predictions of $b_\lambda = 0.007$. These results indicate that b_λ was nearly zero due to strongly forward scattering of the light by the large *C. reinhardtii* cells and that the nitrogen limitation did not affect b_λ . Then, the expression of the fluence rate given by Equations (III.11) and (III.12) can be simplified by considering that $b_\lambda \approx 0$ as α_λ tends to unity, and $\delta_\lambda = \bar{A}_{abs,\lambda}C_{XT}$ to yield (Kandilian, Soulies, et al., 2016; E. Lee et al., 2014):

$$G_{\lambda,simp}(z) = q_{\lambda,0} \left[e^{-\bar{A}_{abs,\lambda}C_{XT}z} + \rho_\lambda e^{-\bar{A}_{abs,\lambda}C_{XT}(2L-z)} \right]. \quad (\text{III. 13})$$

Moreover, the mean volumetric rate of photon absorption $\langle \mathcal{A}_V \rangle$ can be determined by averaging the local volumetric rate of photon absorption $\mathcal{A}_V(z)$ over the volume of the PBR (Kandilian et al., 2019). For a flat plate PBR of thickness L it is expressed as:

$$\langle \mathcal{A}_V \rangle = \frac{1}{L} \int_0^L \mathcal{A}_V(z) dz = \frac{1}{L} \int_{400}^{700} \int_0^L C_{XT} \bar{A}_{abs,\lambda} G_\lambda(z) dz d\lambda. \quad (\text{III. 14})$$

Here, the local rate of photon absorption (LRPA) corresponds to the rate of photons absorbed at depth z in the PAR region between 400 and 700 nm, expressed per unit of time and dry biomass concentration. Finally, the growth kinetics of microalgae is related to the mean specific rate of photon absorption denoted by $\langle \mathcal{A} \rangle$ and expressed in $\text{mol}_{hv}/\text{kg}_h$ (Kandilian, Pruvost, et al., 2014; Kandilian et al., 2019; Takache et al., 2012) and given by $\langle \mathcal{A} \rangle = \langle \mathcal{A}_V \rangle / C_{XT}$.

It is important to note that the simplified local fluence rate $G_{\lambda,simp}(z)$ given by Equation (III.13) can be used in Equation (III.14) to calculate analytically the corresponding simplified averaged volumetric rate of photon absorption $\langle \mathcal{A}_V \rangle_{simp}$ and the simplified LRPA $\langle \mathcal{A} \rangle_{simp}$ such that:

$$\langle \mathcal{A}_V \rangle_{simp} = \frac{1}{L} \int_{400}^{700} \int_0^L C_{XT} \bar{A}_{abs,\lambda} G_{\lambda,simp}(z) dz d\lambda \quad \text{and} \quad \langle \mathcal{A} \rangle_{simp} = \frac{\langle \mathcal{A}_V \rangle_{simp}}{C_{XT}}. \quad (\text{III.15})$$

III.3 Materials and methods

III.3.1 Species and culture

Wild type *Chlamydomonas reinhardtii* strain 137 AH was obtained from the culture collection of the French Atomic Energy Agency (CEA, Cadarache, France). A culture of this *C. reinhardtii* strain was grown in a 1.5-liter torus-shaped photobioreactor (PBR) made of transparent polymethyl methacrylate (PMMA) and operated in batch mode under progressive nitrogen starvation and autotrophic conditions using a modified artificial medium based on Sueoka medium. The used medium had the following composition (in g/L): NH₄Cl 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.14, CaCl₂·H₂O 0.05, KH₂PO₄ 0.3050, NaHCO₃ 1.68 and 1 mL/L of Hunter's trace elements solution. The illumination was provided by a LED panel and a light calibration curve to achieve a collimated incident photon flux $q_{\lambda,0}$ of 200 $\mu\text{mol}_{\text{hv}}/\text{m}^2 \text{ s}$ on the PBR. The latter was stirred constantly at 300 rpm. It was instrumented to monitor the pH, temperature, and dissolved O₂ in the liquid phase. Proportional-integral (PI) control was implemented for the regulation of these parameters. The pH was maintained at 7.5 via automatic CO₂ gas injection while the dissolved O₂ in the liquid phase was kept at 130% of oxygen saturation in air by injecting a gas mixture composed of 4.5 mol.% O₂ and 95.5 mol.% N₂. The inoculum used for launching the batch culture was obtained from a nitrogen-replete continuous culture in 1 liter-airlift PBR operated under autotrophic conditions. Here also, the pH was regulated at 7.5 and the incident photon flux $q_{\lambda,0}$ was 200 $\mu\text{mol}_{\text{hv}}/\text{m}^2\text{s}$.

III.3.2 Progressive nitrogen starvation strategy

The amount of inorganic nitrogen source (NH₄Cl) provided in the culture medium supports the biosynthesis of about 0.25-0.3 g/L of biomass before starch accumulation according to the stoichiometric equation for *C. reinhardtii* growth (Takache et al., 2012). Thus, the culture dynamic of *C. reinhardtii* shows first a growth phase in which microalgae consume the sole inorganic nitrogen source available to sustain cell division followed by a carbon reserve accumulation phase once the nitrogen source is finally depleted. The initial concentration of NH₄Cl = 0.1 g/L was chosen to ensure that nitrogen starvation was the only parameter affecting carbon reserve storage and that no limitation due to light transfer may occur during the culture.

III.3.3 Physiological dynamics characterization

In order to study the dynamics of starch accumulation during progressive nitrogen starvation, the following biophysical parameters of the culture were measured at regular time intervals during the batch process: (i) the total and catalytic biomass expressed as dry weight (in kg/m^3), (ii) the cell density N_T (in $\#/ \text{mL}$), (iii) the Chl *a* and *b* and total carotenoid concentrations (in kg/m^3) and mass fractions, (iv) the starch concentration (kg/m^3) and mass fraction, (v) the concentration of inorganic nitrogen (ammonium NH_4^+) in the culture (in mg/L).

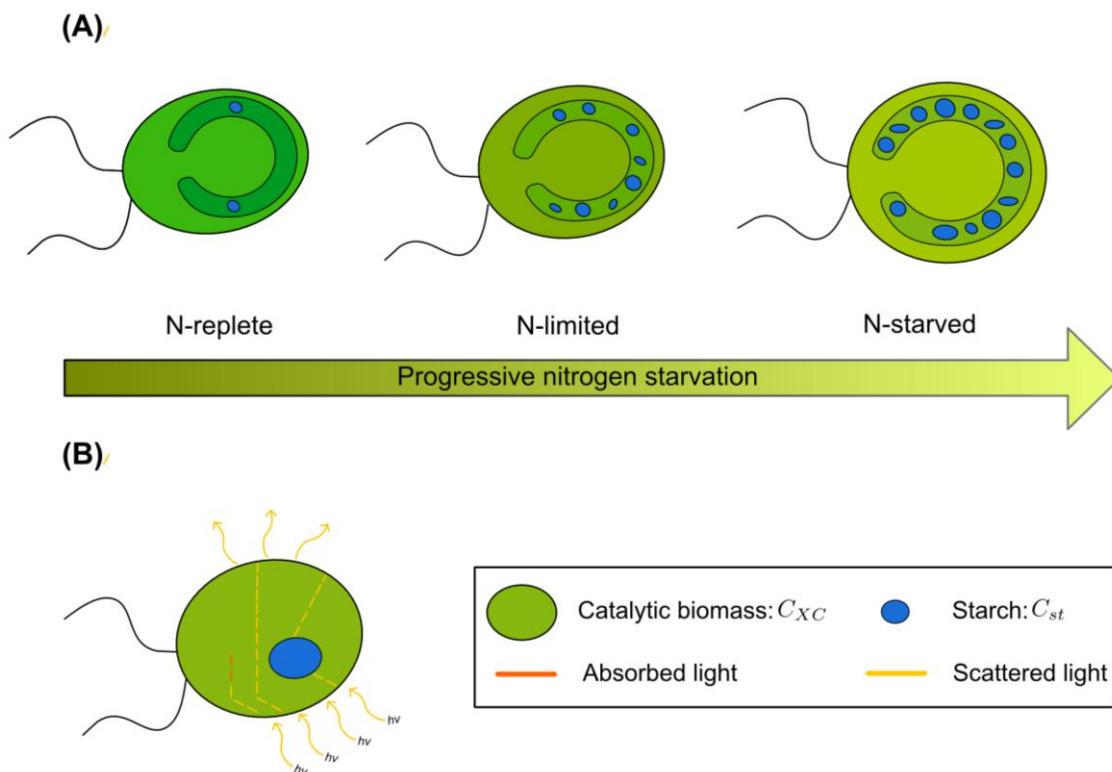


Figure III-1. Green microalgae cell *C. reinhardtii* compartmentalization into the catalytic biomass and the carbon reserves accumulated such as starch. (A) During progressive nitrogen starvation, the starch in the form of non-absorbing granules, is accumulated in the microalgae chloroplast, (B) The total biomass is composed of the catalytic biomass and accumulated starch. The first is responsible for the light absorption (red lines) and light scattering (yellow line), whereas the second is involved only in light scattering (yellow lines). The artificial or natural light is only absorbed by the catalytic biomass while the photons are scattered by the whole biomass, *i.e.*, the catalytic biomass and the starch.

III.3.3.1 Total and catalytic biomass concentrations

The microalgae total dry weight biomass C_{XT} was measured by a gravimetric technique. A volume of culture, ranging from 5 to 15 mL, depending on the cell concentration, was filtered using a pre-dried and pre-weighed 0.7 μm pore size glass-microfiber filter (Whatman GF/F). The filters were dried at 110 °C for 24 h, cooled in a desiccator for 25-30 min and reweighed. The reported biomass concentration for each sample corresponded to the average of triplicates and the error bars correspond to 95% confidence intervals.

The total biomass C_{XT} is typically used as representative of the number of cells when microalgae are cultivated under non-limiting growth conditions. However, when *C. reinhardtii* is cultivated under nitrogen starvation conditions, cell division stops while carbon reserves are accumulated with concentration C_r . This means that the catalytic biomass concentration C_{XC} corresponding to the active fraction of the total biomass should be assumed as the referent of the number of cells in such a case since the accumulation of carbon reserves in the form of starch or lipids can modify the overall weight of an individual cell, although it does not necessarily imply that the cell density increases (Figure III-1A). Thus, the catalytic biomass C_{XC} which should remain proportional to the cell number density is defined as (Kandilian et al., 2019):

$$C_{XC} = C_{XT} - C_r = C_{XT} - (C_{st} + C_{TAG}). \quad (\text{III. 16})$$

This representation is particularly important because the radiation characteristics as well as the rates of light absorption can be now expressed per kg of C_{XC} .

Moreover, note that the starch and TAG accumulation phases are separated in time, as demonstrated in Refs. (Adesanya et al., 2014; Longworth et al., 2012; Park et al., 2015). Thus, during the starch-accumulation phase, the carbon reserve concentration C_r corresponds only to the starch concentration, *i.e.*, $C_r = C_{st}$ and $C_{XC} = C_{XT} - C_{st}$. In addition, batch culture was carried out in the starch-accumulation phase throughout the progressive nitrogen starvation conditions. Moreover, the TAG concentration C_{TAG} was measured at the end of the batch culture and did not change throughout the cultivation. In other words, the TAG-accumulation phase was not observed.

III.3.3.2 Cell density, size distribution, and starch volume fraction

The cell density N_T (in #/mL) was measured by sampling the culture using a Malassez counting chamber and image software analysis ImageJ. The pictures were taken using a

Zeiss microscope connected to a CCD camera (AxioScope A.1 with color camera AxioCam MRC, Zeiss) with total optical magnification of 400X (objective lens 40X and eyepiece 10X).

The size distribution of the cells was estimated at different stages of the batch culture by measuring the minor F_{min} and major F_{maj} Ferret diameters of individual cells treated as ellipsoids. *C. reinhardtii* cells were approximated as second order Tchebytchev particles (spheroids, $n = 2$) (Mishchenko et al., 2002; Takache et al., 2012). The Tchebytchev polynomial can describe a wider range of cell shapes. The volume-equivalent radius r_{eq} was defined as:

$$r_{eq} = a_0 \sqrt[3]{T_v} \quad (\text{III. 17})$$

where a_0 is the average diameter and T_v the Tchebytchev's polynomial, with both depending on the measured Ferret's diameters F_{min} and F_{maj} (J.-F. Cornet, 2007). The frequency distribution of the volume-equivalent radius $f(r_{eq})$ was calculated according to:

$$f(r_{eq}) = \frac{N(r_{eq})}{\int_0^{\infty} N(r_{eq}) dr_{eq}} = \frac{N(r_{eq})}{N_T} \quad (\text{III. 18})$$

where $N(r_{eq})$ is the number of cells per mL of suspension with a volume-equivalent radius between r_{eq} and $r_{eq} + \Delta r_{eq}$ with $\Delta r_{eq} = 0.1 \mu\text{m}$. A minimum of 500 cells were analyzed for each size distribution presented and the reported error bars corresponded to 95% confidence intervals.

Finally, the experimental volume fraction of starch $f_{v,st}$ was estimated as:

$$f_{v,st} = \frac{C_{st}}{N_T \rho_{st}} \quad (\text{III. 19})$$

where ρ_{st} is the starch density taken as $\rho_{st} = 1.5 \text{ kg/m}^3$ (Marousis & Saravacos, 1990). The reported experimental error bars of $f_{v,st}$ were calculated from propagating uncertainties in measuring microalgae starch concentration and the cell number, resulting in an estimated range of around 10-15%.

III.3.3.3 Pigment concentration and mass fraction

C. reinhardtii pigments were extracted in pure methanol and quantified using a spectrophotometer. A volume V_s of culture was centrifuged at 13,400 rpm for 15 min. The formed pellet with microalgae cells and pigments was resuspended in $V_{MeOH} = 1.5$ mL of pure methanol. The samples were incubated for 45 min to 1 h in an oven at 45 °C for extraction and then centrifuged for 10 minutes. Finally, the optical density (OD) of the supernatant was measured at wavelengths of 750, 665, 652, and 480 nm – corresponding to the absorption peaks of Chl *a* and *b* and carotenoids – using a UV-Vis spectrophotometer (Jasco V-730 Easton, MD). The pigment extractions were realized in triplicates and the reported value corresponds to the average. The reported error bars correspond to 95% confidence intervals. The concentrations C_{Chla} and C_{Chlb} in mg/L of photosynthetic pigments Chl *a* and *b* were determined using the widely used correlations (Ritchie, 2006) :

$$C_{Chla} = [-8.0962(OD_{652} - OD_{750}) + 16.5169(OD_{665} - OD_{750})] V_{MeOH}/V_s. \quad (\text{III. 20})$$

$$C_{Chlb} = [27.4405(OD_{652} - OD_{750}) - 12.1688(OD_{665} - OD_{750})] V_{MeOH}/V_s. \quad (\text{III. 21})$$

The concentration C_{PPC} of total carotenoids (PPC) accounting for both photoprotective (PhPC) and photosynthetic (PSC) carotenoids was calculated according to (Strickland & Parsons, 1977) :

$$C_{PPC} = 4(OD_{480} - OD_{750}) V_{MeOH}/V_s. \quad (\text{III. 22})$$

The ratio of PhPC and PSC concentrations was considered to be constant and equal to 6 for all growth conditions (Dubinsky & Stambler, 2009).

Finally, the mass fractions of the different pigments were defined with respect to the total C_{XT} and catalytic C_{XC} biomass concentrations, respectively denoted by w_{pig} and w'_{pig} and expressed as

$$w_{pig} = \frac{C_{pig}}{C_{XT}} \quad \text{and} \quad w'_{pig} = \frac{C_{pig}}{C_{XC}}. \quad (\text{III. 23})$$

III.3.3.4 Starch concentration and mass fraction

The white pellet remaining at the end of the pigment extraction and containing microalgae cells and starch was resuspended in a sodium acetate buffer solution (0.1 M, pH = 4.5) and autoclaved at 135 °C for 1 h. Then, the samples were agitated and the starch

concentration was measured with the commercial starch enzymatic assay kit SA-20 (Sigma-Aldrich). Measurements of the microalgal starch concentration C_{st} were performed in triplicates and the reported error bars correspond to 95% confidence intervals. Then, the starch mass fraction w_{st} was determined according to

$$w_{st} = \frac{C_{st}}{C_{XT}}. \quad (\text{III. 24})$$

III.3.3.5 Inorganic nitrogen (NH_4^+) concentration in the culture

The commercial spectrophotometric kits HACH Lange LCK 303 and LCK 305 were used for measuring the NH_4^+ ion concentration in the culture medium. A volume of culture between 0.2 mL to 5 mL was filtered in a 0.2 μm pore size single use filter unit (Minisart, Sartorius) and added to the kit's vials and incubated for 15 min at ambient temperature. Then, concentration was determined by a dedicated spectrophotometer (HACH Lange DR2800) measuring the absorbance at 695 nm.

III.3.4 Radiation characteristics

III.3.4.1 Experimental measurements

The experimental radiation characteristics $\bar{A}_{abs,\lambda}$ and $\bar{S}_{sca,\lambda}$ of *C. reinhardtii* under a progressive nitrogen starvation conditions and accumulating starch were measured at regular time intervals using the methodology described previously by Pilon et al., 2011. First, the microalgae cells were washed and resuspended in PBS solution after being centrifugated at 13,400 rpm for 10-15 min. The normal-normal and normal-hemispherical transmittances $T_{nn,\lambda}$ and $T_{nh,\lambda}$ of the PBS-suspended cells were measured with a UV-Vis-NIR spectrophotometer (Agilent, Cary 5000, Santa Clara, CA) equipped with an integrated sphere module attachment (Agilent Cary DRA-2500, Santa Clara, CA). Here, the culture samples were diluted such that $C_{XT} \leq 0.13$ g/L to ensure that single scattering prevailed (Pilon et al., 2011). The measurements were performed in 1 cm path length quartz cuvettes (110-10-40 Hellma Analytics, Müllheim, Germany) at wavelengths between 400 and 750 nm. The spectral mass cross-sections of *C. reinhardtii* were measured for three different dry biomass concentrations C_{XT} to verify that they were independent of C_{XT} . It is important to note that the measured mass absorption cross-section was determined by replacing the total biomass C_{XT} with the catalytic biomass C_{XC} concentration in Equation (III.1) such as $\bar{A}_{abs,\lambda} = \kappa_\lambda / C_{XC}$ since only the catalytic

portion composed of the pigments and the constituents carbohydrates and lipids are involved in the absorption of the radiant energy necessary for growth and metabolite production (Figure III-1B) (Kandilian et al., 2019). Contrary to absorption, scattering is caused by the entire cell composed of both the catalytic biomass and the carbon reserves (Figure III-1B). Then, the scattering cross-section $\bar{S}_{sca,\lambda}$ was defined based on the total biomass concentration C_{XT} , i.e., $\bar{S}_{sca,\lambda} = \sigma_{s,\lambda}/C_{XT}$. Finally, depending on the inorganic nitrogen concentration measured, the experimental radiation characteristics were calculated using the correction factor (i) $\epsilon_n = 0.67$ during normal growth conditions, i.e., when ammonium was still available and (ii) $\epsilon_n = 0.72$ during nitrogen deficiency conditions, based on a previous study (Kandilian, Pruvost, et al., 2016). The reported results of absorption and scattering mass cross-sections corresponded to the average of the triplicate measurements and the error bars to 95% confidence intervals.

III.3.4.2 Theoretical predictions

The theoretical radiation characteristics of *C. reinhardtii* under progressive nitrogen starvation and starch accumulation conditions were predicted based on the method developed by Dauchet et al., 2015 and previously described. The total biomass C_{XT} , pigment $C_{pig,j}$, and starch C_{st} concentrations measured experimentally were used to predict the cells effective complex index of refraction $m_\lambda = n_\lambda + ik_\lambda$, as illustrated in Figure III-2. The cells effective absorption index k_λ was calculated according to:

$$k_\lambda = \frac{\lambda}{4\pi} \sum_j C_{pig,j} E a_j = \frac{\lambda}{4\pi} \rho_{dry} (1 - x_w) \sum_j w'_{pig,j} E a_j \quad (\text{III. 25})$$

where individual pigments Chl *a*, Chl *b*, and total catenoids PPC accounting for both photoprotective and photosynthetic carotenoids were considered.

The anchor refractive index n_{vp} of *C. reinhardtii* cells accumulating carbon reserves was expressed as a weighted sum of the refractive indices of the cell constituents such that (Bhowmik & Pilon, 2016):

$$n_{vp} = \sum n_j f_{v,j} = n_{basal} (1 - f_{v,st}) + n_{st} f_{v,st} + n_{TAG} f_{v,TAG} \quad (\text{III. 26})$$

where $f_{v,j}$ is the volume fraction of the j^{th} cellular compartment given by $f_{v,j} = V_j/V_{cell}$ with V_{cell} being the total cell volume, i.e., $V_{cell} = \frac{4}{3}\pi r_{eq}^3$. Here, we consider a basal

refractive index n_{basal} corresponding to that of nutritional unstressed microalgae cell so that $n_{basal} = 1.375$ and the refractive index of starch as $n_{st} = 1.51$ and that of TAG as $n_{TAG} = 1.49$ at 820 nm (Bhowmik & Pilon, 2016). When *C. reinhardtii* cells are accumulating only starch as carbon reserves, n_{vp} can be written as:

$$n_{vp} = (1 - f_{v,st})n_{basal} + n_{st} f_{v,st}. \quad (\text{III. 27})$$

This value of n_{vp} was used to predict the spectral refractive index n_λ of *C. reinhardtii* cells using the Kramers-Kronig relation [Equation (III-10)]. Moreover, the volume fraction of starch $f_{v,st}$ was calculated based on the basal volume of microalgae cells $V_{basal} = 4\pi r_{basal}^3/3$ so that:

$$f_{v,st} = \frac{V_{st}}{V_{cell}} = \frac{V_{st}}{V_{basal} + V_{st}}. \quad (\text{III. 28})$$

Here, V_{st} is the volume occupied by starch in the microalgae cells given by:

$$V_{st} = \left(\frac{w_{st}}{1 - w_{st}} \right) \frac{m_{XC}}{\rho_{st}} \quad (\text{III. 29})$$

where m_{XC} corresponds to the mass of one individual cell assumed to be constant and equal to 73 pg/cell, as estimated from biomass concentration and cell count under non-limiting growth conditions. The basal mean equivalent radius r_{basal} was taken as 4.0 μm for *C. reinhardtii* (Berberoglu et al., 2008; Kandilian, Pruvost, et al., 2016; Pottier et al., 2005).

Finally, the prediction of the log-normal size distribution $f(r_{eq})$ of the microalgae cells under different nitrogen starvation conditions were computed considering a constant standard deviation ($\sigma = 0.56 \mu\text{m}$) inferred from experimental observations and a mean equivalent radius \bar{r}_{eq} expressed as a function of the starch mass fraction accumulated such that:

$$\bar{r}_{eq} = \sqrt[3]{\frac{3V_{cell}}{4\pi}} = \sqrt[3]{\frac{3(V_{basal} + V_{st})}{4\pi}}. \quad (\text{III. 30})$$

The error bars associated with the numerical predictions of absorption and scattering cross-sections resulted from the propagation of uncertainties in measuring the microalgae

biological compounds such as the catalytic biomass and the pigment concentrations. The reported error bars were estimated to be around $\pm 15\text{-}20\%$.

III.3.5 Light transfer in PBR

The catalytic biomass concentration C_{XC} was considered as representative of the cell number in the culture, as previously explained. Thus, the local fluence rates $G'_\lambda(z)$ and $G'_{\lambda, simp}(z)$ were determined by replacing the total biomass concentration C_{XT} with the catalytic biomass concentration C_{XC} in Equations (III.11) and (III.13), respectively. In addition, the reflectance ρ_λ of the PMMA torus flat-panel PBR with a stainless steel back wall was taken as 0.2 (Takache et al., 2010). The backward scattering ratio b_λ was assumed constant over the PAR region and equal to 0.008 (Kandilian, Pruvost, et al., 2016).

The local spectral rate of photon absorption (LRPA) $\mathcal{A}_\lambda(z)$ which represents the amount of photons absorbed per unit of catalytic biomass and time at location z in the PBR. It depends on the *C. reinhardtii* average mass absorption cross-sections $\bar{A}_{abs, \lambda}$ and the local fluence rate $G'_\lambda(z)$ obtained under progressive nitrogen starvation conditions and accumulation of carbon reserves. It was calculated according to (J. F. Cornet et al., 1992):

$$\mathcal{A}_\lambda(z) = \bar{A}_{abs, \lambda} G'_\lambda(z) \quad (\text{III. 31})$$

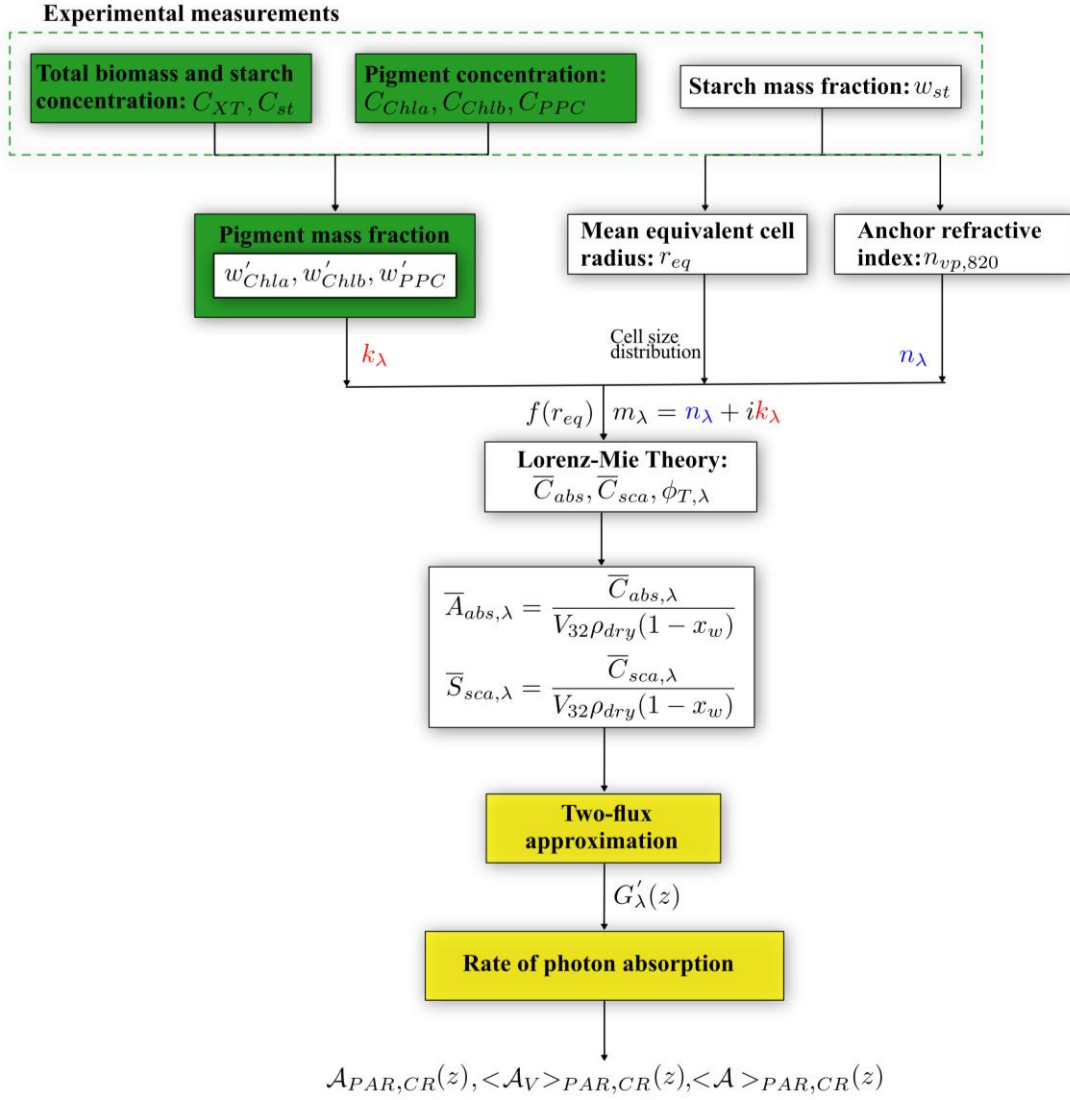


Figure III-2. Theoretical method developed for predicting microalgae radiation characteristics ($\bar{A}_{abs,\lambda}$ and $\bar{S}_{sca,\lambda}$) and the light absorption rate of microalgae culture in PBR under progressive nitrogen starvation conditions and accumulating carbon reserves. The method uses the total biomass, starch and pigment concentrations to establish the effective complex refractive index m_λ and the microalgae size distribution $f(r_{eq})$. The cross-sections ($\bar{C}_{abs,\lambda}$ and $\bar{C}_{sca,\lambda}$) and phase function $\Phi_{T,\lambda}(\theta)$ are calculated using the Lorenz-Mie Theory. From these, radiations characteristics are determined and the backward scattering ratio b_λ can be estimated from the phase function (but assumed constant in this work). Then, the predicted radiation characteristics are used to calculate the fluence rate $G'_\lambda(z)$ and the rates of photon absorption.

Moreover, the local PAR-averaged LRPA at location z can be expressed as:

$$\mathcal{A}_{PAR,CR}(z) = \int_{400}^{700} \mathcal{A}_\lambda(z) d\lambda \quad (\text{III. 32})$$

Similarly, the PAR-averaged mean volumetric rate of photon absorption $\langle \mathcal{A}_V \rangle_{PAR}$ and the mean specific rate of photon absorption of microalgae culture in the PBR $\langle \mathcal{A} \rangle_{PAR}$ can be defined in terms of catalytic biomass concentration C_{XC} according to:

$$\langle \mathcal{A}_V \rangle_{PAR,CR} = \frac{1}{L} \int_{400}^{700} \int_0^L C_{XC} \bar{A}_{abs,\lambda} G'_\lambda(z) dz d\lambda. \text{ and } \langle \mathcal{A} \rangle_{PAR,CR} = \frac{\langle \mathcal{A}_V \rangle_{PAR,CR}}{C_{XC}}. \quad (\text{III. 33})$$

Note that Equations (III.31)-(III.33) can be used to obtain the simplified rates of photon absorption $\mathcal{A}_{PAR,CR,simp}$, $\langle \mathcal{A}_V \rangle_{PAR,CR,simp}$ and $\langle \mathcal{A} \rangle_{PAR,CR,simp}$ by replacing the fluence rate given by the two-flux approximation $G'_\lambda(z)$ with a simplified two-flux approximation term $G'_\lambda(z)_{simp}$.

III.4 Results and Discussion

III.4.1 Physiological dynamics

III.4.1.1 Biomass, NH_4^+ concentration and cell count

Figures. III-3A and III-3B show the temporal evolution of the total biomass C_{XT} , the catalytic biomass C_{XC} , the ammonium concentration $[\text{NH}_4^+]$ (in mg/L), and the total cell number density N_T during a progressive nitrogen starvation batch culture. They indicate that the total biomass concentration C_{XT} increased all along the experiment up to 1 g/L after 69 h of culture. However, inorganic nitrogen concentration in the form of NH_4^+ , necessary for cell division, was entirely consumed after 21 h. At that moment, the catalytic biomass concentration C_{XC} was approximately 0.3 g/L. This concentration is consistent with the fact that the ammonium initial load of 1.87 mM could theoretically sustain the biosynthesis of up to 0.25 g/L of biomass under standard growth conditions, according to the known stoichiometric relationship for non-limited growth of *C. reinhardtii* (Takache et al., 2012).

Moreover, microalgae cell number density N_T increased during the first 33 h, when cell division took place even after 21 h when nitrogen was totally consumed. Under nitrogen starvation conditions, some supplementary cell divisions may occur as microalgae cells are able to remobilize proteins of ribosomes and RuBisCO stocks (Park et al., 2015; D. Zhang & Vassiliadis, 2015). After 33 h of culture, with nitrogen-deficient conditions, cell division stopped and the number of cells remained relatively unchanged. Thus, the total biomass concentration C_{XT} did not follow the same dynamic as the number of cells N_T due to starch accumulation inside the cells, as discussed in the next section. Therefore,

the catalytic biomass concentration C_{XC} is the most relevant mass representation of the number of cells within the cultivation system. In fact, the catalytic biomass increased up to 0.4 g/L during the first 33 h of culture and remained between 0.4-0.5 g/L after cell division stopped.

III.4.1.2 Starch mass fraction

Figure III-3C shows the evolution of the starch mass fraction w_{st} during progressive nitrogen starvation in batch culture. The starch content reached up to 54% after 69 h. This result is consistent with the larger starch mass fraction w_{st} reported for *Chlamydomonas* microalgae species (Gifuni et al., 2017). The starch content dynamic was related to the nitrogen deficiency and increased sharply after 21 h when inorganic nitrogen was consumed. Nevertheless, the starch accumulation phase seemed to have started even before 21 h when the microalgae culture was nitrogen-limited. Thus, the sustainable increase of total biomass concentration during the 69 h of batch culture despite the observed inorganic nitrogen consumption after 21 h can be explained by the carbon reserves accumulation process triggered inside the microalgae cells in the form of starch. *C. reinhardtii* cells can store starch and lipids during nitrogen-limiting conditions, as previously mentioned. However, they are accumulated separately in time with the starch storage phase occurring before the lipid production phase (Adesanya et al., 2014; Longworth et al., 2012; Park et al., 2015). In fact, starch serves as a precursor for lipid synthesis if the nitrogen deprivation persists over time (Juergens et al., 2015; Smythers et al., 2020).

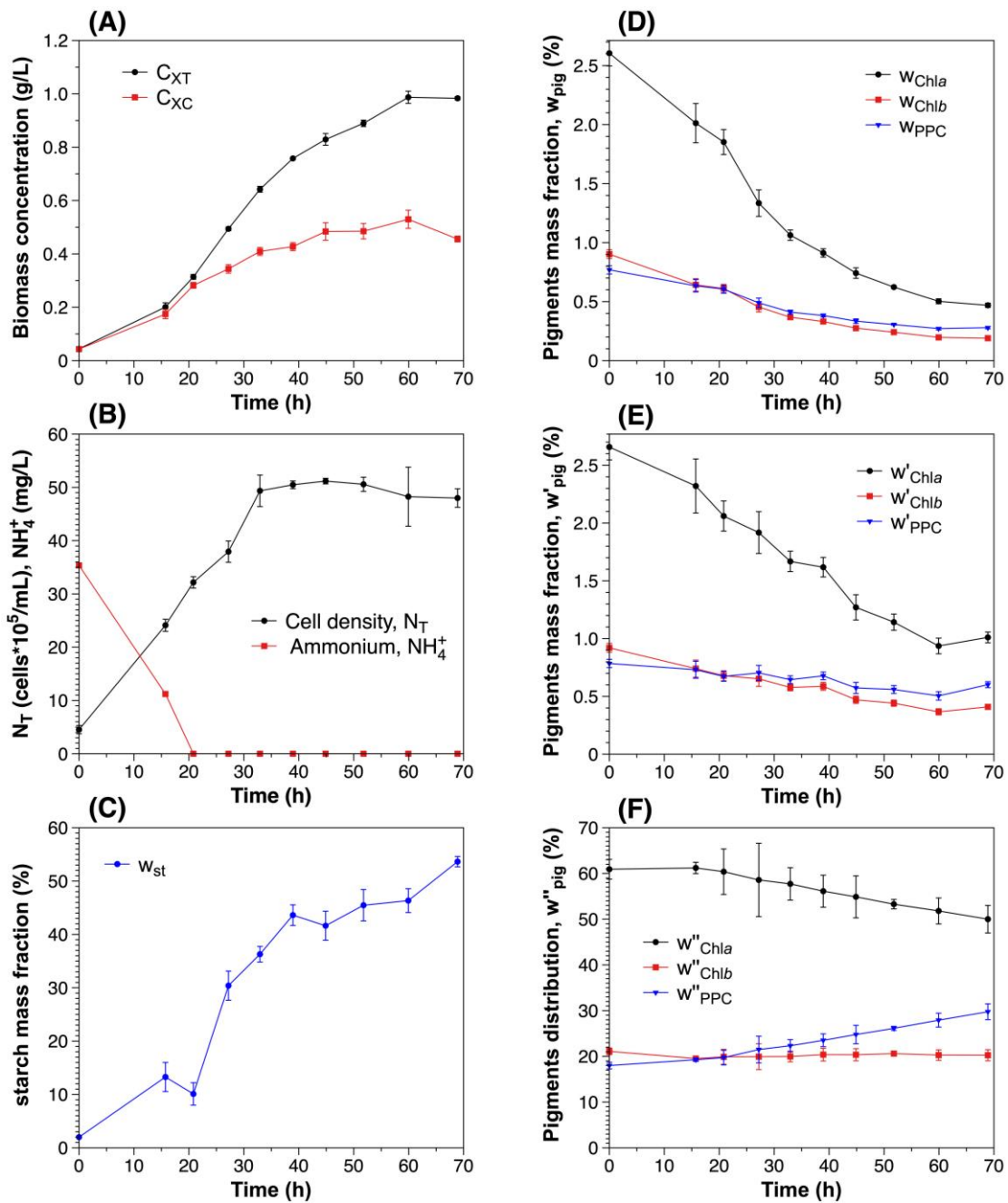


Figure III-3. Physiological changes of *C. reinhardtii* batch culture under a progressive nitrogen starvation condition. Temporal evolution of (A) the total C_{XT} and catalytic C_{XC} biomass concentrations, (B) ammonium concentration and cell density, and (C) starch mass content. Temporal evolution of (D) the pigment mass fractions in the total biomass w_{pig} , (E) the pigment mass fraction in the catalytic biomass w'_{pig} , and of (F) the pigment distribution w''_{pig} .

III.4.1.3 Pigment mass fractions

Figures III-3D to III-3F describe the temporal evolution of the pigment mass fractions w_{pig} and w'_{pig} and of the pigment distribution $w''_{pig} = C_{pig}/C_{T,pig}$ such that $\sum w''_{pig} = 1$. Figure III-3D indicates that a significant decrease in the chlorophyll mass fractions w_{chla} and w_{chlb} in the total biomass. In fact, w_{chla} decreased by more than 5.5 times and w_{chlb} decreased by more than 4.7 times from their initial values measured at the beginning of the batch culture. Simultaneously, w_{PPC} decreased by more than 2.7 times. This decline in the pigment mass fractions w_{pig} can be explained by the progressive nitrogen starvation in which pigment adaptation take place in order to protect microalgae cells from light-induced oxidative stress by reducing the size of the photosynthetic antenna (Kandilian et al., 2013; Kandilian, Pruvost, et al., 2014; Pruvost et al., 2009). Nonetheless, this behavior can also be influenced by a dilution effect of pigments with respect to the total biomass concentration due to starch accumulation. In fact, chlorophyll mass fraction in nitrogen-starved cells fell because of the rapid cessation of their synthesis rather than because of their rapid degradation (Antal, 2018). Thus, the evolution of the pigment mass fractions w'_{pig} in the catalytic biomass C_{XC} is more appropriate to analyze the dynamics of pigment contents in relation to the number of cells. Indeed, Figure III-3E reveals that the Chl *a* mass fraction w'_{chla} in the catalytic biomass declined by a factor 2.7 and Chl *b* mass fraction w'_{chlb} decreased by a factor 2 from the beginning of the batch culture. Simultaneously, the PPC mass fraction w'_{PPC} decreased from 0.78 to 0.6 %, i.e., by a factor 1.3. Note that the concentration ratio of Chl *a* to Chl *b* pigments was approximately constant around $C_{chla}/C_{chlb} = 2.8$ during the entire batch culture, despite the decrease in w'_{chl} , as observed by Juergens et al., 2015. Therefore, *C. reinhardtii* cells adapted to progressive nitrogen starvation conditions by decreasing their chlorophyll mass fractions which stabilized by the end of the batch culture.

Figure III-3F shows the temporal evolution of the pigment distribution w''_{chla} , w''_{chlb} , and w''_{PPC} . All three distributions remained constant until the nitrogen was completely consumed. Once the nitrogen deficiency was reached after 21 h, the Chl *a* mass fraction w''_{chla} decreased progressively by 10% after 69 h of culture while the PPC mass fraction w''_{PPC} increased by the same percentage. The dynamic observed of the pigment distribution w''_{pig} did not stabilize over time, unlike the pigment mass fractions w_{pig} (Figure III-3A) and w'_{pig} (Figure III-3B). It is worth noting that the observed chlorophyll

degradation in cells during nitrogen starvation (Figure III-3E) led to an increase in the PPC content w''_{PPC} within the pigment pool (Figure III-3F) as carotenoids synthesis did not seem to be affected by the cultivated conditions, their concentration remained roughly constant throughout the duration of the culture (Figure III-3E). Thus, from a macroscopic perspective, the regulation of light absorption from microalgae cells during progressive nitrogen starvation appeared to be controlled by the decline in the chlorophyll mass fractions w'_{Chla} and w'_{Chlb} and by the acclimation of pigment distribution w''_{Chla} and w''_{PPC} .

III.4.2 Comparison of theoretical and experimental radiation characteristics

For this comparison four different physiological states during the progressive nitrogen starvation batch culture were analyzed and are summarized in Table III-1.

Table III-1. Experimental measurements of four physiological states during a progressive nitrogen starvation batch culture.

Time (h)	NH_4^+ (mg/L)	w_{st}	$f_{v,st}$	\bar{r}_{eq} (μm)	w'_{Chla}	w'_{Chlb}	w'_{PPC}	w_{Chla}	w_{Chlb}	w_{PPC}
16	11.2	0.133	0.03	4.00 ± 0.49	2.7	0.9	0.8	2.7	0.9	0.8
27	0	0.304	0.11	3.88 ± 0.51	1.9	0.7	0.7	1.3	0.5	0.5
52	0	0.455	0.18	4.17 ± 0.60	1.1	0.4	0.6	0.6	0.2	0.3
69	0	0.536	0.22	4.31 ± 0.65	1.0	0.4	0.6	0.5	0.2	0.3

III.4.2.1 Measurements of cell size distribution and starch volume fraction

Figure III-4 plots the histograms of the volume-equivalent radius frequency distributions $f(r_{eq})$ and the fitting log-normal distributions of *C. reinhardtii* at four different times and starch mass fractions w_{st} (Table III-1). At the beginning of the batch culture, while nitrogen was still present in the culture medium, the mean equivalent radius \bar{r}_{eq} was around $\bar{r}_{eq} = 4.0 \mu\text{m}$ and corresponded to that of *C. reinhardtii* cultivated under optimal conditions (Figure III-4A), as reported previously by Berberoglu et al., 2008; Dauchet et al., 2015; Kandilian, Pruvost, et al., 2016) but without measuring the carbon reserves. Indeed, at this moment, the starch content w_{st} was only 13% and the starch volume fraction $f_{v,st}$ was 3% (Table III-1). Thus, the beginning of starch accumulation phase within the cells did not seem to affect their size distribution during the growth period.

