

ÉTUDE DE L'IMMOBILISATION DE LA MICROALGUE
RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA DANS DES BILLES
D'ALGINATE POUR PRODUIRE UNE QUANTITÉ
ÉLEVÉE DE LIPIDES

par

Amel BENASLA

THÈSE PAR ARTICLES PRÉSENTÉE À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE
SUPÉRIEURE COMME EXIGENCE PARTIELLE À L'OBTENTION
DU DOCTORAT EN GÉNIE
Ph.D.

MONTRÉAL, LE 27 MARS 2024

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC



Amel Benasla, 2024



Cette licence [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de mentionner l'auteur, que ces utilisations soient faites à des fins non commerciales et que le contenu de l'œuvre n'ait pas été modifié.

PRÉSENTATION DU JURY

CETTE THÈSE A ÉTÉ ÉVALUÉE

PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

M. Robert Hausler, directeur de thèse
Département du génie de la construction à l'École de technologie supérieure

M. Patrice Seers, président du jury
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

M. Frédéric Monette, membre du jury
Département du génie de la construction à l'École de technologie supérieure

M. Jean-François Blais, examinateur externe
INRS-Centre Eau Terre Environnement

ELLE A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 20 FÉVRIER 2024

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, professeur Robert Hausler, directeur de la STEPPE, pour sa confiance, ses orientations, ses critiques, ses conseils et sa grande vision de la recherche qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Un grand merci aussi pour sa compréhension et sa souplesse qui m'ont permis de travailler à mon rythme. Être maman et étudiante en même temps ce n'est pas toujours facile. Robert, en dehors de la supervision de mon travail, tu as été présent à mes côtés dans mes moments de joie et tu as su me reconforter et m'encourager dans les moments difficiles. J'aimerais ici t'exprimer ma reconnaissance pour tes qualités humaines et pour ta générosité.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir examiner mon travail. Merci au professeur Patrice Seers d'avoir accepté de présider les membres du jury. Merci au professeur Jean-François Blais pour sa disponibilité et pour son intérêt. Un grand merci aussi au professeur Frédéric Monette pour ses conseils qui m'ont été très précieux pour structurer mon travail.

Un grand merci à l'équipe de la STEPPE et au technicien Michael Dubois. Merci aussi à mes camarades Karine et Raul pour nos discussions et pour vos encouragements.

Merci à l'administration de l'École de technologie supérieure pour son efficacité.

Je remercie chaleureusement les bibliothécaires Marie Stewart et Catherine Forget pour leur sympathie et leur précieuse aide concernant la citation des références et l'utilisation du gabarit de rédaction.

Enfin, un merci spécial revient à ma famille. Un grand merci à mes piliers, mes chers parents, qui, même de loin, ont été toujours présents avec moi. Merci pour votre amour inconditionnel et votre soutien permanent. Papa, me voir docteur était ton rêve. Malgré tous les obstacles

VI

rencontrés, j'ai tenu ma promesse que je t'ai faite en quittant l'Algérie, celle de poursuivre mes études. J'espère t'avoir rendu fier.

Merci à mon époux Mohamed et aux deux bougies qui illuminent ma vie, mes filles Malek et Miral, pour leur amour et leur patience. Mon cher mari, tu as vécu avec moi toute cette expérience, je te suis très reconnaissante pour ton soutien et pour ton aide, sans lesquels ce parcours n'aurait pas été possible. Merci pour tout.

Latifa, ma petite sœur, mon amie et ma confidente, je n'aurais certainement pas été au bout de cette aventure sans ton soutien moral. Malgré ton éloignement, tu as été toujours là pour me donner du courage, je ne te remercierai jamais assez pour cela. Sache que je t'aime et je suis fière de toi.

Merci à mon frère Mohamed et à sa petite famille, particulièrement ma petite jumelle Amel et le petit prince Abdellatif pour la joie qu'ils apportent à notre famille.

Étude de l'immobilisation de la microalgue *Raphidocelis subcapitata* dans des billes d'alginate pour produire une quantité élevée de lipides

Amel BENASLA

RÉSUMÉ

Les lipides algaux suscitent beaucoup d'intérêt quant à la production de biodiesel et d'autres bioproduits qui peuvent être utilisés pour des applications nutritionnelles et pharmaceutiques. Les lipides peuvent être aussi utilisés comme émulsifiants en agroalimentaire et comme matière première pour la fabrication de produits de nettoyage. Toutefois, le procédé de production des lipides algaux présente des coûts élevés et certains défis non négligeables. La récolte des microalgues constitue une étape limitante, car ces microorganismes sont de petite taille et sont dilués dans le milieu de culture. La centrifugation est la technique la plus utilisée à l'échelle industrielle mais elle est coûteuse en énergie. L'intégration de la technologie d'immobilisation dans la culture des microalgues, notamment, le piégeage dans des billes d'alginate, permettrait de faciliter leur récolte et par conséquent, contribuerait à l'augmentation de la faisabilité économique du procédé. Néanmoins cette technologie n'est pas encore parfaitement maîtrisée puisque certains problèmes restent à résoudre avant le passage à grande échelle dont le niveau de stabilité des billes pour favoriser la croissance des microalgues et minimiser la fuite des cellules. Dans ce contexte, l'objectif général du présent projet est l'étude de l'immobilisation de la microalgue d'eau douce *Raphidocelis subcapitata* dans des billes d'alginate pour produire une quantité élevée de lipides. Cet objectif général a été subdivisé en trois objectifs spécifiques.

Le premier objectif vise à déterminer les concentrations en alginate et en CaCl_2 qui assurent la stabilité des billes et favorisent la croissance de la microalgue pendant 10 jours de culture. Pour ce faire, la microalgue a été cultivée dans des billes élaborées avec différentes concentrations en alginate et en CaCl_2 . Les résultats ont montré que, parmi toutes les combinaisons étudiées, la combinaison 2 % alginate et 1 % CaCl_2 était la meilleure, car elle assure la stabilité des billes et la croissance de la microalgue, et ce, avec une faible concentration de cellules libres détectées dans le milieu de culture.

Le deuxième objectif consiste à examiner la capacité de la microalgue immobilisée à accumuler les lipides sous conditions de stress. La production de biomasse et de lipides chez la microalgue a été quantifiée durant sa culture en *batch*, avec suivi des concentrations en azote (N) et en phosphore (P) dans le milieu de culture. Les résultats ont montré que *R. subcapitata* immobilisée était capable d'accumuler $24,7 \pm 2,5$ % de son poids sec en lipides lorsque le N et le P étaient épuisés. Une productivité lipidique $\text{PL} = 29,8 \pm 3,0$ mg/L/jour a été enregistrée durant la phase stationnaire de croissance.

Le troisième objectif vise à augmenter la productivité lipidique de la microalgue par application d'une stratégie de culture en deux étapes. *R. subcapitata* d'abord été cultivée dans des conditions d'apports optimales en N et P pour l'obtention d'une production maximale en biomasse, puis les billes ont été transférées dans un milieu carencé en N pour induire

VIII

l'accumulation des lipides. Par cette stratégie, *R. subcapitata* immobilisée a atteint $37,9 \pm 3,8$ % de son poids sec en lipides et une productivité lipidique $PL = 40,3 \pm 4,0$ mg/L/jour sous carence en N.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus ont permis d'atteindre l'objectif général du projet. La productivité lipidique de *R. subcapitata* immobilisée peut être encore améliorée en variant l'intensité lumineuse et le cycle de lumière. Enfin, une transition à une échelle semi-industrielle est souhaitable avant de réaliser une production industrielle avec cette technologie.

Mots-clés : récolte des microalgues, *Raphidocelis subcapitata* immobilisée, lipides, billes d'alginate, stratégie de culture en deux étapes.

Study of the immobilization of the microalga *Raphidocelis subcapitata* in alginate beads to produce a high quantity of lipids

Amel BENASLA

ABSTRACT

Algal lipids are attracting much interest in the production of biodiesel and other bioproducts that can be used for nutritional and pharmaceutical applications. Lipids can also be used as emulsifiers in the food industry and as raw materials for the manufacture of cleaning products. However, the process of producing algal lipids presents high costs and certain significant challenges. Harvesting microalgae constitutes a limiting step, because these microorganisms are small and are diluted in the culture medium. Centrifugation is the most used technique on an industrial scale but it costs energy. The integration of immobilization technology in the cultivation of microalgae, in particular, trapping in alginate beads, would facilitate their harvest and therefore contribute to increasing the economic functionality of the microalgae. However, this technology is not yet perfectly mastered since certain problems remain to be resolved before scaling up, including the level of stability of the beads to promote the growth of microalgae and minimize cell leakage. The general objective of this project is the study of the immobilization of the freshwater microalga *Raphidocelis subcapitata* in alginate beads to produce a high quantity of lipids. This general objective has been subdivided into three specific objectives.

The first objective aims to determine the alginate and CaCl₂ concentrations which ensure the stability of the beads and promote the growth of the microalgae during 10 days of culture. To do this, the microalgae was cultivated in beads produced with different concentrations of alginate and CaCl₂. The results showed that, among all the combinations studied, the 2 % alginate and 1 % CaCl₂ combination was the best, because it ensures the stability of the beads and the growth of the microalgae, with a low concentration of free cells detected in the culture medium.

The second objective is to examine the capacity of the immobilized microalgae to accumulate lipids under stress conditions. The production of biomass and lipids in the microalgae was quantified during its batch culture, with monitoring of the concentrations in nitrogen (N) and phosphorus (P) in the culture medium. The results showed that immobilized *R. subcapitata* was able to accumulate 24.7 ± 2.5 % of its dry weight in lipids when N and P were depleted. A lipid productivity $PL = 29.8 \pm 3.0$ mg/L/day was recorded during the stationary phase of growth.

The third objective aims to increase the lipid productivity of the microalgae by applying a two-step culture strategy. *R. subcapitata* was first cultivated under optimal N and P supply conditions to obtain maximum biomass production, then the beads were transferred to an N- deficient medium to induce lipid accumulation. By this strategy, immobilized *R. subcapitata* achieved 37.9 ± 3.8 % of its dry weight in lipids and lipid productivity $PL = 40.3 \pm 4.0$ mg/L/day under N deficiency.

Overall, the results obtained made it possible to achieve the general objective of the project. The lipid productivity of immobilized *R. subcapitata* can be further improved by varying the light intensity and light cycle. Finally, a transition to a semi-industrial scale is desirable before achieving industrial production with this technology.

Keywords : harvesting microalgae, immobilized *Raphidocelis subcapitata*, lipids, alginate beads, two-step culture strategy.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE.....	5
1.1 Problématique de recherche.....	5
1.2 Hypothèses de recherche.....	8
1.3 Objectifs de recherche.....	10
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	13
2.1 Vue générale sur les microalgues	13
2.1.1 Définition et caractéristiques des microalgues	13
2.1.2 Classification des microalgues.....	15
2.1.2.1 Les Cyanophycées (algues bleu vert)	15
2.1.2.2 Les Bacillariophycées (diatomées)	16
2.1.2.3 Les Chlorophycées (microalgues vertes).....	17
2.1.2.4 Les Chrysophycées (microalgues dorées).....	18
2.1.2.5 Les Rhodophycées (microalgues rouges)	19
2.1.2.6 Les Euglénophycées.....	20
2.1.3 La photosynthèse	20
2.1.3.1 La phase photochimique (phase claire).....	22
2.1.3.2 Cycle de Calvin.....	28
2.1.4 Culture des microalgues.....	30
2.1.4.1 Conditions de culture	30
2.1.4.2 Systèmes de culture.....	35
2.1.4.3 Modes de culture.....	38
2.1.5 Applications des microalgues	42
2.1.5.1 Alimentation humaine.....	42
2.1.5.2 Aquaculture.....	43
2.1.5.3 Agriculture	43
2.1.5.4 Applications pharmaceutiques et nutraceutiques.....	43
2.1.5.5 En cosmétique.....	44
2.1.5.6 Applications en environnement	44
2.1.5.7 Applications dans le domaine des énergies	45
2.2 Production des lipides dans les microalgues.....	45
2.2.1 Biosynthèse des acides gras	47
2.2.2 Biosynthèse des triglycérides.....	50
2.2.3 Facteurs permettant l'accumulation des triglycérides.....	53
2.2.4 Rôles physiologiques de l'accumulation des triglycérides	56
2.3 Récolte des microalgues	56
2.3.1 Méthodes de récolte conventionnelles.....	58
2.3.1.1 La centrifugation.....	58
2.3.1.2 La filtration	59

	2.3.1.3	La sédimentation par gravité.....	60
	2.3.1.4	La floculation.....	60
	2.3.1.5	La flottation.....	64
2.3.2		Technologie d'immobilisation des microalgues.....	65
	2.3.2.1	Choix du support.....	66
	2.3.2.2	Techniques d'immobilisation des microalgues.....	67
CHAPITRE 3		MÉTHODOLOGIE.....	83
CHAPITRE 4		ARTICLE 1: OPTIMISATION OF GROWTH OF <i>RAPHIDOCELIS</i> <i>SUBCAPITATA</i> IMMOBILIZED FOR BIOFUEL PRODUCTION: INFLUENCE OF ALGINATE AND CaCl ₂ CONCENTRATIONS ON GROWTH.....	85
4.1		Avant-propos.....	85
4.2		Abstract.....	86
4.3		Introduction.....	86
4.4		Materials and methods.....	88
	4.4.1	Chemicals and reagents.....	88
	4.4.2	Microalga and culture medium.....	89
	4.4.3	Algae immobilization.....	89
	4.4.4	Culture conditions.....	90
	4.4.5	Growth monitoring.....	90
	4.4.6	Calculation of growth rate and generation time.....	91
4.5		Results and discussion.....	93
	4.5.1	Beads analysis.....	93
	4.5.2	Effects of alginate and CaCl ₂ concentrations on <i>R. subcapitata</i> growth..	94
	4.5.3	Comparison of free and immobilized <i>R. subcapitata</i> growth in alginate beads.....	99
4.6		Conclusion.....	100
CHAPITRE 5		MÉTHODE DE CALCUL DE LA CROISSANCE DE <i>R. SUBCAPITATA</i> IMMOBILISÉE PAR VOLUME DE MILIEU DE CULTURE.....	103
5.1		Développement d'une méthode de calcul de la croissance de <i>R. subcapitata</i> immobilisée par volume de milieu de culture.....	103
CHAPITRE 6		ARTICLE 2: GROWTH AND PRODUCTION OF LIPIDS IN <i>RHAPHIDOCELIS SUBCAPITATA</i> IMMOBILIZED IN SODIUM ALGINATE BEADS.....	109
6.1		Avant-propos.....	109
6.2		Abstract.....	109
6.3		Introduction.....	110
6.4		Materials and methods.....	112
	6.4.1	Chemical products.....	112
	6.4.2	Microalga and culture medium.....	112
	6.4.3	Cell immobilization.....	113

6.4.4	Culture conditions.....	113
6.4.5	Growth monitoring.....	114
6.4.6	Calculation of growth parameters.....	115
6.4.7	Lipid extraction from immobilized microalgae.....	116
6.4.8	Calculating lipid productivity.....	117
6.4.9	Measurement of nitrates in the culture medium.....	117
6.4.10	Measurement of phosphates in the culture medium.....	118
	6.4.10.1 Principle of the method.....	118
	6.4.10.2 Reagents.....	118
	6.4.10.3 Procedure.....	119
6.5	Results.....	119
6.5.1	Growth of <i>R. subcapitata</i> immobilized in alginate beads.....	119
6.5.2	Production of total lipids in <i>R. subcapitata</i> immobilized in alginate beads.....	121
6.6	Conclusion.....	123
CHAPITRE 7 ARTICLE 3: STRATÉGIE DE CULTURE EN DEUX ÉTAPES POUR UNE PRODUCTION ÉLEVÉE DE BIOMASSE ET UNE ACCUUMULATION DE LIPIDES CHEZ <i>RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA</i> IMMOBILISÉE DANS LE GEL D'ALGINATE.....125		
7.1	Avant-propos.....	125
7.2	Abstract.....	125
7.3	Introduction.....	126
7.4	Materials and methods.....	129
	7.4.1 Microalga and culture medium.....	129
	7.4.2 Immobilization of <i>R. subcapitata</i> cells in alginate beads.....	130
	7.4.3 Culture conditions for immobilized microalgae.....	130
	7.4.4 Determination of the biomass of immobilized microalgae.....	130
	7.4.5 Calculation of growth rate, generation time, and biomass productivity.....	131
	7.4.6 Extraction of total lipid from immobilized microalgae.....	131
	7.4.7 Calculation of lipid productivity.....	132
7.5	Results.....	133
	7.5.1 The effects of nitrogen and phosphorus deficiency on lipid accumulation and biomass production in immobilized <i>R. subcapitata</i> ..	133
	7.5.2 Growth of <i>R. subcapitata</i> immobilized under different concentrations of nitrogen and phosphorus.....	136
	7.5.3 Two-Step culture of immobilized <i>R. subcapitata</i>	138
7.6	Conclusion.....	140
CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE.....143		
8.1	Contributions originales du projet.....	143
	8.1.1 Méthode d'immobilisation de <i>R. subcapitata</i>	144
	8.1.2 Avantages de l'utilisation de stratégie de culture en deux étapes avec la culture immobilisée des microalgues.....	145
8.2	Intérêts et retombées du projet.....	145

8.3	Recommandations.....	146
8.4	Perspectives.....	146
	CONCLUSION.....	149
ANNEXE I	RÉSUMÉ GRAPHIQUE ARTICLE 1	153
ANNEXE II	RÉSUMÉ GRAPHIQUE ARTICLE 2	155
ANNEXE III	RÉSUMÉ GRAPHIQUE ARTICLE 3	157
	LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	159

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 4.1	Size of beads (mm) versus alginate and CaCl ₂ concentrations.....93
Tableau 4.2	Maximum concentrations of <i>R. subcapitata</i> (cells/bead × 10 ⁶) reached in the beads as a function of the alginate and CaCl ₂ concentrations.....96
Tableau 4.3	Free <i>R. subcapitata</i> concentrations (cells/mL × 10 ⁶) detected in the culture medium on the 10 th day.....96
Tableau 4.4	Growth Rates (Cells/Bead/Day) and Generation Time (Day) of <i>R. subcapitata</i> as a function of the concentrations of alginate and CaCl ₂98
Tableau 6.1	Various species of free versus immobilized microalgae used for biodiesel production.....112
Tableau 7.1	The lipid content (% dcw), biomass (g/L), biomass productivity (mg/L/day), and lipid productivity (mg/L/day) of immobilized immobilized <i>R. subcapitata</i> obtained under different culture conditions.....135

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 2.1	Schéma de la structure d'une cellule végétale14
Figure 2.2	<i>Anabaena planctonica</i>16
Figure 2.3	Diatomées vues au microscope.....17
Figure 2.4	<i>Raphidocelis subcapitata</i>18
Figure 2.5	<i>Dinobryon cylindrique</i>18
Figure 2.6	<i>Rhodospirillum rubrum</i>19
Figure 2.7	<i>Euglena gracilis</i>20
Figure 2.8	Structure du chloroplaste21
Figure 2.9	Représentation schématique de l'appareil photosynthétique de la membrane des thylacoïdes22
Figure 2.10	Représentation schématique du photosystème I (PSI).....23
Figure 2.11	Représentation schématique du photosystème II (PSII)23
Figure 2.12	Schéma en Z du transport des électrons dans l'appareil photosynthétique ..27
Figure 2.13	Schéma des réactions du cycle de Calvin28
Figure 2.2.14	Concentrations des différentes espèces carbonées, résultant de la dissolution du CO ₂ gazeux, en fonction du pH du milieu.....31
Figure 2.15	Bassin Raceway (champ de course).....36
Figure 2.16	Exemples de photobioréacteurs37
Figure 2.17	Courbe de croissance théorique d'une microalgue cultivée en <i>batch</i>39
Figure 2.18	Schéma de synthèse de l'acide palmitique (C16)48
Figure 2.19	Schéma de synthèse des triglycérides (TAG)51
Figure 2.20	Comparaison des systèmes de récolte en fonction de leur consommation énergétique58

Figure 2.21	Distribution des monomères G et M dans la chaîne d'alginate	77
Figure 2.22	Étapes de gélification de l'alginate en présence de Ca^{2+}	78
Figure 3.1	Organigramme illustrant les méthodes utilisées dans les expériences d'immobilisation de <i>R. subcapitata</i> et de production de lipides.....	83
Figure 4.1	Macroscopic appearance of the sodium alginate beads with the following concentrations of : (a) 2 % alginate and 0.2 % CaCl_2 ; and (b) 1 % alginate and 1 % CaCl_2	94
Figure 4.2	Evolution of the cellular concentrations of <i>R. subcapitata</i> in alginate beads according to the different concentrations of alginate and CaCl_2 studied, over a period of 10 days: (a) 1 % alginate; (b) 1.5 % alginate; and (c) 2 % alginate	95
Figure 4.3	Variations in growth rates of immobilized <i>R. subcapitata</i> depending on the alginate and	98
Figure 4.4	Beads formed from 2 % alginate and 1 % CaCl_2 containing <i>R. subcapitata</i> in the exponential growth phase. Stereomicroscope observation ($G \times 1.0$)	99
Figure 4.5	Growth of free and immobilized <i>R. subcapitata</i> in the Erlenmeyer flask for 10 days.....	100
Figure 5.5.1	Croissance de <i>R. subcapitata</i> libre et immobilisée après révision de la méthode de calcul	105
Figure 6.1	Growth of <i>R. subcapitata</i> immobilized in alginate beads over a period of 10 days (culture performed in <i>batch</i> and in duplicate) : (a) variations in the number of cells; (b) variations in biomass; (c) variations of the average mass of cells; $t_0 = d_1$	120
Figure 6.2	Production of total lipids in <i>R. subcapitata</i> immobilized in alginate beads, over a period of 10 days (culture performed in <i>batch</i> and in duplicate). (a) Nitrate consumption; (b) phosphate consumption; (c) variations in lipid content per dry weight of cells; (d) variations in lipid concentration per cell; $t_0 = d_1$	122
Figure 7.1	Effects of nitrogen and phosphorus deficiency on lipid accumulation and biomass production in <i>R. subcapitata</i> immobilized in alginate beads (experiments performed in <i>batch</i> and in duplicate) : (a) variations in lipid content per dry weight of cells; (b) variations in biomass; N+P+ (control, complete medium); N-P+ (nitrogen-deficient medium); N+P- (phosphorus-deficient medium); $t_0 = d_1$	134

Figure 7.2 Growth of *R. subcapitata* immobilized in alginate beads under different concentrations of nitrogen and phosphorus, over a period of 10 days (experiments performed in batch and in duplicate) : (a) production of biomass under different concentrations of NaNO₃ (the concentration of K₂HPO₄ was 10.44 mg/L, which was the standard concentration of the culture medium); (b) production of biomass under different concentrations of K₂HPO₄ (the concentration of NaNO₃ was 0.255 g/L, which was the standard concentration of the culture medium); (c) maximum biomass production rate ($\mu_{m \max}$) of immobilized *R. subcapitata* as a function of different concentrations of NaNO₃; (d) maximum biomass production rate ($\mu_{m \max}$) of immobilized *R. subcapitata* as a function of different concentrations of K₂HPO₄; $t_0 = d_1$137

Figure 7.3 Two-step culture of *R. subcapitata* immobilized in alginate beads (experiments performed in duplicate) : (a) biomass production; (b) accumulation of total lipid; (c) appearance of alginate beads containing *R. subcapitata* cells at the beginning and end of the first stage of culture; at t_6 (d7), the immobilized microalgae were transferred to the N-deficient medium; $t_0 = d_1$139

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

CO ₂	Dioxyde de carbone
N	Azote
P	Phosphore
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
ATP	Adénosine Tri Phosphate
ADP	Adénosine Di Phosphate
H ₂ O	Eau
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
LHCII	Light Harvesting Complex II
LHCI	Light Harvesting Complex I
RuBP	Ribulose-1,5- biphosphate
Rubisco	Ribulose-1,5- biphosphate Carboxylase/Oxygénase
G3P	Glycéraldéhyde 3-phosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique

ARN Acide ribonucléique

PBR Photobioréacteur

TAG Triglycérides

ASTM American Society for Testing and Materials

EDTA Acide éthylènediaminetétraacétique

CaCl₂ Chlorure de calcium

NaCl Chlorure de sodium

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

km	Kilomètre
L	Litre
mL	Millilitre
g	Gramme
mg	Milligramme
j	Jour
μm	Micromètre
nm	Nanomètre
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius
%	Pourcent
mM	Millimole
w/v	Weight/volume
rpm	Rotation per minute
$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$	Mètre carré par seconde

INTRODUCTION

Les microalgues, organismes microscopiques unicellulaires, suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison de leur capacité à produire des substances industriellement intéressantes, notamment dans les domaines de la nutrition animale et humaine, de la pharmaceutique, de la nutraceutique, de la cosmétique et de l'énergie (Combe, 2016; Connaissance des énergies, 2011).

Ces microorganismes dont la plupart des espèces sont photosynthétiques sont caractérisés par leur rapidité de croissance (Chisti, 2007; Dejoye, 2013) et permettent la capture d'une quantité importante de dioxyde de carbone (CO₂) atmosphérique (Lam & Lee, 2012b), elles sont donc de potentielles candidates pour contribuer à la diminution de la concentration de ce gaz à effet de serre, responsable (avec d'autres gaz) du réchauffement climatique. Grâce à la photosynthèse, les microalgues convertissent l'eau et le CO₂ absorbés en biomasse composée principalement de glucides, de protéines et de lipides (Bélanger-Lépine, 2019; Veillette, 2016).

Les lipides constituent une opportunité de valorisation intéressante des microalgues (Dejoye, 2013). Certaines espèces sont capables d'accumuler dans des conditions de culture particulières, telles qu'une carence en azote ou en phosphore, des quantités élevées en lipides spécialement les triglycérides (TAG) (lipides de stockage) qui peuvent être convertis en biodiesel (Q. Hu et al., 2008; Mata, Martins, & Caetano, 2010; Roopnarain, Gray, & Sym, 2014; Taleb, 2015). Ce biocarburant pourrait être utilisé pour réduire la consommation de diesel fossile et lutter contre la problématique des changements climatiques (Veillette, 2016). Les lipides de structure, constitués principalement de phospholipides et de glycolipides (Dejoye, 2013; Hu et al., 2008; Huang, 2018), ont généralement une teneur élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI) comme les oméga-3, qui sont des nutriments essentiels pour les animaux aquatiques et les humains (Sharma, Schuhmann, & Schenk, 2012). Par exemple, l'acide docosahexaénoïque (DHA) est essentiel pour le bon fonctionnement du cœur et du cerveau (Dejoye, 2013). Par ailleurs, les phospholipides sont utilisés comme émulsifiants en agroalimentaire (Dejoye, 2013). D'autres bioproduits peuvent être aussi issus des lipides

algues comme des produits nettoyants à usages domestiques et industriels (Bélanger-Lépine, 2019).

Toutefois, la culture des microalgues pour la production des lipides présente des coûts élevés et certains défis non négligeables. La récolte des microalgues constitue une étape limitante, car ces microorganismes sont de petite taille et sont dilués dans le milieu de culture (Bélanger-Lépine, 2019; Lam & Lee, 2012b; Suali & Sarbatly, 2012). Selon certaines estimations, elle représente de 20 à 30 % du coût total de production des lipides (Barros, Gonçalves, Simões, & Pires, 2015; Besson, 2013; Labranche, 2015; Mata et al., 2010; Pahl et al., 2013; Zinkone, 2018).

Il existe plusieurs méthodes de récolte des microalgues, la centrifugation est la technique la plus utilisée à l'échelle industrielle mais, elle est coûteuse en énergie (Bensalem, 2019; Dejoye, 2013; Labranche, 2015). En revanche, il a été rapporté que l'immobilisation des microalgues notamment, dans des billes d'alginate permet de faciliter leur récolte. Les billes sont de grande taille par rapport aux cellules libres et peuvent être récupérées par un simple tamisage sans consommation importante d'énergie (Lam & Lee, 2012a). Ceci laisse alors supposer que l'intégration de cette technique d'immobilisation dans la culture des microalgues pour la production des lipides permettra de réduire les coûts de leur récolte et contribuera à l'augmentation de la faisabilité économique du procédé. Néanmoins, certains problèmes comme la stabilité des billes, la fuite des cellules et la limitation de transfert des nutriments restent à résoudre avant le passage à l'échelle industrielle (Lam & Lee, 2012b). Dans ce contexte, l'objectif général du présent projet est l'étude de l'immobilisation de la microalgue d'eau douce *Raphidocelis subcapitata* dans des billes d'alginate pour produire une quantité élevée de lipides. Cet objectif a été découpé en trois objectifs spécifiques qui sont étudiés par les articles présentés dans cette thèse.

Le manuscrit est composé de six chapitres. Le premier chapitre décrit la problématique et les objectifs de recherche. Le deuxième chapitre consiste en une revue de littérature présentant une vue globale sur les microalgues et leurs applications, le mécanisme de production des

lipides, les méthodes de récolte conventionnelles ainsi que la technologie d'immobilisation des microalgues. Une attention particulière est accordée à l'immobilisation des microalgues dans le gel d'alginate. Le troisième chapitre présente la méthodologie générale suivie dans les expériences d'immobilisation de la microalgue *R. subcapitata* dans des billes d'alginate et de production de lipides. Le quatrième chapitre est dédié au premier article; il vise la détermination des concentrations d'alginate et de CaCl_2 (éléments qui permettent l'élaboration des billes) qui favorisent la croissance de la microalgue *Raphidocelis subcapitata* et assurent la stabilité des billes durant 10 jours de culture. Le cinquième chapitre décrit la méthode de calcul développée pour estimer la croissance de *R. subcapitata* immobilisée par volume de milieu de culture utilisé (1 L). Le sixième chapitre est consacré au deuxième article qui a pour objectif d'examiner la capacité de la microalgue immobilisée à accumuler les lipides sous conditions de stress. Le septième chapitre concerne le troisième article; il porte sur l'utilisation de stratégie de culture combinant haute production de biomasse et accumulation des lipides pour augmenter la productivité lipidique de *R. subcapitata* immobilisée. Le huitième chapitre présente une discussion générale dans laquelle l'originalité des travaux et leur apport au domaine de la recherche sont soulignés. Ensuite, les retombées du projet et les perspectives de continuité de la recherche sont décrites.

CHAPITRE 1

PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE

Ce chapitre décrit, dans une première partie, le problème général auquel répond le présent travail et qui réside dans la difficulté de récupération des microalgues du milieu de culture dans le procédé de production des lipides et les inconvénients des méthodes de récolte conventionnelles utilisées. Il présente par la suite les hypothèses et les objectifs de recherche.

1.1 Problématique de recherche

Les lipides algaux suscitent beaucoup d'intérêt quant à la production de biodiesel et d'autres bioproduits qui peuvent être utilisés pour des applications nutritionnelles et pharmaceutiques comme les oméga-3. Par exemple, l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) permettent de prévenir des maladies cardiovasculaires et cérébrales et d'autres maladies telles que le diabète de type II, l'arthrite et les maladies oculaires (Bélanger-Lépine, 2019; Shahidi & Wanasundara, 1998; Spolaore, Joannis-Cassan, Duran, & Isambert, 2006; Tonon, Harvey, Larson, & Graham, 2002). Les lipides peuvent être aussi utilisés comme émulsifiants en agroalimentaire (Dejoye, 2013). L'acide gras laurique et myristique sont utilisés pour la fabrication des produits de nettoyage (Bélanger-Lépine, 2019).

Toutefois, la culture des microalgues pour la production des lipides est coûteuse et de nombreux verrous restent à lever pour parvenir à une production à grande échelle économiquement viable, parmi lesquels, la récolte des microalgues qui représente de 20 à 30 % du coût total du procédé (Barros et al., 2015; Besson, 2013; Labranche, 2015; Mata et al., 2010; Pahl et al., 2013; Zinkone, 2018). Cette étape pose un réel problème car ces microorganismes sont de petite taille et sont dilués dans le milieu de culture (Barros et al., 2015; Bensalem, 2019; Labranche, 2015; Lam & Lee, 2012b; Suali & Sarbatly, 2012; Zhou et al., 2012). Les méthodes conventionnelles de récolte des microalgues impliquent des procédés physiques ou chimiques tels que la centrifugation, la filtration, la flottation et la floculation. Ces méthodes peuvent être utilisées individuellement ou en combinaison (Difusa, Mohanty, & Goud, 2015;

Escudero-Oñate & Ferrando-Climent, 2019; Zhou et al., 2012). La centrifugation est la technique la plus employée à l'échelle industrielle mais, elle est coûteuse en termes d'investissement et de consommation d'énergie (Bensalem, 2019; Dejoye, 2013; Labranche, 2015). La filtration est aussi un procédé énergivore (Dejoye, 2013; Zinkone, 2018) et ne convient pas à la récolte des microalgues formant des colonies comme *Micratinium sp.* ou filamenteuses comme *Spirulina sp.* (Zhou et al., 2012). La floculation avec des produits chimiques inorganiques nécessite l'ajout de quantités importantes de sels métalliques ce qui pourrait contaminer la biomasse et avoir un effet néfaste sur la qualité du produit final. De plus, elle n'est pas respectueuse de l'environnement (Ballerini, 2011; Chen, Yeh, Aisyah, Lee, & Chang, 2011; Escudero-Oñate & Ferrando-Climent, 2019). La biofloculation des microalgues avec des microorganismes comme les bactéries, les levures et les champignons nécessite une source de carbone et des substrats de culture supplémentaires et peut contaminer la biomasse algale (Zhou et al., 2012).

Pour remédier aux inconvénients des méthodes de récolte traditionnelles, certains chercheurs ont proposé l'immobilisation des microalgues (Escudero-Oñate & Ferrando-Climent, 2019). L'immobilisation des microalgues consiste en leur attachement à, ou piégeage dans, des supports solides insolubles dans l'eau (Bouabidi, El-Naas, & Zhang, 2019). Plusieurs méthodes ont été développées, la plus largement utilisée est leur piégeage dans des polysaccharides naturels, particulièrement les alginates. Cette méthode est simple, peu coûteuse et permet de les récupérer facilement. En effet, les billes d'alginate contenant les microalgues ont une taille relativement grande par rapport aux cellules libres et peuvent être collectées par un simple tamisage sans consommation importante d'énergie (Lam & Lee, 2012b). Ainsi, le gel d'alginate présente plusieurs avantages comme la non toxicité, la biodégradabilité, des conditions douces de gélification et une transparence élevée à la lumière ce qui permet de maintenir l'activité photosynthétique des microalgues (Bouabidi et al., 2019; Ignacio Moreno-Garrido, 2013). Cependant, certains problèmes restent à résoudre avant le passage à grande échelle, parmi lesquels, le niveau de stabilité des billes pour favoriser la croissance des microalgues et minimiser la fuite des cellules.

La stabilité des billes est un point important à prendre en considération pour la culture des microalgues immobilisées sur une longue durée (quelques jours). Il est nécessaire d'obtenir des billes résistantes à la dissolution et qui permettent de retenir les microalgues durant la période de culture. Toutefois, la rigidité du gel ne doit pas freiner la croissance des cellules à l'intérieur des billes. La rigidité du gel dépend en grande partie des concentrations en alginate et en CaCl_2 utilisées. En effet, une faible concentration en alginate et/ou des cations Ca^{2+} insuffisants lors de l'étape de gélification peuvent donner des billes fragiles et facilement dissoutes ce qui les emmène à libérer les cellules de microalgues dans le milieu de culture (Lam & Lee, 2012b). En revanche, des concentrations élevées en ces deux éléments, notamment si l'alginate contient une teneur élevée en blocs G, peuvent générer des billes dures et stables permettant de retenir les microalgues pour une longue durée mais la densité du gel dans ce cas peut créer une limitation de transfert de nutriments en réduisant la perméabilité du gel d'alginate et par conséquent diminue la croissance des microalgues.

Aslani et Kennedy (1996) ont montré que la perméabilité du gel d'alginate à l'acétaminophène était diminuée avec l'augmentation de la concentration en cations gélifiants (Ca ou Zn) de 0,1 M à 0,7 M. Hariyadi (2011) a montré que la libération d'ibuprofène à partir de microsphères d'alginate produites avec une faible concentration en Ca (0,1 M) était plus rapide comparée aux microsphères réticulées avec une concentration élevée en Ca (0,5 M). Également, Thu et al. (1996) rapportent que la stabilité des billes d'alginate vis-à-vis de la dissolution peut être augmentée en augmentant la concentration en alginate. Se pose alors la question suivante : quelles sont les concentrations en alginate et en CaCl_2 qui favorisent la croissance des microalgues et assurent la stabilité des billes durant la période de culture ? D'après les chercheurs, ces concentrations peuvent varier selon l'espèce de microalgue et ses conditions de culture. Par exemple, Lam et Lee (2012a) ont déterminé les conditions optimales d'immobilisation de *Chlorella vulgaris* à 2 % alginate et 2 % CaCl_2 . La microalgue était cultivée dans un milieu de culture synthétique pendant 10 jours. Moreira, Moreira-Santos, Guilhermino, et Ribeiro (2006) ont montré que les concentrations 4.9 % alginate (alginate extrait de *Laminaria hyperborea*) et 4 % CaCl_2 étaient les plus adaptées pour l'immobilisation de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum*. Les billes étaient stables et ont assuré la croissance

de la microalgue dans l'eau de mer naturelle et dans l'eau de mer reconstituée pendant 16 jours de culture.

La stabilité des billes peut être influencée par de nombreux facteurs tels que la densité des microalgues à l'intérieur des billes, l'activité métabolique de la biomasse, la composition du milieu de culture et les paramètres de culture (Millette, 2003). Une densité trop élevée de microalgues à l'intérieur des billes peut déstabiliser le gel d'alginate et provoquer sa dissolution (Lam & Lee, 2012b). Ainsi, dans le cas de microalgue productrice de substances extracellulaires, ces dernières peuvent modifier la viscosité des billes et conduire à leur dissolution (Moreno-Garrido, Campana, Lubián, & Blasco, 2005). La présence d'agents chélateurs tels que le magnésium et le sodium en concentrations élevées dans le milieu de culture peut aussi entraîner la dissolution des billes et donc la libération des microalgues (Lam & Lee, 2012b). Selon la littérature, la culture prolongée des microalgues à des valeurs de pH supérieures à la neutralité entraîne le gonflement du gel et provoque la dissolution des billes (Ching, Bansal, & Bhandari, 2017). De ce fait, il est nécessaire d'ajuster les concentrations en alginate et en CaCl_2 pour chaque espèce et selon ses conditions de culture. Dans le présent travail, la microalgue d'eau douce *Raphidocelis subcapitata* a été choisie comme modèle de l'étude. Les travaux réalisés sur la culture libre de cette espèce ont montré qu'elle est capable d'accumuler une quantité importante de lipides (Gonçalves, Pires, & Simões, 2013; Patil, Källqvist, Olsen, Vogt, & Gislerød, 2007). De plus, elle peut être cultivée au laboratoire. Cette étude est la première qui a tenté de produire une quantité élevée de lipides chez *R. subcapitata* immobilisée dans des billes d'alginate.

Le projet s'appuie sur trois hypothèses, qui font l'objet des trois articles exposés dans cette thèse.

1.2 Hypothèses de recherche

La croissance des microalgues dans le gel d'alginate et la stabilité des billes dépendent en partie des concentrations en alginate et en CaCl_2 utilisées.

Hypothèse 1

Il existe des concentrations en alginate et en CaCl_2 qui favorisent la croissance de *R. subcapitata* immobilisée et assurent la stabilité des billes pour 10 jours de culture. La détermination de ces concentrations permet de maîtriser la culture de la microalgue dans le gel d'alginate

Par ailleurs, il a été rapporté que l'immobilisation des microorganismes peut entraîner une modification de leur croissance, leur morphologie, leur physiologie et leur métabolisme. En effet, les conditions de culture du microorganisme jouent un grand rôle dans l'induction et la répression de certaines de ses enzymes (Bou Saab, 2011; Kourkoutas, Bekatorou, Banat, Marchant, & Koutinas, 2004). Dans ce cas, *R. subcapitata* immobilisée sera-t-elle capable d'accumuler les lipides sous conditions de stress ?

Hypothèse 2

Étant donné que l'immobilisation de *R. subcapitata* sera réalisée dans des billes élaborées avec des concentrations en alginate et en CaCl_2 qui assurent sa croissance, les cellules seront capables d'accumuler les lipides sous conditions de stress comme une carence en azote (N) ou en phosphore (P).

Enfin, il est connu que les conditions d'induction de l'accumulation des lipides (les plus fréquemment utilisées sont la carence en N ou en P) entraînent généralement un ralentissement de la croissance, ce qui réduit la productivité lipidique des microalgues (Bélanger-Lépine, 2019; Mandal & Mallick, 2009; Rodolfi et al., 2009; Xin, Hong-Ying, Ke, & Ying-Xue, 2010). Se pose alors une autre question : comment peut-on augmenter la productivité lipidique de *R. subcapitata* immobilisée ?

