

Mixotrophie de microalgues vertes en milieu fermé : synergie entre assimilation du carbone organique et photosynthèse

Auteur : Michielin, Marie

Promoteur(s) : Franck, Fabrice

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2018-2019

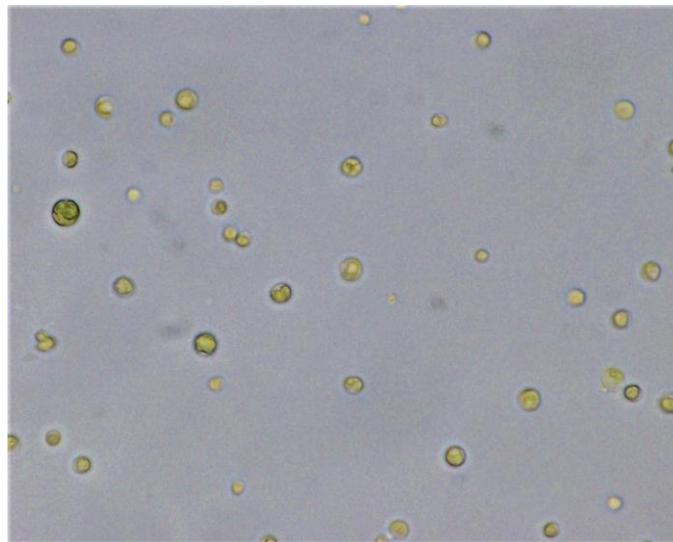
URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/7447>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Mixotrophie de microalgues vertes en milieu fermé : synergie entre assimilation du carbone organique et photosynthèse



Mémoire de fin d'étude du grade de Master en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire à finalité approfondie

Marie Michielin

Promoteur : Pr F. Franck

Co-promoteur : Dr A. Fratamico

Année académique 2018-2019

Remerciements

Je remercie le Docteur Fabrice Franck pour avoir accepté d'être promoteur de ce mémoire, pour son accueil dans son laboratoire et pour toute l'aide apportée tout au long de travail.

Je remercie également le Docteur Anthony Fratamico d'avoir accepté d'être le co-promoteur de mon travail, pour ses bons conseils et l'aide apportée.

Je tiens également à remercier chaleureusement Amélie Corato, doctorante au sein du service, pour son accompagnement, sa disponibilité, sa patience, ses nombreuses explications et la qualité de son accueil.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de bioénergétique pour la bonne ambiance et les encouragements, ainsi que pour leurs conseils.

Je tiens également à remercier mes camarades de classe effectuant leur mémoire en même temps que moi, pour leur soutien moral et culinaire.

Je remercie enfin toute ma famille pour leur soutien et plus particulièrement mes parents pour leur relecture et leur aide en bureautique.

Résumé

Mixotrophie de microalgues vertes en milieu fermé : synergie entre assimilation du carbone organique et photosynthèse

Les microalgues vertes, notamment les chlorelles, présentent de nombreux intérêts économiques. Aussi, l'étude de leurs différents types de croissances ainsi que de leur métabolisme énergétique pourrait permettre de mieux les exploiter. C'est pourquoi notre travail a porté sur l'étude de certaines conditions particulières de croissance appliquées à la mixotrophie. La croissance très rapide observée chez certaines microalgues vertes en mode mixotrophe étant favorisée par le recyclage de l'oxygène et du dioxyde de carbone, il devrait être possible de cultiver des microalgues en l'absence d'échanges gazeux avec l'environnement en présence de glucose.

Dans ce travail, le comportement de cultures de chlorelles (*Chlorella sorokiniana* et *Chlorella* sp.) en flacons scellés a été décrit en condition mixotrophe mais aussi autotrophe et hétérotrophe. Pour ce faire, des analyses de la croissance en environnement clos ont été réalisées parallèlement au suivi de la composition du milieu (oxygène dissous et concentration en glucose) ainsi qu'au suivi du contenu de la biomasse en acides gras et en pigments. Enfin, l'analyse du métabolisme a pu être complétée par l'étude de la photosynthèse et de la respiration.

Les suivis de croissance des différentes cultures closes montrent une croissance en mixotrophie, et non en hétérotrophie et en autotrophie, illustrant donc la possibilité de cultiver des microalgues en milieu clos grâce au recyclage de l'oxygène et du dioxyde de carbone. La saturation en oxygène dissous montre cependant un déséquilibre entre la photosynthèse et la respiration en faveur de la photosynthèse jusqu'à un certain moment où cette tendance est inversée allant jusqu'à l'anoxie. Les analyses photosynthétiques des cultures mixotrophes closes ont alors mis en évidence une diminution de la capacité photosynthétique lors de l'anoxie. Pour finir, La croissance mixotrophe en milieu fermé ne change globalement pas le contenu en acide gras par rapport à une culture ouverte mais le contenu en pigments, lui, est inférieur.

Marie Michielin
Promoteur : Pr F. Franck
Co-promoteur : Dr A. Fratamico
Laboratoire de Bioénergétique

Année académique 2018-2019

Table des matières

Introduction.....	5
1. Les microalgues vertes	5
2. Les conditions de croissance	6
3. La respiration.....	7
4. La photosynthèse	8
5. La fluorescence.....	11
6. Les pigments.....	13
7. Généralités sur les lipides.....	13
8. Objectifs.....	14
Matériel et méthodes.....	15
1. Cultures stocks	15
2. Conditions de culture	15
3. Suivi des cultures.....	16
4. Dosage du glucose.....	16
5. Dosage des acides gras (FAMES)	17
6. Analyse de la photosynthèse.....	18
a. Mesures de la fluorescence de la chlorophylle a	18
b. Mesures d'oxymétrie.....	19
c. Dosage des pigments.....	19
Résultats.....	21
1. Analyse de la croissance.....	21
a. Densité optique et biomasse.....	21
b. Comptage	24
c. Diamètre.....	24
2. Evolution du milieu.....	25
a. Evolution de la concentration en oxygène dissous	25
b. Evolution de la concentration en glucose, et détection d'un produit de fermentation	27
3. Evolution de la composition de la biomasse	29
a. Analyse des acides gras	29
b. Analyse des pigments.....	29
4. Analyse de la photosynthèse.....	31
a. Mesures de fluorescence de la chlorophylle a	31
b. Mesures d'induction de fluorescence	35

Discussion	38
Conclusion	44
Bibliographie.....	45
Annexes	47

Introduction

1. Les microalgues vertes

Les microalgues sont des organismes eucaryotes unicellulaires généralement photosynthétiques. Elles capturent la lumière du soleil et, grâce à la photosynthèse, produisent environ la moitié de l'oxygène atmosphérique sur terre. Ainsi elles absorbent de grandes quantités de CO₂ afin d'incorporer le carbone à leur biomasse.

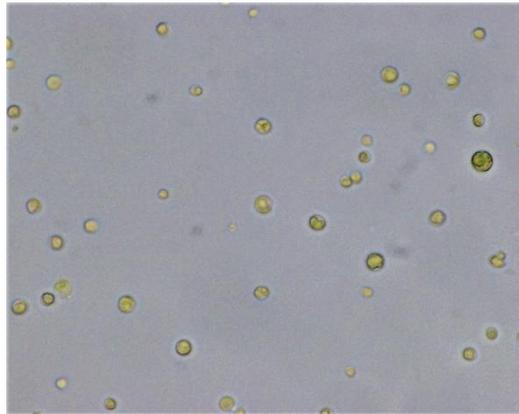


Fig 1 : photo d'une culture d'algues vertes vivante (*Chlorella sorokiniana*). grossissement X60

Les microalgues vertes ont de nombreuses applications commerciales. Elles sont une source de protéines, de carbohydrates, d'acides gras, d'agents antioxydants et de minéraux. Elles peuvent donc être utilisées pour augmenter la valeur nutritionnelle de la nourriture, dans les cosmétiques, l'élevage ou encore en médecine. De plus, leurs lipides sont étudiés pour la production de biocarburants de troisième génération (Spolaore et al., 2006). Elles peuvent également avoir un rôle dans l'épuration des eaux usées domestiques, en formant des consortia avec des bactéries, notamment pour la réduction des niveaux d'azote et de phosphore (Gonçalves et al., 2017).

Les microalgues vertes utilisées lors de ce mémoire sont des chlorelles (plus précisément *Chlorella sorokiniana* et *Chlorella* sp.), elles font partie de l'embranchement *Chlorophyta*. Elles sont entourées d'une paroi autour de leur membrane plasmique et contiennent dans leur cytoplasme différents organites : un noyau, des mitochondries, un chloroplaste, ...

La chlorelle est non-mobile et se reproduit asexuellement par autospore en quelques heures. Quatre cellules filles avec leurs propres parois sont formées à l'intérieur de la paroi de la cellule mère qui se rompt après la maturation des cellules filles pour les libérer (Safi et al., 2014).

Toutes les applications commerciales des microalgues nécessitent une quantité suffisante de biomasse, c'est pourquoi il est particulièrement important d'étudier la croissance des microalgues, notamment leurs conditions de culture.

2. Les conditions de croissance

Il existe trois grands types de conditions de cultures des microalgues, l'autotrophie, l'hétérotrophie et la mixotrophie. L'autotrophie est la croissance des microalgues utilisant la lumière comme seule source d'énergie (on parle alors de photo-autotrophie) ainsi que le dioxyde de carbone dissous comme source de carbone inorganique. L'hétérotrophie est la croissance des microalgues sans apport de lumière et en condition aérobie. Elle utilise l'assimilation de substrats organiques du milieu de culture comme source de carbone et d'énergie. Enfin, la mixotrophie est le mode de croissance combinant l'énergie de la lumière et l'énergie venant de substrats organiques. La photo-autotrophie et l'hétérotrophie se produisent donc simultanément. Le CO₂ est fixé par la photosynthèse alors que les composés organiques sont assimilés et utilisés pour la respiration aérobie (Perez-Garcia and Bashan, 2015).

Plusieurs sources de carbone peuvent servir au développement des microalgues en hétérotrophie et en mixotrophie. Le glucose, le glycérol ou l'acétate peuvent être utilisés ou encore les déchets industriels laitiers, ... (Perez-Garcia and Bashan, 2015). Les sources de carbone assimilables peuvent différer en fonction de l'espèce. Par exemple, la chlorelle est capable d'importer le glucose à l'aide d'un symporteur H⁺/hexose avec une stœchiométrie 1:1 (Schwab and Komor, 1978) alors que la microalgue verte *Chlamydomonas* sp. ne possède pas ces transporteurs efficaces en conditions naturelles (Bennet and Hobbie, 1972).

Certaines sources de carbone permettent un taux de croissance plus élevé que d'autres, celui-ci étant dépendant du taux de conversion en biomasse de la source de carbone, de la quantité de carbone apportée par la source et de la concentration maximale pouvant être ajoutée dans le milieu (Perez-Garcia and Bashan, 2015). La condition de culture pourra aussi être adaptée en fonction du composé d'intérêt recherché. De manière générale, les croissances hétérotrophe et mixotrophe permettent d'obtenir une densité de biomasse plus importante que la croissance autotrophe (Xu et al., 2006). Cela provient essentiellement du fait que la croissance est moins déterminée par la pénétration de la lumière au sein de culture denses.

Les chlorelles sont capables de croître en conditions mixotrophes en utilisant, entre autres, le glucose ou l'acétate. En condition hétérotrophe, elles peuvent utiliser le glucose, l'acétate, le glycérol ou le glutamate comme source de carbone avec un taux de croissance maximum plus élevé avec le glucose. (Safi et al., 2014)

3. La respiration

La respiration est le processus permettant aux cellules de produire de l'énergie sous forme d'ATP pour leur développement grâce aux nutriments absorbés depuis leur milieu. La respiration se déroule dans les mitochondries, des organites entourés d'une double membrane. La membrane interne est structurée en crêtes et est essentiellement imperméable aux protons et ions. La membrane externe contient un grand nombre de porines laissant diffuser ions et molécules de bas poids moléculaire.

La respiration avec le glucose comme source de carbone débute comme suit ; le glucose subit d'abord la glycolyse dans le cytosol de la cellule conduisant à la formation de deux pyruvates ainsi qu'à la production (au final) de 2 ATP et 2 NADH. Le pyruvate pénètre ensuite dans la mitochondrie, il est converti en acétyl-CoA et est oxydé par le cycle de Krebs dans la matrice mitochondriale. Cela permet la libération d'une molécule de CO₂, trois de NADH, une de FADH₂ et une de GTP. Le NADH et FADH₂ peuvent alors être oxydés par la chaîne respiratoire au niveau des crêtes de la membrane interne mitochondriale. C'est donc au niveau des crêtes que se déroule la phosphorylation oxydative qui est le processus permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP par l'ATP synthase grâce à l'énergie libérée par l'oxydation des donneurs d'électrons (NADH et FADH₂) par la chaîne respiratoire avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons (Thiry et al., 2014).

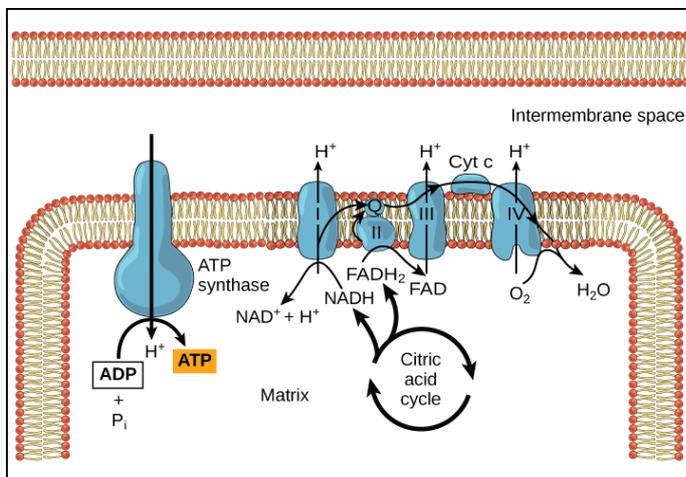
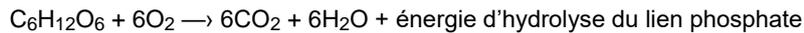


Fig 2 : Illustration de la chaîne respiratoire formée des complexes enzymatiques (en bleu) associés à la membrane interne mitochondriale¹

Pour chaque molécule de glucose oxydée par la respiration on obtient en théorie 38 molécules d'ATP (2 de la glycolyse, 2 du cycle de Krebs et le reste de la chaîne respiratoire).

¹ <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology1/chapter/reading-electron-transport-chain/>

L'équation bilan de la respiration est donc :



4. La photosynthèse

La photosynthèse est le processus permettant la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique servant à synthétiser de la matière organique. Chez les eucaryotes, la photosynthèse se déroule dans le chloroplaste. Cet organite est délimité par une double membrane contenant le liquide intra-chloroplastique, ou stroma, ainsi qu'un réseau membranaire interne, le thylakoïde. Les thylakoïdes sont formés par des vésicules membranaires aplaties renfermant une phase aqueuse, ou lumen. Ils contiennent des pigments associés à des protéines et peuvent se trouver sous une forme empilée, les grana. La photosynthèse est une suite de deux phases. Une phase dépendante de la lumière, ou phase 'claire', se déroulant dans les thylakoïdes, suivie d'une phase non directement dépendante de la lumière se déroulant dans le stroma : la phase 'sombre'.

Les réactions de la phase claire se déroulent dans les membranes des thylakoïdes. Elles permettent le transport linéaire et cyclique des électrons et la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique sous forme d'ATP et NADPH. Les réactions font intervenir plusieurs complexes membranaires, les photosystèmes 1 et 2 (PSI, PSII), leurs antennes collectrices de lumière LHC (« light harvesting complex ») associées, le cytochrome B6f et l'ATP synthétase. La lumière est absorbée par les LHC, des complexes protéiques associés à des pigments et enchâssés dans les membranes des thylakoïdes, et l'énergie lumineuse est transférée à la chlorophylle *a* des centres réactionnels des photosystèmes. Il se déroule alors une séparation de charge, la chlorophylle excitée donne un de ses électrons à un accepteur primaire (phéophytine *a* pour le PSII, chlorophylle *a* pour le PSI). L'ensemble du transport d'électrons linéaire peut être décrit comme une suite de transferts d'électrons partant de l'eau et aboutissant au NADP⁺, cette succession de réactions étant rendue énergétiquement possible par les séparations de charges qui se produisent à la lumière dans les centres réactionnels des deux photosystèmes. Les séparations de charges au sein du PSII mènent à la réduction successive des plastoquinones A et B (QA et QB, voir fig 3). Une fois deux électrons acceptés, QB est protoné puis libéré du PSII pour rejoindre un pool de plastoquinones membranaires (PQ/PQH₂). Du côté oxydant du PSII, la chlorophylle du centre réactionnel est réduite par un électron venant de l'eau, ce qui, après quatre séparations de charges, libère de l'oxygène ainsi que des ions H⁺ dans le lumen. Les plastoquinones réduites (PQH₂) sont ensuite oxydées par le cytochrome B6f. Cette oxydation libère des ions H⁺ dans le lumen ainsi que des électrons qui seront transférés vers le PSI via la plastocyanine. Le PSI oxyde la plastocyanine et transfère un électron à la ferrédoxine (Fd). Une ferrédoxine NADP⁺ réductase (FNR) catalyse la réduction du NADP⁺ à l'aide de deux ferrédoxines réduites (Fig 3). Le

des LHCII qui permet une dissipation accrue de l'énergie d'excitation lumineuse sous forme thermique, détectable comme une baisse du rendement de fluorescence (quenching). La photoinhibition (qi) est induite par une exposition à de fortes intensités lumineuse et traduit des dommages au centre réactionnel du PSII (Müller et al., 2001). Enfin, la transition d'état (qT) intervient lorsque le pool de plastoquinones est réduit, les plastoquinones vont se lier au site Qo du cytochrome B6f ce qui conduit à l'activation d'une kinase. Celle-ci va phosphoryler les LHCII et provoquer leur détachement du PSII et la migration d'une partie d'entre eux vers le PSI. Cela permet un rééquilibrage de l'énergie d'excitation (Rochaix, 2011).