Figures III-4B to III-4D show the changes in the cell size distribution $f(r_{eq})$ observed during nitrogen starvation conditions. It indicates that the cell radius r_{eq} increased progressively between 4.0 to 6.0 μm as the starch content w_{st} within cells increased.

Similarly, the number of cells with equivalent radius r_{eq} between 3.0 and 4.0 μm decreased as the small microalgae cells were not regenerated since cellular division stopped after 33 h (Figure III-3B). Therefore, the cell size distribution profile tended to flatten by the end of the culture. To the best of our knowledge, no change in the cell size distribution has been reported for *C. reinhardtii* during nitrogen starvation batch culture. Nonetheless, the variation of the measured mean equivalent radius \bar{r}_{eq} from Figures III-4B to III-4D was only 10%.

Finally, changes in the shape of *C. reinhardtii* from ellipsoidal cells to larger spherical cells were previously observed in a sulfur deprived culture for hydrogen production (L. Zhang et al., 2002). These changes were attributed to starch accumulation but no quantitative analysis was reported. Here, Table III-1 reports the evolution of the starch volume fraction $f_{v,st}$ during the nitrogen deficiency batch culture and indicates that $f_{v,st}$ increased by up to 22%.

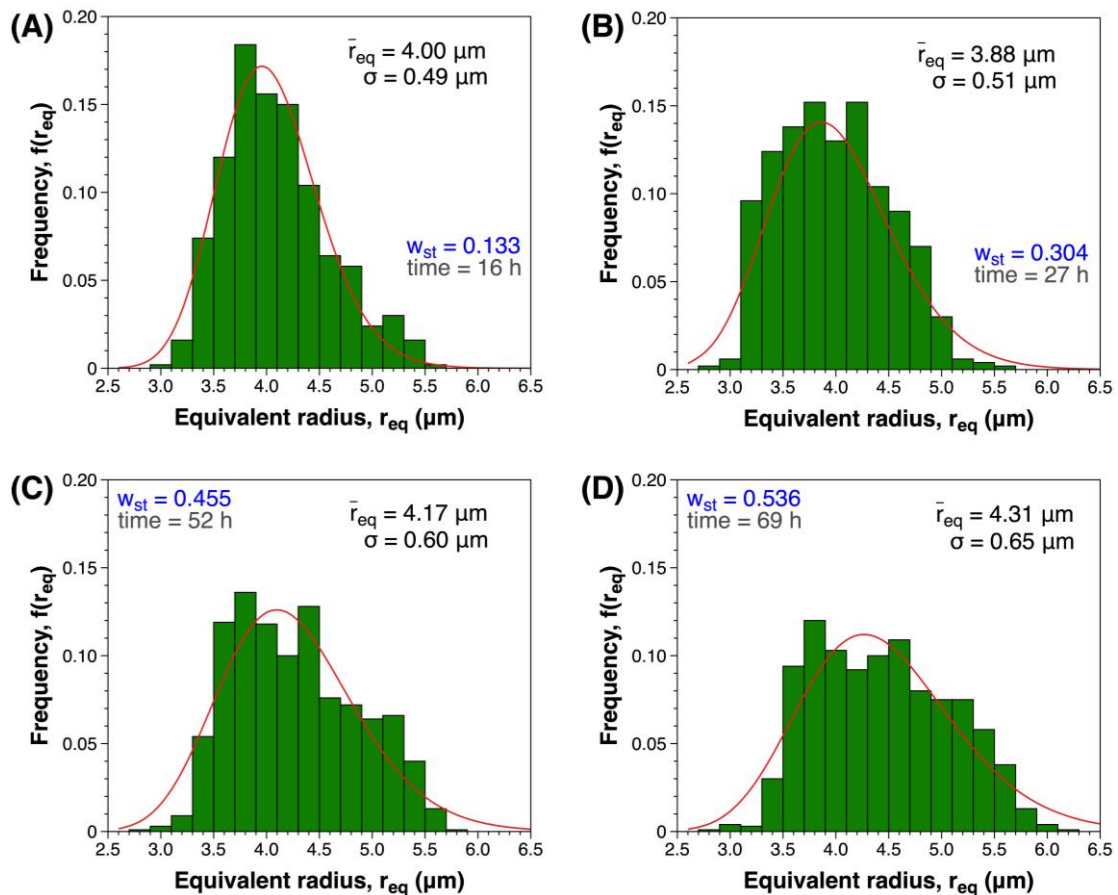


Figure III-4. Measured cell size distribution $f(r_{eq})$ and fitted log-normal distribution of *C. reinhardtii* under progressive nitrogen starvation in batch culture for different starch mass fractions namely (A) $w_{st} = 0.133$ after 16 h, (B) $w_{st} = 0.304$ after 27 h, (C) $w_{st} = 0.455$ after 52 h, and (D) $w_{st} = 0.536$ after 69 h.

III.4.2.2 Theoretical predictions of cell mean radius and starch volume fraction

Figure III-5A compares the experimentally measured and theoretically predicted [Equation (III.30)] cell equivalent mean radius \bar{r}_{eq} as a function of the starch volume fraction w_{st} . It indicates that the cell mean radius \bar{r}_{eq} increased with increasing starch mass fraction. Overall, excellent agreement was observed between experimental results and theoretical predictions with an average relative error less than 3%. The larger discrepancy was observed for $w_{st} = 0.304$ and can be explained by the fact that, after 33 h of batch culture, the cell division took place under nitrogen deprivation. Then, the new cells were smaller than during normal division cycle.

Similarly, Figure III-5B compares the starch volume fraction $f_{v,st}$ vs. the starch mass fraction w_{st} obtained experimentally and predicted by Equation (III.28). Reasonable agreements were observed between experiments and predictions. Note that $f_{v,st}$ was predicted considering a constant cell mass of 73 pg/cell. This value might need to be adjusted since, as the cell volume changes and starch accumulates during progressive nitrogen starvation, the mass of the cells should increase as well.

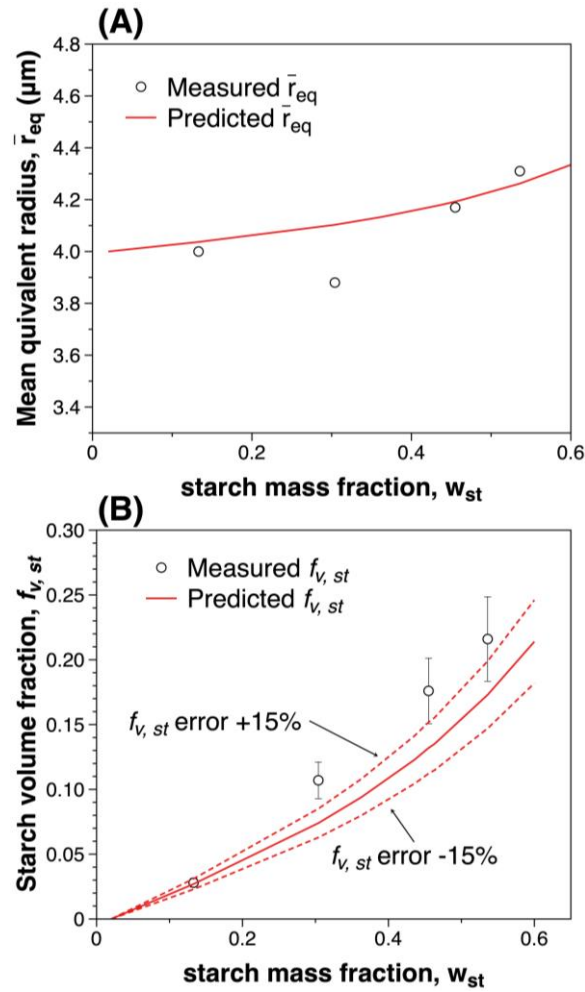


Figure III-5. Comparison of the theoretical predictions and experimental measurements of (A) the mean equivalent radius \bar{r}_{eq} and (B) the starch volume fraction $f_{v, st}$ in microalgae cells for different starch mass fractions accumulated during progressive nitrogen starvation in a batch culture.

Finally, the anchor refractive index n_{vp} predicted by Equation (III.27) as a function of $f_{v, st}$ ranged between 1.375 and 1.40. The changes in the cell composition caused by starch accumulation did not significantly affect n_{vp} . In fact, the reported values of n_{vp} for a non-stressed *C. reinhardtii* culture were 1.375 (Bhowmik & Pilon, 2016; Kandilian, Pruvost, et al., 2016; E. Lee et al., 2013) and 1.44 (Dauchet et al., 2015), and fell in the same range of that of *C. reinhardtii* cultivated during progressive nitrogen starvation in batch culture.

III.4.2.3 Measured vs. predicted mass absorption and scattering cross-sections

Figure III-6 compares the experimental measurements and the theoretical predictions of the spectral absorption cross-section $\bar{A}_{abs, \lambda}$ after (A) 16 h, (B) 27 h, (C) 52 h, and (D) 69

h of progressive nitrogen deprivation in a batch culture corresponding to different starch mass fractions w_{st} . It is evident that $\bar{A}_{abs,\lambda}$ decreased over time as nitrogen deprivation proceeded and pigment concentrations decreased (Figure III-3). The predicted average spectral mass absorption cross-section $\bar{A}_{abs,\lambda}$ agreed very well with the measurements across the PAR region and for all the physiological states investigated. In fact, the PAR-averaged relative difference between experimental measurements and theoretical predictions was less than 5%. Furthermore, the relative differences at wavelengths 440 nm and 676 nm, corresponding to the absorption peaks of chlorophylls *a* and *b*, did not exceed 10% for $\bar{A}_{abs,440}$ and 8% for the $\bar{A}_{abs,676}$.

Similarly, Figure III-7 compares the spectral scattering mass cross-section $\bar{S}_{sca,\lambda}$ measured and predicted at different times during progressive nitrogen starvation in a batch culture. It indicates that, unlike the absorption cross section $\bar{A}_{abs,\lambda}$, $\bar{S}_{sca,\lambda}$ remained nearly unchanged during the batch culture despite significant physiological changes (Figure III-3). Here also, the predictions and measurements agreed relatively well with a PAR-averaged relative difference of up to 18%. Overall, these results are good given the very complex physiological changes occurring to the cells under the studied cultivation conditions. Any discrepancies found between theoretical predictions and experimental measurements of the scattering mass cross-sections could be attributed to the fact that experimental measurements used the same correction factor ϵ_n during the accumulation phase of carbon reserves, once nitrogen source was totally consumed. However, a small difference in the correction factor ϵ_n was reported between *C. reinhardtii* cultures under non-limiting ($\epsilon_n = 0.67$) and nitrogen-limiting ($\epsilon_n = 0.72$) conditions (Kandilian, Pruvost, et al., 2016).

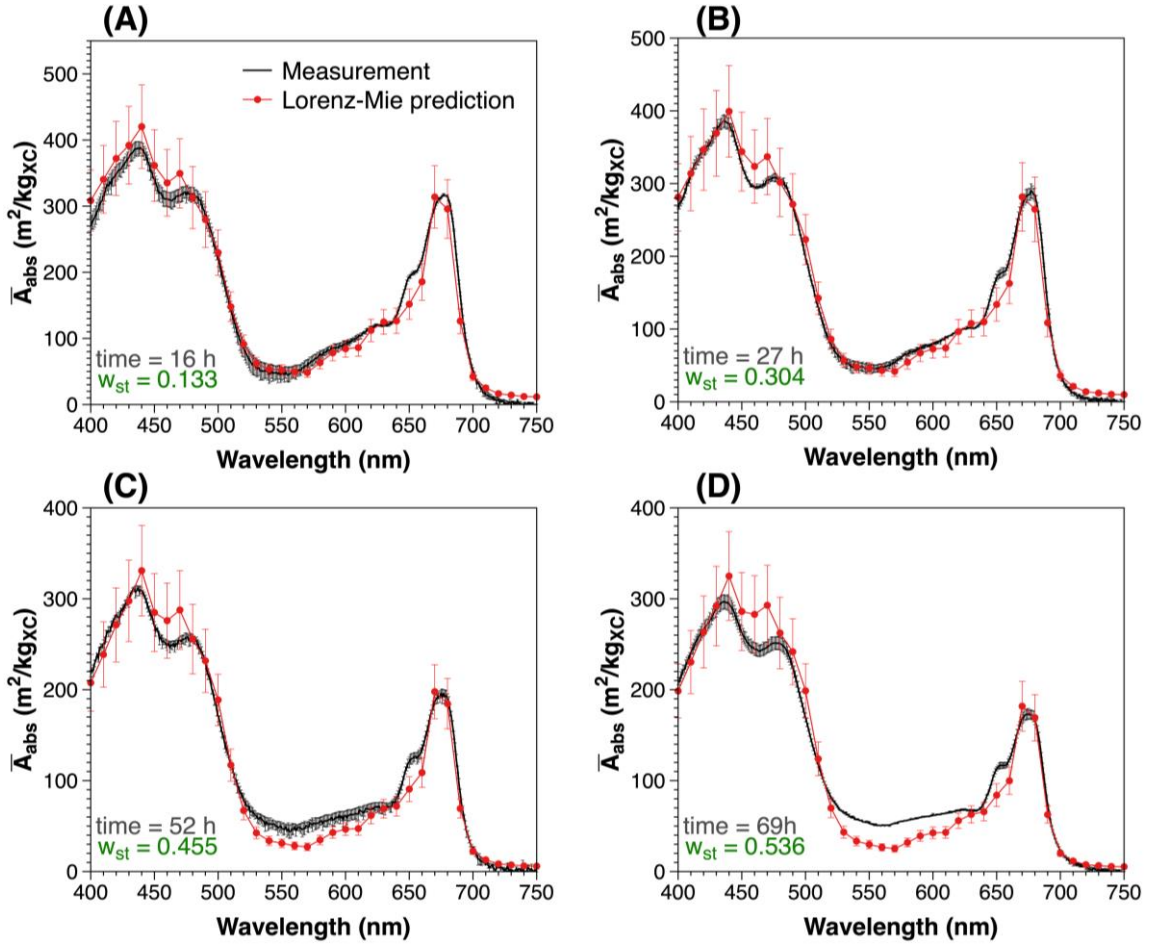


Figure III-6. Comparison between experimentally measured and theoretically predicted average spectral mass absorption cross-section $\bar{A}_{abs,\lambda}$ of *C. reinhardtii* under progressive nitrogen deprivation in batch culture for different starch mass fractions namely (A) $w_{st} = 0.133$ after 16 h, (B) $w_{st} = 0.304$ after 27 h, (C) $w_{st} = 0.455$ after 52 h, and (D) $w_{st} = 0.536$ after 69 h.

III.4.2.4 Local rate of photon absorption (LRPA)

Figure III-8 compares the PAR-averaged local rate of photon absorption $\mathcal{A}_{PAR,CR}(z)$ and $\mathcal{A}_{PAR,CR,simp}(z)$ determined as functions of the PBR depth z using the complete or simplified two-flux approximation for the determination of $G'_\lambda(z)$ and $G'_{\lambda,simp}(z)$, and experimentally measured and theoretically predicted spectral radiation characteristics of the microalgae (See Figures III-6 and III-7). Figure III-8 indicates that the PAR-averaged LRPA decreased during the batch culture as the pigment concentrations and the average mass absorption cross-section decreased.

To simplify citation, the terms ‘experimentally determined PAR-averaged LRPA’ and ‘numerically determined PAR-averaged LRPA’ were used to denote the PAR-averaged

LRPAs calculated from experimentally measured or theoretically predicted radiations characteristics. Figure III-8 demonstrates a very good agreement between both the experimentally and numerically calculated PAR-averaged LRPA $\mathcal{A}_{PAR,CR}(z)$ as well as the simplified PAR-averaged LRPA $\mathcal{A}_{PAR,CR,simp}(z)$. Indeed, the PAR-averaged relative differences between experimental and numerical LRPAs were lower than 1% for the intermediate starch mass fraction ($w_{st} \leq 0.3$) and for the higher starch mass fraction, it ranged between 7-9% (Figure III-8).

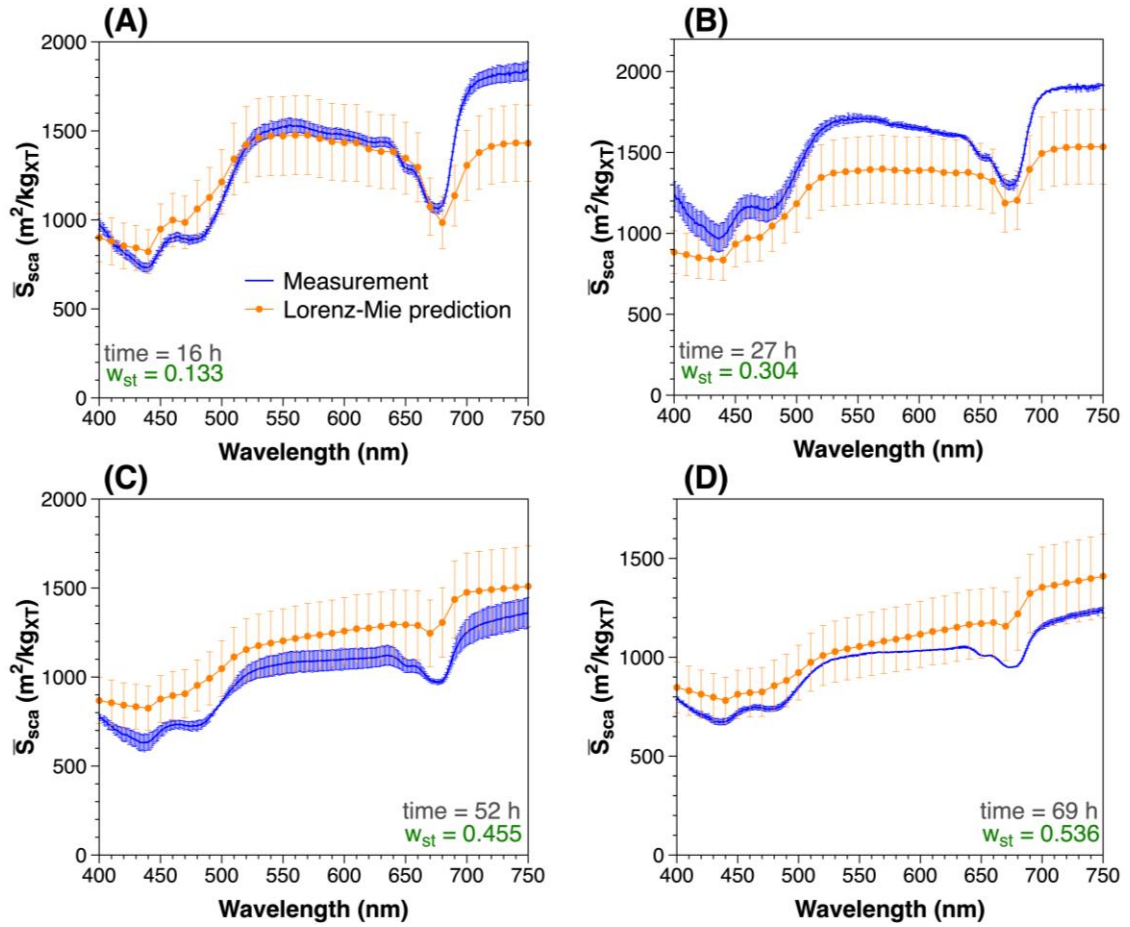


Figure III-7. Comparison between experimentally measured and theoretically predicted average spectral mass scattering cross-section $\bar{S}_{sca,\lambda}$ of *C. reinhardtii* under progressive nitrogen starvation in batch culture for different starch mass fractions namely (A) $w_{st} = 0.133$ after 16 h, (B) $w_{st} = 0.304$ after 27 h, (C) $w_{st} = 0.455$ after 52 h, and (D) $w_{st} = 0.536$ after 69 h.

In addition, Figure III-8 similarly shows that the PAR-averaged LRPA values obtained using a simplified two-flux approximation, $\mathcal{A}_{PAR,CR,simp}(z)$, were very similar to those obtained with a complete two-flux approximation, $\mathcal{A}_{PAR,CR}(z)$. In fact, the relative differences in the PAR-averaged LRPA between $\mathcal{A}_{PAR,CR}(z)$ and $\mathcal{A}_{PAR,CR,simp}(z)$ were

found lower than 5% for the four different physiological states during the progressive nitrogen starvation culture. As previously explained, microalgae suspensions scatter visible light mostly in the forward direction so that the influence of $\bar{S}_{sca,\lambda}$ in the two-flux approximation and consequently, on the calculation of PAR-averaged LRPA is negligible (Kandilian, Soulies, et al., 2016; E. Lee et al., 2014). The present results establish that this was also valid for nutritionally-deprived microalgae culture accumulating carbon reserves as starch. Therefore, the PAR-averaged LRPA values for a *C. reinhardtii* culture under nitrogen-limited conditions and accumulating carbon reserves could be estimated using the simplified two-flux approximation accounting only for the cell spectral absorption cross-section $\bar{A}_{abs,\lambda}$.

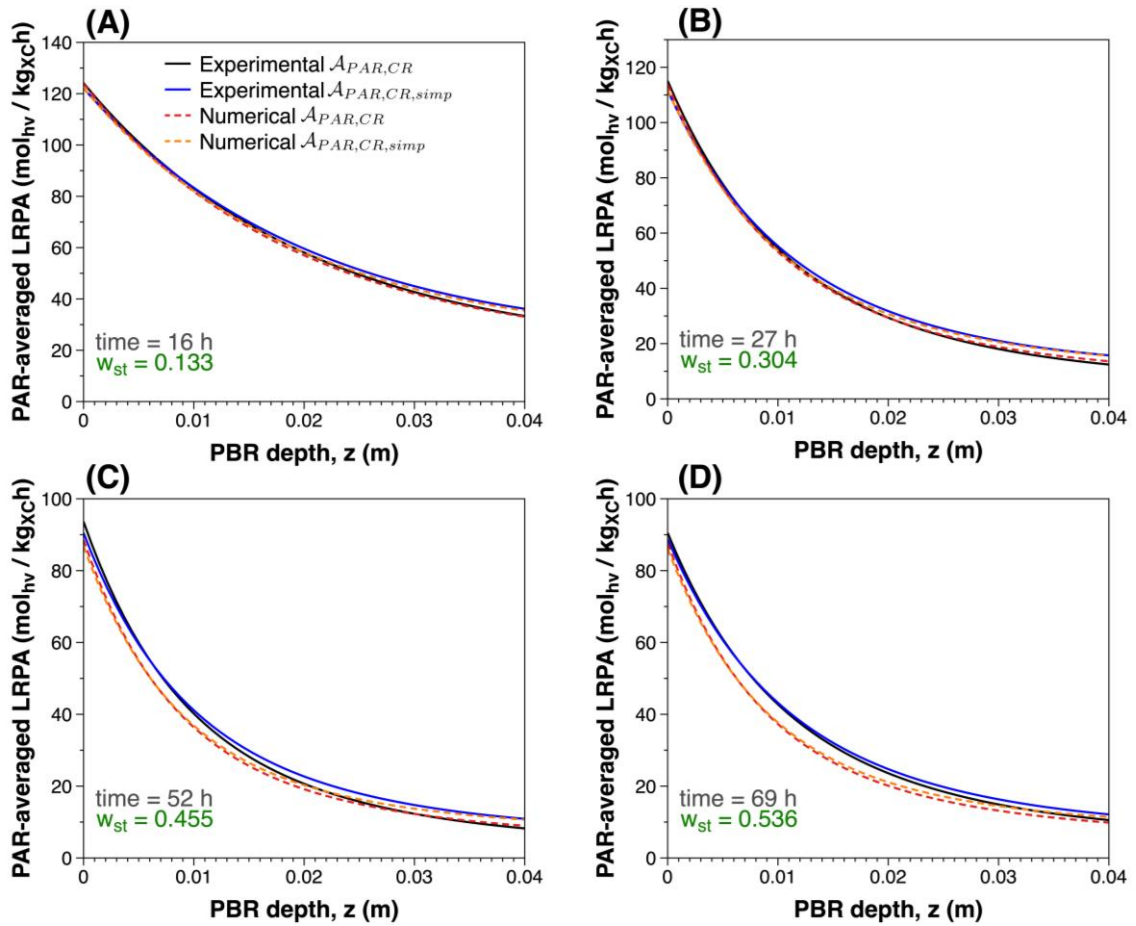


Figure III-8. Comparison of the PAR-averaged local rate of photon absorption LRPA $\mathcal{A}_{PAR,CR}(z)$ and simplified LRPA $\mathcal{A}_{PAR,CR,simp}(z)$ predicted using the complete or simplified two-flux approximation for the calculation of $G'_\lambda(z)$ and $G'_{\lambda,simp}(z)$, and experimentally measured and theoretically predicted radiation characteristics of *C. reinhardtii* under progressive nitrogen starvation in batch culture for different starch mass fractions namely (A) $w_{st} = 0.133$ after 16 h, (B) $w_{st} = 0.304$ after 27 h, (C) $w_{st} = 0.455$ after 52 h, and (D) $w_{st} = 0.536$ after 69 h.

Overall, the methodology developed in this study is capable of predicting accurately the mass absorption $\bar{A}_{abs,\lambda}$ and scattering $\bar{S}_{sca,\lambda}$ cross-sections and the LRPA of a *C. reinhardtii* culture in PBR cultivated under progressive nitrogen starvation conditions with intracellular accumulation of starch as carbon reserves.

III.5 Conclusion

This study developed and validated experimentally a method for predicting the radiation characteristics of the green microalgae *C. reinhardtii* cultivated under progressive nitrogen starvation in batch culture leading to accumulation of carbon reserves in the form of starch. Predictions of the spectral absorption index k_λ and the refractive index n_λ of N-starved microalgae cells took into account (i) the physiological changes including the decrease in pigment concentrations, the cessation of cell division, thanks to the introduction of the catalytic biomass concentration and (ii) the change in the volume of the microalgae cells caused by the accumulation of carbon reserves. Predictions of the N-deprived microalgae complex index of refraction $m_\lambda = n_\lambda + i k_\lambda$ and the measured cell size distribution were used in the Lorenz-Mie theory to obtain the spectral mass absorption and scattering cross-sections of cell. Moreover, the local rate of photon absorption could be predicted using the simplified two-flux approximation and the theoretically predicted absorption coefficient for all microalgae physiological states during a progressive nitrogen starvation. Finally, this methodology could be used to develop a database of radiation characteristics necessary for future microalgae kinetic modeling of carbon reserve accumulation under nitrogen-limiting conditions.

III.6 Appendix

III.6.1 Radiation characteristics database of *C. reinhardtii* cultivated under progressive nitrogen starvation and accumulating carbon reserves.

III.6.1.1 Considerations

The radiation characteristics of microalgae cultures performed in a PBR are necessary for the calculation of the local rate of photons absorption (LRPA), which constitutes the key parameter for coupling light radiative transfer to the kinetic models of microalgae growth. Furthermore, just as growth models require a database to generate the radiation characteristics of non-limited microalgae, upcoming kinetic modeling of nitrogen-limited cultures leading to the carbon reserves storage requires a database adapted to the complexity of the physiological response to these cultivating conditions.

It is worth noting that under non-limiting conditions, a spectral radiation characteristics database is created as a function of total pigments mass fraction w_{pig} and wavelength λ . Then, a classical 2-dimensional interpolation for a given value of w_{pig} is sufficient to obtain a set of $\bar{A}_{abs,\lambda}$, $\bar{S}_{sca,\lambda}$ and b values. The new theoretical methodology established in this work for calculating the radiation characteristics of *C. reinhardtii* cultivated under progressive nitrogen starvation constitutes a tool for generating a spectral radiative properties database that accounts for w'_{pig} , w''_{chla} , w_{st} and w_{TAG} , which corresponds to the main biological parameters representing the physiological changes undergone by microalgae cells (Figure III-9).

Thus, a 5-dimensional (5D) database was generated for interpolation (including λ). For practical analytical purposes and based on experimental results, the Chl *a* and Chl *b* ratio was considered constant and equal to 2.8. It allows reconstituting all the pigments mass fraction (w'_{chla} , w'_{chlb} , w'_{PPC}) for a given value of w'_{pig} and w''_{chla} as shown in Equation (III.34).

$$w'_{chla} = w'_{pig} w''_{chla} ; w'_{chlb} = \frac{w'_{pig} w''_{chla}}{2.8} ; w'_{PPC} = w'_{pig} \left(1 - w''_{chla} - \frac{w''_{chla}}{2.8} \right) \quad (\text{III. 34})$$

Moreover, as explained and demonstrated before, under nitrogen-stressed conditions, it is valid to consider only absorption phenomena to correctly determine LRPA. Therefore, the generated database contains only $\bar{A}_{abs,\lambda}$, but in any case, it could also contain $\bar{S}_{sca,\lambda}$ if needed.

Theoretical input for database creation

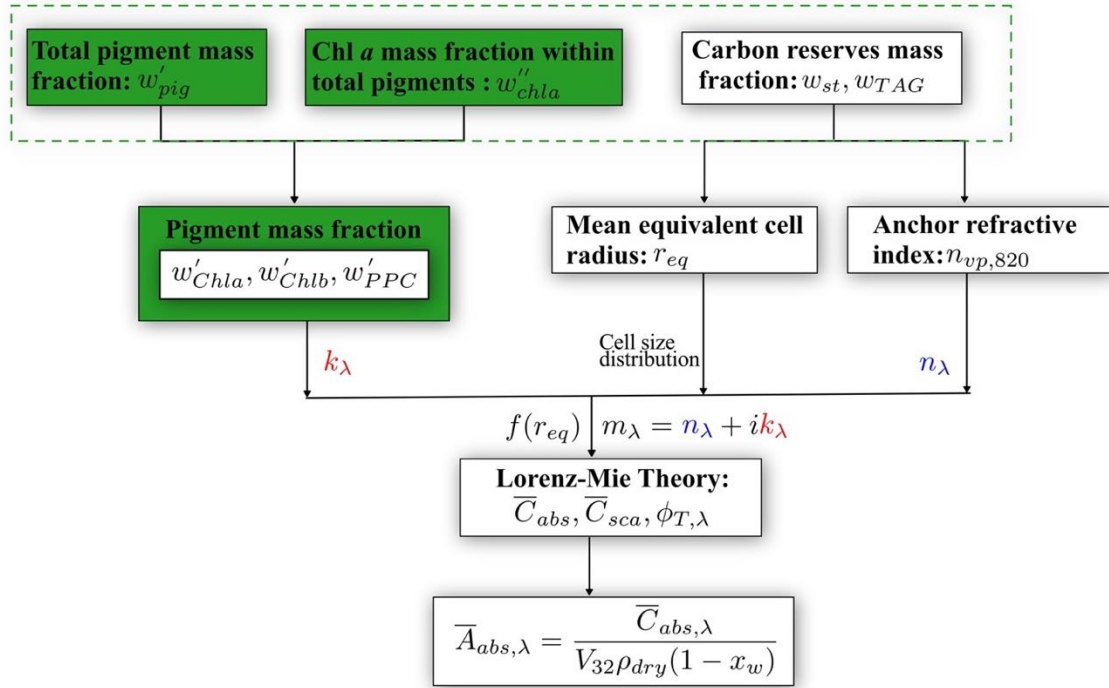


Figure III-9. Schematic representation of the prediction methodology for the mass absorption cross-section $\bar{A}_{abs,\lambda}$, used in the algorithm implementation to create a 5D-database of $\bar{A}_{abs,\lambda}$ as a function of biological parameters w'_{pig} , $w''_{chl a}$, w_{st} , w_{TAG} and the wavelength w .

III.6.1.2 Algorithm for the database creation and 5D-matrix interpolation

First of all, it was defined the working range of the biological parameters w'_{pig} , $w''_{chl a}$, w_{st} and w_{TAG} for the creation of the 5-dimensional database of $\bar{A}_{abs,\lambda}$. They were chosen based on experimental observation for $w''_{chl a}$ and w_{st} . A larger range was considered for w'_{pig} , so that

$$400 \geq \lambda \text{ (nm)} \geq 700 \quad \text{(III. 35)}$$

$$0.5 \geq w'_{pig} \text{ (\%)} \geq 7.5 \quad \text{(III. 36)}$$

$$0.35 \geq w''_{chl a} \geq 0.7 \quad \text{(III. 37)}$$

$$0 \geq w_{st} \geq 0.6 \quad \text{(III. 38)}$$

$$0 \geq w_{TAG} \geq 0.5 \quad \text{(III. 39)}$$

The steps within the provided ranges were as follows: 0.5 % for w'_{pig} , 0.025 for $w''_{chl a}$, 10 nm for λ and 0.05 for both w_{st} and w_{TAG} .

The construction of the $\bar{A}_{abs,\lambda}$ 5D-matrix begins with the formulation of a 5D-matrix filled with zeros, having the same size as the number of conditions to be evaluated, for the purpose of inserting and storing the generated radiation characteristics. Subsequently, an algorithm utilizing the radiation characteristics prediction methodology (Figure III-9) was executed in MATLAB software for all the conditions within the established working range of biological parameters [Equation (III.36) to (III.39)], and the results were placed into the 5D-matrix of zeros.

The MATLAB software was also used for the 5D-interpolations. First, a “mesh” containing all the condition ranges of biological parameters was created using the *ngrid* function. Then, the *griddedinterpolant* function was implemented to perform interpolation of the 5D-matrix of $\bar{A}_{abs,\lambda}$ in the newly formed mesh of condition ranges. Finally, the 5D-interpolation function was used to obtain punctual value of spectral $\bar{A}_{abs,\lambda}$ for a set of w'_{pig} , w''_{chla} , w_{st} and w_{TAG} .

Chapitre IV

IV. Développement d'un outil pour le suivi en ligne de la croissance et de l'accumulation de réserves carbonées chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

Résumé :

En vue de maîtriser l'étage 1 du procédé bi-étagé continu de production de biohydrogène par *C. reinhardtii*, il est primordial de développer un outil de suivi en temps réel de l'accumulation de réserves carbonées en conditions de limitation par la source d'azote afin de contrôler l'état physiologique des cellules et leur niveau de réserves dans cet étage. De ce fait, nous avons développé un outil de suivi en ligne de l'accumulation de réserves carbonées basé sur la mesure indirecte de la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène (r_{O_2}) obtenue à partir des compositions et des débits gazeux mesurés en ligne sur le photobioréacteur. Un modèle stœchiométrique compartimenté a été utilisé pour estimer la vitesse de croissance et de formation des réserves carbonées à partir des relations stœchiométriques connues entre les vitesses nettes de production de l'oxygène (r_{O_2}) et de formation de la biomasse totale, la composition de cette dernière étant sujette à variation. Pour ce faire, la biomasse totale a été décomposée en une fraction catalytique (biomasse sans réserve) et deux types de réserves carbonées, à savoir de l'amidon et des triglycérides (TAG). Les changements de composition dans la biomasse totale ont été pris en compte au travers de deux relations cinétiques. Les paramètres du modèle ont été identifiés à partir de deux cultures discontinues, et validés expérimentalement à partir d'un jeu de données indépendant. Les résultats de simulations obtenus par cet outil d'estimation montrent une bonne adéquation du modèle aux données expérimentales avec une erreur relative moyenne ne dépassant pas 10 %. Ainsi, cette étude a permis de valider l'utilisation d'un modèle stœchiométrique proposé comme outils de suivi en ligne de l'accumulation de réserves carbonées chez la microalgue *C. reinhardtii* cultivée en conditions de carence azotée progressive.

Abstract

Extensive research has been conducted on the use of microalgae biomass as feedstock for producing biofuels. However, microalgae bioprocess still requires simple tools for monitoring the main energetic molecules that can be accumulated inside cells, such as carbohydrates and/or lipids, in order to enhance and optimize culture production. This work aims to develop and validate a three-compartment stoichiometric model implemented as a monitoring tool for on-line estimating growth kinetics and carbon reserve accumulation in the form of starch and/or triglycerides (TAG). The proposed method relies on the indirect measurement of the net oxygen production rate and the known existing stoichiometric relationship between the rates occurring in the bioprocess considering three blocks as key biomass components (catalytic biomass/cell structural components, starch and triglycerids) that are sequentially accumulated over time during batch cultures. Metabolic shift occurring during nitrogen deprivation was modeled using well-defined kinetic terms. Model parameters were identified from two *C. reinhardtii* progressively nitrogen-starved batch cultures and validated experimentally on an independent batch culture. Finally, the state estimator predictions and experimental measurements for nitrogen uptake, microalgae biomass formation, and carbon reserve accumulation were found to be in rather good agreement with the experimental data.

Keywords: Starch, Bioprocess Monitoring, Stoichiometric Modeling, Microalgae, Photobioreactor.

IV.1 Introduction

Because of their vast biodiversity and composition, microalgae have found numerous industrial applications, notably in the cosmetic, pharmaceutical, human and animal food, chemical, and biofuel sectors (Khan et al., 2018; Rumin et al., 2021; Udayan et al., 2021). Microalgal biomass has been extensively studied for its potential as a feedstock for biofuels production and therefore particular attention has been given to the photosynthetic biosynthesis of carbohydrates and lipids such as starch and triglycerides (TAG) inside microalgae cells (Chen et al., 2013; Debnath et al., 2021; de Carvalho Silvello et al., 2022; Maeda et al., 2018; Markou et al., 2012).

Although many parameters related to the culture conditions can influence the microalgae growth and carbon reserves storage, such as irradiance or light intensity, pH, temperature, inorganic nutrients and dissolved oxygen (Antal, 2018; de Carvalho Silvello et al., 2022; González-Fernández & Ballesteros, 2012; Hu, 2013; Kazbar et al., 2019; Sousa et al., 2013), nitrogen deprivation has been one of the most implemented strategies to trigger carbohydrates and lipids accumulation within microalgal cells (Ran et al., 2019). However, the complex microalgae response to nitrogen-limiting conditions, which leads to starch and lipids storage, needs to be carefully monitored in the cultivation system to enable the improvement of nitrogen-limited microalgae cultures operation and the optimization of overall bioprocess performance.

Commonly, nutrients uptake and its evolution in the culture medium is measured offline through ions chromatography or by using classical colorimetric dosage methods (Havlik et al., 2016). Similarly, biomass composition expressed in terms of carbohydrate and lipid content can be monitored using offline techniques, such as enzymatic protocols, Infrared (IR) spectroscopy, Mass Spectroscopy (MS), Gas Chromatography coupled to Mass Spectroscopy (GC-MS), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), TLC (Thin Layer Chromatography) and HPTLC (Havlik et al., 2016; Jouhet et al., 2017; T.-H. Lee et al., 2013). Nevertheless, most of these methods are not adaptable for online monitoring of a microalgae culture and/or they are time-consuming, expensive and require extensive sample processing.

Current microalgal processes using dedicated cultivating systems called photobioreactors (PBR) can be fully-instrumented at laboratory scale for the online monitoring of light cycles, gas phase analysis (H_2 , O_2 , CO_2), temperature, pH, dissolved oxygen

concentration, turbidity, optical density and chlorophyll fluorescence measurements (Cervený et al., 2009; Fouchard et al., 2008; Havlik et al., 2016; Kazbar et al., 2019; Malapascua et al., 2014; Masojídek et al., 2022). Some advances have been done specially for the on-line monitoring of microalgae carbon reserves in the form of lipid using spectroscopy technologies, namely Raman, IR, Nuclear Magnetic Resonance (RMN) spectroscopies (Bouillaud et al., 2019, 2020; Havlik et al., 2016; Lieutaud et al., 2019). However, these technologies are emerging in the field of microalgae and therefore under study. Besides being expensive, they are invasive since they require the implementation of bypass loops for the recovery of the sample to analysis.

An alternative solution for the on-line monitoring of nitrogen-deprived microalgae cultures accumulating carbon reserves can be inspired from the bacteria fermentation process or even mammalian cells cultures in which growth and substrate conversion have been estimated indirectly by measuring CO₂ release through gas balance techniques (Aehle et al., 2011; de Assis & Filho, 2000; Lira-Parada et al., 2021; Sinner et al., 2021; Wechselberger et al., 2013). It is important to mention that gas balance analysis could be preferred over additional in situ probes for industrial applicability like in pharmaceuticals sector (Aehle et al., 2011; Sinner et al., 2021).

Moreover, it has been demonstrated that the indirect measurement of the net oxygen production rate obtained from gas balance analysis can be used to predict microalgae growth under non-limiting conditions (Cogne et al., 2001; Urbain, 2017). In fact, this methodology can be extended to microalgae cultures performed under nitrogen-limiting conditions and accumulating carbon reserves by considering the stoichiometric relationship between released oxygen and produced carbohydrates or lipids. The objective of this work is to develop and validate a model-based monitoring tool that utilizes the on-line indirect measurement of the net oxygen volumetric production rate, obtained by gas balance analysis, for the time-course estimation of growth and carbon reserves storage in the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*.

IV.2 Materials and Methods

IV.2.1 Experimental setup

IV.2.1.1 Studied microalgae, culture media and inoculum preparation.

Microalgae cultures were carried out using the wild-type strain of *Chlamydomonas reinhardtii* 137 AH from the culture collection of the French Atomic Energy Agency (CEA, Cadarache, France). It must be pointed out that the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* belonging to the Chlorophyta group was used for this work as a model photosynthetic microorganism (Harris, 2001; Salomé & Merchant, 2019; Scranton et al., 2015) known for accumulating large amounts of starch or reserve lipids (Banerjee et al., 2021; Sajjadi et al., 2018; H. Singh et al., 2019).