Hypothèse 3

L'application d'une stratégie de culture en deux étapes combinant haute production de biomasse et accumulation de lipides permet d'augmenter la productivité lipidique de *R. subcapitata* immobilisée.

1.3 Objectifs de recherche

L'objectif général du présent projet est l'étude de l'immobilisation de la microalgue d'eau douce *Raphidocelis subcapitata* dans des billes d'alginate pour produire une quantité élevée de lipides. Cet objectif général est divisé en trois objectifs spécifiques, qui répondent aux hypothèses de recherche formulées. Le premier objectif spécifique s'intéresse à la croissance de *R. subcapitata* dans le gel d'alginate et à la stabilité des billes. Il est énoncé comme suit :

Objectifs spécifiques 1

- Étudier la croissance de *R. subcapitata* immobilisée et la stabilité des billes sous différentes concentrations en alginate et en CaCl_2 .
- Déterminer les concentrations en alginate et en CaCl_2 qui favorisent la croissance de la microalgue et assurent la stabilité des billes pour 10 jours de culture.

Dans le deuxième objectif spécifique, la capacité de *R. subcapitata* immobilisée à accumuler les lipides sous conditions de stress (épuisement de l'azote et du phosphore dans le milieu de culture) est examinée. L'objectif est le suivant.

Objectifs spécifiques 2

- Quantifier la production de biomasse et de lipides chez *R. subcapitata* immobilisée durant sa culture en *batch*, avec suivi des concentrations en azote et en phosphore dans le milieu de culture.

- Calculer sa productivité lipidique.

Le troisième objectif spécifique propose l'application de stratégie de culture en deux étapes combinant haute production de biomasse et accumulation de lipides pour tenter d'augmenter la productivité lipidique de *R. subcapitata* immobilisée. Il est formulé comme suit.

Objectifs spécifiques 3

- Déterminer les concentrations optimales en N et P pour l'obtention d'une production maximale en biomasse.
- Déterminer le déclencheur le plus efficace de l'accumulation de lipides dans *R. subcapitata* immobilisée (carence en N ou en P).
- Appliquer la stratégie en deux étapes : cultiver *R. subcapitata* immobilisée dans des conditions d'apports optimales en N et P pour l'obtention d'une production maximale en biomasse puis transférer les billes dans un milieu de culture avec carence en azote ou en phosphore (choisir le déclencheur le plus efficace) pour induire l'accumulation des lipides.

Enfin, Dans ce projet, un pseudo-problème a été rencontré et qui réside dans la méthode de calcul utilisée pour estimer la croissance de *R. subcapitata* immobilisée par volume de milieu de culture utilisé. Un quatrième objectif spécifique est alors ajouté. Il est énoncé comme suit :

Objectif spécifique 4

Développer une méthode de calcul du nombre de cellules de *R. subcapitata* immobilisée par volume de milieu de culture utilisé (1 L).

CHAPITRE 2

REVUE DE LITTÉRATURE

Ce chapitre présente une vue générale sur les microalgues, le mécanisme de production des lipides, les méthodes de récolte conventionnelles ainsi que la technologie d'immobilisation des microalgues. Une attention particulière est accordée à l'immobilisation des microalgues dans le gel d'alginate.

2.1 Vue générale sur les microalgues

Cette section présente la définition des microalgues et leur biodiversité, les conditions de culture, les systèmes et les modes de culture existants ainsi que les diverses applications de ces microorganismes.

2.1.1 Définition et caractéristiques des microalgues

Les microalgues sont des organismes microscopiques unicellulaires (Dejoye, 2013). Leur taille varie de quelques microns à plusieurs centaines de microns (Boileau, 2015).

La majorité des espèces sont autotrophes par photosynthèse (Dejoye, 2013), ce qui signifie qu'elles sont capables de synthétiser la matière organique nécessaire à leur survie à partir de composés minéraux, de CO₂ et de l'eau grâce à l'énergie lumineuse reçue du soleil (Photosynthèse, 2021). Toutefois, il existe des microalgues hétérotrophes et mixotrophes. Les hétérotrophes n'ont pas besoin de lumière, elles utilisent des composants organiques préexistants, pour leur croissance. Les mixotrophes peuvent se nourrir par autotrophie et par hétérotrophie, selon les conditions environnementales. En absence de lumière, le développement des chloroplastes est inhibé, ces microalgues s'alimentent alors des constituants organiques disponible dans le milieu (El Hifnawy, 2016).

Les microalgues constituent un groupe diversifié de procaryotes et eucaryotes (El Hifnawy, 2016). Les procaryotes sont représentées par les cyanobactéries, appelées aussi « algues bleu-vert » (Bonnefond, Combe, Cadoret, Sciandra, & Bernard, 2020). Ces dernières possèdent une structure bactérienne classique, les pigments photosynthétiques sont renfermés dans des membranes lamellaires. Les microalgues eucaryotes ont une structure de cellule végétale qui contient dans son cytoplasme un noyau dans son enveloppe et plusieurs organites intracellulaires nécessaires à son fonctionnement (Figure 2.1). Les pigments photosynthétiques sont contenus dans les plastes (Dejoye, 2013).

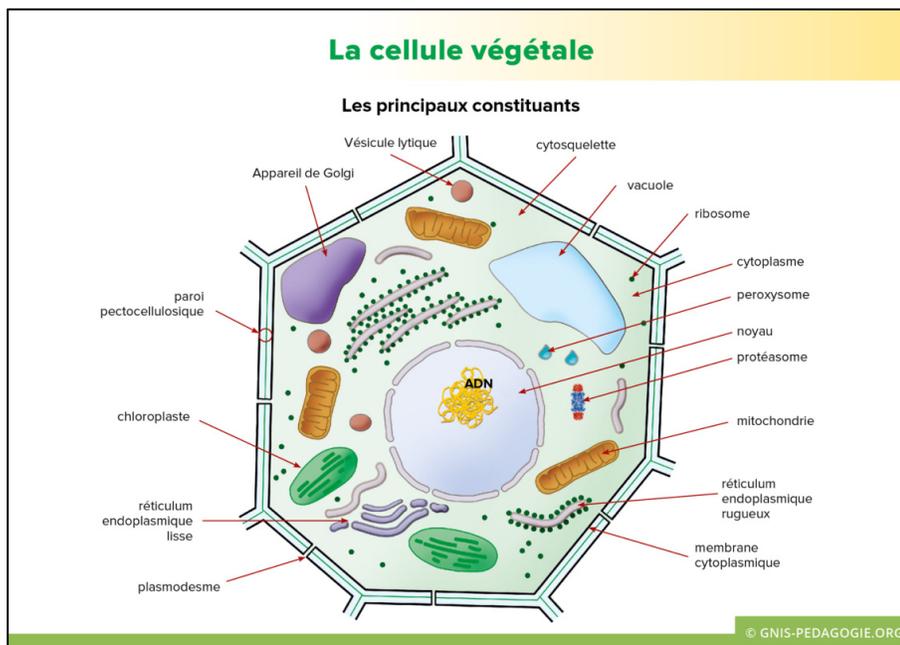


Figure 2.1 Schéma de la structure d'une cellule végétale
Tirée de SEMAE (s.d.)
(Reproduite avec permission)

Selon les espèces, les microalgues peuvent vivre sous forme libre ou en colonie (Ait Bellah et al., 2014), dans des habitats aquatiques (eaux douces, eaux thermales, glaciers, eaux alcalines, eaux acides et eaux usées) ainsi qu'en milieu terrestre (sur les troncs des arbres, sur les rochers mouillés et sur les sols humides). En milieu aquatique, elles peuvent être benthiques (fixées dans le fond) ou planctoniques (en suspension dans l'eau) (De Reviere, s.d.; Launay, Jousseume, & Zribi, s.d.).

Les chercheurs estiment entre 200 000 et 7 millions, le nombre d'espèces de microalgues existantes dans la nature (Launay et al., s.d.), ce qui est largement supérieur aux 250 000 espèces de plantes supérieures recensées (Taleb, 2015).

2.1.2 Classification des microalgues

La classification taxonomique des microalgues reste complexe et sujette à de fréquentes modifications. Elle repose présentement sur diverses propriétés telles que les caractéristiques morphologiques, la pigmentation, l'organisation des membranes photosynthétiques, la nature des produits de stockage et l'analyse de certaines séquences du génome (Bonfond et al., 2020). Les principales classes de microalgues sont les Cyanophycées, les Bacillariophycées (diatomées), les Chlorophycées, les Chrysophycées, les Rhodophycées et les Euglénophycées (El Hifnawy, 2016).

2.1.2.1 Les Cyanophycées (algues bleu vert)

Appelées aussi cyanobactéries (ou algues bleu vert), sont des microalgues procaryotes de petites tailles (10 μm) (Dejoye, 2013). Elles correspondent à un embranchement de bactéries, pourvues de membranes photosynthétiques (Marechal, 2021). Cette famille compte environ 7500 espèces dans divers habitats (Cantin, 2010). Elles se présentent sous forme de cellules individuelles, de colonies ou de filaments (Figure 2.2) (Hickman, 2013). Les espèces les plus connues sont *Spirulina sp*, *Aphanizomenon flos-aquae* et *Nostoc commune* (Dejoye, 2013). Les cyanobactéries contiennent la chlorophylle *a*, les caroténoïdes, la phycocyanine et la phycoérythrine (Groga, 2012). Elles stockent généralement leur énergie sous forme de lipides ou d'amidon (Dejoye, 2013). La présence de lumière est indispensable pour leur croissance, ce sont des microorganismes autotrophes obligatoires (Cantin, 2010). Cependant, quelques espèces sont capables d'oxyder certains sucres présents dans leur composition, en absence de lumière (Dejoye, 2013). Certaines cyanobactéries filamenteuses comme les genres *Nostoc* et *Anabaena* peuvent fixer l'azote atmosphérique, elles possèdent des cellules particulières appelées hétérocystes (Groga, 2012), qui contiennent l'enzyme nitrogénase (Hétérocyste, 2021).



Figure 2.2 *Anabaena planctonica*
Tirée de Oyadomari (2005)
(Reproduite avec permission)

2.1.2.2 Les Bacillariophycées (diatomées)

Ce groupe domine les populations du phytoplancton (Doré-Deschênes, 2009). Il englobe plus de 100 000 espèces répandues dans tous les types d'habitat (Cantin, 2010). Les diatomées se distinguent des autres groupes par leur paroi cellulaire siliceuse appelée frustule (Groga, 2012; Taleb, 2015). Ce sont des microalgues jaunes et brunes unicellulaires (Taylor, 1983) mesurant de 2 μm à 1 mm (Taleb, 2015). Elles peuvent vivre isolées ou en colonie (Taylor, 1983) et sont généralement divisées en deux groupes, selon la géométrie de leur frustule: les diatomées centrales à symétrie radiale et les diatomées pennées à symétrie bilatérale (Figure 2.3) (Langlois, 2006). Les diatomées contiennent comme pigments photosynthétiques la chlorophylle *a* et la chlorophylle *c*, ainsi que la diadinoxanthine, la diatoxanthine et la fucoxanthine (Gastineau, 2011). Elles stockent leur énergie sous forme de chrysolaminarine, un polysaccharide, et de lipides (Dejoye, 2013).

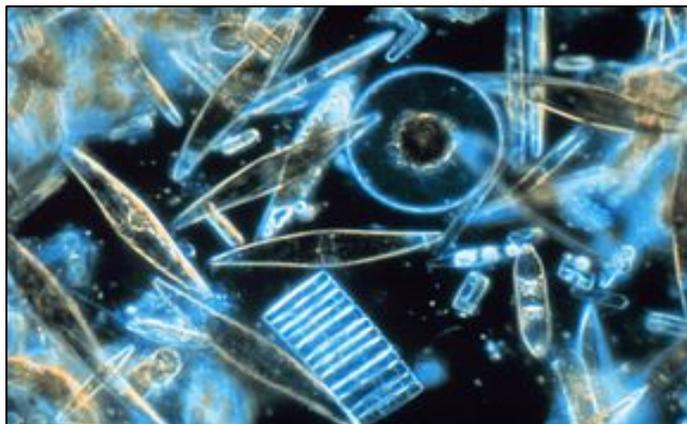


Figure 2.3 Diatomées vues au microscope
Tirée de Taylor (1983)

2.1.2.3 Les Chlorophycées (microalgues vertes)

Les microalgues vertes présentent une grande diversité de morphologie (Cavalla, 2000) et sont abondantes en eaux douces (Doré-Deschênes, 2009). Le groupe est représenté par plus de 15 000 espèces (Groga, 2012). Elles peuvent croître en mode unicellulaire ou en colonies (Doré-Deschênes, 2009). Ces microalgues contiennent la chlorophylle *a*, la chlorophylle *b*, le β -carotène et les xanthophylles (Feldmann & Magne, s.d.-a). Elles peuvent être autotrophes ou hétérotrophes (Dejoye, 2013). Leurs principales réserves énergétiques sont l'amidon et l'huile (Taleb, 2015). Parmi les espèces connues pour leur production élevée de lipides *Chlorella vulgaris* (Cantin, 2010) et *Raphidocelis subcapitata* (anciennement appelée *Pseudokirchneriella subcapitata* ou *Selenastrum capricornutum*) (Gonçalves et al., 2013) qui est l'espèce modèle dans la présente étude. Cette est une microalgue autotrophe d'eau douce. Elle appartient à la famille des *Selenastraceae*. Les cellules ont une forme de croissant (Figure 2.4) et mesurent entre 8 et 14 μm de long et 2 à 3 μm de large. Elles sont habituellement solitaires (*Raphidocelis subcapitata*, 2021).

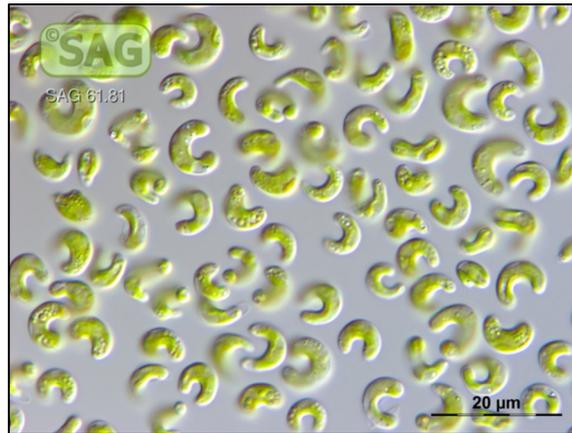


Figure 2.4 *Raphidocelis subcapitata*
Tirée de Lorenz (2016)

2.1.2.4 Les Chrysophycées (microalgues dorées)

Cette famille comporte environ 1000 espèces (Doré-Deschênes, 2009). Ce sont des microalgues unicellulaires vivant sous forme individuelle ou en colonies, dans les eaux douces et les eaux salées. Leur couleur brun-jaune est due à la présence de pigments caroténoïdes et à l'abondance des xanthophylles masquant la chlorophylle *a* et la chlorophylle *c* (Figure 2.5) (Bourrelly, s.d.).



Figure 2.5 *Dinobryon cylindrique*
Tirée de Oyadomari (2003)
(Reproduite avec permission)

La cellule possède généralement deux flagelles localisés à l'une de ses extrémités (*Chrysophyceae*, 2022). Beaucoup d'espèces de Crysophycées sont dépourvues de paroi cellulaire, elles sont entourées seulement d'une membrane cytoplasmique. D'autres sont couvertes d'écailles siliceuses ou calcaires (Groga, 2012). Leurs réserves sont constituées par des lipides et par un polysaccharide, la chrysolaminarine (Bourrelly, s.d.).

2.1.2.5 Les Rhodophycées (microalgues rouges)

Il existe environ 4000 espèces de Rhodophycées qui sont retrouvées principalement dans les eaux salées et saumâtres. La majorité d'entre elles sont photoautotrophes (Dejoye, 2013). Les plastes de ces microalgues (rhodoplastes) sont colorés en rouge par la r-phycoérythrine. Ce pigment rouge masque la chlorophylle *a* et les caroténoïdes (Figure 2.6). Une autre caractéristique cytologique des Rhodophycées est la présence de synapses entre les cellules; une synapse est une ouverture connectant le cytoplasme de deux cellules adjacentes lors de la division cellulaire. Elle consiste en une région lipo-protéique nommée bouchon synaptique (Feldmann & Magne, s.d.-b; Fortier, 2021). Les réserves énergétiques de ces microalgues sont constituées principalement par des grains d'un amidon particulier, l'amidon floridéen, qui est localisé dans le cytoplasme et non dans les plastes comme chez les algues vertes et les plantes supérieures. Aussi, des hétérosides spécifiques, composés de galactose (floridoside) et de glycérol, ou de mannose et d'acide glycérique, sont fréquemment présents dans le suc vacuolaire. Certaines Rhodophycées possèdent des iodiques, cellules sécrétrices spéciales, stockant de l'iode (Feldmann & Magne, s.d.-b).



Figure 2.6 *Rhodosorus marinus*
Tirée de Hodac (2008)

2.1.2.6 Les Euglénophycées

Les Euglénophycées sont des microalgues unicellulaires flagellées. Elles sont répandues dans les eaux saumâtres et les eaux douces. Il y a au moins 1500 espèces dans ce groupe. Les Euglénophycées renferment la chlorophylle *b* (Joyon & Mignot, s.d.). Leurs réserves sont constituées principalement de paramylon, substance glucidique, et d'huiles. Elles peuvent croître en mode autotrophe et hétérotrophe comme l'espèce *Euglena gracilis* (Figure 2.7) qui est connue pour sa production intéressante d'acide gras (Cantin, 2010).



Figure 2.7 *Euglena gracilis*
Tirée de Berdan (2021)
(Reproduite avec permission)

2.1.3 La photosynthèse

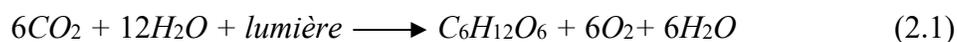
Les microalgues réalisent une photosynthèse similaire à celle des plantes supérieures (Taleb, 2015). Elle est composée de deux phases qui sont décrites dans les paragraphes qui suivent.

Une phase photochimique (phase claire, phase dépendante de la lumière), au cours de laquelle l'énergie lumineuse, captée par les pigments photosynthétiques, est transmise par des électrons, à une chaîne d'accepteurs d'électrons jusqu'à un accepteur final conduisant à la production du pouvoir réducteur Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH).

Cette phase aboutit aussi à la synthèse d'Adénosine Tri Phosphate (ATP). La phase claire permet de transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique (Simon, 2009; Taleb, 2015).

Cycle de Calvin (phase sombre), durant lequel le NADPH et l'ATP sont utilisés pour assimiler le carbone inorganique (CO₂) et le convertir avec l'eau en matière organique. Cette phase est entièrement enzymatique et n'exige pas directement la présence de lumière pour se dérouler (Simon, 2009). Toutefois puisqu'elle utilise les produits de la phase photochimique, elle reste fortement dépendante de celle-ci (Clément-Larosière, 2012).

La photosynthèse peut être représentée par l'équation suivante (Équation 2.1) :



Tirée de Hammadi (2013)

Bien que la photosynthèse ait lieu dans le chloroplaste de la cellule, les deux phases se déroulent dans deux endroits distincts. La phase photochimique et l'oxydation de l'eau se déroulent dans les membranes des thylakoïdes tandis que le cycle de Calvin a lieu dans le stroma du chloroplaste (Figure 2.8) (Clément-Larosière, 2012).

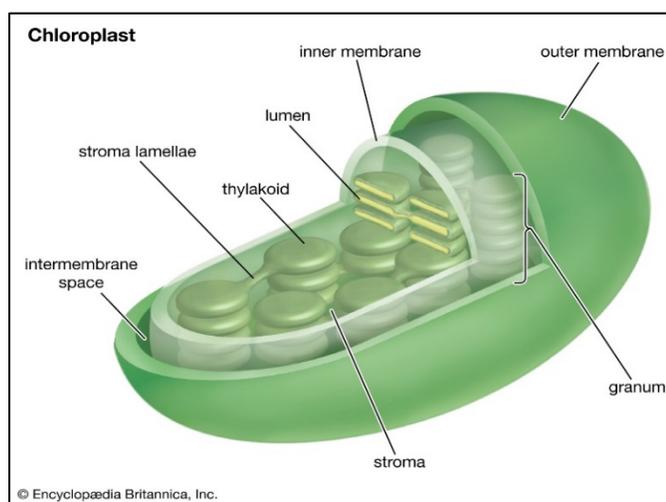


Figure 2.8 Structure du chloroplaste
Tirée de Encyclopædia Britannica (2019)
(Reproduite avec permission)

2.1.3.1 La phase photochimique (phase claire)

Dans la membrane interne des thylakoïdes se trouve l'appareil photosynthétique où se déroulent les réactions de cette phase (Figure 2.9).

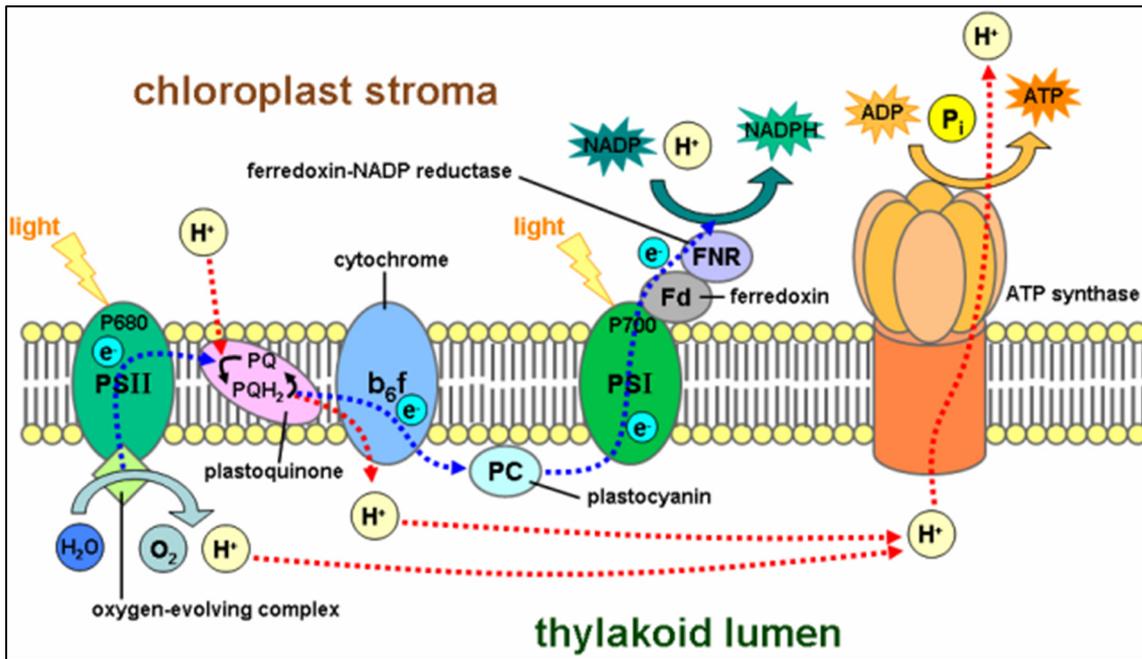


Figure 2.9 Représentation schématique de l'appareil photosynthétique de la membrane des thylakoïdes

Tirée de Tameeria (2007)

Il est composé de complexes protéiques associés à des pigments photosynthétiques que l'on appelle des photosystèmes (PSI et PSII), d'accepteurs et de donneurs d'électrons (Clément-Larosière, 2012). Le PSI et PSII sont constitués d'une antenne collectrice de lumière et d'un centre réactionnel situé au centre de l'antenne (Figure 2.10 et Figure 2.11) (Simon, 2009). L'antenne du PSII est appelée LHCI (Light Harvesting Complex II) (Taleb, 2015), celle du PSI est appelée LHCI (Light Harvesting Complex I). Le PSII comporte un complexe d'oxydation de l'eau.

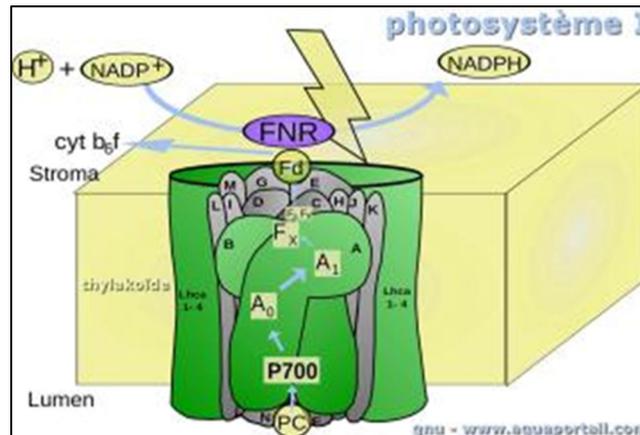


Figure 2.10 Représentation schématique
du photosystème I (PSI)
Tirée de Fortier (2019)
(Reproduite avec permission)

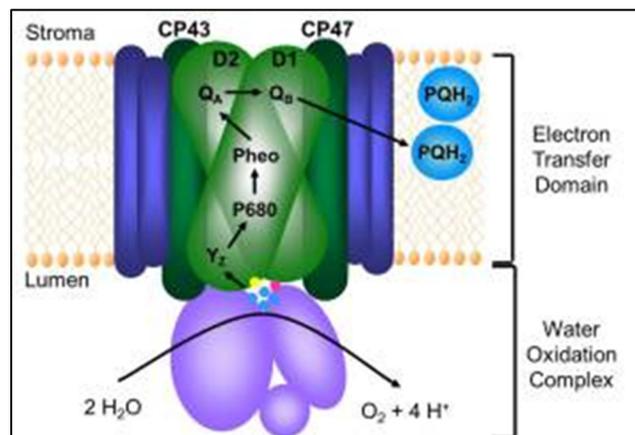


Figure 2.11 Représentation schématique
du photosystème II (PSII)
Tirée de Roose (s.d.)
(Reproduite avec permission)

L'antenne collectrice des photosystèmes contient plusieurs types de pigments photosynthétiques, selon les espèces. Les chlorophycées contiennent la chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* et des caroténoïdes (Clément-Larosière, 2012). Ces pigments absorbent les radiations lumineuses dans la gamme de longueurs d'ondes du visible. La chlorophylle *a* présente un maximum d'absorption à des longueurs d'onde de 430 nm (bleu) et 660 nm (rouge). La chlorophylle *b* présente un maximum d'absorption à des longueurs d'onde de

445 nm (bleu) et 645 nm (rouge). Le β carotène absorbe fortement la lumière entre 400 et 500 nm (bande bleue verte) (Benlot, Blanchouin, Prat, Rubinstein, & Vonarx, s.d.). L'énergie captée par les antennes des photosystèmes est transmise aux centres réactionnels où se déroulent les réactions primaires de la photosynthèse. Les centres réactionnels sont constitués d'amas de pigments contenant une paire unique de chlorophylle *a* (Hammadi, 2013; Simon, 2009). La paire du PSII est appelée P680, car elle absorbe à 680 nm. Celle du PSI est appelée P700, car elle absorbe à 700 nm. La paire spéciale de chlorophylle *a* existe donc en deux variantes qui possèdent des pics d'absorption différents, selon les protéines qui lui sont associées. Ces dernières jouent un rôle important dans les propriétés physiques de la chlorophylle (Simon, 2009). Une des chlorophylles de la paire spéciale du PSI et PSII est capable de céder ses électrons (après excitation) au premier accepteur de la chaîne d'accepteurs d'électrons (accepteur primaire) (Hammadi, 2013). L'accepteur primaire du PSII est la phéophytine (chlorophylle démunie de son atome central de Magnésium Mg^{2+} (Phéophytine, 2017)), et du PSI est la chlorophylle A_0 (chlorophylle *a* modifiée) (Simon, 2009). Les électrons sont ensuite transportés dans l'appareil photosynthétique par un réseau d'accepteurs et de donneurs d'électrons sur la base des réactions d'oxydoréductions jusqu'à arriver au $NADP^+$ qui est l'accepteur final permettant la formation du pouvoir réducteur NADPH. Parallèlement, l'ATP est synthétisée (Hammadi, 2013; Taleb, 2015). Le fonctionnement des photosystèmes est détaillé dans les paragraphes qui suivent.

a) **Fonctionnement des photosystèmes**

• **Photosystème II (PSII)**

L'énergie lumineuse absorbée par l'antenne collectrice du PSII est transmise au centre réactionnel où se trouve la paire spéciale de chlorophylle *a*, la P680. Après excitation, une des molécules de chlorophylle *a* de la P680 cède un électron. Cet électron est capté par l'accepteur primaire qui est la phéophytine. La phéophytine transfère ensuite l'électron à une plastoquinone fixe (Q_A) (Hammadi, 2013). Cette dernière le cède à une autre plastoquinone (Q_B) (Figure 1.11). La Q_B , à l'état oxydé, se trouve dans une pochette dans la protéine D1 du centre

réactionnel du PSII (Figure PSII). Elle peut recevoir deux électrons au maximum. Une fois fait, la Q_B^{2-} quitte la pochette et migre vers le complexe cytochrome b_6f (Figure 2.9). La forme détachée de la Q_B est appelée P_Q . La P_Q^{2-} doit alors traverser la bicouche lipidique qui constitue la membrane des thylakoïdes pour arriver au complexe cytochrome b_6f et livrer les électrons qu'elle transporte. Toutefois, il convient de signaler que les molécules chargées sont hydrophiles et ne peuvent pas traverser la membrane sans transporteurs. Pour que la P_Q^{2-} puisse traverser la membrane, elle doit être électriquement neutre. Pour cela, elle associe deux protons du stroma lorsqu'elle quitte le PSII et c'est donc la PQH_2 qui traverse la membrane pour se lier au cytochrome b_6f . Ce dernier reçoit les deux électrons et les deux protons sont versés dans le lumen (intérieur des thylakoïdes). Le P_Q est régénéré et peut revenir à sa place d'origine (PSII). Le cytochrome b_6f transfère ensuite les électrons à une plastocyanine (PC) (petite protéine localisée dans le lumen) qui les transportent jusqu'au PSI (Schoefs, s.d.).

Parallèlement, la photolyse de l'eau (décomposition de l'eau sous l'effet de la lumière) est réalisée par le complexe d'oxydation de l'eau (OEC), associé au PSII (Équation 2.2) (Clément-Larosière, 2012).



Tirée de Clément-Larosière (2012)

Cette réaction libère de l'oxygène, des électrons et des protons. Les électrons permettent de compenser les électrons perdus par la chlorophylle P680 du PSII. L'eau est alors le donneur d'électrons primaire de la photosynthèse. Les protons s'accumulent dans le lumen. Ils entraînent, avec les protons générés de l'oxydation de PQH_2 par le complexe Cyt b_6f , l'acidification du lumen et la formation d'un gradient de protons entre le stroma et le lumen. Cette force proton motrice permettra à l'ATP synthétase de produire l'ATP. L'oxygène produit par la photolyse de l'eau est libéré dans l'atmosphère (Hammadi, 2013; Simon, 2009).

- **Photosystème I (PSI)**

Lorsque l'énergie absorbée par l'antenne collectrice du PSI arrive au centre réactionnel, elle provoque l'ionisation d'une des molécules de chlorophylle *a* de la P700. L'électron libéré est capté par l'accepteur primaire qui est la chlorophylle *A*₀. Cette dernière le cède à la phylloquinone *A*₁ qui le transfère à son tour au F_x (centre « fer-soufre » du type [4Fe-4S]). L'électron est ensuite transféré aux centres F_A et F_B de la protéine PSI-C (dans la Figure 2.10, la lettre C désigne la protéine PSI-C). Le F_B cède l'électron à la ferrédoxine (Fd) (protéine associée au PSI). La ferrédoxine transfère l'électron à la ferrédoxine NADP-réductase qui réduira le NADP⁺ en NADPH appelé aussi pouvoir réducteur (Schoefs, s.d.). L'électron perdu par la P700 est remplacé par l'électron expulsé par le PSII, ce qui permettra au PSI de continuer à fonctionner (Simon, 2009).

b) Transport des électrons

Il existe deux types de transport des électrons : non cyclique (schéma en Z) (Figure 2.12) et cyclique.

- **Transport non cyclique des électrons (schéma en Z)**

Lorsque les chlorophylles P680 du PSII et P700 du PSI absorbent la lumière transmise par les antennes collectrices, elles passent à un état excité et libèrent des électrons qui permettront la synthèse de NADPH et d'ATP. Les électrons perdus au sein du PSII sont remplacés par les électrons libérés de la photolyse de l'eau et les électrons perdus au sein du PSI sont compensés par les électrons expulsés du PSII comme expliqué plus haut. Le transfert non cyclique correspond donc au transfert des électrons entre l'eau et le NADP⁺ aboutissant à la synthèse de NADPH et d'ATP. Ces molécules énergétiques sont ensuite utilisées par la cellule pour assimiler le carbone inorganique dissous et le convertir en matière organique (Clément-Larosière, 2012; Taleb, 2015).

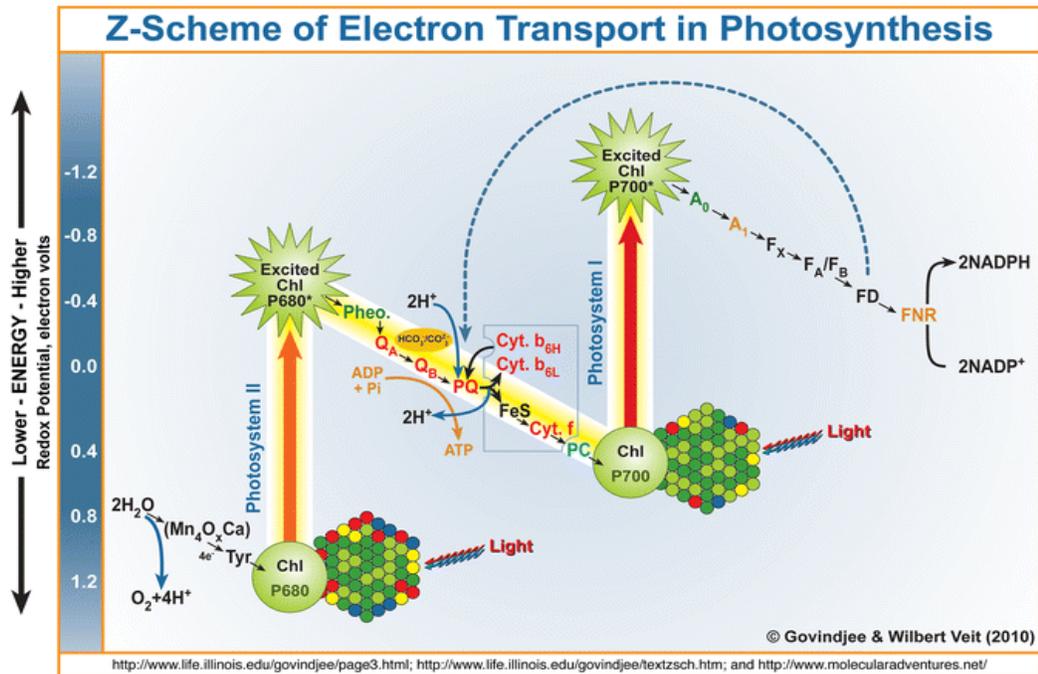


Figure 2.12 Schéma en Z du transport des électrons dans l'appareil photosynthétique
 Tirée de Orr et Govindjee (2013)
 (Reproduite avec permission)

- **Transport cyclique des électrons**

Ce type de transport est montré aussi dans la Figure 2.12. Il n'implique que le PSI et permet la production d'ATP seulement. La ferrédoxine, au lieu de transmettre les électrons, captés du PSI, à la ferrédoxine-NADP réductase pour produire le pouvoir réducteur (NADPH), elle les transfère à la plastoquinone (PQ) via un cytochrome. Les électrons reviennent alors au photosystème I et comblent le vide qu'ils avaient laissé. Ce transport permet d'accumuler plus de protons dans le lumen ce qui favorise la production d'ATP au détriment de la synthèse du pouvoir réducteur (Simon, 2009). Rappelons que l'accumulation de protons dans le lumen résulte ici de l'oxydation du PQH_2 par le complexe Cyt b_6f comme expliqué précédemment. Le transport cyclique des électrons permet à la cellule d'ajuster les proportions de NADPH et d'ATP en fonction de ses besoins physiologiques (Taleb, 2015).

2.1.3.2 Cycle de Calvin

C'est la phase d'assimilation du carbone inorganique. La cellule utilise le NADPH et l'ATP produits dans la phase claire pour assimiler le CO_2 et le convertir avec l'eau en molécules organiques (Taleb, 2015). Le cycle de Calvin consomme plus de 60 % de l'ATP et environ 95 % de NADPH générés durant la phase claire (Falkowski & Raven, 2013). La Figure 2.13 représente l'ensemble des réactions du cycle.

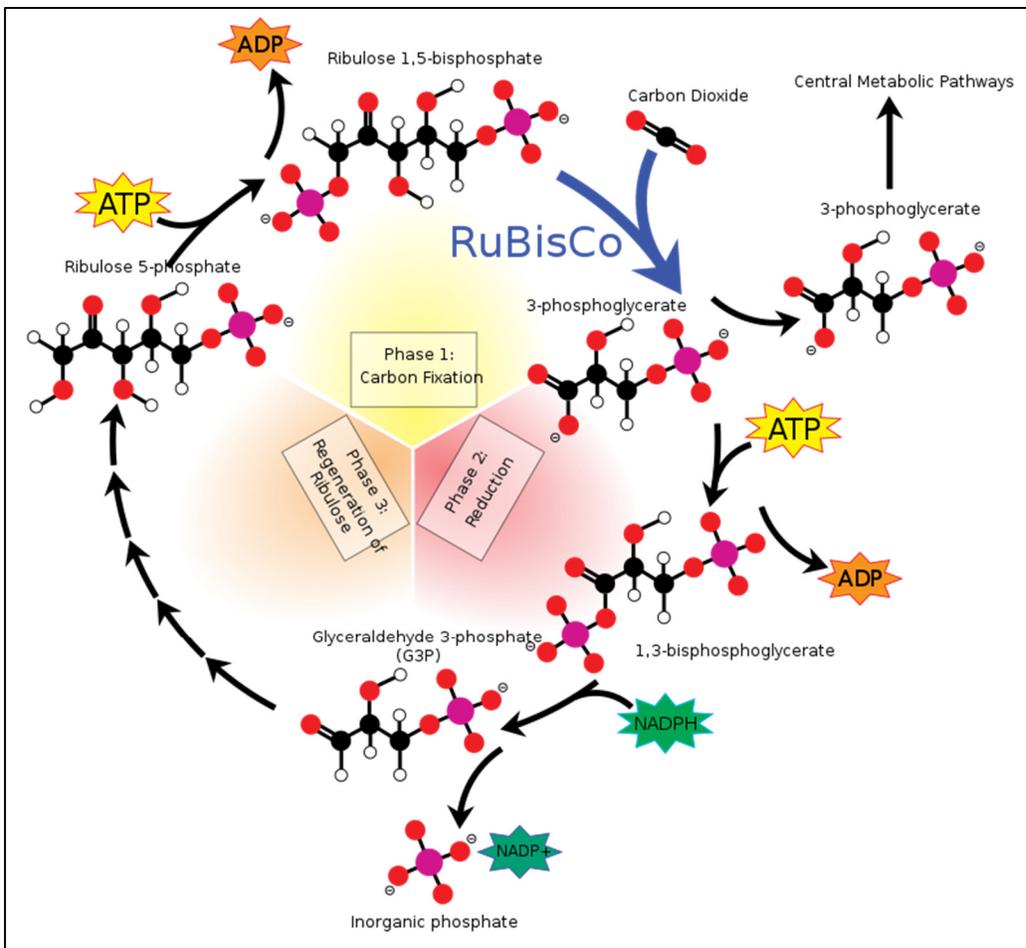


Figure 2.13 Schéma des réactions du cycle de Calvin
Tirée de Jones (2010)

Comme le montre le schéma, l'assimilation du CO₂ est réalisée en trois étapes : la fixation du CO₂ (carboxylation), la réduction du carbone fixé et la régénération de l'accepteur du CO₂. Durant la première étape, le CO₂ est fixé sur le ribulose-1,5- biphosphate (RuBP), molécule organique possédant cinq carbones, par l'enzyme Rubisco (Ribulose-1,5- biphosphate Carboxylase/Oxygénase), pour former une molécule à 6 atomes de carbone qui donnera par la suite deux molécules de trois carbones, le 3-phosphoglycérate. Dans la deuxième étape, le 3-phosphoglycérate est réduit. Ce dernier est d'abord phosphorylé par l'ATP pour former l'acide biphospho-glycérique, qui sera lui-même réduit par le NADPH pour donner le glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P), un sucre composé de trois atomes de carbones. Dans la troisième étape, l'accepteur de CO₂ (RuBP) est régénéré. La majeure partie (5/6) de G3P produit est utilisée pour la resynthèse du RuBP ce qui permettra de recommencer le cycle de Calvin. La régénération du RuBP est réalisée en plusieurs étapes et consomme l'ATP. Le un sixième restant est exporté dans le cytoplasme; il servira pour la synthèse des glucides en quantité élevée et la synthèse des acides aminés et des acides gras en faible quantité (Hammadi, 2013; Taleb, 2015). Ces molécules organiques peuvent être stockées par la cellule comme réserves ou utilisées pour produire de nouveaux composés (Falkowski & Raven, 2013).