Des voies de transport alternatives des électrons ont été décrites chez les microalgues (Fig. 4). Il en existe plusieurs. Par exemple, il peut y avoir une réduction d'O₂ au niveau du PSI via la réaction de Mehler, par l'activité de protéines nommées 'flavodiiron proteins' (FLVs), ainsi que via la plastoquinone oxydase terminale (PTOX). Une consommation de l'excès de pouvoir réducteur peut aussi se produire au cours de la photorespiration, qui résulte d'une activité oxygénase de la Rubisco. Les transports cycliques des électrons autour du PSI peuvent aussi être considérés comme des voies alternatives (Peltier et al., 2010).

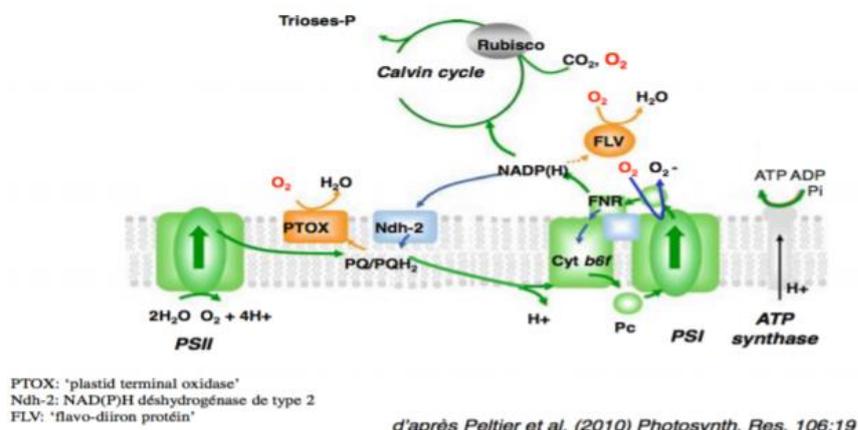


Fig 4 : illustration des différents transports alternatifs d'électrons

Au final, la vitesse du dégagement d'O₂ nette dépendra de la consommation de l'oxygène par la respiration, de l'O₂ utilisé dans les voies de transport alternatives lors de la saturation de la chaîne de transport des électrons ainsi que la production d'O₂ par la photolyse de l'eau au niveau du PSII. La vitesse du dégagement net d'O₂ peut être mesurée à l'aide d'une électrode de Clark (cf. matériel et méthodes).

5. La fluorescence

Une partie de l'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle *a* est réémise sous forme de fluorescence. Cependant, dans le PSII, ce processus entre en compétition avec la réaction de transfert d'électrons vers la plastoquinone QA et la désactivation thermique (incluant l'extinction non photochimique de la fluorescence, NPQ). Puisque ces phénomènes entrent en compétition, il est donc possible d'utiliser les mesures de fluorescence pour obtenir des informations sur le rendement du transfert d'électrons et le NPQ.

Pour ce faire, les mesures de fluorescence peuvent être effectuées à l'aide d'un fluorimètre à lumière modulée (PAM : « pulse Amplitude Modulated »). Il fonctionne à l'aide d'une lumière analytique modulée dont la faible intensité ne permet pas aux algues d'induire un transport d'électrons appréciable mais permet à la chlorophylle d'émettre une fluorescence mesurable. Cette lumière est constituée de pulse d'une microseconde à une fréquence de 2Hz. Une seconde lumière (actinique) continue permet d'induire l'activité photosynthétique et sa valeur (en $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}$) peut être fixée et déclenchée lors de l'expérience. Enfin, des pulses de lumière saturante de 1 seconde ($3000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}$) servent à annuler temporairement l'extinction photochimique (Fig 5).

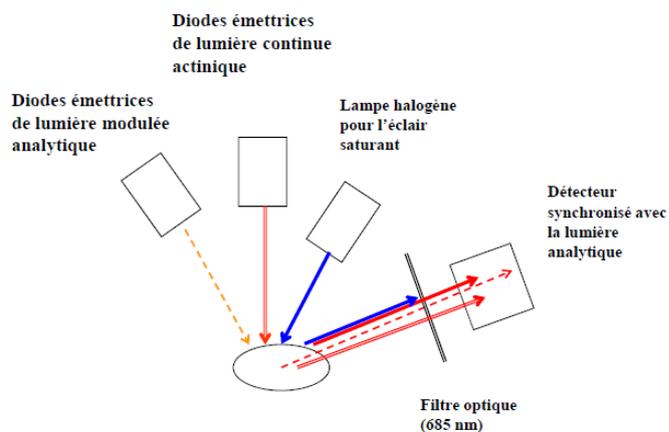


Fig 5 : Principe de fonctionnement du fluorimètre à lumière modulée

Les variations de la fluorescence permettent alors de recueillir plusieurs données : la fluorescence minimale (F_0), la fluorescence maximale (F_m), la fluorescence maximale après activation de la lumière actinique (F_m'), ainsi que les différents composant du NPQ. (Fig 6)

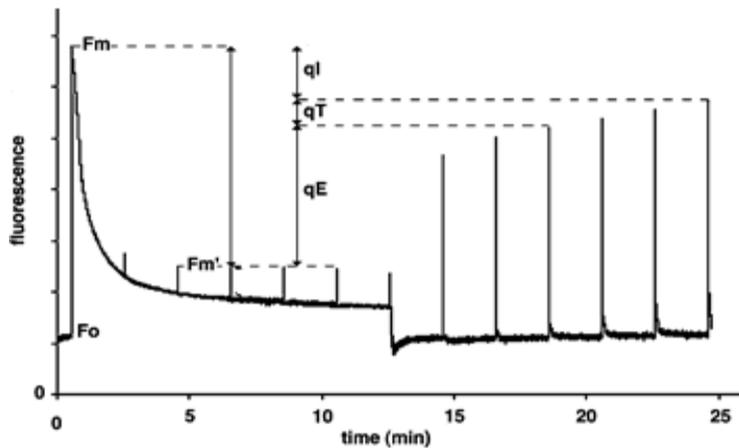


Fig 6 : Résultats d'une analyse au PAM.

Les paramètres F_m , F_m' , F_o et l'intensité de la lumière incidente (mesurée dans la cuvette) permettent le calcul du rendement photochimique du PSII, de l'extinction non photochimique (NPQ) et de la vitesse relative du transport d'électrons (ETR_{rel}). Le rendement photochimique du PSII est noté Φ_{PSII} et traduit le nombre d'électrons transférés par nombre de photons absorbé.

En combinant les mesures de fluorescence et d'oxygène, on peut obtenir la relation entre le transport des électrons et le dégagement d'oxygène, ce qui peut nous renseigner sur l'éventuelle activité de transport alternatif d'électrons vers l'oxygène.

Lors d'un flash saturant après adaptation à l'obscurité, la montée initiale de fluorescence produit une courbe d'induction typique. La fluorescence provenant principalement du PSII à température ambiante (Franck et al., 2002), les mesures de fluorescence permettent de déterminer l'état du PSII. En effet, le PSII peut exister dans deux états, l'un ouvert peu fluorescent et l'autre fermé fortement fluorescent. La montée de fluorescence correspond au passage de l'état ouvert à l'état fermé. Lors de l'état ouvert les plastoquinones A et B ainsi que le pool de plastoquinone derrière le PSII sont complètement oxydés, cela correspond à la valeur minimale du rendement de fluorescence, F_o . Au cours du pulse saturant, QA, le pool de PQ et toute la chaîne de transport d'électrons sont progressivement réduits. Comme les réactions s'enchaînent, une réduction complète de QA n'est (vraisemblablement) obtenue que lorsque la chaîne est entièrement réduite. La valeur maximale du rendement de fluorescence, F_m , est alors observée, typiquement après 0.2 s chez les microalgues vertes (Fratamico et al., 2016). Au cours de la montée de fluorescence allant de F_o à F_m , on observe toujours deux inflexions, notées 'J' et 'I', délimitant trois phases successives : 'O-J', 'J-I' et 'I-P' (O, pour 'origin' étant égal à F_o et P, pour 'plateau', à F_m) (Fig 7). La première phase, 'O-J', est dite photochimique car elle est limitée à la réduction (partielle) de QA ; le pool de PQ est vraisemblablement réduit au point 'I'. La nature de la

phase 'I-P' est débattue ; elle est en tous cas sensible à l'activité du PSI et pourrait refléter une saturation temporaire des accepteurs de ce photosystème (Lazár, 2006).

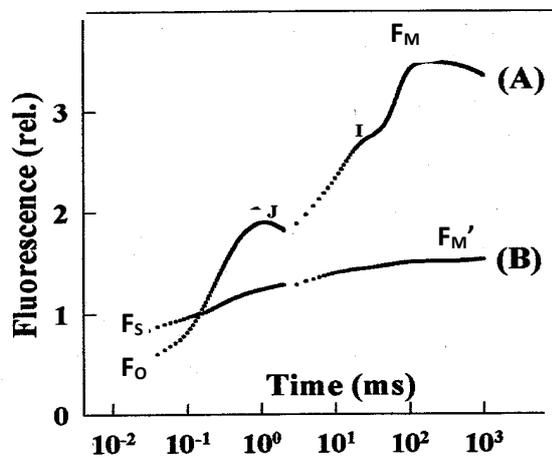


Fig 7 : Courbes d'induction de fluorescence après adaptation à l'obscurité (A) et à la lumière (B) (Strasser et al., 2000).

6. Les pigments

Les microalgues vertes possèdent deux types de pigments, les chlorophylles et les caroténoïdes. Elles possèdent des chlorophylles *a* et *b*. Les chlorophylles interagissent avec la lumière mais seule la chlorophylle *a* peut agir en tant que donneur d'électrons primaire pour les centres réactionnels. Ce sont des molécules composées de tétrapyrroles cycliques, d'un atome de magnésium central et d'une chaîne phytol permettant l'interaction avec l'apoprotéine.

Les caroténoïdes ont un rôle photosynthétique et photo-protecteur. Il existe deux types de caroténoïdes, les carotènes, qui sont des chaînes hydrocarbonées insaturées, et les xanthophylles, qui sont des dérivés oxygénés des carotènes. Les xanthophylles sont liées aux LHC et ont une bonne capacité de dissipation de l'énergie grâce à leurs structures possédant des atomes d'oxygène (Croft and Chen, 2018). D'une manière générale, la fonction des caroténoïdes est double, puisqu'ils peuvent à la fois servir à l'absorption de lumière (suivie d'un transfert d'excitation à la chlorophylle) et être impliqués dans la protection vis-à-vis de l'excès de lumière par quenching de l'oxygène singulet (Frank and Cogdell, 1996).

7. Généralités sur les lipides

Les lipides peuvent être utilisés comme importante source d'énergie et de stockage par les microalgues, ils sont aussi des composants structurels des membranes. Les microalgues produisent

différents types de lipides comme les glycolipides, les phospholipides, les glycerolipides et les acides gras libres (Villarruel-López et al., 2017).

La grande importance des microalgues vertes comme produit commercial vient de leurs utilisation en nutrition animale et humaine notamment pour leurs apport en acides gras poly-insaturés (PUFAs) (Spolaore et al., 2006). Les acides gras Ω -3 et Ω -6 peuvent aussi être retrouvés dans les bicouches lipidiques des membranes cellulaires pour aider à la fluidité de cette membrane.

8. Objectifs

Les microalgues vertes, notamment les chlorelles, présentent de nombreux intérêts économiques. Aussi, l'étude de leurs différents types croissances ainsi que de leur métabolisme énergétique pourrait permettre de mieux les exploiter.

Notre travail a porté sur des conditions particulières de croissance appliquées à la mixotrophie. Lors de travaux récents, il est en effet apparu que la croissance très rapide observée chez certaines microalgues vertes en mode mixotrophe provenait vraisemblablement d'un recyclage de l'oxygène et du dioxyde de carbone (Pang et al., 2019). Ainsi, le CO₂ produit au cours de l'oxydation partielle de la source de carbone (glucose, acétate) lors de la respiration peut être refixé par la photosynthèse qui, à son tour, produit l'oxygène nécessaire à la respiration. En poussant cette conception à l'extrême, il devrait être possible de cultiver des microalgues sans apporter ni oxygène ni dioxyde de carbone, c'est-à-dire en l'absence d'échanges gazeux avec l'environnement de la culture. Ce travail a consisté à tester cette possibilité en étudiant le comportement de cultures de chlorelles (*Chlorella sorokiniana* et *Chlorella* sp.) réalisées en flacons scellés, avec le glucose comme substrat carboné organique. Parallèlement à des analyses de la croissance en environnement clos, nous avons pu suivre l'évolution du milieu (oxygène dissous et concentration en glucose) ainsi que le contenu de la biomasse en certains composants (acides gras et pigments). Enfin, l'analyse du métabolisme a pu être complétée par l'étude de la photosynthèse et de la respiration.

Matériel et méthodes

1. Cultures stocks

Les souches utilisées lors de ce mémoire sont des souches locales récoltées par le Professeur F. Franck et le Dr S. Gérin. Elles ont été isolées, purifiées et identifiées au sein du laboratoire de Bioénergétique. Il s'agit de *Chlorella sorokiniana* et *Chlorella sp.*

Les souches sont conservées sur boîte de petri dans un milieu BBM modifié ('BBM-3N') composé de 20ml/L du milieu « Bold Modified Basal Freshwater Nutrient Solution 50x » (B5282, Sigma-Aldrich) et de 25ml/L de NaNO₃ 20g/L, auquel on ajoute 15 g/L d'agar. Elles sont conservées à une intensité lumineuse constante de 60 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et à une température de 25°C.

Des cultures stock, dans un milieu liquide BBM-3N, de 25mL sont ensemencées tous les 3 mois à partir des cultures en milieu gélosé. Les cultures stock de 25mL ainsi que des précultures de 50mL servant à ensemenecer les futures expériences sont repiquées une fois par semaine dans des erlenmeyers respectivement de 100ml et 250mL avec une dilution x5. Les cultures stock et les précultures sont conservées dans des erlenmeyers de 100ml à 25°C et à une intensité lumineuse constante de 80 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sur un agitateur effectuant 110 rotations par minute (rpm).

2. Conditions de culture

Sur base des précultures, des cultures de *Chlorella sorokiniana* et *Chlorella sp* ont été effectuées en hétérotrophie, autotrophie et mixotrophie, dans des bouteilles en verre de 60ml dans du milieu BBM-3N, fermées hermétiquement par un bouchon possédant un septum permettant d'y insérer une aiguille pour les prélèvements et mesures. Toutes les cultures sont réalisées en triplicata et ensemencées à une densité optique de 0,1 (à 750 nm). Les cultures hétérotrophes et mixotrophes contiennent également du glucose à une concentration finale de 10g/L. De manière générale, les bouteilles étaient remplies, mais dans certains cas (indiqués dans la partie 'Résultats'), des cultures de 30 mL de *C. sorokiniana* ont été ensemencées dans les mêmes conditions afin d'évaluer l'importance du volume de la phase gazeuse présente dans les bouteilles.

Les bouteilles sont ensuite placées sur agitateur (RS-TR05, Phoenix instrument) à 60 rpm. Toutes les cultures sont maintenues à une température constante de 25°C. De plus, les cultures autotrophes et mixotrophes sont exposées à une lumière constante de 60 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tandis que les cultures hétérotrophes sont entourées de papier aluminium de manière à les maintenir à l'obscurité.

3. Suivi des cultures

Des mesures de concentration en oxygène dissous ont été réalisées quotidiennement. De plus, des prélèvements journaliers à l'aide de seringues ont permis le suivi des croissances ainsi que le comptage cellulaire et la mesure des diamètres aux jours 0, 2 et 4. Finalement, la biomasse a été récupérée après quatre jours par centrifugation (voir plus bas). De plus, un suivi de l'évolution de la biomasse des cultures mixotrophes de *C. sorokiniana* à 60ml a également été réalisé.

Les croissances ont été suivies par mesure de densité optique à 750 nm au spectrophotomètre (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech) dans des cuvettes de 1mL (cuvette semi-micro, Greiner bio-one). Les comptages cellulaires, quant à eux, ont été réalisés à l'aide d'une cellule de numération de Neubauer (Neubauer Improved, Hecht Assistant). Enfin, la mesure des diamètres des microalgues a été effectuée à l'aide du programme Image J.

Le degré de saturation en oxygène dans les bouteilles, exprimé en pourcentage, est obtenu par mesures optiques durant 5 jours à l'aide d'un senseur à oxygène possédant une fibre optique rétractable (FireStingO2 et Type Oxygen Sensor, Pyroscience). Sa calibration se fait à l'air ambiant pour le 100% et dans de l'eau contenant du dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) pour le 0%. La fibre optique et l'intérieur de l'aiguille sont nettoyés à l' H_2O_2 3% puis rincés à l'eau distillée avant et après chaque utilisation.