A nitrogen-limited (NL) artificial medium was used for the microalgae cultivation under progressive nitrogen starvation. The NL-medium had the following composition (in g/L): NH_4Cl 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.14, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05, KH_2PO_4 0.3050, NaHCO_3 1.68 and 1 mL/L of Hunter's trace elements solution (Hutner et al., 1950).

The inocula were obtained from a nitrogen-replete continuous culture performed in 1 liter-airlift PBR operated under autotrophic conditions in order to generate non-stressed inocula with the most similar initial macromolecular composition. The pH was regulated at 7.5 by the CO_2 injection and the incident photon flux q_0 was $200 \mu\text{mol}_{\text{hv}}/\text{m}^2\text{s}$. The inoculum characterization was made in term of pigments content, following known correlations developed by (Ritchie, 2006; Strickland & Parsons, 1977) and total sugar content using colorimetric method developed by (Dubois et al., 1956).

IV.2.1.2 Photobioreactor setup

Cultures of *C. reinhardtii* were performed in a lab-scale torus-shaped PBR with a working volume of 1.4 L and a thickness of 4 cm that is mechanically stirred using marine impellers. The PBR was made of transparent polymethyl methacrylate (PMMA) also formerly developed in the lab using polish stainless steel (Fouchard et al., 2008; Ifrim et al., 2014). Torus-shaped PBRs can be easily fitted to a gas analyzer, providing good sensitivity for gas balance analysis (Degrenne et al., 2010; Fouchard et al., 2008; Ifrim et al., 2014; Urbain, 2017), and its geometry allows efficient mixing and homogenization of culture medium with low shear-stress (Pruvost et al., 2006). Moreover, it belongs to flat-panel photobioreactor technology illuminated on one side allowing simple light transfer

characterization considering only 1-D light attenuation using collimated light source (Ferrel Ballestas et al., 2023; Pottier et al., 2005). The incident photons flux q_0 was provided by a LED panel using a calibration curve to set up the desired mean collimated q_0 on the PBR. The PBR was equipped with a pH/temperature probe (InPro 4801SG/Pt100, Mettler Toledo, Switzerland), an optical dissolved oxygen sensor (OxRob10 sensor attached to a FireStingO2-Mini meter, Pyroscience, Germany), and gas monitoring system. A general overview of the PBR setup is presented in Figure IV-1.

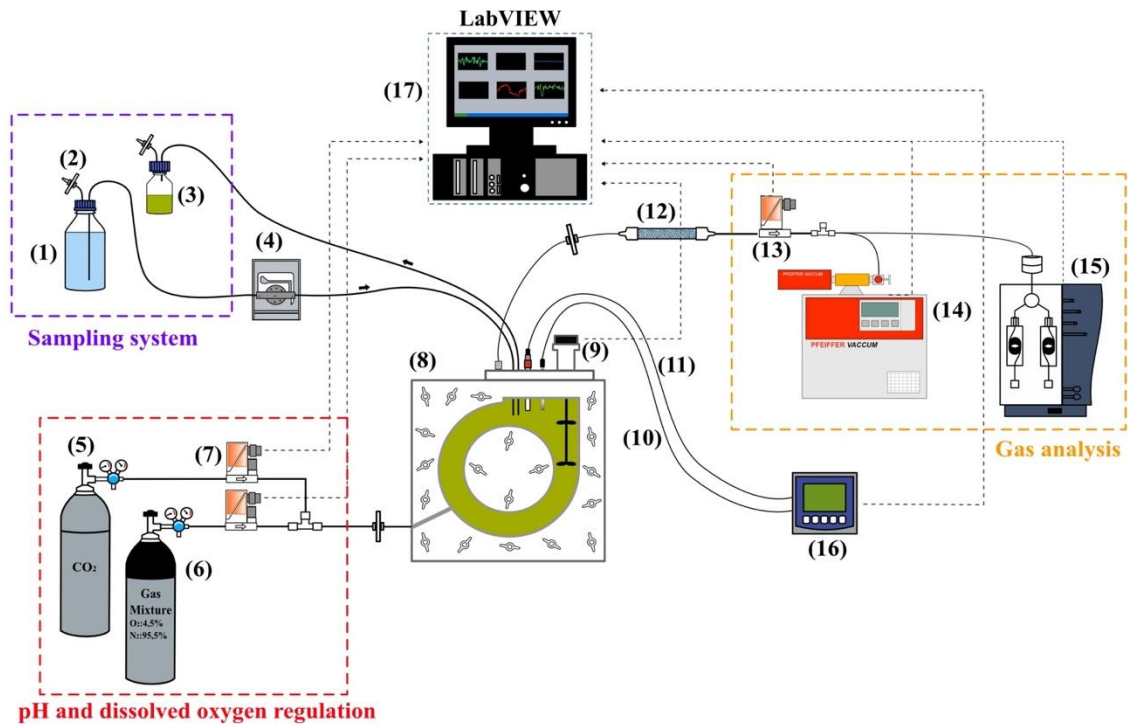


Figure IV-1. Experimental setup used for *C. reinhardtii* controlled-batch cultures. The cultivating system setup was composed of a sampling system, pH and dissolved oxygen regulations, instrumentalized PBR, homemade computer program and a gas analyzer for the gas balance analysis. (1) fresh medium, (2) gas filter, (3) culture sample, (4) pump, (5) pure CO₂ gas, (6) standard N₂/O₂ gas mixture, (7) flow-meter system, (8) PMMA PBR, (9) stirring motor, (10) oxygen probe, (11) pH and temperature probe, (12) Desiccant cartridge, (13) flow-meter reader, (14) mass spectrometer, (15) Micro Gas Chromatography (μ GC), (16) oxygen dissolved and pH transmitters, (17) LabVIEW homemade program. Two gas analyzers were implemented: the mass spectrometer was used for estimator development (culture 1 and 2) and the μ GC for estimator validation (culture 3).

IV.2.1.3 Gas monitoring system

A gas monitoring system was implemented onto the torus-shaped PBR for gas balance analysis, which required the measurement of inlet and outlet gas mass flow rates and outgoing compositions of the gas stream over time.

At the gas inlet level, two mass flow meters Bronkhorst High-Tech EL-FLOW were used for pure CO₂ and standard N₂/O₂ gas mixture (composed of 4.5 % mol O₂ and 95.5% mol N₂) injections with a working range of 0-10 mL/min and 0-200 mL/min, respectively. The mass flow meters accuracy is reported to be ± 0.5 %. Similarly, at the outlet level, the mass flow rate and gas composition (O₂, CO₂, N₂) were monitored using a mass flow meter reader associated with a quadrupole mass spectrometer (QMG 220, Pfeiffer Vacuum) as shown in Figure IV-1. It should be mentioned that for the experimental validation of the monitoring tool presented in this work, a Micro Gas Chromatography (μ GC) was further implemented for a simpler on-line data collection of gas composition. Moreover, the precision of gas analyzers for spectrometer and μ GC was considered as 0.001% and 0.0001%, respectively (Mowry et al., 2019).

It is worth noting that the choice of the standard gas mixture composition was defined to avoid the appearance of anoxia that may occur for microalgae cultivated under progressive nitrogen starvation conditions to avoid any undesired metabolic drift without losing the sensitivity and the required accuracy for gas composition and gas balance analyses in the cultivation system.

IV.2.1.4 Operational conditions of progressive nitrogen-starved batch cultures

The pH and dissolved oxygen concentration were regulated at 7.5 and 130 % of air saturation, respectively, throughout CO₂ and N₂/O₂ standard gas mixture injections (see supplementary materials), using PI controllers developed in the GEPEA laboratory and implemented in a homemade program in LabVIEW environment. The LabVIEW program allowed to online monitor, pH, dissolved oxygen concentration, mass gas flow meters, PBR outlet gas composition and save data at regular time intervals.

IV.2.1.5 Experimental protocol

Three progressive nitrogen-deprived batch cultures were carried out using the torus-shaped PBR and experimental setup described above for three different incident photon flux values, q_0 , of 200, 400 and 600 $\mu\text{mol}_{\text{h}}/\text{m}^2\text{s}$, hereafter referred to as 1, 2 and 3, respectively. The culture 1 and 2 were used for characterizing the compartment stoichiometric model parameters and the culture 3 for model validation. The nitrogen load in the NL-medium were selected in order to prevent any dark zone effects related to strong light attenuation and ensure that no light limitation occurs for microalgae cultures. The

physiological states of inocula were controlled by measuring pigment, starch and total sugar contents. Table IV-1 provides an overview of the culture-controlled parameters, initial nitrogen load for batch cultures, and the characterized physiological state of the inocula employed.

Table IV-1. Controlled parameters and operating conditions applied to progressive nitrogen starvation batch cultures.

Culture	q_0 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	pH	Dissolved O_2 (%)	NH_4^+ load (mg/L)	Inoculum physiological state		
					Starch (%)	Total sugars (%)	Chl <i>a</i> (%)
1	200	7.5	130	35.3	2	18	2.6
2	400	7.5	130	37.5	2	20	2.9
3	600	7.5	130	45.0	2	20	2.3

IV.2.2 Measurements

IV.2.2.1 Biomass concentration and cell density

The microalgae total dry weight biomass concentration C_{XT} in $\text{g}_{\text{XT}}/\text{L}$ was determined using a gravimetric technique. A volume of culture V_{C} ranging from 5 to 15 mL, depending on the cell concentration, was filtered through a pre-dried and pre-weighed (m_f) 0.7 μm pore size glass-microfiber filter (Whatman GF/F). The filters were dried at 110 °C for 24 h, cooled in a desiccator for 25-30 min and reweighed (m_{f+c}). The reported concentration for each sample corresponds to the averaged from three replicates.

The experimental cell density N_{T} (expressed in cells/mL) was determined using a Malassez counting chamber with the image analysis software ImageJ. The pictures were taken using a Zeiss microscope connected to a CCD camera (AxioScope A.1 with color camera AxioCam MRC, Zeiss) with total optical magnification of 400X (objective lens 40X and eyepiece 10X). The predicted cell density \hat{N}_{T} was derived from the numerically estimated catalytic biomass, \hat{C}_{XC} , which is defined as the concentration in total biomass without any carbon reserves, and corresponding to only cell structure composition, so that:

$$\hat{N}_{\text{T}} = \frac{\hat{C}_{\text{XC}}}{m_{\text{cell}}} \times 10^9 \quad (\text{IV.1})$$

where m_{cell} is the cell weight of microalgae cultivated under non-limiting conditions in pg/cell.

IV.2.2.2 Ammonium and inorganic nitrogen concentration

Commercial kits HACH Lange LCK 303 and LCK 305 were used for measuring the NH_4^+ ion concentration $C_{\text{NH}_4^+}$ in the culture medium. A volume of culture between 0.2 mL to 5 mL was filtered through a 0.2 μm pore size filter unit (Minisart, Sartorius) and added to the kit's vials and incubated for 15 min at ambient temperature. Then, the concentration $C_{\text{NH}_4^+}$ was further determined by means of a dedicated spectrophotometer (HACH Lange DR2800) measuring the absorbance at 695 nm.

The inorganic nitrogen concentration C_{N} was calculated such that:

$$C_{\text{N}} = C_{\text{NH}_4^+} \times \frac{M_{\text{N}}}{M_{\text{NH}_4^+}} \quad (\text{IV. 2})$$

where $M_{\text{N}} = 14 \text{ g/mol}$ and $M_{\text{NH}_4^+} = 18 \text{ g/mol}$ are respectively the atomic mass for nitrogen and the molecular mass for ammonium ions.

IV.2.2.3 Starch concentration and cell mass content

The microalgal starch concentration C_{st} was measured using a commercial enzymatic assay kit SA-20 (Sigma-Aldrich). First, extraction of the pigments was performed for each sample as described by (Ferrel Ballestas et al., 2023). The white pellet remaining at the end of the pigment extraction and containing microalgae cells and starch was resuspended in a sodium acetate buffer solution (0.1 M, pH = 4.5) and autoclaved at 135 °C for 1 h in order to solubilize starch. Then, the sample was stirred and the starch concentration C_{st} was measured following the kit instructions. The starch measurements were performed in triplicates and the reported value correspond to the average. Then, the starch mass fraction w_{st} was determined as the ratio between C_{st} and C_{XT} .

IV.2.2.4 Determination of the net volumetric oxygen production rate

The net volumetric oxygen production rate r_{O_2} was determined from the material balance equations for oxygen in both gas and liquid phases. Considering a quasi-steady-state assumption, the material balance for oxygen in the gas phase can be written as:

$$0 = (y_{\text{O}_2, \text{in}} G_{\text{T}, \text{in}} - y_{\text{O}_2, \text{out}} G_{\text{T}, \text{out}}) - N_{\text{O}_2} \quad (\text{IV. 3})$$

where N_{O_2} is the molar transport rate of oxygen to the liquid phase, G_T is the total molar flow rate and y_{O_2} is the molar fraction of oxygen. The subindices “in” and “out” respectively stand for the inlet and outlet of the PBR system.

In addition, by writing the material balance for oxygen in the liquid phase assuming a well-mixed behavior in the PBR (Pruvost et al., 2006), this lead to:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = r_{O_2} + \frac{N_{O_2}}{V} \quad (IV. 4)$$

By combining equations (IV.3) and Eq. (IV.4), the molar volumetric rate for oxygen production r_{O_2} is then given by:

$$r_{O_2} = - \left(\frac{y_{O_2,in} G_{T,in} - y_{O_2,out} G_{T,out}}{V} \right) - \frac{dC_{O_2}}{dt}. \quad (IV. 5)$$

It is worth noting that the accumulation term of the mass balance equation of abiotic phase for oxygen $\frac{dC_{O_2}}{dt}$ can be neglected due to the low solubility of oxygen in water, even if it can be easily assessed, so that equation (IV.5) can be simplified into:

$$r_{O_2} = \frac{y_{O_2,out} G_{T,out} - y_{O_2,in} G_{T,in}}{V} \quad (IV. 6)$$

The total molar flow rate $G_{T,in}$ is given by:

$$G_{T,in} = G_{CO_2,in} + G_{mix,in} \quad (IV. 7)$$

and the total molar outgoing gas rate $G_{T,out}$ can be calculated from the material balance equation for the inert gas of the system (N_2) assuming pseudo-steady state conditions as follows:

$$G_{T,out} = G_{T,in} \left(\frac{y_{N_2,in}}{y_{N_2,out}} \right) \quad (IV. 8)$$

Similarly, the molar fraction of oxygen at the inlet of the PBR can be determined by:

$$y_{O_2,in} = y_{O_2,mix} \left(\frac{G_{mix,in}}{G_{T,in}} \right) = 0.045 \frac{G_{mix,in}}{G_{T,in}} \quad (IV. 9)$$

where $y_{O_2,mix}$ is the oxygen molar fraction present in the standard gas mix bottle. The outlet oxygen molar fraction $y_{O_2,out}$ is directly measured by a gas analyzer (quadrupole portable mass spectrometer or μ GC).

IV.3 Compartment stoichiometric model

A monitoring tool based on gas balance analysis was developed in this work by implementing a dynamic compartment stoichiometric model that relates the net volumetric oxygen production rate to microalgae growth rate and storage rate of carbon reserves in the form of both starch and TAGs within the cells. The following sections detail the structure and operation of the proposed model.

IV.3.1 Verbal statement of phenomena that summarize the complex microalgae biological response to nutritional stress

Under nutritional-stressing conditions, such as nitrogen or sulfur deficiency causing progressive starvation conditions, microalgae exhibit a highly complex global biological response. This response includes a decline in pigment content, leading to a decrease in photosynthetic activity due to photosystem degradation, combined with the cessation of cell division and the start of carbon reserve accumulation (Adesanya et al., 2014; Antal, 2018; Ferrel Ballestas et al., 2023; Juergens et al., 2015; Mizuno et al., 2013; Park et al., 2015). In addition, metabolic and physiological studies have demonstrated that under nitrogen-deprived conditions *C. reinhardtii* cells first accumulate starch then TAG if nutritional stress persists (Ferrel Ballestas et al., 2023; Juergens et al., 2015; Longworth et al., 2012; Park et al., 2015). It is noteworthy that starch accumulation appears to be limited, likely due to a limited steric hindrance issue, and tends to approach a threshold value corresponding to the maximum starch content denoted hereafter as $w_{st,max}$. For *Chlamydomonas* species and others green microalgae species like *Chlorella* and *Parachlorella*, the maximum starch mass fraction $w_{st,max}$ appears to be around 0.45-0.6 (Adesanya et al., 2014; Ferrel Ballestas et al., 2023; Gifuni et al., 2017; Mizuno et al., 2013).

IV.3.2 Model structure development

IV.3.2.1 Biomass compartmentalization

Microalgae composition under nitrogen limitation can significantly vary due to the accumulation of carbon reserves. For this reason, a compartment model is well-suited for modeling microalgae cultures under nutritional stress conditions since the changes in biomass components, such as starch or TAG, will affect the relationships between the species involved in the overall biological process. Therefore, total biomass will be divided into three blocks, namely the catalytic biomass which corresponds to the fraction of

biomass encompassing all the constituent elements of cell structure and enzymatic equipment on the one hand, and on the other hand the carbon reserves that will be splitted into starch and TAG (Figure IV-2).

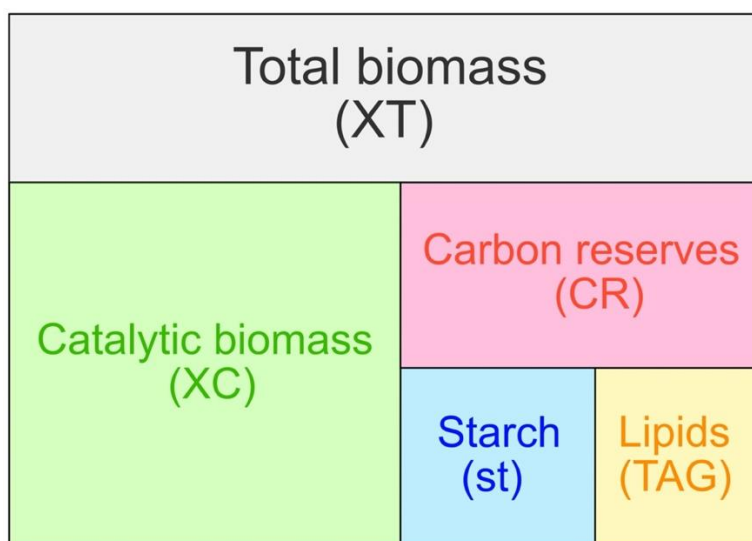


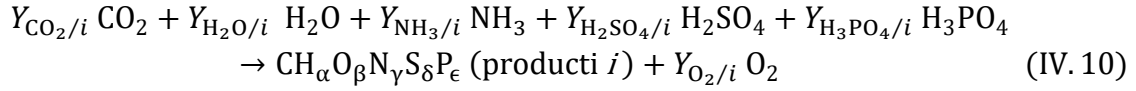
Figure IV-2. Compartment stoichiometric model structure for total biomass. Microalgae biomass is divided into catalytic biomass and carbon reserves namely starch and/or lipid reserves such as triglycerides (TAG).

The catalytic biomass (XC) will be assimilated as the microalgae biomass formed under non-limiting growth conditions, i.e., without any nutritional deficiency. Moreover, as we stated before, when the inorganic nitrogen source becomes limiting in the culture medium, microalgae will start to accumulate carbon reserves (CR) in the form of starch (st) and then TAG. This implies that the reactions leading to the synthesis of these three constituents will take place in the cultivation system sequentially over time. This statement is particularly important as it underlies the necessity to introduce an additional layer of modeling to implement the shift from one metabolic behavior to another. In addition, it is worth noting that it is possible to provide a stoichiometric representation for each of the reactions associated to the formation of these constituents of the total biomass as long as their elemental composition is known, as we will detail in next section.

IV.3.2.2 Stoichiometry

Considering microalgae cultivated under photoautotrophic conditions with nitrogen as the sole limiting factor while ammonia is the nitrogen source, the stoichiometry of the reactions leading to the formation of one C-mole of any of the constituent blocks of the

total biomass defined as a product i with a stoichiometric formula $\text{CH}_\alpha\text{O}_\beta\text{N}_\gamma\text{S}_\delta\text{P}_\epsilon$, can be written into a generalized equation of the form:



where $Y_{j/i}$ corresponds to the molar yield of reactant or product j that is consumed or formed with respect to the reference product i (XC, st or TAG). Redox balance can be used to easily calculate the so-called photosynthetic quotient, $Y_{\text{O}_2/i}$, as a function of the degree of reduction for product i (κ_i) (Villadsen et al., 2011) as follows:

$$Y_{\text{O}_2/i} = \frac{\kappa_i}{4} \quad (\text{IV. 11})$$

with $\kappa_i = 4 + \alpha - 2\beta - 3\gamma + 6\delta + 5\epsilon$.

As already mentioned above, the molar yield $Y_{\text{O}_2/i}$ can be directly calculated for any given product i if its elemental composition is known. Similarly, the other yield coefficients can also be determined from the elemental balances (Table IV-2). Considering the catalytic biomass, elemental composition analyses of dry biomass obtained from non-limiting growing microalgae cultures were performed so that a constant mean C-mole formula for this block component of the model can be assumed. Furthermore, due to the well-known polymeric nature of starch, its elemental composition referred to as one C-mole can also be considered as constant. Finally, in the same way as for catalytic biomass, the mean TAG composition can be measured throughout Fatty Acid Methyl Ester Analysis (FAME) to determine its elemental formula (data not shown) (Table IV-2). However, it is important to note that κ_i will depend on the nitrogen source used. Indeed, the reduction degree of the product i will be closely related to the oxidation state of nitrogen in the chemical used as nitrogen source.

Statistical analysis based on the variability of the measured elemental compositions of the microalgae *C. reinhardtii* grown under non-limiting conditions has shown numerical differences for the calculated yield coefficients, $Y_{\text{O}_2/\text{XC}}$ and $Y_{\text{NH}_3/\text{XC}}$, less than 1.9% and 1.2%, respectively. At first approximation, given the low observed variability, errors on yield estimates can be considered as non-significant.

Table IV-2. Molar yields of catalytic biomass, starch and TAG derived from their composition.

$Y_{j/i}$	Constituent			
	Generic $\text{CH}_\alpha\text{O}_\beta\text{N}_\gamma\text{S}_\delta\text{P}_\epsilon$	Catalytic biomass $\text{CH}_{1.769}\text{O}_{0.441}\text{N}_{0.171}\text{S}_{0.004}\text{P}_{0.020}$	Starch $\text{CH}_{1.667}\text{O}_{0.833}$	TAG $\text{CH}_{1.791}\text{O}_{0.109}$
$Y_{\text{CO}_2/i}$	1	1	1	1
$Y_{\text{H}_2\text{O}/i}$	$(\alpha - 3\gamma - 2\delta - 3\epsilon)/2$	0.594	0.833	0.896
$Y_{\text{NH}_3/i}$	γ	0.171	-	-
$Y_{\text{H}_2\text{SO}_4/i}$	δ	0.004	-	-
$Y_{\text{H}_3\text{PO}_4/i}$	ϵ	0.020	-	-
$Y_{\text{O}_2/i}$	$(4 + \alpha - 2\beta - 3\gamma + 6\delta + 5\epsilon)/4$	1.125	1	1.393

IV.3.2.3 Kinetic formulation

As we explained before, bioreactions taking place during nitrogen starvation occur sequentially over time in a transient regime. This implies that measuring the rate for any single component of the system is sufficient to determine all the others since the stoichiometry of the reaction taking place is supposed to be known at each instant. Based on previous research (Cogne et al., 2001), it was chosen in this work to measure the net oxygen production rate (noted hereafter r_{O_2}) to estimate all other rates in the system, so that:

$$\hat{\mathbf{r}} = \begin{bmatrix} \hat{r}_{XT} \\ \hat{r}_{XC} \\ \hat{r}_{st} \\ \hat{r}_{TAG} \\ \hat{r}_N \end{bmatrix} = \mathbf{Y} r_{O_2} \quad \text{with} \quad \mathbf{Y} = \begin{bmatrix} Y_{O_2/XT}^{-1} \\ Y_{O_2/XC}^{-1} \\ Y_{O_2/st}^{-1} \\ Y_{O_2/TAG}^{-1} \\ -Y_{O_2/N}^{-1} \end{bmatrix} \quad (\text{IV. 13})$$

with $\hat{\mathbf{r}}$ the vector of the estimated volumetric rates for system components, and \mathbf{Y} the vector of the yield coefficients for oxygen related to the same system components arranged in the same order as in $\hat{\mathbf{r}}$.

Note that under N-starvation the photosynthetic quotient $Y_{O_2/XT}$ is not constant anymore during the whole process, unlike what was observed under non-limiting growth conditions. Indeed, it depends on the reaction taking place within the cultivation system as shown by:

$$Y_{O_2/XT} = \frac{r_{O_2}}{r_{XT}} = \frac{r_{XC}Y_{O_2/XC} + r_{st}Y_{O_2/st} + r_{TAG}Y_{O_2/TAG}}{r_{XT}} \quad (\text{IV. 14})$$

Although all reactions have been described before, it is necessary to introduce kinetics terms to describe metabolic changes throughout the process. The first one corresponds to a limitation term that operates the metabolic switch between the formation of the catalytic biomass and the beginning of starch accumulation depending on nitrogen availability. This term denoted hereafter as \tilde{g}_N is given by:

$$\tilde{g}_N = \frac{C_N}{C_N + K_N} \quad (\text{IV. 15})$$

where K_N is the half-saturation constant for growth limitation by the nitrogen source (expressed in kg/m^3).

The second kinetic term gives the expression for the rate at which starch can reach its saturation value. This relationship denoted hereafter as \tilde{g}_{st} is defined as follows:

$$\tilde{g}_{st} = \left(\frac{w_{st}}{w_{st,max}} \right)^n \quad (\text{IV. 16})$$

where $w_{st,max}$ is the maximum starch mass content into microalgae cells and n is a non-negative power term. Note that each of the terms \tilde{g}_N and \tilde{g}_{st} varies between 0 and 1 depending on the given physiological state in which the nitrogen-limited cells are. Therefore, the metabolic switch between starch and TAG accumulation is considered in a first approximation as conditioned on the occurrence of a saturation phenomenon of possible starch reserves for the cells.

Finally, the global growth rate r_{XT} can be expressed as follows:

$$\hat{r}_{XT} = \hat{r}_{XC} + \hat{r}_{st} + \hat{r}_{TAG} = \frac{r_{O_2}}{Y_{O_2/XT}} M_{XT} \quad (\text{IV. 17})$$

with

$$Y_{O_2/XT} = \tilde{g}_N Y_{O_2/XC} + (1 - \tilde{g}_N)(1 - \tilde{g}_{st}) Y_{O_2/st} + (1 - \tilde{g}_N) \tilde{g}_{st} Y_{O_2/TAG} \quad (\text{IV. 18})$$

where M_{XT} stand for the molecular weight of *C. reinhardtii* total biomass expressed in kg.C-mol⁻¹, which depends on the carbon reserves accumulated (See Appendix A).

IV.3.2.4 Model state equations

The state equations for the model are given by material balances (written here in a matrix form) as follows:

$$\frac{d\hat{\mathbf{C}}}{dt} = \hat{\mathbf{r}} \quad \text{with} \quad \hat{\mathbf{C}} = \begin{bmatrix} \hat{C}_{XT} \\ \hat{C}_{XC} \\ \hat{C}_{st} \\ \hat{C}_{TAG} \\ \hat{C}_N \end{bmatrix} \quad (\text{IV. 19})$$

where $\hat{\mathbf{C}}$ is the chemical state vector which includes the concentrations of each component of the biotic phase (total biomass) and the concentration of the inorganic nitrogen source present in the abiotic phase (culture medium). The ordinary differential equation system in equation (IV.19) was solved using ODE15s in MATLAB software.

IV.3.2.5 Model parameter identification

The stoichiometric model parameters K_N and n as well as the cellular weigh m_{cell} were identified using the experimental data of culture 1 and 2 (Table IV-3). The identification was performed

with MATLAB using the function `fmincon` (Optimization Toolbox, MATLAB version 2023a, The MathWorks Inc., Natick Massachusetts, United States). The optimization was formulated as a quadratic problem by minimizing the squared error between the experimental values and the model outputs. The following constraints were applied on the model parameters for the identification process:

$$0.0001 < K_N < 0.01 \quad (\text{IV. 20})$$

$$1 < n < 20 \quad (\text{IV. 21})$$

$$40 < m_{\text{cell}} < 90 \quad (\text{IV. 22})$$

Please note that the model parameter $w_{\text{st,max}}$ was set to 0.6 based on the experimental observations.

Table IV-3. List of the model parameters with their descriptions, units and values.

Parameter or stoichiometric yield*	Description	Unit	Value
k_N	Inorganic nitrogen affinity constant	kg/m ³	0.0053
$w_{\text{st,max}}$	Theoretical maximum starch mass content	No units	0.6
n	Power value of the saturation term	No units	3
m_{cell}	Weight of cell	pg/cell	56

IV.4 Results and discussion

IV.4.1 Microalgae growth and starch accumulation dynamic

This section presents a description of the *C. reinhardtii* batch cultures progressively deprived of the inorganic nitrogen source, before comparing them to model simulations. A continuous monotonic increase of the total biomass concentration C_{XT} was observed during all the *C. reinhardtii* batch cultures up to reach a value of 0.9-1 g/L after 70 h and 45 h respectively for culture 1 and 2 (Figure IV-3A). The observed evolution of the total biomass C_{XT} is a result of an initial growth phase, followed by a phase of carbon reserves accumulation once inorganic nitrogen source has been depleted and cell division has ceased. Figure IV-3C illustrates that, after strict nitrogen starvation conditions occurring at 21 h for culture 1 and 19 h for culture 2, some additional cell division occurred before the confirmed cessation of cell division. This

experimental observation can be attributed to the presence of ribosome proteins and/or enzyme stocks such as RuBisCO, which can be remobilized to support further cell division (Park et al., 2015; D. Zhang & Vassiliadis, 2015).

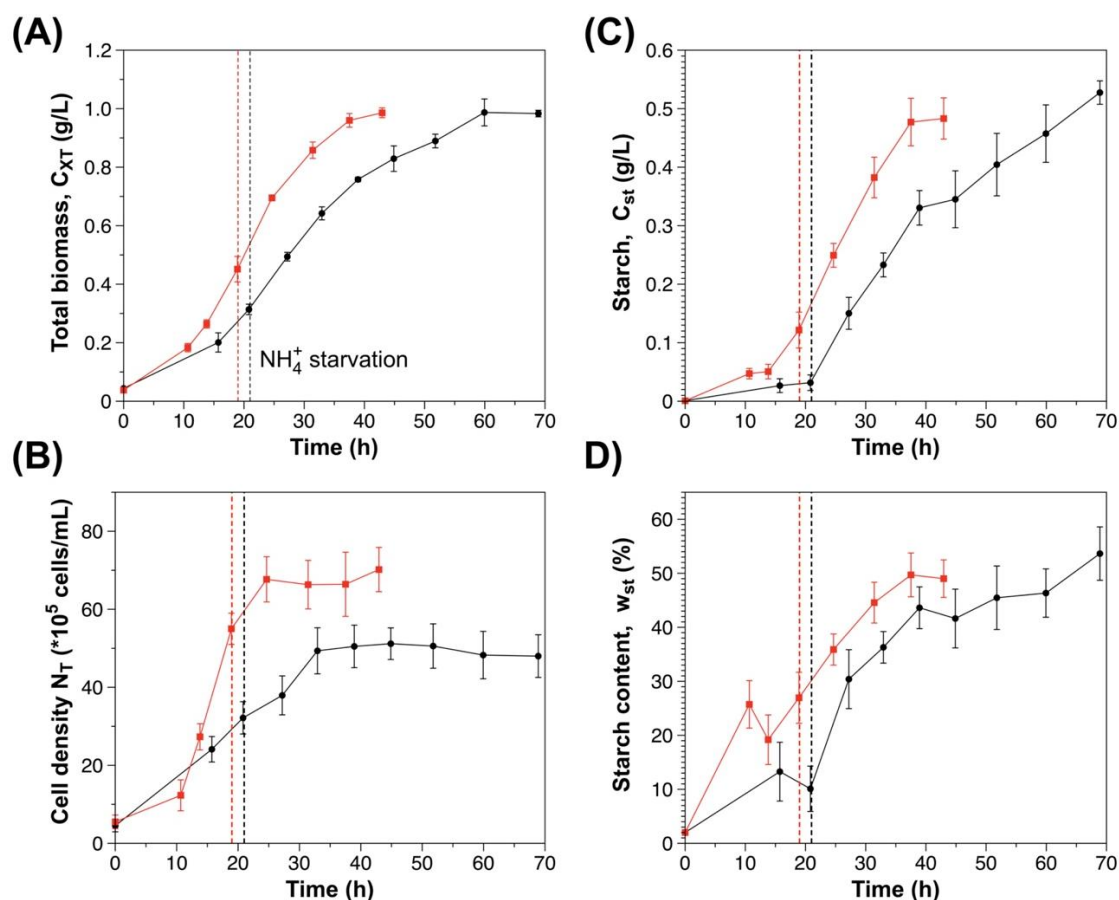


Figure IV-3. *C. reinhardtii* growth and starch storage dynamic. (A) total biomass concentration, (B) inorganic nitrogen concentration, (C) starch concentration, (D) starch content. Black and red symbols represent culture 1 and culture 2, respectively. Vertical discontinued red and black lines refer to the time of total inorganic nitrogen consumption.

Similarly, in Figures IV-3B and IV-3D, a phase of starch accumulation is observed following nitrogen depletion and the cessation of cell division. The *C. reinhardtii* cells accumulated starch and reached a maximum starch content of 53 and 49% for cultures 1 and 2, respectively. The experimental values of $w_{st,max}$ reported in this work are consistent with the $w_{st,max}$ range of 45-60% for microalgae cultures performed under nutritional-limiting conditions (Adesanya et al., 2014; Ferrel Ballestas et al., 2023; Gifuni et al., 2017; Mizuno et al., 2013).

IV.4.2 On-line indirect measurement of r_{O_2} by gas analysis

Figure IV-4 shows the evolution of the net volumetric oxygen production rate r_{O_2} as a function of time respectively for the culture 1 and 2. The time evolution profile of r_{O_2} appears to be

similar for both cultures, with an increase observed along with the progress of the growth phase associated with nitrogen uptake, until it reaches a maximum value assessed around $1.1 \text{ mol O}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ for culture 1 and $1.6 \text{ mol O}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ for culture 2. The observed difference for the maximum value of r_{O_2} between cultures 1 and 2 depicts two photosynthetic activity levels reached with respect to the changing light energy input into the culture. After cell division cease, the net oxygen production declines consistently with the decrease in the photosynthetic activity when nitrogen starvation occurs (Antal, 2018; Ferrel Ballestas et al., 2023; Juergens et al., 2015; Park et al., 2015). Note that the averaged relative error of the r_{O_2} indirect measurement was estimated to be 5% for culture 1 and 9% for culture 2. These relative errors are related to precision of equipment used for gas balance analysis, namely mass flow-meters and off-gas analyzers.

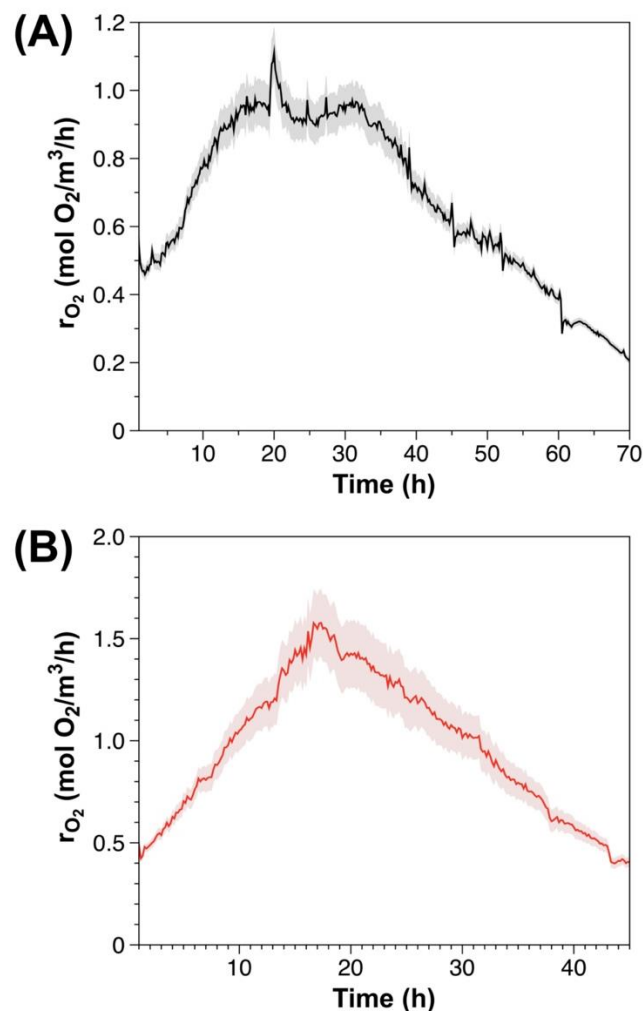


Figure IV-4. Time-evolution of the net volumetric oxygen production rate r_{O_2} obtained by gas analysis technique. Black and red color correspond to the culture 1 and 2, respectively. The shaded regions show the relative error of the indirect measurement of the r_{O_2} .

Additionally, it is worth noting that, in accordance with the stoichiometry, oxygen is not only released during growth but also when carbon reserves are accumulated, as shown in figures IV-4A and IV-4B. In these figures, it can be observed that, besides the drop in r_{O_2} after nitrogen depletion and the cessation of cell division, photosynthetic activity still exists as indicated by the non-zero value of r_{O_2} .

IV.4.3 Simulation results

Figure IV-5 illustrates the schematic representation of how the proposed compartment stoichiometric model can be operated as a monitoring tool. The model uses as an input the on-line indirect measurement of the net volumetric oxygen production rate r_{O_2} to predict the time-course of the rates and concentrations throughout the cultivation system.

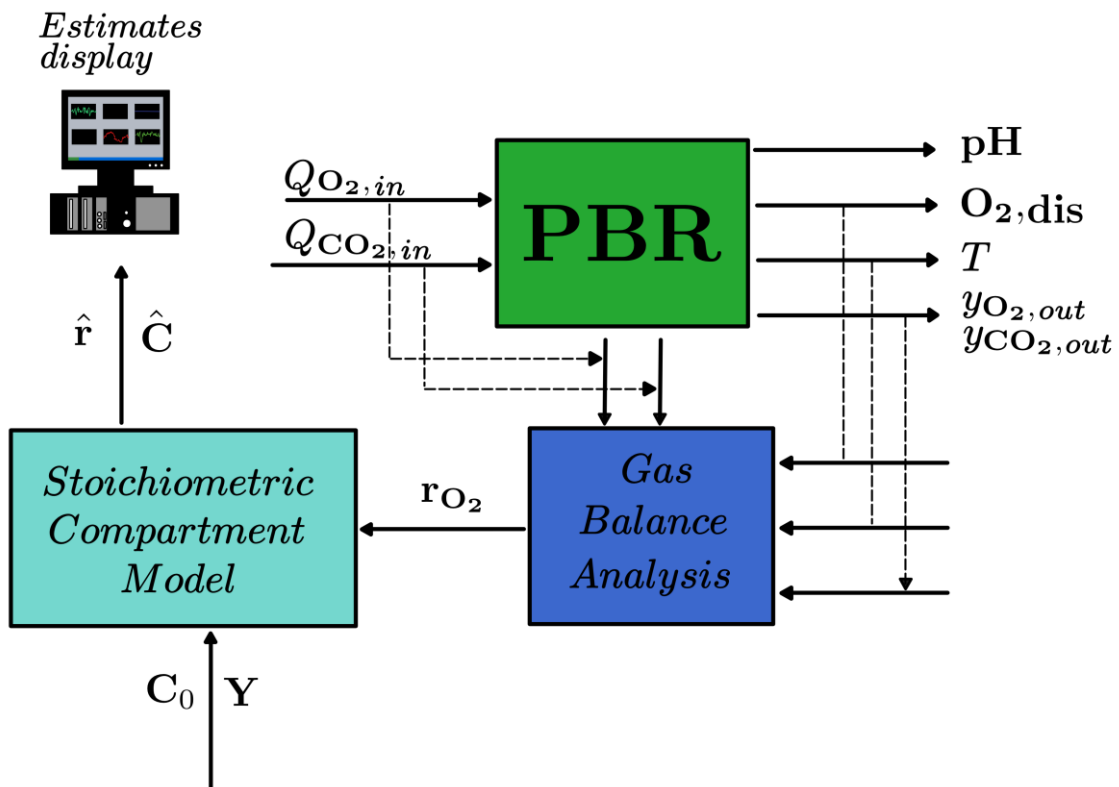


Figure IV-5. Schematic operation of the compartment stoichiometric model as a monitoring tool of growth and carbon reserves storage in microalgae cultivated under nitrogen-limiting conditions.

Figure IV-6 depicts the predictions of the compartment stoichiometric model, implemented as a monitoring tool, in comparison with the experimental measurements for culture 1 and 2. Figures IV-6A and IV-6E show that the model accurately predicted total biomass growth, with an averaged relative difference of 11% for culture 1 and 7% for culture 2, compared with

experimental measurements. On the other hand, the starch concentration values determined by the model fit perfectly well with the experimental data, exhibiting an averaged relative difference of 8% for culture 1 and 11% for culture 2 (Figures IV-6C and IV-6G). The prediction of the starch content (w_{st}) can be calculated by the total biomass and starch concentrations estimated by the model. The averaged relative difference between model simulations and experimental measurements of w_{st} was 10% and 8%, for culture 1 and 2, respectively (Figures IV-6D and IV-6H). These results indicate that the introduction of adapted kinetics terms \tilde{g}_N and \tilde{g}_{st} allowed to describing the metabolic transition taking place in the system during N-starvation. However, although the experiments aim to highlight the starch accumulation phase, the model tends to show that other reserve molecules are accumulated, as depicted in Figures IV-6C and IV-6G, which are assumed to be TAG reserves (Adesanya et al., 2014; Juergens et al., 2015c; Longworth et al., 2012; Park et al., 2015). The TAG content in total biomass estimated at the end batch cultures was lower than 20% and 15% for culture 1 and 2, respectively.