L'ensemble des réactions du cycle peut être présenté par l'équation suivante (Équation 2.3). L'équation montre que pour fixer une molécule de CO₂, la cellule utilise trois molécules d'ATP et deux molécules de NADPH pour synthétiser deux molécules de G3P (Taleb, 2015).



Tirée de Taleb (2015)

Selon la littérature, chez les microalgues, 95 % du carbone inorganique est fixé par l'enzyme Rubisco, mais il existe une autre voie de fixation du carbone nommée β -carboxylation (Clément-Larosière, 2012; Raven & Beardall, 2003).

- **β -carboxylation**

Cette voie de fixation du carbone inorganique est indépendante de la lumière. C'est un ensemble de réactions durant lesquelles le β -carbone d'une molécule composée de trois atomes, le phosphoenolpyruvate (PEP) (Coudret & Ducher, 1993) est carboxylé d'où le nom β -carboxylation. La cellule utilise ces réactions pour alimenter les cycles métaboliques en composés essentiels à sa croissance, qui ne sont pas fournis par le Cycle de Calvin tels que les purines, pyrimidines, acides aminés essentiels et tétrapyrroles. Malgré l'importance de cette voie pour la cellule, elle ne permet de fixer qu'une faible proportion du carbone chez la majorité des organismes aquatiques photoautotrophes (Clément-Larosière, 2012).

2.1.4 Culture des microalgues

Dans cette partie, les conditions de culture des microalgues, les systèmes de culture ainsi que les modes de culture existants sont exposés.

2.1.4.1 Conditions de culture

Les microalgues photoautotrophes ont besoin pour leur croissance d'une source de lumière et d'un milieu de culture contenant une source de carbone inorganique et des minéraux. L'ajustement des autres paramètres de culture tels que la lumière, la température et le pH ainsi qu'une bonne agitation du milieu de culture sont aussi nécessaires pour assurer une meilleure croissance des microalgues.

a) Milieu de culture

- **Source de carbone**

Le carbone est un élément indispensable à la production des molécules organiques essentielles à la croissance. Contrairement aux végétaux supérieurs, les microalgues autotrophes ne sont pas capables d'assimiler le CO₂ sous forme gazeuse. Il doit être dissous dans le milieu de

culture pour pouvoir être assimilé (Pruvost, Leguic, Cornet, & Lombard, 2017). Selon le pH du milieu, la dissolution du CO_2 gazeux peut générer du CO_2 aqueux ($\text{CO}_2\text{H}_2\text{O}$), des anions bicarbonates (HCO_3^-) et des anions carbonates (CO_3^{2-}) (Figure 2.14). Quelle que soit l'espèce carbonée qui entre dans la microalgue, elle se convertit naturellement en CO_2 pour être fixée par la Rubisco (Taleb, 2015).

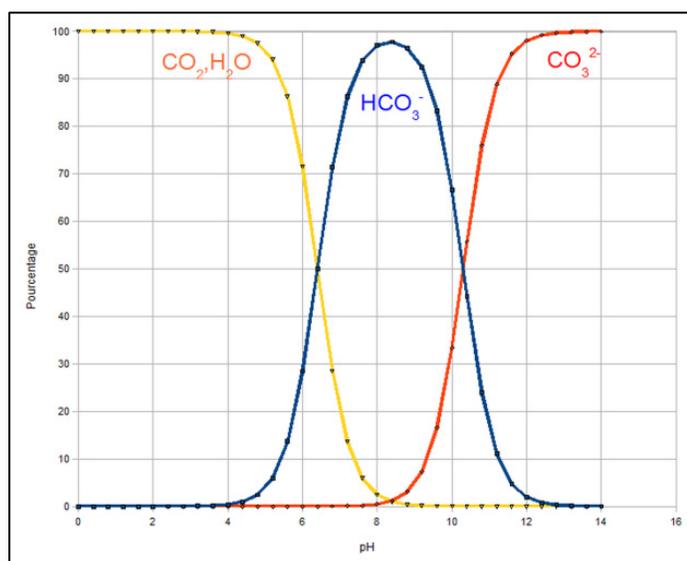


Figure 2.2.14 Concentrations des différentes espèces carbonées, résultant de la dissolution du CO_2 gazeux, en fonction du pH du milieu
Tirée de Gonzalez (s.d.)

Pour la culture des microalgues, une simple diffusion du CO_2 depuis l'air ambiant n'est pas suffisante pour assurer une bonne croissance car sa concentration naturelle est trop faible (0.04 % v:v) (Marcilhac, 2014). Pour atteindre des productions élevées en biomasse, l'injection de CO_2 pur ou d'air enrichi en CO_2 est nécessaire (Marcilhac, 2014). Le CO_2 peut être aussi apporté au milieu de culture sous forme de sels carbonatés (NaHCO_3 , Na_2CO_3) (Marcilhac, 2014; Pruvost et al., 2017).

- **Source d'azote**

Pour la croissance des microalgues, l'azote est un élément essentiel. Il est utilisé pour la synthèse des protéines et des acides nucléiques (Marcilhac, 2014). Aussi, c'est un élément constitutif de la chlorophylle qui joue un rôle fondamental dans la photosynthèse (Taleb, 2015). Les microalgues autotrophes sont capables d'assimiler les nitrates (NO_3^-), les nitrites (NO_2^-) et l'ammonium (NH_4^+) comme sources d'azote inorganiques (Boileau, 2015). Certaines cyanobactéries peuvent assimiler l'azote atmosphérique (Groga, 2012). Le NH_4^+ est la forme la plus facilement assimilable par les microalgues, elle peut être utilisée directement (sans réduction préalable). Toutefois, dans les milieux aquatiques, c'est la forme NO_3^- qui est généralement retrouvée (Boileau, 2015). Une fois entré dans la cellule, le NO_3^- est réduit en NO_2^- par une nitrate réductase. Le NO_2^- est ensuite réduit en NH_4^+ par une nitrite réductase (Villay, 2013). Les mécanismes d'assimilation de l'azote dépendent du métabolisme du carbone. En effet, la transcription de l'enzyme nitrate réductase est stimulée par les glucides produits par la photosynthèse (Fortier, 2009; Villay, 2013).

- **Source de phosphore**

Le phosphore est également nécessaire à la croissance des microalgues. Il entre dans la composition des acides nucléiques (acide désoxyribonucléique (ADN) et acide ribonucléique (ARN)), des phospholipides qui constituent la membrane cellulaire et l'ATP (Marcilhac, 2014). Le phosphore est assimilé par les microalgues principalement sous forme d'orthophosphates (PO_4^{3-}) (El Hifnawy, 2016). Dans la cellule algale, le phosphore est stocké sous forme de granules polyphosphates (El Hifnawy, 2016; Marcilhac, 2014).

- **Source de soufre**

Le soufre est un minéral indispensable à la croissance des microalgues. Il entre dans la composition de deux acides aminés essentiels qui sont la cystéine et la méthionine (Villay, 2013). La cystéine est l'un des constituants de la coenzyme A, impliquée dans de nombreuses

voies métaboliques (Coenzyme A, 2020). Les microalgues assimilent le soufre principalement sous forme de sulfate (SO_4^{2-}) (Villay, 2013).

- **Les métaux**

Certains métaux comme le fer (Fe), le magnésium (Mg), le calcium (Ca) et le potassium (K) sont nécessaires à la croissance des microalgues. Ils interviennent dans différents mécanismes cellulaires en rentrant dans la synthèse des enzymes ou en jouant le rôle de cofacteurs (Boileau, 2015). Par exemple, le Fe est essentiel à la photosynthèse (Boileau, 2015) [entre dans la composition de la ferrédoxine (Ferrédoxine, 2022) et du complexe cytochrome *b₆f* (Complexe cytochrome *b₆f*, 2021) de l'appareil photosynthétique] et à la formation de la chlorophylle (Parent, 2021; Taleb, 2015). Le Mg est un élément constitutif de la chlorophylle, pigment qui assure la photosynthèse (Marcilhac, 2014). D'autres métaux tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdate (Mo) et le cobalt (Co) sont aussi importants pour le développement des microalgues mais en faibles quantités. Ils remplissent généralement le rôle de cofacteurs et aident à maintenir la structure des protéines (Boileau, 2015).

- b) Paramètres de culture**

- **La lumière**

La lumière a une grande influence sur la croissance des microalgues autotrophes puisque l'activité photosynthétique dépend de l'énergie lumineuse captée par les cellules. Il est nécessaire de définir l'intensité lumineuse appropriée pour la culture des microalgues. En effet, une intensité lumineuse insuffisante met la croissance des cellules sous une condition de photolimitation (Wahidin, Idris, & Shaleh, 2013). En revanche, un excès de lumière conduit à des phénomènes de photoinhibition (Combe, 2016). Les effets de l'intensité lumineuse sur la croissance des microalgues ont été étudiés chez plusieurs espèces de microalgues autotrophes. Les résultats révèlent une augmentation linéaire du taux de croissance avec l'augmentation de l'intensité lumineuse jusqu'à un certain seuil, appelé intensité de saturation qui est spécifique

à chaque espèce. Au-delà de cette valeur seuil, la croissance est inhibée (photoinhibition) (Bouarab, Loudiki, & Dauta, 2002; MacIntyre, Kana, Anning, & Geider, 2002; Posten, 2009; Xue, Su, & Cong, 2011). Selon ce qui a été rapporté dans la littérature, un excès de photons cause des dommages de l'appareil photosynthétique, particulièrement le photosystème II. La protéine D1 du PSII est dégradée, ce qui se manifeste par une diminution de l'activité photosynthétique. Ces dommages peuvent être réparés si l'intensité lumineuse est réduite (Combe, 2016). La lumière peut être apportée au système de culture par un tube fluorescent ou par des diodes électroluminescentes. Une combinaison des deux sources est aussi possible (Lemire-Lamothe, 2016).

Le cycle de lumière (cycle lumière/obscurité) utilisé a aussi un effet sur l'activité photosynthétique et par conséquent sur le métabolisme cellulaire (Villay, 2013). Par exemple, chez la microalgue *Nannochloropsis sp.*, la croissance et la production de lipides sont optimales pour un cycle de 18/6 sous une intensité lumineuse de $100 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Wahidin et al., 2013). Cette étude montre que la durée de la phase lumineuse dépend de l'intensité lumineuse utilisée. Sous une intensité lumineuse inférieure à l'intensité de saturation, une augmentation de la durée de la phase lumineuse permet d'améliorer la croissance des microalgues. Pour des intensités lumineuses élevées quand le phénomène de photoinhibition survient, une diminution de la durée de la phase lumineuse permet de réduire les effets de l'inhibition (Wahidin et al., 2013).

- **La température**

La température est un des principaux facteurs environnementaux affectant la croissance des microalgues (El Hifnawy, 2016). Elle affecte directement l'état physiologique des cellules (Doré-Deschênes, 2009) et influence les diverses réactions biochimiques intracellulaires (Taleb, 2015). Aussi, la température a un impact sur la dissolution du CO_2 gazeux dans l'eau. Une température élevée du milieu entraîne une faible dissolution du CO_2 (Clément-Larosière, 2012). La température de culture dépend des espèces de microalgues (cryophiles, mésophiles ou thermophiles). Les microalgues mésophiles sont les plus abondantes, elles se développent

à des températures situées entre 15 et 35 °C (Villay, 2013). À noter que chaque espèce de microalgue possède une température optimale de croissance (El Hifnawy, 2016).

- **Le pH**

Le pH est un paramètre important à prendre en considération dans la culture des microalgues. Le pH joue sur la forme des espèces carbonées et des minéraux présents dans le milieu de culture (Boileau, 2015) et influence les échanges des substrats entre les microalgues et le milieu (Taleb, 2015). Le pH permet aussi de réguler l'activité des enzymes (Beardall, Johnston, & Raven, 1998; Boileau, 2015). La plupart des microalgues ont un pH optimal compris entre 7 et 9 (Wang, Lan, & Horsman, 2012).

- **L'agitation**

L'agitation du milieu de culture est nécessaire pour assurer l'accessibilité à la lumière et aux nutriments pour toutes les microalgues (Wang et al., 2012), bien répartir la chaleur (Doré-Deschênes, 2009), améliorer les échanges gazeux entre la phase liquide et la phase gazeuse (air) (Wang et al., 2012), éviter la sédimentation des microalgues et la formation de biofilms (Combe, 2016). Il est important d'ajuster ce paramètre pour ne pas altérer les cellules et éviter le stress hydrodynamique (Marcilhac, 2014).

2.1.4.2 Systèmes de culture

La culture à grande échelle des microalgues peut être réalisée dans des systèmes ouverts ou dans des systèmes fermés. Le choix du système dépend de l'espèce cultivée et de l'application ciblée (Bennouna, 2018).

- a) **Systèmes ouverts**

Ce sont les systèmes de culture les plus employés, en raison de leur faible coût et de leur facilité d'utilisation (Bennouna, 2018; El Hifnawy, 2016). Il existe plusieurs modèles. Les raceways

restent les plus utilisés (Figure 2.15). Ce sont des bassins ouverts, en forme de champ de course, peu profonds (de 10 à 50 cm) (Bennouna, 2018; Bonnefond et al., 2020).



Figure 2.15 Bassin Raceway (champ de course)
Tirée de JanB46 (2011)

Dans les raceways, les cultures sont mélangées mécaniquement par des roues à aubes (Bonnefond et al., 2020). Le principal inconvénient des systèmes ouverts est le risque de contamination par d'autres microorganismes (Bonnefond et al., 2020; Dejoye, 2013; El Hifnawy, 2016). C'est pourquoi, leur utilisation est limitée pour les cultures de microalgues se développant dans des milieux de culture sélectifs comme *Dunaliella salina* qui pousse dans un milieu hyper salin et *Arthrospira platensis* (cachée derrière le nom Spiruline) qui se développe en milieu très alcalin (Dejoye, 2013; Taleb, 2015). Un autre inconvénient de ces systèmes réside dans la difficulté à contrôler les conditions de culture. Le rendement en biomasse dépend des variations journalières et saisonnières de l'éclairement et de la température. Aussi, l'agitation peu intense du milieu limite l'accessibilité à la lumière et aux nutriments pour certaines cellules, diminuant ainsi la productivité du système (Bonnefond et al., 2020). Enfin, des problèmes d'évaporation du milieu de culture sont rencontrés dans ces systèmes (Chisti, 2007).

b) Systèmes fermés

Les photobioréacteurs (PBR) sont des systèmes de culture fermés, faits de matériaux transparents. Ils sont éclairés naturellement (lumière du soleil) ou par une lumière artificielle (Bonfond et al., 2020; Dejoye, 2013). Les PBR présentent une grande variété de géométries (Figure 2.16). En général, leur conception cherche à maximiser le transfert de la lumière, à assurer une bonne agitation du milieu (Bonfond et al., 2020) afin d'empêcher le phénomène de formation de biofilm et à prévenir l'échauffement de la culture (par utilisation d'un système de refroidissement par eau), particulièrement dans des conditions d'éclairage par la lumière du soleil, du fait de la quantité importante de la lumière infrarouge captée (Taleb, 2015).

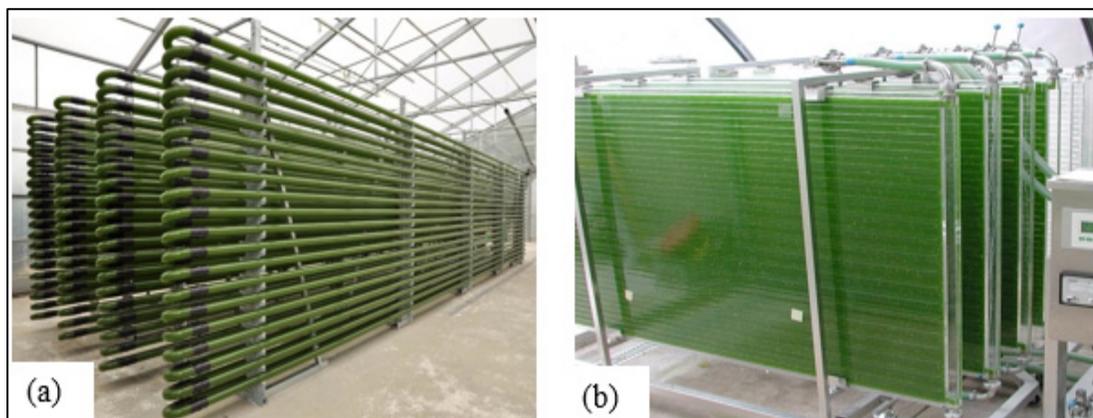


Figure 2.16 Exemples de photobioréacteurs

a) Photobioréacteur tubulaire

b) Photobioréacteur à plaques alvéolaires

Tirées de IGVBioTech (2013) et de IGVBioTech (2003), respectivement

Comparés aux systèmes ouverts, les PBR offrent plusieurs avantages : ils assurent la protection des cultures des microalgues des contaminations extérieures et permettent un meilleur contrôle des paramètres opératoires (nutriments, lumière, température, pH, agitation, échanges gazeux) (Bennouna, 2018; Bonfond et al., 2020). Les PBR ont une productivité plus élevée par rapport aux raceways (Chisti, 2007). Toutefois, les coûts de leur fabrication et de leur maintenance ainsi que les coûts énergétiques associés à leur exploitation sont élevés (Bonfond et al., 2020).

2.1.4.3 Modes de culture

La culture des microalgues dans les réacteurs peut être réalisée en mode discontinu (*batch*), continu ou discontinu alimenté (*fed batch*).

a) Mode discontinu (*batch*)

En mode de culture discontinu, un volume défini de milieu de culture stérile contenant tous les nutriments nécessaires à la croissance est inoculé par les microalgues et incubé dans des conditions favorables à la croissance. Aucun ajout de milieu de culture n'est apporté à la culture par la suite. La culture peut être réalisée dans une fiole ou dans un réacteur. C'est la méthode la plus couramment utilisée pour la culture des microalgues en raison de la simplicité de son système de culture et de sa facilité de réalisation (Lee & Shen, 2004). Ce mode de culture est utilisé dans la présente étude.

Durant la culture, la concentration cellulaire augmente avec la consommation des nutriments. Quand un des éléments indispensables à la croissance n'est plus disponible en quantité suffisante pour soutenir la reproduction des microalgues, la croissance est ralentie (Boileau, 2015). La Figure 2.17 représente une courbe de croissance théorique en six phases des microorganismes dont les microalgues, cultivés en *batch*.

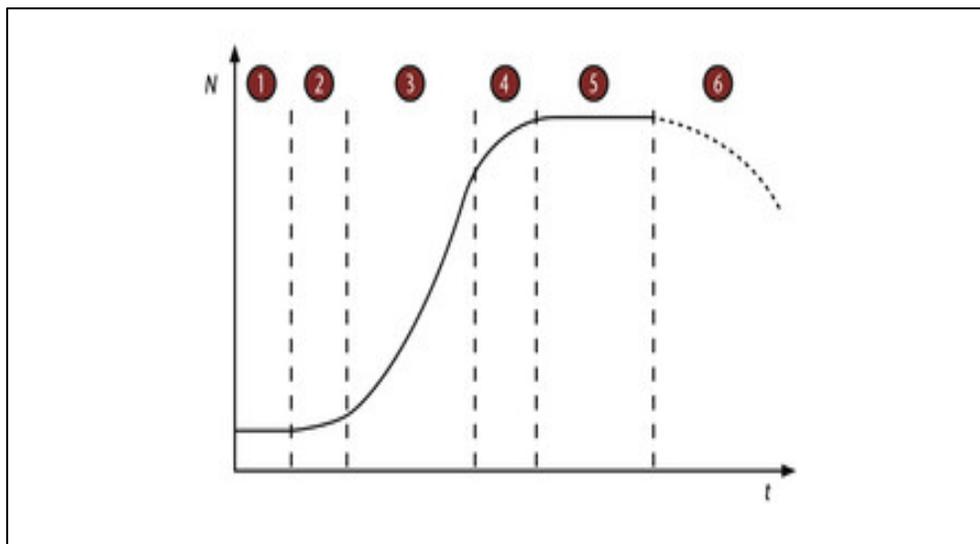


Figure 2.17 Courbe de croissance théorique d'une microalgue cultivée en *batch*

1 : phase de latence; 2 : phase d'accélération; 3 : phase exponentielle;
4 : phase de décélération; 5 : phase stationnaire; 6 : phase de déclin
Tirée de Tessier (2018)

- **Phase de latence**

Les microalgues ont besoin d'un temps d'adaptation aux nouvelles conditions de culture. Pendant cette phase, elles synthétisent les enzymes nécessaires à l'assimilation des substrats présents dans le milieu de culture (Cherif Antar, 2020; Driche, 2020), la croissance est faible (Clément-Larosière, 2012). La durée de cette phase varie selon l'âge de la microalgue et la composition du milieu (Driche, 2020).

- **Phase d'accélération**

Les microalgues ont doublé leur matériel génétique et ont stocké des composés intracellulaires en quantité suffisante. Elles commencent à croître par multiplication végétative. Chaque cellule se scinde en deux cellules identiques génétiquement qui, à leur tour, se divisent en deux par la suite (Clément-Larosière, 2012).

- **Phase exponentielle**

Les microalgues sont dans un bon état physiologique. Le taux de croissance est maximum et constant (Cherif Antar, 2020; Clément-Larosière, 2012; Driche, 2020).

- **Phase de décélération**

Un des nutriments essentiels devient limitant (absent ou présent en faible quantité). La vitesse de croissance diminue (Tomaselli, 2004). Le ralentissement de la croissance peut aussi résulter de la diminution de la quantité de lumière disponible pour les microalgues du fait de la concentration élevée de cellules atteintes dans le réacteur après un certain temps de culture (Clément-Larosière, 2012; Ogbonna, Yada, & Tanaka, 1995).

- **Phase stationnaire**

Le milieu de culture est épuisé. Toutefois, tant que les microalgues disposent des réserves intracellulaires leur permettant de soutenir leur métabolisme, elles restent vivantes (Tomaselli, 2004). Le nombre de cellules reste constant, soit parce que le nombre de cellules qui se divisent est égal au nombre de cellules qui meurent ou les cellules ne se divisent pas (Cherif Antar, 2020). Les glucides et les lipides continuent à s'accumuler dans les cellules durant cette phase (Boileau, 2015; Clément-Larosière, 2012).

- **Phase de déclin**

La plupart des microalgues ont épuisé leurs réserves internes et ne peuvent plus produire suffisamment d'énergie pour assurer la maintenance cellulaire, elles meurent (Boileau, 2015; Clément-Larosière, 2012; Tomaselli, 2004). Le nombre de cellules qui meurent est supérieur au nombre de cellules pouvant encore se multiplier (Clément-Larosière, 2012).

Certaines microalgues peuvent entrer en dormance cellulaire quand les conditions de culture sont défavorables. Elles reprennent leur activité lorsque les conditions environnementales deviennent à nouveau convenables à leur croissance (Clément-Larosière, 2012).

b) Mode continu

Dans une culture continue, les microalgues sont d'abord cultivées en *batch* jusqu'à ce qu'une concentration cellulaire prédéfinie soit atteinte. Ensuite, le milieu de culture neuf est injecté dans le réacteur en continu et le même volume du milieu épuisé (contenant les microalgues) est soutiré afin de maintenir le volume du réacteur constant (débit d'entrée est égal au débit de sortie) (Brautaset & Ellingsen, 2011; Clément-Larosière, 2012). Ainsi, la culture demeure perpétuellement en phase exponentielle de croissance. Ce mode de culture permet de maintenir la densité cellulaire dans le réacteur stable (Clément-Larosière, 2012).

Il existe deux principales méthodes de culture en mode continu : le chemostat et le turbidostat. Dans un chemostat, le milieu de culture neuf est fourni à un débit fixe (Taleb, 2015) et le taux de croissance est contrôlé par la concentration d'un seul nutriment qui est le substrat limitant (Moore, Robson, & Trinci, 2019). Dans un turbidostat, la densité cellulaire est maintenue constante par ajustement du débit d'alimentation (débit d'entrée du milieu neuf est donc variable) (Lee & Shen, 2004). Le turbidostat est muni d'une cellule photoélectrique pour détecter la turbidité de la culture (Lee & Shen, 2004). Lorsque la turbidité dépasse un niveau prédéfini, le débit d'entrée du milieu de culture neuf est augmenté pour la diluer et l'emmener à ce niveau. Quand la turbidité de la culture baisse, le débit d'entrée est baissé pour que la croissance puisse amener la turbidité au niveau ciblé (Moore et al., 2019).

Du point de vue industriel, la culture continue est intéressante puisqu'elle permet d'augmenter la productivité des microalgues. L'inconvénient majeur de ce type de culture est que la microalgue cultivée peut subir des mutations spontanées après plusieurs divisions (Brautaset & Ellingsen, 2011).

c) **Mode discontinu alimenté (*Fed batch*)**

La culture commence dans un volume réduit de milieu de culture. Lorsque les microalgues arrivent à la fin de la phase exponentielle de croissance, le milieu de culture stérile est ajouté dans la cuve. Le débit d'alimentation est réglé afin de maintenir la concentration en substrat constante. Le volume du milieu dans le réacteur augmente alors avec le temps. Lorsque la cuve du réacteur est remplie, l'alimentation est coupée, puis la culture évolue en mode discontinu (Driche, 2020). En mode *fed batch*, il n'y a pas de soutirage en cours du procédé, la production est récupérée en une fois en fin de culture (Bourat, 1992; Perrin, 2019). Ce mode de culture permet un gain de temps. De plus, la composition du milieu d'alimentation peut être modifiée (Driche, 2020). Ceci permet d'améliorer la croissance, par augmentation progressive de la concentration en substrat, avant de déclencher l'accumulation des lipides.

2.1.5 Applications des microalgues

Les applications commerciales des microalgues sont nombreuses allant de l'alimentation humaine à la production de biocarburants. Les paragraphes qui suivent dressent un aperçu de ces applications.

2.1.5.1 Alimentation humaine

En raison de leur composition chimique riche en protéines, vitamines, acides gras polyinsaturés et sels minéraux, certaines espèces de microalgues (non toxiques), par exemple la spiruline, sont utilisées comme complément (Bonnefond et al., 2020; Spolaore et al., 2006). Les microalgues contiennent aussi les pigments dont les phycobiliprotéines (pigments synthétisés par les cyanobactéries et certaines rhodophycées) et le β -carotène qui sont utilisés comme colorants alimentaires naturels (Dejoye, 2013; Spolaore et al., 2006). Les exopolysaccharides (polymères hydrosolubles) produits par les microalgues sont employés comme gélifiants (Taleb, 2015).

2.1.5.2 Aquaculture

Les microalgues sont utilisées pour nourrir les bivalves (moules, huitres, palourdes, coquilles Saint-Jacques), les larves et les juvéniles des crustacés et de certaines espèces de poissons (Dejoye, 2013).

2.1.5.3 Agriculture

La biomasse microalgale peut être utilisée comme engrais. Ainsi, grâce à la capacité des cyanobactéries à fixer l'azote atmosphérique, ces microalgues permettent d'améliorer la fertilité des sols (Dejoye, 2013).

2.1.5.4 Applications pharmaceutiques et nutraceutiques

Certaines espèces sont riches en acides gras. Parmi ces acides gras, les acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série oméga-3, tels que l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22: 6n-3) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3) sont connus pour leurs applications pharmaceutiques et nutraceutiques. Ils préviennent des maladies cardiovasculaires et cérébrales et d'autres maladies telles que le diabète de type II, l'arthrite et les maladies oculaires (Shahidi & Wanasundara, 1998; Spolaore et al., 2006; Tonon et al., 2002).

Quelques espèces de microalgues produisent des substances à activité antivirale, antibiotique et antitumorale. Par exemple *Arthrospira platensis* produit une substance ayant une activité antivirale contre le virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1) (Ayehunie, Belay, Baba, & Ruprecht, 1998). *Porphyridium cruentum* produit des exopolysaccharides possédant une activité antitumorale (Decamp, 2020).

Une autre application des microalgues est l'exploitation des propriétés fluorescentes des phycobiliprotéines dans la recherche et le diagnostic en médecine (Dejoye, 2013). Ces pigments sont utilisés dans les expériences d'immunologie comme marqueurs pour les anticorps et d'autres molécules biologiques (Spolaore et al., 2006).

2.1.5.5 En cosmétique

Certaines espèces comme *Chlorella*, *Arthrospira Nannochloropsis oculata* et *Dunaliella salina* se sont montrées d'intérêt dans le marché des soins du visage, de la peau et des cheveux. Leurs extraits sont utilisés dans des produits de soin anti-âge et rafraîchissants, crèmes de protection solaire et produits de soin capillaire (Spolaore et al., 2006). Les polysaccharides produits par les microalgues sont aussi utilisés en cosmétique pour épaissir les crèmes (Decamp, 2020).

2.1.5.6 Applications en environnement

a) Réduction des émissions du CO₂

Pour leur croissance, les microalgues photosynthétiques peuvent utiliser le CO₂ atmosphérique ou le CO₂ provenant des gaz d'échappement des industries (Lam & Lee, 2012b; Wang, Li, Wu, & Lan, 2008). Théoriquement, 1 kg de biomasse de microalgues capte environ 1.8 kg de CO₂ (Lam & Lee, 2012b). Ceci permet à la fois de réduire les émissions de ce gaz à effet de serre, de produire des biocarburants neutres en carbone et des bioproduits à haute valeur ajoutée (Dejoye, 2013).

b) Traitement des eaux usées

Les microalgues permettent de retirer les nutriments présents en concentrations élevées dans les eaux usées principalement l'azote et le phosphore. Ceci les rend intéressantes pour lutter contre l'eutrophisation des milieux aquatiques (Wang et al., 2010). Les microalgues contribuent aussi à la dépollution des eaux usées par la fixation des métaux lourds (Perales-Vela, Pena-Castro, & Canizares-Villanueva, 2006; Sialve & Steyer, 2013) et la décomposition des contaminants toxiques [par exemple la dégradation du tributylétain (TBT) par la microalgue *Chlorella vulgaris*] (Luan, Jin, Chan, Wong, & Tam, 2006). Elles apportent également de l'oxygène dissous nécessaire aux bactéries pour la dégradation des matières organiques (Dejoye, 2013).

2.1.5.7 Applications dans le domaine des énergies

L'utilisation des microalgues comme source d'énergie renouvelable fait l'objet d'une attention particulière. La biomasse microalgale peut servir à la génération de plusieurs formes de biocarburants. Certaines espèces comme *Chlorella vulgaris* et *Chlamydomonas perigranulata* sont utilisées pour produire le bioéthanol grâce à la fermentation des sucres accumulés dans leurs cellules (Bahlawan et al., 2022; Kumar, Pulidindi, Kinel-Tahan, Yehoshua, & Gedanken, 2016; Varaprasad et al., 2020; Ziolkowska & Simon, 2014). D'autres microalgues telles que *Chlamydomonas reinhardtii* possèdent des enzymes, les hydrogénases leur permettant de produire le biohydrogène, pendant la photosynthèse (Ballerini, 2011; Melis & Happe, 2001). Le biométhane peut aussi être obtenu par biométhanisation de la biomasse (Ballerini, 2011; Sialve, Bernet, & Bernard, 2009). Enfin, certaines microalgues sont capables d'accumuler des quantités élevées en lipides spécialement les triglycérides qui peuvent être transformés en biodiesel par une réaction de transestérification (Chisti, 2007; Mata et al., 2010; Smith, Sturm, Denoyelles, & Billings, 2010). Plusieurs informations sont disponibles dans la littérature sur ce biocarburant par rapport aux autres biocarburants issus des microalgues.

2.2 Production des lipides dans les microalgues

Selon les espèces, les microalgues peuvent utiliser le CO₂ ou une source de carbone organique pour produire divers types de lipides (Huang, Chen, Wei, Zhang, & Chen, 2010). Les lipides sont des molécules organiques caractérisées par leur insolubilité dans l'eau. Ils sont solubles dans les solvants organiques apolaires comme le chloroforme (Berrada, 2009). Dans des conditions favorables à la croissance, les microalgues synthétisent les lipides polaires qui sont principalement constitués des phospholipides et des glycolipides (Dejoye, 2013; Hu et al., 2008; Huang, 2018). Ce sont des constituants des membranes plasmiques et des membranes des organites intracellulaires comme les chloroplastes. Ils représentent environ 5 à 20 % du poids sec de la cellule (Hu et al., 2008).

Toutefois, dans des conditions défavorables à la croissance telles qu'une carence en nutriment essentiel (absence ou présence en quantité insuffisante), certaines microalgues orientent leur

métabolisme vers la production et l'accumulation des lipides neutres, notamment sous forme de triglycérides (TAG). Ces microalgues sont dites oléagineuses (Hu et al., 2008). Contrairement aux lipides membranaires, les TAG n'ont pas un rôle structural mais représentent plutôt une réserve de carbone et d'énergie pour les microalgues (Ohlrogge & Browse, 1995). Certaines espèces peuvent accumuler jusqu'à 80 % de leur poids en TAG (Chisti, 2007; Liu, Wang, & Zhou, 2008). Les TAG constituent la matière première pour la production de biodiesel (Dejoye, 2013; Hu et al., 2008; Huang, 2018; Huang et al., 2010).

Les microalgues synthétisent les acides gras comme unités de base pour la production des lipides membranaires et des lipides de réserve (TAG). Les acides gras sont des acides carboxyliques constitués d'une chaîne hydrocarbonée (Huang, 2018). Selon les espèces, les acides gras produits peuvent avoir des longueurs de chaînes allant de 10 à plus de 20 carbones (Hu et al., 2008). Par exemple *Botryococcus braunii* peut produire des acides gras composés de 34 carbones (C34) (Dejoye, 2013). Les acides gras les plus fréquemment synthétisés par les microalgues ont des longueurs de chaînes de 16 à 18 carbones, semblables à celles des végétaux supérieurs (Hu et al., 2008). Les acides gras sont soit saturés, de formule générale $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$, (Berrada, 2009) soit insaturés présentant une ou plusieurs doubles liaisons (jusqu'à 6) dans leur chaîne hydrocarbonée. Ils sont dits mono ou polyinsaturés (Berrada, 2009; Hu et al., 2008). Les acides gras insaturés diffèrent par le nombre et la position des doubles liaisons (Hu et al., 2008). Certaines espèces sont riches en acides gras polyinsaturés à longue chaîne tels que l'acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6n-3), l'acide eicosapentaénoïque (EPA ; C20:5n-3) et l'acide alpha linoléique (ALA ; C18 :3n-3) (Huang, 2018; Khozin-Goldberg, Iskandarov, & Cohen, 2011) appartenant à la série oméga (ω) 3 (la première double liaison se situe entre le 3^e et le 4^e carbone à partir de l'extrémité méthyle terminale (CH_3 , nommée ω) de l'acide gras (Hu et al., 2008). La composition en acides gras des microalgues varie selon les espèces et les conditions de culture (Huang, 2018).

Le métabolisme des lipides neutres a été peu étudié chez les microalgues comparé aux plantes supérieures. Néanmoins, en se reposant sur l'homologie des séquences des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des acides gras et des TAG isolés des microalgues et des plantes

supérieures. On suppose alors que le métabolisme des lipides neutres chez les microalgues est similaire à celui décrit chez les plantes supérieures (Hu et al., 2008; Taleb, 2015; Zienkiewicz, Du, Ma, Vollheyde, & Benning, 2016). Les informations présentées dans les paragraphes qui suivent proviennent principalement des études sur les plantes supérieures, et dans une moindre mesure des études directes sur les microalgues.

2.2.1 Biosynthèse des acides gras

La synthèse *de novo* des acides gras chez les microalgues a lieu principalement dans les chloroplastes. Les acides gras produits sont généralement constitués de 16 ou 18 atomes de carbones ou les deux (Hu et al., 2008). La Figure 2.18 présente un schéma général de cette voie.

La synthèse des acides gras nécessite du CO₂, de l'énergie sous forme d'ATP, du pouvoir réducteur (NADPH, H⁺) obtenu de la voie des pentoses phosphates (transformation du glucose en pentoses phosphates et NADPH) (Clément-Larosière, 2012) et de l'acétyl CoA qui est la molécule de base de la synthèse des acides gras. L'acétyl-CoA est fourni par les mitochondries et par les plastes chez les plantes oléagineuses (Heldt & Piechulla, 2021). Dans les mitochondries, il est produit par certaines réactions : décarboxylation oxydative du pyruvate issu de la glycolyse, β-oxydation des acides gras et catabolisme de certains acides aminés dits cétoènes ou cétoformateurs comme la lysine et la leucine (Bhagavan & Ha, 2015; Taleb, 2015; Yaici, 2021). L'acétyl CoA doit être ensuite exporté vers le cytosol mais comme il ne peut pas traverser directement la membrane interne de la mitochondrie, il est transféré via un mécanisme de transport navette citrate (Bhagavan & Ha, 2015; Yaici, 2021). Les plastes possèdent aussi un complexe pyruvate déshydrogénase, qui permet l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA. Cette voie implique la glycolyse cytosolique en phosphoénolpyruvate (PEP), qui est ensuite importé dans le stroma des plastes, où il est transformé par les pyruvates kinases plastidiales en pyruvate et par conséquent en acétyl CoA (Heldt & Piechulla, 2021; Hu et al., 2008). Cependant, selon l'état de développement des cellules, l'activité de la pyruvate déshydrogénase est généralement faible dans les chloroplastes. Par ailleurs, ces dernières

possèdent une enzyme acétyl-CoA synthétase active, capable de transformer l'acétate en acétyl-CoA. Dans plusieurs plantes, l'acétate est un précurseur majeur de la production d'acétyl-CoA dans les chloroplastes. Quant à son origine, il peut provenir de l'hydrolyse de l'acétyl-CoA mitochondrial, obtenu par l'oxydation du pyruvate sous l'action du complexe pyruvate déshydrogénase mitochondrial (Heldt & Piechulla, 2021).

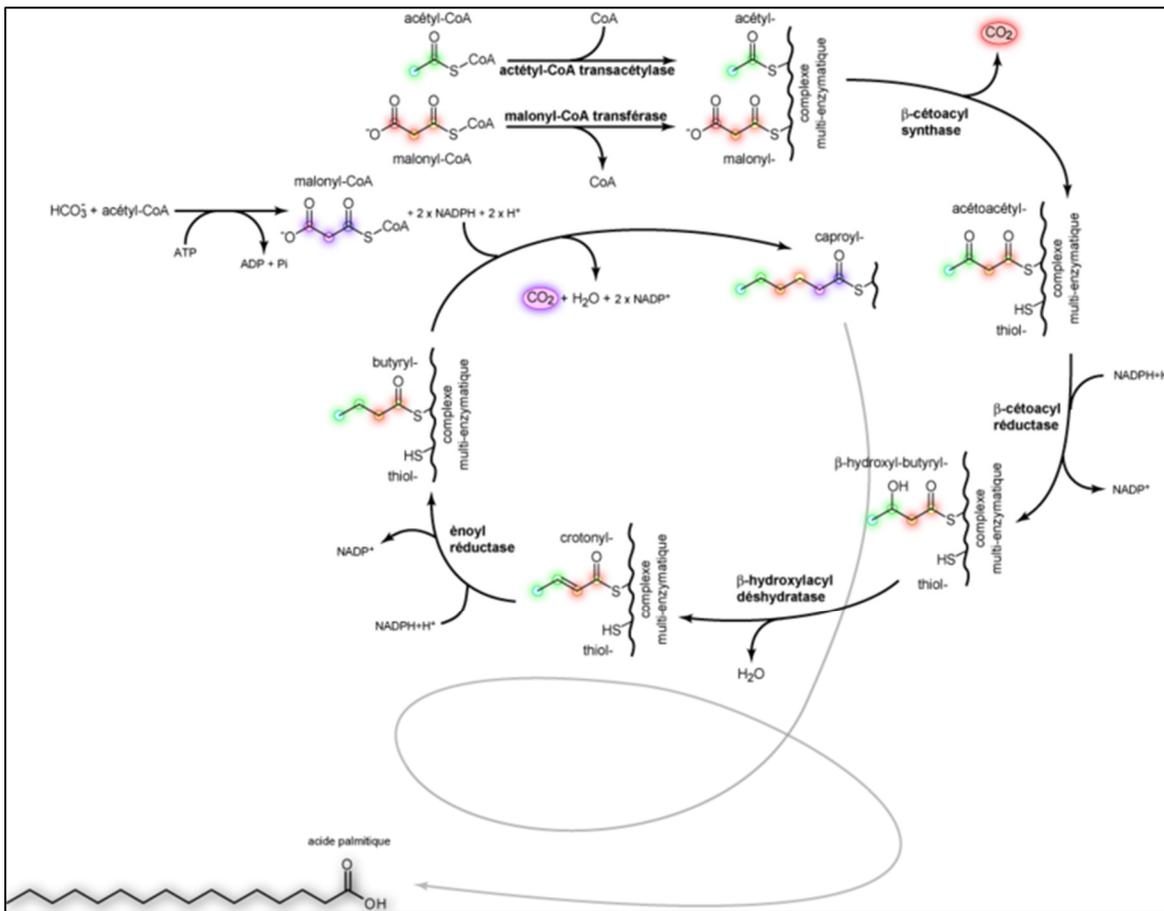


Figure 2.18 Schéma de synthèse de l'acide palmitique (C16)
Tirée de Foobar (2006)

La biosynthèse des acides gras commence par la conversion de l'acétyl CoA (C2) en malonyl CoA (C3) par l'acétyl CoA carboxylase (ACCase) (Heldt & Piechulla, 2011; Hu et al., 2008). Le malonyl CoA est le donneur de carbone pour l'allongement de la chaîne des acides gras. (Ohlrogge & Browse, 1995). L'allongement est réalisé par le système Acide Gras Synthase

(FAS : *FAtty Acid Synthase*). Le FAS est un complexe multi-enzymatique composé de sept enzymes possédant chacune une activité différente (Huang, 2018) :

- protéine porteuse d'acyle (ACP : *acyl carrier protein*) : joue un rôle important dans la synthèse des acides gras, la malonyl CoA-ACP transférase permet la formation du malonyl-ACP à partir de malonyl-CoA et l'Acétyl-CoA-ACP transacétylase forme l'Acétyl-ACP à partir de l'Acétyl-CoA,
- quatre enzymes engagées dans le cycle d'ajout de 2 carbones (β -kétol-ACP synthétase, β -kétol-ACP réductase, β -hydroxyacyl-ACP déshydratase et enoyl-ACP réductase),
- acyl-ACP thioestérase : permet de libérer les acides gras synthétisés par coupure de leur liaison avec l'ACP.