La biomasse est récupérée au jour 4, 20mL de chaque échantillon ont été prélevés dans des falcons et centrifugés 5 min à 3000g, le surnageant est retiré. Les culots ont ensuite été rincés dans 5mL d'eau distillée et l'étape précédente a été répétée. Les culots obtenus ont été resuspendus dans 500 μL d'eau distillée et déposés sur des papiers filtres Wathman (Glass Microfiber Filters, GF/C, 42.5 mm \varnothing , Whatman) ou resuspendus dans 1mL d'eau distillée et déposés dans des cuvettes en aluminium (VWR) préalablement taré(e)s. Le séchage est réalisé à 70°C dans une étuve pendant trois jours. Les papiers filtres ou cuvettes chargés de biomasse sont ensuite pesé(e)s à la balance. Finalement, les papiers filtres et les cuvettes en aluminium ont été pesé(e)s et la biomasse est calculée par différence entre les poids mesurés et ceux obtenus lors de la tare.

4. Dosage du glucose

Aux jours 0, 2 et 4, 1 ml de chaque bouteille (triplicata) de culture mixotrophe et hétérotrophe de *C. sorokiniana* à 60ml sont prélevés. Ils sont ensuite centrifugés 4 min à 16000g, les surnageants sont gardés et les culots jetés. Les surnageants sont ensuite filtrés avec des filtres de 13 mm avec une membrane de 0.2 μm en PES (IC Acrodisc, Pall Corporation).

Les échantillons sont ensuite injectés dans un système d'HPLC (Shimadzu) et les solutés sont séparés par phase normale à l'aide d'une colonne à exclusion d'ions Supelcogel C610-H (6% Crosslinked, 9µm particle size, L x I.D. 30 cm x 7.8 mm, Sigma-Aldrich). L'élution est réalisée en mode isocratique avec, comme solvant, du H₃PO₄ 0.1%, à une température de 35°C et avec un débit de 0.5ml/min, pendant 35 min. L'équipement HPLC est composé d'un injecteur SIL-20ACXR, d'une pompe LC-20ADXR, d'une unité de dégazage DGU-20A3R, d'un four CTO-20A, d'un détecteur à indice de réfraction RID-20A et d'un module de communication CBM-20A. Le programme LabSolution (Shimadzu) est utilisé pour contrôler l'équipement, collecter les données et les analyser. La concentration en glucose est calculée sur la base de l'aire du pic avec comme étalon un standard externe préparé au préalable (Roth).

5. Dosage des acides gras (FAMES)

Une quantité de microalgues correspondant à 3mg de biomasse sèche est prélevée pour chaque triplicata des cultures mixotrophes aux jours 0, 2 et 4. Les échantillons sont ensuite centrifugés et les surnageants ôtés. Les FAMES (« fatty acid methyl esters ») en sont extraits comme suit : des billes de verre (0.75-1mm) sont ajoutées au culot de chaque échantillon et 500µl de solvant d'extraction (CHCl₃/MeOH 2:1) y sont ajoutés. Ils sont ensuite broyés à l'aide d'un TissueLyser (Qiagen) à 25Hz pendant 5min, puis laissés sur vibrax (VXR basic, Ika) pendant 15 min et ensuite centrifugés 4 min à 16000g. Le surnageant est ôté et transféré dans un eppendorf de 2mL. Ces étapes sont répétées avec 250µl de solvant d'extraction. Les surnageants récupérés sont « poolés » aux précédents. Les culots sont réextraits une dernière fois en les plaçant 15 min sur vibrax avec 200µl de solvant d'extraction. Les surnageants précédemment poolés sont replacés dans les échantillons de départ et les eppendorfs ayant servi à la récupération des surnageants sont rincés avec 50µl de solvant d'extraction. Les extraits sont alors centrifugés 4 min à 16000g. 800µl du surnageant sont prélevés et mis dans un eppendorf, 1mL de NaCl 0,9% y est ajouté. Les échantillons sont vortexés. Ils sont ensuite centrifugés à 16000g pendant 4min et la phase aqueuse est enlevée. Les phases chloroformées sont transférées dans des vials GC et mis à sécher 'overnight' sous hotte chimique.

Ensuite, 1mL de réactif de méthylation (33% HCl méthanolique 3N, 67% MeOH, 10µg/mL BHT) est ajouté. Les vials sont scellés, vortexés et incubés 1h à 70°C. Les extraits sont transvasés dans des eppendorfs et 200µL d'heptane sont ajoutés. Les échantillons sont vortexés et centrifugés. La phase heptane est conservée et les extractions des FAMES dans l'heptane sont répétées trois fois.

Les échantillons sont ensuite injectés dans un système GC (GC-2010 plus, Shimadzu), en mode split (1µL est injecté et le ratio de split est de 10). Les échantillons sont alors envoyés automatiquement sur une colonne SGE 30m x 0,25mm (ID : BPX70 x 0,25µm). L'élution est réalisée grâce à un gradient de température de 120 à 240°C et de 4°C/min. L'équipement GC est composé d'un auto-injecteur AOC-

20i et d'un four GC-2010Plus. Le programme LabSolution (Shimadzu) est utilisé pour contrôler l'équipement, collecter les données et les analyser. La concentration en acides gras est basée sur l'aire du pic et calculée à l'aide d'un standard (CRM47885, Sigma-Aldrich).

6. Analyse de la photosynthèse

a. Mesures de la fluorescence de la chlorophylle a

Les mesures de fluorescence, prises aux jours 2, 3 et 4, ont été effectuées de deux manières. (cf. introduction)

Premièrement, des mesures de fluorescences de la chlorophylle *a*, réalisées simultanément aux mesures d'échange d'oxygène, ont été enregistrées à l'aide d'un fluorimètre PAM (Pulse Amplitude Modulated) (Fluorescence Monitoring System, Hansatech). Pour ce faire, des échantillons de 1mL ont été acclimatés à l'obscurité pendant 5 min avant d'être placés dans une cuvette close de 2mL. Ensuite 10µL de NaHCO₃ 1M ont été ajoutés dans la cuvette. Des paliers d'intensité lumineuse croissante démarrant de 0 (obscurité) et séparés par des périodes d'obscurité ont été définis pour les mesures des échantillons. Les intensités lumineuses aux paliers successifs sont de 40, 80, 120, 200, 400 et 700 µmol photons.m⁻².s⁻¹. La première période d'obscurité dure deux minutes et les suivantes une minute. Les périodes éclairées durent deux minutes. Un pulse de lumière saturante d'une seconde est effectué à chacune de ces étapes. Les mesures de fluorescence permettent d'obtenir les paramètres ΦPSII et Fm' de chaque palier (relevés via le programme ModFluor). Ensuite ces paramètres permettent, pour chaque intensité lumineuse, le calcul de la vitesse relative du transport d'électrons (ETR_{relatif}) et du coefficient d'extinction non-photochimique (NPQ) (cf. introduction) grâce aux formules suivantes :

$$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$$

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F)/F_m'$$

$$ETR_{relatif} = \Phi_{PSII} * I_{incidente}$$

Où :

F_m est la valeur maximale du rendement de fluorescence lors d'un pulse saturant donné après adaptation à l'obscurité,

F_m' est la valeur maximale du rendement de fluorescence lors d'un pulse saturant donné après adaptation à la lumière,

F est la valeur du rendement de fluorescence après adaptation à la lumière,

$I_{\text{incidente}}$ est l'intensité de la lumière incidente, mesurée dans la cuvette et exprimée en $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Deuxièmement, des mesures d'induction de fluorescence au cours d'un pulse saturant ont été réalisées avec le fluorimètre Handy PEA (Hansatech). Il comporte une source de lumière LED produisant une lumière d'excitation à 660nm. Le flash de lumière est réglé à une intensité de 3500 $\mu\text{mol de photons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et dure deux secondes. Le fluorimètre effectue une mesure toutes les 10 microsecondes durant les deux premières millisecondes d'éclairement, puis toutes les 100 microsecondes ensuite. Ces mesures de fluorescences permettent d'obtenir les paramètres F_0 , F_m et $F_v (= F_m - F_0)$, ainsi que la cinétique d'augmentation du rendement de fluorescence depuis F_0 jusque F_m . Les analyses sont réalisées sur les bouteilles entières, restées closes et acclimatées à l'obscurité durant 5 min.

b. Mesures d'oxymétrie

La variation de la concentration en oxygène dissous est mesurée via une électrode de Clark connectée à la cuvette à laquelle le fluorimètre est aussi connecté (Oxy-lab, Hansatech) et est enregistrée parallèlement aux mesures de fluorescence de la chlorophylle *a* du premier type (PAM). L'étalonnage de l'électrode de Clark est réalisé à l'aide d'eau saturée en oxygène et d'eau contenant du dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). A la fin de chaque mesure, 1mL de l'échantillon de microalgues est récupéré pour permettre la normalisation des mesures par le dosage du contenu en chlorophylle (cf. 6.c).

La vitesse d'échange d' O_2 à chaque palier (périodes de lumière et d'obscurité) est relevée à l'aide du programme O2 View sur la base de la pente visible dans le graphique de la concentration en oxygène en fonction du temps. Les vitesses d'échange d' O_2 nettes et brutes sont ensuite rapportées à la concentration en chlorophylle et mises en graphique en fonction de l'intensité lumineuse.

c. Dosage des pigments

Les chlorophylles et caroténoïdes ont été extraits quotidiennement afin de suivre leurs évolutions. Les échantillons utilisés pour les mesures d'oxymétrie et de fluorescence sont également récupérés pour l'extraction de leurs pigments. En effet, le dosage du contenu total en chlorophylle permet la normalisation des mesures d'oxymétrie (voir plus haut).

Ainsi, les échantillons ont été centrifugés à 16000g pendant 3 minutes. Le surnageant a été retiré et des billes de verre (0.75-1mm) ont été ajoutées au culot de chaque échantillon. Les culots ont ensuite été re-suspendus dans 500 μL de méthanol 100%. Les échantillons ont été broyés au TissueLyser pendant 5 minutes à une fréquence de 25Hz, puis agités sur vibrax pendant 30 minutes à l'obscurité. Ils ont ensuite été centrifugés 4 minutes à 16000g. Les surnageants ont été ôtés et transférés dans des

pendorfs. 500µL de méthanol ont été ajoutés aux culots et les échantillons ont été agités sur vibrax pendant 15 min à l'obscurité. Ils ont ensuite été centrifugés 4 minutes à 16000g. Les surnageants précédents ont ensuite été « poolés » avec ceux déjà obtenus.

Les échantillons ont finalement été passés au spectrophotomètre (Lambda 20, Perkin Elmer) et les concentrations de chlorophylles et caroténoïdes calculées grâce aux formules suivantes (A.R. Wellburn, 1994):

$$Ca = 15,65 \times A_{666} - 7,34 \times A_{653}$$

$$Cb = 27,05 \times A_{653} - 11,21 \times A_{666}$$

$$Cx+c = (1000 \times A_{470} - 2,28 \times Ca - 129,2 \times Cb) / 221$$

Avec: Ca, la concentration en chlorophylle *a*, Cb la concentration en chlorophylle *b* et Cx+c la concentration en caroténoïdes (xanthophylles + carotènes), exprimées en µg.mL⁻¹. A666 l'absorbance à 666 nm A653 l'absorbance à 653 nm et A470 l'absorbance à 470 nm.

Résultats

1. Analyse de la croissance

Comme mentionné précédemment (cf introduction pt 2) *C. sorokiniana* et *Chlorella* sp. peuvent croître dans différentes conditions. En présence d'une source de carbone organique et dans le noir (hétérotrophie), en présence d'une source de carbone organique et de lumière (mixotrophie) ou seulement de lumière (autotrophie). Dans cette partie nous avons suivi les croissances (à $60 \mu\text{mol de photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) de ces deux souches en milieu clos avec une concentration en glucose de 10 g.L^{-1} pour l'hétérotrophie et la mixotrophie (Fig. 8). La croissance a pu être suivie par mesure de la densité optique à 750nm , comptage des cellules de *C. sorokiniana* ainsi que la mesure de leurs diamètres. De plus, la biomasse a été récupérée après quatre jours, à la fin de l'expérience.



Figure 8 A et B : Photo de cultures de *C. sorokiniana* en flacons scellés en conditions hétérotrophe (trait plein, avec et sans emballage d'aluminium), autotrophe (pointillés) et mixotrophe (tirets) après 3 jours de culture.

a. Densité optique et biomasse

Sur les courbes de la figure 9, représentant l'évolution de la densité optique de *C. sorokiniana* en culture de 60mL, on peut constater que la densité optique atteinte après quatre jours en mixotrophie est de $6,99 \pm 1,16$ alors qu'elle n'est que de $0,256 \pm 0,064$ et $0,223 \pm 0,151$ en hétérotrophie et autotrophie respectivement. La biomasse sèche moyenne atteinte après quatre jours, quant à elle, est de $1,58 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$ en mixotrophie, $0,072 \pm 0,008 \text{ g.L}^{-1}$ en hétérotrophie et $0,0475 \pm 0,0177 \text{ g.L}^{-1}$ en autotrophie. Une croissance substantielle se produit clairement en mixotrophie alors que la densité optique en hétérotrophie et autotrophie reste stable et leurs biomasses peu élevées (la biomasse de départ étant de $0,025 \pm 0,0003 \text{ g.L}^{-1}$). Finalement, on peut aussi noter que la croissance mixotrophe est moins rapide lors des premier et dernier jours d'expérience.

L'évolution de la biomasse en fonction de la densité optique de *C. sorokiniana* 60mL en mixotrophie a également été calculée (voir figure en annexe 1).

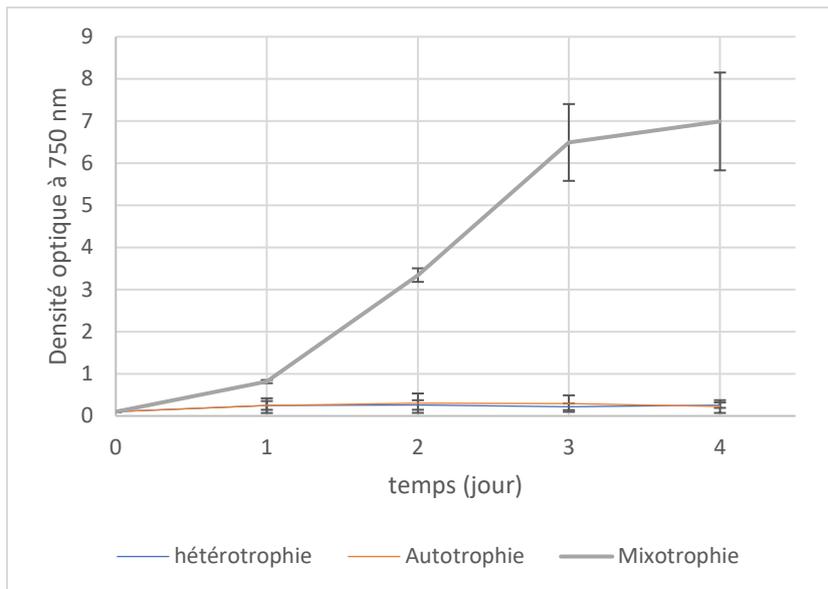


Figure 9 : Evolution de la densité optique de *C. sorokiniana* en flacons scellés remplis de 60mL dans différentes conditions de culture : hétérotrophie (bleu), autotrophie (orange) et mixotrophie (gris). L'intensité lumineuse était fixée à $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et la concentration en glucose (pour l'hétérotrophie et la mixotrophie) à 10g.L^{-1} . Les données sont représentées sous formes de moyennes \pm écart-type.

Les courbes de la figure 10 représentent la croissance de *C. sorokiniana* dans les bouteilles remplies à 30mL afin d'évaluer l'effet du partage entre la phase liquide et la phase gazeuse dans les bouteilles. On peut constater une forte croissance de mixotrophe avec un maximum atteint après trois jours ainsi qu'une faible croissance hétérotrophe. Cependant la densité optique reste stable en autotrophie. La biomasse sèche moyenne atteinte après quatre jours est de $3,02 \pm 0,09 \text{g.L}^{-1}$ en mixotrophie, $0,55 \pm 0,02 \text{g.L}^{-1}$ en hétérotrophie et $0,033 \pm 0,023 \text{g.L}^{-1}$ en autotrophie.

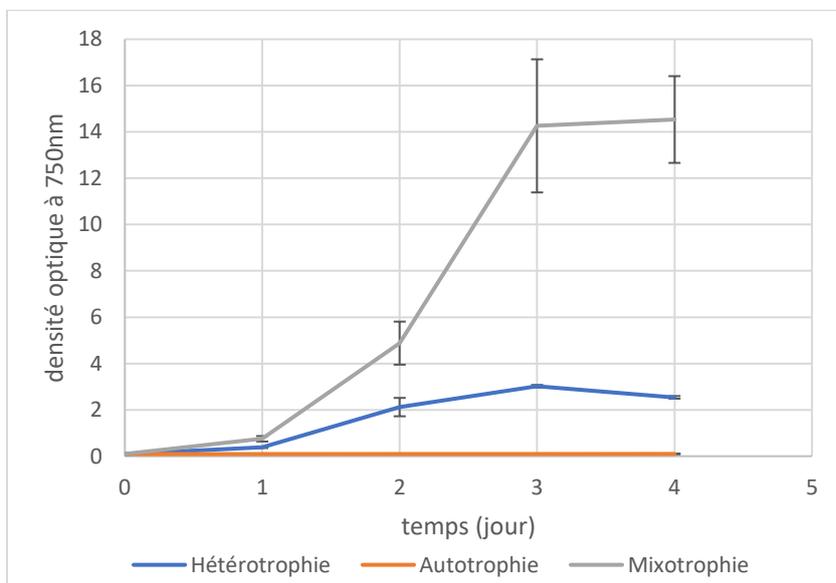


Figure 10 : Evolution de la densité optique de *C. sorokiniana* en flacons scellés de 60ml contenant 30 ml de culture dans différentes conditions: hétérotrophie (bleu), autotrophie (orange) et mixotrophie (gris). L'intensité lumineuse était fixée à $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et la concentration en glucose (pour l'hétérotrophie et la mixotrophie) à 10g.L^{-1} . Les données sont représentées sous formes de moyennes \pm écart-type.