Note that higher differences between experimental data and model predictions is observed during the initial 25 h for culture 1, and 15 h for culture 2. These discrepancies can be explained by the simulation outcomes during this period, which are notably influenced by the initial values of r_{O_2} . Indeed, these values could be overestimated due to residual oxygen from air in the PBR gas outlet line and gas analyzers. Therefore, it is necessary to remove and minimize the presence of residual air to prevent the over-estimation of state variable concentration. On the other hand, the averaged relative errors committed by the model predictions of the state variables \hat{C}_{XT} , \hat{C}_{st} , \hat{C}_{TAG} and \hat{C}_N , illustrated in Fig. 6 by the shaded region, were estimated to be 5 %, 7%, 17% and 5% for culture 1, and 7%, 10%, 27%, 5% for culture 2. These averaged errors are linked to the reported errors from the indirect on-line measurements of r_{O_2} .

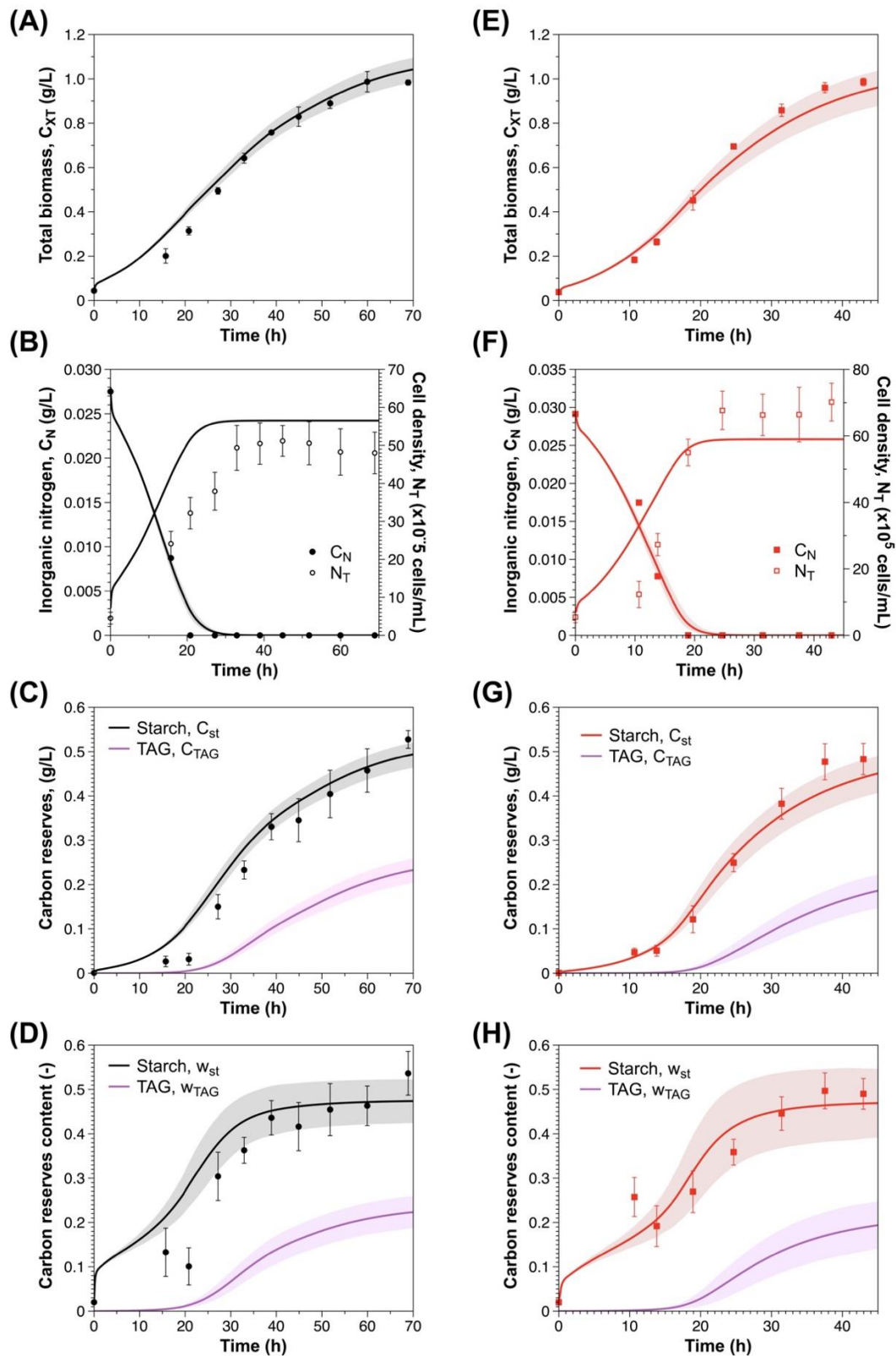


Figure IV-6. Model simulations vs experimental data. (A)-(E) total biomass concentration, (B)-(F) inorganic nitrogen concentration and cell density, (C)-(G) carbon reserves concentration in the form of starch and TAG (magenta), (D)-(H) carbon reserves content in the form of starch and TAG (magenta). Color black and red correspond to culture 1 and 2, respectively. Symbols represents experimental measurements and continued lines model predictions. Shaded regions represent the model relative error.

It must be pointed out that the biomass compartmentalization was also executed well by the proposed model. In fact, Figures IV-6B and IV-6F demonstrate that cell division cessation with nitrogen exhaustion was perfectly well conveyed by the model for culture 1 and 2, respectively. Microalgae cells density appears to be much more difficult to predict due to the sensitivity of cell counts and the uncertainty around cell weight (without carbon reserves) determination. However, cell density is not the primary intended culture parameter to be assessed for bioprocess monitoring purposes and the relative averaged difference observed of 20% for culture 1 and 15% for culture 2 remain acceptable in any case.

IV.4.4 Model validation

An independent batch culture (culture 3) under progressive nitrogen starvation conditions was carried out to validate the model-based monitoring tool presented in this work. For this experiment, identified kinetic parameter of the stoichiometric compartment model were used. First, the on-line indirect measurement of the r_{O_2} was obtained using a μ GC instead of a spectrophotometer (Figure IV-7A). The averaged relative error of r_{O_2} on-line indirect measurement for culture 3 was lower than 10%, indicating that the error range using a spectrometer or micro-gas chromatography is quite similar in determining r_{O_2} . Moreover, Figures IV-7B to IV-7D demonstrate that the developed monitoring tool provided highly accurate predictions of the total biomass, inorganic nitrogen and starch concentration, with averaged relative difference, respectively, of 4%, 7%, 10% compared to experimental measurements. The averaged error made by the model, represented by the shaded region in figure IV-7, was estimated to be 8 %, 4% and 12% for \hat{C}_{XT} , \hat{C}_N and \hat{C}_{st} , respectively.

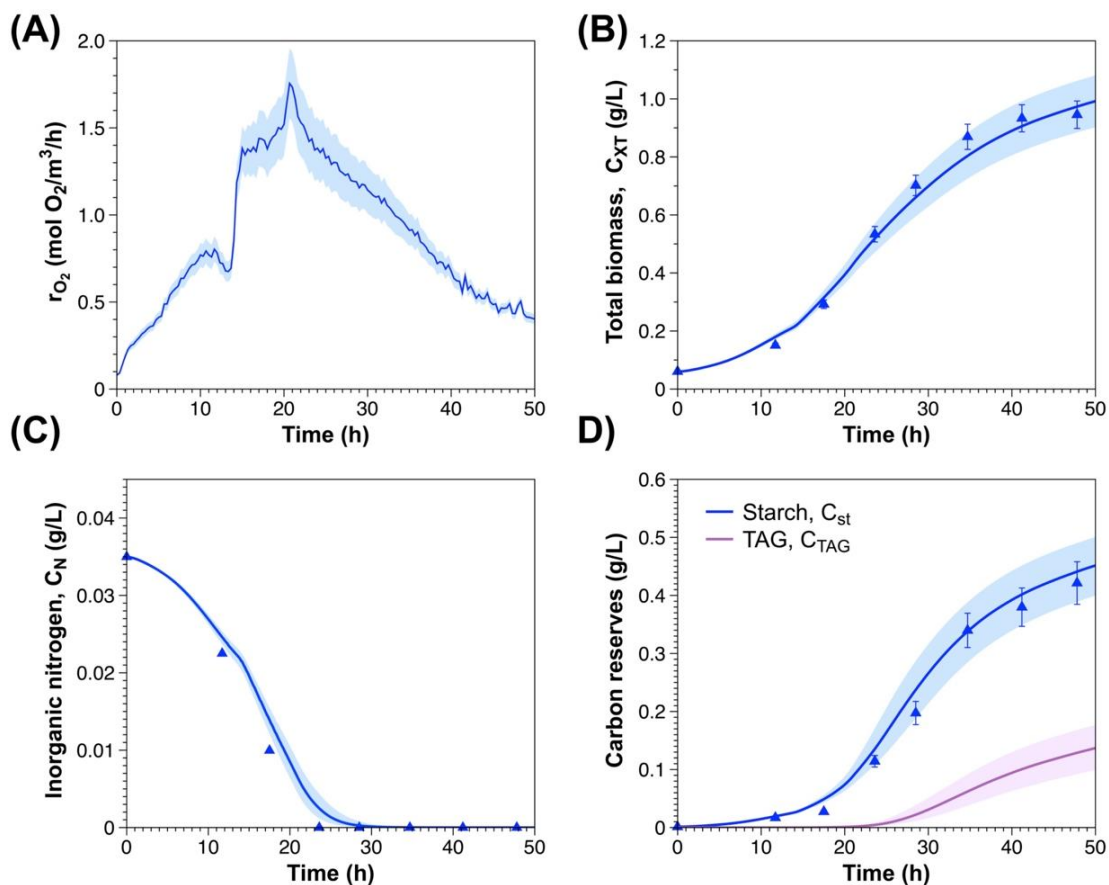


Figure IV-7. Model validation. (A) on-line indirect measurement of r_{O_2} , (B) total biomass concentration, (C) inorganic nitrogen concentration, (D) carbon reserves concentration in the form of starch and TAG (magenta). Blue color corresponds to culture 3. Symbols represents experimental measurements and continued lines model predictions. Shaded regions represent the model relative error.

Overall, the presented work demonstrates that the use of gas balance analysis techniques could be implemented in a PBR to obtain the on-line indirect measurement of the oxygen production rate r_{O_2} , which allows to accurate monitoring the carbon reserve storage of a nitrogen-limited culture of microalgae throughout a dynamic stoichiometric model.

IV.5 Conclusion

A compartment stoichiometric model utilizing the on-line indirect measurements of the net volumetric oxygen production rate, obtained from gas balance analysis in a fully-controlled PBR, was implemented for monitor microalgae growth and carbon reserve storage. The model employed limitation and saturation kinetic terms to depict the metabolic shifts occurring during nitrogen-deprived conditions. The model accurately predicts the total biomass, inorganic nitrogen and starch concentration for three different microalgae batch cultures. The developed

model-based monitoring tool can be easily integrated into a microalgae bioprocess to rapidly estimate and control the carbon reserve storage for the optimization of biofuels production.

IV.6 Appendix

Molecular weight for total biomass M_{XT} was adapted to changes in composition when carbon reserves are accumulated based on the molar fractions for starch x_{st} and lipid reserves (triglycerides) x_{TAG} as follows:

$$M_{XT} = (1 - x_{st} - x_{TAG}) M_{XC} + x_{st} M_{st} + x_{TAG} M_{TAG} \quad (IV. 23)$$

where

$$x_{st} = w_{st} M_{XC} / (1 - w_{st} M_{st} + w_{st} M_{XC}) \quad (IV. 24)$$

$$x_{TAG} = w_{TAG} M_{XC} / (1 - w_{TAG} M_{TAG} + w_{TAG} M_{XC}) \quad (IV. 25)$$

The molecular weights for catalytic biomass, starch and triglycerides, respectively, were: $M_{XC} = 23.15 \times 10^{-3} \text{ kg.C-mol}^{-1}$, $M_{st} = 26.7 \times 10^{-3} \text{ kg.C-mol}^{-1}$ and $M_{TAG} = 15.54 \times 10^{-3} \text{ kg.C-mol}^{-1}$ were derived from separate composition analyses carried out at the laboratory GEPEA in Saint Nazaire, France.

IV.7 Supplementary material and methods

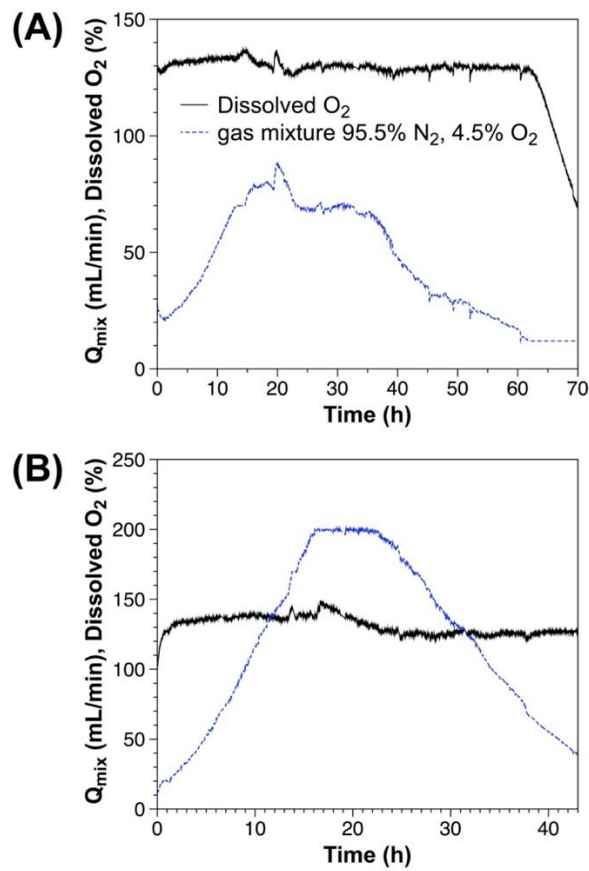


Figure IV-8. Time evolution of the controlled dissolved oxygen (black lines) and standard gas mixture flow-rate Q_{mix} (blue lines) during progressive nitrogen starvation batch cultures leading to carbon reserves accumulation. (A) culture 1, (B) culture 2.

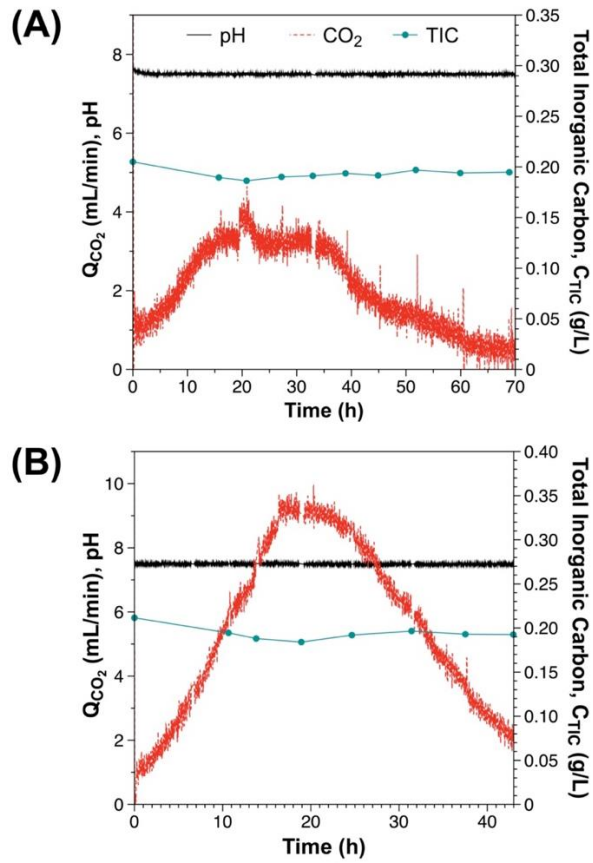


Figure IV-9. Time evolution of the pH regulation (black lines), carbon dioxide flow-rate Q_{CO_2} (red lines) and total inorganic carbon concentration C_{TIC} (green line) during progressive nitrogen starvation batch cultures leading to carbon reserves accumulation. (A) culture 1, (B) culture 2.

Chapitre V

V. Analyse de la cinétique d'accumulation des réserves carbonées chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* en conditions de limitation par la source d'azote.

Résumé :

Une base de données composée de 4 cultures discontinues a été établie pour analyser et comparer la cinétique d'accumulation des réserves carbonées sous la forme d'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii* en conditions de limitation par la source d'azote pour deux régimes de fonctionnement du photobioréacteur (PBR) vis-à-vis de la lumière, cinétique et photolimité. La dynamique de mise en réserve est différente selon le régime de fonctionnement du PBR, avec une teneur en amidon plus élevée pour les cultures conduites en régime cinétique comparées aux cultures photolimitées. Le phénomène peut s'expliquer par l'existence d'une zone sombre dans le PBR dans le cas des cultures photolimitées conduisant à une activation des voies de dégradation de l'amidon en parallèle du fonctionnement des voies de synthèse sous contrôle de l'énergie lumineuse captée. Ainsi, l'évolution de la teneur en amidon accumulée par *C. reinhardtii* en fonction de la fraction volumique éclairée montre qu'une zone sombre plus importante dans le réacteur conduit à une accumulation d'amidon moindre, ce qui met en évidence l'effet possible d'une double limitation, par la source d'azote et par le transport de la lumière sur le niveau de réserves pouvant être atteint.

D'autre part, pendant l'application du stress nutritionnel, une réduction des teneurs massiques en chlorophylles (*a* et *b*) et une modification de la distribution pigmentaire dans les cellules a été observée. Cette adaptation pigmentaire a provoqué également une forte diminution de l'activité photosynthétique, laquelle a pu être directement observée au travers du suivi de la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène rO_2 . De façon un peu réductrice, ces changements peuvent être vus de prime abord comme un moyen pour les cellules de baisser la vitesse d'absorption de photons en réduisant l'énergie lumineuse captée et sa conversion par *C. reinhardtii*. D'ailleurs, la dégradation de la chl *a* au sein du pool de pigments est parfaitement corrélée à la diminution de l'efficacité de la captation des photons décrite par deux paramètres caractéristiques de la photosynthèse et déterminés expérimentalement, à savoir, le rendement photosynthétique maximum et la constante de demi-saturation de la photosynthèse (*K*) issu de

l'analyse de la dépendance du rendement photosynthétique vis-à-vis de la lumière d'excitation reçue. Finalement, ce travail a permis de décrire les phénomènes majeurs à prendre en compte lors d'une limitation par la source d'azote chez *C. reinhardtii* afin de décrire d'un point de vue cinétique la mise en réserve des réserves carbonées sous la forme d'amidon.

V.1 Introduction

Dans le chapitre de cette thèse, nous avons développé un protocole nous permettant d'étudier les seuls effets d'une limitation par la source d'azote sur la mise en réserve du carbone chez *C. reinhardtii*. Pour cela, on s'est notamment affranchi des effets possibles liés au stress oxydant, à l'apport en carbone, à l'utilisation d'un inoculum pré-stressé ou encore d'une limitation par le transport de la lumière en travaillant pour cela en régime cinétique. Ce dernier point mérite cependant désormais qu'on l'étudie avec attention, les conditions de production en photobioréacteurs étant dans la majorité des cas définies pour atteindre un régime photolimité et monter en concentration afin d'intensifier le procédé.

L'objectif est donc ici de réaliser une étude et une analyse comparative de la cinétique d'accumulation des réserves en amidon chez *C. reinhardtii* en conditions de limitation par la source d'azote pour deux régimes de fonctionnement d'un PBR vis-à-vis du transport de la lumière : cinétique et photolimité.

V.2 Matériels et méthodes

V.2.1 Régime de lumière dans un photobioréacteur

Le régime de fonctionnement d'un PBR vis-à-vis de la lumière apportée peut être défini à partir d'une grandeur caractéristique appelée la fraction volumique éclairée (γ) qui tient compte du phénomène d'atténuation de la lumière observé au sein du volume de culture pour un réacteur parallélépipédique éclairé d'un seul côté. Comme défini dans le chapitre bibliographique, il s'agit en fait de la distance réduite de pénétration de la lumière dans la culture $z(G_c)$ caractérisée pour une valeur d'irradiance particulière correspondant au point de compensation G_c et que l'on rapporte à l'épaisseur L de la culture (J. F. Cornet et al., 1992; J.-F. Cornet & Dussap, 2009; Degrenne, 2009; Pruvost & Cornet, 2012; Takache, 2010) :

$$\gamma(-) = \frac{z(G_c)}{L} \quad (\text{V.1})$$

Le point de compensation G_c représente la valeur d'irradiance pour laquelle les échanges gazeux associés à la photosynthèse (absorption de CO_2 et dégagement d' O_2) compensent exactement ceux de la respiration (prise d' O_2 et dégagement de CO_2). Il correspond en fait à l'irradiance à partir de laquelle l'activité photosynthétique devient prépondérante. Cette valeur de G_c peut varier d'un organisme à l'autre. Celle-ci a été estimée expérimentalement pour *Chlamydomonas reinhardtii* comme égale à $10 \mu\text{mol}_{\text{hv}}/\text{m}^2/\text{s}$ (Takache, 2010).

Il est important de noter que d'un point de vue théorique si $z(G_c) \geq L$ la fraction volumique éclairée vaut 1, et signifie que la répartition de la lumière dans le PBR est telle que l'ensemble des intensités se situe au-dessus de la valeur de G_c . On parle alors de régime cinétique. A contrario, quand $z(G_c) < L$ et donc $\gamma < 1$, on parlera de régime photolimité et s'accompagne de l'apparition d'une zone dite « sombre » au sein de la culture.

La distance $z(G_c)$ peut être estimée en utilisant l'équation d'un modèle d'atténuation lumineuse simplifié $G_{\lambda, \text{simp}}(z)$, comme suit (cf. chapitre III) :

$$G_{\lambda, \text{simp}}(z) = q_0 \left(e^{-\bar{A}_{\text{abs}, \lambda} C_{\text{XC}} z} \right) \quad (\text{V. 2})$$

où q_0 désigne le flux de lumière incidente (en $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), C_{XC} la concentration en biomasse catalytique (en kg/m^3) et $\bar{A}_{\text{abs}, \lambda}$ le coefficient massique d'absorption moyenné dans la région photosynthétiquement active (PAR) (en $\text{m}^2/\text{kg}_{\text{XC}}$).

Par conséquent, $z(G_c)$ peut se calculer de la façon suivante :

$$z(G_c) = -\frac{\ln\left(\frac{G_c}{q_0}\right)}{\bar{A}_{\text{abs}, \lambda} C_{\text{XC}}} \quad (\text{V. 3})$$

Finalement, la fraction volumique éclairée γ peut être déterminée par :

$$\gamma(-) = -\frac{\ln\left(\frac{G_c}{q_0}\right)}{\bar{A}_{\text{abs}, \lambda} C_{\text{XC}} L} \quad (\text{V. 4})$$

Il est important de préciser que la méthodologie de calcul des propriétés radiatives en conditions de limitation par la source d'azote peut être utilisée pour déterminer le coefficient massique d'absorption $\bar{A}_{\text{abs}, \lambda}$, et donc permettre d'estimer la fraction volumique éclairée γ pour l'ensemble de cultures discontinues réalisées dans cette étude.

V.2.2 Présentation de l'étude cinétique

V.2.2.1 Campagne expérimentale

Une campagne expérimentale composée de 4 cultures en discontinu (nommées A, B, C et D) et en conditions de carence azotée progressive a été réalisée. Le système de culture utilisé est un PBR torique en inox opéré en contrôlant le pH (7,5) et l'oxygène dissous (130% par rapport à la saturation avec de l'air) comme présenté dans le protocole de culture décrit au chapitre II. Le régime de lumière pour les cultures réalisées est caractérisé par la valeur de la fraction volumique éclairée (γ) lorsque la carence stricte par la source d'azote est atteinte. La charge initiale en azote présente dans le milieu de culture a été pour cela modulée et classée en 2 catégories, faible charge azotée (Faible N) et forte charge azotée (Forte N), correspondant respectivement aux cultures menées en régime cinétique ($\gamma = 1$) et celles réalisées en régime photolimité ($\gamma < 1$) (Tableau V-1).

Tableau V-1. Conditions opératoires des cultures en discontinu de *C. reinhardtii* soumises à une carence azotée progressive. Pour l'ensemble des cultures, le pH a été régulé à 7.5 et l'oxygène dissous à 130% par rapport la saturation de l'air.

Culture	q_0 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	PBR Torique	Charge azotée		Régime de rayonnement
			$C_{\text{NH}_4^+}$ (mg/L)	Notation	
A	600	Inox	57.8	Faible N	Cinétique ($\gamma = 1$)
B	300	Inox	43.6	Faible N	Cinétique ($\gamma = 1$)
C	600	Inox	124.8	Forte N	Photolimité ($\gamma < 1$)
D	300	Inox	149.3	Forte N	Photolimité ($\gamma < 1$)

V.2.2.2 Validation des conditions de rayonnement imposées

À l'aide de l'équation (V.4), la fraction volumique éclairé γ a été calculée afin de valider le régime de lumière dans le PBR pour les cultures réalisées (Figure V-1). On peut observer qu'elle est égale à 1, comme attendu, pour toutes les cultures batch réalisés à faible charge azotée (Figure V-1A). Ce résultat permet de valider le protocole expérimental défini au chapitre II de ce manuscrit quant aux choix de la charge azotée initiale afin d'imposer des conditions vis-à-vis du rayonnement dans le PBR telles qu'il n'y ait pas de limitations par le transport de la lumière pour les cultures A et B. De la même façon, la figure V-1B montre que pour les

cultures C et D la fraction volumique éclairée γ devient inférieure à 1, comme souhaitée dans cette étude, afin d'observer le double effet d'une carence azotée et d'une limitation par l'apport de lumière sur la cinétique d'accumulation des réserves de carbone.

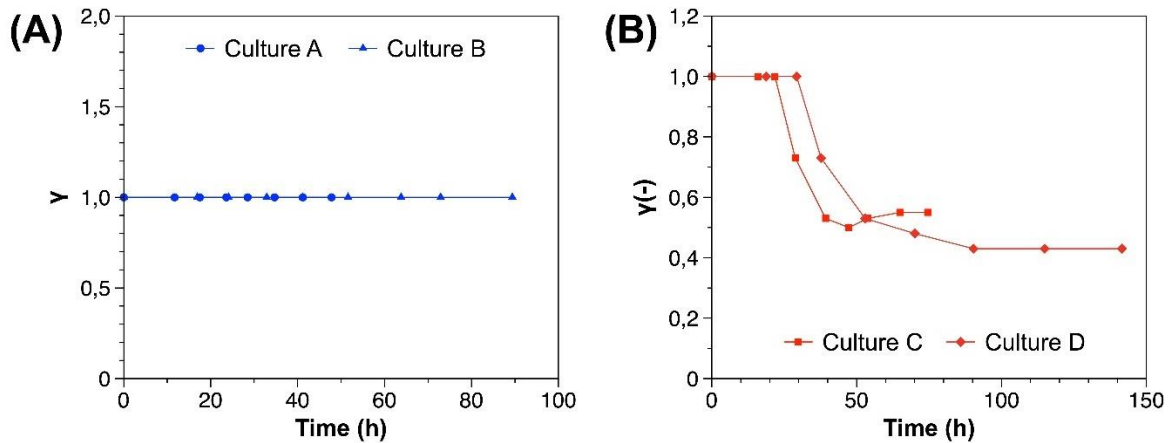


Figure V-1. Évolution de la fraction éclairée γ dans les cultures en discontinu en régime cinétique (en bleu) et photolimité (en rouge).

V.2.2.3 Suivi de culture

Un suivi cinétique comprenant la mesure de la concentration en biomasse, en pigments, en amidon, en ions ammonium ainsi que de la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène rO_2 a été effectué pour chacune des cultures réalisées. Une présentation complète de ces données a été déjà fait au chapitre II de ce manuscrit. Une étude plus spécifique de la conversion de photons par la machinerie photosynthétique au cours des cultures a été réalisé au travers de la mesure de deux paramètres de la photosynthèse permettant de rendre compte de la captation des photons : le rendement photosynthétique (ρ) et la constante de demi-saturation de la photosynthèse (K).

V.2.3 Analyse de l'efficacité de la captation des photons par la photosynthèse

V.2.3.1 Détermination du rendement primaire de la photosynthèse

Un fluorimètre PAM a été utilisé (WaterPAM, Walz, Germany) pour la mesure des paramètres de la photosynthèse. Un volume de culture de *C. reinhardtii* a été dilué dans du milieu Sueoka et placé dans une cuvette en quartz sous agitation de manière à avoir une valeur de 200-250 unités de fluorescence. Ensuite, l'échantillon a été laissé 15 minutes à l'obscurité afin de permettre l'oxydation totale des photosystèmes II (PSII). Après le passage à l'obscurité, huit pulses saturants d'irradiance croissante (à savoir, 0, 75, 109, 165, 245, 346, 479, 773 et 1127

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) sont envoyés à la suspension toutes les 2 minutes pour créer une courbe rapide de réponse du photosystème II à la lumière permettant de calculer plusieurs paramètres de la photosynthèse dont le rendement photosynthétique ϕ_{PSII} et sa valeur maximale $\phi_{\text{PSII},\text{max}}$, ce dernier étant donnée par le logiciel associé au fluorimètre PAM (PAM WinControl 3.1).

V.2.3.2 Détermination expérimentale de la constante de demi-saturation de la photosynthèse (K)

Considérons le rendement primaire de la photosynthèse, ρ , que l'on assimile au rendement ϕ_{PSII} . Celui-ci va décroître avec la vitesse des excitations générées dans les antennes qui peut être défini par \mathcal{A} , selon une fonction hyperbolique décroissante, telle que :

$$\rho = \rho_{\text{max}} \frac{K}{K + \mathcal{A}} \quad (\text{V.5})$$

avec \mathcal{A} la vitesse spécifique d'absorption de photons en $\text{mol}_{\text{h}\nu}/\text{kg}_{\text{Xch}}$. Il vient alors que :

$$1 - \frac{\rho}{\rho_{\text{max}}} = \frac{\mathcal{A}}{K + \mathcal{A}} \quad (\text{V.6})$$

Il est ensuite possible de linéariser l'équation (V.6) de sorte que :

$$\frac{1}{1 - \hat{\rho}} = \frac{K}{\mathcal{A}} + 1 \quad (\text{V.7})$$

avec $\hat{\rho} = \rho/\rho_{\text{max}}$ la valeur du rendement primaire normalisée. L'équation (V.7) peut finalement s'écrire comme :

$$\frac{\hat{\rho}}{1 - \hat{\rho}} = \frac{K}{\mathcal{A}} \quad (\text{V.8})$$

Ainsi, en traçant $\hat{\rho}/1 - \hat{\rho}$ en fonction de $1/\mathcal{A}$, on peut obtenir par régression linéaire la constante de demi-saturation de la photosynthèse, K . Il est utile de préciser que la droite permettant de calculer K est constituée de 8 points générés pour chaque état physiologique caractérisé, à partir de la courbe rapide de réponse du PSII à la lumière. En effet, pour chacun des pulses saturants effectués à différentes irradiances, on mesure une valeur de ϕ_{PSII} , que l'on peut relier à une valeur de \mathcal{A} .

V.2.4 Calcul de la vitesse moyenne d'absorption de photons (MRPA)

La vitesse moyenne d'absorption des photons, abrégée par l'acronyme MRPA (pour mean rate of photons absorption) obtenue après intégration sur le volume de culture et exprimée en $\text{mol}_{\text{hv}}/\text{kg}_{\text{XC}}/\text{h}$, a été calculée à partir de l'expression suivante :

$$MRPA = \langle \mathcal{A}(z) \rangle = \frac{1}{L} \int_0^L \int_{400}^{700} A_{\text{abs},\lambda} G_{\lambda}(z) d\lambda dz \quad (\text{V. 9})$$

avec L l'épaisseur du PBR, $A_{\text{abs},\lambda}$ le coefficient massique d'absorption dans la région photosynthétiquement active (PAR) et $G_{\lambda}(z)$ le profil d'irradiance dans le volume de culture donnée par le modèle à 2-flux (cf. chapitre III). On peut remarquer que, de la même manière que pour le calcul de la fraction volumique éclairée, le coefficient massique d'absorption $A_{\text{abs},\lambda}$ peut être prédit en utilisant la méthodologie développée au chapitre III de ce manuscrit.

V.3 Résultats et discussion

V.3.1 Dynamique d'accumulation des réserves carbonées chez *Chlamydomonas reinhardtii* cultivée en conditions de limitation par la source d'azote

La figure V-2 présente une comparaison de la cinétique d'accumulation des réserves carbonées chez *C. reinhardtii* pour différentes conditions vis-à-vis du champ de rayonnement imposé dans le PBR que l'on contrôle par la charge azotée initiale. Celles-ci ont donné lieu à 4 cultures dénommées A, B, C et D. Notons tout d'abord que pour l'ensemble des cultures réalisées, on observe une phase de croissance suivie d'une phase de mise en réserve obtenue après l'épuisement des ions ammonium présents dans le milieu de culture. On peut observer, au travers du suivi de la fraction catalytique de la biomasse (Figure V-2B), que la phase de croissance dans le cas des cultures photolimitées se poursuit au-delà de celle observée pour les cultures réalisées en régime cinétique en raison d'une charge initiale en azote augmentée (Figure V-2E). On observe, une fois les conditions strictes de carence azotée imposées, que la concentration en biomasse totale dans les cultures (Figure V-2A) continue d'augmenter suite à une accumulation d'amidon dans les cellules (Figure V-2C). La figure V-2D montre que les quantités d'amidon formées en conditions photolimitées sont inférieures avec une teneur maximale en amidon de 20 % et 10 %, respectivement, pour les cultures C et D, contre 41 % et 48 % pour les cultures A et B, respectivement.

Notons également que dès lors que l'azote est épuisé, la vitesse nette de formation d'amidon semble plus rapide en régime cinétique tandis que pour les cultures réalisées en présence d'une zone sombre, elle semble beaucoup plus lente. Cette différence observée dans la cinétique d'accumulation de l'amidon pour les cultures photolimitées peut s'expliquer par l'activation accrue des voies de dégradation de l'amidon du fait de l'existence d'une zone sombre dans le PBR. En effet, il a été montré dans le cadres des études du métabolisme fermentaire, des mécanismes de production de biohydrogène ainsi que de la réponse biologique à une déficience en azote que *C. reinhardtii* est capable de dégrader ses réserves d'amidon à l'obscurité et en conditions de faible lumière (Antal, 2018; Antal et al., 2011; Chochois, 2009; Chochois et al., 2010; Gfeller & Gibbs, 1984). Il est donc possible de supposer que les voies de synthèse et de dégradation de l'amidon puissent opérer de manière simultanée expliquant des vitesses réduites de formation de l'amidon pour les cultures C et D, et donc des teneurs en amidon plus faibles en régime photolimité.

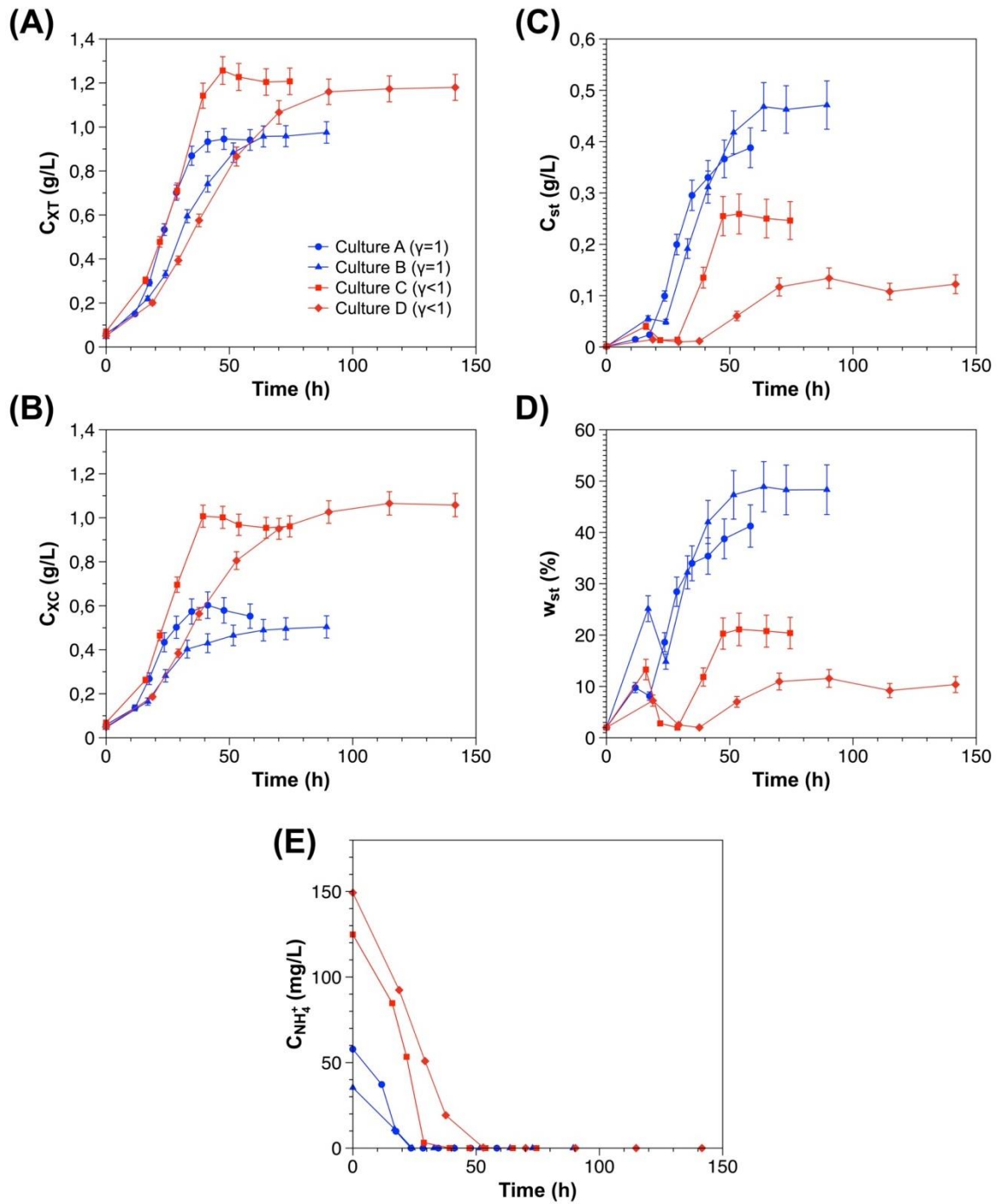


Figure V-2. Dynamique de la mise en réserves des cultures en discontinu de *C. reinhardtii* cultivées en conditions de carence azotée progressive et opérant en régime cinétique (bleu) et photolimité (rouge). (A) Concentration en biomasse totale, (B) concentration en biomasse catalytique, (C) concentration en amidon, (D) teneur en amidon (E) concentration en ions ammonium.

V.3.2 Adaptation pigmentaire chez *C. reinhardtii* en conditions de carence azotée

V.3.2.1 Changement dans le contenu pigmentaire

La figure V-3 montre l'évolution de la teneur en pigments dans la biomasse catalytique (w'_{pig}) comme indicateur des changements de composition dans l'équipement pigmentaire des cellules au cours d'une carence progressive par la source d'azote. On observe globalement dans la figure V-3A une réduction de la teneur en pigments totaux au cours du temps pour l'ensemble de cultures discontinues réalisées. On observe dans les premières heures de culture, avant l'épuisement de l'azote, une chute rapide de la teneur en pigments totaux, et donc des chlorophylles (Figures V-3B et V-3C) et caroténoïdes totaux (Figure V-3D), pour les cultures (B, C et D), suivie globalement d'une augmentation de celle-ci. Lorsque la carence azotée est atteinte, la teneur en chlorophylles (*a* et *b*) continue de décroître, à l'exception de la culture D, où elle semble se stabiliser. Ces observations mettent en évidence des phénomènes d'adaptation pigmentaire marqués au sein des cultures.

En effet, il a été montré qu'en conditions de limitation par la lumière seule chez *C. reinhardtii* on observe fréquemment ces changements pigmentaires au début de la culture du fait que les cellules ne sont pas généralement adaptées aux conditions de rayonnement auxquelles elles se trouvent soumises après inoculation. Des études sur le comportement de *C. reinhardtii* en réponse à une carence azotée montrent que la synthèse de chlorophylles se trouve fortement réprimée avec une activation de leur catabolisme par des enzymes de type chlorophylase (Antal, 2018; Juergens et al., 2015; Park et al., 2015; Wase et al., 2014). Ce qui précède permettrait ainsi d'expliquer les changements observés dans les teneurs massiques en pigments dans la biomasse catalytique en conditions de limitation par la source d'azote.

On remarque aussi une diminution de la teneur en chlorophylles (*a* et *b*) avec des dynamiques différentes selon le régime de lumière. On observe ainsi dans les cultures menées en régime cinétique, une diminution des fractions massiques pigmentaire dans la biomasse catalytique, w'_{chla} et w'_{chlb} , plus marquée comparée aux cultures en régime photolimité. En effet, les cultures ayant été exposées à des rayonnements plus importants doivent adapter leur appareillage photosynthétique de façon plus drastique afin d'éviter une production et une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, ROS (pour Reactive Oxygen Species), accrues et l'apparition d'un état de sur-réduction des cellules (Antal, 2018; Antal et al., 2015). Cette régulation est possible grâce à la dégradation des protéines impliquées dans la chaîne photosynthétique ainsi qu'à une diminution de la synthèse des complexes photosynthétiques,

tels que le complexe LHCII (pour Light-Harvesting Complex II), permettant la captation de la lumière (Miller et al., 2010; Schmollinger et al., 2014). De plus, il est connu que les molécules de chlorophylles, en particulier, la chl *a*, qui constitue le cœur des complexes de collecte de la lumière (LHC), sont dégradée ou inactivée en conditions de carence nutritionnelle (Antal et al., 2015).