Après la formation du malonyl-ACP à partir du malonyl-CoA, l'Acétyl CoA intervient une autre fois en tant que substrat pour la première réaction de condensation. La condensation de l'Acétyl-ACP (obtenu à partir de l'Acétyl-CoA) avec le malonyl-ACP est catalysée par l'enzyme β -kétol-ACP synthétase. Cette réaction libère une molécule de CO_2 et elle est irréversible. L'acétoacétyl-ACP ainsi formé est réduit par le NADPH, H^+ en β -hydroxyl-butyl-ACP. La réaction est catalysée par la β -kétol-ACP réductase. Suite à la déshydratation (libération d'eau) du β -hydroxyl-butyl-ACP par la β -hydroxyacyl-ACP déshydratase, une double liaison trans Δ^2 (entre C2 et C3) est formée. Le α - β -trans-butenoyl obtenu est ensuite réduit (réduction de la double liaison) par le NADPH, H^+ en butyl-ACP. La réaction est catalysée par enoyl-ACP réductase. Ces quatre réactions (condensation, réduction, déshydratation et réduction) représentent un cycle. Le butyl-ACP synthétisé est un acide gras à quatre atomes de carbone. Sa chaîne sera augmentée de deux carbones fournis par une autre molécule malonyl-ACP lors du second cycle. Le processus se poursuit jusqu'au palmitoyl-ACP (C16:0) ou stéaroyl-ACP (C18:0) (deux carbones sont ajoutés à chaque cycle). Pour produire un acide gras insaturé, une double liaison est insérée par l'enzyme stéaroyl ACP désaturase. Les acides gras synthétisés (saturés ou insaturés) sont libérés de l'ACP par une acyl-ACP thioestérase (Heldt & Piechulla, 2011; Hu et al., 2008; Huang, 2018; Yaici, 2021).

Les acides gras produits par le système FAS (C16 et C18) sont par la suite exportés vers le réticulum endoplasmique. Ils peuvent être utilisés comme précurseurs pour la synthèse des acides gras poly-insaturés à longue chaîne entrant dans la composition des lipides membranaires et des TAG. La synthèse des AGPI-LC à partir des acides gras précurseurs se fait par des réactions alternées de désaturation (introduction de doubles liaisons) et d'allongement (Huang, 2018).

2.2.2 Biosynthèse des triglycérides

Par analogie avec les plantes supérieures, les chercheurs pensent que la biosynthèse des TAG chez les microalgues se produit principalement dans le réticulum endoplasmique (Huang, 2018). Toutefois, des travaux rapportent que chez certaines espèces, telle que *Chlamydomonas reinhardtii*, elle peut avoir lieu dans le chloroplaste (Fan, Andre, & Xu, 2011; Li et al., 2012; Zienkiewicz et al., 2016).

Les TAG sont formés d'une molécule de glycérol estérifiée par trois acides gras (Huang, 2018). Le glycérol-3-phosphate (G3P) est issu de la réduction de la 3-phosphodihydroxyacétone qui est un métabolite de la glycolyse (Zinsou, s.d.). Comme le montre la Figure 2.19, la synthèse des TAG est réalisée en trois étapes : dans un premier temps, deux acides gras sont détachés du CoA et sont transférés successivement aux positions 1 et 2 du G3P, ce qui donne l'acide phosphatidique (PA). Les deux réactions sont catalysées par l'enzyme glycérol-3-phosphate acyl-transférase. Ensuite, le PA est déphosphorylé sous l'action d'une phosphatase spécifique, formant ainsi le diacylglycérol (DAG). Finalement, pour compléter la synthèse des TAG, un troisième acide gras est transféré à la position 3 (position libre) du DAG par l'enzyme diacylglycérol acyltransférase. (Hu et al., 2008; Huang et al., 2010). Il convient de mentionner que le PA et DAG peuvent aussi servir de substrat pour la synthèse des lipides membranaires. À mentionner aussi que la composition finale en acides gras des TAG dépend des enzymes acyltransférases, puisqu'elles peuvent favoriser certains acides gras sur d'autres (Hu et al., 2008).

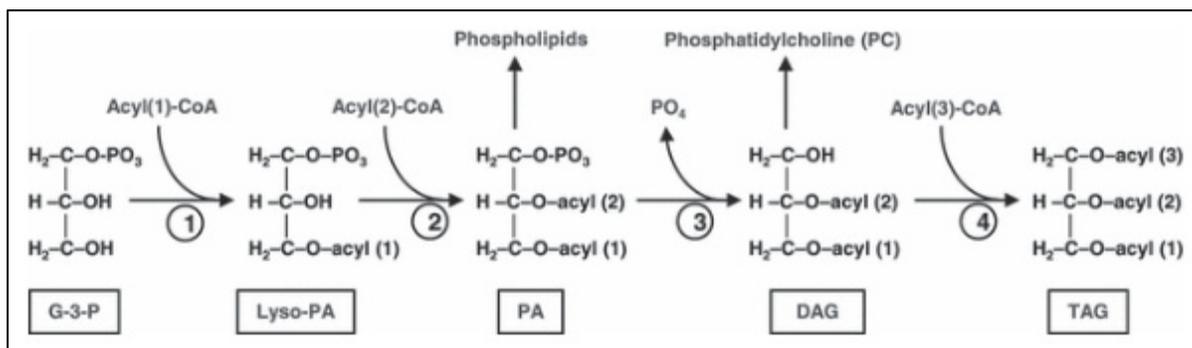


Figure 2.19 Schéma de synthèse des triglycérides (TAG)

Tirée de Hu et al. (2008)

(Reproduite avec permission)

Bien que la voie directe du glycérol (trois transferts successifs d'acides gras à une molécule de glycérol) expliquée ci-dessus soit considérée comme la principale voie de biosynthèse des TAG, la littérature rapporte une autre voie utilisant les phospholipides comme donneurs d'acides gras et le DAG comme accepteur. Cette voie implique l'enzyme phospholipide - diacylglycérol acyltransférase (PDAT) (Hu et al., 2008; Yoon, Han, Li, Sommerfeld, & Hu, 2012).

Les TAG synthétisés, composés principalement d'acides gras saturés et mono-insaturés (Hu et al., 2008), sont stockés dans des gouttelettes lipidiques appelées «oléoplastes», généralement situées dans le réticulum endoplasmique ou dans le cytoplasmes (Goold, Beisson, Peltier, & Li-Beisson, 2015; Taleb, 2015). Toutefois, elles peuvent être présentes dans les chloroplastes chez certaines microalgues comme *Chlamydomonas reinhardtii* (Li et al., 2012). Dans ce cas, elles sont nommées « plastoglobules » (Taleb, 2015). Les acides gras stockés dans les TAG peuvent être utilisés pour synthétiser des lipides membranaires quand les cellules retrouvent à nouveau les conditions favorables à la croissance (Khozin-Goldberg, Shrestha, & Cohen, 2005).

Les TAG peuvent être convertis en biodiesel via une réaction de transestérification. Pendant cette réaction, les TAG réagissent avec un alcool, habituellement le méthanol, pour produire des esters méthyliques d'acides gras (le biodiesel) et du glycérol (sous-produit qui peut être utilisé dans des produits cosmétiques, pharmaceutiques et aussi en industrie chimique) (Bélair,

2012; Chisti, 2007; Mata et al., 2010). La transestérification est catalysée par des alcalis, des acides ou des enzymes lipases. La transestérification en présence d'un catalyseur alcalin est plus rapide (environ 4000 fois) que la transestérification en présence d'un catalyseur acide. Pour cette raison, les catalyseurs alcalins tels que l'hydroxyde de sodium (NaOH) et l'hydroxyde de potassium (KOH) sont généralement utilisés par les industriels. La transestérification avec des lipases est peu utilisée en raison du coût élevé de ces enzymes (Chisti, 2007; Fukuda, Kondo, & Noda, 2001).

La qualité du biodiesel produit dépend principalement de sa composition en acides gras. La structure des acides gras notamment la longueur de la chaîne carbonée et le degré d'insaturation (nombre de doubles liaisons) affectent les propriétés du biodiesel (Stansell, Gray, & Sym, 2012). Les propriétés critiques du biodiesel qui sont influencées par la structure des acides gras sont l'indice de cétane, les propriétés d'écoulement à froid (point d'écoulement et point de trouble), la viscosité et la stabilité oxydative (Knothe, 2005; Stansell et al., 2012). Un biodiesel de qualité est celui qui montre un indice de cétane élevé, une faible viscosité, une stabilité oxydative supérieure et des points d'écoulement et de trouble faibles (Chamoumi, 2013; Knothe, 2005; Stansell et al., 2012; Taleb, 2015). D'après la littérature, une concentration élevée en acides gras saturés et de longues chaînes carbonées donne au biodiesel un indice de cétane élevé et une stabilité oxydative supérieure, mais une viscosité médiocre (élevée) et de mauvaises propriétés d'écoulement à froid (points d'écoulement et de trouble élevés). En revanche, un pourcentage élevé en acides gras polyinsaturés diminue la viscosité du biodiesel et lui offre de bonnes propriétés d'écoulement à froid. Toutefois, ces acides gras sont sensibles à l'auto-oxydation (Chamoumi, 2013; Hu et al., 2008; Stansell et al., 2012). Un équilibre dans les proportions des acides gras saturés et insaturés est alors nécessaire pour obtenir un biodiesel avec des propriétés qui répondent aux normes existantes. En Amérique, la norme appropriée est la norme ASTM Biodiesel Standard D 6751 (ASTM : American Society for Testing and Materials). En Europe, il existe la norme EN 14214 pour le biodiesel destiné aux véhicules (Chisti, 2007; Knothe, 2006). Ces normes diffèrent dans certains points. La norme EN 14214 par exemple exige une teneur inférieure à 12 % (mol/mol) en acide linoléique et une teneur

inférieure à 1 % (mol/mol) en acides gras polyinsaturés (\geq quatre doubles liaisons). Cette spécificité n'est pas présente dans la norme ASTM D 6751 (Chamoumi, 2013).

2.2.3 Facteurs permettant l'accumulation des triglycérides

Dans des conditions de culture favorables à la croissance, le taux des TAG dans les microalgues oléagineuses est faible. Il est possible d'augmenter significativement la production des TAG dans les cellules par culture des microalgues dans des conditions de stress. Le stress peut être de nature chimique (carence en nutriments essentiels à la croissance, pH et salinité) ou physique (température et intensité lumineuse) (Hu et al., 2008). Toutefois, les conditions d'induction de l'accumulation des TAG ont un impact négatif sur la croissance (Mandal & Mallick, 2009; Rodolfi et al., 2009; Xin et al., 2010).

La carence en azote est le facteur nutritionnel le plus couramment rapporté pour déclencher la production et l'accumulation des TAG dans microalgues oléagineuses (Hu et al., 2008; Lacour, 2010; Rodolfi et al., 2009; Simionato et al., 2013; Taleb, 2015; Thiriet-Rupert, 2017). L'azote est utilisé par les microalgues pour la synthèse des protéines et des structures essentielles (Marcilhac, 2014). Lorsque l'azote est manquant, les microalgues n'arrêtent pas immédiatement l'assimilation du CO₂ indispensable à la photosynthèse, mais comme elles ne peuvent pas l'utiliser pour synthétiser les protéines, elles le stockent sous forme de TAG (Dejoye, 2013). À noter que la carence en azote entraîne une baisse de l'activité photosynthétique (Clément-Larosière, 2012). Cette baisse pourrait être expliquée par la diminution de la concentration de la Rubisco (Falkowski, Sukenik, & Herzig, 1989) et par la baisse de la concentration de chlorophylle (Richardson, Orcutt, Schwertner, Martinez, & Wickline, 1969). La chlorophylle joue un rôle dans le stockage interne de l'azote. Sous carence en azote, les cellules de microalgues détruisent leur chlorophylle pour pallier ce manque et assurer la division cellulaire, la croissance est alors maintenue mais à un rythme réduit (Kandilian, Pruvost, Legrand, & Pilon, 2014; Voo et al., 2015).

La carence en phosphore favorise aussi l'accumulation des TAG dans les microalgues (Khozin-Goldberg & Cohen, 2006; Rodolfi et al., 2009; Roopnarain et al., 2014) mais, elle diminue la croissance (Bonfond et al., 2020). Comme mentionné plus haut, le phosphore entre dans la composition des membranes cellulaires, des acides nucléiques et dans les molécules d'ATP et de NADPH qui interviennent dans de nombreux processus métaboliques (Clément-Larosière, 2012).

La carence en soufre est un autre facteur qui affecte le métabolisme des lipides et la croissance des microalgues. Chez *Chlorella sorokiniana* par exemple, une carence en soufre a entraîné une diminution de la croissance d'un facteur 2.3 à 2.8 et a favorisé le stockage d'amidon de façon temporaire. Après sept jours, les réserves d'amidon ont diminué au profit d'une augmentation de la production des TAG (Mizuno et al., 2013; Villay, 2013).

Dans les diatomées, la carence en silice déclenche l'accumulation des lipides. Une teneur élevée en TAG a été obtenue chez la diatomée *Cyclotella cryptica*, en réponse à ce stress (Roessler, 1988; Sriharan, Bagga, & Nawaz, 1991).

Il est également possible d'augmenter la production des lipides de réserves dans les microalgues par contrôle de la température. La réponse des TAG à la température n'est pas claire (Bonfond et al., 2020; Hu et al., 2008). Chez certaines microalgues, une augmentation de la production des lipides a été obtenue à des températures inférieures ainsi qu'à des températures supérieures à la température optimale de croissance. D'après Converti, Casazza, Ortiz, Perego, et Del Borghi (2009), la teneur en lipides de *Nannochloropsis oculata* à 15 °C (14.9 %) et à 25 °C (13.9 %) est deux fois supérieure à celle obtenue à 20 °C (7.9 %) (température optimale de croissance). Chez d'autres espèces, telles que *Scenedesmus obliquus*, la production des TAG est maximale à la température optimale de croissance (27.5°C) (Breuer, Lamers, Martens, Draaisma, & Wijffels, 2013).

La lumière a aussi un effet sur le métabolisme des lipides. Une tendance générale à l'accumulation des TAG, en réponse à une augmentation de l'intensité lumineuse a été

observée chez plusieurs espèces de microalgues (Breuer et al., 2013; Hu et al., 2008; Liu, Yuan, Hu, & Li, 2012; Pal, Khozin-Goldberg, Cohen, & Boussiba, 2011; Takeshita et al., 2014). Cependant, il convient de mentionner que pour des intensités lumineuses supérieures à l'intensité de saturation qui est spécifique à chaque espèce, une photoinhibition se produit, entraînant une baisse de l'activité photosynthétique et par conséquent une diminution de la productivité lipidique (Breuer et al., 2013; Vitova, Bisova, Kawano, & Zachleder, 2015).

Pour l'impact du pH sur le métabolisme des lipides, les travaux publiés sur le sujet montrent que le pH alcalin favorise l'accumulation des TAG dans les microalgues (Gardner, Peters, Peyton, & Cooksey, 2011; Guckert & Cooksey, 1990; Santos, Janssen, Lamers, Evers, & Wijffels, 2012).

Enfin, il a été rapporté qu'une concentration élevée de sel dans le milieu de culture stimule l'accumulation des TAG dans les microalgues. À titre d'exemple, chez *Neochloris oleoabundans*, une augmentation de la teneur en TAG a été obtenue dans des conditions salines (NaCl 270 mM, NaHCO₂ 75 mM et Na₂CO₃ 75 mM) à pH alcalin (pH 10) (Santos et al., 2012).

La productivité lipidique des microalgues dépend de leur contenu lipidique et de leur production de biomasse. Pour obtenir une productivité lipidique élevée, il est nécessaire de trouver un compromis entre croissance et production de lipides. Rodolfi et al. (2009) et d'autres chercheurs (Feng, Deng, Fan, & Hu, 2012; Huntley & Redalje, 2007; Mandal & Mallick, 2009; Xin et al., 2010) proposent une stratégie de culture en deux étapes. Une première étape de culture des microalgues dans des conditions optimales de croissance pour l'obtention d'une production maximale en biomasse suivie d'une étape d'induction de l'accumulation des TAG sous conditions de stress.

2.2.4 Rôles physiologiques de l'accumulation des triglycérides

La synthèse des TAG chez les microalgues jouent plusieurs rôles dans la réponse au stress environnemental. En plus du rôle des TAG dans le stockage de carbone et d'énergie dans les cellules, leur synthèse permet de réguler la chaîne photosynthétique de transport d'électrons. Dans des conditions de stress, les électrons en excès s'accumulent dans la chaîne photosynthétique de transport d'électrons conduisant à une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène, qui entraîne une inhibition de la photosynthèse et endommage les lipides membranaires, les protéines et d'autres macromolécules. Dans ce cas, la synthèse des acides gras C18 permet de détendre la chaîne de transport d'électrons puisqu'elle consomme une grande quantité de NADPH, H⁺ (la synthèse d'un acide gras C18 utilise 24 NADPH, H⁺ provenant de la chaîne de transport d'électrons, soit le double de ce qui est consommé pour la formation d'une molécule protéique ou glucidique) (Hu et al., 2008; Taleb, 2015).

Par ailleurs, la voie de synthèse des TAG dans les microalgues est couramment coordonnée avec la synthèse secondaire des pigments caroténoïdes. Ces molécules sont stockées avec les TAG dans des gouttelettes lipidiques cytosoliques. Elles permettent de réduire l'excès de lumière tapant le chloroplaste en conditions de stress (Hu et al., 2008; Taleb, 2015). Enfin, la synthèse des TAG peut utiliser les acides gras toxiques exclus des membranes comme donneurs d'acyle (Hu et al., 2008; Taleb, 2015).

2.3 Récolte des microalgues

La séparation des microalgues du milieu de culture est une étape indispensable avant de procéder à l'extraction des lipides. Toutefois, cette tâche pose un véritable problème, car les microalgues sont de petite taille (de l'ordre du micron), légères et diluées dans le milieu de culture. Du point de vue économique, il s'agit d'une étape limitante dans le procédé de production de lipides à grande échelle, puisqu'elle peut contribuer de 20 à 30 % du coût de production (Barros et al., 2015; Besson, 2013; Labranche, 2015; Mata et al., 2010; Pahl et al., 2013; Zinkone, 2018).

La concentration de la biomasse dans les bassins ouverts ou dans les photobioréacteurs peut être inférieure à 0.1 % (m/v). Or, les procédés d'extraction des lipides utilisés après exigent que cette concentration soit apportée au minimum à 1 % (m/v), voire 30 % (m/v), selon la méthode d'extraction envisagée. Plus la biomasse doit être concentrée, plus les coûts énergétiques de cette étape sont importants (Wolff, 2012).

Le choix de la méthode de récolte dépend de l'espèce de microalgue, sa taille, sa densité, ses propriétés et aussi de la valeur du produit désiré (Bensalem, 2019; Brennan & Owende, 2010; Chen et al., 2011; Labranche, 2015). La récolte des microalgues est généralement envisagée en deux étapes : une première étape de préconcentration (récolte en vrac) qui consiste à séparer les microalgues du milieu de culture par sédimentation par gravité, floculation ou flottation, suite à laquelle on obtient une boue de microalgues dont le taux de matière sèche peut être compris entre 2 et 7 % et une seconde étape de concentration par centrifugation ou filtration qui permet d'obtenir une pâte épaisse de microalgues avec un taux de matière sèche entre 15 et 25 % (pâte humide). Cette étape est plus énergivore que la première (Ballerini, 2011; Bensalem, 2019; Besson, 2013; Chen et al., 2011). Selon les besoins, une étape de séchage peut être rajoutée pour obtenir un solide avec un taux de matière sèche entre 85 et 95 % (Besson, 2013; Labranche, 2015). À noter que la récolte des microalgues et la concentration de la biomasse peut se faire en une seule étape par centrifugation ou filtration mais ces méthodes consomment une quantité importante d'énergie notamment dans le cas de grands volumes de culture (échelle industrielle). Le processus en deux étapes permet de réduire les coûts (Zinkone, 2018). La Figure 2.20 présente la consommation énergétique des différentes méthodes de récolte conventionnelles utilisées.

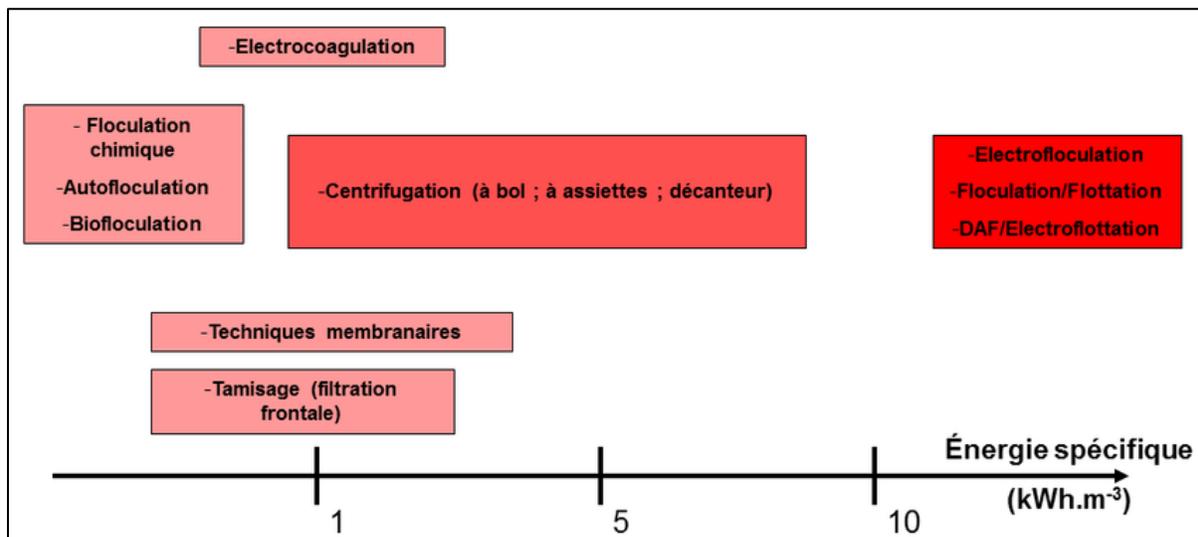


Figure 2.20 Comparaison des systèmes de récolte en fonction de leur consommation énergétique

Tirée de présentation Frappart, Massé, et Jaouen - GEPEA - CNRS (s.d.)

(Reproduite avec permission)

Dans ce qui suit, ces méthodes sont présentées avec leurs avantages et leurs inconvénients.

2.3.1 Méthodes de récolte conventionnelles

2.3.1.1 La centrifugation

Cette technique utilise la force centrifuge pour séparer les microalgues de l'eau. La séparation est basée sur la différence de densité des cellules de microalgues par rapport à celle du milieu de culture. La force centrifuge utilisée permet d'accélérer la vitesse de sédimentation. Cette méthode est efficace, rapide et facile à réaliser (Bensalem, 2019; Labranche, 2015). Des études effectuées sur certaines microalgues montrent qu'il est possible de récupérer entre 90 et 100 % de la biomasse algale en moins de cinq minutes (Besson, 2013; Chen et al., 2011; Heasman, Diemar, O'connor, Sushames, & Foulkes, 2000). La centrifugation est l'une des techniques les plus employées à l'échelle industrielle. Cependant, elle est coûteuse en termes d'investissement et de consommation d'énergie. De plus la force centrifuge peut endommager

les cellules de microalgues et par conséquent diminuer le rendement de récupération (Bensalem, 2019; Dejoye, 2013; Labranche, 2015; Wolff, 2012).

2.3.1.2 La filtration

Cette méthode consiste à faire passer le milieu de culture contenant les microalgues au travers d'un filtre. Les microalgues sont alors retenues sur le filtre tandis que le milieu de culture (filtrat) est récupéré. Il s'agit d'une séparation par exclusion de taille (Dejoye, 2013; Labranche, 2015; Wolff, 2012). Le passage de la suspension de microalgues à travers le filtre peut être réalisé par gravité, sous vide ou sous pression (Besson, 2013; Labranche, 2015). Il existe deux types de filtration : la filtration frontale (tamisage) où la suspension de microalgues s'écoule perpendiculairement à la surface du filtre et la filtration tangentielle où la suspension de microalgues s'écoule parallèlement à la surface du filtre (Wolff, 2012). La filtration frontale est peu employée pour la récupération des microalgues à l'échelle industrielle. Son inconvénient majeur est le colmatage des pores du filtre suite à l'accumulation des cellules de microalgues, empêchant le milieu de culture de traverser d'avantage (Besson, 2013; Labranche, 2015). Les filtres doivent être alors changés régulièrement, ce qui augmente le coût du procédé. La filtration tangentielle réduit le problème de colmatage mais elle permet de récolter les microalgues de taille inférieure à 40 μm (Wolff, 2012). Avec ce type de filtration, (Petrusevski, Bolier, Van Breemen, & Alaerts, 1995) ont récupéré de 70 à 89 % de biomasse de microalgues d'eau douce.

Le choix de la taille des pores du filtre dans les procédés utilisés dépend de la taille de l'espèce de microalgue à récolter (Dejoye, 2013; Labranche, 2015). Selon la taille des pores, on peut distinguer : la macrofiltration (taille de pores supérieure à 10 μm), la microfiltration (taille des pores se situe entre 0,1 et 10 μm) et l'ultrafiltration (taille des pores se situe 0,02 et 2 μm) (Bensalem, 2019). La filtration n'endommage pas les cellules de microalgues comme pourrait le faire la centrifugation (Labranche, 2015). Cependant, elle est coûteuse en énergie. Dans la filtration sous vide, le pompage de la suspension de microalgues implique une consommation

importante d'énergie en plus des frais de remplacement des filtres (Dejoye, 2013; Zinkone, 2018).

2.3.1.3 La sédimentation par gravité

C'est une méthode de séparation basée sur le principe de gravité (Dejoye, 2013). Elle repose sur la particularité de certaines espèces de microalgues à sédimenter spontanément lorsque l'agitation du milieu est arrêtée (Bensalem, 2019; Wolff, 2012). La vitesse de sédimentation dépend de la taille des microalgues, de la différence de densité entre les cellules et le milieu et aussi de la viscosité du milieu de culture (Wolff, 2012). C'est une technique de récolte facile à réaliser et non consommatrice d'énergie. Toutefois, elle est spécifique aux espèces. De plus le processus est lent et le taux de récupération est faible (Bensalem, 2019).

2.3.1.4 La floculation

La floculation est un procédé de séparation au cours duquel les microalgues en suspension s'agglomèrent et forment de gros amas, appelés floccs. Ayant une masse supérieure aux cellules libres, elles sédimentent plus rapidement (Bensalem, 2019; Chen et al., 2011; Labranche, 2015). Il existe plusieurs techniques de floculation : l'autofloculation, la floculation chimique, l'électrofloculation et la biofloculation (Chen et al., 2011; Lam & Lee, 2012b).

L'autofloculation peut être produite à la suite de la sécrétion par les cellules de microalgues, sous certaines conditions de stress (pH, température, conditions nutritives extrêmes), des substances polymères extracellulaires (EPS) comme les exopolysaccharides et des protéines remplissant le rôle de flocculant. Elle peut être aussi provoquée par l'augmentation du pH du milieu. L'augmentation du pH peut résulter de la consommation du CO₂ par les cellules lors de la photosynthèse ou peut être produite par l'ajout de NaOH (Besson, 2013; Chen et al., 2011; Zinkone, 2018). En effet, Les cellules de microalgues portent une charge négative à leur surface qui les emmène à se repousser et à rester en suspension. L'augmentation du pH entraîne la précipitation des sels et des ions métalliques présents dans le milieu de culture. Ces derniers influencent la charge des microalgues. La charge positive des sels neutralisent la charge

négligable des microalgues ce qui favorise la floculation (Chen et al., 2011; Labranche, 2015; Lam & Lee, 2012b). Les diatomées sont connues pour leur capacité à flocculer à pH élevés (Knuckey, Brown, Robert, & Frampton, 2006). Une étude a montré que la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* floccule à partir d'un pH 10,5. Son activité photosynthétique a fait augmenter le pH du milieu jusqu'à 10,8 (Spilling, Seppälä, & Tamminen, 2011). Cette même étude a mis en évidence la floculation de la microalgue verte *Scenedesmus obliquus* à partir d'un pH 11,3, mais l'activité photosynthétique de la microalgue n'était pas suffisante pour atteindre cette valeur de pH, l'ajout du NaOH était nécessaire (Spilling et al., 2011). L'autofloculation permet de pré-concentrer à faible coût la biomasse algale (Besson, 2013).

La floculation chimique repose sur l'ajout de produits chimiques dans le milieu de culture pour induire l'agrégation des microalgues (Chen et al., 2011). Elle est réalisée en deux étapes. La première étape est la coagulation qui consiste en l'ajout d'un produit chimique « coagulant » afin de déstabiliser les cellules de microalgues en suspension. La seconde est la floculation qui consiste en l'agrégation des cellules déstabilisées pour former des floccs apparents (Besson, 2013). Il existe deux types de coagulants : les coagulants inorganiques et les coagulants organiques. Les coagulants inorganiques sont des composés minéraux, les plus fréquemment utilisés sont les sels d'aluminium [chlorure d'aluminium, AlCl_3 ; sulfate d'aluminium, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ habituellement appelé alun,...] ou de fer [sulfate de fer, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$; chlorure de fer, FeCl_3 ,...] (Wolff, 2012). Par exemple l'alun était utilisé pour la récolte des microalgues *Chlorella* et *Scenedesmus* (Grima, Belarbi, Fernández, Medina, & Chisti, 2003). Les coagulants organiques sont des polymères synthétiques ou dérivés de produits naturels. On distingue les polymères anioniques, non ioniques et cationiques (Besson, 2013). Les polymères organiques cationiques sont efficaces pour l'agrégation des microalgues (Bilanovic, Shelef, & Sukenik, 1988). Les polymères organiques anioniques et non ioniques sont inefficaces en raison de la répulsion entre les charges (Chen et al., 2011). Dans les polymères cationiques, on retrouve les polymères cationiques synthétiques comme les polyacrylamides cationiques et les polymères cationiques dérivés de produits naturels tels que le chitosane, l'amidon, les polysaccharides et la lignine (Bolto & Gregory, 2007). Le polyacrylamide a été utilisé pour la floculation de la microalgue *Chlorella vulgaris*. Un taux de récupération de 78 % de biomasse

algal a été obtenu (Oh et al., 2001). L'efficacité du chitosane pour la récolte des microalgues a été démontrée par plusieurs chercheurs (Divakaran & Sivasankara Pillai, 2002; Rashid, Rehman, & Han, 2013; Xu, Purton, & Baganz, 2013). L'amidon cationique était aussi efficace pour la récolte des microalgues d'eau douce *Parachlorella* et *Scenedesmus* (Vandamme, Foubert, Meesschaert, & Muylaert, 2010). La floculation chimique est une méthode facile à réaliser et non consommatrice d'énergie mais, les coagulants peuvent être onéreux et spécifiques aux espèces de microalgues (un coagulant peut être efficace sur une espèce et pas sur une autre) (Bensalem, 2019). La floculation avec des produits chimiques inorganiques nécessite l'utilisation de forte concentration de sels pour être efficace. De plus, la biomasse est contaminée par les sels de fer ou d'aluminium utilisés. Ceci peut avoir un effet néfaste sur la qualité du produit final (Ballerini, 2011; Chen et al., 2011; Lam & Lee, 2012b). Cette méthode n'est pas recommandée dans le cas où des co-produits liés au domaine de la santé doivent être extraits de la biomasse avant sa valorisation en biocarburants (les sels utilisés peuvent être toxiques) (Ballerini, 2011; Lam & Lee, 2012b). Cette méthode peut aussi avoir un impact négatif sur l'environnement, notamment lors de l'évacuation des effluents du fait de la présence de fortes concentrations de sels métalliques (Ballerini, 2011). Les coagulants polymères dérivés de produits naturels sont moins toxiques et biodégradables (Lam & Lee, 2012b). Toutefois, les polymères cationiques ne sont pas efficaces pour l'agrégation des microalgues marines. De plus, la floculation peut être inhibée par la salinité élevée du milieu (Bilanovic et al., 1988; Vandamme et al., 2010).

L'électrofloculation repose sur le mouvement des microalgues dans un champ électrique. Les cellules de microalgues se déplacent vers l'anode (+) pour neutraliser leur charge négative et former des floes par la suite. Cette méthode permet d'éviter la contamination de la biomasse par des produits chimiques (Besson, 2013; Zinkone, 2018). Les travaux de Poelman, De Pauw, et Jeurissen (1997) ont montré qu'il était possible de récupérer 80 à 95 % ou plus de biomasse de microalgues d'eau douce avec cette technique en environ 35 minutes.

Enfin, la biofloculation est une technique de floculation induite par des substances polymères extracellulaires (bio-floculants) produites par des microorganismes comme les bactéries, les

levures, les champignons et les microalgues autofloculantes. Ces microorganismes peuvent être mis en culture avec les microalgues à récolter ou non (Besson, 2013; Zinkone, 2018). Par exemple, la culture des bactéries *Terrimonas* sp. , *Flavobacterium* sp. et *Sphingobactérium* sp. avec la microalgue *Chlorella vulgaris* a favorisé sa floculation (Lee et al., 2013). Le bio-floculant peut être produit hors culture de microalgues (Besson, 2013). À titre d'exemple, le biofloculant produit par la bactérie *Paenibacillus polymyxa* AM49 est efficace sur les microalgues *Scenedesmus* sp. (Kim, La, Ahn, Park, & Oh, 2011) et *Chlorella vulgaris* (Oh et al., 2001). Cette méthode de récolte n'utilise pas des produits chimiques mais peut contaminer la biomasse algale, et par conséquent empêche son utilisation dans le domaine alimentaire (Zinkone, 2018). Par ailleurs, la culture des microorganismes producteurs de biofloculants peut être coûteuse. Il est donc nécessaire de trouver une source de carbone peu onéreuse pour leur culture (Lam & Lee, 2012b). L'utilisation des microalgues autofloculantes pour récolter les microalgues non autofloculantes semble plus avantageuse puisqu'elle offre la possibilité de valorisation de la totalité de la biomasse algale (Zinkone, 2018). Par exemple, les microalgues d'eau douce *Ankistrodesmus falcatus* et *Scenedesmus obliquus* ont permis la floculation de la microalgue d'eau douce *Chlorella vulgaris* et la microalgue marine *Tetraselmis suecica* a permis de floculer la microalgue marine *Neochloris oleoabundans* (Salim, Bosma, Vermuë, & Wijffels, 2011). Une autre méthode de biofloculation assistée par palettisation de champignons (les champignons forment des granules dans certaines conditions de culture) a été développée pour la récolte des microalgues (Zhou et al., 2012). Dans cette étude, des champignons filamenteux *Aspergillus* sp. UMN F01 et *Aspergillus* UMN F02 étaient utilisés pour la récolte de la microalgue *Chlorella vulgaris* UMN235. Des granules de champignons-microalgues de grande taille (2 à 5 mm) étaient obtenues et elles étaient facilement récupérées par une simple filtration. L'étude a montré que les champignons étaient capables de croître dans le milieu de culture de la microalgue et que le pH était le principal facteur affectant la palettisation (la palettisation se produit à pH bas). Cette technologie est prometteuse. Non seulement elle a permis la récolte de la microalgue, mais aussi les granules champignons-microalgues obtenues étaient utilisées pour le traitement des eaux usées. Cette technologie offre aussi la possibilité de valorisation de la totalité de la biomasse (champignons-microalgues) en biocarburants puisque certaines espèces de champignons peuvent avoir des teneurs en lipides allant de 10 à

30 % de la biomasse sèche (Xia, Zhang, Zhang, & Hu, 2011), qui peuvent être convertis en biodiesel.

2.3.1.5 La flottation

La flottation est une méthode de séparation basée sur la gravité (Chen et al., 2011; Dejoye, 2013). Certaines cyanobactéries et microalgues possèdent des vacuoles de gaz leur permettant de flotter naturellement (Besson, 2013). C'est le cas par exemple des cyanobactéries *Anabaena flos-aquae* (Kashyap, Sundararajan, & Ju, 1998) et *Spirulina platensis* (Kim et al., 2005). Pour ces microalgues, la flottation naturelle permet de réduire considérablement leur coût de récolte. Pour les microalgues qui ne possèdent pas cette caractéristique et sont nombreuses, la récolte peut se faire par flottation assistée (Besson, 2013). Des bulles d'air s'adhèrent aux cellules de microalgues en suspension et les font flotter à la surface du milieu de culture où elles peuvent ensuite être récoltées. Les techniques de flottation utilisées sont la flottation à air dissous (DAF), la flottation à air dispersé et l'électroflottation (Chen et al., 2011).

La flottation à air dissous (DAF) repose sur l'utilisation de microbulles d'air de diamètre compris entre 10 et 100 μm (Chen et al., 2011). Les microbulles sont obtenues par dissolution d'air dans le milieu de culture sous pression. Quand l'eau (milieu de culture) est saturée d'air, l'eau distillée stérile (à l'état brut) est ajoutée, il en résulte la formation de petites bulles (EMO, s.d.). Selon (Edzwald, 1993), le procédé DAF est plus efficace que la sédimentation pour la récolte des microalgues mais il doit être précédé par une coagulation. L'ajout de coagulant permet de déstabiliser les cellules de microalgues pour assurer leur fixation aux bulles.

Le procédé de flottation à air dispersé utilise des bulles de diamètre compris entre 700 et 1500 μm . Celles-ci sont obtenues par injection d'air et agitation du milieu de culture à grande vitesse à l'aide d'un agitateur mécanique (Chen et al., 2011). Cette technique a été utilisée pour la récolte de la microalgue *Scenedesmus quadricauda* (Chen, Liu, & Ju, 1998). Elle s'est montrée efficace en présence d'un collecteur cationique [le bromure cationique de *N*-Cétyl - *N* - *N* - *N* - triméthylammonium (CTAB)] ainsi qu'en présence d'un collecteur anionique [le

dodécylsulfate de sodium anionique (SDS)] plus du chitosane. Plus de 90 % de la biomasse algale a été récupérée.

Dans l'électroflottation, les microalgues sont transportées à la surface par des microbulles de dihydrogène issues de l'électrolyse de l'eau (décomposition de l'eau par application d'un champ électrique) (Wolff, 2012). Toutefois, les techniques de flottation assistée sont énergivores (Wolff, 2012; Zinkone, 2018).

Ces dernières années, une nouvelle méthode de récupération des microalgues par bio-flottation a été rapportée dans la littérature. La méthode consiste à utiliser une émulsion obtenue par mélange de solution de protéines de *Moringa* (plante) avec l'huile de tournesol comestible, pour faire flotter la microalgue *Nannochloropsis* sp. Une efficacité de flottation de 87 % a été obtenue (Kandasamy & Shaleh, 2018).

D'autres technologies étaient rapportées dans la littérature, telles que l'utilisation des ultrasons (séparation basée sur l'agrégation des microalgues) (Bosma, Van Spronsen, Tramper, & Wijffels, 2003) et la technologie d'immobilisation des cellules qui est apparue comme méthode alternative et solution innovante pour la récolte des microalgues (Kaparapu, 2017; Ignacio Moreno-Garrido, 2013). Cette technologie sera abordée dans la partie suivante.