Enfin, la figure 11 représente la croissance de *Chlorella* sp. dans les bouteilles remplies à 60mL. On peut constater une forte croissance mixotrophe avec un maximum atteint après quatre jours. Cependant la densité optique reste stable en autotrophie et hétérotrophie. La biomasse sèche

moyenne atteinte après quatre jours est de $2,06 \pm 0,24 \text{ g.L}^{-1}$ en mixotrophie, $0,0552 \pm 0,0006 \text{ g.L}^{-1}$ en hétérotrophie et $0,0169 \pm 0,0001 \text{ g.L}^{-1}$ en autotrophie. Un plateau de croissance est atteint après le quatrième jour.

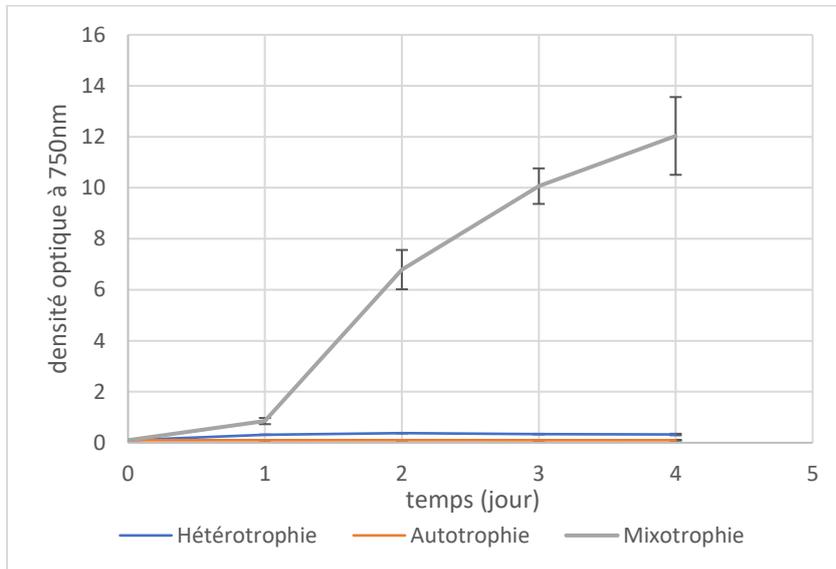


Figure 11 : Evolution de la densité optique de *Chlorella* sp. en flacons scellés remplis de 60mL dans différentes conditions de culture: hétérotrophie (bleu), autotrophie (orange) et mixotrophie (gris). L'intensité lumineuse était fixée à $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et la concentration en glucose (pour l'hétérotrophie et la mixotrophie) à 10 g.L^{-1} . Les données sont représentées sous formes de moyennes \pm écart-type.

La figure 12 représente les taux de croissance spécifique (μ_{max}) en phase exponentielle par jour de *C. sorokiniana* en culture de 60 et 30mL et de *Chlorella* sp, ils peuvent être calculés à partir des mesures de densité optique.

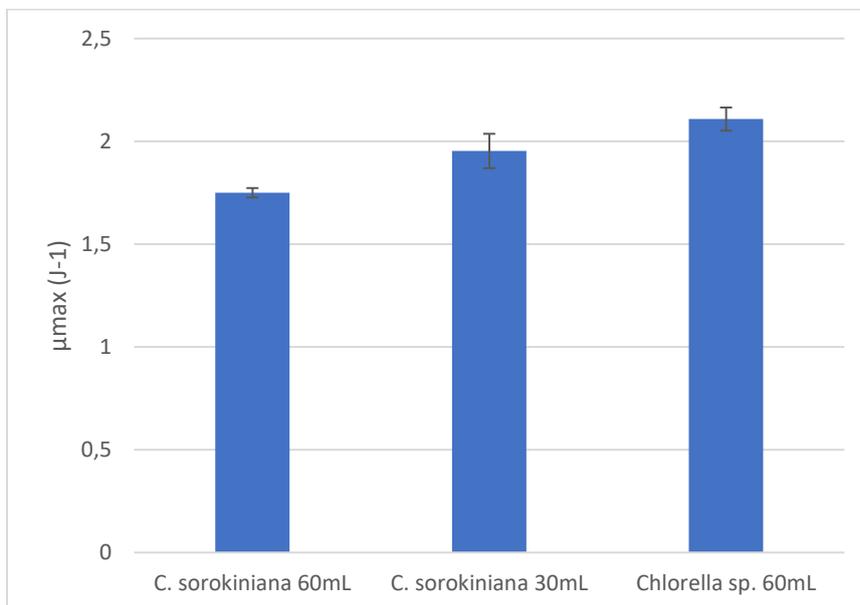


Figure 12 : Taux de croissance spécifique (μ_{max}) en phase exponentielle des cultures mixotrophes de *C. sorokiniana* en de 60 et 30mL et de *Chlorella* sp. en flacons scellés. Les données sont représentées sous formes de moyennes \pm écart-type.

b. Comptage

L'évaluation de la croissance a également pu être réalisée par comptage. Les résultats de ces comptages, réalisés sur *C. sorokiniana* 60mL en hétérotrophie, autotrophie et mixotrophie sont représentés sur la figure 13. Il est important de noter que les échantillons mixotrophes utilisés pour le comptage n'ont atteint qu'une densité optique de $4,16 \pm 0,28$ contrairement aux échantillons précédant ayant atteint une densité optique de $6,99 \pm 1,16$. Il est possible que les volumes des cultures utilisées pour le comptage aient été plus élevés du fait de prélèvements de volumes moins importants tout au long de l'expérience. On peut tout de même constater une forte augmentation du nombre de cellules en mixotrophie, une faible augmentation en hétérotrophie, et une stabilité en autotrophie, ce qui corrobore globalement les résultats de densité optique.

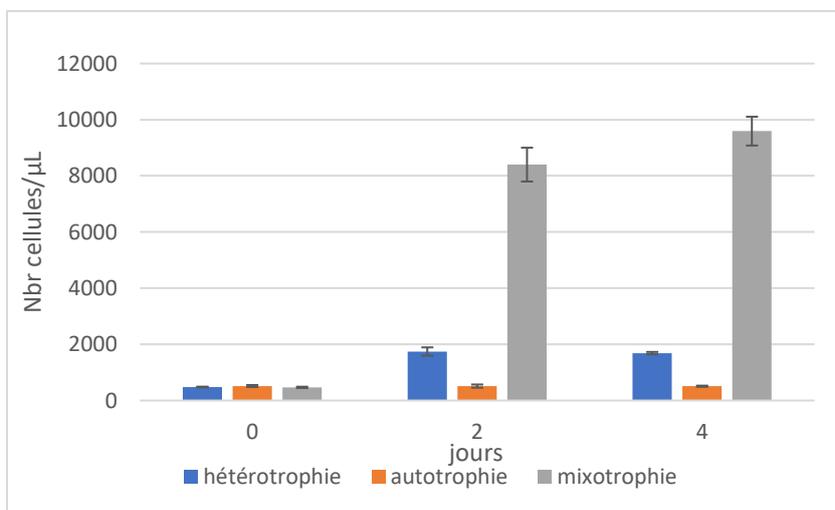


Figure 13 : Evolution du nombre de *C. sorokiniana* 60mL par condition de culture. Les comptages ont été effectués aux jours 0, 2 et 4 et sont exprimés en nombre de cellule par μL . Les cultures hétérotrophes sont représentées en bleu, les autotrophes en orange et les mixotrophes en gris.

c. Diamètre

Les diamètres des cellules de *C. sorokiniana* 60mL ont pu être mesurés aux jours 0, 2 et 4. Les résultats montrent une augmentation significative du diamètre des microalgues tout au long de la croissance en autotrophie ($p < 0,05$) ainsi qu'en mixotrophie entre le jour 0 et le jour 2 ($p < 0,05$).

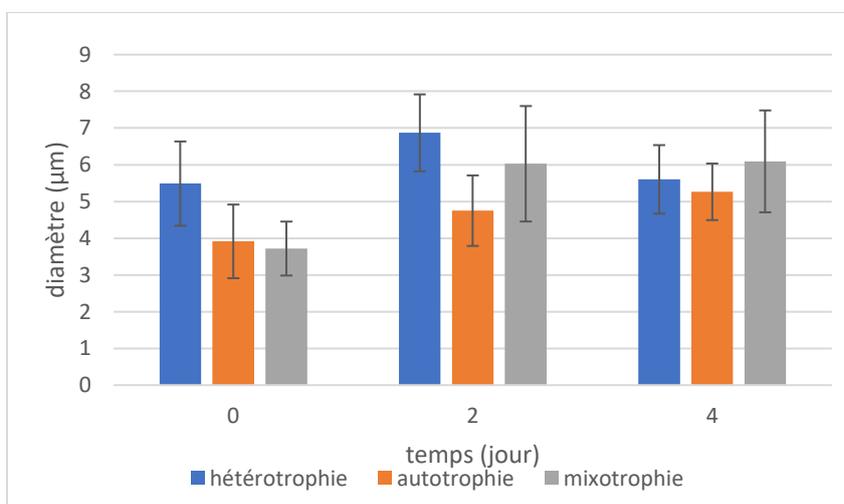


Figure 14 : Evolution du diamètre des cellules de *C. sorokiniana* 60mL dans différentes conditions de culture. Les mesures des diamètres ont été effectuées aux jours 0, 2 et 4. Les cultures hétérotrophes sont représentées en bleu, les autotrophes en orange et les mixotrophes en gris.

2. Evolution du milieu

Après avoir analysé la croissance des algues dans les différentes conditions, il est important de se pencher sur l'évolution du milieu dans ces mêmes conditions en parallèle avec la croissance. Deux paramètres ont été mesurés ici, l'évolution de la concentration en oxygène dissous dans les bouteilles closes ainsi que l'évolution de la concentration en glucose présent dans le milieu. De ce deuxième paramètre, on calculera facilement la consommation de glucose lors de la croissance hétérotrophe et mixotrophe.

L'évolution du pH a également été contrôlée et montre une légère diminution entre le jour 0, à un pH de $5,8 \pm 0,1$, et le jour 4, à $5,1 \pm 0,1$.

a. Evolution de la concentration en oxygène dissous

Les courbes de la figure 15 représentent l'évolution de la concentration en oxygène dissous de *C. sorokiniana* en cultures scellées de 60mL (flacons remplis). Le niveau d'oxygène a été suivi durant quatre jours pour les trois conditions de culture. On peut constater que le niveau d'oxygène en autotrophie reste stable, autour de 100 % de saturation, alors que l'oxygène est rapidement et totalement consommé en hétérotrophie. En mixotrophie, les algues produisent plus d'oxygène qu'elles n'en consomment pendant les deux premiers jours jusqu'à atteindre un maximum à 350% d'oxygène dissous. Suite à cela, l'oxygène est consommé pour atteindre 0% le jour suivant et ne réaugmente plus. On notera que, dans les courbes de croissance mixotrophe, la phase stationnaire est atteinte après 3 jours, c'est-à-dire au moment où l'anoxie est établie (Fig. 9).

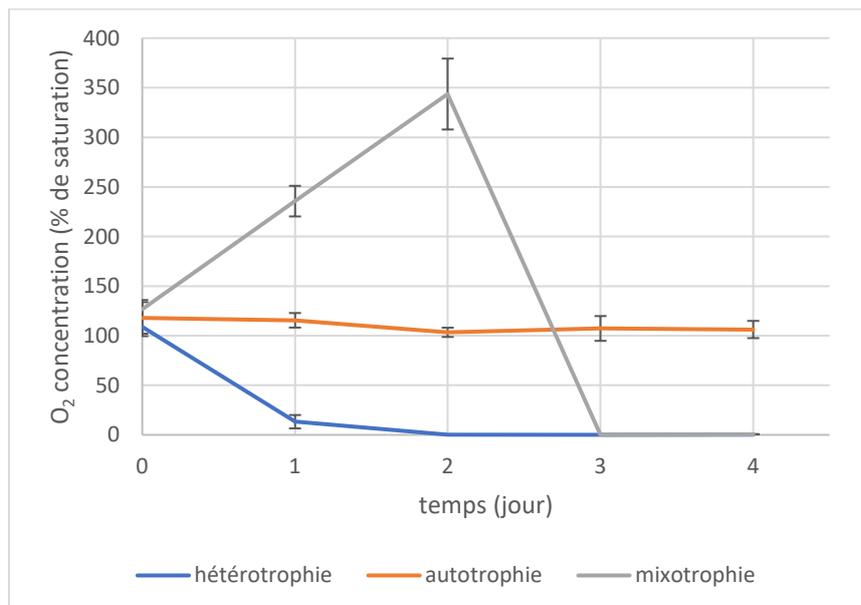


Figure 15 : Evolution de la concentration en oxygène dissous dans les cultures de *C. sorokiniana* 60mL en différents modes trophiques : hétérotrophie (bleu), autotrophie (orange) et mixotrophie (gris). L'intensité lumineuse était fixée à $60 \mu\text{mol de photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et la concentration en glucose (pour l'hétérotrophie et la mixotrophie) à $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. La saturation en oxygène est exprimée en % par rapport à l'air. Les données sont représentées sous formes de moyennes \pm écart-type.

L'évolution de la saturation en oxygène sur quatre jours de culture de *C. sorokiniana* en flacons partiellement remplis de liquide (30mL) montre également une stabilité de l'oxygène dissous en autotrophie. En hétérotrophie, cependant, l'oxygène dans la bouteille prend plus de temps à être consommé que pour des cultures de 60 ml. En mixotrophie, le niveau d'oxygène évolue qualitativement de manière similaire aux cultures présentant un volume plus important (sur-saturation puis diminution menant à l'anoxie). Néanmoins, la valeur maximale est beaucoup moins élevée (de l'ordre de 150% au lieu de 350 %) et l'oxygène accumulé les deux premiers jours est consommé moins rapidement par la suite. On se rappellera que dans ces conditions, la croissance (densité optique et biomasse) était meilleure, et que la phase stationnaire était atteinte après 4 jours au lieu de 3 jours, ce qui peut être corrélé à un établissement plus tardif de l'anoxie.

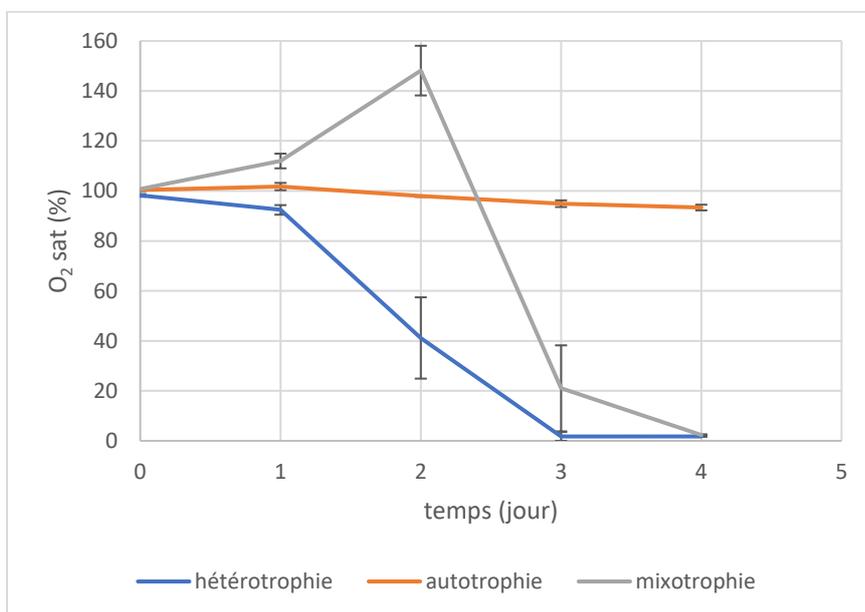


Figure 16 : Evolution de la saturation en oxygène de *C. sorokiniana* pour des cultures de 30mL en différents modes trophiques : hétérotrophie (bleu), autotrophie (orange) et mixotrophie (gris). L'intensité lumineuse était fixée à $60 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et la concentration en glucose (pour l'hétérotrophie et la mixotrophie) à $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. La saturation en oxygène est exprimée en % par rapport à l'air. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm écart-type.

L'évolution de la saturation en oxygène de *Chlorella* sp. pour les différentes conditions de cultures montre des comportements similaires à ceux de *C. sorokiniana* cultivée dans le même volume (60mL, flacons remplis). Il présente toutefois une très grande variabilité au troisième jour, lors de la consommation de l'oxygène en culture mixotrophe après avoir également atteint un pic de saturation d'oxygène. Cette variabilité est illustrée par une figure en annexe (annexe 2).