D'autre part, on peut noter que la teneur en caroténoïdes totaux dans la biomasse catalytique w'_{PPC} , incluant les espèces photosynthétiques et photoprotectrices (abrégées par l'acronyme PPC), semble varier beaucoup moins que les chlorophylles (Figure V-3D). Elle semble rester stable, voire augmenter légèrement, lors de la phase de carence azotée indépendamment du régime de rayonnement. De plus, les études métaboliques menées par Park et al. (2015) sont en parfaite cohérence avec nos observations expérimentales, puisqu'ils ont montré que les gènes liés à la synthèse de caroténoïdes se trouvaient légèrement surexprimée pendant une courte période consécutive à l'établissement de la carence azotée, puis revenaient ensuite à des niveaux d'expression similaires à ceux observés en conditions non-limitantes. Ces observations sont à rapprocher d'un mécanisme de photoprotection impliquant les caroténoïdes pour dissiper l'énergie lumineuse sous forme de chaleur (Harris et al., 2009). Cette dissipation a lieu à travers du cycle de xanthophylles, lequel a été mis en évidence par la mesure en HPLC de la conversion de la violaxanthine en zeaxanthine (Park et al., 2015). Nos résultats laissent à penser que la teneur de caroténoïdes totaux (w'_{PPC}) ne changerait pas de façon significative en conditions de carence azotée, mais leur composition pourrait très certainement être affectée.

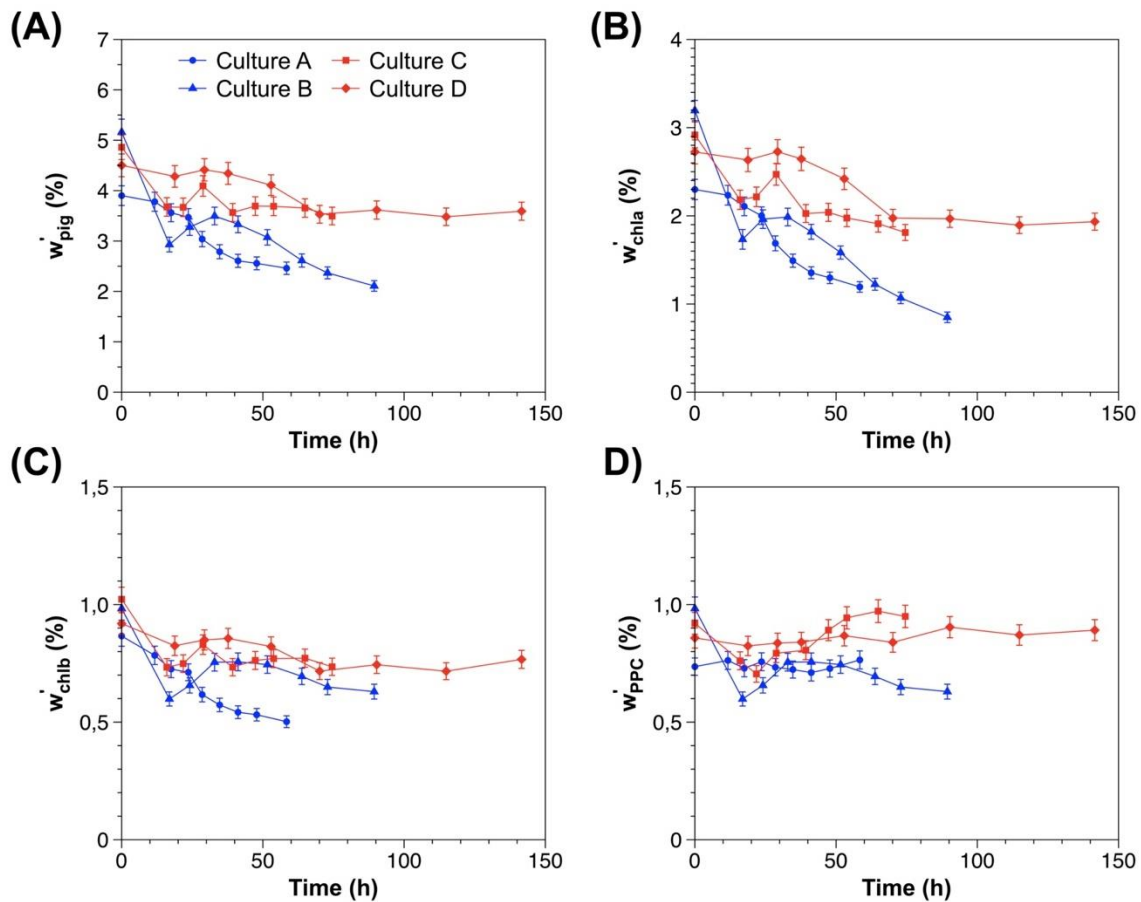


Figure V-3. Adaptation pigmentaire chez *C. reinhardtii* lors d'une carence azotée progressive pour différentes cultures en discontinu opérant en régime cinétique (en bleu) et photolimité (en rouge). (A) fraction massique des pigments totaux dans la biomasse catalytique, (B) fraction massique en Chl *a* dans la biomasse catalytique, (C) fraction massique en Chl *b* dans la biomasse catalytique, (D) Fraction massique en PPC dans la biomasse catalytique.

V.3.2.2 Changement dans la distribution pigmentaire

Bien que l'on ait montré qu'une diminution de la teneur en pigments dans les cellules (biomasse catalytique) avait lieu lors d'une carence azotée progressive, nous verrons que ces changements pigmentaires s'accompagnent également d'une modification de la distribution pigmentaire (Figure V-4). On observe dans la figure V-4 que la fraction massique individuelle en Chl *a*, Chl *b* et PPC dans les pigments totaux, notés respectivement, w''_{chla} , w''_{chlb} , w''_{PPC} , restent stable dans les premiers heures de culture, comme reporté dans les cultures menées en conditions de non-limitation par la source d'azote chez *C. reinhardtii* (Martzolff, 2013; Takache et al., 2012; Urbain, 2017) (Tableau V-2).

Tableau V-2. Distribution pigmentaire pendant la phase de croissance dans les cultures discontinues.

Cultures	w''_{chla} (%)	w''_{chlb} (%)	w''_{PPC} (%)
A	59	21	20
B	60	20	20
C	60	20	20
D	61	20	19

Après épuisement de l'azote inorganique dans les cultures, on observe un changement dans la distribution pigmentaire caractérisé par la diminution de la teneur en Chl *a* (Figure V-4A) et l'augmentation des PPC (Figure V-4C) dans la fraction pigmentaire. Notons que ce phénomène est bien plus marqué pour les cultures réalisées en régime cinétique que pour les cultures photolimitées. En effet, cette dégradation de la chl *a* semble être linéaire selon le temps, avec une vitesse de dégradation 2 fois plus rapide pour les cultures diluées réalisées en régime cinétique (pente de la droite égale à -0.0025 g/L/h) comparée aux cultures photolimitées (pente de la droite égale à -0.0013g/L/h). On observe également que la teneur en Chl *b* au sein des pigments totaux semble globalement rester constante tout au long des cultures indépendamment des conditions de rayonnement imposées sur le réacteur (Figure V-4B).

Nos observations expérimentales montrent également que la teneur en caroténoïdes totaux dans les pigments totaux (w''_{PPC}) augmente (Figure V-4C). Cependant, cela ne vient pas d'une synthèse accrue de caroténoïdes mais il s'agit plutôt d'une conséquence de la diminution de la teneur en chl *a* au sein du pool de pigments, suite à leur dégradation lors de la phase de carence azotée (Antal, 2018; Juergens et al., 2015; Park et al., 2015; Wase et al., 2014).

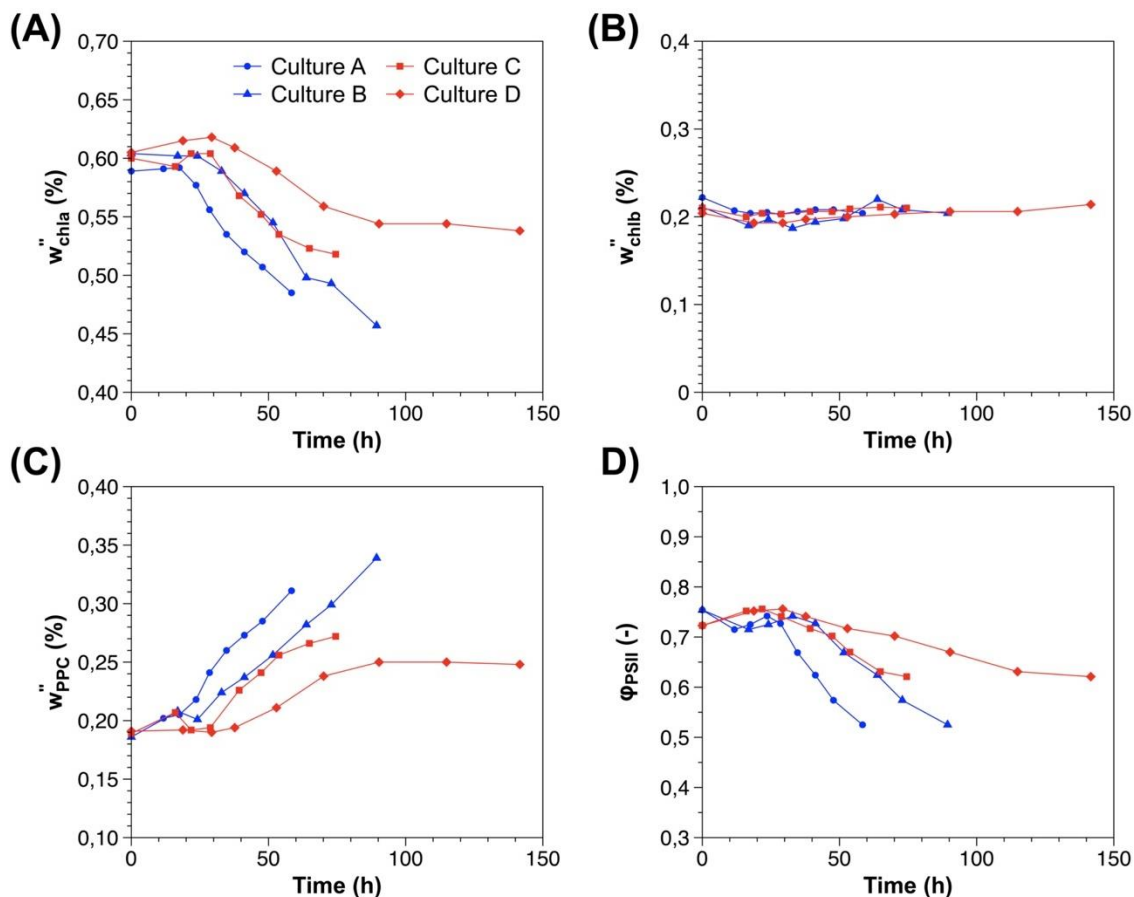


Figure V-4. Évolution de la distribution pigmentaire et du rendement photosynthétique maximum dans les cultures discontinues de *C. reinhardtii* effectuées en conditions de carence azotée progressive opérant en régime cinétique (en bleu) et photolimité (en rouge). (A) fraction massique en chl *a* dans les pigments totaux, (B) fraction massique en chl *b* dans les pigments totaux, (C) fraction massique en PPC dans les pigments totaux, (D) rendement photosynthétique maximum ϕ_{PSII} mesuré par fluorimétrie PAM.

V.3.2.3 Relations entre adaptation pigmentaire et captation de la lumière

Au vu des observations présentées auparavant, nous nous sommes intéressés également à l'évolution du rendement photosynthétique maximum ϕ_{PSII} mesuré expérimentalement au cours des cultures en discontinu (Figure V-4D). La figure V-4D montre, dès lors que les cellules se retrouvent en conditions de carence azotée, une baisse très marquée du rendement photosynthétique d'environ 32 % et 14 % pour les cultures en régime cinétique et photolimité, respectivement. Ce phénomène semble corrélé à celui observé pour le pourcentage massique de chl *a* au sein des pigments totaux, $w''_{chl a}$ (Figure V-4A). La figure V-5 montre en effet qu'une relation linéaire permet relier la réduction du pourcentage de chl *a*, $w''_{chl a}$, à la diminution du rendement photosynthétique. Ce qui semble montrer que la dégradation observée de la chl *a* a un impact direct sur la captation de la lumière, probablement au travers de deux phénomènes :

d'un part, en réduisant le nombre de centres réactionnelles et donc de photosystèmes disponibles, et d'autre part en diminuant la taille des antennes collectrices associées. À ce sujet, les études de Park et al. (2015) montre que l'expression des protéines prenant part aux antennes collectrices des photosystèmes (LHCI et LHCII pour Light-Harvesting Center I et II) est réduite d'un facteur compris entre 10 et 20, pour des cultures carencées en azote chez *C. reinhardtii*.

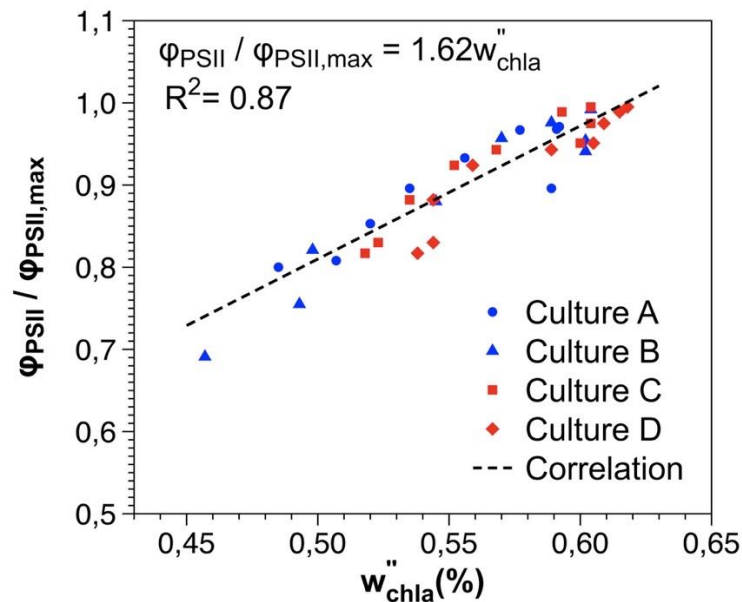


Figure V-5. Corrélation linéaire entre la fraction massique en chl *a* ($w''_{chl a}$) au sein des pigments totaux et le rendement photosynthétique maximum normalisé. Les données expérimentales correspondent aux cultures de *C. reinhardtii* effectuées en conditions de carence azotée progressive en régime cinétique (en bleu) et photolimité (en rouge).

Il a par ailleurs été possible d'estimer la valeur de la constante de demi-saturation de la photosynthèse K , utilisée pour caractériser l'efficacité de la captation de la lumière pour les cultures photolimitées (Figure V-6). Cette grandeur est directement relié à la taille des antennes collectrices des photosystèmes en rendant compte des déperditions d'énergie liées au transport des excitations dans ces dernières (J.-F. Cornet, 2007; Pruvost et al., 2015, 2016; Takache, 2010; Takache et al., 2012; Urbain, 2017). On observe dans la figure V-6A qu'en effet la valeur de K semble varier au cours de la culture. Elle tend à rester relativement stable lors de la phase de croissance mais chute rapidement lors du passage dans la phase de carence azotée. À noter que les valeurs de K calculées (300-400 mol_{hv}/kg_{Xch}) durant la phase de croissance sont 3 fois plus élevées à celles reportées jusqu'à présent pour *C. reinhardtii* en conditions non-limitantes à l'exception de la lumière (70-140 mol_{hv}/kg_{Xch}) (Dauchet, 2012; Takache, 2010; Urbain, 2017).

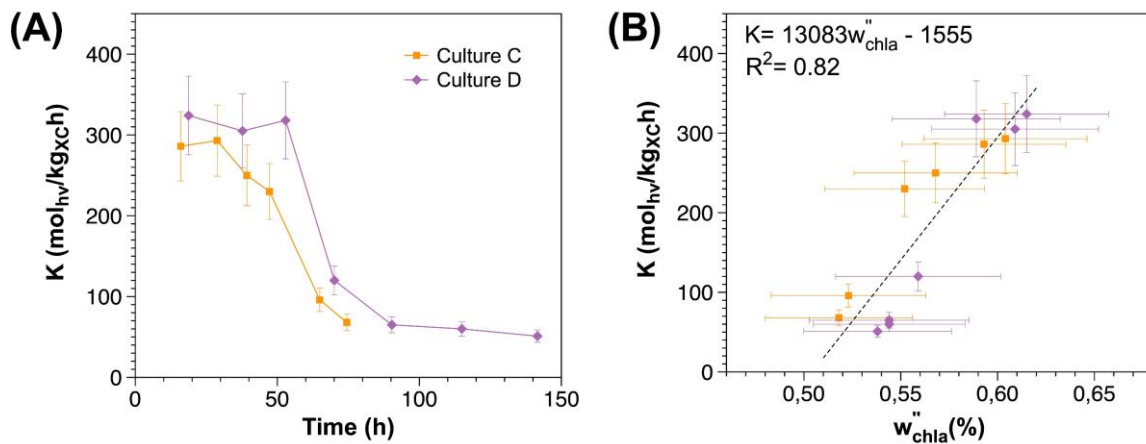


Figure V-6. Évolution de la constante de demi-saturation de la photosynthèse K en fonction du temps (A) et de la teneur massique en chl a dans le pool de pigments totaux, $w''_{\text{chl}a}$ avec une corrélation linéaire entre $w''_{\text{chl}a}$ et K présentée avec une ligne discontinue (B).

De manière similaire aux observations faites pour le rendement photosynthétique maximum, il est possible d'établir une relation entre la diminution du pourcentage de chl a dans les pigments ($w''_{\text{chl}a}$) et l'évolution de K (Figure V-6B). Néanmoins, il serait convenable d'étudier l'évolution de K à des valeurs de $w''_{\text{chl}a}$ inférieur à 0.50 pour confirmer le type de relation mathématique entre ces deux paramètres. Il se peut qu'il s'agisse d'une relation linéaire (Figure V-6B), ou d'une fonction de type tangente hyperbolique. Dans ce dernier cas, la figure V-6B correspondrait à la section linéaire de cette fonction. Enfin, nos résultats montrent qu'il semblerait que la valeur de K serait modulée très rapidement chez *C. reinhardtii* entre des conditions non-limitantes et des conditions de carence azotée.

V.3.3 Évolution de la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène r_{O_2}

La figure V-7 montre l'évolution de la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène déterminée par la méthode des bilans gazeux. On observe des réponses cinétiques similaires de la r_{O_2} quelle que soit les conditions étudiées. Ainsi, lors de la phase de croissance une augmentation progressive de la r_{O_2} est observée, suivi d'une diminution qui coïncide avec l'épuisement de l'azote et l'arrêt de la croissance. Cette baisse de l'activité photosynthétique associée à la diminution de la vitesse nette de production d'oxygène montre que le fonctionnement de la machinerie photosynthétique est fortement altéré pendant la phase de carence azotée comme observée déjà précédemment avec l'évolution du rendement photosynthétique maximum (Figure V-4D). Il est important de noter que si l'activité

photosynthétique décroît fortement pendant la carence azotée, elle n'est jamais nulle et semble finir par se stabiliser à une valeur critique pour toutes les cultures réalisées.

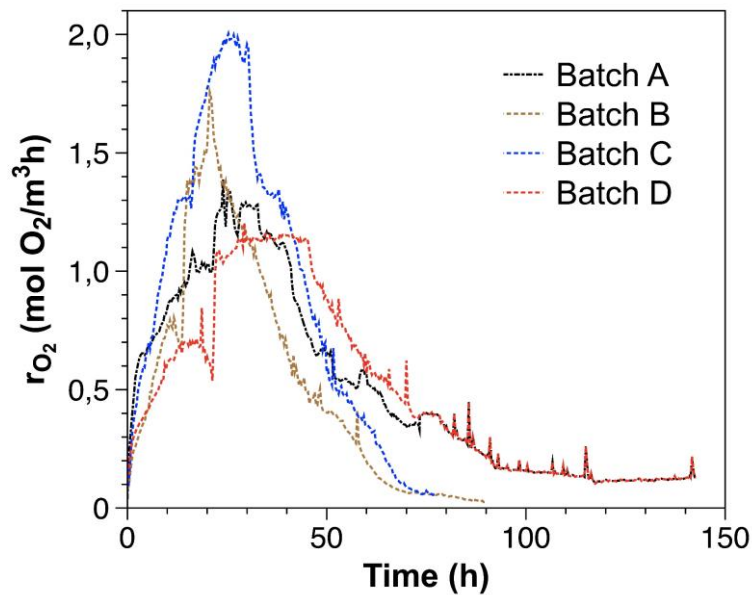


Figure V-7. Évolution de la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène r_{O_2} dans les cultures en discontinues de *C. reinhardtii* en conditions de carence azotée progressive.

V.3.4 Impact de la lumière sur l'accumulation des réserves de carbone

Deux paramètres ont été utilisés pour étudier la relation entre la lumière et le stockage de l'amidon pour l'ensemble des cultures réalisées en conditions de carence azotée progressive, à savoir, la fraction volumétrique éclairée γ et la vitesse moyenne d'absorption de photons MRPA.

La valeur du MRPA a été amplement utilisée comme un paramètre d'ingénierie de PBR, dans le cadre de plusieurs études visant à chiffrer l'impact de la lumière sur la production de métabolites d'intérêt à partir des microorganismes photosynthétiques, tels que les triglycérides TAGs, les polysaccharides ou encore plusieurs types de pigments (Decamp, 2020; Kandilian et al., 2019; Kandilian, Pruvost, et al., 2014; Nghiem-Xuan, 2019; Samhat, 2023). Les liens faits entre le MRPA et la production de molécules d'intérêt ont permis de développer des nouveaux protocoles de production et servi à l'optimisation des bioprocédés actuels.

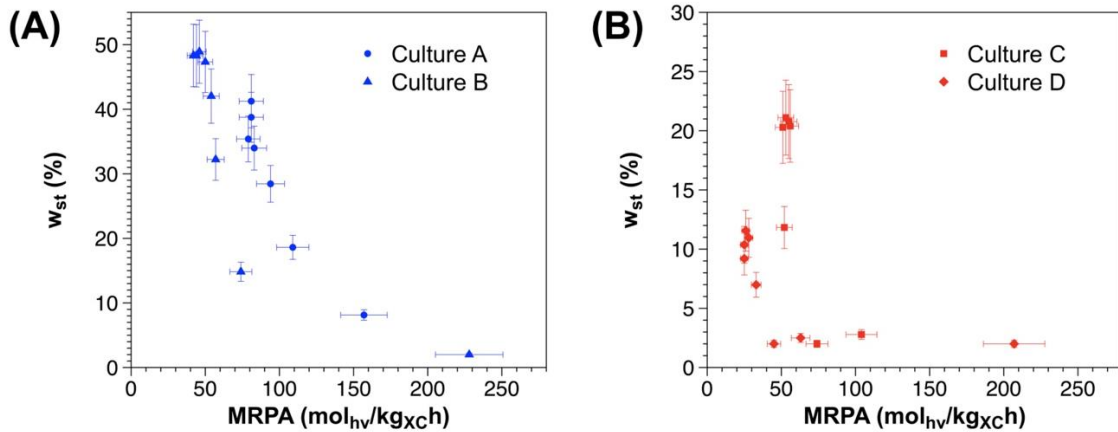


Figure V-8. Vitesse moyenne d'absorption de photons (MRPA) vs teneur en amidon (w_{st}) pour les cultures discontinues de *C. reinhardtii* en conditions de carence azotée progressive en régime cinétique (A) et photolimité (B).

La figure V-8 montre que si les cultures réalisées en régime cinétique (Figure V-8A) et en régime photolimité (Figure V-8B) n'atteignent pas les mêmes teneurs maximales en amidon, celles-ci sont atteintes systématiquement pour des valeurs de MRPA d'environ 50-70 $\text{mol}_{hv}/\text{kg}_{xc}/\text{h}$, pendant la phase de carence azotée. Cette valeur critique de MRPA pourrait servir d'indicateur pour contrôler l'optimum de production d'amidon pour des conditions de culture données. Il semblerait par ailleurs qu'une corrélation de type exponentielle décroissante (non-tracée) puisse être écrite entre la vitesse d'absorption de la lumière et la quantité d'amidon accumulée pour les conditions étudiées.

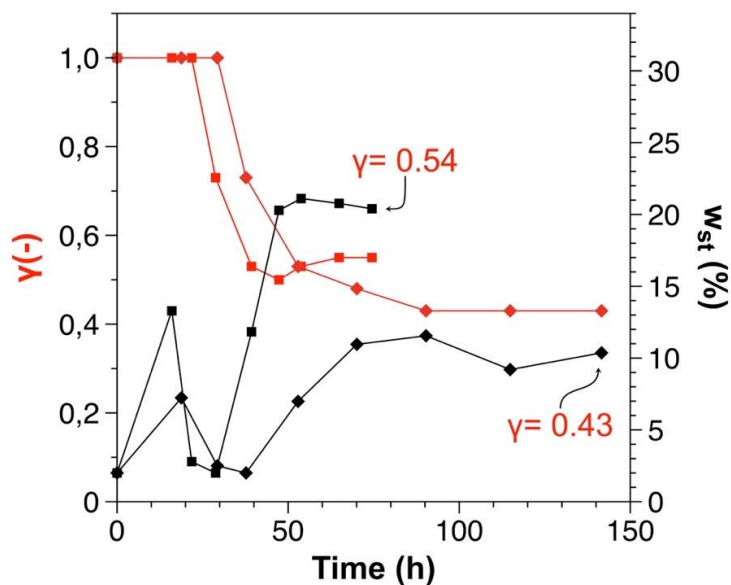


Figure V-9. Relation entre l'accumulation d'amidon (en noir) et l'accès à la lumière par les cellules représentée par la fraction éclairée γ (en rouge). Les points en carrés et en diamant correspondent, respectivement, à la culture C et D.

Nous avons montré précédemment que les cultures en régime cinétique ont accumulé plus d'amidon que les cultures photolimitées. Nous avons évoqué qu'une activité respiratoire est considérablement plus importante lors du passage dans les zones sombres du PBR, et par conséquent, une accumulation nette d'amidon est moindre due à une vitesse de dégradation de l'amidon plus rapide par rapport à la vitesse de biosynthèse. Ainsi, plus une zone sombre est marquée, moins de réserves en amidon seraient accumulées dans les cellules. En effet, la figure V-9 montre que la culture D présentant une fraction volumique éclairée plus faible ($\gamma = 0.43$), et donc une phase sombre plus prononcée, a accumulé moins d'amidon en comparaison à la culture C, ayant une fraction volumique éclairée plus élevée, et donc une phase sombre moins importante ($\gamma = 0.54$). De cette manière, le régime de rayonnement, dépendant à la fois du nombre de cellules et du phénomène d'adaptation pigmentaire, conditionnerait l'accumulation des réserves d'amidon chez *C. reinhardtii* en conditions de carence azotée, mettant ainsi en évidence l'effet d'une double limitation, à la fois par la source d'azote et liée au transport de la lumière.

V.4 Conclusions

Une base de données expérimentale constituée de 4 cultures discontinues opérant en deux régimes de lumière : cinétique et photolimité a été effectuée dans le but d'étudier la cinétique d'accumulation d'amidon lors d'une carence azotée progressive chez la microalgue *C. reinhardtii*. L'ensemble des cultures batch présente une phase de croissance et de mise en réserve accompagnées de changements pigmentaires caractérisées par une diminution de la teneur en pigments totaux dans les cellules et d'une modification de la distribution pigmentaire. Les points concluants sur ces dynamiques se résument ci-dessous :

- Le régime de rayonnement conditionne la dynamique de mise en réserve : les cultures en régime cinétique atteignent des teneurs en amidon beaucoup plus élevées comparées aux cultures photolimitées. Une activation concomitante des voies de synthèse et de dégradation ayant lieu lors de passages dans les zones sombres du PBR semblerait expliquer ces observations.
- La diminution de la teneur en pigments dans les cellules et particulièrement des teneurs en chlorophylles ($a + b$) est plus marquée dans les cultures en régime cinétique que dans les cultures photolimitées. Cette adaptation pigmentaire semblerait permettre à la cellule de réguler la quantité de lumière absorbée pour combler leurs besoins énergétiques et éviter la formation de ROS dans des conditions de stress nutritionnelle.

- Une réduction rapide du pourcentage de chl *a* dans les pigments est observée entraînant indirectement une augmentation de la teneur en PPC dans les pigments totaux. Cette dégradation de la chl *a* s'est révélée être directement corrélée à la diminution du rendement photosynthétique maximum, ainsi qu'à la taille des antennes collectrices représentée ici par la constante de saturation de la photosynthèse *K*. Par conséquent, l'adaptation pigmentaire entraîne non seulement une diminution de la vitesse d'absorption de la lumière par les cellules mais véritablement une réduction de l'efficacité de captation des photons au niveau de l'appareil photosynthétique.
- La réduction de l'activité photosynthétique a été corroborée par la mesure de la vitesse nette volumétrique d'absorption de photons rO_2 , laquelle a chuté progressivement après l'épuisement de l'azote et s'est stabilisée à un niveau très bas.
- La vitesse moyenne d'absorption de photons MRPA a été calculée et une valeur critique d'entre 50-70 mol_{hv}/kg_{XC}/h a été trouvée nécessaire pour atteindre une teneur maximale d'amidon par condition de rayonnement imposée.
- Le calcul de la fraction volumique éclairée a permis de montrer que plus une zone sombre est marquée en conditions de carence azotée, moins est la quantité de réserves carbonées accumulées par la culture, mettant en évidence ainsi l'impact de l'effet combiné de la carence azotée et la lumière sur l'accumulation d'amidon.

Enfin, les résultats de ce chapitre permettent d'avoir une meilleure compréhension des phénomènes ayant lieu lors d'une carence azotée en intégrant l'effet du rayonnement. Ces résultats faciliteront également la mise en place d'un modèle cinétique permettant de décrire la mise en réserve dans des conditions de limitation azotée, notamment grâce à la description de paramètres clés, tels que l'évolution du rendement primaire maximum ρ_{max} et de la constante de demi-saturation de la photosynthèse *K*.

Chapitre VI

VI. Mise en place d'un système de culture bi-étagé pour la photoproduction de biohydrogène en continu par la microalgue *C. reinhardtii*

Résumé :

Un procédé de production d'hydrogène par la microalgue *C. reinhardtii* avec un système de culture bi-étagé a été mis en place. Ce procédé a consisté à séparer dans l'espace les 2 phases clés pour la production d'hydrogène, à savoir la formation d'une biomasse enrichie en amidon dans l'étage 1 et un passage en anoxie pour déclencher la production d'H₂ dans l'étage 2. Pour ce faire, dans l'étage 1 la culture a été soumise à une limitation par la source d'azote afin de favoriser l'accumulation de réserves en amidon, et dans l'étage 2 des conditions anoxiques sont imposées à la culture par un contrôle rigoureux de la lumière dans le but d'induire une production d'H₂. Le système bi-étagé de production d'H₂ dispose d'un programme « fait maison » permettant le pilotage et la régulation des conditions de culture, telles que l'oxygène dissous, le pH, ou le taux de dilution dans chacun des 2 réacteurs. Un dispositif appelé « sélecteur de voies » a été installé et validé pour la mesure des compositions gazeuses en sortie de chaque photobioréacteur à partir du même analyseur de gaz. Une expérimentation avec le système bi-étagé a été effectuée pour la validation du pilote. La stratégie de démarrage du pilote se déroule en 3 temps : en mode batch, puis continu pour chacun des 2 PBRs pris séparément avant de les raccorder et de contrôler les 2 étages en parallèle. Les étapes en mode batch et continu servent à produire une biomasse enrichie en amidon dans des états physiologiques très proches dans les deux PBRs avant leur raccordement. Les deux PBRs ont été mise en œuvre conjointement et une production d'H₂ en régime permanent a pu être observée pendant près de 100 h dans l'étage 2 avec une vitesse volumétrique de production d'H₂ égale à 0,19 L H₂/m³/h et un volume total d'H₂ produit de 14 L/m³. La production d'H₂ s'est arrêtée suite à une perte de la stabilité sur l'étage 1. Finalement, les résultats obtenus ont cependant permis de valider le pilote bi-étagé de production d'H₂ et de mettre en évidence la nécessité d'aller plus loin sur le contrôle de l'étage 1 afin d'atteindre une production soutenue d'H₂.

VI.1 Introduction

La production de biohydrogène par les microalgues comme *C. reinhardtii* est possible grâce à deux processus biologiques appelés voies directe (PSII-dépendante) et indirecte (PSII-indépendante) de production d'H₂. Les voies métaboliques impliquées dans ces deux processus permettent à cellule microalgale de former de l'hydrogène, soit à partir de l'eau et de la lumière ou avec la dégradation de réserves de carbone internes, respectivement, en conditions anoxiques (cf. chapitre I). L'inconvénient majeur de la voie directe est le fait que la production d'hydrogène est liée au dégagement de l'oxygène produit par photosynthèse, ce qui peut très rapidement inhiber l'expression de l'enzyme hydrogénase et conduire à des productions d'H₂ transitoires. De ce fait, la voie indirecte de production d'H₂ présenterait un avantage par rapport à la sensibilité de l'hydrogénase à l'oxygène puisque la production d'H₂ via ce chemin métabolique n'entraîne pas de production d'oxygène. En fait, dans la voie indirecte de production d'H₂ les électrons formant l'H₂ sont fournis par oxydation des sucres de réserves et non pas par des molécules d'eau.

Ainsi, un procédé bi-étagé de production continue d'H₂ peut être conçu pour favoriser la voie indirecte au lieu de la voie directe. Ce procédé consiste à séparer dans l'espace les deux étapes clés pour la production envisagée d'H₂, à savoir une étape consacrée à la formation d'une biomasse riche en amidon et une deuxième étape dédiée à la production d'hydrogène. L'obtention d'une biomasse enrichie en amidon est possible en appliquant une limitation nutritionnelle par la source d'azote dans un premier photobioréacteur (étage 1). Ensuite, cette biomasse enrichie en amidon passerait dans un deuxième photobioréacteur (étage 2) où les conditions de rayonnement seront contrôlées afin d'imposer l'anoxie et d'induire la production d'H₂. Ces conditions d'éclairage permettant d'imposer des conditions anoxiques sont inspirées du protocole d'hypoxie développée par (Degrenne et al., 2011), dans lequel un flux de lumière incident réduit est imposée à la culture de sorte que la production et la consommation d'oxygène par les activités photosynthétique et respiratoire, respectivement, conduisent à une production nette d'oxygène proche de zéro. Une fois l'anoxie imposée de la sorte, une production d'H₂ peut avoir lieu par l'intermédiaire d'un des deux mécanismes réactionnels décrits précédemment. L'objectif de ce chapitre est de (i) présenter le système de production bi-étagé pour la photoproduction en continu d'hydrogène par la microalgue *C. reinhardtii* et (ii) de valider l'utilisation du pilote bi-étagé de production d'H₂ avec une première expérimentation.

VI.2 Matériels et méthodes

VI.2.1 Présentation du système de culture bi-étagé

VI.2.1.1 Photobioréacteurs

Deux photobioréacteurs toriques en inox d'un volume de 1.5 L, précédemment décrits (cf. chapitre II et chapitre IV), ont été utilisés pour la mise en œuvre du système de culture bi-étagé pour la photoproduction en continu d' H_2 . Les PBRs toriques ont été éclairées avec des panneaux LED préalablement calibrés pour fournir un flux de lumière incident connu. Ce type de PBR peuvent être couplés à un analyseur gaz en sortie (Degrenne et al., 2010; Fouchard et al., 2008) et permettre ainsi de calculer les vitesses spécifiques de production de gaz (O_2 , H_2) par la méthode des bilans gazeux (Degrenne, 2009; Urbain, 2017). De même, en raison de sa géométrie plane, ce réacteur permet également une caractérisation rigoureuse du transfert radiatif en ne considérant uniquement qu'une atténuation de la lumière selon une dimension (Pottier et al., 2005). Les PBRs toriques ont été équipés de plusieurs capteurs pour un suivi et contrôle des conditions de culture telles que : la température, le pH et l'oxygène dissous. L'aération à l'intérieur des PBRs toriques a été effectuée avec des débitmètres massiques calibrés pour l'air et le CO_2 . Les PBRs sont installés sur des balances de précision pour la régulation du niveau dans chacun des étages (Figure VI-1).

VI.2.1.2 Mesure de la composition gazeuse

La mesure individuelle de la composition gazeuse en sortie de chaque PBR du système bi-étagé a été effectuée avec un seul et unique analyseur gaz, à savoir une micro-chromatographie gazeuse (μGC). Pour ce faire, la μGC a été équipée d'un dispositif appelé « sélecteur de voies » permettant d'adresser jusqu'à 6 voies indépendantes de gaz à l'analyseur. Ainsi, 3 voies ont été utilisées pour l'opération du système bi-étagé : deux voies ont été consacrées à l'analyse de la composition gazeuse issue du PBR 1 et du PBR 2, et une 3^e voie a été assignée à une purge d'azote pur pour éviter des potentielles contaminations/traces de gaz restantes lors des mesures entre le PBR 1 et le PBR2 (Figure VI-1).

Il est important de noter que, s'il aurait été possible d'utiliser deux analyseur gaz, cela aurait nécessiter de rajouter du travail d'entretien, d'étalonnage et de pilotage supplémentaire, complexifiant encore d'avantage l'opération de production d' H_2 . De plus, disposer de deux analyseurs gaz génère également un coût supplémentaire associé à l'acquisition des analyseurs et de fonctionnement.

VI.2.1.3 Régulation des conditions de culture

La régulation des conditions de culture des deux PBRs ont été effectués par l'intermédiaire d'un unique programme « fait maison » sur le logiciel LabVIEW. Pour chaque PBR une régulation du pH et de l'oxygène dissous a été effectué par l'injection de débits gazeux dynamiques de CO₂ et N₂, respectivement. Les valeurs des débits gazeux sont imposées par des contrôleurs de type PID. Le pH a été régulé à 7,5 pour les deux PBRs tout au long de l'expérience. En revanche la consigne imposée pour l'oxygène dissous, exprimée en pourcentage par rapport à la saturation de l'air, a variée selon le stade des cultures (avant et après couplage des PBRs).

D'autre part, le volume de chaque PBR a été régulé à l'aide d'une balance et d'une pompe. Ainsi, une consigne de poids est donnée afin de conserver un volume de culture et de ciel gazeux constant lors du fonctionnement en continu.

VI.2.1.4 Raccordement des PBRs et contrôle des temps de séjour

Les deux PBRs toriques sont couplés par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique à 3 canaux. Deux modes de conduite ont été envisagées pour le pilotage des taux de dilution appliqués au PBR 1 et 2 (Figure VI-2) :

1. Taux de dilutions égaux dans les deux PBRs ($D_{PBR\ 1} = D_{PBR\ 2}$).
2. Taux de dilutions différents entre les deux PBRs ($D_{PBR\ 2} < D_{PBR\ 1}$).

Pour le premier cas, avec une conduite des taux de dilution égaux entre les PBRs ($D_{PBR\ 1} = D_{PBR\ 2}$) la canule de sortie du PBR 1, consacrée à la récolte de la culture, est utilisée pour alimenter directement le PBR 2. De ce fait, les taux de dilutions dans les deux PBRs sont identiques et il est fixé par le taux de dilution imposé dans l'étage 1. Pour le deuxième cas, avec des taux de dilutions différents entre les deux PBRs ($D_{PBR\ 2} < D_{PBR\ 1}$), une canule supplémentaire est installée dans le PBR 1 de sorte que deux soutirages puissent être effectués depuis le PBR 1 par la pompe reliant les deux PBRs.

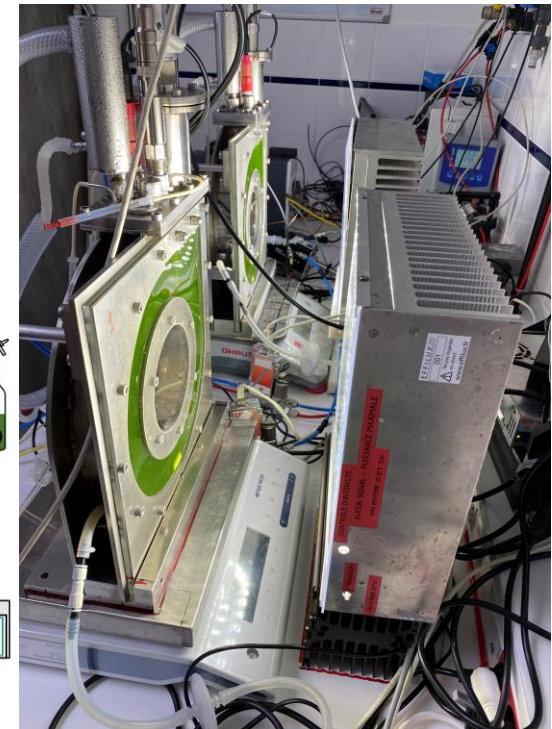
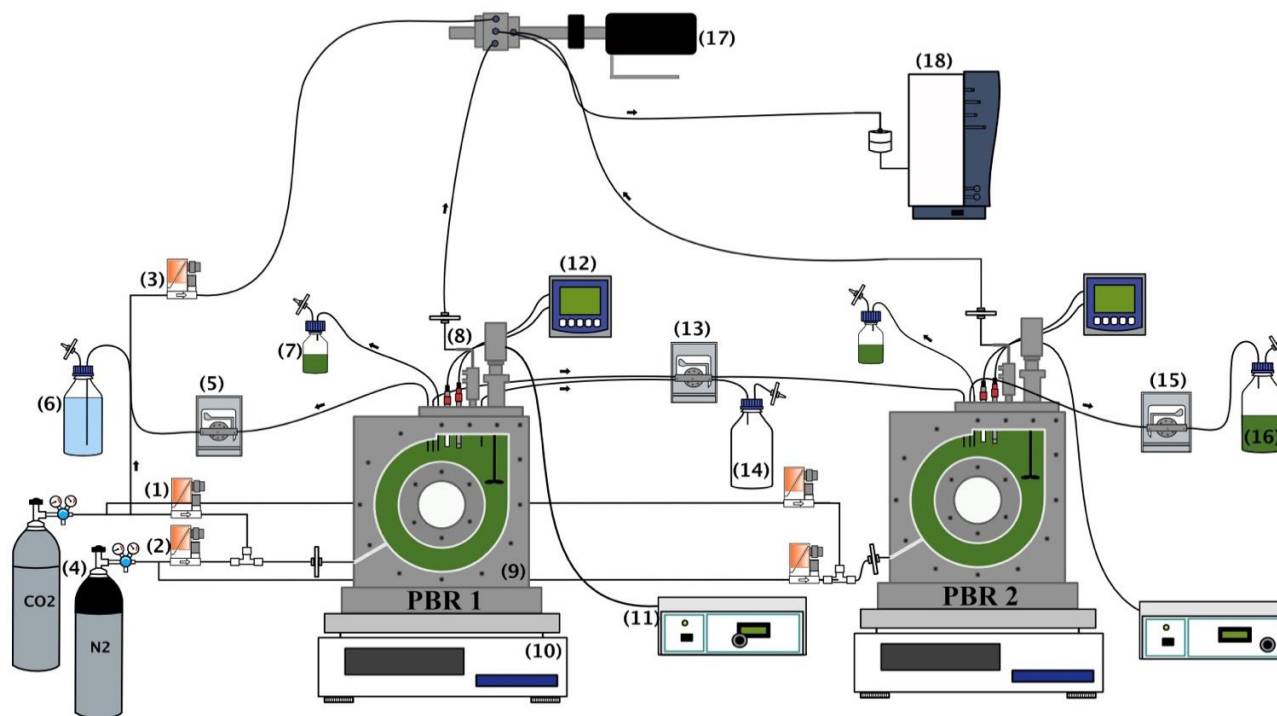


Figure VI-1. Schéma du système de culture bi-étagé de photoproduction en continu d' H_2 . (1) Débitmètre massique CO_2 , (2) débitmètre massique N_2 , (3) débitmètre massique pour purge de la μGC avec N_2 , (4) bouteilles gaz, (5) pompe entrée de milieu, (6) milieu de culture frais, (7) point d'échantillonnage PBR, (8) condenseur, (9) PBR, (10) Balance, (11) Moteur pour agitation, (12) Boîtier des sondes pH/Température et O_2 dissous, (13) pompe pour connexion des PBRs et pour la régulation du volume du PBR1 (14) Purge issu de la pompe de connexion des PBRs, (15) pompe pour la régulation du volume du PBR 2, (16) récolte du système bi-étagé, (17) sélecteur de voie, (18) analyseur gaz μGC .