2.3.2 Technologie d'immobilisation des microalgues

L'immobilisation des microalgues est effectuée par leur attachement à, ou piégeage dans, des supports solides insolubles dans l'eau (Bouabidi et al., 2019). La technologie d'immobilisation des microalgues est actuellement utilisée dans divers domaines de recherche tels que l'épuration des eaux usées par élimination des nutriments (comme l'azote et le phosphore) (Cao et al., 2022; El-Sheekh, Metwally, Allam, & Hemdan, 2017; Kube, Fan, & Roddick, 2021; Kube, Mohseni, Fan, & Roddick, 2019; Sukačová, Trtílek, & Rataj, 2015), des métaux lourds (Barquilha, Cossich, Tavares, & da Silva, 2019; Hadiyanto, Pradana, Buchori, & Budiati, 2014; Lee et al., 2016; Shen et al., 2018), des colorants (Revathi et al., 2017) et des

composés toxiques (Nazos & Ghanotakis, 2021; Tam et al., 2010), la production d'énergie comme le biodiesel (Cao et al., 2022; Cheng et al., 2013; Johnson & Wen, 2010; Liu et al., 2013; Rushan, Yasin, Said, & Ramesh, 2020; Schnurr, Espie, & Allen, 2013; Srinuanpan, Cheirsilp, Boonsawang, & Prasertsan, 2019) et le biohydrogène (Canbay, Kose, & Oncel, 2018; Maswana, Lindblad, & Maneeruttanarungroj, 2020; Alejandro Ruiz-Marin, Canedo-López, & Chávez-Fuentes, 2020; Wutthithien & Incharoensakdi, 2022), les tests de toxicité (biocapteurs) (Ahmed et al., 2018; Gosset, 2018; Guedri & Durrieu, 2008) et dans l'industrie cosmétique pour la production de molécules à haute valeur ajoutée (Duliège, 2017).

2.3.2.1 Choix du support

Le choix du support est une étape importante dans un procédé d'immobilisation. Pour l'immobilisation des microalgues, un support idéal est celui qui remplit les critères suivants : il est insoluble dans l'eau, non toxique pour les cellules, non biodégradable par la biomasse immobilisée, non polluant, facile à manipuler et à régénérer, retient les microalgues pour une longue durée, assure la diffusion des nutriments, du CO₂ et de la lumière dans le cas de microalgues photosynthétiques, présente une stabilité mécanique (il ne doit pas être fragile et cassant), chimique (ne doit pas être dégradé par les éléments chimiques présents dans le milieu de culture) et thermique (résiste à la température de culture) et enfin peu coûteux et peut être utilisé à grande échelle (Bou Saab, 2011; Bouabidi et al., 2019; Martins, Martins, Fiúza, & Santaella, 2013).

Selon leur nature chimique, on distingue deux classes de supports : les supports inorganiques et les supports organiques. Les supports inorganiques comme en verre, en aluminium et en silicates (Bou Saab, 2011). Pour les supports organiques, on retrouve les polymères synthétiques (polyacrylamide, polyuréthane, alcool polyvinylique (PVA), polysulfone, résines, sel de sodium de carboxyméthylcellulose, gel de silice...) (Bouabidi et al., 2019; Martins et al., 2013; Ignacio Moreno-Garrido, 2013) et les polymères naturels tels que les polysaccharides d'algues (alginates, carraghénanes et agars) et le chitosane, un polysaccharide dérivé de la chitine (Martins et al., 2013). La chitine est le principal constituant de la carapace des crustacés,

des insectes et de plusieurs champignons (Blouin, Patry, Boulfroy, & Legault, 2002). Le polymère naturel le plus largement utilisé pour l'immobilisation des microalgues est l'alginate en raison de ses caractéristiques optiques (transparence), mécaniques et chimiques (Ignacio Moreno-Garrido, 2013). Les protéines (blanc d'œuf, caséine, albumine et gélatine) sont aussi utilisées comme supports naturels pour immobiliser les microalgues (Ignacio Moreno-Garrido, 2013). D'après Bouabidi et al. (2019), les polymères naturels ne sont pas toxiques, assurent une diffusion élevée des éléments nécessaires à la croissance des cellules et sont respectueux de l'environnement, mais ont une faible résistance mécanique dans les eaux usées particulièrement. Les polymères synthétiques sont plus stables, mais peuvent être toxiques pour les microalgues, ce qui pourrait affecter l'efficacité du procédé de traitement des eaux usées par les microalgues immobilisées.

Les techniques d'immobilisation existantes sont exposées dans la partie suivante, en accordant une attention particulière à la méthode d'inclusion des microalgues dans le gel d'alginate qui est utilisée dans la présente étude. Une description détaillée des alginates et de leurs utilisations dans l'immobilisation des microalgues pour diverses applications seront présentées à la fin de cette partie.

2.3.2.2 Techniques d'immobilisation des microalgues

Selon la littérature, les techniques d'immobilisation peuvent être divisées en deux groupes : les techniques passives et les techniques actives (Kaparapu, 2017; Martins et al., 2013; Ignacio Moreno-Garrido, 2013; Nghiem-Xuan, 2019).

a) Techniques passives: adsorption passive

L'immobilisation passive des microalgues repose sur la capacité naturelle de certaines espèces à se fixer et à se développer sur différentes surfaces (Ignacio Moreno-Garrido, 2008, 2013). C'est le phénomène naturel de la formation de biofilm (Bou Saab, 2011). La fixation des cellules sur le support se fait au moyen de substances polymères extracellulaires (EPS) qu'elles

produisent (Mages, Óvári, & Kröpfl, 2004). L'immobilisation par adsorption implique des interactions entre les cellules et la surface du support. Les interactions créées sont de nature électrostatiques représentées principalement par des liaisons hydrogènes, liaisons ioniques et forces de van der Waals (Bou Saab, 2011; Bouabidi et al., 2019). Ces liaisons sont faibles et n'entraînent pas un changement de la structure des cellules immobilisées (Bouabidi et al., 2019). Cette méthode d'immobilisation est simple, douce et ne nécessite pas l'ajout de produits chimiques. Cependant, les cellules peuvent se détacher facilement du support en raison de la faible force de liaisons entre les deux ce qui rend la technique un peu moins efficace (Bayat, Hassanshahian, & Cappello, 2015; Millette, 2003).

Les supports utilisées dans l'immobilisation passive peuvent être naturels ou synthétiques (Ignacio Moreno-Garrido, 2008). L'éponge naturelle de différentes espèces de la plante *Luffa* a été largement utilisée pour immobiliser les microalgues. Ce support est caractérisé par sa porosité élevée, il n'est pas toxique, possède de bonnes propriétés mécaniques, stable dans les cultures à longue durée, biodégradable et peu coûteux. Son principal inconvénient est la variabilité de la structure de l'éponge d'une plante à l'autre. Certaines éponges peuvent être plus poreuses que d'autres selon les conditions de culture et l'état de la plante ce qui pourrait créer un problème de répétabilité dans les recherches impliquant ce matériau (Ignacio Moreno-Garrido, 2008, 2013). Chen et al. (2014) ont utilisé l'éponge de *Luffa cylindrica* pour immobiliser la microalgue *Scenedesmus obliquus* CNW-N afin d'éliminer le cadmium d'une solution aqueuse. Ferrando et Matamoros (2020) ont utilisé différents matériaux de support y compris l'éponge de *Luffa cylindrica* pour immobiliser un consortium de microalgues et de bactéries provenant de l'eau de canaux d'irrigation agricoles, pour atténuer les nitrates, les antibiotiques et les pesticides des eaux souterraines. D'autres chercheurs ont utilisé ce matériau pour l'immobilisation de la microalgue *Chlorella sorokiniana*, afin d'éliminer le nickel (II) et le chrome (III) des solutions aqueuses (Akhtar, Iqbal, & Iqbal, 2004; Nasreen Akhtar, Iqbal, Zafar, & Iqbal, 2008).

Le verre a aussi été utilisé comme support pour immobiliser les microalgues. Par exemple, dans des études d'écotoxicologie, Vrba (2021) a utilisé des lames de verre, immergées dans l'étang de Cestas pendant cinq mois pour collecter le biofilm (microalgues, de bactéries et de champignons). L'objectif de la recherche était d'étudier les effets du chlorure de benzalkonium (produit toxique) et de la lumière nocturne sur les biofilms aquatiques. Gaamoune (2018) a utilisé des lames de verre pour le développement de cyanobactéries, afin d'éliminer les le plomb et le cadmium des solutions aqueuses.

D'autres matériaux ont été utilisés par les chercheurs. À titre d'exemple, Gross, Henry, Michael, et Wen (2013) ont développé un système rotatif pour la culture des microalgues attachées afin de faciliter leur récolte. Dans cette étude, les cellules de la microalgue *Chlorella vulgaris* (UTEX #265) ont été cultivées à la surface d'un matériau tournant entre un milieu riche en nutriments essentiels à la croissance et une phase gazeuse riche en CO₂. Divers matériaux de fixation (immobilisation) de microalgues ont été testés : la fibre de verre, la fibre de verre armide, la fibre de verre revêtue de PTFE (PTFE : polytétrafluoroéthylène), la microfibre, l'étamine en mousseline, la toile de jute, la toile de peau de chamois, la peau de chamois synthétique, le velours, le conduit de coton, la vermiculite, le tyvek, l'acide polylactique, polyester et nylon laminé en vinyle. De tous ces matériaux, le conduit de coton a montré une excellente fixation des microalgues et une bonne durabilité à faible coût. Johnson et Wen (2010) ont testé différents matériaux comme support pour la fixation de *Chlorella* sp. cultivée dans les eaux usées de fumier laitier, afin de produire le biodiesel. Les matériaux testés sont : l'éponge de *Luffa*, le carton, la mousse de polystyrène, la mousse de polyuréthane, tissu paysager en polyéthylène et l'éponge de nylon. Parmi ces matériaux, la mousse de polystyrène a permis une meilleure fixation des microalgues. *Chlorella* sp. immobilisée dans la mousse de polystyrène a montré une production élevée de biomasse et un potentiel élevé pour la production de biodiesel en plus de son efficacité dans l'élimination de l'azote et du phosphore des eaux usées utilisées comme milieu de culture. Chen et al. (2020) ont montré que l'immobilisation de *Chlorella sorokiniana* AK-1 dans une éponge en polyuréthane a amélioré sa croissance et son efficacité dans le traitement des eaux usées des élevages porcins. Clares,

Guerrero, et García-González (2015) ont immobilisé la cyanobactérie *Anabaena* sp. ATCC 33047 dans la mousse de polyuréthane afin de l'utiliser dans l'élimination du cadmium des solutions aqueuses. Abe, Matsumura, Imamaki, et Hirano (2003) ont immobilisé la microalgue *Trentepohlia aurea* sur papier filtre pour éliminer l'azote du milieu de culture.

b) Techniques actives

Contrairement à l'immobilisation passive, l'immobilisation cellulaire active ne dépend pas de l'aptitude des cellules à s'attacher naturellement à des surfaces solides. Des méthodes spécifiques ont été développées par les chercheurs pour fixer les cellules sur un support ou les piéger dans une matrice (Ignacio Moreno-Garrido, 2013; Nghiem-Xuan, 2019). Les méthodes rapportées dans la littérature sont : l'attachement chimique, l'encapsulation, le piégeage dans un gel et la floculation. Bien que la floculation soit habituellement employée pour récolter les microalgues, les chercheurs la considère aussi comme une technique d'immobilisation (Martins et al., 2013; Ignacio Moreno-Garrido, 2008, 2013).

- **Attachement chimique (liaisons covalentes)**

Cette technique d'immobilisation repose sur la création de liaisons covalentes entre les cellules et le support par utilisation d'un agent liant (Martins et al., 2013). Contrairement à l'adsorption passive, l'immobilisation par liaisons covalentes permet de réduire la perte de cellules (détachement des cellules du support) et rend le procédé plus efficace (Millette, 2003). Toutefois, les agents utilisés pour la création de liaisons covalentes comme le glutaraldéhyde par exemple, sont souvent cytotoxiques (endommagent la paroi cellulaire), ce qui réduit la viabilité des cellules (Bouabidi et al., 2019; Martins et al., 2013; Ignacio Moreno-Garrido, 2008). Lobakova et al. (2017) rapportent que le support à base de polyéthylèneimine (PEI) réticulé avec l'épichlorhydrine était efficace pour l'immobilisation des microalgues *Nostoc muscorum* PCC 6310 et *Desmodesmus* sp. 3Dp86E. Toutefois, il est toxique pour les cellules. Une baisse considérable de l'activité photosynthétique de ces microalgues a été enregistrée.

Un autre exemple, Vasilieva et al. (2021) ont utilisé des supports à base de chitosane réticulé avec le glutaraldéhyde pour immobiliser les cellules de la microalgue *Lobosphaera* sp. IPPAS 2047 afin de l'utiliser dans le traitement des eaux usées synthétiques (élimination de l'azote et du phosphore). L'étude a montré que les supports utilisés étaient efficaces pour l'immobilisation de la microalgue. De plus, ils présentent une stabilité mécanique et biologique élevée dans les eaux usées et contrairement à ce qui a été rapporté dans la littérature sur la toxicité des agents de réticulation, cette étude rapporte que le chitosane réticulé avec le glutaraldéhyde n'a pas affecté la croissance et l'activité photosynthétique de la microalgue immobilisée et a amélioré son efficacité dans le traitement des eaux usées.

- **L'encapsulation**

L'encapsulation consiste à confiner les cellules de microalgues à l'intérieur d'une sphère creuse (capsule) dont la paroi est faite d'une membrane poreuse et semi-perméable. L'intérieur de la capsule est rempli avec un liquide, les microalgues peuvent alors flotter librement dans l'espace central. La semi-perméabilité de la membrane permet la circulation des nutriments mais empêche la fuite des cellules (Bou Saab, 2011; Bouabidi et al., 2019; Martins et al., 2013; Rolland, 2013). Les principaux inconvénients de cette technique sont la limitation de transfert de nutriments (la membrane peut constituer une barrière) et la fragilité des matériaux d'encapsulation (Bou Saab, 2011; Martins et al., 2013). Duliège (2017), par exemple, a cultivé la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* dans des capsules à cœur liquide et à membrane d'alginate pour produire des molécules à haute valeur ajoutée pour la cosmétique.

- **Piégeage dans un gel**

Cette technique a été largement utilisée pour immobiliser les microalgues. Le piégeage peut être réalisé dans des polymères synthétiques [polyacrylamide, alcool polyvinylique (PVA), polysulfone, résines, sel de sodium de carboxyméthylcellulose, gel de silice...], des protéines

[albumine, caséine, gélatine...] ou des polymères naturels [agars, carraghénanes, alginates et chitosane] (Kaparapu, 2017; Ignacio Moreno-Garrido, 2008). Les polymères utilisés ont généralement une structure poreuse, ce qui permet la diffusion des nutriments dans le gel (Bouabidi et al., 2019; Martins et al., 2013). La suspension de microalgues est d'abord mélangée avec le polymère, le mélange est ensuite solidifié pour former un gel. La gélification peut être réalisée par des traitements physiques comme la température ou chimiques comme l'utilisation de cations di ou multivalents (Kaparapu, 2017). La résistance mécanique du gel obtenu peut être influencée par de nombreux facteurs tels que la concentration en polymère, le mode de réticulation et la méthode de préparation (Hui, 2017).

Piégeage dans des polymères synthétiques

Aydinoğlu, Şen, Helvacioğlu, Nugay, et Nugay (2013) ont immobilisé la *Spiruline* dans le gel de polyacrylamide pour l'utiliser dans l'adsorption des métaux lourds de l'eau. La polymérisation de l'acrylamide était réalisée avec le *N, N'*-Méthylènebisacrylamide (BAAM) comme agent de réticulation. Encarnação, Palito, Pais, Valente, et Burrows (2020) ont immobilisé la microalgue *Nannochloropsis* sp. dans des billes d'alcool polyvinylique (PVA) afin d'éliminer des produits pharmaceutiques de l'eau. La gélification des billes de PVA était réalisée dans une solution saturée d'acide boronique et de chlorure de calcium (CaCl_2) à 2 %. Les chercheurs rapportent que le PVA avait un effet négatif sur la survie des microalgues immobilisées (les microalgues libres sont restées vivantes plus longtemps que les microalgues immobilisées). Jeong et Jang (2021) ont aussi utilisé le PVA pour immobiliser la microalgue *Chlorella sorokiniana*, afin d'éliminer les nutriments des eaux usées synthétiques. Dans cette, étude, des fibres optiques ont été ajoutées dans le PVA pour améliorer la pénétration de la lumière dans les billes. La gélification était réalisée dans une solution saturée d'acide borique (B(OH)_3) et de CaCl_2 à 1 %.

Erkaya, Arica, Akbulut, et Bayramoglu (2014) ont immobilisé *Chlamydomonas reinhardtii* dans des billes de carboxyméthylcellulose (CMC) pour l'élimination de l'uranium

d'une solution aqueuse. La gélification des billes était réalisée dans une solution de CaCl_2 0,2 M. Blanco, Sanz, Llama, et Serra (1999) ont piégé les cellules de la cyanobactérie *Phormidium laminosum* mortes dans le polysulfone et dans la résine époxy afin d'étudier sa capacité d'adsorption du Cu(II) , du Fe(II) , du Ni(II) et du Zn(II) des solutions aqueuses. La gélification des billes de polysulfone était réalisée dans l'éthanol à 50 % (v/v). Les billes de la résine époxy ont été durcies dans une solution de CaCl_2 à 2 % (m/v). La littérature rapporte que le polysulfone et la résine époxy sont toxiques pour les cellules et ne conviennent pas à l'immobilisation des microalgues vivantes (Kaparapu, 2017; Ignacio Moreno-Garrido, 2013).

La fixation des métaux lourds par les microalgues peut être réalisée par la biomasse vivante et non vivante. La biosorption des métaux se déroule en deux étapes : une première étape de fixation rapide, réversible et passive sur la paroi cellulaire des microalgues (les métaux lourds (chargés positivement) se lient aux groupes fonctionnels (chargés négativement) de la paroi cellulaire par des liaisons électrostatiques) suivie d'un processus actif irréversible et lent dans lequel, les métaux sont transportés à travers la membrane cellulaire au cytoplasme où ils seront liés aux composés intracellulaires. La première étape se déroule dans les microalgues vivantes et mortes, alors que la seconde se produit seulement dans les cellules de microalgues vivantes (Monteiro, Castro, & Malcata, 2012).

Sembiring (2012) a immobilisé la microalgue *Chetoceros* sp. dans le gel de silice, pour éliminer le plomb (Pb) d'une solution aqueuse. Adetya, Arifin, et Anggriyani (2021) ont aussi utilisé le gel de silice pour piéger *Spirulina* sp. afin d'éliminer le chrome (VI) d'une solution aqueuse. Après avoir mélangé les microalgues avec le gel de silice, le mélange est séché dans un four à 80 °C pour former de la silice sèche. Ahmed et al. (2018) ont immobilisé *Chlorella vulgaris* (CCAP 211/11b), *Euglena gracilis* (ALCP 217) et une cyanobactérie *Anabaena flos - aquae* (ALCP B24) dans le gel de silice pour les utiliser comme biocapteurs pour la détection des polluants toxiques en milieu aqueux.

Piégeage dans des protéines

Des protéines mélangées à des substances réticulantes ont été utilisées pour immobiliser les microalgues (Ignacio Moreno-Garrido, 2013). Jeanfils et Collard (1983) ont immobilisé *Scenedesmus obliquus* dans l'albumine sérique réticulée avec le glutaraldéhyde. Les chercheurs mentionnent que le glutaraldéhyde a inhibé l'activité photosynthétique de la microalgue. Chouteau, Dzyadevych, Chovelon, et Durrieu (2004) et Chong, Loh, Ang, et Ting (2008) ont immobilisé *Chlorella vulgaris* dans l'albumine de sérum bovin (BSA) réticulée avec du glutaraldéhyde afin de l'utiliser comme biocapteur. Seki et Suzuki (2002) ont immobilisé la microalgue marine *Heterosigma akashiwo* non vivante dans la caséine réticulée avec le glutaraldéhyde, pour l'adsorption des métaux lourds d'une solution aqueuse. Martin et al. (2021) ont utilisé la gélatine porcine pour co-immobiliser la microalgue *Marinichlorella kaistiae* KAS603 et la bactérie *Erythrobacter* sp. La co-culture de microalgues et de bactéries a favorisé la croissance des microalgues dans l'hydrogel. Pour la gélification du gel, le mélange de gélatine, microalgues et bactéries était versé dans des boîtes de Pétri et laissé à 18 °C pendant 1 h, ce qui a produit des gels d'environ 1 cm d'épaisseur.

Piégeage dans des polymères naturels

Les polymères naturels les plus fréquemment utilisés pour immobiliser les microalgues sont les polysaccharides d'algues (agars, carraghénanes et alginates) et le chitosane (Ignacio Moreno-Garrido, 2008). Des exemples d'immobilisation des microalgues dans ces polymères sont donnés dans les paragraphes qui suivent.

Les carraghénanes sont des polysaccharides extraits d'algues rouges, principalement des genres *Gigartina*, *Chondrus* et *Eucheuma*. Ils sont composés d'unités alternées d' α -D-galactopiranosose et de β -D-galactopyranose. Ils forment un gel en présence de composés cationiques comme les ions métalliques, les solvants organiques miscibles à l'eau, les amines

et les dérivés d'acides aminés (Ignacio Moreno-Garrido, 2008, 2013). Lau, Tam, et Wong (1997) ont immobilisé *Chlorella vulgaris* dans le gel de Kappa-carraghénane pour éliminer l'azote et le phosphore des eaux usées. Dans une autre étude, les mêmes chercheurs ont étudié les effets de l'immobilisation dans le gel de Kappa-carraghénane sur les activités physiologiques de *Chlorella vulgaris*. L'étude a montré que le gel de carraghénane n'avait aucun effet indésirable sur la croissance et la physiologie de la microalgue immobilisée (Lau, Tam, & Wong, 1998). D'autres chercheurs ont aussi immobilisé *Chlorella vulgaris* dans le gel de Kappa-carraghénane pour éliminer les colorants des eaux usées textiles (Chu, See, & Phang, 2009). Chevalier et de la Noüe (1985) ont immobilisé deux espèces de la microalgue verte d'eau douce *Scenedesmus* dans le gel de Kappa-carraghénane pour une utilisation dans le traitement des eaux usées. Cañizares et al. (1994) ont utilisé le gel de Kappa-carraghénane pour immobiliser *Spirulina maxima* pour le traitement des eaux usées porcines. Dans tous les exemples cités, la gélification du gel de carraghénane était réalisée dans une solution de KCl.

L'agar est le principal constituant de la gélose. Ce polysaccharide est obtenu de la paroi de certaines algues rouges, principalement des genres *Gelidium* et *Gracilaria* (Ignacio Moreno-Garrido, 2008, 2013). L'agar est constitué de deux polysaccharides, l'agarose et d'agaropectine. L'agarose représente 70 % du mélange [(Chaplin, 2007; United Nations Development Programme (UNDP) & Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1990)] et c'est un polymère linéaire formé d'unités répétitives d'un disaccharide composé de β -D-galactopyranose et de 3,6-anhydro- α -L-galactopyranose. L'agaropectine est un polysaccharide non gélifiant, de structure similaire à celle de l'agarose mais légèrement ramifiée et sulfatée. Il contient l'acide pyruvique et l'acide glucuronique (Chaplin, 2007; Fortier, 2022). L'agar est un gel thermoréversible, il se gélifie entre 35 et 40 °C et fond à environ 85 °C. La principale limitation de l'utilisation de la gélose pour l'immobilisation des microalgues vivantes est la température de l'agar. Lorsqu'il est mélangé avec la suspension de microalgues, les températures élevées pourraient altérer la viabilité des espèces non thermophiles (Ignacio Moreno-Garrido, 2008, 2013). La sélection des espèces aptes à résister à un choc thermique temporaire comme *Chlorella* et *Parachlorella*, *Dunaliella*,

Nannochloropsis et *Tetraselmis*, est nécessaire dans ce procédé d'immobilisation (Kandilian, Jesus, Legrand, Pilon, & Pruvost, 2017). Lebeau, Gaudin, Junter, Mignot, et Robert (2000) ont piégé la diatomée marine *Haslea ostrearia* dans le gel d'agar pour une production continue de marennine (pigment bleu-vert d'intérêt biotechnologique). D'autres exemples, Kandilian et al. (2017) ont immobilisé les cellules de *Parachlorella kessleri* dans le gel d'agar. L'objectif de l'étude était la modélisation du transfert de la lumière dans les photobioréacteurs à cellules immobilisées. Hu, Liu, Shukla, Lin, et Luo (2020) ont immobilisé *Chlorella saccharophila* FACHB-4 pour éliminer l'azote et le phosphore des eaux usées synthétiques.

Le chitosane est un polymère naturel composé d'unités répétitives de D-glucosamine et N-acetyl-D-glucosamine. Il est obtenu par désacétylation partielle de la chitine. La désacétylation permet d'enlever suffisamment de groupes acétyl (CH₃-CO) de la chitine pour permettre à la molécule d'être soluble dans les acides (la chitine est insoluble dans les acides contrairement au chitosane qui est soluble) (Blouin et al., 2002). La gélification du chitosane est produite dans une solution d'anions multivalents (Willaert, 2011). Le chitosane a été utilisé pour immobiliser plusieurs espèces de microalgues telles que *Scenedesmus bicellularis* (Kaya & Picard, 1996), *Scenedesmus obliquus* (Fierro, del Pilar Sánchez-Saavedra, & Copalcua, 2008) et *Synechococcus elongatus* (Aguilar-May & del Pilar Sánchez-Saavedra, 2009) pour des utilisations dans le traitement des eaux usées.

Les alginates

Le piégeage dans des billes d'alginate est la méthode la plus largement utilisée pour immobiliser les microalgues. Le gel d'alginate offre plusieurs avantages comme sa transparence élevée à la lumière, ce qui permet de maintenir l'activité photosynthétiques des microalgues et une perméabilité assurant la diffusion des éléments essentiels à la croissance. Il n'est pas toxique pour les cellules et en plus, sa gélification n'est pas dépendante de la

température, ce qui permet de conserver la viabilité des microalgues immobilisées (Bouabidi et al., 2019; Lam & Lee, 2012b; Ignacio Moreno-Garrido, 2013).

Les alginates sont des polysaccharides extraits d'algues brunes, principalement des espèces *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria japonica*, *Macrocystis pyrifera*, *Fucus serratus*, *Ascophyllum nodosum*, *Lessonia nigrescens* et *Durvillea antarctica*, *Durvillea potarum* (Gbassi, 2010; Ignacio Moreno-Garrido, 2008). Ils peuvent être obtenus aussi de certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* (Ignacio Moreno-Garrido, 2013). Ce sont des polymères linéaires composés d'acide α -L- guluronique (G) et d'acide β -D- mannuronique (M) liés par des liaisons glycosidiques β (1-4). Ces monomères apparaissent dans la chaîne d'alginate par blocs, avec des séquences alternées et non de manière aléatoire (Figure 2.21) (Gbassi, 2010; Storz, Zimmermann, Zimmermann, & Kulicke, 2010). Les propriétés gélifiantes des alginates dépendent de la proportion des blocs G et des blocs M dans le polymère. Le rapport M/G varie selon l'espèce, la partie de l'algue, la saison de récolte, l'âge de l'algue et son habitat (Storz et al., 2010; Vincent, 2010). À l'exception de *Laminaria Hyperborea* qui produit un alginate avec un rapport M/G < 1 ($\approx 0,45$), toutes les autres espèces d'algues brunes produisent des alginates avec un rapport M/G situé entre 1,0 et 3,5 (Gbassi, 2010). Un rapport M/G élevé donne un gel mou et élastique, alors qu'un faible rapport M/G donne un gel dur et cassant (Rolland, 2013).

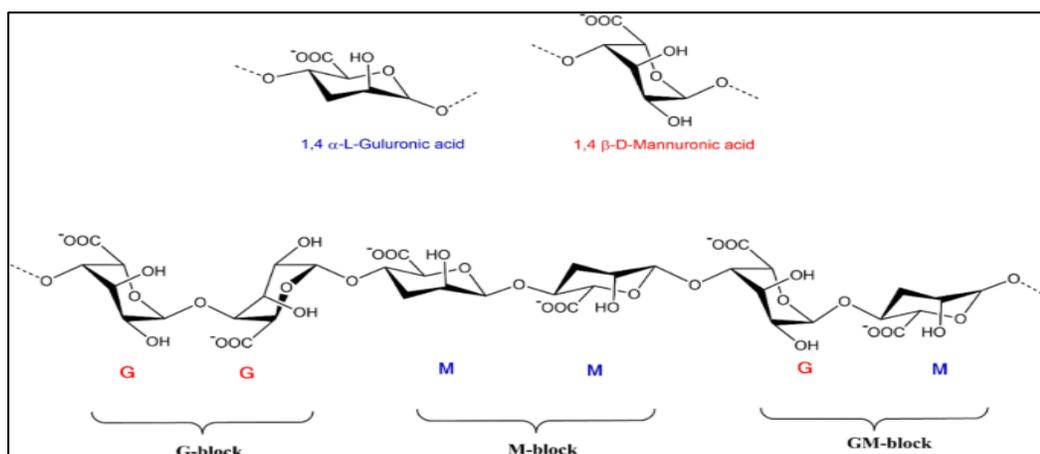


Figure 2.21 Distribution des monomères G et M dans la chaîne d'alginate
Tirée de Abasalizadeh et al. (2020)

Les alginates forment un gel ionique en présence de certains cations. La force de liaison varie selon l'affinité de l'alginate pour le cation impliqué et elle est dans l'ordre suivant : $Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Fe > Ni, Co > Zn > Mn$. L'utilisation des cations Pb, Cu, Cd, Ba et Sr est limitée en raison de leur toxicité. Le Ca n'est pas toxique et c'est la raison pour laquelle la gélification des alginates est couramment décrite avec ce cation (Ching et al., 2017). La suspension de microalgues est d'abord mélangée avec la solution d'alginate, puis, le mélange est introduit dans une seringue et injecté dans une solution de $CaCl_2$. Les gouttes forment instantanément des billes, piégeant les cellules de microalgues au sein d'un réseau tridimensionnel d'alginate réticulé ioniquement (Willaert, 2011). Selon ce qui a été rapporté dans la littérature, la concentration en alginate dans les billes n'est pas homogène. Cette concentration augmente du centre vers la surface des billes (Millette, 2003). En effet, la diffusion des cations Ca^{2+} produit la gélification des billes de l'extérieur vers l'intérieur. L'alginate a donc tendance à se déplacer vers la zone de gélification ce qui explique le gradient de concentration en alginate établi à l'intérieur des billes (Vincent, 2010). La Figure 2.22 présente le mécanisme de gélification de l'alginate en présence de cations Ca^{2+} .

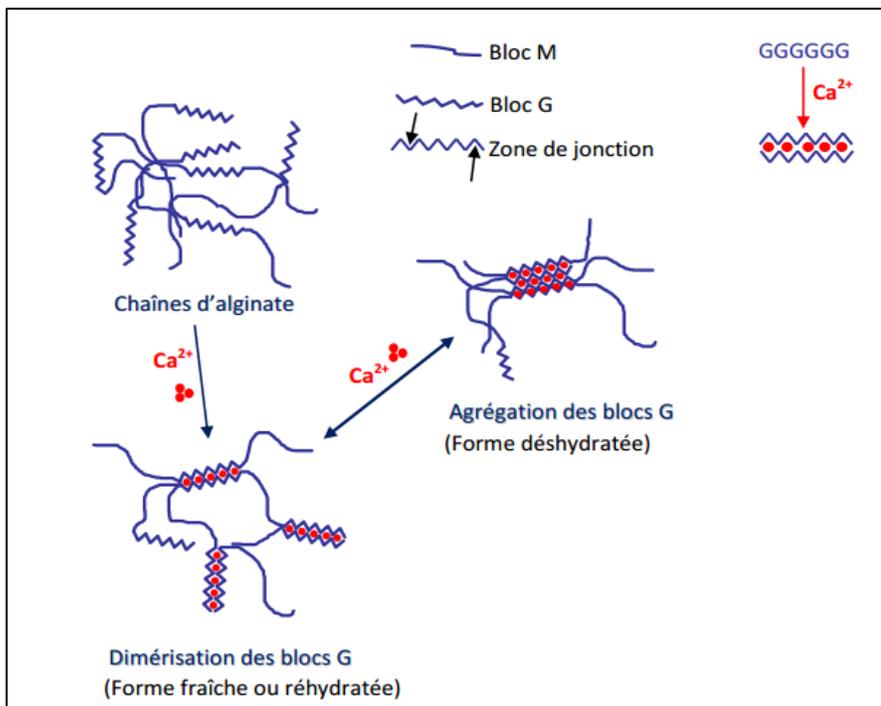


Figure 2.22 Étapes de gélification de l'alginate en présence de Ca^{2+}
Tirée de Gbassi (2010)
(Reproduite avec permission)

La gélification de l'alginate se fait en deux étapes et n'implique que les blocs G du polymère (Gbassi, 2010). Dans la première étape, deux blocs G de deux chaînes adjacentes se lient par des cations Ca^{2+} . Lorsque deux blocs G se trouvent face à face, leur conformation forme des cavités dans lesquelles sont piégés les cations Ca^{2+} . Ces derniers interagissent avec les groupes carboxyliques COO^- des G (interaction électrostatique) (Rolland, 2013; Vincent, 2010). La fixation des cations Ca^{2+} entre deux blocs G se fait de façon coopérative, la fixation d'un cation Ca^{2+} facilite la capture d'un second, et ainsi de suite. Cette première étape mène à la dimérisation de tous les blocs G. La seconde étape consiste à l'agrégation des blocs G dimérisés (Gbassi, 2010). Cet enchaînement organisé, connu sous le nom structure type « boîte d'œufs », donne lieu à la formation d'un réseau tridimensionnel (Rolland, 2013; Vincent, 2010). Le principal inconvénient du gel d'alginate est sa sensibilité aux agents chélateurs comme l'EDTA, phosphate, citrate, etc (Willaert, 2011). L'agent chélateur déplace les ions Ca^{2+} conduisant à une répulsion électrostatique entre les chaînes d'alginate, ce qui augmente son instabilité et provoque sa dissolution (Vincent, 2010; Voo et al., 2015). La présence des agents chélateurs en concentration élevée dans le milieu de culture peut causer la dissolution des billes et par conséquent, la libération des microalgues dans le milieu de culture. Toutefois, ce problème peut être résolu en ajustant les concentrations en alginate et en CaCl_2 pour l'obtention d'un niveau de stabilité des billes élevé. Aussi la présence des ions Ca^{2+} libres dans le milieu de culture peut empêcher la dissolution des billes (Vincent, 2010).

Dans le commerce, on trouve plusieurs variétés d'alginate comme l'alginate de sodium, l'alginate de calcium, l'alginate de magnésium, l'alginate de potassium, etc (Vincent, 2010). La solubilité de ces alginates dans l'eau dépend du cation lié aux groupements carboxyliques des acides qui les composent (Wordpress, 2016). En effet, dans le procédé d'extraction de l'alginate d'une algue brune, ce dernier est transformé en acide alginique qui est insoluble dans l'eau (Vincent, 2010). Pour le solubiliser, un sel alcalin est ajouté à la solution comme le chlorure de sodium et le chlorure de calcium. Selon le minéral alcalin ajouté, on obtient l'alginate de sodium, de calcium, etc. Les alginates de sodium, magnésium et potassium sont solubles dans l'eau et donnent des solutions visqueuses alors que les alginates de calcium sont solubles uniquement en milieu basique (Wordpress, 2016).

L'immobilisation des microalgues dans des billes d'alginate a été largement utilisée dans des études ayant pour objectif le traitement des eaux usées et l'élimination des composés toxiques des solutions aqueuses (Adam, Kumar, Santhanam, Kumar, & Prabhavathi, 2015; Dinesh Kumar et al., 2018; El-Sheekh et al., 2017; Kadimpati, Mondithoka, Bheemaraju, & Challa, 2013; Kiani, Ullah, Javaid, Islam, & Younas, 2021; Nazos & Ghanotakis, 2021). Pour cette application, le piégeage dans le gel d'alginate permet non seulement de faciliter la récolte des microalgues mais aussi permet de les protéger des composés toxiques présents dans les eaux usées ce qui augmente leur efficacité d'élimination des contaminants par rapport aux microalgues libres (Bouabidi et al., 2019; El-Sheekh et al., 2017). Toutefois, peu de travaux ont été publiés concernant la culture des microalgues dans des billes d'alginate pour la production de biocarburants, notamment le biodiesel. Les informations sur ce sujet sont dispersées dans la littérature (Cao et al., 2022; Kiani et al., 2021; Srinuanpan et al., 2019).

L'alginate peut être combiné avec d'autres polymères pour immobiliser les microalgues. Par exemple, Ozer et al. (2012) ont immobilisé les cellules de *Pediastrum boryanum* dans des billes d'alginate et des billes d'alginate-gélatine pour l'absorption du chrome (VI) d'une solution aqueuse. Les résultats ont montré que le meilleur taux d'absorption a été obtenu avec les microalgues piégées dans les billes d'alginate-gélatine. Castro et Ballesteros (2020) ont piégé les cellules de *Chlorella vulgaris* dans des billes d'alginate-chitosane afin d'éliminer les nutriments des eaux usées synthétiques de l'aquaculture. Rushan et al. (2020) ont immobilisé *Chlorella vulgaris* dans divers systèmes matriciels pour évaluer sa production d'huile et son potentiel pour la production de biodiesel. Six systèmes ont été développés par les chercheurs : billes d'alginate de sodium, alginate de sodium-chitosane, alginate de sodium- carraghénane, alginate de sodium-gélatine, alginate de sodium-alginate de calcium et alginate de sodium-carboxyméthylcellulose sodique. Le rendement en huile le plus élevé a été obtenu avec les microalgues immobilisées dans des billes d'alginate-gélatine. La combinaison de ces deux polymères a conduit à la formation d'un grand nombre de pores de grande taille à la surface des billes, ce qui a favorisé le transfert de nutriments et de CO₂ aux microalgues à l'intérieur des billes.

L'immobilisation des microalgues dans des billes hybrides alginate-silice a aussi été étudiée par les chercheurs, notamment pour le développement de biocapteurs (Ferro, Perullini, Jobbagy, Bilmes, & Durrieu, 2012; Gosset, 2018; Perullini, Ferro, Durrieu, Jobbagy, & Bilmes, 2014). L'immobilisation est réalisée en deux étapes : la première consiste à piéger les microalgues dans des billes d'alginate, la seconde consiste à emprisonner les billes d'alginate dans le gel de silice. Cette méthode offre plusieurs avantages. En effet, le gel de silice permet de protéger l'alginate des agents chélateurs qui pourraient entraîner sa dissolution. L'alginate quant à lui permet de protéger les microalgues de la toxicité de la silice. Cette double encapsulation permet d'augmenter la porosité des billes et leur stabilité mécanique et chimique. Ainsi, les billes possèdent une bonne qualité optique grâce à la transparence élevée des hydrogels, ce qui favorisera d'avantage la croissance des microalgues (Gosset, 2018).

Il existe d'autres méthodes d'immobilisation des microalgues dans le gel d'alginate à part le piégeage dans des billes. Par exemple, Twist, Edwards, et Codd (1997) ont immobilisé *Scenedesmus subspicatus* dans un film d'alginate pour la conception d'un biocapteur pour l'évaluation de l'eutrophisation dans les eaux de surface courantes. Dans cette étude, la suspension de microalgues était mélangée avec la solution d'alginate de sodium ensuite, le mélange a été étalé finement sur une nappe en nylon en utilisant une spatule en plastique et laisser pendant cinq minutes dans une solution de CaCl_2 afin de durcir. Frense, Müller, et Beckmann (1998) ont aussi immobilisé *Scenedesmus subspicatus* pour la conception d'un biocapteur. Les cellules de la microalgue ont été immobilisées sur des disques de papier filtre (suite à une filtration) puis elles ont été recouvertes d'une fine couche d'alginate durcie avec le CaCl_2 .

CHAPITRE 3

MÉTHODOLOGIE

L'organigramme de la Figure 3.1 illustre les méthodes employées dans les expériences d'immobilisation de *R. subcapitata* dans des billes d'alginate et de production de lipides.