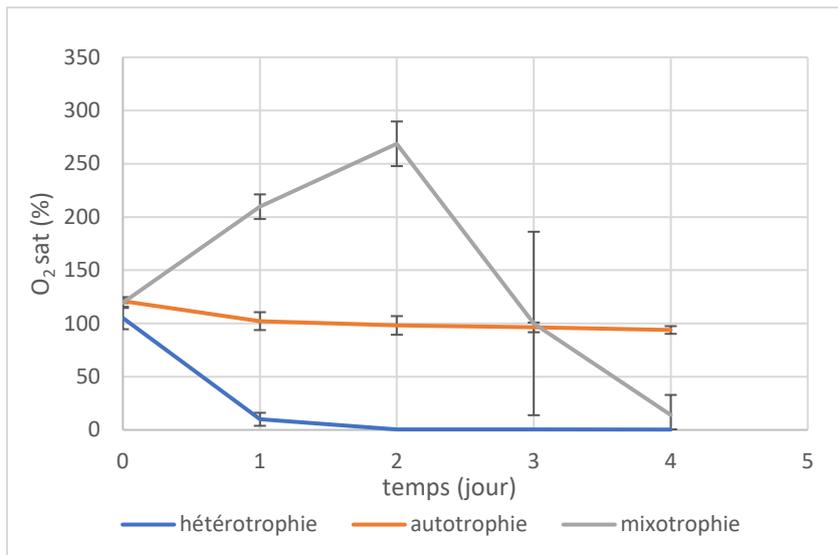


Figure 17 : Evolution de la saturation en oxygène de *Chlorella* sp. (60 ml) en différents modes trophiques : hétérotrophie (bleu), autotrophie (orange) et mixotrophie (gris). L'intensité lumineuse était fixée à $60 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et la concentration en glucose (pour l'hétérotrophie et la mixotrophie) à $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. La saturation en oxygène est exprimée en % par rapport à l'air. Les données sont représentées sous formes de moyennes \pm écart-type.

b. Evolution de la concentration en glucose, et détection d'un produit de fermentation

La concentration en sucre a été analysée par HPLC afin de déterminer la consommation de glucose en hétérotrophie et en mixotrophie. Les chromatogrammes des milieux des cultures mixotrophes aux premier et dernier jours sont présentés aux figures 18 et 19.

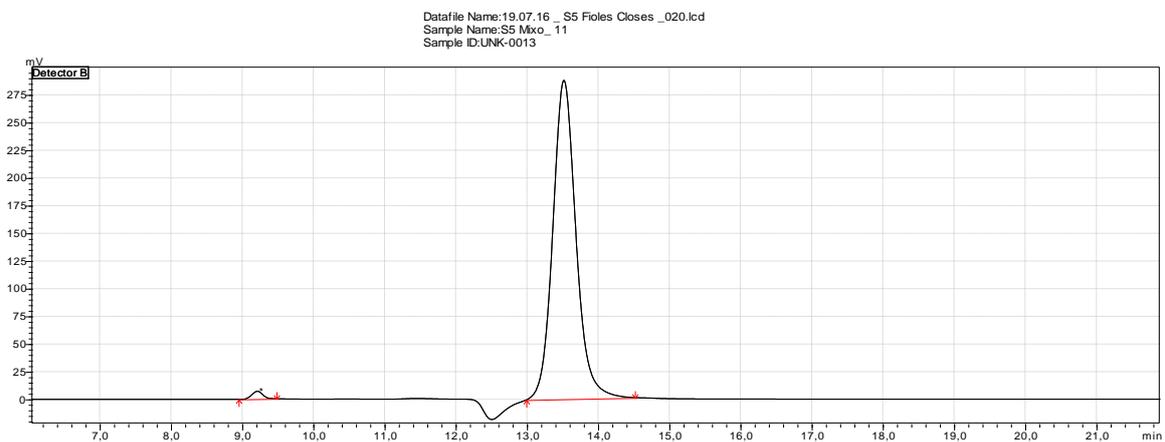


Figure 18 : Chromatogramme du milieu de culture au début de la culture mixotrophe (jour 0). Le pic au temps de rétention 13,52 min correspond au glucose.

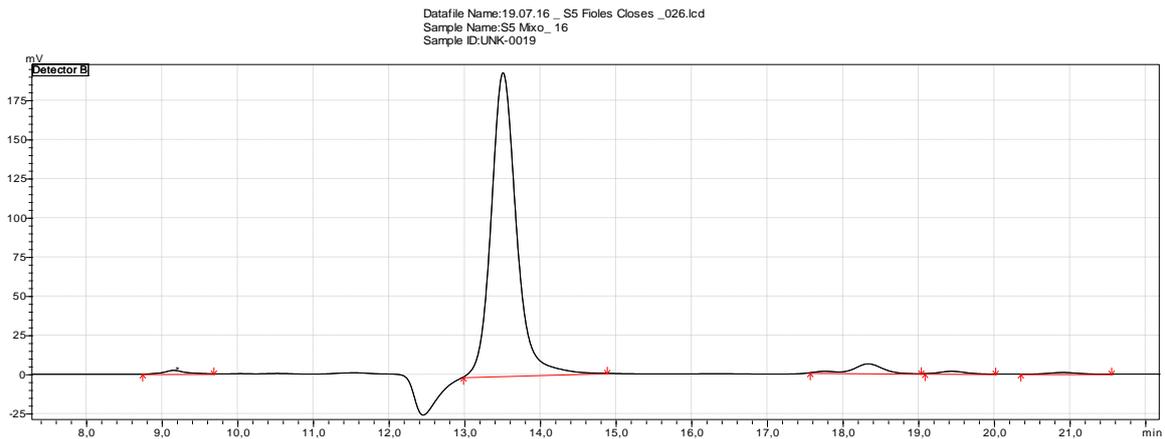


Figure 19 : Chromatogramme du milieu de culture au quatrième jour de la culture mixotrophe. Le pic au temps de rétention 13,52 min correspond au glucose et celui à 18,3 min au succinate. Il y a également apparition de deux pics à 19,4 et 20,9 min ne correspondant pas à des composés présents dans le standard.

Il est important de noter que le pic correspondant au succinate ainsi que les deux pics correspondant à des composés inconnus n'apparaissent que sur les chromatogrammes des cultures au quatrième jour en mixotrophie. Le succinate est présent à une concentration de $0,273 \pm 0,083 \text{ g.L}^{-1}$.

Les concentrations de glucose sont présentées à la figure 20. Ces données combinées à la quantité connue de biomasse nous permettent d'obtenir le rendement de la formation de biomasse par quantité de glucose consommée. Ce rendement est de 0,5 pour la mixotrophie et de 0,16 pour l'hétérotrophie. On peut voir que le glucose a été consommé en plus grande quantité en mixotrophie qu'en hétérotrophie.

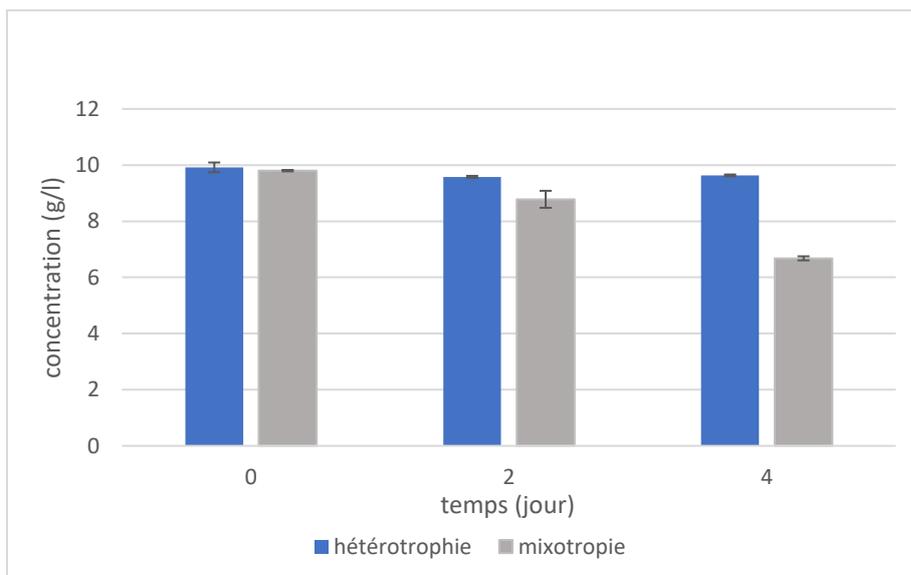


Figure 20 : Evolution de la concentration en glucose de cultures de *C. sorokiniana* 60mL en différents modes trophiques. Les données sont montrées sous formes de moyennes \pm écart-type. Les cultures hétérotrophes sont représentées en bleu et les mixotrophes en gris

3. Evolution de la composition de la biomasse

La condition mixotrophe ayant permis la croissance en milieu clos et la récupération de biomasse, l'évolution du contenu de cette biomasse a pu être suivi. Des analyses du contenu en acides gras aux jours 0, 2 et 4 ainsi qu'un dosage quotidien des pigments (chlorophylles et caroténoïdes) ont été effectués.

a. Analyse des acides gras

Le contenu total initial en acides gras était de $40 \pm 0,9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de masse sèche (soit 4% de la biomasse). Au deuxième jour, lorsque le pic de saturation d'oxygène est atteint, la quantité totale d'acides gras descend à $18,46 \pm 0,76$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ pour ensuite remonter à 34 ± 3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ le dernier jour après consommation de l'oxygène. Les différents acides gras retrouvés ainsi que leurs proportions (en %) par rapport au total des acides gras par jour sont décrits dans le tableau 1. Ainsi nous pouvons constater que, si les acides gras possédant 18 atomes carbones représentent toujours environ 60% de la quantité totale en acide gras, les proportions d'acide stéarique et acide cis-9-oléique doublent au quatrième jour. Il y a également disparition des acides docosanoïque et lignocérique (présents seulement en traces) au quatrième jour ainsi que de l'acide palmitoléique à partir du deuxième jour. Les acides gras majoritaires restent l'acide palmitique, l'acide linoléique et l'acide linoléique.

Tableau 1 : Proportions des différents acides gras (esters méthyliques d'acides gras) par rapport au total, aux différents jours de cultures mixotrophes. Les données sont exprimées en pourcentage (moyennes \pm écart-type sur trois expériences indépendantes).

Composant (%)	Jour 0	Jour 2	Jour 4
Octanoic acid (C8:0)	2,047 \pm 0,03	4,286 \pm 0,072	2,329 \pm 0,083
Decanoic acid (C10:0)	1,378 \pm 0,019	2,866 \pm 0,013	1,589 \pm 0,081
Tetradecanoic acid (C14:0)	3,851 \pm 0,199	4,445 \pm 0,003	4,117 \pm 0,284
Palmitic acid (C16:0)	30,858 \pm 0,202	30,508 \pm 0,963	29,36 \pm 2,04
Palmitoleic acid (C16:1)	1,847 \pm 0,098	0	0
Stearic acid (C18:0)	4,522 \pm 0,544	4,006 \pm 0,097	8,536 \pm 0,636
Cis-9-oleic acid (C18:1n9c)	2,362 \pm 0,034	3,36 \pm 0,23	7,836 \pm 1,708
Linoleic acid (C18:2n6c)	22,484 \pm 0,648	13,832 \pm 0,524	15,548 \pm 1,554
Linolenic acid (C18:3n3)	30,292 \pm 0,412	36,089 \pm 2,181	30,685 \pm 2,637
Docosanoic acid (C22:0)	0,236 \pm 0,004	0,478 \pm 0,005	0
Lignoceric acid (C24:0)	0,124 \pm 0,023	0,131 \pm 0,011	0

b. Analyse des pigments

Les pigments dosés par spectrophotométrie sur des extraits méthanoliques sont les chlorophylles *a* et *b* (Fig. 21) ainsi que les caroténoïdes totaux (xanthophylles et carotènes) (Fig. 22). La concentration en pigments a été suivie quotidiennement sur la souche *C. sorokiniana* en culture de 60mL et exprimée sur base du poids sec.

Comme montré sur la figure 21, la teneur de la biomasse en chlorophylles (a+b) diminue durant les deux premiers jours, correspondant à la phase d'augmentation de la concentration en oxygène dissous, pour ensuite se stabiliser lors des deux derniers jours.

Les teneurs en caroténoïdes totaux montrées à la figure 22 sont très variables du jour 0 au jour 2 pour ensuite se stabiliser aux alentours de 1 µg/mg de masse sèche lors des deux derniers jours. On peut faire remarquer ici que cette mesure des caroténoïdes est une mesure spectrophotométrique des caroténoïdes totaux, sur base de l'absorbance des extraits à 470 nm. Comme les caroténoïdes comprennent diverses molécules ayant des spectres d'absorbance différents, et en proportion variable, cette mesure doit être considérée comme un 'proxi', et non comme une quantification absolue (qui requiert des analyses par HPLC).

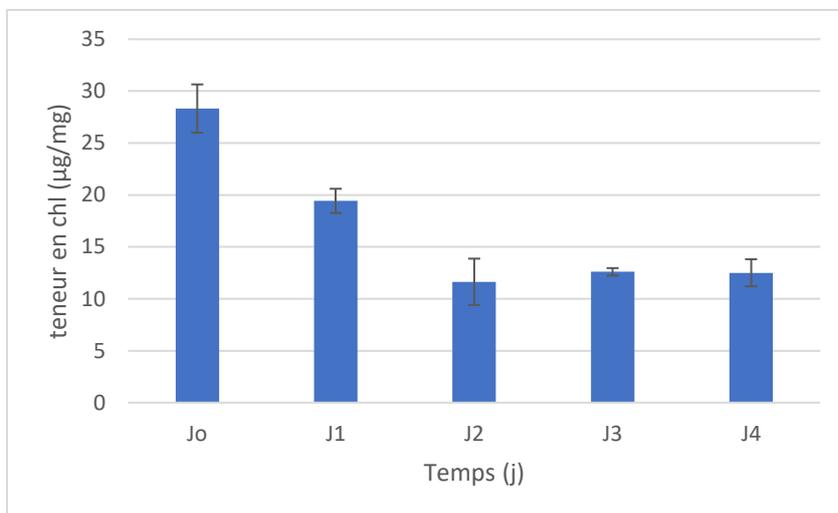


Figure 21 : Teneurs de la biomasse en chlorophylles (a + b) de *C. sorokiniana* 60mL en cultures mixotrophes. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type sur trois expériences indépendantes.

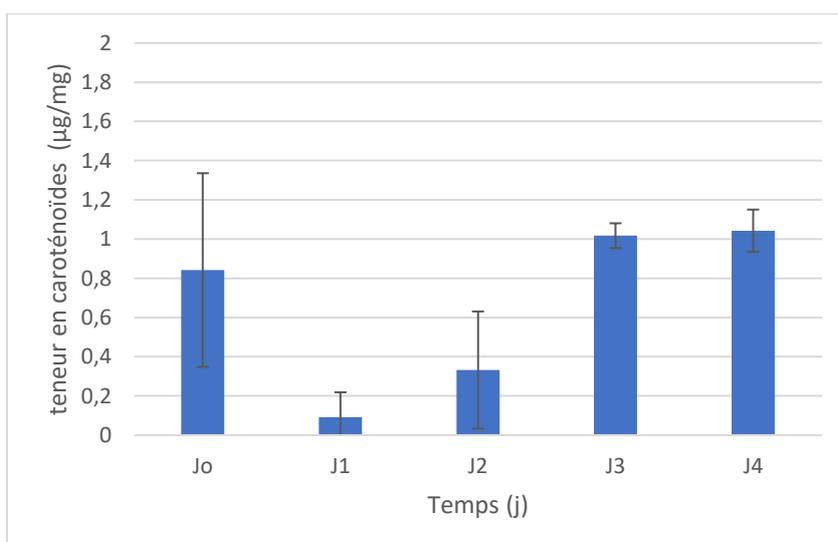


Figure 22 : Teneurs de la biomasse en caroténoïdes de *C. sorokiniana* 60mL en cultures mixotrophes. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± écart-type sur trois expériences indépendantes.

4. Analyse de la photosynthèse

Les analyses photosynthétiques ont été réalisées après 2, 3 et 4 jours de cultures sur des cultures de 60mL (flacons remplis) mixotrophes de *C. sorokiniana* adaptées à l'obscurité. Des mesures de fluorescence modulée de la chlorophylle *a* à 25°C, des mesures d'oxymétrie ainsi que des mesures d'induction de fluorescence ont été réalisées de sorte à obtenir les paramètres suivants : F_0 , F_m , F_m' , F , la vitesse de dégagement d'oxygène nette et de la respiration à l'obscurité. Sur base de ces paramètres, nous pouvons calculer les grandeurs permettant l'analyse des caractéristiques photosynthétiques (cf. introduction). (détails des calculs dans le matériel et méthodes)

a. Mesures de fluorescence de la chlorophylle *a*

Les mesures de fluorescences sont effectuées en soumettant les algues à des paliers lumineux d'intensité croissante (40, 80, 120, 200, 400 et 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et entrecoupés de périodes d'obscurité. Combinées avec des mesures d'oxymétrie cela permet d'obtenir les courbes de la vitesse de dégagement d'oxygène nette, du dégagement d'oxygène brut, de la respiration à l'obscurité et de la vitesse de transport des électrons apparente en fonction de l'intensité lumineuse ainsi que de déterminer le coefficient d'extinction non-photochimique. Les mesures ont été prises aux deuxième, troisième et quatrième jours de culture (figures 23 à 25). Les vitesses d'échange d'oxygène sont normalisées sur la chlorophylle totale ($a+b$) présente dans les échantillons. Les vitesses de dégagement d'oxygène et de respiration de la figure 25 (jour 4) n'ont pu être mesurées que jusqu'à une intensité lumineuse de 120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cela est dû à une concentration en oxygène initiale trop faible ainsi qu'une consommation trop importante (due à la respiration), la concentration d'oxygène ayant atteint 0 après cette intensité lumineuse il n'a plus été possible de mesurer les variations de vitesse de dégagement d'oxygène.