Le premier soutirage sert à alimenter le PBR 2 mais ne suffit pas pour garder un volume constant dans le PBR 1. Pour résoudre ce problème, un deuxième soutirage est réalisé dans le PBR 1 et envoyé dans une bouteille dénommée « purge » pour maintenir le volume constant à l'aide de la régulation du niveau de culture expliquée auparavant. Le pilotage du mode de conduite du système bi-étagé relatif aux taux de dilution imposés a été implémenté dans le programme « fait-maison » élaboré à l'aide du logiciel LabVIEW.

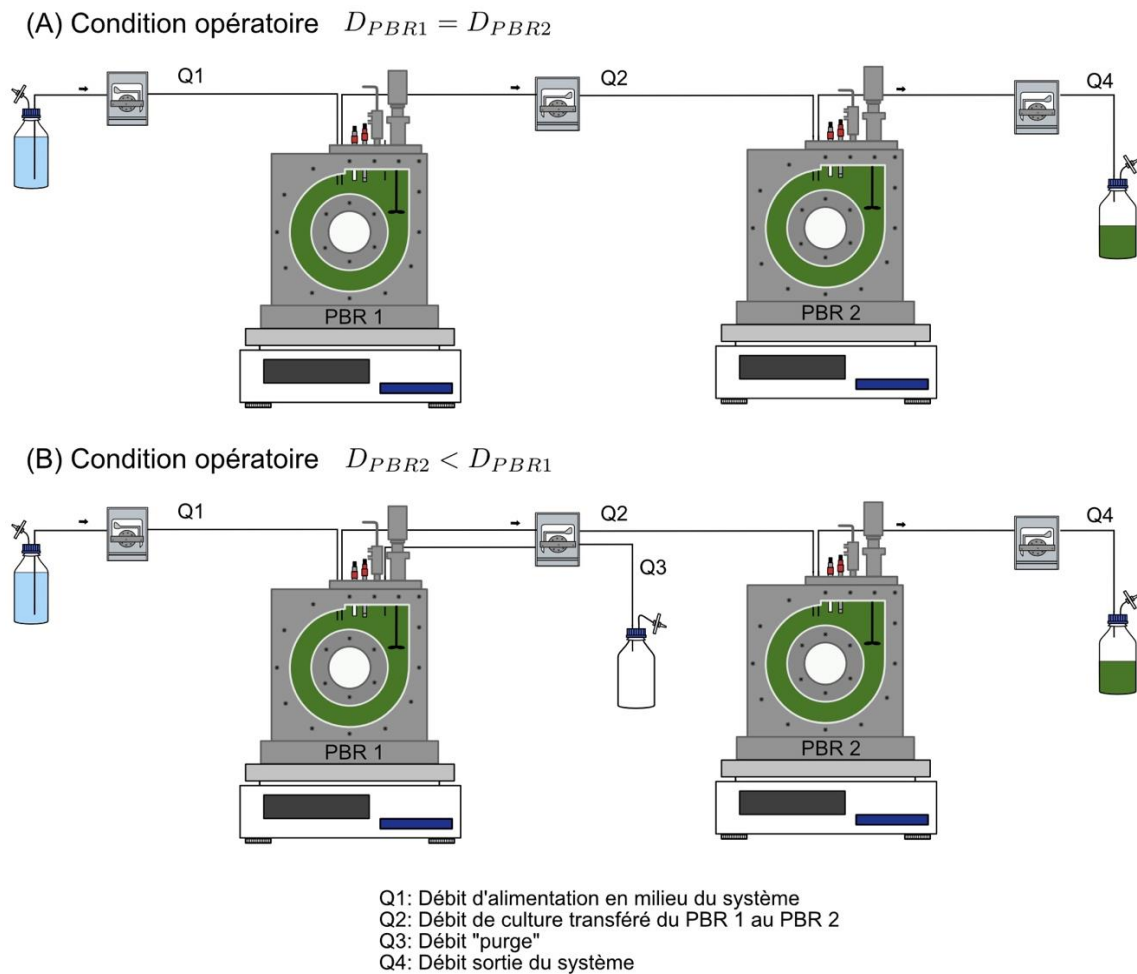


Figure VI-2. Modes de conduite des taux de dilution D dans le système de culture bi-étagé en continu.

VI.2.1.5 Complexité technique de la mise en œuvre d'un système de culture bi-étagé en continu

L'opération de deux photobioréacteurs toriques en série peut s'avérer très complexe à différents niveaux de son implémentation. D'un point de vue technique, plusieurs aspects sont à considérer : (i) Le développement d'un programme à façon pour le pilotage du système bi-étagé, (ii) le suivi des compositions gazeuse dans les deux PBRs, (iii) la disposition et configuration des PBRs.

VI.2.1.5.1 Développement du programme pour le pilotage du système bi-étagé.

Comme expliqué précédemment, un programme « fait maison » créé à partir du logiciel LabVIEW a été développé pour la régulation des conditions opératoire de cultures du système bi-étagé (Figure VI-3). Ce programme effectue l'acquisition en ligne des données recueillies à partir des différents équipements (débitmètres, sondes, pompes, balances, etc) branchés à chaque PBR pour un suivi en temps réel des données via une interface utilisateur personnalisée, la régulation des conditions opératoires des PBRs et l'enregistrement de données. La communication entre les équipements et le programme est gérée par une carte mère et un système d'acquisition adapté pour la conduite du système bi-étagé. Étant donné le nombre significatif d'équipements installés dans le montage bi-étagé (Figure VI-1), un temps considérable a dû être accordé à la programmation LabVIEW afin de mettre au point le programme de pilotage. Ainsi, un programme LabVIEW a pu être élaborée par l'équipe technique du laboratoire GEPEA. L'ensemble de tâches effectuées par le programme LabVIEW pour le pilotage du système de culture bi-étagé sont numérotées ci-dessous :

1. Interface utilisateur pour l'affichage/suivi en ligne des mesures provenant des équipements tels(les) que : les sondes O₂ dissous et pH/température, les débits gazeux d'aération, balance dans les deux PBRs, débits de pompes et flux de lumière incidente.
2. Régulation PID du pH et de l'oxygène dissous.
3. Régulation du niveau des PBRs.
4. Pilotage des modes de conduite des taux de dilutions (Figure VI-2)
5. Enregistrement de données
6. Communication avec l'analyseur gaz (μ GC) et acquisition des données.

De plus, une option permettant de communiquer avec le logiciel MATLAB et d'exécuter des scripts nécessaires aux étapes de contrôle a pu être intégré directement au programme LabVIEW. Ce dernier dans l'optique de pouvoir réaliser les analyses gaz dans chaque PBR et potentiellement d'implémenter l'estimation des réserves carbonées accumulées en temps réel (cf. chapitre IV).

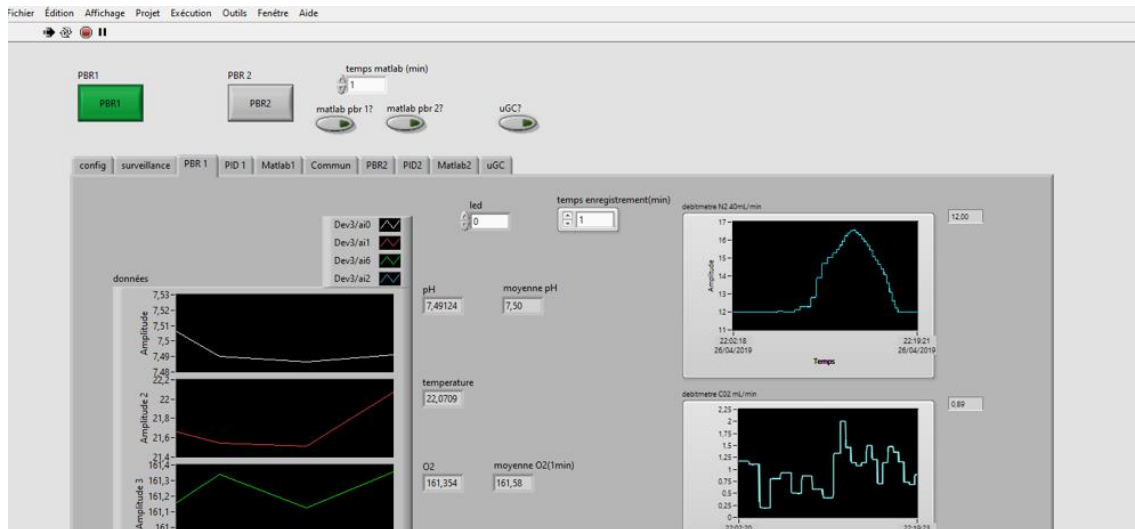


Figure. VI-3. Interface utilisateur du programme LabVIEW de pilotage du système de culture bi-étagé.

VI.2.1.5.2 Mesure des compositions gazeuses des PBRs

La mesure des compositions gazeuse en sortie des deux PBRs avant et après raccordement est primordiale pour le suivi du système bi-étagé. Avant le couplage des deux PBRs, cette mesure peut permettre de calculer par le biais de la méthode des bilans gazeux la vitesse volumétrique nette de production d'oxygène r_{O_2} (cf. chapitre IV) afin de valider les états physiologiques recherchés. De même, la mesure de la composition gazeuse en sortie du PBR 1 lors du couplage des deux PBRs a permis de mettre en évidence une perte de la stabilité suite aux changements observés de la r_{O_2} ou d'identifier une production inattendue d'hydrogène pouvant survenir si la limitation azotée n'est pas suffisamment contrôlée (cf. chapitre II). De manière similaire, la mesure de la composition gazeuse en sortie du PBR 2 est impératif pour la quantification de la production d' H_2 .

La difficulté technique de ce qui précède résulte de la mesure de la composition gazeuse des deux PBRs avec un unique analyseur gaz. Si un sélecteur de voies couplé à la μGC permet d'analyser plusieurs échantillons gazeux avec la même machine, un protocole adapté est nécessaire et peut être validé uniquement en conditions réelles.

VI.2.1.5.3 Dispositions et configuration des PBRs

La bonne disposition ainsi qu'une configuration adaptée des PBRs, notamment lors du couplage des PBRs permettrait d'anticiper des problèmes pouvant survenir une fois que les deux PBRs sont connectés. Quelques recommandations à ce sujet sont présentées ci-dessous :

- Le positionnement des deux PBRs est très important pour assurer la bonne l'alimentation du PBR 2 à partir du PBR 1. Idéalement, le PBR 1 devrait être positionné à une hauteur plus élevée par rapport au PBR 2 pour faciliter le pompage et éviter la suraccumulation des cellules dans le tuyau reliant les 2 PBRs.
- La longueur du tuyau de connexion entre les deux PBRs devrait être la plus courte possible afin d'éviter un volume mort trop important et les effets inconnus que cela pourrait entraîner dans l'étage 2.
- Il est aussi recommandé que la canule d'alimentation du PBR 2 ne soit pas une canule plongeante. Le cas contraire, le débit d'alimentation du PBR 2 ne pourra pas être assuré correctement, et un stress non-maitrisé se verrait imposé à la culture à l'entrée de l'étage 2.

À cause des contraintes d'espace et de matériel, dans l'expérimentation réalisée avec le système de culture bi-étagé décrit dans ce chapitre, les PBRs ont été installés à la même hauteur.

VI.2.2 Stratégie de conduite de culture pour la production d'H₂

Pour la réalisation d'une culture avec le système bi-étagé décrit précédemment, trois étapes sont prévues. Les deux premières étapes, nommées étapes en mode batch et continu, ont lieu lorsque les deux PBRs fonctionnent séparément, et la dernière étape, appelée en mode bi-étagé, débute lors de la connexion des deux PBRs (Figure VI-4) :

1. Étape batch : Les PBRs sont inoculés et les cultures se développent afin de former une certaine quantité de biomasse imposée par la concentration en NH₄Cl apporté dans le milieu de culture initial.
2. Étape continue : Les PBRs passent en mode continu jusqu'à obtention d'un état stationnaire pour chaque culture, caractéristique de l'état physiologique désirée, en l'occurrence identiques dans les 2 étages dans le cas présent avant raccordement. Les PBRs sont alimentés avec un milieu de culture dont la charge en azote (NH₄Cl) a été réduite afin d'induire l'accumulation de réserves en amidon. Il est important de noter que disposer d'un même état physiologique avant raccordement devrait favoriser une stabilisation plus rapide du système de culture bi-étagé en continu.
3. Étape « passage en mode bi-étagé » : Les deux PBRs sont connectés et le système de culture bi-étagé est opéré en continu. Les conditions opératoires de l'étage 1 reste les mêmes que celles de l'étape continue. En revanche, les conditions d'éclairage de l'étage 2 sont modifiées afin d'induire l'anoxie et la production d'H₂ à partir du

protocole d'hypoxie (Degrenne et al., 2011). Si nécessaire, la régulation de l'oxygène dissous peut être utilisée pour aider à imposer les conditions d'anoxie dans cet étage.

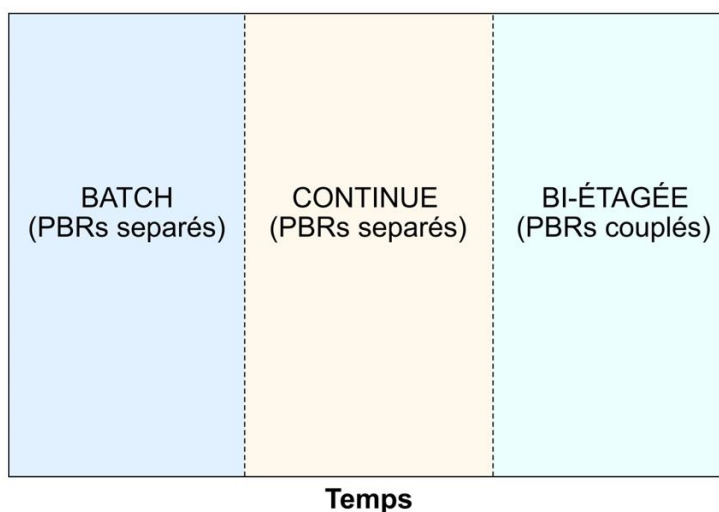


Figure VI-4. Étapes pour la mise en place du système de culture bi-étagé.

Les conditions de cultures spécifiques à chaque étape sont décrites dans le Tableau VI-1. Les conditions opératoires (q_0 , D , $[\text{NH}_4\text{Cl}]$) utilisées pour les étapes batch et sont issues de travaux antérieurs (Lemasson, 2015; Martzloff, 2013). Ces conditions ont permis d'obtenir une teneur en amidon d'environ 40 % chez *C. reinhardtii*. D'autre part, les conditions d'éclairiment imposées dans l'étage 2 après raccordement correspond au flux de lumière incident qui a permis d'avoir la meilleure production d' H_2 lors des essais préliminaires réalisés avec un prototype de système de culture bi-étagé (Lemasson, 2015).

Tableau VI-1. Conditions de culture pour les 3 étapes ayant lieu lors du lancement du système bi-étagé de production d' H_2 .

Étape/Condition	Taux de dilution, D (h^{-1})	Flux incidente, q_0 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	Concentration en NH_4Cl (g/L)	Analyse gaz	Consigne O_2 dissous (%)
Batch	-	400	0.40	Non	130
Continue	0.01	400	0.110	Oui	130
Bi-étagée (PBR 2)	0.01	50	0.110	Oui	0,40

VI.2.2.1 Suivi de culture

Le suivi de la phase biotique (composition de la cellule), de la phase liquide (mesures sur le milieu de culture) et de la phase gaz des deux PBRs ont été effectuées pour l'ensemble des

différentes étapes (batch, continue et bi-étagée) du procédé étudié. Le tableau VI-2 récapitule les mesures et dosages réalisés.

Tableau VI-2. Mesure et dosages réalisées pour les phases biotique, liquide et gaz dans les 3 étapes du procédé bi-étagée de production d'H₂.

Phase	Mesure/dosage
Biotique	<ul style="list-style-type: none"> - Dosage de la concentration en pigments - Mesure de la concentration en amidon - Concentration de la matière sèche - Densité cellulaire
Liquide	<ul style="list-style-type: none"> - pH - O₂ dissous - Température - Mesure du rendement photosynthétique maximum - Dosage de la concentration en ammonium.
Gaz	<ul style="list-style-type: none"> - Composition gazeuse en sortie des PBRs

VI.2.3 Caractérisation de la production d'H₂

La caractérisation de la production d'hydrogène par *C. reinhardtii* a été réalisée par le calcul de deux grandeurs, à savoir la vitesse volumétrique nette de production d'hydrogène, r_{H_2} et du volume d'hydrogène produit rapporté par unité de volume de culture, I_{H_2} . De façon analogue au calcul de la vitesse volumétrique nette de formation d'oxygène r_{O_2} (cf. chapitre II et chapitre IV), r_{H_2} (en L H₂ /m³/h) peut être déterminé par la méthode de bilan gazeux :

$$r_{H_2} = \left(\frac{y_{H_2,out} G_{T,out}}{V} \right) V_m \quad (VI. 1)$$

où $y_{H_2,out}$ désigne la fraction molaire d'H₂ à la sortie du PBR 2, $G_{T,out}$ le débit molaire total en sortie du PBR 2, V le volume de culture et V_m le volume molaire.

Le volume d'hydrogène produit rapporté par unité de volume de culture, I_{H_2} , sur une plage de temps donnée compris entre deux temps caractéristiques, t_1 et t_2 , peut être calculé de la façon suivante :

$$I_{H_2} = \int_{t_1}^{t_2} r_{H_2} dt \quad (VI. 2)$$

VI.3 Résultats et discussion

VI.3.1 Évolution de l'état physiologique des cultures

La figure VI-5 montre l'évolution des états physiologiques des cultures réalisées dans le PBR 1 et 2. On observe une allure cinétique très similaire pendant les étapes réalisées en mode batch et continu pour les deux PBRs. En effet, durant les premières 120 h de culture en batch, les cellules de *C. reinhardtii* se sont multipliées et ont consommée la totalité de l'ammonium disponible dans le milieu de culture jusqu'à atteindre une concentration en biomasse totale située aux alentours de 1,3-1,5 g/L pour une teneur en amidon d'environ 20 % et une densité cellulaire de $200-210 \times 10^5$ cellules/mL. Après 120 h, les cultures dans les 2 PBRs sont conduites en mode continu et maintenues environ 400 heures jusqu'à obtention d'un état physiologique stable. On peut noter qu'à la fin de l'étape continue dans le PBR 1, celui s'est stabilisé pour une teneur en amidon d'environ 39 % et une densité cellulaire de 1×10^6 cellules/mL, et le PBR 2 pour une teneur en amidon de 37 % approximativement et une densité cellulaire de 1×10^6 cellules/mL. Ainsi, deux états physiologiques semblables ont pu être obtenus dans les deux PBRs avant raccordement. A ce stade, il est utile de remarquer que les teneurs en amidon obtenues pour les cultures continues sont en parfaite adéquation avec les valeurs reportées par Martzloff (2013) et Lemasson (2015).

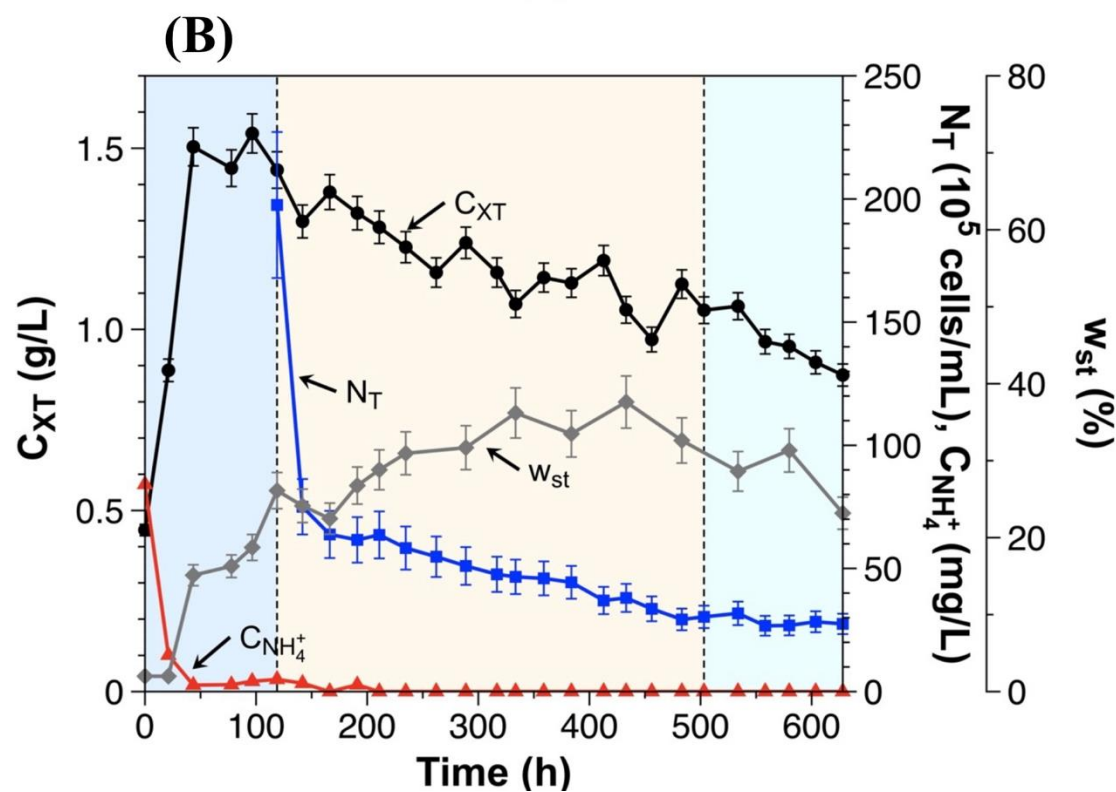
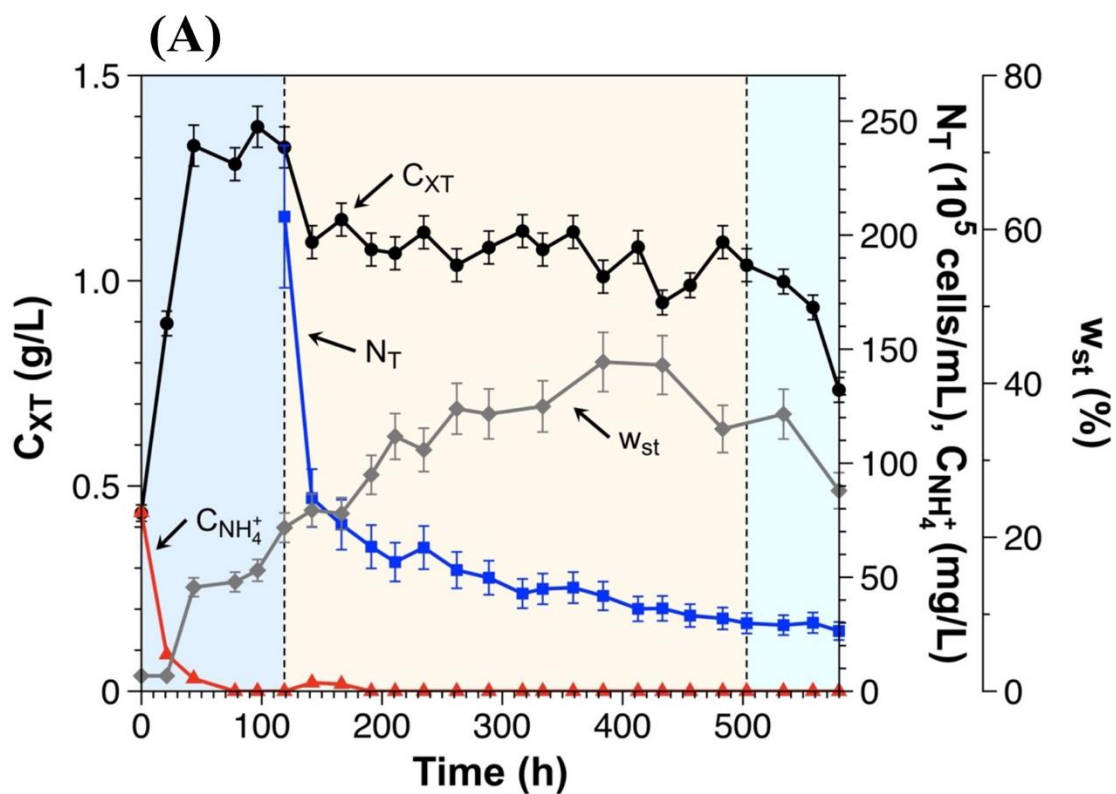


Figure VI-5. Évolution de l'état physiologique des PBR 1 (A) et PBR 2 (B), représentés par la dynamique de la concentration en biomasse totale (C_{XT}), de la densité cellulaire (N_T), de la teneur en amidon (w_{st}) et de la concentration en ammonium ($C_{NH_4^+}$).

Un suivi de la vitesse volumétrique nette de production d'oxygène (rO_2) a par ailleurs pu être effectuée pour les PBRs 1 et 2 lors de l'étape continue. La figure VI-6 montre que la production nette d'oxygène s'est stabilisée pour les deux étages à une valeur moyenne d'approximativement $0,3 \text{ mol O}_2/\text{m}^3/\text{h}$. Ces observations permettent de valider si besoin était, que l'état physiologique atteint dans les PBR 1 et 2 était identique avant raccordement. De même, ces résultats permettent de valider le fonctionnement du sélecteur de voie pour la mesure de composition gaz en sortie de chaque étage avec un seul analyseur gaz. À partir de 503 h de culture, les deux PBRs ont été raccordés. Un problème de surpression dans le PBR 1 a cependant pu être observé et a perturbé l'analyse des gaz pour ce PBR pendant l'étape de conduite en mode bi-étagé (Figure VI-6).

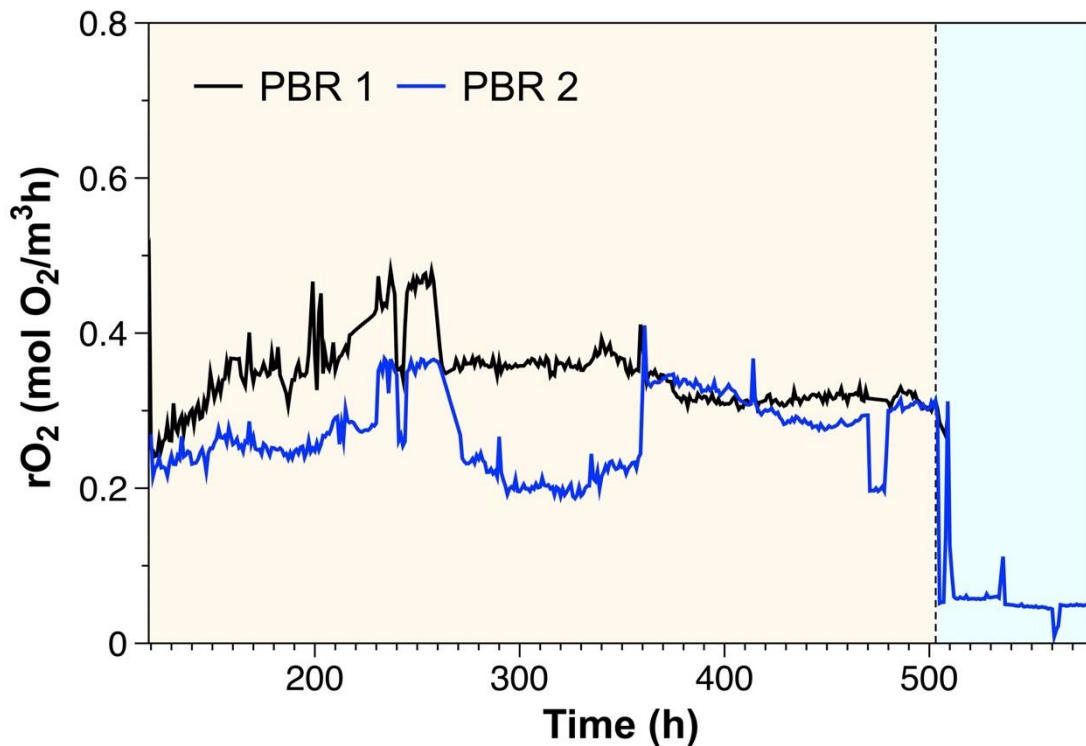


Figure. V-6. Évolution de la vitesse volumétrique nette de production d'oxygène (rO_2) durant les étapes en mode continu et bi-étagé des PBR 1 et 2.

Par ailleurs, la figure VI-7 décrit l'évolution la teneur en Chl *a*, Chl *b* et PPC dans la biomasse catalytique, notés respectivement, $w'_{chl a}$, $w'_{chl b}$, w'_{PPC} , dans le PBR 1 et 2. On observe que les teneurs en pigments diminuent lors du passage en continu avec des conditions de limitation par la source azotée, et que cette diminution semble plus marquée pour les teneurs en chlorophylles $w'_{chl a}$ et $w'_{chl b}$, jusqu'à une stabilisation à partir de 300 h et 400 h pour le PBR1 et PBR 2, respectivement. Ces observations illustrent les phénomènes d'adaptation pigmentaire suite à un stress nutritionnel, conduisant à la fois à une diminution de la teneur en pigments et une

réduction du pourcentage de chlorophylles au sein de la fraction pigmentaire (cf. chapitre V). On peut noter au passage que les teneurs massiques en pigments w'_{pig} sont très similaires dans les PBRs 1 et 2 avec un écart moyen de 13 %, montrant qu'avant couplage, les deux PBRs étaient effectivement dans des états physiologiques équivalents vis-à-vis de la quantité de pigments rapportée par cellule. D'ailleurs, on peut noter que les teneurs en pigments restent relativement constantes une fois les deux PBRs raccordés pour fonctionner en système bi-étagé.

Il est utile de remarquer que puisque la teneur en pigments semble peu évoluer dans l'étage de production d' H_2 (PBR 2), cela implique une vitesse d'absorption de photons (RPA pour rate of photons absorption) constante qui peut être décrite à partir des travaux présentés au chapitre III. Ces observations ouvrent la possibilité à une régulation possible du RPA dans l'étage 2 suivant l'état physiologique imposé dans l'étage 1. De plus, une deuxième implication de la limitation azotée est une diminution du rendement photosynthétique maximum (cf. chapitre V), lequel a été mesuré à 0,56 pour le PBR 1 et à 0,61 pour le PBR 2 avant raccordement.

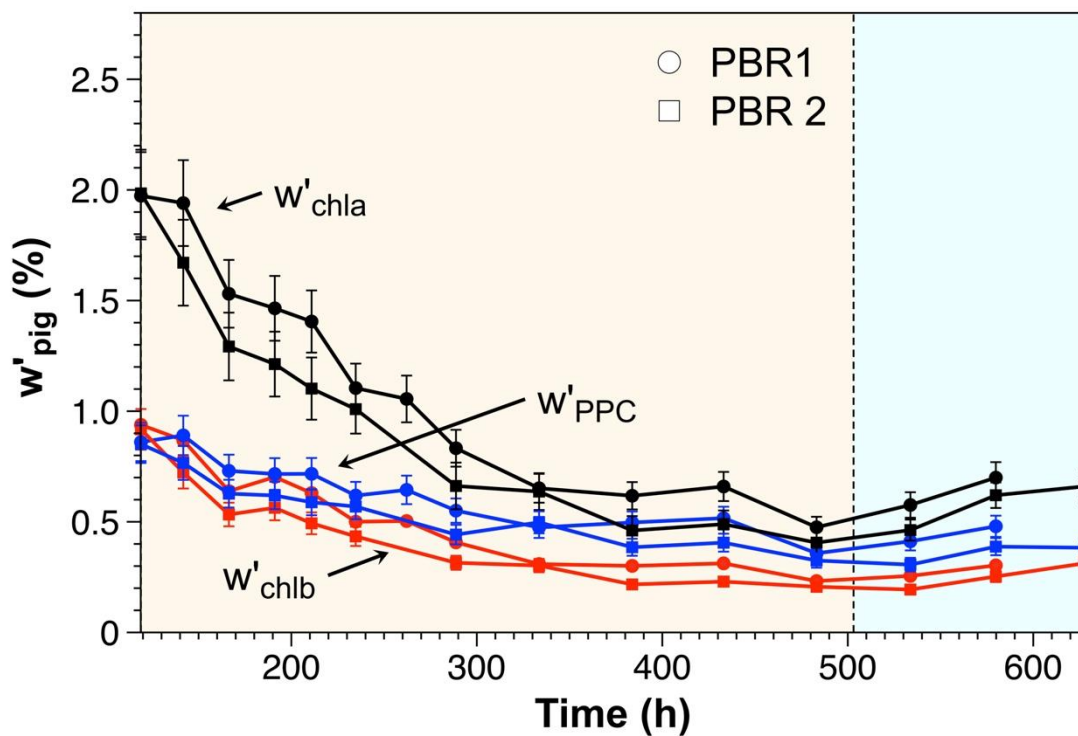


Figure V-7. Évolution de la teneur en pigments dans la biomasse catalytique w'_{pig} . En noir, rouge et bleu la teneur massique de la Chl a, Chl b, et caroténoïdes totaux PPC dans la biomasse catalytique, respectivement notés, w'_{chla} , w'_{chlb} , w'_{PPC} . Le symbole cercle et carré désignent les w'_{pig} dans le PBR 1 et PBR 2, respectivement.

VI.3.2 Production de biohydrogène

Une fois les deux PBRs connectés, la culture passe en mode bi-étagé et les conditions opératoires dans l'étage 2 sont changées telles que décrit dans le Tableau VI-1. Notons que le nouveau flux de lumière incident dans le PBR 2 ($q_0 = 50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) devait permettre d'atteindre des conditions anoxiques, et donc induire une production d' H_2 . De plus, afin de maintenir des conditions anoxiques dans l'étage 2, la consigne pour l' O_2 dissous dans le PBR 1 et 2 ont été changé à 40 % et 0 %, respectivement (Figure VI-8).

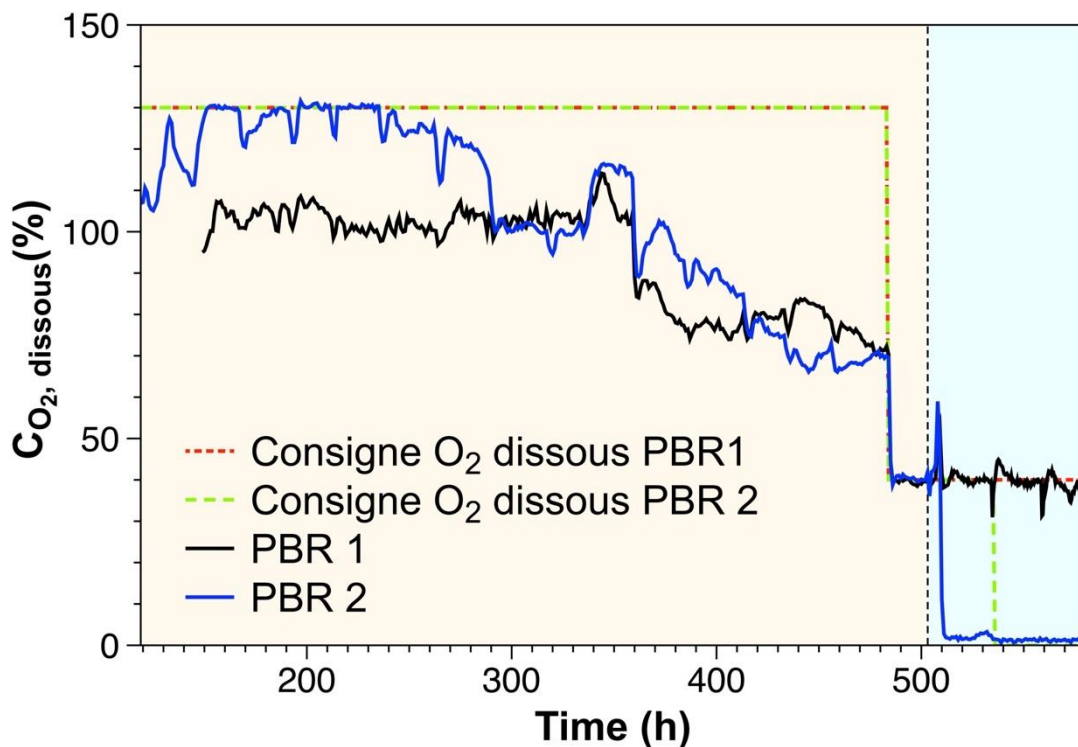


Figure VI-8. Évolution de la concentration en oxygène dissous $C_{\text{O}_2, \text{dissous}}(\%)$ dans les PBR 1 et 2 au cours des étapes en mode continu et bi-étagé (lignes continues) comparé à la consigne transmise au contrôleur PID.

À partir de là, une production de biohydrogène d'une durée d'environ 100 h a pu être observée (Figure VI-9). Il est important de noter que pendant 70 h la vitesse volumétrique nette de production d'hydrogène r_{H_2} a été maintenue constante entre $0.18\text{-}0.19 \text{ L H}_2/\text{m}^3/\text{h}$, ce qui a démontré la faisabilité d'une production d' H_2 en régime permanent avec la stratégie étudiée. Cette production en régime permanent d' H_2 s'est accompagnée d'une consommation d'environ 12 % des réserves d'amidon dans la biomasse (Figure VI-5B) et a permis de former près de $15 \text{ L}/\text{m}^3$ d'hydrogène ($I_{\text{H}_2, \text{total}}$). De même, pendant cette période de production d' H_2 , aucun changement significatif sur le rendement photosynthétique n'a pu être observé. La valeur du

rendement photosynthétique maximum $\varphi_{PSII,max}$ semble être restée sensiblement égale à 0,6 avant et après raccordement des 2 PBRs (Figure VI-9). Cette observation diffère positivement de ce qui avait pu être rapporté précédemment dans les travaux de Lemasson (2015), où le $\varphi_{PSII,max}$ diminuait jusqu'à atteindre des valeurs aux alentours de 0,2 lors de l'étape de conduite en mode bi-étagé, pour la production d' H_2 . En effet, un rendement photosynthétique trop bas pourrait compromettre la viabilité cellulaire et limiter considérablement la captation de photons, pouvant conduire à un arrêt de la production d' H_2 .

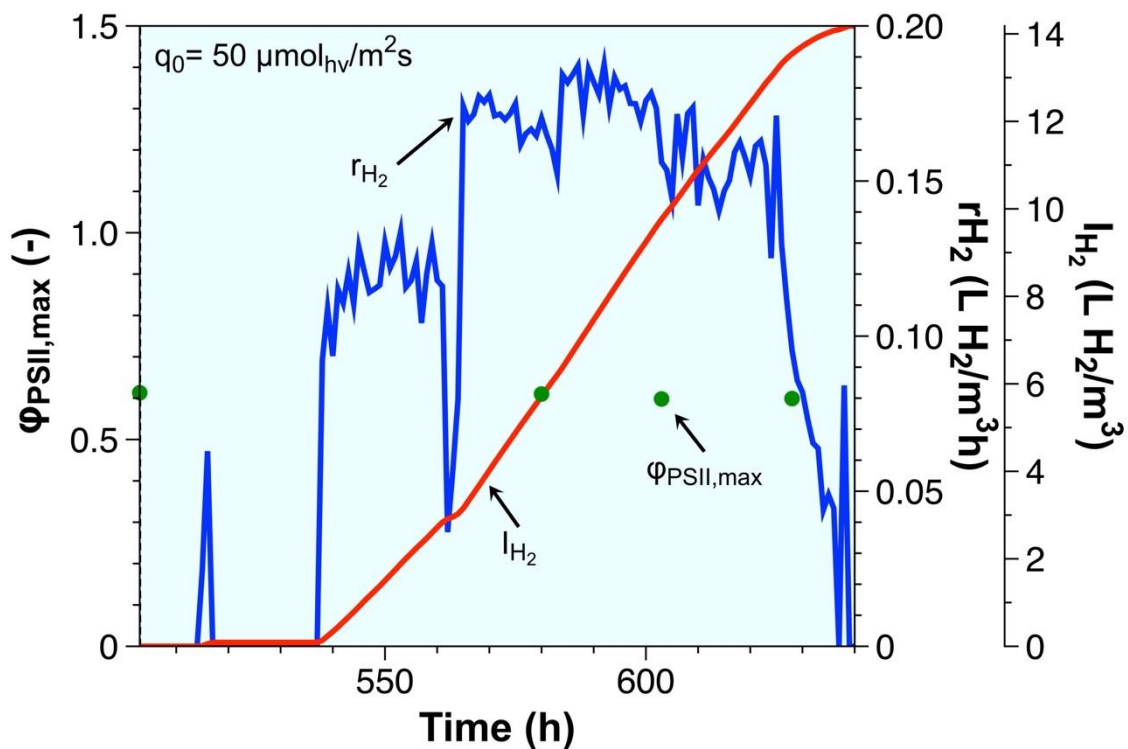


Figure VI-9. Production de biohydrogène par la microalgue *C. reinhardtii* en système bi-étagé. Cette production a été caractérisée par la vitesse volumétrique nette de production d' H_2 (r_{H_2}) et le volume d' H_2 produit par rapport au volume de culture (I_{H_2}).