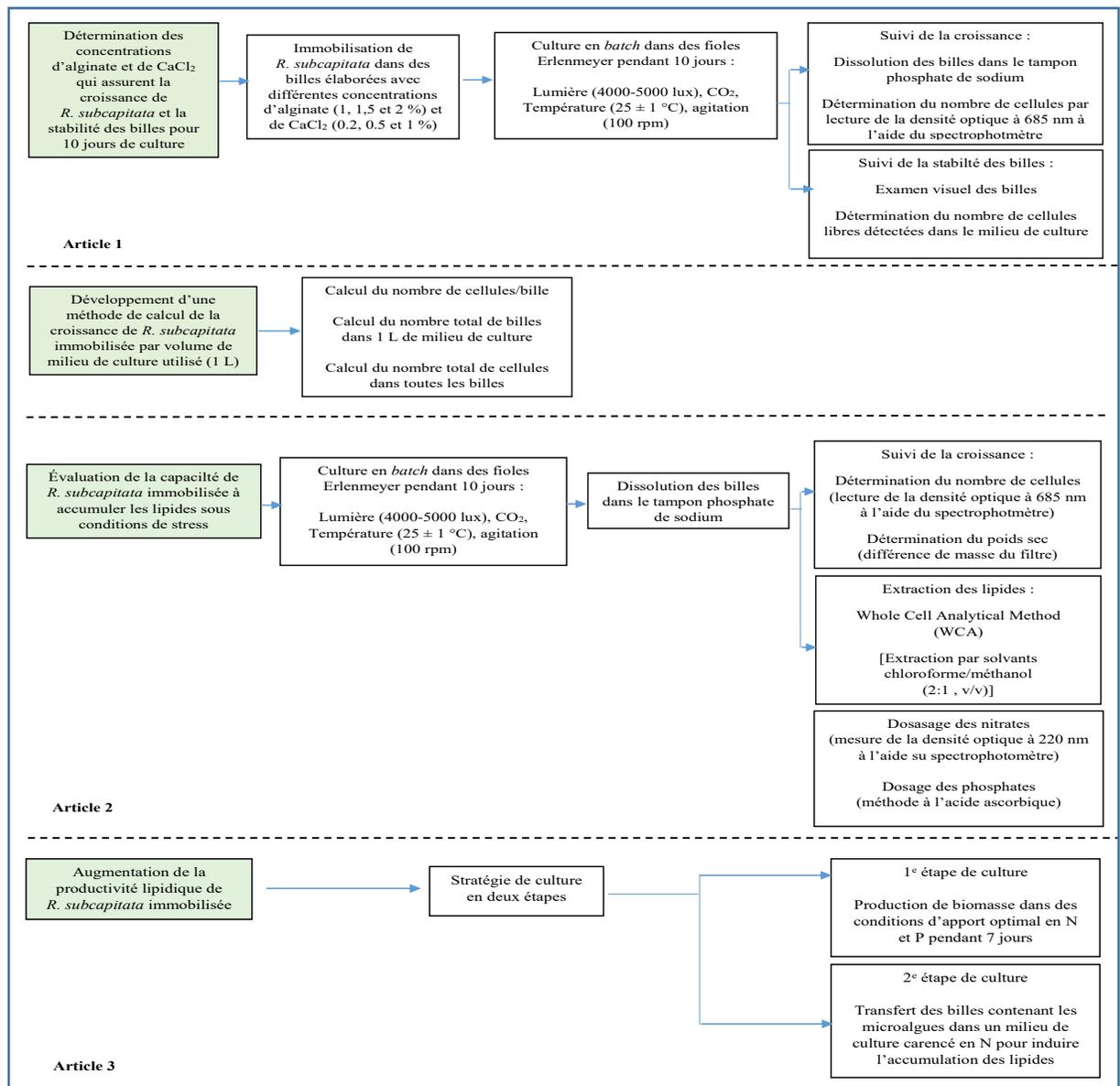


Figure 3.1 Organigramme illustrant les méthodes utilisées dans les expériences d'immobilisation de *R. subcapitata* et de production de lipides

CHAPITRE 4

ARTICLE 1 : OPTIMISATION OF GROWTH OF *RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA* IMMOBILIZED FOR BIOFUEL PRODUCTION: INFLUENCE OF ALGINATE AND CaCl₂ CONCENTRATIONS ON GROWTH

Amel Benasla * and Robert Hausler

Station Expérimentale des Procédés Pilotes en Environnement, École de technologie supérieure, Université du Québec,
1100, rue Notre-Dame Ouest Local A-1500, Montréal, QC H3C 1K3, Canada

Article publié dans « Environments », mai, 2018

4.1 Avant-propos

Dans ce premier article, les effets de différentes concentrations en alginate et en CaCl₂ sur la stabilité des billes et la croissance de la microalgue *Raphidocelis subcapitata* immobilisée sont étudiés. L'objectif est de déterminer les concentrations en ces deux éléments qui favorisent la croissance de la microalgue et assure la stabilité des billes pour 10 jours de culture. L'article a une structure classique tout comme les deux autres articles présentés dans cette thèse. Il présente un résumé exposant l'objectif et les principaux résultats du travail, suivi d'une introduction qui fournit une brève revue de littérature. La méthodologie utilisée pour l'immobilisation de la microalgue et le calcul des paramètres de culture est ensuite décrite. Enfin, les résultats sont présentés et discutés, suivis de la conclusion.

L'article présente aussi un résumé graphique qui est une illustration du sujet de recherche. Il est présenté en Annexe I (Figure-A I-1).

4.2 Abstract

The growth of the green microalga *Raphidocelis subcapitata* in sodium alginate beads was studied. The beads were generated by the extrusion technique, which was followed by gelling in a Ca^{2+} solution. The alginate concentrations studied were 1 %, 1.5 % and 2 % (w/v), while the concentrations of CaCl_2 were 0.2 %, 0.5 % and 1 % (w/v). The growth monitoring of the cells in the beads was performed by dissolving the gel in a sodium phosphate buffer and reading the optical density at 685 nm using a spectrophotometer. The results clearly showed that alginate and divalent Ca^{2+} ions do not contribute directly to the growth of microalgae but play a decisive role in preserving the integrity of the beads and protecting them from shrinkage. Furthermore, they have an important role in the transfer of nutrients, light and CO_2 in the beads. The highest growth ($3.92 \times 10^6 \pm 0.39$ cells/bead) was obtained with the concentrations of alginate being 1.5 % and CaCl_2 being 0.2 %. However, the beads began to shrink and resulted in the cells being released into the culture medium after the 8th day. Of all the combinations studied, the combination of 2 % alginate and 1 % CaCl_2 was the best because it ensured the stability of the beads during the 10 days of culture and resulted in a low concentration of free cells detected in the culture medium. These concentrations were determined as the optimal conditions for the immobilization of microalgae and will be used in the following work.

Keywords : Alginate; CaCl_2 ; beads; *Raphidocelis subcapitata*; growth

4.3 Introduction

Climate change is the result of the industrialization of the planet and the massive use of fossil fuels (André, 2003; Labriet, Waaub, & Prades, 2000; Lorius, 2003; Petit, 2001; Tissot, 2001). This issue has stimulated the development of alternative and renewable energy sources, such as microalgae biomass (Chisti, 2007; Gavrilescu & Chisti, 2005). Attention has been drawn to using microalgae for the production of biofuels for many reasons, including rapid growth and high lipid productivity. Some species can double their biomass 1–3 times in 24 hours (Khan, Rashmi, Hussain, Prasad, & Banerjee, 2009). Under certain conditions, they can accumulate 40–60 % of their dry weight in fatty acids (Brennan & Owende, 2010), value in a very effective

way the CO₂ (1.83 kg CO₂/kg dry weight) (Lam & Lee, 2012b). Furthermore, their cultivation does not require the exploitation of agricultural land, unlike the production of biofuels from terrestrial cultures (Cantin, 2010). Dry biomass can be used to produce direct combustion energy (Kadam, 2002), while the recovered heat can produce steam to activate turbines and generate electricity. The pyrolysis and the gasification of the microalgae make it possible to obtain the coal and the synthesis gas separately (Doré-Deschênes, 2009). The latter can serve in turn to produce methanol, ethanol, dimethyl ether (DME), synthetic natural gas (SNG) and hydrogen (Molino, Larocca, Chianese, & Musmarra, 2018). By biochemical conversion, methane and ethanol can be produced from anaerobic biomass bio-anaerobic digestion or the fermentation of sugars accumulated in the cell (Sialve et al., 2009). This conversion system also allows for the production of hydrogen, with some microalgae having the capacity to produce hydrogen through enzymes, such as hydrogenases, during photosynthesis (Carver, Hulatt, Thomas, & Tuovinen, 2011; Mussnug, Klassen, Schlüter, & Kruse, 2010). Finally, biodiesel can be obtained as follows (Scott et al., 2010). First, the autotrophic culture requires a light source, CO₂ and nutrients. The culture is optimized according to the selection of a strain, which involves adjustment of the culture conditions and promotion of the accumulation of lipids in the form of triglycerides. After this, the biomass is harvested and concentrated. Finally, the lipids are extracted and converted into biodiesel by a transesterification reaction. In this reaction, the triglycerides react with an alcohol, which is usually methanol, to form fatty acid esters (biodiesel) and glycerol as a by-product.

Microalgae harvesting is a limiting step in the production of biofuels. According to some estimates, this accounts for 20–30 % of the total cost of producing biodiesel (Pienkos & Darzins, 2009). These high costs are due to their very small diameter (2–20 µm in diameter) among other factors (Lam & Lee, 2012b). Centrifugation is the most frequently used method for separating cells from water (Suali & Sarbatly, 2012). However, it is a very energy-intensive technique and therefore, contributes to an increase in the energy balance of the production process using algal biofuels (Sander & Murthy, 2010). More economical and more efficient methods of biomass concentration, such as the immobilization of microalgae in natural polysaccharides, such as alginates, carrageenans and agars, are currently being

investigated worldwide. The latter has the advantage of non-toxicity, biocompatibility, biodegradability and light transparency, which maintain the photosynthetic activity of the algae (Cao, Liu, Cheng, Jing, & Xu, 2010; Moreira et al., 2006; Ignacio Moreno-Garrido, 2008). Because of the particularly mild gelation conditions, alginates are the most favorable (Dulieu, Poncelet, & Neufeld, 1999). Alginate is a polycarboxylate extracted from brown algae, which gels by cationic bridging in the presence of multivalent ions, such as CaCl_2 (Draget, Steinsvåg, Onsøyen, & Smidsrød, 1998).

Although the immobilization of the photosynthetic microalgae in alginate beads has been the subject of previous studies (Antal et al., 2016; Lopez, Hernandez, Bashan, & de-Bashan, 2017; Moreira et al., 2006; Ignacio Moreno-Garrido, 2008; Moreno-Garrido et al., 2005; Ruiz-Marín & Mendoza-Espinosa, 2008), a perfect mastery of this technology has not been achieved since it partially depends on the type of microorganism and its conditions of culture. In addition, it should be noted that the immobilization within matrices often causes limitations in the material transfer (Amsden, 1998). It is with this in mind that this study was undertaken. The main objective of this present study is to optimize the growth of *Raphidocelis subcapitata* in the alginate gel. This species has many advantages. Due to its high lipid productivity, it holds good potential in the field of energy-rich biomass (Gonçalves et al., 2013; Patil et al., 2007). Moreover, by fixing the CO_2 in the form of organic matter due to its luminous energy, it is a potential candidate for decreasing CO_2 in the atmosphere (Pires, Gonçalves, Martins, Alvim-Ferraz, & Simões, 2014). For this, we initiated the research by evaluating the effects of alginate and CaCl_2 concentrations on the growth of the algae. The results obtained would allow us to determine the optimal conditions of immobilization for obtaining an important quantity of microalgae in order to produce the biodiesel.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Chemicals and reagents

Sodium alginate from the brown algae (No. 71238) was used in this study for the formulation of beads. It was supplied by Sigma-Aldrich®.

Calcium chloride dihydrate $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (No. 700912) was chosen to constitute the gelling medium. The divalent Ca^{2+} cation has a high affinity for polysaccharides of negative charges (Draget et al., 1998; Khromova, 2006; Panouillé & Larreta-Garde, 2009; Smrdel, Bogataj, Zega, Planinšek, & Mrhar, 2008) compared to all monovalent cations. It was supplied by Anachemia.

Sodium phosphate monobasic dihydrate $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (No. 71505) and sodium phosphate dibasic dihydrate $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (No. 71643) were used to prepare the sodium phosphate buffer for dissolving the beads. They were obtained from Sigma-Aldrich®.

Distilled water was used for the various manipulations.

4.4.2 Microalga and culture medium

The unicellular green algae *Raphidocelis subcapitata* was obtained from the Environment Canada Laboratory. The cells were conserved and grown in a medium (Centre des sciences et technologies environnementales, 2007) with five nutrient mother solutions having the following composition (per liter) : (1) 25.5 g NaNO_3 ; (2) 14.7 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; (3) 1.044 g K_2HPO_4 ; (4) 15 g NaHCO_3 ; (5) 10 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 4.4 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.185 g H_3BO_3 ; 0.416 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 3.28 mg ZnCl_2 ; 0.16 g FeCl_3 ; 1.428 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 7.26 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.012 mg CuCl ; and 0.3 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. From each solution, 10 mL was taken and placed in an Erlenmeyer flask, before the volume was brought to 1 liter by the addition of distilled water. The pH of the medium was adjusted to 7.5. The culture medium was autoclaved at 121 °C for 20 min.

4.4.3 Algae immobilization

The immobilization of *R. subcapitata* cells in alginate beads was carried out according to the method of Moreira Dos Santos, Moreno-Garrido, Gonçalves, Soares, et Ribeiro (2002), with some modifications in the alginate/NaCl ratio. A pellet of microalgae resulting from the concentration of 100 mL of exponential growth cell density growth of about 10^7 cells/mL was

washed three times in sterile saline water (0.85 %), with centrifugation of the sample between each wash (4000 rpm, 4 °C for 10 minutes). The cells were resuspended in 50 mL of sterile saline (0.85 %). After this, the algae suspension was mixed with 50 mL of the sodium alginate solution at the final concentrations of 1 %, 1.5 % and 2 %, which was previously sterilized by autoclaving (120 °C, 20 min), and gently homogenized. Each mixture was dripped from a 20 mL syringe equipped with a 0.9 × 40 mm G needle (Braun, Melsungen, Germany) in CaCl₂ solutions at the final concentrations of 0.2 %, 0.5 % and 1 %. These were previously sterilized by autoclaving (121 °C, 20 min), with gentle and constant agitation. The beads obtained were left in the CaCl₂ solution for 30 minutes to complete the gelation reaction. After this, they were collected in a sterile metal sieve and then rinsed with sterile distilled water.

4.4.4 Culture conditions

Cultures were performed in 2-L Erlenmeyer flasks, which were sterilized by the autoclave (121 °C, 20 min). The beads containing the microalgae were aseptically introduced into 1 L of sterile culture medium. A thermoregulated chamber equipped with a stirring table (INFORS HT Ecotron) was used to provide standard culture conditions at a certain temperature (25 ± 1 °C) and level of agitation (100 rpm). The light was provided by a white fluorescent lamp (KF15T8CW-PROJECT PAK 15W) placed vertically in the cultures, providing illumination of 4000–5000 lux (light quantum flux of approximately $56 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$). The cultures were incubated under a photoperiod of 24 hours of light for 0 hours of darkness (24/0; L/D). The contribution of CO₂ was provided by an air pump (MARINA 300). The cultures were strongly bubbled (145 L of air/liter of culture/hour). The air was filtered through a 0.45- μm porosity filter (Fischer Scientific).

4.4.5 Growth monitoring

The growth monitoring of the cells immobilized on the beads requires the prior dissolution of the gel. In this study, the sodium phosphate buffer was used to dissolve the beads, while the ion exchange between the Na²⁺ ions present in the buffer solution and the Ca²⁺ ions that were bound to the alginate leads to the destruction of the gel. During the ion exchange process, the

content of free carboxylate anions in the gel increases, which leads to electrostatic repulsion between the alginate chains, causing relaxation of the chain. The beads begin to disintegrate when the alginate networks are unable to retain the structure and finally, they dissociate (Voo et al., 2015). Each day, the ten beads of each formula were removed aseptically from the Erlenmeyer flask and placed in 4 mL of sodium phosphate buffer (pH = 6.0), which was previously sterilized by autoclaving. This achieved a final concentration of 50 mM. After this, they were incubated at room temperature for 4 hours. The number of cells was determined by measuring the optical density at 685 nm using a spectrophotometer (Varian Cary 300 bio visible UV spectrophotometer). The relationship between OD_{685} (y) and cell concentration (x) of *R. subcapitata* was established by a linear regression: $y = 0.3572x$ ($R^2 = 0.9978$). The experiment was stopped when the stationary phase was reached.

4.4.6 Calculation of growth rate and generation time

The growth rate was calculated as follows (Clément-Larosière, 2012). The culture of microalgae was carried out in *batches*. In this case, a material balance between the instants t and $t+dt$ gives :

$$VdX = rVdt \quad (4.1)$$

Where :

V = volume of culture (mL)

r = growth rate (cell/mL/d)

X = cell concentration (cell/mL)

The growth rate of microalgae is given by the model:

$$R = \mu X \quad (4.2)$$

With :

μ = specific growth rate (day^{-1})

Using Eq. 3.2, we obtain the following :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (4.3)$$

If we consider all the culture phases, μ is not constant. However, in the exponential phase, μ is optimal and constant. This results in :

$$\frac{dX}{X} = \mu dt \quad (4.4)$$

By integrating Eq. 3.4, we obtain the following :

$$\text{Ln} \frac{X}{X_0} = \mu(t - t_0) \quad (4.5)$$

where :

t_0 : initial time

X_0 : cell concentration corresponding to t_0

The generation time is the time needed to double a population. It was calculated according to the following formula (Clément-Larosière, 2012) :

$$G = \text{Ln}2/\mu \quad (4.6)$$

where G is the generation time (day); Ln is the natural logarithm; and μ is the specific growth rate (day^{-1}).

4.5 Results and discussion

4.5.1 Beads analysis

Before immobilizing the microalgae, we first sought to determine the concentrations of polymers and gelling agents for generating macroscopically homogeneous beads. For this, alginate and CaCl₂ concentrations were chosen arbitrarily and the ball manufacturing tests were performed. The results obtained are summarized in Table 4.1, which were the average from three replicate experiments.

Tableau 4.1 Size of beads (mm) versus alginate and CaCl₂ concentrations

Alginate % (w/v)	CaCl ₂ 0.2 % (w/v)	CaCl ₂ 0.5 % (w/v)	CaCl ₂ 1 % (w/v)
1.0	3.0 ± 0.2	2.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1
1.5	3.5 ± 0.2	3.0 ± 0.1	2.5 ± 0.1
2.0	3.8 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.0 ± 0.1
2.5	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.5 ± 0.2
3.0	-	-	-

Increasing the alginate concentration and decreasing the CaCl₂ concentration increases the size of the beads (Figure 4.1).

It has been found that both constituents (alginate and CaCl₂) generated beads regardless of their concentrations, except for the 3 % alginate solution (m/v). At this concentration of alginate solution, the formation of beads was almost impossible because the dissolution of alginate in water was very difficult even with the heating. The 2.5 % alginate solution generated beads of larger diameters than the other concentrations. However, the high viscosity of this solution interfered with its flow and high pressures were applied to make the beads. In addition, the latter had a non-regular shape. In view of these results, the 2.5 % and 3 % alginate concentrations were considered unsuitable for the elaboration of the beads and were therefore not used in the following experiments.

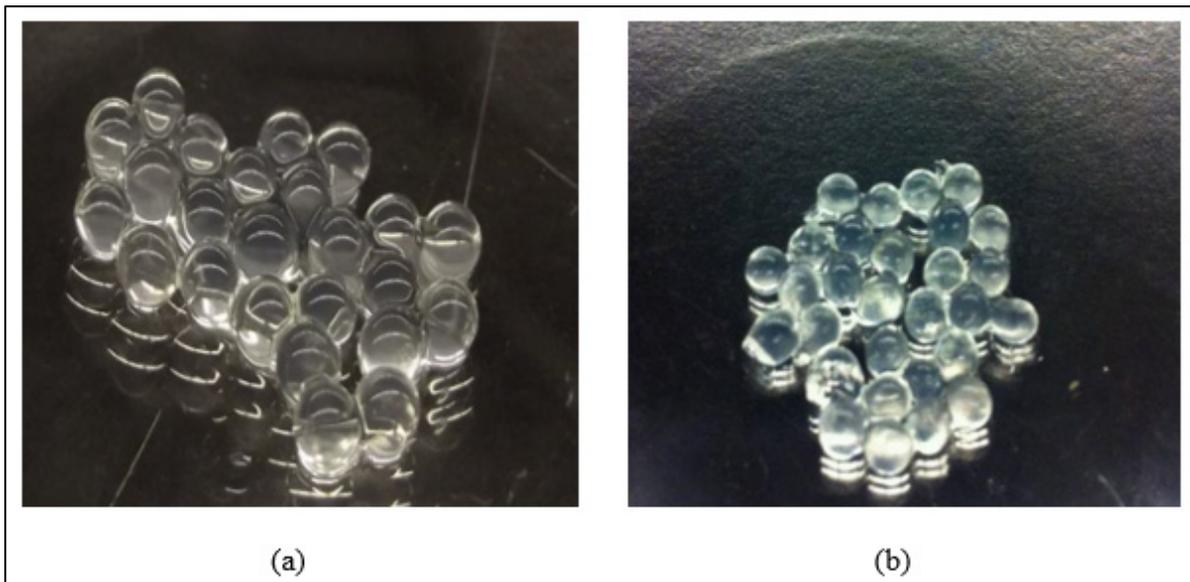


Figure 4.1 Macroscopic appearance of the sodium alginate beads with the following concentrations of : (a) 2 % alginate and 0.2 % CaCl₂; and (b) 1 % alginate and 1 % CaCl₂

These observations are consistent with the findings of other articles. In 1985, Boyaval et al. (Boyaval, Lebrun, & Goulet, 1985) obtained beads with a diameter of 3.5 mm using a concentration of 2.5 % alginate and 0.5 % CaCl₂. This present study reports a slightly higher value of 3.8 ± 0.2 mm for the same concentrations of alginate and CaCl₂. Other authors obtained lower average diameters of 2.5 mm (Prevost, Divies, & Rousseau, 1985) and 2.6 mm (Prevost & Divies, 1987). The differences observed with the literature could be attributed to the types of alginates and extrusion devices used.

4.5.2 Effects of alginate and CaCl₂ concentrations on *R. subcapitata* growth

Figure 4.2 shows the evolution of the cellular concentrations of *R. subcapitata* in the alginate beads along the batch culture, according to the different concentrations of alginate and CaCl₂ studied, over a period of 10 days. The experiments were performed in duplicate. The initial concentrations of microalgae cells, which varied between $2.6 \times 10^5 \pm 0.26$ and $3 \times 10^5 \pm 0.3$ cells/bead, were recorded inside the beads for all formulations. After a lag phase of 3 days, the OD_{685nm} measured using the spectrophotometer revealed a significant increase in the microalgae concentrations inside the beads made from all the formulations.

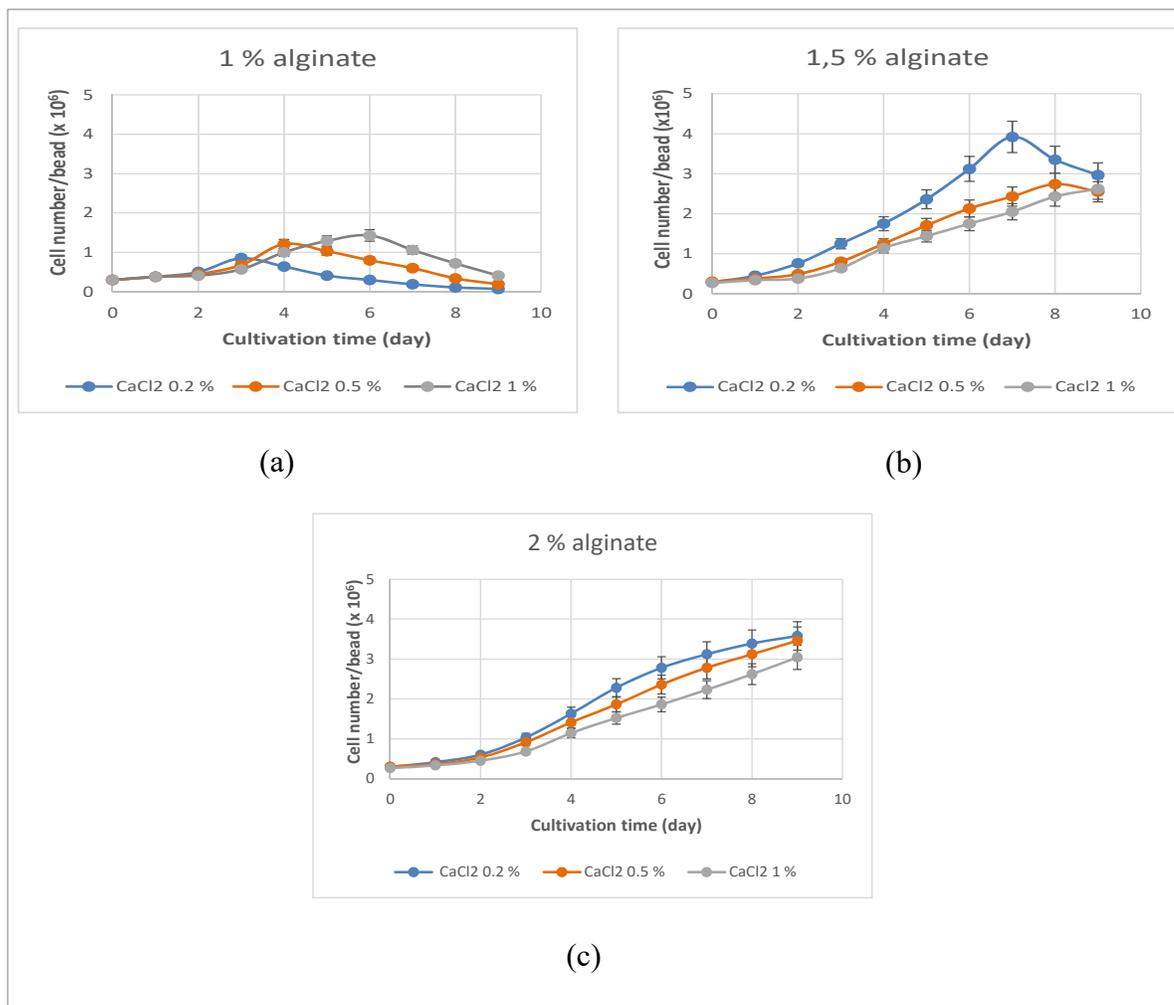


Figure 4.2 Evolution of the cellular concentrations of *R. subcapitata* in alginate beads according to the different concentrations of alginate and CaCl₂ studied, over a period of 10 days : (a) 1 % alginate; (b) 1.5 % alginate; and (c) 2 % alginate $t = 0$ corresponds to the first day of culture.

The beads made from the 1.5 % and 2 % alginate solutions (Figures 4.2b and 4.2c) exhibited remarkably higher concentrations of microalgae compared to the 1 % alginate beads (Figure 4.2a) regardless of the CaCl₂ concentrations used. The maximum concentrations of the cells reached within the beads of each formulation are presented in Table 4.2. The beads formed from the 1 % alginate solution (Figure 4.2a) were soft and easily dissolved, showing inadequate results after day 4, 5, and 7 for 0.2 %, 0.5 %, and 1 % CaCl₂, respectively. The

beads began to shrink and resulted in the release of cells into the culture medium. A high number of free cells were recorded on the 10th day (Table 4.3).

Tableau 4.2 Maximum concentrations of *R. subcapitata* (cells/bead $\times 10^6$) reached in the beads as a function of the alginate and CaCl₂ concentrations

Alginate % (w/v)	CaCl ₂ 0.2 % (w/v)	CaCl ₂ 0.5 % (w/v)	CaCl ₂ 1 % (w/v)
1.0	0.83 \pm 0.08	1.21 \pm 0.12	1.48 \pm 0.35
1.5	3.92 \pm 0.39	2.74 \pm 0.27	2.62 \pm 0.26
2.0	3.58 \pm 0.35	3.46 \pm 0.34	3.04 \pm 0.3

Tableau 4.3 Free *R. subcapitata* concentrations (cells/mL $\times 10^6$) detected in the culture medium on the 10th day

Alginate % (w/v)	CaCl ₂ 0.2 % (w/v)	CaCl ₂ 0.5 % (w/v)	CaCl ₂ 1 % (w/v)
1.0	1.54 \pm 0.15	1.28 \pm 0.12	1.0 \pm 0.1
1.5	0.8 \pm 0.08	0.34 \pm 0.03	0.21 \pm 0.02
2.0	0.27 \pm 0.02	0.16 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01

These observations have shown that a low concentration of alginate causes the instability of the beads due to the thin layer of the formed biofilm. Furthermore, the Ca²⁺ ions play an important role in the hardening of the beads and in the maintenance of their stability for a long time. Low CaCl₂ concentrations reduce the stability of the beads, which causes them to easily release the cells into the culture medium. Thus, a 1 % concentration of alginate is certainly not suitable for the culture of microalgae in the beads for a long time. The formulation based on 1.5 % alginate (Figure 4.2b) allowed for good growth of the microalgae. Nevertheless, a shrinkage of the beads formed from 0.2 % and 0.5 % CaCl₂ solutions was observed after the 8th and 9th day, respectively. The 1 % concentration of CaCl₂ allowed us to maintain the stability of the beads during the 10 days of culture. In addition, the free cells detected on the 10th day were reduced compared to the beads from 1 % alginate (Table 4.3). The beads synthesized with the 2 % alginate solution (Figure 4.2c) demonstrated a continuous growth of microalgae even after the exponential growth phase, without remarkable shrinkage of the

beads. Furthermore, the free cell concentrations recorded on the 10th day of culture were considerably minimized (Table 4.3). There was a maximum reduction of 40 % compared to those synthesized using 1.5 % alginate, while the maximum reduction was 88 % when compared to those produced using 1 % alginate for the same concentration of CaCl₂ (1 %).

In a second step, the growth rates (Table 4.4 and Figure 4.3) and the generation times (Table 4.4) obtained from all the formulations tested were compared in order to fulfil the objective of this present study, which was the optimization of the growth rate of the alga to obtain a large quantity of cells to produce biodiesel. The results obtained showed that the beads made with the combination of 1 % alginate and 1 % CaCl₂ had the lowest growth rate and therefore, the slowest growth ($\mu = 0.17 \pm 0.01$ cells/bead/day, $G = 4.05 \pm 0.4$ days) of all the combinations studied. On the other hand, the growth rate values recorded with the beads from the 1.5 % and 2 % alginate solutions and the studied concentrations of CaCl₂ indicated that the highest growth rate was obtained with the formulation of 1.5 % alginate and 0.2 % CaCl₂ ($\mu = 0.27 \pm 0.2$ cells/bead/day, $G = 2.55 \pm 0.25$ days). These concentrations of alginate and CaCl₂ appear to improve the mass transfer of nutrients, light and CO₂ in the beads due to the relatively thin layer of alginate biofilm formed and the soft texture of the beads. However, they were not sufficient to ensure the stability of the beads for a long time, as well as the concentrations of alginate 1.5 % and CaCl₂ 0.5 %.

The combination of 1.5 % alginate and 1 % CaCl₂ as well as all the combinations with 2 % alginate were the best because they maintained the stability of the beads during the 10 days of culture. However, the lowest number of free cells detected in the medium at the end of culture was recorded with the combination of 2 % alginate and 1 % CaCl₂. As a result, these alginates and CaCl₂ concentrations were determined as the optimal conditions for the immobilization of microalgae and will be used in the following work. An observation of the beads made under these conditions and containing *R. subcapitata* cells in the exponential phase of growth, was carried out using a stereomicroscope (SteREO Discovery.V8) (Figure 4.4), equipped with a low-magnification objective ($G \times 1.0$) and image capture software (Zen 2.3 lite, blue edition).

Tableau 4.4 Growth Rates (Cells/Bead/Day) and Generation Time (Day) of *R. subcapitata* as a function of the concentrations of alginate and CaCl₂

CaCl ₂ % (w/v)	Alginate 1 % (w/v)		Alginate 1.5 % (w/v)		Alginate 2 % (w/v)	
	μ_{max}	G	μ_{max}	G	μ_{max}	G
0.2	0.53 ± 0.05	1.30 ± 0.13	0.27 ± 0.02	2.55 ± 0.25	0.25 ± 0.02	2.76 ± 0.27
0.5	0.49 ± 0.04	1.40 ± 0.14	0.22 ± 0.02	3.13 ± 0.31	0.22 ± 0.02	3.13 ± 0.31
1.0	0.17 ± 0.01	4.05 ± 0.4	0.19 ± 0.02	3.63 ± 0.36	0.20 ± 0.02	3.13 ± 0.31

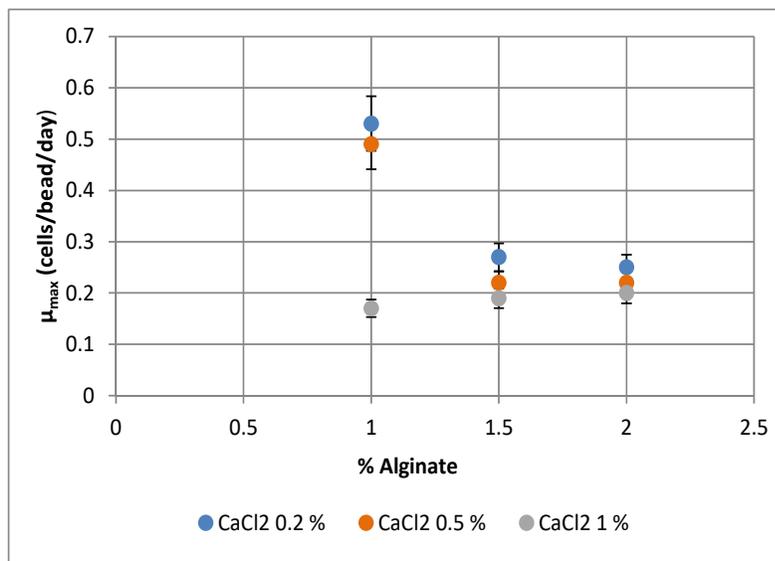


Figure 4.3 Variations in growth rates of immobilized *R. subcapitata* depending on the alginate and CaCl₂ concentrations studied

The growth rates decrease with increasing alginate and CaCl₂ concentrations

The growth value of *R. subcapitata* obtained in this study under the optimal conditions of immobilization (2 % alginate and 1 % CaCl₂) was higher than the values reported in other articles. Li-Juan Zhang et al. (Zhang et al., 2012) obtained a growth of $18.5 \times 10^4 \pm 0.3$ cells/mL under the optimal immobilization conditions, which were determined to be 4 % alginate and CaCl₂, after 3 days of culture. If the growth value of the study presented here is converted into the same unit, it gives a growth of $34.3 \times 10^4 \pm 0.34$ cells/mL after 3 days of culture. The differences in the growth values observed with the study of Li-Juan Zhang et al. (Zhang et al., 2012) could be attributed to the alginate and CaCl₂ concentrations used. The researchers used

concentrations higher than what is proposed in this paper because their objective was to obtain dissolution-resistant beads in contaminated freshwater sediments.

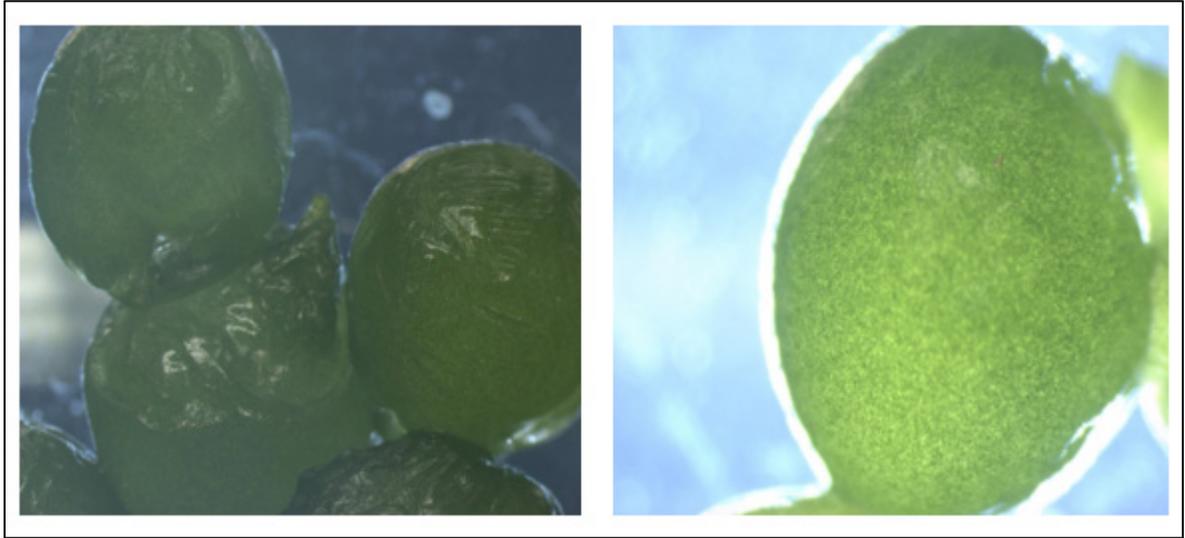


Figure 4.4 Beads formed from 2 % alginate and 1 % CaCl₂ containing *R. subcapitata* in the exponential growth phase. Stereomicroscope observation ($G \times 1.0$)

4.5.3 Comparison of free and immobilized *R. subcapitata* growth in alginate beads

A comparison was established with the cells immobilized on the beads using 2 % alginate and 1 % CaCl₂ (Figure 4.5). The results obtained showed that the cell division termination is almost concomitant in both culture conditions. Nevertheless, the final concentration of cells is greater in the free culture ($7.1 \times 10^6 \pm 0.71$ cells/mL against $1.52 \times 10^6 \pm 0.15$ cells/mL for the immobilized culture). The immobilized cells expressed a growth rate of 0.203 ± 0.02 cells/mL/day during the exponential phase of growth, while the free cells had a growth rate of 0.305 ± 0.03 cells/mL/day. This is a decrease in the order of 34.42 %. These results first confirmed that immobilization in natural polysaccharides often causes material transfer limitations, which has been described in the literature (Amsden, 1998). Moreover, in the free culture, the suspension of algae in fermentation is homogeneous at any point of the reactor. In contrast, in the immobilized culture, the distribution of the alginate beads in the reactor and the distribution of the cells in the beads are heterogenous. However, it should be noted that the use of immobilization technology in microalgae culture has made it easier to separate the cells

from the water. The alginate beads are relatively large compared to free cells and can be easily collected through a simple filtration method such as sieving without significant amount of energy consumed. Also, although *R. subcapitata* was incubated under standard microalgal culture conditions, its growth exhibited better results than was found in the literature (Zhang et al., 2012). This research therefore suggests that optimizing the conditions of culture could provide even more promising results.

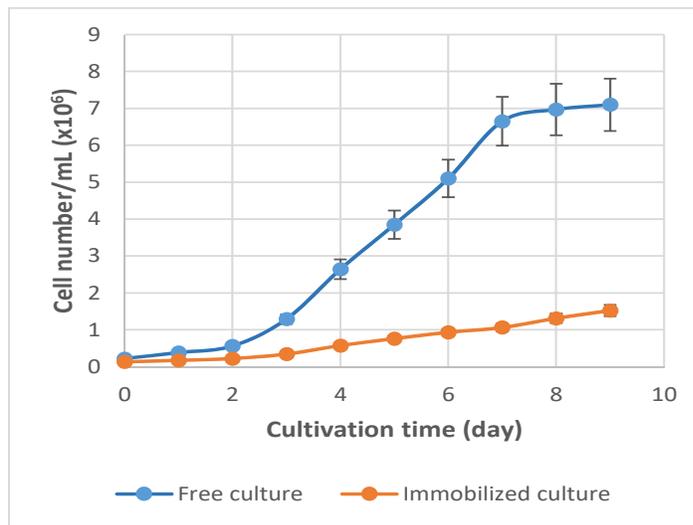


Figure 4.5 Growth of free and immobilized *R. subcapitata* in the Erlenmeyer flask for 10 days
The growth of the free seaweed follows a traditional pattern of a discontinuous culture
 $t = 0$ corresponds to the first day of culture

4.6 Conclusion

This research studied the effects of immobilization conditions on the growth of *Raphidocelis subcapitata* in alginate beads. The first step was designed to determine the alginate and CaCl₂ concentrations that are capable of generating beads. Following the results obtained, it was shown that among all the concentrations tested, only the concentrations of 1 %, 1.5 % and 2 % alginate allowed us to obtain macroscopically homogeneous beads and had easy handling. Regardless of the concentration of CaCl₂ used, the 2.5 % alginate concentration generated

irregular beads, while the 3 % alginate was too viscous and insoluble in water. Therefore, these last two concentrations of alginate were considered inadequate for the elaboration of the beads. The results of growth monitoring of the alga in the beads synthesized from different formulations showed that the highest growth ($3.92 \times 10^6 \pm 0.39$ cells/bead) was obtained with the combination of 1.5 % alginate and 0.2 % CaCl_2 . However, these concentrations did not maintain the stability of the beads during the 10 days of culture. For a long-lasting microalgae culture, the optimal immobilization conditions were determined to be concentrations of 2 % alginate and 1 % CaCl_2 . This choice is justified by the stability of the beads vis-à-vis the dissolution of the gel and the release of cells in the culture medium. The maximum concentration of cells reached in these beads was $3.04 \times 10^6 \pm 0.3$ cells/bead with a growth rate of 0.20 ± 0.02 cells/bead/day.