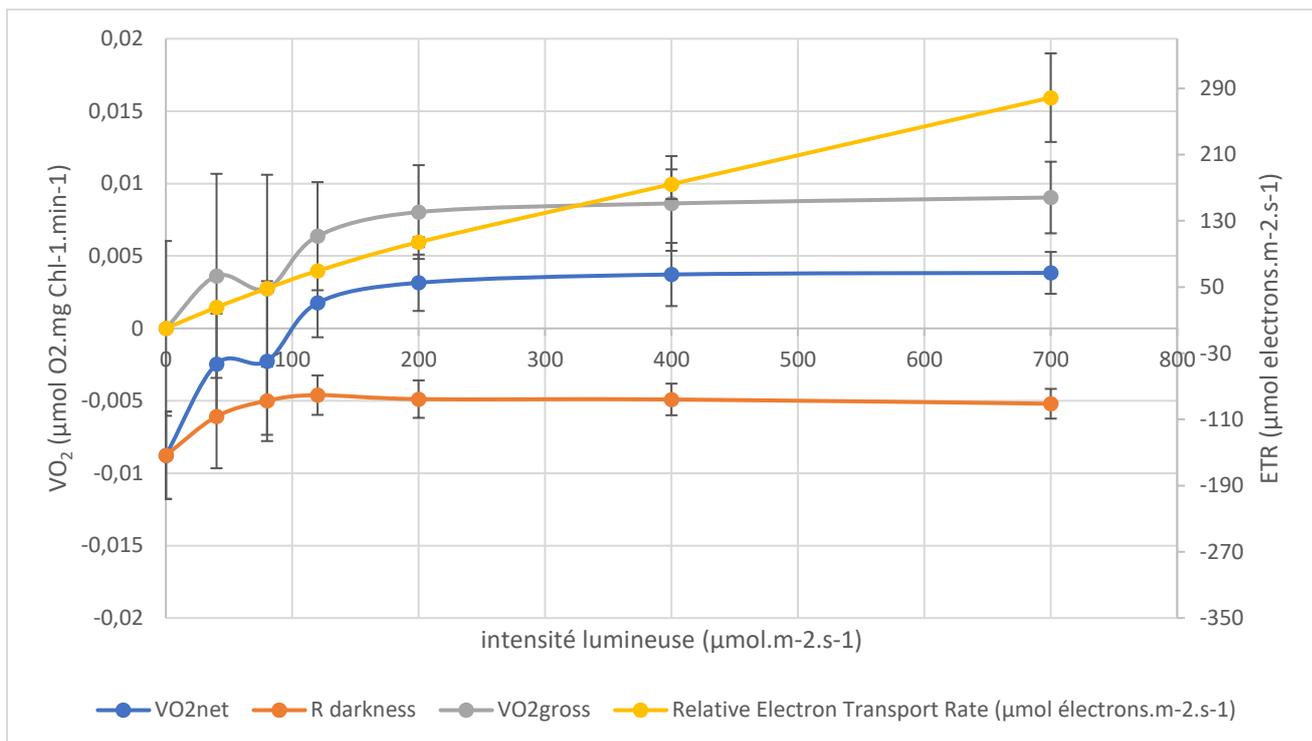


Figure 23 : Saturation lumineuse des échanges d'oxygène et du transport d'électrons. Ces valeurs ont été calculées à partir des mesures effectuées sur des cultures mixotrophes de 60mL de *C. sorokiniana* après deux jours de culture. Les données sont montrées sous formes de moyennes \pm écart-type. La vitesse de dégagement d'oxygène nette est représentée en bleu, celle du dégagement d'oxygène brut (obtenue après soustraction de la respiration obscure) en gris, la respiration à l'obscurité en orange et la vitesse de transport des électrons apparente en jaune.

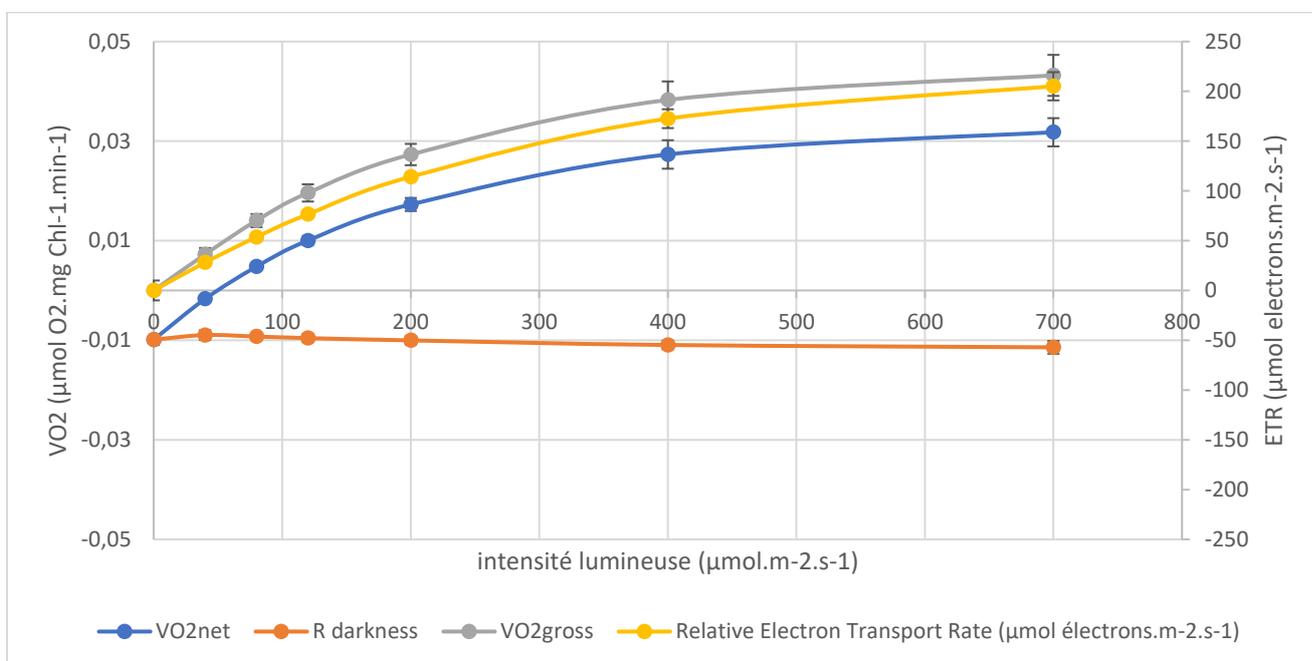


Figure 24 : Saturation lumineuse des échanges d'oxygène et du transport d'électrons. Ces valeurs ont été calculées à partir des mesures effectuées sur des cultures mixotrophes de 60mL de *C. sorokiniana* après trois jours de culture. Les données sont montrées sous formes de moyennes \pm écart-type. La vitesse de dégagement d'oxygène nette est représentée en bleu, celle du dégagement d'oxygène brut (obtenue après soustraction de la respiration obscure) en gris, la respiration à l'obscurité en orange et la vitesse de transport des électrons apparente en iaune.

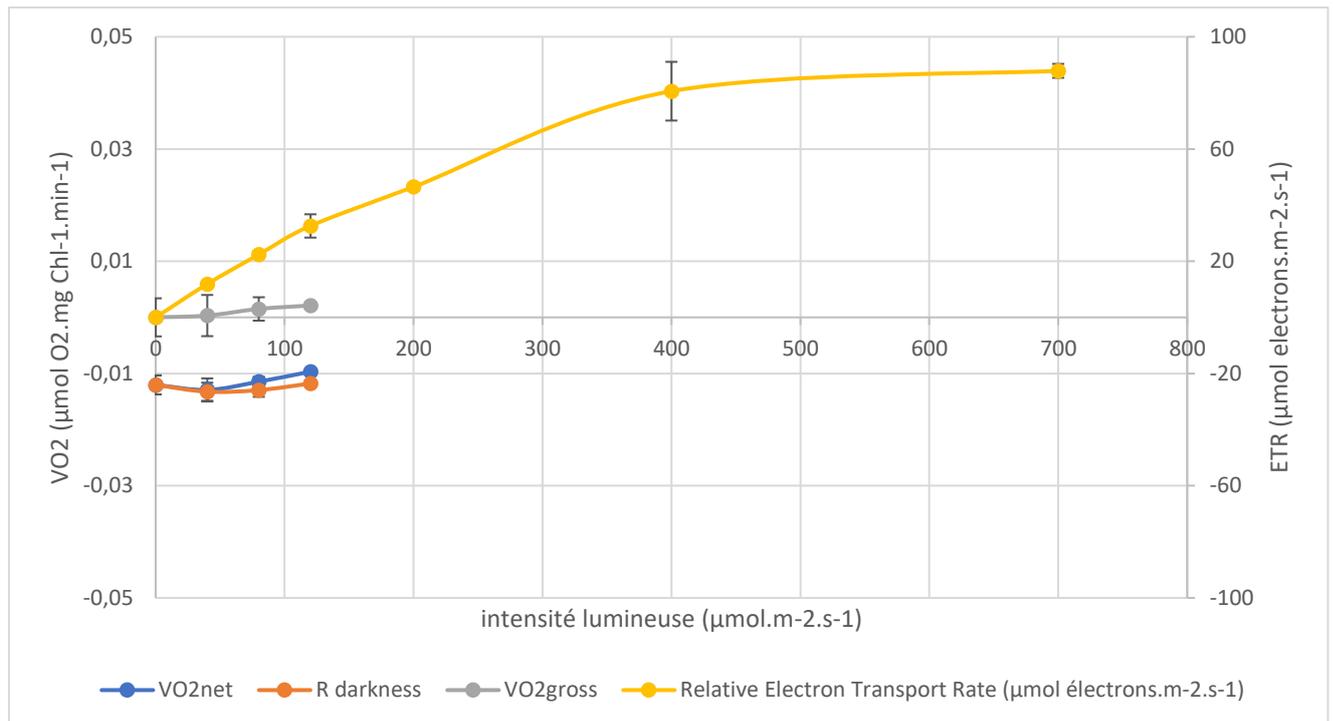


Figure 25 : Saturation lumineuse des échanges d'oxygène et du transport d'électrons. Ces valeurs ont été calculées à partir des mesures effectuées sur des cultures mixotrophes de 60mL de *C. sorokiniana* après quatre jours de culture. Les données sont montrées sous formes de moyennes \pm écart-type. La vitesse de dégagement d'oxygène nette est représentée en bleu, celle du dégagement d'oxygène brut (obtenue après soustraction de la respiration obscure) en gris, la respiration à l'obscurité en orange et la vitesse de transport des électrons apparente en jaune.

La comparaison des figures 23 à 25 permet de dégager les tendances suivantes :

- La vitesse de respiration à l'obscurité avant éclairage subit peu de changement au cours de la culture ; elle se situe autour de $-0.01 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg Chl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.
- Les courbes de saturation de vitesse d'échange d'O₂ à la lumière (photosynthèses nettes et brutes) évoluent entre le jour 2 et le jour 3 : au jour 2, la photosynthèse sature à faible intensité lumineuse (vers $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), alors qu'au jour 3 il faut atteindre $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
- Au jour 4, la photosynthèse nette (mesurée à $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) est négative, ce qui signifie qu'une consommation nette d'oxygène se produit à la lumière ; la photosynthèse brute (= photosynthèse nette – respiration) est très faible
- La vitesse relative du transport d'électrons ne paraît pas saturer à $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ au jour 2, contrairement aux jours 3 et 4. Au jour 4, les vitesses sont plus faibles qu'aux jours 2 et 3 ; toutefois, la diminution de la vitesse du transport d'électrons est moins marquée que celle du dégagement brut d'oxygène.

La figure 26 montre l'évolution de la vitesse de transport des électrons apparente à $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (calculée à partir des paramètres de fluorescence) sur trois jours à partir du deuxième jour de culture. On peut constater une diminution de la capacité de transport des électrons. On peut également constater une saturation lumineuse de la vitesse de transport d'électrons à haute intensité lumineuse lors des jours 3 et 4 (figure 23 et 24).

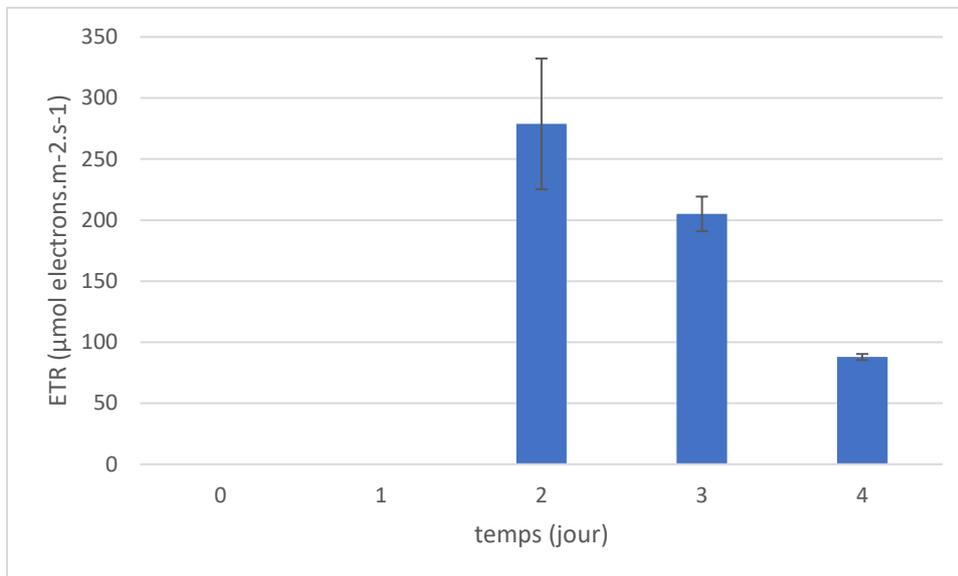


Figure 26 : Evolution de la vitesse de transport des électrons apparente (ETR_{relatif}) de *C. sorokiniana* 60mL à une intensité lumineuse de $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ après 2, 3 et 4 jours de culture. Les données sont montrées sous formes de moyennes \pm écart-type.

La figure 27 montre l'évolution de la vitesse de dégagement d'oxygène nette à une intensité lumineuse de $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Cette intensité lumineuse est choisie ici car elle proche de l'intensité utilisée pour la culture des algues ($60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), bien que la lumière utilisée pour effectuer les mesures soit de la lumière rouge (au lieu de lumière blanche pour la croissance). Cela permet malgré tout d'obtenir une approximation de l'évolution de la photosynthèse nette telle qu'elle a lieu dans les bouteilles de culture. On peut constater une valeur de dégagement d'oxygène très variable au deuxième jour correspondant au point variable visible sur la courbe de dégagement d'oxygène net de la figure 23. De plus, la vitesse nette de dégagement d'oxygène reste positive au deuxième et troisième jours de culture pour enfin être négative le quatrième jour, après que l'anoxie ait été établie dans les bouteilles closes.

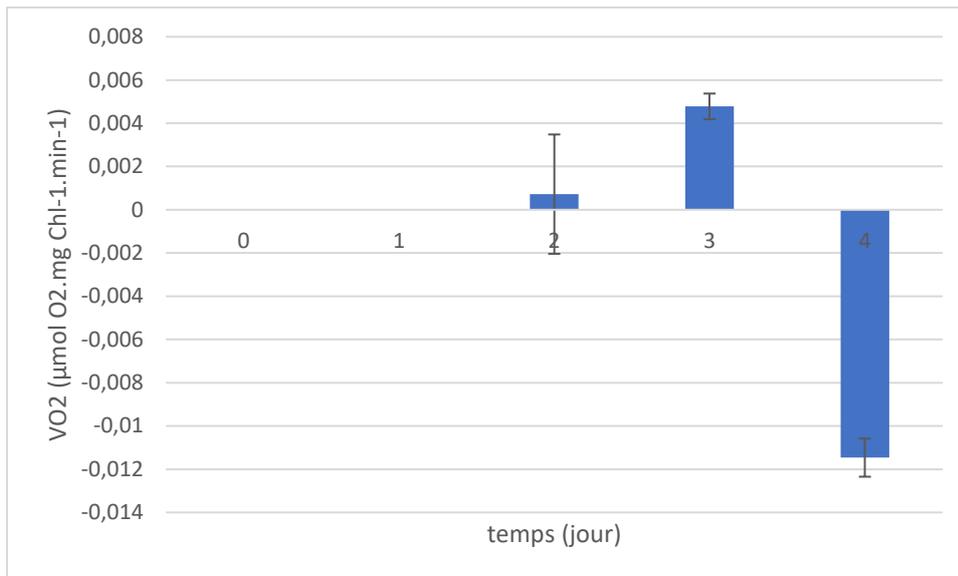


Figure 27 : Evolution de la vitesse nette de dégagement d'oxygène de *C. sorokiniana* 60mL à une intensité lumineuse de $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ après 2, 3 et 4 jours de culture. Les données sont montrées sous formes de moyennes \pm écart-type.

Enfin, la figure 28 représente l'évolution du coefficient d'extinction non-photochimique (NPQ) à une intensité lumineuse de $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Le NPQ total (représenté en bleu sur la figure) n'est pas très élevé au deuxième jour et diminue pour atteindre des valeurs négatives aux jours 3 et 4. Cependant, la composante qE du NPQ (représentés en orange sur la figure), correspondant à une dissipation de l'énergie d'excitation lumineuse sous forme thermique (composant du NPQ réversible rapidement après l'éclairement, cf. introduction) reste positive et stable (mais faible) au cours du temps.