La figure VI-9 montre cependant que la formation d' H_2 s'est malgré tout arrêtée rapidement, après seulement 70 h de production. En fait, une perte de la stabilité de l'étage 1 lors de l'étape de conduite en mode bi-étagé, a pu être observée avec une chute significative de la concentration en biomasse et de la densité cellulaire (Figure VI-5A). Il est donc fortement probable que cet événement soit à l'origine de la chute, puis de l'arrêt de la production d' H_2 . Ces observations réaffirment la nécessité de disposer d'outils de suivi et contrôle avancés pour piloter l'étage 1 afin pouvoir soutenir une production d' H_2 en continu avec le système de culture bi-étagé mis en place.

VI.4 Conclusions

La mise en place d'un système de culture bi-étagé a été effectuée pour la photoproduction en continu de biohydrogène par la microalgue *C. reinhardtii*. Le pilote bi-étagé intègre des améliorations importantes permettant une conduite et un suivi en conditions contrôlées accrues. Le système bi-étagé permet d'être piloté avec un unique programme développé à façon à partir du logiciel LabVIEW. Dans ce programme de pilotage, différents régulateurs ont été implémentés pour le contrôle du pH, de l'oxygène dissous et du niveau (volume de culture) dans les PBRs. De plus, un sélecteur de voies a pu être utilisé et validé dans sa mise en œuvre pour le suivi de la composition gazeuse en sortie des PBRs à partir d'un seul analyseur de gaz.

Enfin, une expérimentation en culture bi-étagé a pu être lancée pour valider le concept du pilote. Un protocole en 3 étapes (batch, continue et bi-étagée) a été validé pour son démarrage. Le raccordement des deux PBRs a été réalisé avec des états physiologiques initiaux sensiblement identiques, et une production d' H_2 en régime permanent a été observée pendant 100 h dont 70 h à une vitesse de production sensiblement constante ($r_{H_2,max} = 0.19 \text{ L } H_2/m^3/h$), soit 70% du temps total de production. Le pilote de culture bi-étagé nécessite encore l'implémentation d'un outil de suivi et contrôle avancés de l'état physiologique du PBR 1 afin de soutenir une production d' H_2 plus longtemps.

Conclusion générale et perspectives

Bien que plusieurs stratégies de production d'H₂ avec des microalgues aient été étudiées jusqu'à présent, l'intérêt majeur de la communauté scientifique semble porter majoritairement sur la manière d'imposer des conditions anoxiques prolongées nécessaires à l'expression et à l'activité de l'hydrogénase. Par conséquent, la plupart des cultures réalisées pour produire de l'H₂ sont opérées en mode discontinu, et seulement une étude en mode continu peut être recensée dans la littérature. Cependant, une production en mode batch ne peut entraîner qu'une production transitoire d'H₂, ce qui est difficilement industrialisable. Par conséquent, une attention particulière a été portée à développer un système de culture continu bi-étagé permettant une production continue de biohydrogène à partir de la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce système permet de séparer spatialement deux étapes clés de la production d'H₂, à savoir la production d'une biomasse enrichie en amidon (potentiellement source de pouvoir réducteur) et le passage en anoxie de la culture. Il s'est révélé que la maîtrise et le contrôle du premier étage, permettant l'obtention d'une biomasse riche en amidon et de contrôler la production d'oxygène, sont impératifs pour la stabilité globale du système afin de pouvoir envisager de soutenir une production d'H₂. Pour ces raisons, les travaux réalisés lors de cette thèse de doctorat ont été consacré principalement à l'étude la réponse de *C. reinhardtii* à des conditions de limitation par la source d'azote.

Dans le chapitre II de ce manuscrit, un protocole a été développé afin d'étudier la cinétique d'accumulation de l'amidon chez *C. reinhardtii* lors d'une limitation par la source d'azote seule. Ce protocole a permis de s'affranchir d'autres paramètres pouvant influencer la réponse de notre système biologiques, telles que l'apparition d'un stress oxydant, un passage en anoxie, une fluctuation qualitative des inocula, ou encore une limitation par la source d'énergie. Ainsi, une analyse de la cinétique de mise en réserve affectée uniquement par une carence azotée progressive, a été rendu possible.

Dans le chapitre III de ce manuscrit, une méthodologie de prédiction des propriétés radiatives de la microalgue *C. reinhardtii* en conditions de limitation azotée a été proposée, et validée expérimentalement pour différentes teneurs en amidon. La détermination des propriétés radiatives a été réalisée à l'aide de la théorie de Mie-Lorenz, qui nécessite de connaître le coefficient de réfraction complexe de la cellule $m_\lambda = n_\lambda + i k_\lambda$ dans les conditions de culture étudiées, ainsi que l'évolution de la distribution de taille des cellules de microalgue afin de prédire les coefficients massiques d'absorption $\bar{A}_{abs,\lambda}$ et de diffusion $S_{sca,\lambda}$ de la culture.

Un calcul du coefficient de réfraction complexe a pu être réalisé en tenant compte des changements physiologiques opérés par la limitation nutritionnelle, telles que la diminution de la teneur en pigments, l'arrêt de la division cellulaire, les changements de taille et volume des cellules en fonction de l'accumulation de réserves intracellulaires en amidon. Les propriétés radiatives déterminées numériquement et expérimentalement ont permis de déterminer la vitesse spécifique d'absorption de photons (LRPA) avec une correspondance inférieure à 9% pour l'ensemble des teneurs en amidon évaluées. De plus, un modèle d'atténuation lumineuse simplifié ne tenant compte que du coefficient d'absorption pour le calcul du LRPA, a montré une bonne adéquation avec le modèle d'atténuation lumineuse complet, permettant d'approcher plus simplement le calcul du LRPA pour des cultures de *C. reinhardtii* soumise à une carence azotée progressive.

Finalement, la méthodologie proposée a été utilisée pour générer une base de données des propriétés radiatives en 5D dépendant de la longueur d'onde, de la teneur totale en pigments rapportée à la biomasse catalytique, de la teneur en Chl *a* au sein des pigments, de la teneur en amidon et de la teneur en triglycérides dans la biomasse totale.

Dans le chapitre IV, un modèle stœchiométrique compartimenté a été élaboré pour estimer le niveau de réserves en carbone accumulé dans des conditions de limitation azotée. Ce modèle utilise une mesure indirecte de la vitesse nette volumétrique de production d'oxygène r_{O_2} obtenue par la méthode de bilan gazeux pour estimer les vitesses de formation de la biomasse catalytique, d'accumulation de l'amidon et de triglycérides. La bascule entre les différentes réactions est définie par l'introduction des termes cinétiques. Les paramètres du modèle ont été identifiés à partir des données collectées pour deux cultures batch. La validation de ce dernier a été réalisée à partir d'une culture discontinue indépendante. Le modèle proposé peut être implémenté comme un outil d'estimation et de suivi en ligne de l'état physiologique de cultures réalisées en conditions de limitation azotée et en régime cinétique vis-à-vis de la lumière.

Le modèle développé dans le chapitre IV a été construit sur l'hypothèse que l'apport en lumière n'était pas limitant pour les cultures. Afin d'aller plus loin, dans le chapitre V, une analyse cinétique a été réalisée à partir de 4 cultures dans le but de comparer la réponse biologique à une carence azotée progressive pour deux régimes de lumière différents : cinétique (2 cultures) et photolimité (2 cultures). Les phases de croissance et d'accumulation d'amidon ont pu être caractérisées pour les quatre cultures. Les cultures réalisées en régime cinétique se sont révélées accumuler davantage d'amidon que les cultures photolimitées. Une activation des voies de

dégradation de l'amidon sous contrôle de la présence ou non d'une zone sombre dans le PBR pourrait expliquer ce phénomène.

De manière similaire, une diminution des teneurs en chlorophylles a été constatée pour l'ensemble des cultures, mais avec une réduction plus importante pour les cultures conduites en régime cinétique. La dégradation des chlorophylles permettrait à la cellule de réguler la quantité d'énergie absorbée et de prévenir le stress oxydatif pouvant être induit par la limitation azotée. En effet, une diminution de l'activité photosynthétique caractérisée par le suivi de la r_{O_2} a pu être observée. De plus, une diminution du rendement photosynthétique maximale ainsi qu'une diminution de la taille des antennes collectrices associées aux photosystèmes, semblent être reliées à la dégradation de la Chl *a*.

Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence les phénomènes clés associés à une limitation azotée et de montrer les effets négatifs sur les niveaux de réserves pouvant être atteints, opérés en conditions photolimitantes. De même, ces résultats devraient permettre l'élaboration d'un modèle cinétique de mise en réserve de l'amidon et pointer les limitations du modèle stoechiométrique présenté au chapitre IV.

Dans le chapitre VI de ce manuscrit, la mise en place du système de photoproduction continue d' H_2 a pu être abordée. Un pilote de production a été développé intégrant un contrôle rigoureux des conditions opératoires (O_2 dissous, pH, niveau) et physiologiques (concentration en biomasse, en amidon, en cellules, en azote inorganique), ainsi qu'un suivi et une analyse des gaz en simultanée sur les deux étages.

Un protocole en trois étapes pour le lancement du système bi-étagé a été mis en place. Une première étape permet la formation d'une biomasse « standardisée » dans les deux étages séparément, en mode continu et en conditions de limitation par la source d'azote. Ensuite, les deux PBR comprenant une biomasse des conditions physiologiques similaires ou très proches, ont été raccordés. Enfin, des conditions opératoires spécifiques ont été imposées à l'étage 2 en vue de produire de l'hydrogène. Une production d' H_2 a pu être réalisée sur environ 100 h dont 70 h semblées relativement stables ($r_{H_2,max} = 0.19 \text{ L/m}^3\text{h}$). Une perte de la stabilité de l'étage 1 a malheureusement été l'origine de l'arrêt de la production d' H_2 . L'implémentation d'un outil avancé de suivi et de contrôle de cet étage devrait permettre de surmonter le problème rencontré et parvenir à maintenir plus longtemps une production d' H_2 .

Les perspectives de cette thèse tournent autour des chapitres III à VI :

- Pour le Chapitre III, il serait possible d'aller plus loin dans la validation de la méthodologie de prédiction des propriétés radiatives de *C. reinhardtii* cultivée en conditions de limitation azotée et accumulant des réserves carbonées. Une validation plus robuste pourrait consister dans l'étude de ces dernières pour une culture accumulant certes de l'amidon mais aussi des lipides (TAG) de façon majoritaire.
- Pour le Chapitre IV, il serait intéressant d'étendre la validité du modèle à des conditions opératoires plus larges, notamment en présence d'une phase sombre. Étant donné l'effet mis en évidence d'une double limitation par la source d'azote et d'énergie au Chapitre V, il serait intéressant d'intégrer de nouveaux capteurs permettant le suivi de la concentration en pigments dans les cellules afin de pouvoir estimer le profil d'atténuation lumineuse au sein du PBR. Il pourrait également être possible de tester le modèle développé avec d'autres souches de microalgues.
- Un modèle biochimiquement structuré de la cinétique de stockage du carbone chez *C. reinhardtii* peut être développé à partir des résultats obtenus au Chapitre V. Ce modèle pourrait tenir compte de l'effet du transport de la lumière et de la captation de photons pour prédire la dynamique de mise en réserves lors d'une limitation azotée. De même, ce modèle pourrait être utilisé pour le développement et le réglage d'un contrôleur en boucle fermée de l'état physiologique d'une culture de microalgues en conditions de limitation par la source d'azote à partir des bilans gaz.
- Au niveau de la production continue d'hydrogène avec le système de culture bi-étagé, il serait pertinent de réaliser une étude paramétrique à l'aide de l'outil de suivi et contrôle de l'état physiologique de l'étagé 1. Cette étude paramétrique permettrait de cibler des conditions de culture optimales pour la mise en œuvre du système étudié. Les paramètres à considérer dans un premier temps seraient le niveau de réserves et le taux de dilution dans les deux étages ainsi que la stabilité du système dans le temps. De cette manière, des conditions optimales et contrôlées pour la mise en œuvre du système bi-étagé pourront être établis. Ces conditions pourront ainsi être testés dans une période de temps prolongée pour démontrer la viabilité technique d'une production continue et soutenue d' H_2 à partir de la microalgue verte *C. reinhardtii*.

Références

- Abdullah, B., Syed Muhammad, S. A. F., Shokravi, Z., Ismail, S., Kassim, K. A., Mahmood, A. N., & Aziz, M. M. A. (2019). Fourth generation biofuel : A review on risks and mitigation strategies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 37-50. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.018>
- Adesanya, V. O., Davey, M. P., Scott, S. A., & Smith, A. G. (2014). Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions. *Bioresource Technology*, 157, 293-304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.032>
- Adessi, A., & De Philippis, R. (2012). Hydrogen Production : Photofermentation. In P. C. Hallenbeck (Éd.), *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production* (p. 53-75). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1208-3_4
- Adessi, A., & De Philippis, R. (2014). Photobioreactor design and illumination systems for H₂ production with anoxygenic photosynthetic bacteria : A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(7), 3127-3141. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.12.084>
- Aehle, M., Kuprijanov, A., Schaepe, S., Simutis, R., & Lübbert, A. (2011). Simplified off-gas analyses in animal cell cultures for process monitoring and control purposes. *Biotechnology Letters*, 33(11), 2103-2110. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0686-5>
- Antal, T. K. (2018). The Metabolic Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to Depletion of Essential Nutrients : Application for Hydrogen Production. In M. Seibert & G. Torzillo (Éds.), *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences* (Vol. 16, p. 235-264). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781849737128-00235>
- Antal, T. K., Krendeleva, T. E., Laurinavichene, T. V., Makarova, V. V., Ghirardi, M. L., Rubin, A. B., Tsygankov, A. A., & Seibert, M. (2003). The dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1607(2), 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2003.09.008>
- Antal, T. K., Krendeleva, T. E., & Rubin, A. B. (2011). Acclimation of green algae to sulfur deficiency : Underlying mechanisms and application for hydrogen production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2879-6>
- Antal, T. K., Krendeleva, T. E., & Tyystjärvi, E. (2015). Multiple regulatory mechanisms in the chloroplast of green algae : Relation to hydrogen production. *Photosynthesis Research*, 125(3), Article 3. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0157-2>
- Anwar, M., Lou, S., Chen, L., Li, H., & Hu, Z. (2019). Recent advancement and strategy on bio-hydrogen production from photosynthetic microalgae. *Bioresource Technology*, 292, 121972. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121972>

- Artu, A. (2016). *Etude et optimisation de la culture de microalgues en photobioréacteurs solaires* [These de doctorat, Université de Nantes]. <http://www.theses.fr/2016NANT4019>
- Aucoin, H. R., Gardner, J., & Boyle, N. R. (2016). Omics in Chlamydomonas for Biofuel Production. *Sub-Cellular Biochemistry*, 86, 447-469. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6_18
- Badger, M., Andrews, T., Whitney, S., Ludwig, M., Yellowlees, D., Leggat, W., & Price, G. (1998). The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in algae. *Canadian Journal of Botany-revue Canadienne De Botanique - CAN J BOT*, 76, 1052-1071. <https://doi.org/10.1139/cjb-76-6-1052>
- Balat, M. (2008). Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(15), 4013-4029. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.047>
- Banerjee, S., Ray, A., & Das, D. (2021). Optimization of Chlamydomonas reinhardtii cultivation with simultaneous CO₂ sequestration and biofuels production in a biorefinery framework. *Science of The Total Environment*, 762, 143080. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143080>
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2014). *Algae : Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, Second Edition*. CRC Press.
- Batyrova, K. A., Tsygankov, A. A., & Kosourov, S. N. (2012). Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived Chlamydomonas reinhardtii cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(10), 8834-8839. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.068>
- Batyrova, K., & Hallenbeck, P. C. (2017). Sustainability of Biohydrogen Production Using Engineered Algae as a Source. In A. Singh & D. Rathore (Éds.), *Biohydrogen Production : Sustainability of Current Technology and Future Perspective* (p. 163-180). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3577-4_8
- Bayro-Kaiser, V., & Nelson, N. (2017). Microalgal hydrogen production : Prospects of an essential technology for a clean and sustainable energy economy. *Photosynthesis Research*, 133(1-3), 49-62. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0350-6>
- Béchet, Q., Shilton, A., & Guieysse, B. (2013). Modeling the effects of light and temperature on algae growth : State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1648-1663. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014>
- Bekirogullari, M., Figueroa-Torres, G. M., Pittman, J. K., & Theodoropoulos, C. (2020). Models of microalgal cultivation for added-value products—A review. *Biotechnology Advances*, 44, 107609. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107609>
- Benvenuti, G. (2016). *Batch and repeated-batch oil production by microalgae*. <https://research.wur.nl/en/publications/batch-and-repeated-batch-oil-production-by->

microalgae

- Berberoglu, H., Pilon, L., & Melis, A. (2008). Radiation characteristics of *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 and its truncated chlorophyll antenna transformants tla1, tlaX and tla1-CW+. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(22), 6467-6483. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.071>
- Berberoglu, H., Yin, J., & Pilon, L. (2007). Light transfer in bubble sparged photobioreactors for H₂ production and CO₂ mitigation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(13), 2273-2285. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.02.018>
- Bernard, O., & Rémond, B. (2012). Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. *Bioresource Technology*, 123, 520-527. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.022>
- Bharathiraja, B., Sudharsana, T., Bharghavi, A., Jayamuthunagai, J., & Praveenkumar, R. (2016). Biohydrogen and Biogas – An overview on feedstocks and enhancement process. *Fuel*, 185, 810-828. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.030>
- Bhowmik, A., & Pilon, L. (2016). Can spherical eukaryotic microalgae cells be treated as optically homogeneous? *Journal of the Optical Society of America A*, 33(8), Article 8. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.33.001495>
- Bidigare, R. R., Ondrusek, M. E., Morrow, J. H., & Kiefer, D. A. (1990). *In-vivo absorption properties of algal pigments* (R. W. Spinrad, Éd.; p. 290). <https://doi.org/10.1117/12.21451>
- Bölling, C., & Fiehn, O. (2005). Metabolite Profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under Nutrient Deprivation. *Plant Physiology*, 139(4), 1995-2005. <https://doi.org/10.1104/pp.105.071589>
- Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (2013). *Algae for Biofuels and Energy*. Springer New York. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-007-5479-9>
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae—Their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743-756. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
- Borowitzka, M. A., & Vonshak, A. (2017). Scaling up microalgal cultures to commercial scale. *European Journal of Phycology*, 52(4), 407-418. <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365177>
- Bouillaud, D., Drouin, D., Charrier, B., Jacquemmoz, C., Farjon, J., Giraudeau, P., & Gonçalves, O. (2020). Using benchtop NMR spectroscopy as an online non-invasive in vivo lipid sensor for microalgae cultivated in photobioreactors. *Process Biochemistry*, 93, 63-68. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.016>
- Bouillaud, D., Heredia, V., Castaing-Cordier, T., Drouin, D., Charrier, B., Gonçalves, O., Farjon, J., & Giraudeau, P. (2019). Benchtop flow NMR spectroscopy as an online device for the in vivo monitoring of lipid accumulation in microalgae. *Algal Research*,

43, 101624. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101624>

- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 557-577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Brentner, L. B., Peccia, J., & Zimmerman, J. B. (2010). Challenges in Developing Biohydrogen as a Sustainable Energy Source : Implications for a Research Agenda. *Environmental Science & Technology*, *44*(7), 2243-2254. <https://doi.org/10.1021/es9030613>
- Cady, C. W., Crabtree, R. H., & Brudvig, G. W. (2008). Functional Models for the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II. *Coordination chemistry reviews*, *252*(3-4), 444-455. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.06.002>
- Cervený, J., Šetlík, I., Trtílek, M., & Nedbal, L. (2009). Photobioreactor for cultivation and real-time, *in-situ* measurement of O₂ and CO₂ exchange rates, growth dynamics, and of chlorophyll fluorescence emission of photoautotrophic microorganisms. *Engineering in Life Sciences*, *9*(3), 247-253. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800123>
- Chang, C. H., King, P. W., Ghirardi, M. L., & Kim, K. (2007). Atomic Resolution Modeling of the Ferredoxin:[FeFe] Hydrogenase Complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophysical Journal*, *93*(9), 3034-3045. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.108589>
- Chatzitakis, A., Nikolakaki, E., Sotiropoulos, S., & Poulis, I. (2013). Hydrogen production using an algae photoelectrochemical cell. *Applied Catalysis B: Environmental*, *142-143*, 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2013.05.011>
- Chen, C.-Y., Liu, C.-H., Lo, Y.-C., & Chang, J.-S. (2011). Perspectives on cultivation strategies and photobioreactor designs for photo-fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, *102*(18), 8484-8492. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.082>
- Chen, C.-Y., Zhao, X.-Q., Yen, H.-W., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Lee, D.-J., Bai, F.-W., & Chang, J.-S. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, *78*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, *25*(3), 294-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chochois, V. (2009). *Implication des réserves carbonées dans le photoproduction d'hydrogène chez l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii* [These de doctorat, Aix-Marseille Université]. <https://www.theses.fr/2009AIX22074>
- Chochois, V., Constans, L., Dauvillée, D., Beyly, A., Solivérès, M., Ball, S., Peltier, G., & Cournac, L. (2010). Relationships between PSII-independent hydrogen bioproduction and starch metabolism as evidenced from isolation of starch catabolism mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, *35*(19), 10731-10740. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.052>
- Chochois, V., Dauvillée, D., Beyly, A., Tolleter, D., Cuiné, S., Timpano, H., Ball, S., Cournac, L., & Peltier, G. (2009). Hydrogen Production in *Chlamydomonas* : Photosystem II-

- Dependent and -Independent Pathways Differ in Their Requirement for Starch Metabolism. *Plant Physiology*, 151(2), 631-640. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144576>
- Choix, F. J., Bashan, Y., Mendoza, A., & de-Bashan, L. E. (2014). Enhanced activity of ADP glucose pyrophosphorylase and formation of starch induced by *Azospirillum brasilense* in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Biotechnology*, 177, 22-34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.014>
- Chowdhury, H., & Loganathan, B. (2019). Third-generation biofuels from microalgae : A review. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 20, 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.09.003>
- Chu, S., & Majumdar, A. (2012). Opportunities and challenges for a sustainable energy future. *Nature*, 488(7411), Article 7411. <https://doi.org/10.1038/nature11475>
- Cogne, G., Lasseur, Ch., Cornet, J.-F., Dussap, C.-G., & Gros, J.-B. (2001). Growth monitoring of a photosynthetic micro-organism (*Spirulina platensis*) by pressure measurement. *Biotechnology Letters*, 23(16), 1309-1314. <https://doi.org/10.1023/A:1010521406607>
- Cornet, J. F., Dussap, C. G., & 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(7), Article 7. <https://doi.org/10.1002/bit.260400709>
- Cornet, J.-F. (2007). *Procédés Limités par le Transfert de Rayonnement en Milieu Hétérogène* [Habilitation à diriger des recherches, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II]. <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01281239>
- Cornet, J.-F., & Dussap, C.-G. (2009). A simple and reliable formula for assessment of maximum volumetric productivities in photobioreactors. *Biotechnology Progress*, 25(2), Article 2. <https://doi.org/10.1002/btpr.138>
- Cournac, L., Mus, F., Bernard, L., Guedeney, G., Vignais, P., & Peltier, G. (2002). Limiting steps of hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* PCC 6803 as analysed by light-induced gas exchange transients. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11), 1229-1237. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00105-2](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00105-2)
- Cournac, L., Pruvost, J., & Legrand, J. (2012). Production d'hydrogène par les micro-organismes photosynthétiques. *Chimie verte*. <https://doi.org/10.51257/a-v1-bio3352>
- Crofts, A. R., & Wraight, C. A. (1983). The electrochemical domain of photosynthesis. *BBA Reviews On Bioenergetics*, 726(3), 149-185. [https://doi.org/10.1016/0304-4173\(83\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0304-4173(83)90004-6)
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fenvs.2014.00053>
- Dauchet, J. (2012). *Analyse radiative des photobioréacteurs* [These de doctorat, Université de

Clermont Auvergne]. <https://www.theses.fr/2012CLF22304>

- Dauchet, J., Blanco, S., Cornet, J.-F., & Fournier, R. (2015). Calculation of the radiative properties of photosynthetic microorganisms. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, *161*, 60-84. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2015.03.025>
- de Assis, A. J., & Filho, R. M. (2000). Soft sensors development for on-line bioreactor state estimation. *Computers & Chemical Engineering*, *24*(2-7), 1099-1103. [https://doi.org/10.1016/S0098-1354\(00\)00489-0](https://doi.org/10.1016/S0098-1354(00)00489-0)
- Debnath, C., Bandyopadhyay, T. K., Bhunia, B., Mishra, U., Narayanasamy, S., & Muthuraj, M. (2021). Microalgae: Sustainable resource of carbohydrates in third-generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *150*, 111464. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111464>
- Decamp, A. (2020). *Etude des conditions d'accumulation et de production de polysaccharides solubles (ou exopolysaccharides—EPS) chez des microalgues marines cultivées en photobioréacteur* [These de doctorat, Université de Nantes]. <https://www.theses.fr/2020NANT4035>
- de Carvalho Silvello, M. A., Severo Gonçalves, I., Patrícia Held Azambuja, S., Silva Costa, S., Garcia Pereira Silva, P., Oliveira Santos, L., & Goldbeck, R. (2022). Microalgae-based carbohydrates: A green innovative source of bioenergy. *Bioresource Technology*, *344*(Pt B), 126304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126304>
- Dechatiwongse, P., Maitland, G., & Hellgardt, K. (2015). Demonstration of a two-stage aerobic/anaerobic chemostat for the enhanced production of hydrogen and biomass from unicellular nitrogen-fixing cyanobacterium. *Algal Research*, *10*, 189-201. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.004>
- Degrenne, B. (2009). *Production d'hydrogène par Chlamydomonas reinhardtii en photobioréacteur: Analyse des conditions de culture et mise en place d'un protocole autotrophe*. Nantes. <http://www.theses.fr/2009NANT2031>
- Degrenne, B., Pruvost, J., Christophe, G., Cornet, J. F., Cogne, G., & 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*(19), 10741-10749. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.02.067>
- Degrenne, B., Pruvost, J., & 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*(2). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.009>
- Desplats, C., Mus, F., Cuiné, S., Billon, E., Cournac, L., & Peltier, G. (2009). Characterization of Nda2, a plastoquinone-reducing type II NAD(P)H dehydrogenase in *Chlamydomonas chloroplasts*. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(7), 4148-4157. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804546200>

- de Vitry, C., Ouyang, Y., Finazzi, G., Wollman, F.-A., & Kallas, T. (2004). The chloroplast Rieske iron-sulfur protein. At the crossroad of electron transport and signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44621-44627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406955200>
- Dubini, A., & Ghirardi, M. L. (2015). Engineering photosynthetic organisms for the production of biohydrogen. *Photosynthesis Research*, 123(3), 241-253. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9991-x>
- Dubini, A., & Gonzalez-Ballester, D. (2016). Biohydrogen from Microalgae. In F. Bux & Y. Chisti (Éds.), *Algae Biotechnology* (p. 165-193). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9_10
- Dubinsky, Z., & Stambler, N. (2009). Photoacclimation processes in phytoplankton: Mechanisms, consequences, and applications. *Aquatic Microbial Ecology*, 56(2-3), 163-176. <https://doi.org/10.3354/ame01345>
- Dubois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Erbes, D. L., King, D., & Gibbs, M. (1979). Inactivation of Hydrogenase in Cell-free Extracts and Whole Cells of *Chlamydomonas reinhardi* by Oxygen. *Plant Physiology*, 63(6), 1138-1142. <https://doi.org/10.1104/pp.63.6.1138>
- Eriksen, N. T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30(9), 1525-1536. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9740-3>
- Eroglu, E., & Melis, A. (2016). Microalgal hydrogen production research. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(30), 12772-12798. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.115>
- Esquível, M. G., Pinto, T. S., Marín-Navarro, J., & Moreno, J. (2006). Substitution of tyrosine residues at the aromatic cluster around the betaA-betaB loop of rubisco small subunit affects the structural stability of the enzyme and the in vivo degradation under stress conditions. *Biochemistry*, 45(18), 5745-5753. <https://doi.org/10.1021/bi052588y>
- Fakhimi, N., Dubini, A., Tavakoli, O., & González-Ballester, D. (2019). Acetic acid is key for synergetic hydrogen production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures. *Bioresource Technology*, 289, 121648. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121648>
- Fakhimi, N., Gonzalez-Ballester, D., Fernández, E., Galván, A., & Dubini, A. (2020). Algae-Bacteria Consortia as a Strategy to Enhance H₂ Production. *Cells*, 9(6), 1353. <https://doi.org/10.3390/cells9061353>
- Fan, M.-S., Abdullah, A. Z., & Bhatia, S. (2009). Catalytic Technology for Carbon Dioxide Reforming of Methane to Synthesis Gas. *ChemCatChem*, 1(2), 192-208. <https://doi.org/10.1002/cctc.200900025>
- Fedorov, A. S., Kosourov, S., Ghirardi, M. L., & Seibert, M. (2005). Continuous hydrogen

- photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121(1-3), Article 1-3. <https://doi.org/10.1385/ABAB:121:1-3:0403>
- Ferrel Ballestas, F. R., Titica, M., Legrand, J., Pilon, L., & Cogne, G. (2023). Prediction of the radiation characteristics and the light absorption rate of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated under a progressive nitrogen starvation and accumulating carbon reserves. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 309, 108708. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2023.108708>
- Figueroa-Torres, G. M., Pittman, J. K., & Theodoropoulos, C. (2017). Kinetic modelling of starch and lipid formation during mixotrophic, nutrient-limited microalgal growth. *Bioresource Technology*, 241, 868-878. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.177>
- Finazzi, G., Rappaport, F., Furia, A., Fleischmann, M., Rochaix, J.-D., Zito, F., & Forti, G. (2002). Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO Reports*, 3(3), 280-285. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf047>
- Forestier, M., King, P., Zhang, L., Posewitz, M., Schwarzer, S., Happe, T., Ghirardi, M. L., & Seibert, M. (2003). Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. *European Journal of Biochemistry*, 270(13), 2750-2758. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03656>
- Fouchard, S., Pruvost, J., Degrenne, B., & Legrand, J. (2008). Investigation of H₂ production using the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* in a fully controlled photobioreactor fitted with on-line gas analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(13), 3302-3310. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.03.067>
- Franck, F., Ghysels, B., & Godaux, D. (2017). Hydrogen Photoproduction by Oxygenic Photosynthetic Microorganisms. In F. D. Harzevili & S. Hiligsmann (Éds.), *Microbial Fuels* (1^{re} éd., p. 315-350). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351246101-9>
- Frey, M. (2002). Hydrogenases : Hydrogen-activating enzymes. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 3(2-3), 153-160. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020301\)3:2/3<153::AID-CBIC153>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020301)3:2/3<153::AID-CBIC153>3.0.CO;2-B)
- Fu, W., Nelson, D. R., Mystikou, A., Daakour, S., & Salehi-Ashtiani, K. (2019). Advances in microalgal research and engineering development. *Current Opinion in Biotechnology*, 59, 157-164. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.05.013>
- Fuentes, J. L., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-Del-Valle, M., & Vílchez, C. (2016). Impact of Microalgae-Bacteria Interactions on the Production of Algal Biomass and Associated Compounds. *Marine Drugs*, 14(5), 100. <https://doi.org/10.3390/md14050100>
- Gaffron, H., & Rubin, J. (1942). Fermentative and Photochemical Production of Hydrogen in Algae. *The Journal of General Physiology*, 26(2), 219. <https://doi.org/10.1085/jgp.26.2.219>
- Gallaher, S. D., Fitz-Gibbon, S. T., Glaesener, A. G., Pellegrini, M., & Merchant, S. S. (2015).

- Chlamydomonas Genome Resource for Laboratory Strains Reveals a Mosaic of Sequence Variation, Identifies True Strain Histories, and Enables Strain-Specific Studies. *The Plant Cell*, 27(9), 2335-2352. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00508>
- Gasparatos, A., Stromberg, P., & Takeuchi, K. (2013). Sustainability impacts of first-generation biofuels. *Animal Frontiers*, 3(2), 12-26. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0011>
- Gfeller, R. P., & Gibbs, M. (1984). Fermentative Metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii* : I. Analysis of Fermentative Products from Starch in Dark and Light. *Plant Physiology*, 75(1), 212-218.
- Ghirardi, M. L., Zhang, L., Lee, J. W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E., & Melis, A. (2000). Microalgae: A green source of renewable H₂. *Trends in Biotechnology*, 18(12), 506-511. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(00\)01511-0](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(00)01511-0)
- Gifuni, I., Olivieri, G., Pollio, A., Franco, T. T., & Marzocchella, A. (2017). Autotrophic starch production by *Chlamydomonas* species. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 105-114. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0932-2>
- González-Fernández, C., & Ballesteros, M. (2012). Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1655-1661. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.07.003>
- Grossman, A. R., Croft, M., Gladyshev, V. N., Merchant, S. S., Posewitz, M. C., Prochnik, S., & Spalding, M. H. (2007). Novel metabolism in *Chlamydomonas* through the lens of genomics. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(2), 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.01.012>
- Groth, T., & Bentzen, J. (2013). Prices of agricultural commodities, biofuels and fossil fuels in long-run relationships : A comparative study for the USA and Europe. *Food Economics*, 9(sup5), 27-36. <https://doi.org/10.1080/2164828X.2013.859577>
- Harris, E. H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 363-406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>
- Harris, E. H., Stern, D. B., & Witman, G. B. (Éds.). (2009). The *Chlamydomonas* sourcebook. In *The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition)* (p. iii). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00059-9>
- Havlik, I., Scheper, T., & Reardon, K. F. (2016). Monitoring of Microalgal Processes. In C. Posten & S. Feng Chen (Éds.), *Microalgae Biotechnology* (p. 89-142). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2015_328
- He, J., Xi, L., Sun, X., Ge, B., Liu, D., Han, Z., Pu, X., & Huang, F. (2018). Enhanced hydrogen production through co-cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503 and a facultative autotrophic sulfide-oxidizing bacterium under sulfurated conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(32), 15005-15013. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.06.081>

- Hemschemeier, A., Fouchar, S., Cournac, L., Peltier, G., & Happe, T. (2008). Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* : An elaborate interplay of electron sources and sinks. *Planta*, 227(2), 397-407. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0626-8>
- Heng, R.-L., Sy, K. C., & Pilon, L. (2015). Absorption and scattering by bispheres, quadspheres, and circular rings of spheres and their equivalent coated spheres. *JOSA A*, 32(1), 46-60. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.32.000046>
- Hermans, C., Vuylsteke, M., Coppens, F., Cristescu, S. M., Harren, F. J. M., Inzé, D., & Verbruggen, N. (2010). Systems analysis of the responses to long-term magnesium deficiency and restoration in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 187(1), 132-144. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03257.x>
- Ho, S.-H., Li, P.-J., Liu, C.-C., & Chang, J.-S. (2013). Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 145, 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.119>
- Hoeniges, J., Kandilian, R., Zhang, C., Pruvost, J., Legrand, J., Grizeau, D., & Pilon, L. (2020). Effect of colony formation on light absorption by *Botryococcus braunii*. *Algal Research*, 50, 101985. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101985>
- Hom, E. F. Y., Aiyar, P., Schaeme, D., Mittag, M., & Sasso, S. (2015). A Chemical Perspective on Microalgal–Microbial Interactions. *Trends in Plant Science*, 20(11), 689-693. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.09.004>
- Hu, Q. (2013). Environmental Effects on Cell Composition. In *Handbook of Microalgal Culture* (p. 114-122). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch7>
- Hutner, S. H., Provasoli, L., Schatz, A., & Haskins, C. P. (1950). Some Approaches to the Study of the Role of Metals in the Metabolism of Microorganisms. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 94(2), 152-170.
- IAE International Energy Agency. (2019, juin 1). *The Future of Hydrogen – Analysis*. <https://www.iea.org/reports/the-future-of-hydrogen>
- IEA International Energy Agency. (2015a, janvier 1). *Technology roadmap : Nuclear energy*. <https://www.iea.org/reports/technology-roadmap-nuclear-energy-2015>
- IEA International Energy Agency. (2015b, juin 1). *World Energy Outlook Special Report : Energy and climate change*. <https://www.iea.org/reports/energy-and-climate-change>
- IEA International Energy Agency. (2016). *World Energy Outlook Special Report : Energy and air pollution*. <https://www.iea.org/reports/world-energy-outlook-2016>
- IEA International Energy Agency. (2020, août 1). *Key world energy statistics*. <https://www.iea.org/reports/key-world-energy-statistics-2020>
- Ifrim, G., Titica, M., Cogne, G., Boillereaux, L., Legrand, J., & Caraman, S. (2014). Dynamic pH Model for Autotrophic Growth of Microalgae in Photobioreactor : A Tool for

Monitoring and Control Purposes. *AIChE Journal*, 60.
<https://doi.org/10.1002/aic.14290>

- Jans, F., Mignolet, E., Houyoux, P.-A., Cardol, P., Ghysels, B., Cui n , S., Cournac, L., Peltier, G., Remacle, C., & Franck, F. (2008). A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20546-20551. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806896105>
- Jeswani, H. K., Chilvers, A., & Azapagic, A. (2020). Environmental sustainability of biofuels : A review. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 476(2243), 20200351. <https://doi.org/10.1098/rspa.2020.0351>
- Jin, H., Xu, Y., Lin, R., & Han, W. (2008). A proposal for a novel multi-functional energy system for the production of hydrogen and power. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(1), 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.09.014>
- Johnson, X., & Alric, J. (2013). Central Carbon Metabolism and Electron Transport in *Chlamydomonas reinhardtii* : Metabolic Constraints for Carbon Partitioning between Oil and Starch. *Eukaryotic Cell*, 12(6), 776-793. <https://doi.org/10.1128/EC.00318-12>
- Jonasz, M., & Fournier, G. R. (2007). Light Scattering by Particles in Water : Theoretical and Experimental Foundations. *Light Scattering by Particles in Water: Theoretical and Experimental Foundations*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-388751-1.X5000-5>
- Jouhet, J., Lupette, J., Clerc, O., Magneschi, L., Bedhomme, M., Collin, S., Roy, S., Mar chal, E., & R beill , F. (2017). LC-MS/MS versus TLC plus GC methods : Consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation. *PLOS ONE*, 12(8), e0182423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182423>
- Juergens, M. T., Deshpande, R. R., Lucker, B. F., Park, J.-J., Wang, H., Gargouri, M., Holguin, F. O., Disbrow, B., Schaub, T., Skepper, J. N., Kramer, D. M., Gang, D. R., Hicks, L. M., & Shachar-Hill, Y. (2015). The regulation of photosynthetic structure and function during nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 167(2), Article 2. <https://doi.org/10.1104/pp.114.250530>
- Kalam Azad, A., & Masud Kamal Khan, M. (2021). Bioenergy Resources and Technologies. In *Bioenergy Resources and Technologies*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822525-7.09991-1>
- Kandilian, R., Heng, R.-L., & Pilon, L. (2015). Absorption and scattering by fractal aggregates and by their equivalent coated spheres. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 151, 310-326. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2014.10.018>
- Kandilian, R., Lee, E., & Pilon, L. (2013). Radiation and optical properties of *Nannochloropsis oculata* grown under different irradiances and spectra. *Bioresource Technology*, 137, 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.058>
- Kandilian, R., Pruvost, J., Artu, A., Lemasson, C., Legrand, J., & Pilon, L. (2016). Comparison

- of experimentally and theoretically determined radiation characteristics of photosynthetic microorganisms. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 175, 30-45. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2016.01.031>
- Kandilian, R., Pruvost, J., Legrand, J., & Pilon, L. (2014). Influence of light absorption rate by *Nannochloropsis oculata* on triglyceride production during nitrogen starvation. *Bioresource Technology*, 163, 308-319. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.045>
- Kandilian, R., Soulies, A., Pruvost, J., Rousseau, B., Legrand, J., & Pilon, L. (2016). Simple method for measuring the spectral absorption cross-section of microalgae. *Chemical Engineering Science*, 146, 357-368. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.02.039>
- Kandilian, R., Taleb, A., Heredia, V., Cogne, G., & 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, 101442. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101442>
- Kandilian, R., Tsao, T.-C., & Pilon, L. (2014). Control of incident irradiance on a batch operated flat-plate photobioreactor. *Chemical Engineering Science*, 119, 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.07.056>
- Kaushik, A., & Sharma, M. (2017). Exploiting Biohydrogen Pathways of Cyanobacteria and Green Algae : An Industrial Production Approach. In A. Singh & D. Rathore (Éds.), *Biohydrogen Production : Sustainability of Current Technology and Future Perspective* (p. 97-113). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3577-4_5
- Kazbar, A., Cogne, G., Urbain, B., Marec, H., Le-Gouic, B., Tallec, J., Takache, H., Ismail, A., & Pruvost, J. (2019). Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Research*, 39, 101432. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101432>
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae : Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Khetkorn, W., Rastogi, R. P., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., Madamwar, D., Pandey, A., & Larroche, C. (2017). Microalgal hydrogen production – A review. *Bioresource Technology*, 243, 1194-1206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.085>
- Khosravitar, F. (2020). Microalgal biohydrogen photoproduction : Scaling up challenges and the ways forward. *Journal of Applied Phycology*, 32(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01911-9>
- Kim, D.-H., & Kim, M.-S. (2011). Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, 102(18), 8423-8431. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.113>
- King, P. W., Posewitz, M. C., Ghirardi, M. L., & Seibert, M. (2006). Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system. *Journal of*

- Bacteriology*, 188(6), 2163-2172. <https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2163-2172.2006>
- Klein, U., & Betz, A. (1978). Fermentative Metabolism of Hydrogen-evolving *Chlamydomonas moewusii*. *Plant Physiology*, 61(6), 953-956. <https://doi.org/10.1104/pp.61.6.953>
- Kliphuis, A. M. J., Martens, D. E., Janssen, M., & Wijffels, R. H. (2011). Effect of O₂:CO₂ ratio on the primary metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10), 2390-2402. <https://doi.org/10.1002/bit.23194>
- Komine, Y., Eggink, L. L., Park, H., & Hooper, J. K. (2000). Vacuolar granules in *Chlamydomonas reinhardtii*: Polyphosphate and a 70-kDa polypeptide as major components. *Planta*, 210(6), 897-905. <https://doi.org/10.1007/s004250050695>
- Kosourov, S., Jokel, M., Aro, E.-M., & Allahverdiyeva, Y. (2018). A new approach for sustained and efficient H₂ photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Energy & Environmental Science*, 11(6), 1431-1436. <https://doi.org/10.1039/C8EE00054A>
- Kosourov, S., Murukesan, G., Seibert, M., & Allahverdiyeva, Y. (2017). Evaluation of light energy to H₂ energy conversion efficiency in thin films of cyanobacteria and green alga under photoautotrophic conditions. *Algal Research*, 28, 253-263. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.027>
- Kosourov, S. N., Ghirardi, M. L., & Seibert, M. (2011). A truncated antenna mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* can produce more hydrogen than the parental strain. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(3), 2044-2048. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.10.041>
- Kosourov, S. N., He, M., Allahverdiyeva, Y., & Seibert, M. (2018). Chapter 15. Immobilization of Microalgae as a Tool for Efficient Light Utilization in H₂ Production and Other Biotechnology Applications. In M. Seibert & G. Torzillo (Éds.), *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences* (p. 355-384). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781849737128-00355>
- Kosourov, S. N., & Seibert, M. (2009). Hydrogen photoproduction by nutrient-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized within thin alginate films under aerobic and anaerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 50-58. <https://doi.org/10.1002/bit.22050>
- Krishnan Unni, J., Govindappa, P., & Das, L. M. (2017). Development of hydrogen fuelled transport engine and field tests on vehicles. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(1), 643-651. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.107>
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R., Hendriks, I. E., Ramajo, L., Singh, G. S., Duarte, C. M., & Gattuso, J.-P. (2013). Impacts of ocean acidification on marine organisms: Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global Change Biology*, 19(6), 1884-1896. <https://doi.org/10.1111/gcb.12179>
- Kruse, O., Rupprecht, J., Bader, K.-P., Thomas-Hall, S., Schenk, P. M., Finazzi, G., & Hankamer, B. (2005). Improved Photobiological H₂ Production in Engineered Green

- Algal Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 34170-34177. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503840200>
- Kufryk, G. (2013). Advances in Utilizing Cyanobacteria for Hydrogen Production. *Advances in Microbiology*, 3(6), Article 6. <https://doi.org/10.4236/aim.2013.36A008>
- Lam, M. K., & Lee, K. T. (2011). Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME) : Win-win strategies toward better environmental protection. *Biotechnology Advances*, 29(1), 124-141. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.10.001>
- Lam, M. K., Lee, K. T., & Mohamed, A. R. (2010). Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnology Advances*, 28(4), 500-518. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.03.002>
- Lam, M. K., Loy, A. C. M., Yusup, S., & Lee, K. T. (2019). Biohydrogen Production From Algae. In *Biohydrogen* (p. 219-245). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64203-5.00009-5>
- Laurinavichene, T. V., Fedorov, A. S., Ghirardi, M. L., Seibert, M., & Tsygankov, A. A. (2006). Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(5), 659-667. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.05.002>
- Le Gouic, B. (2013). *Analyse et optimisation de l'apport de carbone en photobioréacteur* [These de doctorat, Ecole Centrale de Nantes]. <https://www.theses.fr/2013ECDN0020>
- Lee, E., Heng, R.-L., & Pilon, L. (2013). Spectral optical properties of selected photosynthetic microalgae producing biofuels. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 114, 122-135. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2012.08.012>
- Lee, E., & Pilon, L. (2013). Absorption and scattering by long and randomly oriented linear chains of spheres. *Journal of the Optical Society of America A*, 30(9), 1892. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.30.001892>
- Lee, E., Pruvost, J., He, X., Munipalli, R., & Pilon, L. (2014). Design tool and guidelines for outdoor photobioreactors. *Chemical Engineering Science*, 106, 18-29. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.11.014>
- Lee, J. W., & Greenbaum, E. (2003). A new oxygen sensitivity and its potential application in photosynthetic H₂ production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105-108, 303-313. <https://doi.org/10.1385/abab:106:1-3:303>
- Lee, T.-H., Chang, J.-S., & Wang, H.-Y. (2013). Current developments in high-throughput analysis for microalgae cellular contents. *Biotechnology Journal*, 8(11), 1301-1314. <https://doi.org/10.1002/biot.201200391>
- Legrand, J. (2016). *Photobioreaction Engineering: Vol. First*. Academic Press Inc.