The results obtained are encouraging as the concentrations of cells reached are high compared to other works despite the fact that the strain was incubated under standard microalgal culture conditions. This study suggests that optimizing crop conditions, such as light, could lead to even more promising results. It is known that photon input is critical for microalgae culture in terms of biomass yield. Thus, it would be interesting to evaluate the influence of cell trapping in the alginate beads on light penetration. Although the gel is transparent and we have noted a considerable growth of algae, it can be a barrier and reduce the amount of light available. On the other hand, further studies are needed to provide more information for the valorization of the immobilized *Raphidocelis subcapitata* biodiesel, namely the influence of cell trapping on biomass production and lipid production. Thus, the contribution of the present work is paving the way for a possible use of a well-known algae for the production of biofuels. Despite the species having been studied before, this study allowed us to develop the knowledge on its culture in the alginate gel. This research is the first in the process of optimizing the growth of immobilized *Raphidocelis subcapitata*.

CHAPITRE 5

MÉTHODE DE CALCUL DE LA CROISSANCE DE *R. SUBCAPITATA* IMMOBILISÉE PAR VOLUME DE MILIEU DE CULTURE

Ce chapitre décrit la méthode de calcul développée pour exprimer la croissance de la microalgue *R. subcapitata* immobilisée par volume de milieu de culture.

5.1 Développement d'une méthode de calcul de la croissance de *R. subcapitata* immobilisée par volume de milieu de culture

Dans ce projet, un pseudo-problème a été rencontré et qui réside dans la méthode de calcul utilisée pour estimer la croissance de *R. subcapitata* immobilisée par volume de milieu de culture utilisé (1 L). Lors de l'analyse de l'ensemble des résultats obtenus dans ce travail, il s'est avéré que la méthode utilisée (Figure 4.5, article 1) n'exprimait pas le nombre de cellules immobilisées dans toute la culture. Cela explique la grande différence entre les valeurs de la culture libre et la culture immobilisée. En effet, dans le cas de culture libre, le milieu est homogène et la concentration des microalgues est la même en tout point de la fiole. La lecture de la densité optique de l'échantillon prélevé (1 mL) permet alors de déterminer le nombre de microalgues par mL de milieu de culture. En revanche, dans la culture immobilisée, le milieu est hétérogène. Après dissolution de 10 billes dans le tampon phosphate, la lecture de la densité optique du 1 mL prélevé alors permet d'estimer le nombre de cellules par millilitre de tampon phosphate et non par millilitre de milieu de culture. Pour calculer le nombre de cellules immobilisées par litre de milieu de culture, ce travail propose la méthode suivante. La courbe étalon permet d'obtenir le nombre de cellules/mL de tampon phosphate. Le nombre de cellules par bille est calculé comme suit :

$$\text{Nombre de cellules/bille} = \frac{\text{Nombre de cellules obtenues par la courbe étalon (cellules/mL)} \times V_{\text{tampon phosphate}} \text{ (mL)}}{\text{Nombre de billes dissoutes}} \quad (5.1)$$

Le nombre total de cellules immobilisées dans 1 L de milieu culture est le nombre de cellules immobilisées dans toutes les billes. Il peut être calculé comme suit :

$$\text{Nombre total de cellules immobilisées (cellules/L)} = \text{Nombre de cellules/bille} \times \text{Nombre total de billes} \quad (5.2)$$

Dans les expériences, le nombre total de billes dans 1 L de milieu de culture a été de 2000 billes. La Figure 5.1 montre les résultats de la croissance de *R. subcapitata* libre et immobilisée après révision de la méthode de calcul.

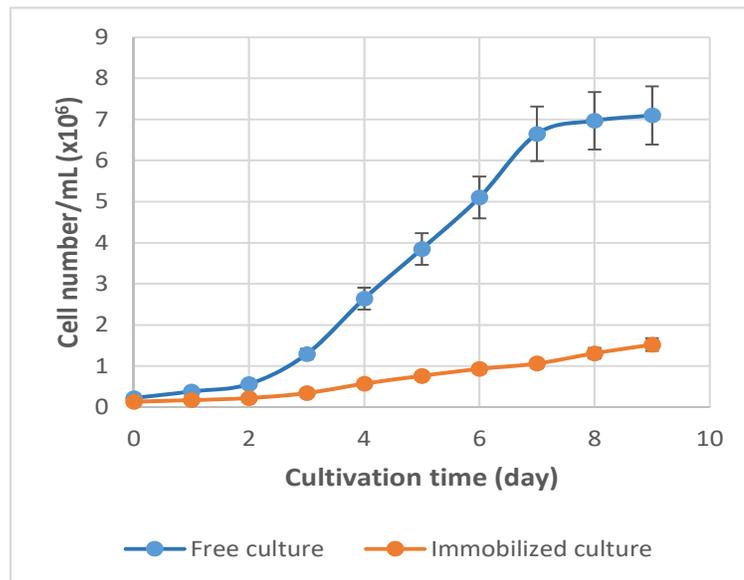


Figure 4.5 Croissance de *R. subcapitata* libre et immobilisée présentée dans l'article 1

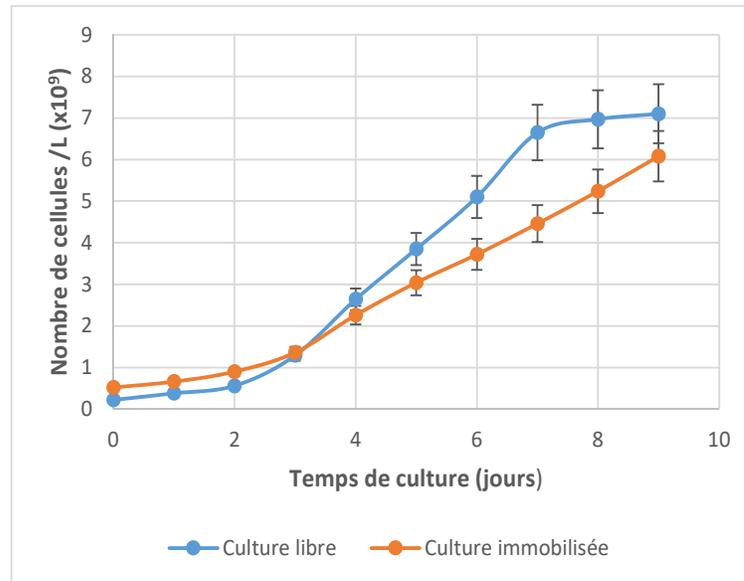


Figure 5.5.1 Croissance de *R. subcapitata* libre et immobilisée après révision de la méthode de calcul

La Figure 5.1 montre que durant les premiers jours de culture, la concentration des microalgues est élevée dans la culture immobilisée. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que dans la culture libre l'inoculum algal était dilué dans le milieu de culture. En revanche, dans la culture immobilisée, l'inoculum était transformé en billes qui ont été ensuite placées dans le milieu de culture. L'immobilisation a permis de concentrer les cellules. Après cette phase de latence, le nombre de microalgues a augmenté dans les deux cultures. Toutefois, la croissance des cellules était plus rapide dans la culture libre avec un taux de division $\mu = 0.305 \pm 0.03$ cellules/mL/jour contre $\mu = 0.203 \pm 0.02$ cellules/mL/jour dans la culture immobilisée. Après le 8^e jour, la culture libre est entrée en phase quasi stationnaire alors qu'une croissance continue est notée dans la culture immobilisée. À la Figure 4.5, les phases de croissance de la culture immobilisée n'étaient pas bien distinguées. Ceci a conduit à une mauvaise interprétation. Ainsi, la terminaison de la division cellulaire n'est pas concomitante dans les deux cultures. La croissance continue des microalgues immobilisées les derniers jours de culture laisse supposer qu'il reste encore des nutriments dans le milieu de culture et que l'immobilisation dans des billes d'alginate a créé une limitation de transfert de nutriments. L'autre possibilité est que les

nutriments aient été épuisés dans le milieu de culture les derniers jours, car les cellules de microalgues libérées des billes dans le milieu de culture utilisent aussi les nutriments pour leur croissance. Toutefois, les nutriments étaient encore disponibles dans les billes. À l'intérieur des billes, le transfert des nutriments de la surface au centre peut être lent, ce qui peut faire en sorte que les cellules ne reçoivent pas les nutriments en même temps. De ce fait, la division des microalgues qui se trouvent au centre sera retardée.

Le nombre de cellules de microalgues atteint en fin de culture est légèrement élevé dans la culture libre ($7.1 \times 10^9 \pm 0.71$ cellules/L contre $6.08 \times 10^9 \pm 0.60$ cellules/L pour la culture immobilisée). Ce résultat est attendu; l'accessibilité des microalgues aux nutriments, au CO₂ et à la lumière est plus élevée dans la culture libre ce qui conduit à une activité métabolique supérieure. Dans la culture immobilisée, l'effet d'ombrage dû à l'augmentation de la concentration des microalgues à l'intérieur des billes d'alginate est un phénomène courant. Cao et al. (2020) ont observé des billes d'alginate contenant des cellules de *Chlorella vulgaris* à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les chercheurs rapportent que les cellules de microalgues étaient uniformément réparties à l'intérieur des billes quand elles étaient nouvellement fabriquées. Après deux jours de culture, la densité des cellules à l'intérieur des billes a augmenté. Toutefois, une quantité élevée de microalgues s'est concentrée à la surface des billes formant ainsi une fine couche, appelée couche d'ombrage. En raison de la formation de cette couche, la quantité de lumière disponible pour les microalgues à l'intérieur des billes a été réduite.

Aussi, il convient de mentionner que dans la culture immobilisée, les billes ne reçoivent pas la même quantité de lumière suivant leur emplacement dans la fiole. Bien qu'une bonne agitation du milieu de culture permette d'équilibrer la répartition de la lumière aux billes, à l'intérieur des billes, un gradient de lumière est formé. Les microalgues en surface reçoivent davantage de lumière que celles au centre.

CHAPITRE 6

ARTICLE 2 : GROWTH AND PRODUCTION OF LIPIDS IN *RHAPHIDOCELIS SUBCAPITATA* IMMOBILIZED IN SODIUM ALGINATE BEADS

Amel Benasla * and Robert Hausler

Station Expérimentale des Procédés Pilotes en Environnement, École de technologie
supérieure, Université du Québec,
1100, rue Notre-Dame Ouest Local A-1500, Montréal, QC H3C 1K3, Canada

Article publié dans « Energies », janvier, 2020

6.1 Avant-propos

Cet article étudie la croissance et la production de lipides chez la microalgue *R. subcapitata* cultivée dans des billes d'alginate de sodium. L'objectif est d'examiner la capacité de la microalgue immobilisée à accumuler les lipides en réponse à l'épuisement de l'azote et du phosphore dans le milieu de culture afin d'estimer son potentiel pour la production de biodiesel. La culture de la microalgue est réalisée en *batch*.

Le résumé graphique de l'article est présenté en Annexe II (Figure-A II-1).

6.2 Abstract

The growth and production of lipids in the green microalga *Raphidocelis subcapitata* immobilized in alginate gel are studied. The beads are made from alginate (2 % w/v) and CaCl₂ (1 % w/v). The dry weight, the concentration of cells, and the lipid content are determined after dissolution of the beads in a sodium phosphate buffer. The results show that variations in biomass do not reflect variations in the number of cells in *R. subcapitata*. Cells divide more rapidly ($G_c = 3.45 \pm 0.3$ days) than biomass is produced ($G_m = 4.1 \pm 0.4$ days) during the

exponential growth phase. Therefore, the average mass of the immobilized cells decreases until it reaches its minimum at the end of the exponential phase. Thus, during the stationary phase, cell division ceases while biomass production continues, and the average mass of the immobilized cells increases. In the present study, it is shown that this increase is due to the accumulation of lipids following the depletion of nitrates and phosphates in the culture medium. A lipid content of 24.7 ± 2.5 % (dcw) and a lipid productivity of $LP = 29.8 \pm 3.0$ mg/L/day are recorded at the end of culture. These results suggest that immobilized *R. subcapitata* has promising potential for biodiesel production.

Keywords : biomass; cell division; lipid content; *Raphidocelis subcapitata*; alginate; CaCl_2

6.3 Introduction

In response to the problems of climate change and greenhouse gas emissions in the atmosphere, microalgal biomass has emerged as a superior raw material and promising alternative for biodiesel production (Chisti, 2007; Gavrilescu & Chisti, 2005; Khan et al., 2009; Li, Horsman, Wu, Lan, & Dubois-Calero, 2008). According to some estimates, the average lipid productivity of microalgae is 54 tons/ha/year, which is higher compared to oilseed crops, such as oil palm (3.62 tons/ha/year) and rapeseed (0.68 tons/ha/year) (Chisti, 2007; Lam & Lee, 2011). In addition, microalgae can use CO_2 from the atmosphere, gases from various processes such as those from coal-fired power plants, or soluble carbonates with an efficiency 10 to 50 times greater than those of terrestrial plants (Doré-Deschênes, 2009; Khan et al., 2009; Li et al., 2008). Most importantly, growing microalgae for biodiesel production does not trigger a food-biofuel issue, which could lead the industry towards more sustainable development (Cantin, 2010).

Great attention has been paid to certain species, including the green alga *Raphidocelis subcapitata*, because of their rapid growth and high level of lipid production (Gonçalves et al., 2013; Patil et al., 2007). Nevertheless, the high energy input required, particularly in the concentration and drying stage of biomass in the biodiesel production process, has made the

possibility to market algocarbons questionable (Sander & Murthy, 2010). Production processes have evolved and new technologies, such as cell immobilization in natural polysaccharides, have been introduced into microalgae culture to facilitate their harvesting. The most frequently used are alginates, carrageenans, and agars because of their non-toxicity, biodegradability, and transparency to light, which helps to maintain the algae's photosynthetic activity (Cao et al., 2010; Moreira et al., 2006; Ignacio Moreno-Garrido, 2008). In the case of alginate polycarboxylate extracted from brown algae, the polymer is mixed with microalgae cells, then the gelling of the beads is produced by cationic grafting in the presence of multivalent ions such as CaCl_2 (Draget et al., 1998). The beads obtained have a relatively large size compared to the free cells and can be easily separated from the culture medium by simple sieving without energy consumption. Thus, microalgal biomass will become easier to handle. However, in the literature, there is less work on the use of immobilized microalgae for biodiesel production compared to those using microalgae-free cultivation (Table 6.1). The objective of this work is to study the growth and production of lipids in the microalga *Raphidocelis subcapitata* immobilized in alginate gel with a view to its development into biodiesel. This species is characterized by its high lipid productivity (Gonçalves et al., 2013; Patil et al., 2007) and by the fixation of CO_2 in the form of organic matter, thanks to light energy, thus contributing to its reduction in the atmosphere (Pires et al., 2014). To our knowledge, no research projects have been published on the cultivation of *R. subcapitata* in alginate beads for possible use in the production of biodiesel.

Tableau 6.1 Various species of free versus immobilized microalgae used for biodiesel production

Microalgae	Type of culture	Reference
<i>Parachlorella kessleri</i> UTEX2229	Free	(Taleb, 2015)
<i>Chlorella</i> sp.	Free	(El Hifnawy, 2016)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Free	(Chader, Mahmah, Chetehouna, & Mignolet, 2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Immobilized	(Béliveau, Bertrand-Lehouillier, Carrier, Tremblay, & Larrivée, 2013)
<i>Tetraselmis</i> sp.	Free	(Chamoumi, 2013)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Free	(Massart, Aubry, & Hantson, 2010)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Free	(Olofsson et al., 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Free	(Branco-Vieira et al., 2018)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Free	(Gonçalves et al., 2013)
<i>Botryococcus braunii</i>	Immobilized	(Casadevall et al., 1985)

6.4 Materials and methods

6.4.1 Chemical products

Sodium alginate extracted from brown algae (No. 71238) and phosphate buffer components, sodium phosphate monobasic dihydrate $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (No. 71505) and sodium phosphate dibasic dihydrate $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (No. 71643), were supplied by Sigma-Aldrich® (Oakville, ON, Canada). Calcium chloride dihydrate $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (No. 700912), used as a gelling medium (Benasla & Hausler, 2018; Draget et al., 1998; Khromova, 2006; Panouillé & Larreta-Garde, 2009; Smrdel et al., 2008), was supplied by Anachemia (Montréal, QC, Canada).

6.4.2 Microalga and culture medium

Raphidocelis subcapitata came from the Environment Canada Laboratory. The microalga was conserved and grown in a medium (Centre des sciences et technologies environnementales, 2007) prepared from five mother solutions whose composition (per liter) is as follows :

(1) 25.5 g NaNO₃; (2) 14.7 g MgSO₄·7H₂O; (3) 1.044 g K₂HPO₄; (4) 15 g NaHCO₃; (5) 10 g MgCl₂·6H₂O; 4.4 g CaCl₂·2H₂O; 0.185 g H₃BO₃; 0.416 g MnCl₂·4H₂O; 3.28 mg ZnCl₂; 0.16 g FeCl₃; 1.428 mg CoCl₂·6H₂O; 7.26 mg Na₂MoO₄·2H₂O; 0.012 mg CuCl; and 0.3 g Na₂EDTA·2H₂O. From each nutrient solution, 10 mL was taken and transferred to an Erlenmeyer flask; the distilled water was then added to bring the volume to 1 L. The pH of the medium was adjusted to 7.5. The culture medium was sterilized by an autoclave at 121 °C for 20 min.

6.4.3 Cell immobilization

The immobilization of *R. subcapitata* cells in alginate gel was performed under sterile conditions from 2 % (w/v) sodium alginate solutions, CaCl₂ 1 % (w/v), sterilized by autoclave (121 °C, 20 min) (Benasla & Hausler, 2018), and an algae suspension in the exponential growth phase of biomass concentration of about 1 g/L. A total of 100 mL of microalgae culture was concentrated by centrifugation (4000 rpm, 4 °C for 10 min); the pellet was recovered and washed three times in sterile saline water (0.85 %), with centrifugation between each wash. Cells were then suspended in 50 mL of sterile saline water (0.85 %). The algae suspension was finally mixed with 50 mL of sodium alginate solution and gently homogenized (Benasla & Hausler, 2018; Moreira Dos Santos et al., 2002). The mixture was transferred into a sterile 20 mL syringe equipped with a 20 G 0.9 × 40 mm needle (Braun, Melsungen, Germany) and expelled dropwise into the CaCl₂ solution. The beads generated were left in the CaCl₂ solution for 30 min to complete the gelation. After this, they were harvested using a sterile metal sieve and then washed with sterile distilled water.

6.4.4 Culture conditions

The beads containing the microalgae were aseptically transferred into a 2 L Erlenmeyer flask, previously sterilized by an autoclave (121 °C, 20 min), containing 1 L of sterile culture medium. They were then placed in an incubator equipped with a stirring table (INFORS HT Ecotron, Montréal, QC, Canada), providing standard culture conditions, agitation (100 rpm), and temperature (25 ± 1 °C). The experiment was carried out under a photoperiod of 24 h of

light for 0 h of darkness (24/0; L/D). A white fluorescent lamp (KF15T8CW-PROJECT PAK 15W) was used as a light source. It was installed vertically, thus providing lighting of 4000–5000 lux [light quantum flux of approximately $56 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$]. In order to avoid cell sedimentation and to prevent the depletion of the medium in CO_2 , the cultures were heavily bubbled (145 L of air/liter of culture/hour). CO_2 was supplied by an air pump (MARINA 300). The air was filtered by a $0.45 \mu\text{m}$ porosity filter (Fischer Scientific).

6.4.5 Growth monitoring

The growth monitoring of the cells immobilized in the beads was carried out by measuring the cell concentration and determining the dry weight over a period of 10 days. Each day, ten beads were removed aseptically from the Erlenmeyer flask and transferred in 20 mL of sterile sodium phosphate buffer (pH = 6.0), at a concentration of 50 mM. They were then incubated at room temperature for 24 h. This step allowed the dissolution of the beads and consequently the release of cells (Benasla & Hausler, 2018; Voo et al., 2015).

The number of cells was determined by measuring the optical density at 685 nm using a spectrophotometer (Varian Cary 300 bio visible UV spectrophotometer). The relationship between the OD_{685} (y) and the concentration of *R. subcapitata* cells (x) is given by the following equation: $y = 0.3572x$ ($R^2 = 0.9978$).

The determination of the dry weight was carried out by filtration of the algae suspension on a pre-weighed fiberglass filter (Wathman filter, $1.2 \mu\text{m}$) (METTLER AT261 balance). The cells were washed with 100 mL of sterile distilled water. The filter was then placed in the oven at $80 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h, cooled in a desiccator for 15 min, and then weighed again. The biomass concentration represents the average of two tests. It was calculated from the difference in mass of the filter divided by the volume of the sample and was expressed in g/L, according to the following equation :

$$Cx \text{ (g/L)} = \frac{m_2 - m_1}{V_{\text{sample}}} \times 10^3 \quad (6.1)$$

where m_1 : mass of the filter (g), m_2 : mass of the filter containing the microalgae (g), V_{sample} (L).

6.4.6 Calculation of growth parameters

The immobilized *R. subcapitata* culture is performed in *batch*. The optimal cell division rate (μ_c) and biomass production rate (μ_m) were calculated during the exponential growth phases according to the following equation (Benasla & Hausler, 2018; Lam & Lee, 2012a) :

$$\mu_c \text{ (day}^{-1}\text{)} = \frac{\ln(N_2/N_1)}{t_2 - t_1} \quad (6.2)$$

where N_1 and N_2 are defined as the number of cells (cell/L) at time t_1 and t_2 , respectively.

$$\mu_m \text{ (day}^{-1}\text{)} = \frac{\ln(M_2/M_1)}{t_2 - t_1} \quad (6.3)$$

where M_1 and M_2 are defined as biomass (g/L) at time t_1 and t_2 , respectively.

The doubling time of the microalgae cells (G_c : generation time) and the biomass doubling time (G_m) are calculated according to the following formula (Clément-Larosière, 2012) :

$$G_c = \ln 2 / \mu_{c \text{ max}} \quad (6.4)$$

G_c : generation time (day); \ln : natural logarithm; μ_c : specific growth rate (day⁻¹).

$$G_m = \ln 2 / \mu_{m \text{ max}} \quad (6.5)$$

G_m : Biomass doubling time (day); \ln : natural logarithm; μ_m : specific rate of biomass production (day^{-1}).

6.4.7 Lipid extraction from immobilized microalgae

The extraction of total lipids was performed according to the whole cell analytical method (WCA) described by Van Vooren et al. (Van Vooren et al., 2012). It is based on the use of a mixture of apolar (chloroform) and polar (methanol) solvents in proportions 2:1 (v/v). Methanol allows the bursting of microalgae, thus making the lipids accessible to chloroform, which leads to the production of a complete lipid extract. The choice of this method is justified by its numerous advantages compared to the methods of Folch (Folch, Lees, & Stanley, 1957) and Bligh and Dyer (Bligh & Dyer, 1959), which are recognized as reference techniques of extraction of total lipids. The WCA method is faster, simpler to perform, can be applied to a small sample volume, and ultimately achieves a better extraction yield (Taleb, 2015).

After dissolving the beads (10 beads) as described above (Section 6.4.5), the resulting algal suspension was centrifuged for 10 min at 4000 rpm at 4 °C. Then, the supernatant was removed and 20 μL of butylated hydroxytoluene (BHT) at 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ were added to the pellet containing the whole cells of microalgae in order to prevent lipid oxidation during the extraction. The extraction was carried out in glass tubes with 6 mL of $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ mixture 2:1 (v/v) which were added in three times (2 mL successively). After each addition of solvents, the tubes were vortexed for 10 s and then placed in an ultrasonic bath (BRANSON 5200) for 30 s to improve the extraction yield. In fact, the ultrasounds emitted generate bubbles in the solvent mixture; the bursting thereof in the vicinity of the cells makes it possible to maximize the extraction of the lipids contained inside the microalgae. The tubes were thus covered with aluminum foil and kept shaking on a pendulum for 6 h in the dark in order to ensure the complete extraction of the lipids. The evaporation of the extraction solvent was carried out in an oven at 60 °C for 6 h. The tubes were then cooled in a desiccator for 20 min and weighed to determine the weight of dry matter obtained corresponding to the total lipids extracted. The level of fatty acids in the biomass represents the average of two tests and is given by the following formula :

$$\text{Percentage mass of total lipids \% (dcw)} = \frac{\text{Mass of total lipids extract (g)}}{\text{Dry weight of cells (g)}} \times 100 \quad (6.6)$$

6.4.8 Calculating lipid productivity

The lipid productivity (LP) is calculated according to the following equation :

$$LP \text{ (mg/L/day)} = \frac{C_2 B_2 - C_1 B_1}{t_2 - t_1} \quad (6.7)$$

where C_1 is the lipid content of microalgae (mg of lipids/mg of dry of cells) at t_1 and C_2 (mg of lipids/mg of dry of cells) is that at t_2 . B_1 and B_2 are the biomass concentrations (mg/L) at time t_1 and t_2 (day), respectively.

6.4.9 Measurement of nitrates in the culture medium

The determination of the nitrate concentration in the culture medium during the growth period of immobilized microalgae (10 days) was carried out according to a standard method (Eaton, Franson, Clesceri, Rice, & Greenberg, 2005). Each day, 1 mL of culture medium was removed from the Erlenmeyer flask and centrifuged (4000 rpm, 4 °C for 10 min) to remove free microalgae cells that can be relegated from the beads. The supernatant was recovered, and the nitrate concentration was estimated by measuring the absorbance at 220 nm using the spectrophotometer (Varian cary 300 bio visible UV spectrophotometer). Since organic matter dissolved in the culture medium can also absorb UV light at 220 nm, and thus distort the nitrate assay results, the absorbance of the sample was also measured at 275 nm. Indeed, at this wavelength, only the dissolved organic matter absorbs. The absorbance of nitrates was calculated as follows :

$$A_{\text{nitrate}} = A_{220\text{nm}} - 2A_{275\text{nm}} \quad (6.8)$$

A solution of sodium nitrate (NaNO_3) at different concentrations was used to plot the calibration curve.

6.4.10 Measurement of phosphates in the culture medium

The determination of phosphate ions in the culture medium during the 10 days of culture of the immobilized microalgae was carried out according to the method of Murphy and Riley (Murphy & Riley, 1962) with ascorbic acid.

6.4.10.1 Principle of the method

Ammonium molybdate and potassium antimonyl tartrate react in acidic medium with orthophosphate to form an antimonyl–phosphate–molybdate complex, which is reduced by acid ascorbic acid to céruléomolybdic, a blue colored complex whose intensity is proportional to the phosphate concentration and is measured using a spectrophotometer (Varian Cary 300 bio UV visible spectrophotometer) at 800 nm.

6.4.10.2 Reagents

- Sulfuric acid, H_2SO_4 , 5N.
- Potassium antimonyl tartrate solution, $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$, 3.42 g/L.
- Ammonium molybdate solution, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 40 g/L.
- Ascorbic acid, 0.1 M.

Combined reagent: for 100 mL of combined reagent, the above reagents were mixed in the following order and in the following proportions: 50 mL H_2SO_4 , 5N, 5 mL potassium antimonyl tartrate solution, 15 mL ammonium molybdate solution, and 30 mL ascorbic acid. The resulting mixture was stable for 4 h.

6.4.10.3 Procedure

Each day, 5 mL of culture medium were taken from the Erlenmeyer flask. After centrifugation at 4000 rpm at 4 °C for 10 min, the supernatant was collected in a 20 mL graduated flask to which 800 µL of combined reagent was added. The solution was kept at room temperature for about 20 min before reading the absorbance at 800 nm using the spectrophotometer (Varian Cary 300 bio visible UV spectrophotometer). A solution of potassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄) at different concentrations was used to plot the calibration curve.

6.5 Results

6.5.1 Growth of *R. subcapitata* immobilized in alginate beads

Variations in the number of cells of immobilized *R. subcapitata* (Figure 6.1a) show a classical pattern of a discontinuous culture with an exponential growth phase which stops after the seventh day of culture, followed by a short slowing and then a stationary phase. The cell division rate and the generation time during the exponential phase of growth, are $\mu_c = 0.20 \pm 0.02 \text{ day}^{-1}$ and $G_c = 3.45 \pm 0.3 \text{ days}$, respectively.

The biomass variations of immobilized *R. subcapitata* (Figure 6.1b) show an increase in the amount of biomass produced by microalgae in the alginate beads from the first days of culture. The rate of biomass production during the exponential phase of growth is $\mu_m = 0.17 \pm 0.02 \text{ day}^{-1}$ and the generation time is $G_m = 4.1 \pm 0.4 \text{ days}$. As a result, biomass values continue to increase after the seventh day of cultivation, and stable biomass production was not reached, even on the last day of cultivation.

The comparison of the doubling time of the microalgae cells ($G_c = 3.45 \pm 0.3 \text{ days}$) and the doubling time of the biomass ($G_m = 4.1 \pm 0.4 \text{ days}$) shows that for the growth of *R. subcapitata* in the alginate gel, the number of cells increases more rapidly than biomass production during the exponential growth phase. Consequently, the average mass of the immobilized cells decreases until it reaches its minimum at the end of the exponential phase (Figure 6.1c). This

is justified by the asexual reproduction of the cells. Like all microalgae, *R. subcapitata* is divided by mitosis; the size of the cells then decreases until they can no longer divide.

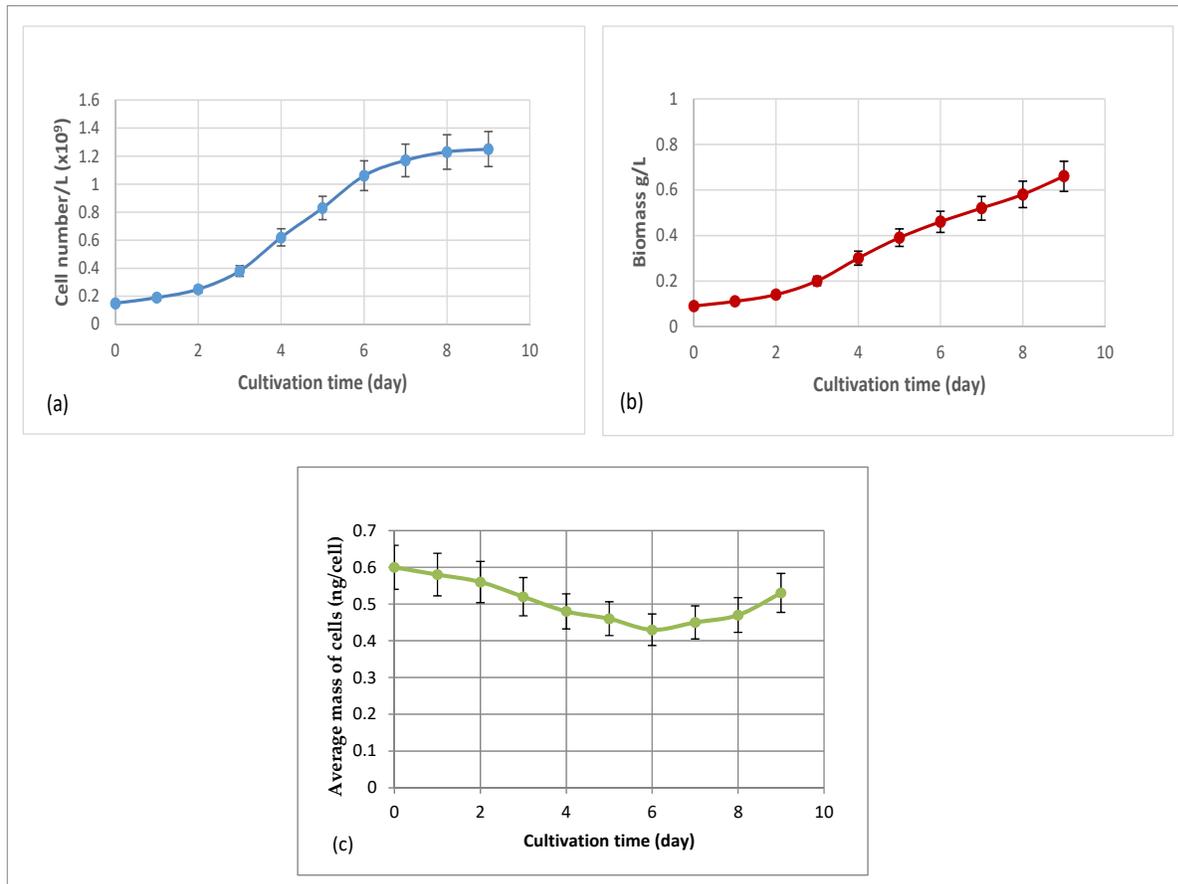


Figure 6.1 Growth of *R. subcapitata* immobilized in alginate beads over a period of 10 days (culture performed in *batch* and in duplicate) : (a) variations in the number of cells; (b) variations in biomass; (c) variations of the average mass of cells; $t_0 = d_1$

In addition, during the last three days of culture, cell division ceases while biomass production continues, and the average cell mass increases. Since the culture of microalgae is carried out in batch, this increase could be due to the accumulation of lipids following the depletion of one of the nutrients essential for growth, such as phosphorus or nitrogen. Indeed, the accumulation of lipids in response to this stress was observed in free *R. subcapitata* (Del Río, Armendáriz, García-Gómez, García-González, & Guerrero, 2015) and in other species of microalgae (Del

Río et al., 2015; Rodolfi et al., 2009) including *Chlorococcum oleofaciens*, *Scenedesmus almeriensis*, and *Nannochloropsis* sp. F & M-M24.

The production of lipids in immobilized *R. subcapitata* was then studied with the monitoring of the nitrate and phosphate concentrations in the culture medium during the whole culture period.

6.5.2 Production of total lipids in *R. subcapitata* immobilized in alginate beads

Figure 6.2 shows the production of total lipids in immobilized *R. subcapitata* with monitoring of nitrate and phosphate concentrations in the culture medium, over a period of 10 days. When nitrates and phosphates are available in the culture medium (Figure 6.2a,b), a slight increase in lipid content is noted (Figure 6.2c) from 13.3 ± 1.3 % (dcw) (first day) to 15.3 ± 1.5 % (dcw) (seventh day), with lipid productivity, $LP = 9.5 \pm 1.0$ mg/L/day. After the seventh day, the nitrates and phosphates are exhausted in the culture medium (Figure 6.2a,b) and a lipid accumulation is observed (Figure 6.2c). A lipid content of 24.7 ± 2.5 % (dcw) is recorded at the end of the experiment with lipid productivity (LP) of 29.8 ± 3.0 mg/L/day.

Despite variations in lipid concentration per microalgae cell, Figure 6.2d shows a progressive decrease in concentration during the first days of culture, reaching a minimum value of 0.066 ± 0.006 ng/cell on the seventh day (a decrease of approximately 17.5 ± 1.7 %). This decrease results from the decrease in the mean mass of cells during their division (Figure 6.1c). After this, when the nitrates and phosphates are depleted in the culture medium (Figure 6.2a,b), the lipid concentration per cell is increased to 0.13 ± 0.01 ng/cell on the last day of culture. It should be noted that the accumulation of lipids was stimulated as soon as nitrates and phosphates were depleted in the culture medium. This implies that de novo fatty acid synthesis was activated rapidly due to the lack of medium in these two elements.

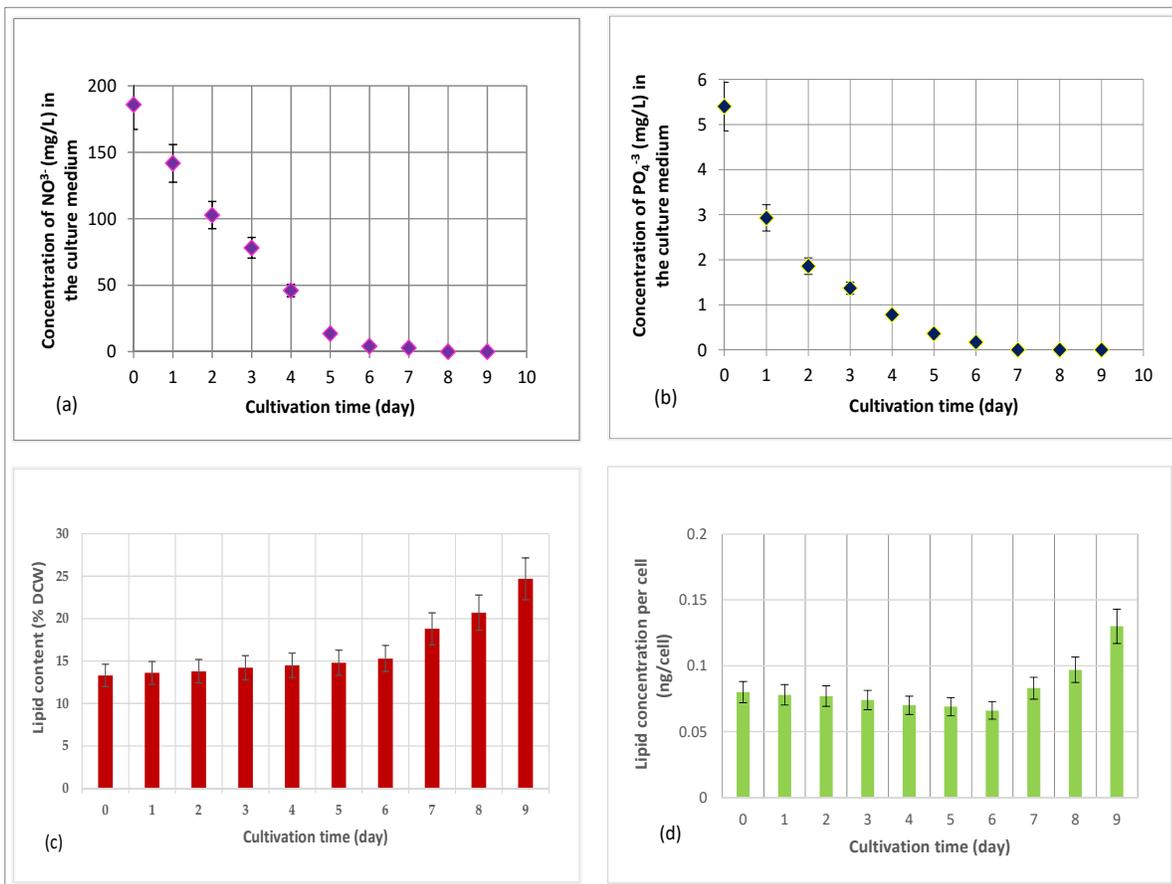


Figure 6.2 Production of total lipids in *R. subcapitata* immobilized in alginate beads, over a period of 10 days (culture performed in *batch* and in duplicate). (a) Nitrate consumption; (b) phosphate consumption; (c) variations in lipid content per dry weight of cells; (d) variations in lipid concentration per cell; $t_0 = d_1$

These results confirm the results obtained above (Figure 6.1). The increase in biomass production during the stationary phase of growth (Figure 6.1b) is due to the accumulation of lipids following the depletion of nitrates and phosphates in the culture medium. Indeed, the storage of lipids results from an imbalance between the flow of carbon, resulting from photosynthesis, and the flow of nitrogen and phosphorus necessary for growth. When the cell is deficient in these elements, it does not immediately interrupt the acquisition of CO_2 necessary for photosynthesis, as it cannot use it to produce proteins; it stores this flow, in the form of lipids (Bernard, Blonz, & Hidoine, 2008; Dejoye, 2013; Hersant, Tremblay, Berthelot, Rousseau, & Bernier, 2012).

Our results show that *R. subcapitata* immobilized in the alginate gel has the ability to accumulate lipids in response to nitrogen and phosphorus limitations. The value obtained in this study (accumulation of 24.7 ± 2.5 % (dcw) at the end of culture), under standard culture conditions, is encouraging since, according to the literature, the lipid contents of *R. subcapitata* would be between 12 % and 41 % of the dry weight, depending on the culture conditions and the concentrations of nitrates and phosphates in the medium (Del Río et al., 2015; Del Río, García-Gómez, Moreno, Guerrero, & García-González, 2017).

6.6 Conclusion

The results of this study suggest that the green microalga *Raphidocelis subcapitata* immobilized in alginate gel has promising potential for the production of biodiesel. Indeed, the strain has the ability to accumulate lipids in response to the depletion of nitrates and phosphates in the culture medium. The values obtained, under standard culture conditions, are encouraging. A lipid content of 24.7 ± 2.5 % (dcw) was recorded at the end of culture, with a lipid productivity (LP) of 29.8 ± 3.0 mg/L/day. In future work, it would be interesting to individually evaluate the effect of each element (nitrates, phosphates) on biomass production and lipid accumulation in order to optimize its growing conditions. This could significantly improve the yield of the species.