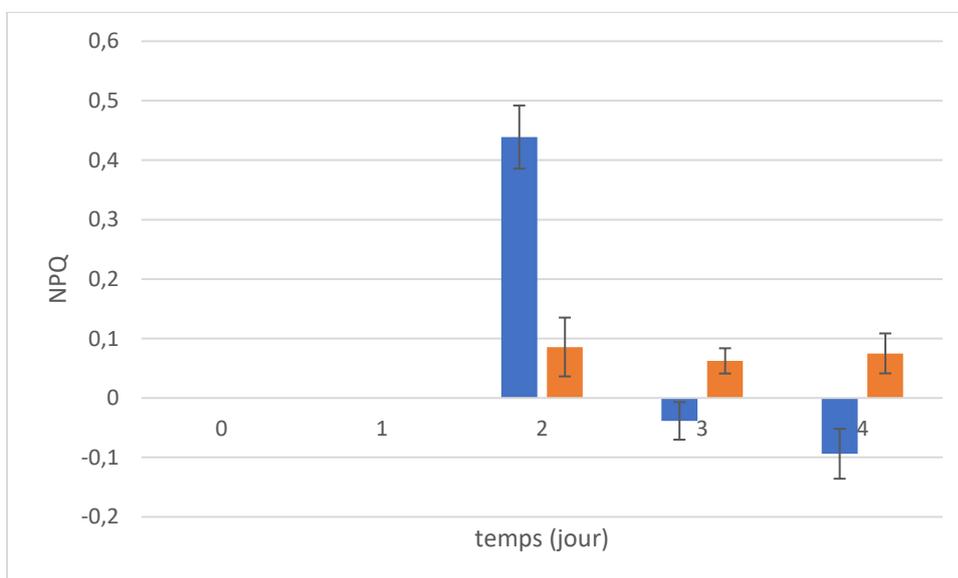


Figure 28 : Evolution du NPQ de *C. sorokiniana* 60mL à une intensité lumineuse de $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ après 2, 3 et 4 jours de culture. Le NPQ total est représenté en bleu et le NPQ correspondant à l'extinction sous forme de dissipation thermique (qE) est représenté en orange. Les données sont montrées sous formes de moyennes \pm écart-type.

b. Mesures d'induction de fluorescence

Contrairement aux mesures de fluorescence PAM et d'oxygène, les mesures d'induction de fluorescence ont pu être réalisées sans prélever d'échantillons hors des bouteilles scellées. Les bouteilles ont été déplacées pour adapter d'abord les algues à l'obscurité puis les exposer à un flash

saturant en posant simplement les bouteilles en verre sur la sonde du fluorimètre. Ces mesures ont permis de déterminer :

- Les rapports F_v/F_m des échantillons (avec F_m , la valeur maximale du rendement de fluorescence ; F_o , la valeur minimale du rendement de fluorescence et $F_v = F_m - F_o$). Le rapport F_v/F_m est égal au rendement photochimique maximal du PSII.
- La cinétique complète d'augmentation du rendement de fluorescence entre F_o et F_m , qui correspond à la réduction progressive des accepteurs d'électrons en aval du PSII.

La figure 29 représente l'évolution du rapport F_v/F_m des cultures après 2, 3 et 4 jours. Une forte diminution de ce rapport peut être observée entre le troisième et quatrième jour de culture, ce qui indique une inactivation partielle du PSII à cette étape.

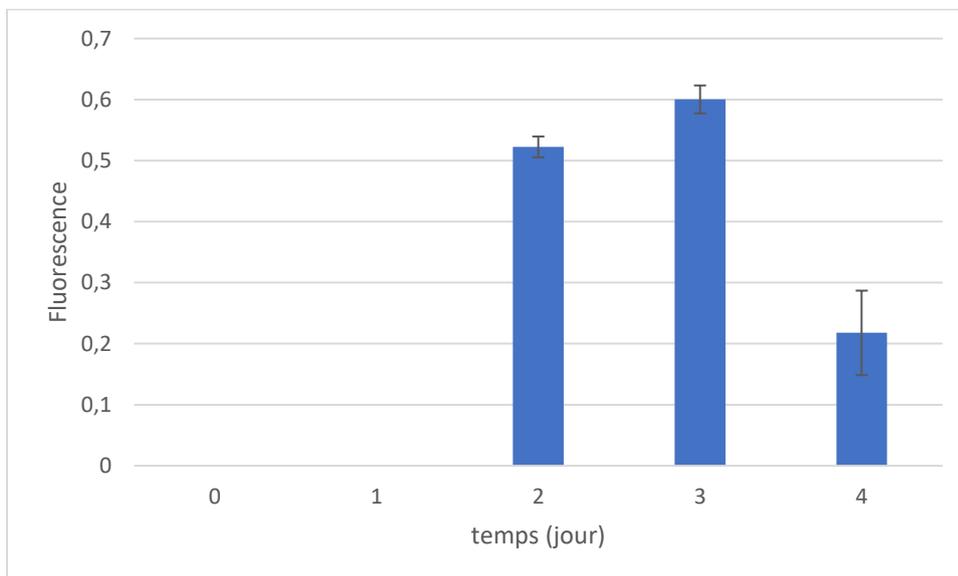


Figure 29 : Evolution du rapport F_v/F_m de *C. sorokiniana* 60mL après 2, 3 et 4 jours de culture. Les données sont montrées sous formes de moyennes \pm écart-type.

Les cinétiques d'augmentation du rendement de fluorescence sont représentées à la figure 30 par les courbes d'induction de fluorescence enregistrées aux jours 2, 3 et 4. Les courbes sont normalisées de manière à amener à 1 la valeur de $(F_m - F_o)$, ce qui permet de visualiser les changements de forme de la montée. Les phases de la montée de fluorescence ('O-J', 'J-I' et 'I-P') (cf. introduction) sont observables aux deuxième et troisième jours de culture, le maximum de fluorescence (F_m) étant obtenu après environ 1 seconde. Ensuite, les inflexions 'J' et 'I' disparaissent au quatrième jour. La valeur maximale du rendement de fluorescence est également beaucoup plus rapidement atteinte au quatrième jour de culture (6 millisecondes). Un tel résultat indique une limitation du transport d'électrons au niveau du pool d'accepteurs du PSII (voir discussion).

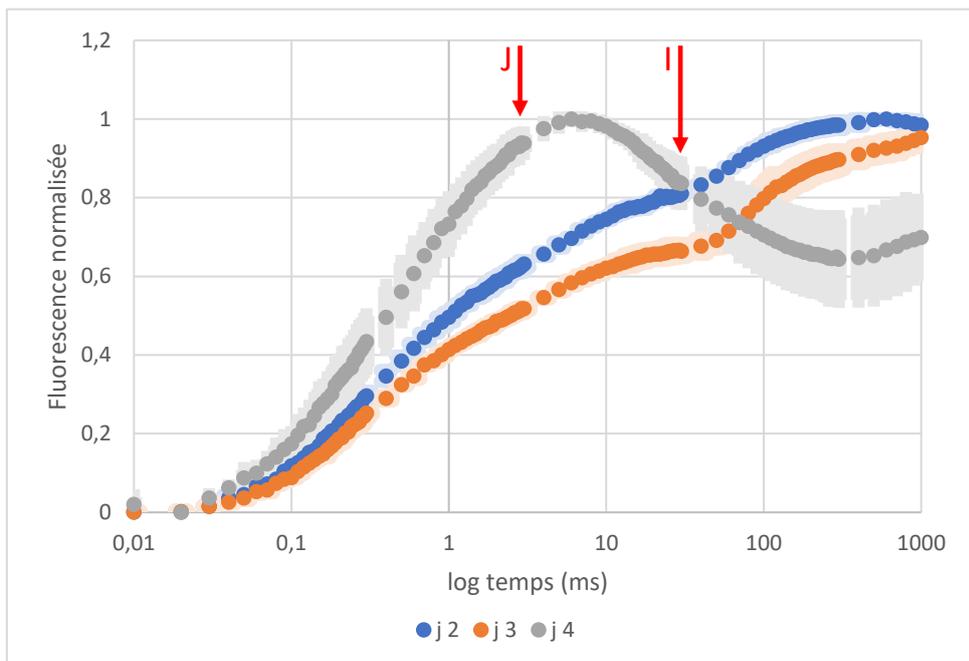


Figure 30 : Courbes d'induction de fluorescence normalisées de *C. sorokiniana* 60mL adapté à l'obscurité après 2, 3 et 4 jours de culture. La courbe du deuxième jour est représentée en bleu, celle du troisième jour en orange et celle du quatrième jour en gris. Les données sont montrées sous formes de moyennes et les écart-types sont représentés par des halos de couleur plus claires. Les flèches rouges représentent les points d'inflexion 'J' et 'I'.

Discussion

Le travail a porté sur la croissance en milieu fermé de microalgues vertes, plus particulièrement en mixotrophie.

Nous avons commencé par analyser la croissance et ensuite, nous nous sommes attachés à étudier la composition du milieu de croissance, ensuite la composition de la biomasse obtenue pour terminer par des analyses photosynthétiques.

Dans un premier temps, les conditions particulières de croissance, c'est-à-dire en absence d'échange gazeux avec l'environnement, ont été testées pour les différentes conditions de culture (l'hétérotrophie, l'autotrophie et la mixotrophie) et pour deux souches de chlorelles différentes, *C. sorokiniana* et *Chlorella* sp. Les cultures ont été réalisées dans du milieu BBM-3N et la source de carbone utilisée était le glucose à une concentration de 10 g.L⁻¹ (cf. matériel et méthode).

Les cultures ont été effectuées dans des conditions limitant la présence d'une phase gazeuse en les effectuant dans des flacons de 60mL remplis. Les résultats montrent une croissance en mixotrophie, et non en hétérotrophie et en autotrophie, illustrant donc la possibilité de cultiver des microalgues en milieu clos grâce au recyclage de l'oxygène et du dioxyde de carbone. Ainsi, le CO₂ produit au cours de l'oxydation partielle de la source de carbone lors de la respiration peut être refixé par la photosynthèse qui, à son tour, produit l'oxygène nécessaire à la respiration (Pang et al., 2019).

Ensuite, des cultures ont été effectuées dans le but d'évaluer l'effet d'une phase gazeuse initiale plus importante dans les bouteilles en remplissant celle-ci par un volume deux fois moins élevé (30mL). Dans ces conditions, nous avons pu observer une croissance en mixotrophie deux fois plus élevée que dans les bouteilles remplies, ainsi qu'une faible croissance en hétérotrophie.

La croissance suivie par densité optique démarre à une densité optique faible et montre une forte augmentation (passant de 0,1 à 0,7) pour les cultures de *C. sorokiniana* de 60mL, les cultures de 30mL atteignent une densité optique maximale deux fois plus élevée. Enfin les cultures de *Chlorella* sp. de 60mL atteignent une densité optique de 12.

Enfin, pour les deux souches et quel que soit le volume présent dans les bouteilles, la croissance s'est arrêtée après quatre jours de culture.

Etant donné que les suivis de croissance ont été réalisés par mesure de la densité optique et donc de la dispersion de la lumière par les particules, la taille des particules peut alors modifier les résultats, nous avons donc aussi suivi la croissance par des comptages ainsi que par des mesures du diamètre

des cellules. Ces mesures de diamètre montrent effectivement une légère augmentation de la taille des cellules entre le jour 0 et le jour 2 des cultures en mixotrophie. Mais le comptage a montré qu'il y a bien une croissance mixotrophe en termes de densité cellulaire.

Nous avons ensuite effectué des mesures de la biomasse dans toutes les conditions de culture.

Les biomasses atteintes en mixotrophie en fin de culture fermée sont les suivantes : $1,58 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$ pour *C. sorokiniana* à 60mL, $3,02 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$ pour *C. sorokiniana* à 30mL et $2,06 \pm 0,24 \text{ g.L}^{-1}$ pour *Chlorella* sp. à 60mL. En comparaison, des chercheurs ont montré que la biomasse atteinte par les cultures mixotrophes de *C. sorokiniana* en milieu ouvert, avec bullage d'air, est de $4.57 \pm 0.12 \text{ g.L}^{-1}$ en présence de 6 g.L^{-1} de glucose (Li et al., 2016).

Les taux de croissance spécifique (μ_{\max}) en phase exponentielle par jour de *C. sorokiniana* en culture de 60 et 30mL et de *Chlorella* sp peuvent être calculés à partir des mesures de densité optique et sont montrés à la figure 12 (cf. résultats). Les taux atteints sont de $1,75 \pm 0,02 \text{ J}^{-1}$ pour *C. sorokiniana* 60mL, $1,95 \pm 0,08 \text{ J}^{-1}$ *C. sorokiniana* 30mL et $2,11 \pm 0.06 \text{ J}^{-1}$ pour *Chlorella* sp. Ceux-ci sont moins élevés comparés aux taux de croissance spécifiques obtenus par des études antérieures en milieu ouvert mixotrophe de *C. sorokiniana* et *C. vulgaris*, qui sont de $3,13 \pm 0,22$ et $4,75 \text{ J}^{-1}$ respectivement (Li et al., 2016; Smith et al., 2015) cependant les intensités lumineuses de ces cultures étaient supérieures (91 ± 7 et $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Le taux de croissance spécifique des cultures de 30mL étant plus grand que celles de 60mL pour *C. sorokiniana*, on peut supposer une limitation de la croissance due à la limitation en CO_2 dans l'environnement clos, les cultures de 30mL possédant une phase gazeuse initiale plus élevée et donc une plus grande quantité d' O_2 et CO_2 au jour 0 ou qu'une accumulation moins importante de l'oxygène dans les bouteilles remplies à 30mL permette un meilleur taux de croissance. Il a déjà été montré par une étude qu'une concentration faible en CO_2 peut être un facteur limitant pour la croissance autotrophe (Vance and Spalding, 2005). La mixotrophie permet de compenser cette limitation par la production de CO_2 de la respiration (Pang et al., 2019). Les mesures de saturation d'oxygène ayant montré une augmentation de l'oxygène dissous, l'oxygène ne devrait pas être le facteur limitant pour la respiration.

L'évolution de la composition du milieu de culture a été suivie par des dosages du glucose ainsi que des mesures de saturation en oxygène dans le milieu.

Les dosages du glucose par HPLC ont permis d'obtenir le rendement de la formation de biomasse (w/w) par quantité de glucose consommée de *C. sorokiniana* 60mL, soit 50 % en mixotrophie dans nos conditions. L'efficacité de la conversion du glucose en biomasse pour la culture mixotrophe close est proche de ce qui a pu être observé par Miazek et al. (2017) dans des cultures mixotrophes ouvertes, soit environ 54%. De plus, les analyses HPLC du 4^{ème} jour des cultures mixotrophes closes ont

étonnamment mis en évidence la présence de succinate comme produit de fermentation ainsi que l'apparition de deux composés inconnus. A notre connaissance, le succinate n'a pas été rapporté comme produit majeur de fermentation chez les microalgues, mais il est bien connu que, chez des bactéries, il peut se former à partir d'oxaloacétate, lui-même dérivant du phosphoénolpyruvate (Catalanotti et al., 2013).

Par contre, la consommation de glucose en hétérotrophie close est faible et donne un rendement très bas de la formation de biomasse (16%) par rapport aux observations réalisées par Miazek et al. (2017). L'oxygène présent initialement dans le milieu étant rapidement consommé et sans production d'oxygène par la photosynthèse, la respiration s'arrête par manque d'oxygène et le glucose ne va plus être consommé après le deuxième jour de culture. Les observations au microscope indiquant que les microalgues sont toujours en vie à l'issue des 4 jours, on pourrait proposer que l'efficacité de la conversion du glucose en biomasse pour la culture hétérotrophe est très basse car l'énergie apportée par le glucose en anoxie sera utilisée pour maintenir les cellules en vie plutôt que pour la production de biomasse.

Les mesures de saturation de l'oxygène dans le milieu ont effectivement montré la consommation entière de l'oxygène après deux jours de culture en condition hétérotrophe de 60mL et après trois jours pour les volumes de 30mL. La saturation d'oxygène ne présente pas plus qu'une légère diminution pour toutes les cultures autotrophes. En mixotrophie, la même tendance est observée pour toutes les cultures : il y a d'abord une augmentation de la saturation en oxygène dissous durant deux jours, montrant un déséquilibre entre la photosynthèse et la respiration en faveur de la photosynthèse. Une fois le maximum de saturation d'oxygène atteint, celui-ci est ensuite entièrement consommé en un ou deux jours montrant de nouveau un déséquilibre, cette fois en faveur de la respiration. Le maximum d'oxygène dissous (jour 2) en culture de 30mL est deux fois moins élevé que dans les cultures de 60mL. Une tendance similaire de l'oxygène dissous lors de la croissance en mixotrophie ouverte a été observée par (Smith et al., 2015) chez l'espèce *Micractinium inermum* cultivée avec aération. Il faut remarquer aussi qu'en définitive les cultures de 30 ml produisent la même quantité de biomasse totale que celles de 60 ml, mais dans un volume deux fois moindre. Les cultures de 30mL montrent également une consommation de l'oxygène après être montées à une saturation d'oxygène de 150% (au lieu de 350 %). Ces variations de saturations d'oxygène peuvent être expliquées plus en détail à l'aide des analyses photosynthétiques réalisées par les mesures de fluorescences et d'oxymétrie.

Les analyses photosynthétiques sont réalisées par des mesures de la fluorescence modulée de la chlorophylle a à 25°C combinées avec des mesures d'oxymétrie, ainsi que par les mesures d'induction de fluorescence.

Ces mesures ont toutes été réalisées sur la souche *C. sorokiniana* en cultures mixotrophes de 60mL fermées.

Nous constatons que les courbes de réponse de la vitesse d'échange d'oxygène à la lumière montrent une saturation à une faible intensité lumineuse au 2^{ème} jour de la culture et à une intensité lumineuse trois fois plus élevée aux jours 3 et 4 (voir fig 23 à 25). Par contre, le taux de transfert relatif d'électrons ne sature pas au 2^{ème} jour mais bien aux jours 3 et 4, de plus, ce niveau de saturation diminue au cours du temps (voir fig 23 à 25). Nous voyons également une consommation nette d'oxygène à $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ au jour 4, sachant que $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ est proche du niveau d'illumination dans les cultures, montrant donc une consommation nette d'oxygène. Enfin, nous pouvons constater également une forte diminution du rendement photochimique maximal (F_v/F_m) entre le jour 3 et le jour 4, indiquant une inactivation partielle du PSII à cette phase de la croissance. La modification de l'allure de la courbe d'induction de fluorescence (OJIP) entre le jour 3 et le jour 4 indique par ailleurs une limitation du transport d'électrons au niveau du pool d'accepteurs du PSII.