- Leite, G. B., & Hallenbeck, P. C. (2014). Chapter 22 - Engineered Cyanobacteria : Research and Application in Bioenergy. In V. K. Gupta, M. G. Tuohy, C. P. Kubicek, J. Saddler, & F. Xu (Éds.), *Bioenergy Research: Advances and Applications* (p. 389-406). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00022-X>
- Lemasson, camille. (2015). *Contribution à l'étude de la production d'hydrogène par Chlamydomonas reinhardtii : Vers la mise en place d'une production continue en photobioréacteur bi-étagé* [These de doctorat, Université de Nantes].
- Li, S., Li, F., Zhu, X., Liao, Q., Chang, J.-S., & Ho, S.-H. (2022). Biohydrogen production from microalgae for environmental sustainability. *Chemosphere*, 291, 132717. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132717>
- Lichtl, R. R., Bazin, M. J., & Hall, D. O. (1997). The biotechnology of hydrogen production by Nostoc flagelliforme grown under chemostat conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(6), 701-707. <https://doi.org/10.1007/s002530050998>
- Lieutaud, C., Assaf, A., Gonçalves, O., Wielgosz-Collin, G., & Thouand, G. (2019). Fast non-invasive monitoring of microalgal physiological stage in photobioreactors through Raman spectroscopy. *Algal Research*, 42, 101595. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101595>
- Lira-Parada, P. A., Tuveri, A., Seibold, G. M., & Bar, N. (2021). Comparison of noninvasive, in-situ and external monitoring of microbial growth in fed-batch cultivations in Corynebacterium glutamicum. *Biochemical Engineering Journal*, 170, 107989. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.107989>
- Long, H., King, P. W., Ghirardi, M. L., & Kim, K. (2009). Hydrogenase/Ferredoxin Charge-Transfer Complexes : Effect of Hydrogenase Mutations on the Complex Association. *The Journal of Physical Chemistry A*, 113(16), 4060-4067. <https://doi.org/10.1021/jp810409z>
- Longworth, J., Noirel, J., Pandhal, J., Wright, P. C., & Vaidyanathan, S. (2012). HILIC- and SCX-based quantitative proteomics of Chlamydomonas reinhardtii during nitrogen starvation induced lipid and carbohydrate accumulation. *Journal of Proteome Research*, 11(12), 5959-5971. <https://doi.org/10.1021/pr300692t>
- Lu, Y., & Koo, J. (2019). O₂ sensitivity and H₂ production activity of hydrogenases—A review. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(11), 3124-3135. <https://doi.org/10.1002/bit.27136>
- Lubitz, W., Ogata, H., Rüdiger, O., & Reijerse, E. (2014). Hydrogenases. *Chemical Reviews*, 114(8), 4081-4148. <https://doi.org/10.1021/cr4005814>
- Ludwig, M., Schulz-Friedrich, R., & Appel, J. (2006). Occurrence of hydrogenases in cyanobacteria and anoxygenic photosynthetic bacteria: Implications for the phylogenetic origin of cyanobacterial and algal hydrogenases. *Journal of Molecular Evolution*, 63(6), 758-768. <https://doi.org/10.1007/s00239-006-0001-6>
- Ma, W., Chen, M., Wang, L., Wei, L., & Wang, Q. (2011). Treatment with NaHSO₃ greatly

- enhances photobiological H₂ production in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology*, 102(18), 8635-8638. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.052>
- Maeda, Y., Yoshino, T., Matsunaga, T., Matsumoto, M., & Tanaka, T. (2018). Marine microalgae for production of biofuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.018>
- Mahapatra, S., Kumar, D., Singh, B., & Sachan, P. K. (2021). Biofuels and their sources of production : A review on cleaner sustainable alternative against conventional fuel, in the framework of the food and energy nexus. *Energy Nexus*, 4, 100036. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100036>
- Mahidhara, G., Burrow, H., Sasikala, Ch., & Ramana, Ch. V. (2019). Biological hydrogen production : Molecular and electrolytic perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(8), 116. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2692-z>
- Malapascua, J., Jerez, C., Sergejevová, M., Figueroa, F., & Masojídek, J. (2014). Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures : Application of chlorophyll fluorescence techniques. *Aquatic Biology*, 22, 123-140. <https://doi.org/10.3354/ab00597>
- Markou, G., Angelidaki, I., & Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates : An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3), 631-645. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>
- Marousis, S. n., & Saravacos, G. d. (1990). Density and Porosity in Drying Starch Materials. *Journal of Food Science*, 55(5), 1367-1372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb03939.x>
- Márquez-Reyes, L. A., Sánchez-Saavedra, M. del P., & Valdez-Vazquez, I. (2015). Improvement of hydrogen production by reduction of the photosynthetic oxygen in microalgae cultures of *Chlamydomonas gloeopara* and *Scenedesmus obliquus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(23), 7291-7300. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.060>
- Martzolff, A. (2013). *Analyse systémique du métabolisme carboné et énergétique de Chlamydomonas reinhardtii* [These de doctorat, Université de Nantes]. <http://www.theses.fr/2013NANT2009>
- Masojídek, J., Gómez-Serrano, C., Ranglová, K., Cicchi, B., Encinas Bogeat, Á., Câmara Manoel, J. A., Sanches Zurano, A., Silva Benavides, A. M., Barceló-Villalobos, M., Robles Carnero, V. A., Ördög, V., Gómez Pinchetti, J. L., Vörös, L., Arbib, Z., Rogalla, F., Torzillo, G., Lopez Figueroa, F., & Acién-Fernández, F. G. (2022). Photosynthesis Monitoring in Microalgae Cultures Grown on Municipal Wastewater as a Nutrient Source in Large-Scale Outdoor Bioreactors. *Biology*, 11(10), 1380. <https://doi.org/10.3390/biology11101380>
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. In A.

- Richmond & Q. Hu (Éds.), *Handbook of Microalgal Culture* (p. 21-36). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>
- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M. L., & Seibert, M. (2000). Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, *122*(1), 127-136. <https://doi.org/10.1104/pp.122.1.127>
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L.-H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., ... Grossman, A. R. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5848), 245-250. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
- Miller, R., Wu, G., Deshpande, R. R., Vieler, A., Gärtner, K., Li, X., Moellering, E. R., Zäuner, S., Cornish, A. J., Liu, B., Bullard, B., Sears, B. B., Kuo, M.-H., Hegg, E. L., Shachar-Hill, Y., Shiu, S.-H., & Benning, C. (2010). Changes in Transcript Abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following Nitrogen Deprivation Predict Diversion of Metabolism. *Plant Physiology*, *154*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1104/pp.110.165159>
- Ministère de la transition écologique et solidaire. (2015). *Stratégie Nationale Bas-Carbone (SNBC)*. <https://www.ecologie.gouv.fr/strategie-nationale-bas-carbone-snbc>
- Ministère de l'économie, des finances et de la relance. (2020). *Stratégie nationale pour le développement de l'hydrogène décarboné en France*. <https://www.entreprises.gouv.fr/fr/strategies-d-acceleration/strategie-nationale-pour-developpement-de-l-hydrogene-decarbone-france>
- Mishchenko, M. I., Travis, L. D., & Lacis, A. A. (2002). *Scattering, Absorption, and Emission of Light by Small Particles* (Vol. 4). Cambridge university press.
- Mizuno, Y., Sato, A., Watanabe, K., Hirata, A., Takeshita, T., Ota, S., Sato, N., Zachleder, V., Tsuzuki, M., & Kawano, S. (2013). Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresource Technology*, *129*, 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.030>
- Mona, S., Kumar, S. S., Kumar, V., Parveen, K., Saini, N., Deepak, B., & Pugazhendhi, A. (2020). Green technology for sustainable biohydrogen production (waste to energy) : A review. *Science of The Total Environment*, *728*, 138481. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138481>
- Morales-Ibarria, M., Ruiz-Ruiz, P., Estrada-Graf, A. A., Razo-Flores, E., Rincón-Pérez, J., & Celis, L. B. (2022). Biohydrogen from microalgae. In *3rd Generation Biofuels* (p. 505-545). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90971-6.00037-1>
- Moreno-Benito, M., Agnolucci, P., & Papageorgiou, L. G. (2017). Towards a sustainable hydrogen economy: Optimisation-based framework for hydrogen infrastructure development. *Computers & Chemical Engineering*, *102*, 110-127.

<https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2016.08.005>

- Moshood, T. D., Nawanir, G., & Mahmud, F. (2021). Microalgae biofuels production: A systematic review on socioeconomic prospects of microalgae biofuels and policy implications. *Environmental Challenges*, 5, 100207. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100207>
- Mowry, C. D., Jarek, R. L., Román-Kustas, J., Telles, A. C., & Pimentel, A. S. (2019). Gas Analysis by Mass Spectrometry. In *Materials Characterization* (Vol. 10, p. 143-152). ASM International. <https://doi.org/10.31399/asm.hb.v10.a0006663>
- Mulder, D. W., Boyd, E. S., Sarma, R., Lange, R. K., Endrizzi, J. A., Broderick, J. B., & Peters, J. W. (2010). Stepwise [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of HydA(DeltaEFG). *Nature*, 465(7295), 248-251. <https://doi.org/10.1038/nature08993>
- Mullineaux, C. W. (2014). Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(4), 503-511. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.11.017>
- Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K.-I., Endo, T., Tasaka, M., & Shikanai, T. (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature*, 429(6991), Article 6991. <https://doi.org/10.1038/nature02598>
- Nagappan, S., Devendran, S., Tsai, P.-C., Dahms, H.-U., & Ponnusamy, V. K. (2019). Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production. *Fuel*, 252, 339-349. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.138>
- Nagarajan, D., Lee, D.-J., Kondo, A., & Chang, J.-S. (2017). Recent insights into biohydrogen production by microalgae – From biophotolysis to dark fermentation. *Bioresource Technology*, 227, 373-387. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.104>
- Nghiem-Xuan, R. (2019). *Optimisation de la culture d'Haslea ostrearia en photobioréacteur* [These de doctorat, Université de Nantes]. <https://www.theses.fr/2019NANT4015>
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52-68. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>
- Noth, J., Krawietz, D., Hemschemeier, A., & Happe, T. (2013). Pyruvate:Ferredoxin Oxidoreductase Is Coupled to Light-independent Hydrogen Production in *Chlamydomonas reinhardtii**. *Journal of Biological Chemistry*, 288(6), 4368-4377. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.429985>
- Oey, M., Ross, I. L., Stephens, E., Steinbeck, J., Wolf, J., Radzun, K. A., Kügler, J., Ringsmuth, A. K., Kruse, O., & Hankamer, B. (2013). RNAi Knock-Down of LHCBM1, 2 and 3 Increases Photosynthetic H₂ Production Efficiency of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLOS ONE*, 8(4), e61375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061375>
- Oey, M., Sawyer, A. L., Ross, I. L., & Hankamer, B. (2016). Challenges and opportunities for hydrogen production from microalgae. *Plant Biotechnology Journal*, 14(7), 1487-1499.

<https://doi.org/10.1111/pbi.12516>

- Oncel, S. S. (2013). Microalgae for a macroenergy world. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26, 241-264. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.059>
- O-Thong, S., Hniman, A., Prasertsan, P., & Imai, T. (2011). Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(5), 3409-3416. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.12.053>
- Paramesh, K., & Chandrasekhar, T. (2020). Improvement of photobiological hydrogen production in *Chlorococcum minutum* using various oxygen scavengers. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(13), 7641-7646. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.216>
- Park, J.-J., Wang, H., Gargouri, M., Deshpande, R. R., Skepper, J. N., Holguin, F. O., Juergens, M. T., Shachar-Hill, Y., Hicks, L. M., & Gang, D. R. (2015). The response of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation: A systems biology analysis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 81(4), Article 4. <https://doi.org/10.1111/tpj.12747>
- Peden, E. A., Boehm, M., Mulder, D. W., Davis, R., Old, W. M., King, P. W., Ghirardi, M. L., & Dubini, A. (2013). Identification of Global Ferredoxin Interaction Networks in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(49), 35192-35209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.483727>
- Pilon, L., Berberoğlu, H., & Kandilian, R. (2011). Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 112(17), Article 17. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2011.07.004>
- Pilon, L., & Kandilian, R. (2016). Interaction Between Light and Photosynthetic Microorganisms. In *Advances in Chemical Engineering* (Vol. 48, p. 107-149). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ache.2015.12.002>
- Pinto, T. S., Malcata, F. X., Arrabaça, J. D., Silva, J. M., Spreitzer, R. J., & Esquivel, M. G. (2013). Rubisco mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* enhance photosynthetic hydrogen production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(12), 5635-5643. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4920-z>
- Plouviez, M., Shilton, A., Packer, M. A., & Guieysse, B. (2017). N₂O emissions during microalgae outdoor cultivation in 50L column photobioreactors. *Algal Research*, 26, 348-353. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.08.008>
- Posewitz, M. C., Smolinski, S. L., Kanakagiri, S., Melis, A., Seibert, M., & Ghirardi, M. L. (2004). Hydrogen Photoproduction Is Attenuated by Disruption of an Isoamylase Gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 16(8), 2151-2163. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.021972>
- Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae.

- Engineering in Life Sciences*, 9(3), 165-177. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900003>
- Posten, C., & Walter, C. (Éds.). (2012). *Microalgal biotechnology : Integration and economy*. Walter de Gruyter.
- Pottier, L., Pruvost, J., Deremetz, J., Cornet, J.-F., Legrand, J., & Dussap, C. G. (2005). A fully predictive model for one-dimensional light attenuation by *Chlamydomonas reinhardtii* in a torus photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(5), Article 5. <https://doi.org/10.1002/bit.20475>
- Pruvost, J., Cornet, J. F., Goetz, V., & Legrand, J. (2011). Modeling dynamic functioning of rectangular photobioreactors in solar conditions. *AIChE Journal*, 57(7), 1947-1960. <https://doi.org/10.1002/aic.12389>
- Pruvost, J., Cornet, J. F., Le Borgne, F., Goetz, V., & Legrand, J. (2015). Theoretical investigation of microalgae culture in the light changing conditions of solar photobioreactor production and comparison with cyanobacteria. *Algal Research*, 10, 87-99. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.005>
- Pruvost, J., & Cornet, J.-F. (2012). Knowledge models for the engineering and optimization of photobioreactors. In *Microalgal Biotechnology : Potential and Production* (p. 181-224). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110225020.181>
- Pruvost, J., Le Borgne, F., Artu, A., Cornet, J.-F., & Legrand, J. (2016). Chapter Five—Industrial Photobioreactors and Scale-Up Concepts. In J. Legrand (Éd.), *Advances in Chemical Engineering* (Vol. 48, p. 257-310). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ache.2015.11.002>
- Pruvost, J., Le Borgne, F., Artu, A., & Legrand, J. (2017). Development of a thin-film solar photobioreactor with high biomass volumetric productivity (AlgoFilm©) based on process intensification principles. *Algal Research*, 21, 120-137. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.012>
- Pruvost, J., Pottier, L., & Legrand, J. (2006). Numerical investigation of hydrodynamic and mixing conditions in a torus photobioreactor. *Chemical Engineering Science*, 61(14), 4476-4489. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.02.027>
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., & Legrand, J. (2009). Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*, 100(23), 5988-5995. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.004>
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635-648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Ramachandran, R., & Menon, R. K. (1998). An overview of industrial uses of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 23(7), 593-598. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(97\)00112-2](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(97)00112-2)
- Ran, W., Wang, H., Liu, Y., Qi, M., Xiang, Q., Yao, C., Zhang, Y., & Lan, X. (2019). Storage

- of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. *Bioresource Technology*, 291, 121894. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121894>
- Ras, M., Steyer, J.-P., & Bernard, O. (2013). Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(2), 153-164. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>
- Rashid, N., Rehman, M. S. U., Memon, S., Ur Rahman, Z., Lee, K., & Han, J.-I. (2013). Current status, barriers and developments in biohydrogen production by microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 22, 571-579. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.01.051>
- Raso, S., van Genugten, B., Vermuë, M., & Wijffels, R. H. (2012). Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. At low light intensity. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 863-871. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9706-z>
- Renaud, S. M., Thinh, L.-V., Lambrinidis, G., & Parry, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211(1), 195-214. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00875-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00875-4)
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents. *Photosynthesis Research*, 89(1), 27-41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>
- Roessler, P. G., & Lien, S. (1984). Activation and De Novo Synthesis of Hydrogenase in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*, 76(4), 1086-1089.
- Rolland, N., Atteia, A., Decottignies, P., Garin, J., Hippler, M., Kreimer, G., Lemaire, S. D., Mittag, M., & Wagner, V. (2009). *Chlamydomonas* proteomics. *Current Opinion in Microbiology*, 12(3), 285-291. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.04.001>
- Rühle, T., Hemschemeier, A., Melis, A., & Happe, T. (2008). A novel screening protocol for the isolation of hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* strains. *BMC Plant Biology*, 8, 107. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-107>
- Rumin, J., Gonçalves de Oliveira Junior, R., Bérard, J.-B., & Picot, L. (2021). Improving Microalgae Research and Marketing in the European Atlantic Area: Analysis of Major Gaps and Barriers Limiting Sector Development. *Marine Drugs*, 19(6), 319. <https://doi.org/10.3390/md19060319>
- Sáenz, M. E., Bišová, K., Touloupakis, E., Faraloni, C., Di Marzio, W. D., & Torzillo, G. (2015). Evidences of oxidative stress during hydrogen photoproduction in sulfur-deprived cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(33), 10410-10417. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.06.124>
- Sağır, E., & Hallenbeck, P. C. (2019). Photofermentative Hydrogen Production. In *Biohydrogen* (p. 141-157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64203-5.00006-X>
- Sajjadi, B., Chen, W.-Y., Raman, Abdul. Aziz. A., & Ibrahim, S. (2018). Microalgae lipid and

- biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 200-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>
- Sakurai, H., Masukawa, H., Kitashima, M., & Inoue, K. (2013). Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its practical application. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 17, 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2013.05.001>
- Salomé, P. A., & Merchant, S. S. (2019). A Series of Fortunate Events: Introducing Chlamydomonas as a Reference Organism. *The Plant Cell*, 31(8), 1682-1707. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00952>
- Samhat, K. (2023). *Contribution à l'optimisation de la production d'astaxanthine à partir de la microalgue Haematococcus pluvialis* [These de doctorat, Nantes Université]. <https://www.theses.fr/s221714>
- Schaeffer, M., Hare, W., Rahmstorf, S., & Vermeer, M. (2012). Long-term sea-level rise implied by 1.5 °C and 2 °C warming levels. *Nature Climate Change*, 2(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nclimate1584>
- Schipper, K., Muraikhi, M. A., Alghasal, G. S. H. S., Saadaoui, I., Bounnit, T., Rasheed, R., Dalgamouni, T., Jabri, H. M. S. J. A., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2019). Potential of novel desert microalgae and cyanobacteria for commercial applications and CO2 sequestration. *Journal of Applied Phycology*, 31(4), 2231-2243. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01763-3>
- Schmollinger, S., Mühlhaus, T., Boyle, N. R., Blaby, I. K., Casero, D., Mettler, T., Moseley, J. L., Kropat, J., Sommer, F., Strenkert, D., Hemme, D., Pellegrini, M., Grossman, A. R., Stitt, M., Schroda, M., & Merchant, S. S. (2014). Nitrogen-Sparing Mechanisms in Chlamydomonas Affect the Transcriptome, the Proteome, and Photosynthetic Metabolism. *The Plant Cell*, 26(4). <https://doi.org/10.1105/tpc.113.122523>
- Scognamiglio, V., Giardi, M. T., Zappi, D., Touloupakis, E., & Antonacci, A. (2021). Photoautotrophs-Bacteria Co-Cultures: Advances, Challenges and Applications. *Materials (Basel, Switzerland)*, 14(11), 3027. <https://doi.org/10.3390/ma14113027>
- Scoma, A., Krawietz, D., Faraloni, C., Giannelli, L., Happe, T., & Torzillo, G. (2012). Sustained H₂ production in a Chlamydomonas reinhardtii D1 protein mutant. *Journal of Biotechnology*, 157(4), 613-619. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.019>
- Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2015). Chlamydomonas as a model for biofuels and bio-products production. *The Plant Journal*, 82(3), 523-531. <https://doi.org/10.1111/tpj.12780>
- Serra-Maia, R., Bernard, O., Gonçalves, A., Bensalem, S., & Lopes, F. (2016). Influence of temperature on Chlorella vulgaris growth and mortality rates in a photobioreactor. *Algal Research*, 18, 352-359. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.016>
- Show, K.-Y., Yan, Y.-G., & Lee, D.-J. (2019). Biohydrogen Production: Status and

- Perspectives. In *Biofuels : Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels* (p. 693-713). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816856-1.00028-2>
- Siaut, M., Cui n , S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylid s, C., Li-Beisson, Y., & Peltier, G. (2011). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii* : Characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*, *11*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-7>
- Siderius, M., Musgrave, A., van den Ende, H., Koerten, H., Cambier, P., & van der Meer, P. (1996). *Chlamydomonas Eugametos* (chlorophyta) Stores Phosphate in Polyphosphate Bodies Together with Calcium¹. *Journal of Phycology*, *32*(3), 402-409. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00402.x>
- Singh, A., & Rathore, D. ( ds.). (2017). *Biohydrogen Production : Sustainability of Current Technology and Future Perspective*. Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3577-4>
- Singh, H., Paritosh, K., Vivekanand, V., & Pareek, N. (2022). Microorganism-Assisted Biohydrogen Production and Bioreactors. *Chemical Engineering & Technology*, ceat.202000561. <https://doi.org/10.1002/ceat.202000561>
- Singh, H., Varanasi, J. L., Banerjee, S., & Das, D. (2019). Production of carbohydrate enrich microalgal biomass as a bioenergy feedstock. *Energy*, *188*, 116039. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.116039>
- Sinner, P., Stiegler, M., Herwig, C., & Kager, J. (2021). Noninvasive online monitoring of *Corynebacterium glutamicum* fed-batch bioprocesses subject to spent sulfite liquor raw material uncertainty. *Bioresource Technology*, *321*, 124395. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124395>
- Smythers, A. L., McConnell, E. W., Lewis, H. C., Mubarek, S. N., & Hicks, L. M. (2020). Photosynthetic Metabolism and Nitrogen Reshuffling Are Regulated by Reversible Cysteine Thiol Oxidation Following Nitrogen Deprivation in *Chlamydomonas*. *Plants*, *9*(6), 784. <https://doi.org/10.3390/plants9060784>
- Sołowski, G. (2018). Biohydrogen Production—Sources and Methods : A Review. *Biohydrogen Production*, 2018(01).
- Sousa, C., Compadre, A., Vermu , M. H., & Wijffels, R. H. (2013). Effect of oxygen at low and high light intensities on the growth of *Neochloris oleoabundans*. *Algal Research*, *2*(2), 122-126. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.007>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(2), 87-96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Srirangan, K., Pyne, M. E., & Perry Chou, C. (2011). Biochemical and genetic engineering strategies to enhance hydrogen production in photosynthetic algae and cyanobacteria.

- Steinbeck, J., Nikolova, D., Weingarten, R., Johnson, X., Richaud, P., Peltier, G., Hermann, M., Magneschi, L., & Hippler, M. (2015). Deletion of Proton Gradient Regulation 5 (PGR5) and PGR5-Like 1 (PGRL1) proteins promote sustainable light-driven hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* due to increased PSII activity under sulfur deprivation. *Frontiers in Plant Science*, 6, 892. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00892>
- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1977). *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fisheries Research Board of Canada.
- Surzycki, R., Cournac, L., Peltier, G., & Rochaix, J.-D. (2007). Potential for hydrogen production with inducible chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(44), 17548-17553. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704205104>
- Tai, A. P. K., Martin, M. V., & Heald, C. L. (2014). Threat to future global food security from climate change and ozone air pollution. *Nature Climate Change*, 4(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nclimate2317>
- Takache, H. (2010). *Caractérisation, modélisation de la croissance photosynthétique de Chlamydomonas reinhardtii en photobioréacteur et mise en évidence du couplage à l'hydrodynamique* [These de doctorat, Université de Nantes]. <https://www.theses.fr/2010NANT2072>
- Takache, H., Christophe, G., Cornet, J.-F., & Pruvost, J. (2010). Experimental and theoretical assessment of maximum productivities for the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in two different geometries of photobioreactors. *Biotechnology Progress*, 26(2), Article 2. <https://doi.org/10.1002/btpr.356>
- Takache, H., Pruvost, J., & Cornet, J.-F. (2012). Kinetic modeling of the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in a photobioreactor. *Biotechnology Progress*, 28(3), 681-692. <https://doi.org/10.1002/btpr.1545>
- Takahashi, H., Braby, C. E., & Grossman, A. R. (2001). Sulfur Economy and Cell Wall Biosynthesis during Sulfur Limitation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 127(2), 665-673.
- Titica, M., Kazbar, A., Marec, H., Pruvost, J., Ifrim, G., Barbu, M., & Caraman, S. (2018). Simultaneous control of pH and dissolved oxygen in closed photobioreactor. *2018 22nd International Conference on System Theory, Control and Computing (ICSTCC)*, 372-378. <https://doi.org/10.1109/ICSTCC.2018.8540689>
- Todisco, É. (2019). *Microalgae Growth Optimization in Biofaçade Photobioreactors* [These de doctorat, Université de Nantes]. <https://www.theses.fr/2019NANT4040>
- Toepel, J., Albaum, S. P., Arvidsson, S., Goesmann, A., la Russa, M., Rogge, K., & Kruse, O. (2011). Construction and evaluation of a whole genome microarray of *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Genomics*, 12(1), 579. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-579>

- Tolleteer, D., Ghysels, B., Alric, J., Petroutsos, D., Tolstygina, I., Krawietz, D., Happe, T., Auroy, P., Adriano, J.-M., Beyly, A., Cuiné, S., Plet, J., Reiter, I. M., Genty, B., Cournac, L., Hippler, M., & Peltier, G. (2011). Control of Hydrogen Photoproduction by the Proton Gradient Generated by Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, *23*(7), 2619-2630. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.086876>
- Torzillo, G., Scoma, A., Faraloni, C., & Giannelli, L. (2015). Advances in the biotechnology of hydrogen production with the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Critical Reviews in Biotechnology*, *35*(4), 485-496. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.900734>
- Touloupakis, E., Benavides, A. M. S., Cicchi, B., & Torzillo, G. (2016). Growth and hydrogen production of outdoor cultures of *Synechocystis* PCC 6803. *Algal Research*, *18*, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.010>
- Touloupakis, E., Faraloni, C., Silva Benavides, A. M., & Torzillo, G. (2021). Recent Achievements in Microalgal Photobiological Hydrogen Production. *Energies*, *14*(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/en14217170>
- Tsita, K. G., & Pilavachi, P. A. (2013). Evaluation of next generation biomass derived fuels for the transport sector. *Energy Policy*, *62*, 443-455. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2013.07.114>
- Udayan, A., Pandey, A. K., Sharma, P., Sreekumar, N., & Kumar, S. (2021). Emerging industrial applications of microalgae: Challenges and future perspectives. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, *1*(4), 411-431. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00038-8>
- Uggetti, E., Sialve, B., Trably, E., & Steyer, J.-P. (2014). Integrating microalgae production with anaerobic digestion: A biorefinery approach. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *8*(4), 516-529. <https://doi.org/10.1002/bbb.1469>
- Urbain, B. (2017). *Elaboration of a biochemically-based structured model for the growth of eukaryotic microalgae in photoreactors* [These de doctorat, Université de Nantes]. <https://www.theses.fr/2017NANT4096>.
- Van Vooren, G., Le Grand, F., Legrand, J., Cuiné, S., Peltier, G., & Pruvost, J. (2012). Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology*, *124*, 421-432. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.009>
- Verdelho Vieira, V., Cadoret, J.-P., Acien, F. G., & Benemann, J. (2022). Clarification of Most Relevant Concepts Related to the Microalgae Production Sector. *Processes*, *10*(1), 175. <https://doi.org/10.3390/pr10010175>
- Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G. (2011). *Bioreaction Engineering Principles*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9688-6>
- Vogt, S., Lyon, E. J., Shima, S., & Thauer, R. K. (2008). The exchange activities of [Fe] hydrogenase (iron-sulfur-cluster-free hydrogenase) from methanogenic archaea in

- comparison with the exchange activities of [FeFe] and [NiFe] hydrogenases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 13(1), 97-106. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0302-2>
- Volgusheva, A. A., Jokel, M., Allahverdiyeva, Y., Kukarskikh, G. P., Lukashev, E. P., Lambreva, M. D., Krendeleva, T. E., & Antal, T. K. (2017). Comparative analyses of H₂ photoproduction in magnesium- and sulfur-starved *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Physiologia Plantarum*, 161(1), 124-137. <https://doi.org/10.1111/ppl.12576>
- Volgusheva, A., Kukarskikh, G., Krendeleva, T., Rubin, A., & Mamedov, F. (2014). Hydrogen photoproduction in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* under magnesium deprivation. *RSC Advances*, 5(8), 5633-5637. <https://doi.org/10.1039/C4RA12710B>
- Volgusheva, A., Styring, S., & Mamedov, F. (2013). Increased photosystem II stability promotes H₂ production in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18), 7223-7228. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220645110>
- Wang, X., Ruan, Z., Sheridan, P., Boileau, D., Liu, Y., & Liao, W. (2015). Two-stage photoautotrophic cultivation to improve carbohydrate production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biomass and Bioenergy*, 74, 280-287. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.01.024>
- Wase, N., Black, P. N., Stanley, B. A., & DiRusso, C. C. (2014). Integrated quantitative analysis of nitrogen stress response in *Chlamydomonas reinhardtii* using metabolite and protein profiling. *Journal of Proteome Research*, 13(3), Article 3. <https://doi.org/10.1021/pr400952z>
- Wechselberger, P., Sagmeister, P., & Herwig, C. (2013). Real-time estimation of biomass and specific growth rate in physiologically variable recombinant fed-batch processes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(9), 1205-1218. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0848-4>
- Weissman, J. C., Goebel, R. P., & Benemann, J. R. (1988). Photobioreactor design : Mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(4), 336-344. <https://doi.org/10.1002/bit.260310409>
- Wheeler, T., & von Braun, J. (2013). Climate Change Impacts on Global Food Security. *Science*, 341(6145), 508-513. <https://doi.org/10.1126/science.1239402>
- Willey, J. M., Sherwood, L., & Woolverton, C. J. (2019). *Prescott's Microbiology* (9^e éd.). McGraw-Hill.
- Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P., & Leegood, R. C. (2000). Photorespiration : Metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402), 1517-1529.
- Wu, S., Huang, R., Xu, L., Yan, G., & Wang, Q. (2010). Improved hydrogen production with expression of hemH and lba genes in chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, 146(3), 120-125.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.023>

- Wykoff, D. D., Davies, J. P., Melis, A., & Grossman, A. R. (1998). The Regulation of Photosynthetic Electron Transport during Nutrient Deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, *117*(1), 129-139. <https://doi.org/10.1104/pp.117.1.129>
- Xu, F.-Q., Ma, W.-M., & Zhu, X.-G. (2011). Introducing pyruvate oxidase into the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* increases oxygen consumption and promotes hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, *36*(17), 10648-10654. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.05.130>
- Yacoby, I., Pochekailov, S., Toporik, H., Ghirardi, M. L., King, P. W., & Zhang, S. (2011). Photosynthetic electron partitioning between [FeFe]-hydrogenase and ferredoxin:NADP⁺-oxidoreductase (FNR) enzymes in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(23), 9396-9401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103659108>
- Zebda, A., Alcaraz, J.-P., Vadgama, P., Shleev, S., Minteer, S. D., Boucher, F., Cinquin, P., & Martin, D. K. (2018). Challenges for successful implantation of biofuel cells. *Bioelectrochemistry*, *124*, 57-72. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.05.011>
- Zhang, D., & Vassiliadis, V. S. (2015). *Chlamydomonas reinhardtii* Metabolic Pathway Analysis for Biohydrogen Production under Non-Steady-State Operation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *54*(43), 10593-10605. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b02034>
- Zhang, L., Happe, T., & Melis, A. (2002). Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*, *214*(4), 552-561. <https://doi.org/10.1007/s004250100660>
- Zhang, Q., & Zhang, Z. (2018). Biological Hydrogen Production From Renewable Resources by Photofermentation. In *Advances in Bioenergy* (Vol. 3, p. 137-160). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2018.03.001>
- Zittelli, G. C., Biondi, N., Rodolfi, L., & Tredici, M. R. (2013). Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture* (p. 225-266). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch13>
- Zuccaro, G., Yousuf, A., Pollio, A., & Steyer, J.-P. (2020). Chapter 2—Microalgae Cultivation Systems. In A. Yousuf (Éd.), *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (p. 11-29). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3>

Titre : Étude et analyse de la cinétique de mise en réserves du carbone en chez la microalgue *C. reinhardtii* cultivée en conditions de limitation par la source d'azote.

Mots clés : Microalgue, biohydrogène, réserves carbonées, limitation azotée, système bi-étagé, modélisation.

Résumé : L'hydrogène (H_2) est aujourd'hui l'une des molécules les plus prometteuses pour produire une énergie renouvelable sans émission de CO_2 . L'enjeu de cette thèse porte sur une domestication de la microalgue *C. reinhardtii* en vue de produire de l' H_2 en conditions anoxiques à partir seulement de lumière, d'eau et de minéraux. Ce processus de production est par nature transitoire. Cependant, une production continue dans un système de culture contrôlé est envisageable pour rendre cette production d' H_2 viable industriellement. Pour cela, une approche consiste dans le développement d'un système de culture bi-étagé opérant en continu et permettant de séparer spatialement deux étapes clés de la production d' H_2 , à savoir l'accumulation de réserves carbonées intracellulaires et la mise en anoxie. L'objectif de ce travail est d'étudier de façon approfondie l'étage 1, considéré comme l'étape conditionnant la stabilité du système, et de mettre en place le système pilote de production d' H_2 . La cinétique d'accumulation des réserves en amidon a été étudiée à partir de la mise au point d'un protocole dédié.

À partir de ce protocole, les expériences réalisées ont permis de développer une méthodologie permettant de prédire les propriétés radiatives de *C. reinhardtii* en conditions de limitation azotée et de remonter à une information sur le champ de rayonnement dans le système de culture. De plus, un modèle stœchiométrique dynamique reposant sur une mesure de vitesse à partir des bilans gazeux a été développé posant les bases d'un outil d'estimation permettant de contrôler l'état physiologique de *C. reinhardtii*. Une étude comparative a été également réalisée pour deux régimes de lumière, montrant que l'effet d'une double limitation, nutritionnelle et par l'accès la source d'énergie, s'avérer négatif sur la cinétique d'accumulation de l'amidon. Enfin, le système bi-étagé de production continue d' H_2 développé a été mis en œuvre et validé expérimentalement dans son concept, et a permis de soutenir une production d' H_2 pendant 70 h.

Title: Study and analysis of carbon storage kinetics in the microalgae *C. reinhardtii* cultivated under nitrogen-limited conditions.

Keywords : Microalgae, biohydrogen, carbon reserves, nitrogen-limitation, two-stage process, modelling.

Abstract: Hydrogen (H_2) is currently one of the most promising molecules for producing renewable energy without CO_2 emissions. This thesis focuses on the cultivation of the microalgae *C. reinhardtii* to produce H_2 under anoxic conditions and using only light, water and minerals. This production process is by nature transient. However, continuous production in a controlled culture system is conceivable to make this H_2 production industrially viable. To this end, one approach is to develop a continuous two-stage culture system that spatially separates two key stages in H_2 production, namely the accumulation of intracellular carbon reserves and anoxia establishment. The aim of this work is to carry out a detailed study of stage 1, considered to be the stage that determines the system's stability, and to set up the H_2 production pilot system. The kinetics of starch reserve accumulation were studied, based on the development of a dedicated protocol.

Based on this protocol, the experiments carried out have allowed the development of a methodology for predicting the radiative properties of *C. reinhardtii* under nitrogen-limited conditions and to calculate the radiation field in the cultivation system. In addition, a dynamic stoichiometric model based on the oxygen production volumetric rate measurements from gas balance analysis was developed, laying the foundations for an estimation tool to monitor the physiological state of *C. reinhardtii*. A comparative study was also carried out for two light regimes, showing that the effect of a double limitation: nutritional and the access to the energy source, proved negative on starch accumulation kinetics. Finally, the two-stage continuous H_2 production system developed was implemented and experimentally validated in concept, sustaining H_2 production for 70 h.