Ces différents éléments pourraient suggérer que, comme l'oxygène sature au jour 2 mais pas le transfert d'électrons, il pourrait y avoir une augmentation du transport alternatif d'électrons vers l'oxygène à forte intensité lumineuse au jour 2. Comme le rendement photochimique maximal F_v/F_m est toujours élevé, on peut en déduire qu'il n'y a pas encore inactivation du PSII au 3^{ème} jour. De plus, le dégagement d' O_2 brut par la photosynthèse est plus élevé au jour 3. Et la respiration à $700 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ est deux fois plus élevée au jour 3 qu'au jour 2 (il en résulte un dégagement d'oxygène net presque égal à celui du jour 2). On peut donc supposer que ce transport alternatif n'est plus effectif au jour 3 ni au suivant car il y a diminution de l'ETR.

Il a été observé par Torzillo et al. (1998) et Ugwu et al. (2007) que lorsque la saturation en oxygène augmente entre 120 et 300%, le rapport F_v/F_m diminue, traduisant des dommages au PSII. Ainsi qu'un haut degré de lyse cellulaire observé au-dessus de 200% de saturation d' O_2 . Cependant la diminution de F_v/F_m n'est observée qu'au 4^{ème} jour alors que l'anoxie est établie et non lors de la consommation de l'oxygène accumulé. Il est évidemment possible que les dommages au PSII ne s'établissent pas immédiatement au moment de l'exposition à un taux élevé d'oxygène, mais que ce processus n'apparaisse qu'avec un délai d'un jour. Par ailleurs, l'anoxie peut également entraîner des changements dans l'organisation de l'appareil photosynthétique. Ainsi, chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'anoxie entraîne en quelques minutes une transition vers l'état 2 de distribution des complexes LHCII entre les photosystèmes, dans lequel une partie des LHCII se détachent du PSII (Iwai et al., 2008), ce qui mène à une diminution du rapport F_v/F_m (Cardol et al., 2003).

Les courbes d'induction de fluorescence montrent aussi un changement de forme important une fois que l'anoxie est atteinte (figure 30). La montée rapide de la fluorescence observée dans ces conditions indique que le pool d'accepteurs d'électrons du PSII est fortement réduit avant la mesure. C'est également ce qui a été observé lors d'une transition vers l'état 2 de distribution de l'énergie d'excitation entre les photosystèmes. D'une manière générale, l'état redox de la cellule est très réducteur en anoxie, ce qui provoque la réduction du pool de PQ et l'état 2 (Jans et al., 2008).

Le quenching non-photochimique (NPQ) total observé au jour 2 est de 0,44 ce qui est faible comparé aux valeurs de NPQ obtenue par Quaas et al. (2015) en autotrophie (valeurs supérieures à 1) cultivée à une illumination de $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Aux jours 3 et 4 le NPQ chute et devient négatif. Des études portant sur l'anoxie chez *Chlamydomonas* ont montré des transitions d'état vers l'état 2. Une fois les algues sorties des bouteilles et combiné avec l'éclairement utilisé lors des mesures, le pool de plastoquinones pourrait être partiellement réoxydé par le rétablissement de conditions aérobies et par le transport d'électrons, ce qui provoquerait une transition partielle vers l'état 1 pendant la mesure, expliquant le NPQ total négatif obtenu.

On le voit, il serait utile d'analyser le processus des transitions d'état au cours de la croissance mixotrophe, ce qui peut être réalisé par des mesures d'émission de fluorescence des deux photosystèmes à basse température (Cardol et al. 2003).

Il a déjà été montré, en culture mixotrophe, un NPQ total très faible et même nul aux intensités lumineuses inférieures à $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Li et al., 2016). Comme un NPQ élevé de type qE est aussi un indicateur de la restriction de l'activité photosynthétique par la limitation en CO_2 (Roach et al., 2015), son absence ou une faible valeur témoigne de la disponibilité en CO_2 . En mixotrophie, cette disponibilité est rendue possible grâce à la respiration.

Pour finir, la composition de la biomasse en acides gras et en pigments (chlorophylles et caroténoïdes) ont été étudiés.

Les acides gras majoritaires détectés sont l'acide palmitique, l'acide linoléique et l'acide linoléique, ce qui correspond aux acides gras majoritaires en cultures mixotrophes et hétérotrophes ouverte (avec une quantité d'acide linoléique plus importante en mixotrophie). La contenu total en acides gras en culture mixotrophe close est similaire à la culture mixotrophe ouverte mis en évidence par Miazek et al. (2017) avec un contenu en acide gras autour de 4% du poids sec. La croissance mixotrophe en milieu fermé ne change donc globalement pas le contenu en acide gras par rapport au milieu ouvert.

Le contenu en chlorophylle ($a+b$) montre une diminution au cours du temps lors des deux premiers jours d'expérience suivi d'une stabilisation à $12,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ (1,25% de la biomasse). La teneur de la

biomasse en caroténoïdes est faible après le 1^{er} jour de culture et augmente fortement au 3^{ème} jour de culture, passant de 0,09 µg/mg au jour 1 à 0,3 µg/mg au jour 2 et finalement 1,02 µg/mg (0,102% de la biomasse) au jour 3 (reste stable au jour 4). En comparaison, une autre étude montre que le contenu total en chlorophylle d'une culture mixotrophe ouverte ayant le glucose comme source de carbone est de $1,63 \pm 0,17\%$ de la biomasse. Une diminution du contenu en chlorophylle au cours du temps y a également été observé. Le contenu final total en caroténoïdes d'une culture mixotrophe ouverte ayant le glucose comme source de carbone est de $0,38 \pm 0,03 \%$ de la biomasse (Miazek et al., 2017) ce qui est beaucoup plus élevé que ce qui a été observé en milieu clos dans notre travail.

Conclusion

Le but de notre travail était de montrer la possibilité de cultiver des microalgues vertes en milieu fermé (c'est-à-dire en l'absence d'échanges gazeux avec l'environnement) grâce au recyclage de l'oxygène et du dioxyde de carbone effectué en mixotrophie, ainsi que d'en analyser le métabolisme.

Nous avons donc commencé par suivre les croissances (par densité optique) en milieu fermé de cultures de *C. sorokiniana* et *Chlorella* sp. en hétérotrophie, autotrophie et mixotrophie. Ces cultures ont été réalisées à une intensité lumineuse de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et à une concentration en glucose de 10g/L. La croissance a alors pu être observée dans les cultures mixotrophes uniquement. Mais nous avons constaté un arrêt de la croissance alors que le glucose n'était que partiellement consommé. Le suivi de la saturation en oxygène a alors montré un déséquilibre entre la photosynthèse et la respiration en faveur de la photosynthèse jusqu'à un certain moment où cette tendance est inversée allant jusqu'à l'anoxie. Les analyses photosynthétiques suggèrent une augmentation de la capacité de transport alternatif des électrons vers l'oxygène lorsque la saturation de l'oxygène est à son maximum pendant la croissance. On constate aussi une forte diminution du rendement photochimique maximal lorsque la croissance est stationnaire et que l'anoxie est établie. Le quenching non-photochimique, quant à lui, est faible et les paramètres de fluorescence indiquent qu'une transition vers l'état 2 se produit quand l'anoxie est établie. Enfin, le dosage des acides gras de *C. sorokiniana* en culture mixotrophe fermée a permis de montrer que cette condition de croissance ne change globalement pas le contenu en acide gras par rapport à une culture ouverte. Cependant, le dosage des pigments a montré un contenu inférieur à ce qui a été obtenu dans d'autres études en milieu mixotrophe ouvert.

Dans le futur, la croissance des microalgues en mixotrophie fermée pourrait certainement être optimisée en modifiant la composition du milieu et les conditions de culture (intensité lumineuse, alternance de périodes d'éclairement et d'obscurité, source d'azote, ...). Des analyses plus détaillées de la photosynthèse et de la respiration pourraient permettre une meilleure compréhension des adaptations du métabolisme à la culture mixotrophe close.

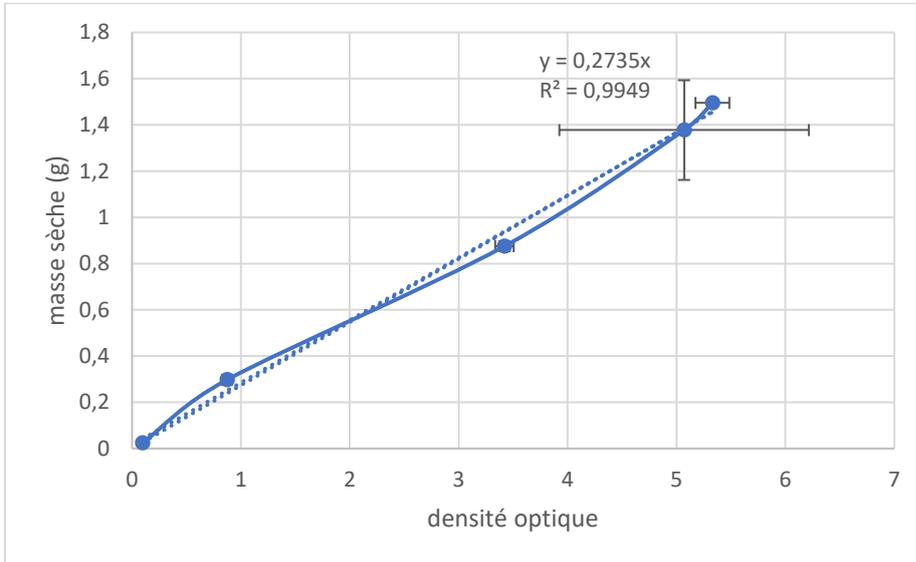
Bibliographie

- Bennet, M.E., Hobbie, J.E., 1972. The uptake of glucose by *Chlamydomonas* sp. *J. Phycol.* 392–398.
- Cardol, P., Gloire, G., Havaux, M., Remacle, C., Matagne, R., Franck, F., 2003. Photosynthesis and State Transitions in Mitochondrial Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Affected in Respiration. *Plant Physiol.* 133, 2010–2020. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028076>
- Catalanotti, C., Yang, W., Posewitz, M.C., Grossman, A.R., 2013. Fermentation metabolism and its evolution in algae. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00150>
- Croft, H., Chen, J.M., 2018. Leaf Pigment Content, in: *Comprehensive Remote Sensing*. Elsevier, pp. 117–142. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10547-0>
- Franck, F., Juneau, P., Popovic, R., 2002. Resolution of the Photosystem I and Photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1556, 239–246. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(02\)00366-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00366-3)
- Frank, H.A., Cogdell, R.J., 1996. Carotenoids in Photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63, 257–264. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb03022.x>
- Fratamico, A., Tocquin, P., Franck, F., 2016. The chlorophyll a fluorescence induction curve in the green microalga *Haematococcus pluvialis*: further insight into the nature of the P–S–M fluctuation and its relationship with the “low-wave” phenomenon at steady-state. *Photosynth. Res.* 128, 271–285. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0241-2>
- Gonçalves, A.L., Pires, J.C.M., Simões, M., 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res.* 24, 403–415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>
- Goss, R., Lepetit, B., 2015. Biodiversity of NPQ. *J. Plant Physiol.* 172, 13–32. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.004>
- Iwai, M., Takahashi, Y., Minagawa, J., 2008. Molecular Remodeling of Photosystem II during State Transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 20, 2177–2189. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059352>
- Jans, F., Mignolet, E., Houyoux, P.-A., Cardol, P., Ghysels, B., Cuine, 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 20546–20551. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806896105>
- Lazár, D., 2006. The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct. Plant Biol.* 33, 9. <https://doi.org/10.1071/FP05095>
- Li, T., Kirchhoff, H., Gargouri, M., Feng, J., Cousins, A.B., Pienkos, P.T., Gang, D.R., Chen, S., 2016. Assessment of photosynthesis regulation in mixotrophically cultured microalga *Chlorella sorokiniana*. *Algal Res.* 19, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.012>
- Miazeck, K., Remacle, C., Richel, A., Goffin, D., 2017. Beech wood *Fagus sylvatica* dilute-acid hydrolysate as a feedstock to support *Chlorella sorokiniana* biomass, fatty acid and pigment production. *Bioresour. Technol.* 230, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.034>
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K.K., 2001. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol.* 125, 1558–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>
- Pang, N., Gu, X., Chen, S., Kirchhoff, H., Lei, H., Roje, S., 2019. Exploiting mixotrophy for improving productivities of biomass and co-products of microalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 112, 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.06.001>
- Peltier, G., Tolleter, D., Billon, E., Cournac, L., 2010. Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae. *Photosynth. Res.* 106, 19–31. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9575-3>
- Perez-Garcia, O., Bashan, Y., 2015. Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics, in: Prokop, A., Bajpai, R.K., Zappi,

- M.E. (Eds.), *Algal Biorefineries*. Springer International Publishing, Cham, pp. 61–131. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_3
- Quaas, T., Berteotti, S., Ballottari, M., Flieger, K., Bassi, R., Wilhelm, C., Goss, R., 2015. Non-photochemical quenching and xanthophyll cycle activities in six green algal species suggest mechanistic differences in the process of excess energy dissipation. *J. Plant Physiol.* 172, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.07.023>
- Roach, T., Na, C.S., Krieger-Liszkay, A., 2015. High light-induced hydrogen peroxide production in *Chlamydomonas reinhardtii* is increased by high CO₂ availability. *Plant J.* 81, 759–766. <https://doi.org/10.1111/tpj.12768>
- Rochaix, J.-D., 2011. Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1807, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.010>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Schwab, W.G.W., Komor, E., 1978. A possible mechanistic role of the membrane potential in proton-sugar cotransport of *Chlorella*. *N.-Holl. Biomed. Press* 87, 157–160.
- Smith, R.T., Bangert, K., Wilkinson, S.J., Gilmour, D.J., 2015. Synergistic carbon metabolism in a fast growing mixotrophic freshwater microalgal species *Micractinium inermum*. *Biomass Bioenergy* 82, 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.04.023>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Strasser, R., Srivastava, A., Tsimili-Michael, M., 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, in: *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*. Londre, pp. 443–480.
- Thiry, M., Racano, S., Rigo, P., 2014. Les mitochondries, in: *Biologie Cellulaire*. pp. 196–199.
- Torzillo, G., Bernardini, P., Masojídek, J., 1998. On-line monitoring of chlorophyll fluorescence to assess the extent of photoinhibition of photosynthesis induced by high oxygen concentration and low temperature and its effect on the productivity of outdoor cultures of *Spirulina platensis* (cyanobacteria). *J. Phycol.* 34, 504–510. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340504.x>
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H., 2007. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. *Photosynthetica* 45, 309–311. <https://doi.org/10.1007/s11099-007-0052-y>
- Vance, P., Spalding, M.H., 2005. Growth, photosynthesis, and gene expression in *Chlamydomonas* over a range of CO₂ concentrations and CO₂/O₂ ratios: CO₂ regulates multiple acclimation states. *Can. J. Bot.* 83, 796–809. <https://doi.org/10.1139/b05-064>
- Villarruel-López, A., Ascencio, F., Nuño, K., 2017. Microalgae, a Potential Natural Functional Food Source – a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 67, 251–263. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2017-0017>
- Xu, H., Miao, X., Wu, Q., 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* 126, 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.002>

Annexes

1. Analyse de la croissance



Evolution de la masse sèche de *C. sorokiniana* en culture mixotrophe de 60mL en fonction de la densité optique pour 1L. Les données sont représentées sous formes de moyennes \pm écart-type.

2. Evolution de la concentration en oxygène dissous

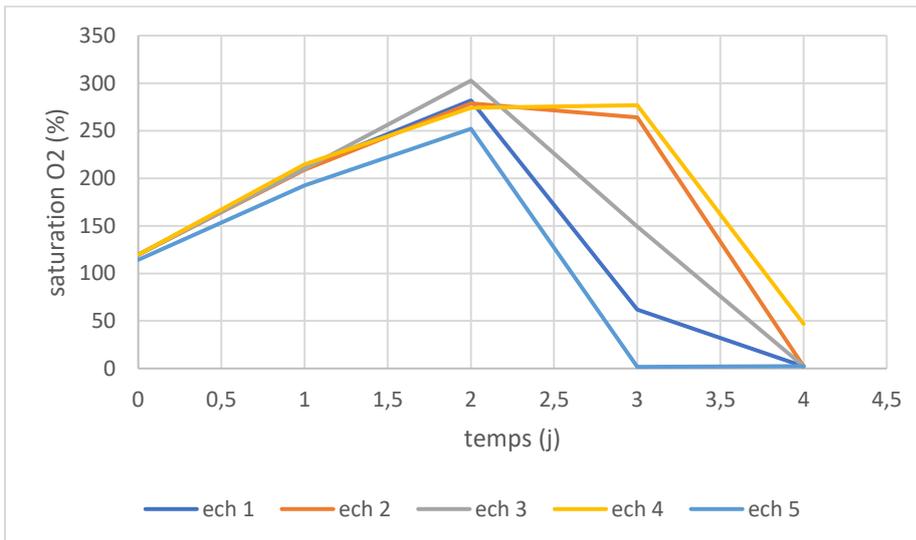


Illustration de la variabilité de la saturation en oxygène de *Chlorella* sp. en mixotrophie