CHAPITRE 7

ARTICLE 3 : STRATÉGIE DE CULTURE EN DEUX ÉTAPES POUR UNE PRODUCTION ÉLEVÉE DE BIOMASSE ET UNE ACCUUMULATION DE LIPIDES CHEZ *RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA* IMMOBILISÉE DANS LE GEL D'ALGINATE

Amel Benasla * and Robert Hausler

Station Expérimentale des Procédés Pilotes en Environnement, École de technologie supérieure, Université du Québec,
1100, rue Notre-Dame Ouest Local A-1500, Montréal, QC H3C 1K3, Canada

Article publié dans « Biomass », novembre, 2021

7.1 Avant-propos

Dans ce troisième article, une stratégie de culture en deux étapes est appliquée pour tenter d'augmenter la productivité lipidique de *R. subcapitata* immobilisée dans des billes d'alginate. Dans la première étape, la microalgue immobilisée est cultivée dans des conditions d'apports optimales en N et P pour l'obtention d'une production maximale en biomasse. Dans la deuxième étape, les billes contenant les cellules de microalgues sont transférées dans un milieu de culture carencé en azote pour induire l'accumulation des lipides.

Le résumé graphique de l'article est présenté en Annexe III (Figure-A III-1).

7.2 Abstract

This work focuses on a culture strategy that combines high biomass production and lipid accumulation in the green microalgae *Raphidocelis subcapitata* immobilized in alginate gel in order to obtain high lipid productivity for biodiesel production. The study of the effects of nitrogen and phosphorus deficiency on lipid accumulation and biomass production in

immobilized microalgae showed that both conditions (N⁻ and P⁻) promoted lipid accumulation in the microalgae. The lipid contents achieved under nitrogen (31.7 % ± 3.2 % (dcw)) and phosphorus (19.4 % ± 1.9 % (dcw)) deficiency conditions were higher than those obtained in the complete medium (control) (14.9 % ± 1.5 % (dcw)). The highest lipid productivity was recorded under nitrogen deficiency conditions (PL = 11.1 ± 1.1 mg/L/day). This indicated that nitrogen deficiency was more effective than phosphorus deficiency in terms of triggering lipid accumulation in the microalgae. However, the conditions for inducing lipid accumulation (N⁻ or P⁻) resulted in slower growth. In order to address this issue and achieve high lipid productivity, a two-step culture strategy was used. Immobilized *R. subcapitata* was cultivated under optimal concentrations of nitrogen and phosphorus to achieve a high biomass concentration. Thereafter, the beads containing the microalgae were transferred to a culture medium under nitrogen deficiency conditions in order to induce lipid accumulation. The concentrations 1.5 g/L of NaNO₃ and 20 mg/L of K₂HPO₄ were determined as being the optimal concentrations for growth, and they produced the highest biomass production rates ($\mu_{m \max} = 0.233 \pm 0.023 \text{ day}^{-1}$ and $\mu_{m \max} = 0.225 \pm 0.022 \text{ day}^{-1}$ for NaNO₃ and K₂HPO₄, respectively) from all of the concentrations studied. With the two-step culture strategy, immobilized *R. subcapitata* accumulated 37.9 ± 3.8 % of their dry weight in lipid and reached a lipid productivity value of PL = 40.3 ± 4.0 mg/L/day under nitrogen deficiency conditions. This value was approximately 3.6 times higher than that obtained in the direct culture of cells under nitrogen deficiency conditions (PL = 11.1 ± 1.1 mg/L/day).

Keywords : two-step strategy; *Raphidocelis subcapitata*; alginate gel; nitrogen; phosphorus; biomass; lipid content; lipid productivity; biodiesel

7.3 Introduction

The discovery of oil and coal deposits has served humans well; however, these will eventually be exhausted. In addition, the combustion of fossil fuels generates high greenhouse gas emissions, which are responsible for global warming (Bobin, Nifenecker, & Stéphan, 2021; Favennec, 2010; Fritz Dufour, 2018; Le Treut, 2015). Microalgal biomass appears to be a

promising solution for the production of renewable fuels, known as “biofuels” (Bonnefond et al., 2020; Bougaran & Saint-Jean, 2014; Nafe Aziz, Ibrahim, & Ahmed, 2018). As compared to higher plants, microalgae have many advantages as a source of biofuels, including biodiesel, for example: (1) their growth is about 50 times faster than that of terrestrial plants (Suali & Sarbatly, 2012); (2) they can produce 10 to 100 times more oil per hectare than oil crops (Chisti, 2007; Demirbas & Demirbas, 2010; Doré-Deschênes, 2009); (3) they are able to grow in seawater, brackish water, sewage, and on wasteland (Gouveia, 2011); their CO₂ sequestration is 10 to 50 times greater than that of terrestrial plants (Khan et al., 2009; Y. Li et al., 2008); (5) their cultivation does not require herbicides or pesticides (Rodolfi et al., 2009); (6) after oil extraction, residual biomass can be used as a fertilizer or food, or it can be fermented to produce methane or ethanol (Cardozo et al., 2007; Mata et al., 2010; Rodolfi et al., 2009; Sialve et al., 2009).

The biodiesel yield of microalgae depends essentially on their lipid content and biomass production. These are influenced by the growing conditions. Nitrogen deficiency is one of the most frequently used strategies to steer the metabolism of microalgae towards lipid accumulation (Jenck et al., 2011; Rodolfi et al., 2009; Taleb, 2015). Nitrogen is used by microalgae for protein synthesis. Under nitrogen deficiency conditions, the carbon fixed during photosynthesis is converted into lipid rather than proteins (Boileau, 2015; Falkowski & Raven, 2013; Richardson et al., 1969). It has also been shown that phosphorus deficiency can trigger lipid accumulation in microalgae (Khozin-Goldberg & Cohen, 2006; Roopnarain et al., 2014). However, the conditions for inducing lipid accumulation generally lead to slower growth (Mandal & Mallick, 2009; Rodolfi et al., 2009; Xin et al., 2010). To address this and achieve high lipid productivity, Rodolfi et al. (2009), as well as other researchers (Feng et al., 2012; Huntley & Redalje, 2007; Mandal & Mallick, 2009; Xin et al., 2010), proposed a two-step culture strategy. In the first stage, microalgae grow under optimal nitrogen and phosphorus supply conditions to obtain a high biomass concentration. In the second stage, microalgae are transferred to a culture medium under nitrogen or phosphorus deficiency conditions in order to induce lipid accumulation. This strategy has been the subject of many studies using free cultures of microalgae (Huntley & Redalje, 2007; Massart et al., 2010; Rodolfi et al., 2009;

Taleb, 2015). Although it promotes an increase in lipid production in the microalgae studied, its application with free cultures remains debatable. It should be noted that in the process of producing biodiesel with microalgae, cell harvesting is a limiting step because they are small, light, and diluted in water (Lee, Yoo, Jun, Ahn, & Oh, 2010; Suali & Sarbatly, 2012). Centrifugation is the most common method used for harvesting cells, but it is energy-consuming (Sander & Murthy, 2010; Suali & Sarbatly, 2012). In the two-step culture strategy using free cultures, the microalgae are collected by centrifugation and transferred to a medium deficient in nitrogen or phosphorus to trigger lipid accumulation. They are then collected again at the end of culturing to extract the lipid. This leads to an increase in the energy balance of the process, which drives up the price of the biodiesel produced. In order to increase the economic feasibility of the process, this study proposed the use of immobilized microalgae cultures. The immobilization of microalgae in polymer-based beads, such as alginate, for example, polycarboxylate extracted from brown algae, is a simple, gentle, and economical technique (Dulieu et al., 1999). The beads are large compared to free cells and are easily collected by simple sieving without consuming significant amounts of energy (Lam & Lee, 2012a).

It is in this context that the present study has been undertaken. Our objective was to use the two-step culture strategy in the green microalgae *Raphidocelis subcapitata* immobilized in alginate gel in order to obtain high lipid productivity for biodiesel production. Previous work carried out on *Rhaphidocelis subcapitata* immobilized in alginate gel and cultured in batch, under standard culture conditions, showed that it had potential for the production of biodiesel. It accumulated 24.7 ± 2.5 % of its dry weight in lipid when nitrates and phosphates were exhausted in the culture medium (the stationary phase) (Benasla & Hausler, 2020).

This study was divided into three parts: In the first part, the effects of nitrogen and phosphorus deficiency on lipid accumulation and biomass production in the immobilized microalgae were evaluated in order to determine the most effective trigger (N- or P-) for lipid accumulation in the microalgae. In the second part, the growth of *R. subcapitata* immobilized under different concentrations of nitrogen and phosphorus was studied in order to determine the optimal

concentrations of nitrogen and phosphorus to obtain a high biomass concentration in the first stage of cultivation. In the third part, the two-stage culture strategy was applied. Immobilized *R. subcapitata* was cultivated under optimal concentrations of nitrogen and phosphorus. Thereafter, the beads containing the microalgae were recovered by sieving and were transferred to a culture medium under nitrogen deficiency conditions (the trigger was chosen based on the results obtained in the first part) in order to induce lipid accumulation.

To the best of our knowledge, this is the first study to focus on the use of the microalgae *Raphidocelis subcapitata* immobilized in alginate gel in a two-stage culture process to obtain high lipid productivity for biodiesel production.

7.4 Materials and methods

7.4.1 Microalga and culture medium

The green microalgae *Raphidocelis subcapitata* were obtained from the culture collection of the Environment Canada laboratory (Montréal, QC, Canada). The microalgae culture medium consisted of five nutrient stock solutions. The detailed composition of the medium and its preparation protocol are published on the Environment Canada website (Centre des sciences et technologies environnementales, 2007). We note that we used 10 mL of each solution for the preparation of the culture medium and not 1 mL as described in the protocol. The pH of the medium was 7.5. The culture medium was sterilized using an autoclave (121 °C, 20 min).

In the experiments related to the growth of *R. subcapitata* immobilized under different nitrogen and phosphorus concentrations, the volumes taken from the NaNO₃ and K₂HPO₄ stock solutions were adjusted in order to obtain the final concentrations: 0 g/L, 0.25 g/L, 0.5 g/L, 1 g/L, 1.5 g/L, and 2 g/L in NaNO₃ and 0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L, and 60 mg/L in K₂HPO₄.

7.4.2 Immobilization of *R. subcapitata* cells in alginate beads

The immobilization of the microalgae in alginate beads was performed aseptically from a suspension of *R. subcapitata* in the exponential growth phase (biomass concentration of about 1 g/L), sterile sodium alginate solution 2 % (w/v) (sodium alginate (No. 71238), Sigma-Aldrich®, Oakville, ON, Canada), and sterile CaCl₂ gelling solution 1 % (w/v) (CaCl₂·2H₂O (No. 700912), Anachemia, Montreal, QC, Canada) (Benasla & Hausler, 2018; Moreira Dos Santos et al., 2002). The pellet recovered from the centrifugation (4000 rpm for 10 min) of the microalgae suspension (100 mL) was washed three times with sterile saline water (0.85 %). The microalgae were then resuspended in 50 mL of sterile saline water. A volume of 50 mL of sodium alginate solution was added to the microalgae suspension. The beads were formed using a sterile 20 mL syringe. The obtained mixture was expelled dropwise into the CaCl₂ solution. The beads produced were kept in this solution, under gentle stirring, for 30 min for hardening.

7.4.3 Culture conditions for immobilized microalgae

The immobilized microalgae cultures were placed in 2 L Erlenmeyer flasks that had previously been sterilized in an autoclave (121 °C, 20 min), containing 1 L of culture medium (sterile). The cultures were placed in a temperature-controlled chamber (INFORS HT Ecotron) to achieve standard culture conditions (Benasla & Hausler, 2020). They were incubated under a photoperiod of 24 h of light and 0 h of darkness (24/0; L/D). Determination of the biomass of immobilized microalgae.

7.4.4 Determination of the biomass of immobilized microalgae

The biomass concentrations of immobilized *R. subcapitata* were determined by measuring the dry weight after the dissolution of the beads in sterile sodium phosphate buffer (pH = 6.0), with a concentration of 50 mM (Benasla & Hausler, 2018; Voo et al., 2015). The cells were collected by filtration of the microalgae suspension through pre-weighed glass-fiber filters (Wathman filter, 1.2 µm). They were then washed with sterile distilled water. The filters

containing the microalgae were weighed after drying in an oven at 80 °C for 24 h (Benasla & Hausler, 2020; Del Río et al., 2015). The experiments were performed in duplicate.

7.4.5 Calculation of growth rate, generation time, and biomass productivity

The maximum biomass production rate ($\mu_{m \max}$) was calculated during the exponential growth phase, as follows (Lam & Lee, 2012a) :

$$\mu_{m \max} (\text{day}^{-1}) = \frac{\ln (B_2/B_1)}{t_2 - t_1} \quad (7.1)$$

where B_1 and B_2 are the biomass concentrations (g/L) at time t_1 and t_2 , respectively.

The biomass doubling time (G_m) was calculated according to the following formula (Clément-Larosière, 2012; Richmond, 2008) :

$$G_m = \ln 2 / \mu_{m \max} \quad (7.2)$$

The biomass productivity was calculated as follows (Gonçalves, Pires, & Simões, 2016) :

$$PB (\text{mg/L/day}) = \frac{B_x - B_0}{t_x - t_0} \quad (7.3)$$

where B_x and B_0 are the biomass concentrations (mg/L) at time t_x (the final day of cultivation) and t_0 (the first day of cultivation), respectively.

7.4.6 Extraction of total lipid from immobilized microalgae

Total lipid was extracted according to the “whole-cell analytical method” (WCA) of Van Vooren et al. (Benasla & Hausler, 2020; Van Vooren et al., 2012). The extraction was carried out with a mixture of chloroform/methanol solvents (2:1, v/v). Whole *R. subcapitata* cells were

recovered after the beads (10 beads) dissolved in the phosphate buffer, and the suspension was centrifuged (4000 rpm for 10 min). Before adding the solvents, 20 μL of butyl hydroxytoluene (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) were added to the pellet to prevent lipid oxidizing during extraction. The solvent mixture (6 mL) was added three times. After each addition, the tubes were vortexed (10 s) and placed in an ultrasound bath (BRANSON 5200, Fisher Scientific, Montréal, QC, Canada) for 30 s (Taleb, 2015). For complete lipid extraction, the tubes were placed on a pendulum for 6 h in the dark at room temperature. The extracted solvent was evaporated in an oven at 60 °C for 6 h. Finally, the tubes were weighed after cooling in the desiccator. The experiments were performed in duplicate. The rate of total lipid in the biomass was calculated as follows (Alam et al., 2019) :

$$\text{Percentage mass of total lipids \% (dcw)} = \frac{\text{Mass of total lipids extract (g)}}{\text{Dry weight of cells (g)}} \times 100 \quad (7.4)$$

7.4.7 Calculation of lipid productivity

The lipid productivity (LP) was calculated using the following formula (Alam et al., 2019) :

$$LP \text{ (mg/L/day)} = \frac{C_x B_x - C_0 B_0}{t_x - t_0} \quad (7.5)$$

where C_x and C_0 are the lipid contents of the microalgae (mg lipid/mg dry weight of cells) at time t_x (the final day of cultivation) and t_0 (the first day of cultivation), respectively. B_x is the biomass concentration (mg/L) at t_x , and B_0 (mg/L) is the biomass concentration at t_0 .

7.5 Results

7.5.1 The effects of nitrogen and phosphorus deficiency on lipid accumulation and biomass production in immobilized *R. subcapitata*

To assess the effects of nitrogen and phosphorus deficiency on lipid accumulation and biomass production in immobilized *R. subcapitata*, beads containing microalgae with initial biomass of between 0.082 and 0.09 g/L were inoculated into the following culture media: nitrogen-deficient medium (N-P+) (NaNO_3 concentration of 0 g/L; K_2HPO_4 concentration of 10.44 mg/L); phosphorus-deficient medium (N+P-) (K_2HPO_4 concentration of 0 mg/L; NaNO_3 concentration of 0.255 g/L); and complete medium, which constituted the control (N+P+) (NaNO_3 concentration of 0.255 g/L; K_2HPO_4 concentration of 10.44 mg/L, which are the standard concentrations of the culture medium). The results obtained are presented in Figure 7.1. The experiments were performed in batch and in duplicate.

The results show that nitrogen deficiency (N-P+) and phosphorus deficiency (N+P-) promoted lipid accumulation in the immobilized *R. subcapitata* microalgae, unlike the control (N+P+), which produced no significant increase in lipid content (Figure 7.1a). The latter increased from $13.1 \% \pm 1.3 \%$ (dcw) to $14.9 \pm 1.5 \%$ (dcw) at the end of culture. The highest lipid content ($31.7 \% \pm 3.2 \%$ (dcw)) was achieved when the microalgae were cultivated in an N-deficient culture medium (Table 7.1). In the P-deficient medium, the lipid content of $19.4 \% \pm 1.9 \%$ (dcw) was obtained (Table 7.1), which indicates that phosphorus deficiency is also an appropriate stimulant for lipid accumulation in immobilized *R. subcapitata* but is less effective than nitrogen deficiency.

The lipid productivity recorded under nitrogen deficiency ($\text{PL} = 11.1 \pm 1.1$ mg/L/day) (Table 7.1) was also the highest. However, the lipid productivity value obtained under phosphorus deficiency ($\text{PL} = 7.7 \pm 0.8$ mg/L/day) (Table 7.1) was lower than that obtained in the control medium (N+P+) ($\text{PL} = 9.1 \pm 0.9$ mg/L/day) (Table 7.1). This can be explained by the low biomass concentration achieved under phosphorus deficiency as compared to the control (Table 7.1). Indeed, the growth of *R. subcapitata* immobilized under nitrogen and

phosphorus deficiency exhibited a negative trend, which was more pronounced for nitrogen than phosphorus (Figure 7.1b and Table 7.1).

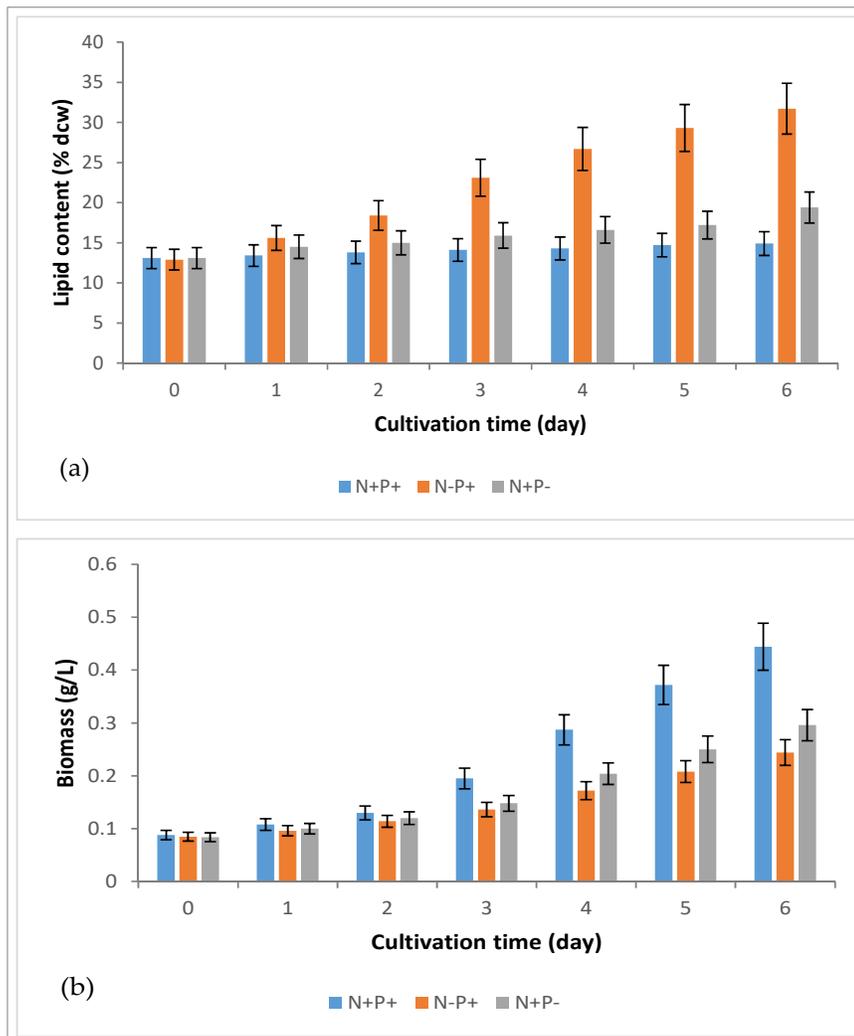


Figure 7.1 Effects of nitrogen and phosphorus deficiency on lipid accumulation and biomass production in *R. subcapitata* immobilized in alginate beads (experiments performed in batch and in duplicate) : (a) variations in lipid content per dry weight of cells; (b) variations in biomass; N+P+ (control, complete medium); N-P+ (nitrogen-deficient medium); N+P- (phosphorus-deficient medium); $t_0 = d_1$

Tableau 7.1 The lipid content (% dcw), biomass (g/L), biomass productivity (mg/L/day), and lipid productivity (mg/L/day) of immobilized *R. subcapitata* obtained under different culture conditions

Conditions of Culture	Lipid Content (% dcw)	Biomass (g/L)	Biomass Productivity (mg/L/day)	Lipid Productivity (mg/L/day)
N+P+ (control)	14.9 ± 1.5	0.444 ± 0.044	59.3 ± 5.9	9.1 ± 0.9
N-P+	31.7 ± 3.2	0.244 ± 0.024	26.5 ± 2.6	11.1 ± 1.1
N+P-	19.4 ± 1.9	0.296 ± 0.029	35.3 ± 3.5	7.7 ± 0.8

In the absence of nitrogen or phosphorus in the culture medium, microalgae use their internal reserves in these elements to compensate for this lack and to ensure certain cell divisions; photosynthesis then occurs but at a reduced rhythm compared to a culture where N and P are present in sufficient quantity. The rate of growth of microalgae in a medium deficient in nitrogen or phosphorus depends on the intracellular level of these elements (Rodolfi et al., 2009).

Our results are in accordance with other studies on various microalgae that demonstrate a high lipid content resulting from nitrogen deficiency conditions (Feng et al., 2012; Hu et al., 2008; Mandal & Mallick, 2009; Shifrin & Chisholm, 1981). Nitrogen is involved in the synthesis of essential cell structures and proteins. Nitrogen deficiency conditions cause an imbalance in the ratio of nitrogen and carbon. This imbalance results in the storage of excess carbon, which is fixed during photosynthesis as lipid or carbohydrates rather than as proteins (Richardson et al., 1969). Lipid accumulation under phosphorus deficiency conditions has also been observed in several species of microalgae, such as *Scenedesmus obliquus* (Mandal & Mallick, 2009), *Monodus subterraneus* (Khozin-Goldberg & Cohen, 2006), and *Isochrysis galbana* U4 (Roopnarain et al., 2014).

Various studies report that these high lipid production conditions (nitrogen and phosphorus deficiency) generally lead to slower growth (Mandal & Mallick, 2009; Rodolfi et al., 2009;

Xin et al., 2010). To address this and obtain high lipid productivity, we recall that the authors of Feng et al. (2012), Huntley et Redalje (2007), Mandal et Mallick (2009), Rodolfi et al. (2009) and Xin et al. (2010) suggested a two-step culture strategy. This involves an initial stage of biomass production under the conditions of optimal N and P supply, followed by a second stage inducing the accumulation of lipid under N or P deficiency conditions. It is this strategy that the present study aimed to utilize in order to increase lipid production in immobilized *R. subcapitata*. In view of the obtained results, nitrogen deficiency was determined to be the most effective trigger for lipid accumulation in immobilized microalgae.

In the following, the studied growth of immobilized *R. subcapitata* under different concentrations of nitrogen and phosphorus in order to determine the optimal concentrations of nitrogen and phosphorus in order to obtain a high biomass concentration in the first stage of cultivation is presented.

7.5.2 Growth of *R. subcapitata* immobilized under different concentrations of nitrogen and phosphorus

Figure 7.2 shows the growth curves of *R. subcapitata* immobilized in alginate beads under different concentrations of nitrogen and phosphorus.

The results of biomass production under different concentrations of NaNO₃ (Figure 7.2a) show that the lowest biomass was obtained with a concentration of 0 g/L of NaNO₃ ($\mu_{m \max} = 0.13 \pm 0.01 \text{ day}^{-1}$) (Figure 7.2a,b). Biomass production improved as the NaNO₃ concentration increased (0.25, 0.5, 1, and 1.5 g/L). However, a further increase in biomass was not obtained with a NaNO₃ concentration of 2 g/L (Figure 7.2a,b). The immobilized *R. subcapitata* produced the highest biomass production rate ($\mu_{m \max} = 0.233 \pm 0.023 \text{ day}^{-1}$) (Figure 7.2b) with a NaNO₃ concentration of 1.5 g/L.

Figure 7.2c shows the biomass production of *R. subcapitata* immobilized under different K₂HPO₄ concentrations. An increase in the biomass concentration was observed with all concentrations of K₂HPO₄ used. The highest production rate was obtained with a concentration

of 20 mg/L ($\mu_{m \max} = 0.225 \pm 0.022 \text{ day}^{-1}$), and the lowest ($\mu_{m \max} = 0.143 \pm 0.014 \text{ day}^{-1}$) was obtained with a concentration of 0 g/L (Figure 7.2d). For the 40 mg/L and 60 mg/L K_2HPO_4 concentrations, a decrease in the $\mu_{m \max}$ was observed.

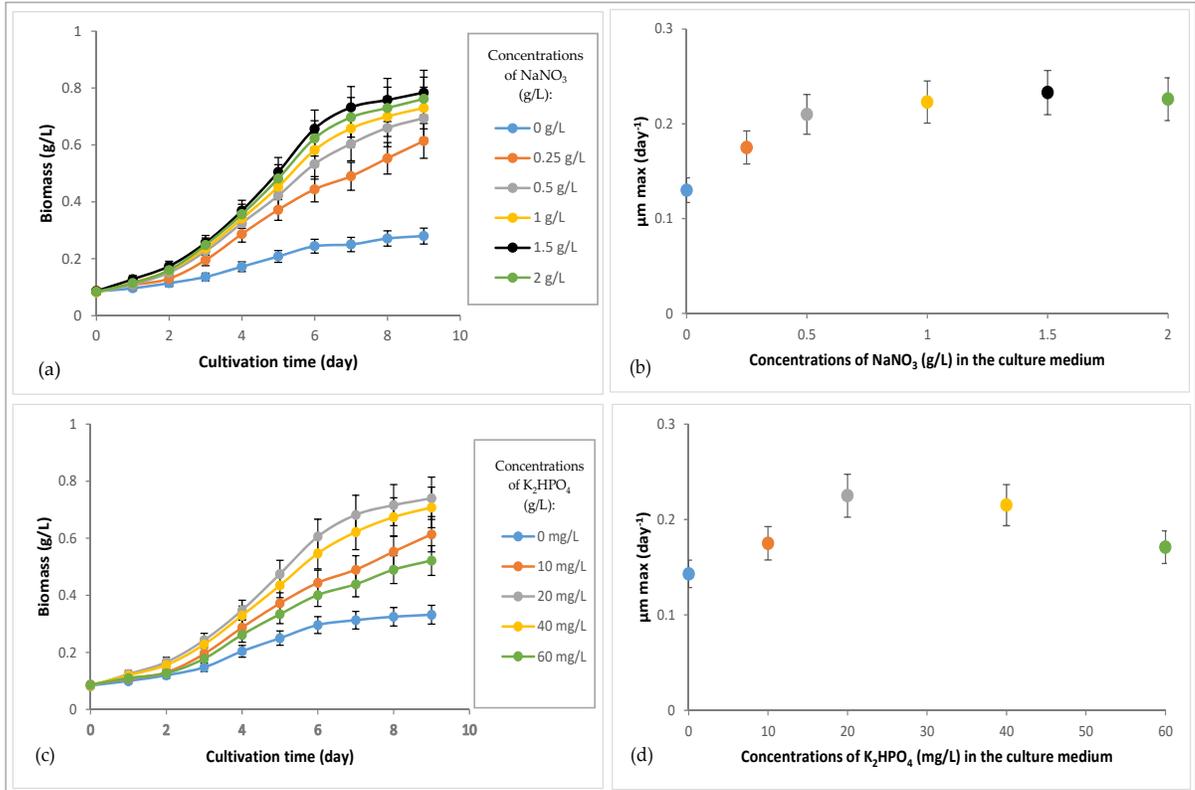


Figure 7.2 Growth of *R. subcapitata* immobilized in alginate beads under different concentrations of nitrogen and phosphorus, over a period of 10 days (experiments performed in batch and in duplicate) : (a) production of biomass under different concentrations of NaNO_3 (the concentration of K_2HPO_4 was 10.44 mg/L, which was the standard concentration of the culture medium); (b) production of biomass under different concentrations of K_2HPO_4 (the concentration of NaNO_3 was 0.255 g/L, which was the standard concentration of the culture medium); (c) maximum biomass production rate ($\mu_{m \max}$) of immobilized *R. subcapitata* as a function of different concentrations of NaNO_3 ; (d) maximum biomass production rate ($\mu_{m \max}$) of immobilized *R. subcapitata* as a function of different concentrations of K_2HPO_4 ; $t_0 = d_1$

Our results are consistent with other studies in that increasing the concentration of nitrogen and phosphorus in the culture medium stimulates the growth of microalgae. However, too high concentrations of these elements appear to inhibit growth (Bhola et al., 2011; Clément-

Larosière, 2012). One study showed that excess nitrogen could have a toxic effect, leading to a decline in microalgae (Golueke, Oswald, & Gee, 1967).

Considering the results obtained, the concentrations of 1.5 g/L of NaNO₃ and 20 mg/L of K₂HPO₄ were determined as the optimal concentrations and were used in the remainder of the study to obtain the maximum biomass production.

7.5.3 Two-Step culture of immobilized *R. subcapitata*

A two-step cultivation strategy was applied to increase the microalgae lipid productivity. The immobilized microalgae were cultivated under optimal growth conditions (concentrations of NaNO₃ and K₂HPO₄ were 1.5 and 20 mg/L, respectively) for 7 days to obtain the maximum biomass production, and then they were transferred to the N-deficient culture medium to trigger lipid accumulation. The results obtained are presented in Figure 7.3.

During the first culture step (optimal growth conditions), an increase in the quantity of biomass produced was observed from the first days (Figure 7.3a). A biomass production rate of $\mu_{m \max} = 0.288 \pm 0.028 \text{ day}^{-1}$ was recorded during the exponential growth phase, which corresponded to a doubling time of $G_m = 2.40 \pm 0.24$ days. The microalgae achieved biomass productivity of $PB = 103.0 \pm 10.3 \text{ mg/L/day}$. This value was approximately 1.7 times higher than that recorded under standard culture conditions ($PB = 59.3 \pm 5.9 \text{ mg/L/day}$) (Table 7.1 (N+P+)). Figure 7.3c shows the appearance of the alginate beads containing the *R. subcapitata* cells at the beginning and end of this step. With regard to lipid production in this first culture step (Figure 7.3b), a slight increase in the lipid content was observed, increasing from approximately $13.3 \% \pm 1.3 \% \text{ (dcw)}$ (1st day) to $16.7 \% \pm 1.7 \% \text{ (dcw)}$ (7th day), with a lipid productivity value of $PL = 17.7 \pm 1.7 \text{ mg/L/day}$. This lipid productivity value was approximately 1.9 times higher than that obtained under standard culture conditions ($PL = 9.1 \pm 0.9 \text{ mg/L/day}$) (Table 7.1 (N+P+)). This increase was due to the high biomass concentration achieved under optimal growth conditions.

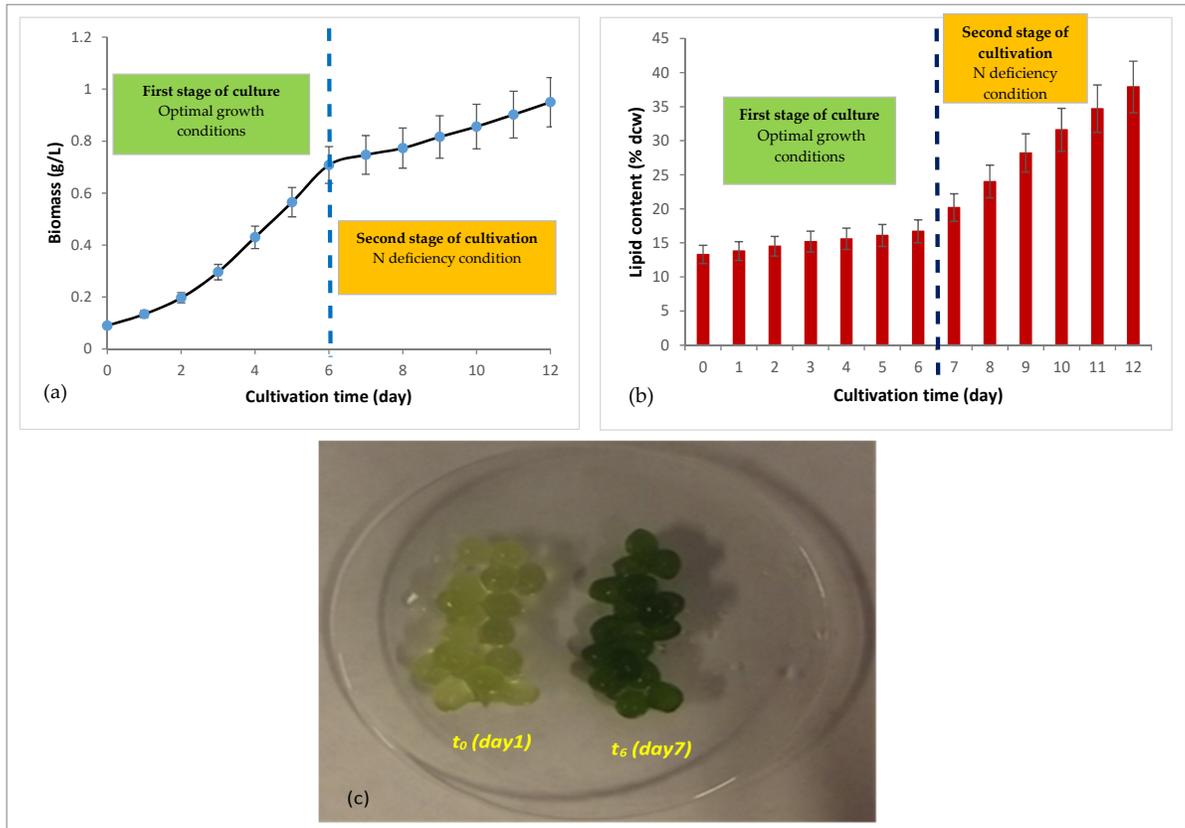


Figure 7.3 Two-step culture of *R. subcapitata* immobilized in alginate beads (experiments performed in duplicate) : (a) biomass production; (b) accumulation of total lipid; (c) appearance of alginate beads containing *R. subcapitata* cells at the beginning and end of the first stage of culture; at t_6 (d7), the immobilized microalgae were transferred to the N-deficient medium; $t_0 = d_1$

When the beads containing the microalgae were transferred to the N-deficient culture medium (7th day), a slowing of the growth was observed for the first 3 days (Figure 7.3a, second culture step). This can be explained by the fact that the immobilized microalgae suffered a shock (sudden nitrogen deficiency), and thus they needed time to adapt to the new growing conditions. After this adaptation period, an increase in biomass production was noted. With regard to lipid production, their accumulation was triggered from the onset of N deficiency (Figure 7.3b, second step). The immobilized *R. subcapitata* accumulated 37.9 ± 3.8 % of their dry weight in lipid and reached a lipid productivity value of $PL = 40.3 \pm 4.0$ mg/L/day, under nitrogen deficiency.

Using this two-step culture strategy, the lipid productivity of immobilized *R. subcapitata* (under nitrogen deficiency) increased by a factor of 3.6 as compared to the direct culture of cells under nitrogen deficiency (PL = 11.1 ± 1.1 mg/L/d) (Table 7.1 (N-P+)). Our results are superior to those obtained from other microalgae species, such as *Tetraselmis suecica*, in which the two-step culture strategy provided a lipid productivity PL = 18.1 mg/L/d (Go, Lee, Jeong, & Kim, 2012). This shows that the immobilized *R. subcapitata* is a promising candidate for biodiesel production.

7.6 Conclusion

In the present study, a culture strategy combining high biomass production and lipid accumulation was applied to the immobilized microalgae *R. subcapitata* in order to achieve high lipid productivity for biodiesel production. In the first step, the immobilized microalgae were cultivated under optimal nitrogen and phosphorus supply conditions (1.5 g/L NaNO₃, 20 mg/L K₂HPO₄) in order to achieve a high biomass concentration. Then, the beads containing the microalgae were transferred to an N-deficient culture medium (the most effective trigger) to induce lipid accumulation.

As a result of the two-step culture strategy, immobilized *R. subcapitata* accumulated 37.9 ± 3.8 % of their dry weight in lipid and reached a lipid productivity value of PL = 40.3 ± 4.0 mg/L/day, under nitrogen deficiency. This value was approximately 3.6 times higher than that obtained from the direct culture of cells under nitrogen deficiency (PL = 11.1 ± 1.1 mg/L/day). The results obtained show that immobilized *R. subcapitata* is a promising candidate for biodiesel production. This work is the first step in the process of optimizing the lipid productivity of immobilized microalgae. Additional experiments are needed to optimize other growing parameters, such as lighting. Indeed, light plays an important role in the culture of microalgae. Therefore, determining the optimal light intensity and appropriate light cycles for immobilized *R. subcapitata* would improve its biomass yield and lipid productivity.

CHAPITRE 8

DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce chapitre revient sur l'originalité des travaux et leur apport au domaine de la culture des microalgues pour la production de lipides. Ensuite, les retombées du projet et les perspectives de continuité de la recherche sont décrites.

8.1 Contributions originales du projet

Le projet présent visait l'étude de l'immobilisation de la microalgue d'eau douce *Raphidocelis subcapitata* dans des billes d'alginate pour produire une quantité élevée de lipides. Le premier article a permis de déterminer les concentrations en alginate et en CaCl_2 qui assurent la stabilité des billes et favorisent la croissance des cellules de *R. subcapitata* pendant 10 jours de culture. Le deuxième article a montré que *R. subcapitata* immobilisée était en mesure d'accumuler les lipides sous conditions de stress. Enfin, le troisième article a mis en évidence qu'il était possible d'augmenter sa productivité lipidique par une stratégie de culture en deux étapes. De façon complémentaire, les résultats des trois articles ont permis d'atteindre l'objectif général du projet. De même, ces résultats apportent de nouvelles informations sur la microalgue *R. subcapitata*. Cette étude est la première à se concentrer sur l'utilisation de la culture immobilisée de cette microalgue pour la production de lipides.

Sur le plan méthodologique, l'étude montre qu'il est possible d'utiliser le NaCl à une faible concentration dans la composition des billes sans altérer la viabilité de *R. subcapitata* qui est une espèce d'eau douce. Par ailleurs, elle propose une méthode pour calculer le nombre de cellules de microalgues immobilisées par litre de milieu de culture. Cette méthode n'a pas été décrite dans la littérature (Canbay et al., 2018; Kadimpati et al., 2013; Kiani et al., 2021; Kube et al., 2021; Moreira Dos Santos et al., 2002; Nazos & Ghanotakis, 2021; Alejandro Ruiz-Marin et al., 2020; Rushan et al., 2020) et pourrait être appliquée pour exprimer la croissance de n'importe quelle espèce de microalgue immobilisée dans des billes d'alginate (par volume de milieu de culture utilisé) quelle que soit l'application envisagée. Enfin, cette étude souligne

l'avantage de l'utilisation de la stratégie de culture en deux étapes avec la culture immobilisée pour augmenter la productivité lipidique des microalgues.

8.1.1 Méthode d'immobilisation de *R. subcapitata*

La technique d'immobilisation des cellules de *R. subcapitata* dans des billes d'alginate était basée sur celle décrite par Moreira Dos Santos et al. (2002), avec quelques modifications. Dans cette méthode, le culot de microalgues est mis en suspension dans le milieu de croissance de microalgues avant de le mélanger avec la solution d'alginate. Le mélange est ensuite introduit dans une seringue et expulsé goutte à goutte dans la solution de CaCl₂. Dans ce cas, les billes contiennent dès le départ une certaine concentration de nutriments. Dans la présente étude, le meilleur était de fabriquer des billes sans aucune trace de nutriments afin de s'assurer que la croissance de *R. subcapitata* était bien due au transfert de nutriments du milieu extérieur (milieu de culture) et de confirmer la perméabilité des billes. Pour cela, le culot de *R. subcapitata* a été lavé trois fois avec une solution de NaCl (pour éliminer toute trace du milieu de culture), puis remis en suspension dans cette solution avant son mélange avec la solution d'alginate. Théoriquement, le NaCl à des concentrations élevées peut altérer la viabilité d'une microalgue d'eau douce. Pour éviter un stress salin chez *R. subcapitata*, le NaCl a été utilisé à une faible concentration (0.85 %). L'utilisation de l'eau distillée pour la remise en suspension du culot a été évitée puisqu'elle peut entraîner le gonflement des cellules (turgescence) ce qui conduit à leur éclatement. Lorsque la pression osmotique dans le milieu extracellulaire est inférieure à celle du milieu intracellulaire (vacuole), l'eau passe à travers la membrane cytoplasmique du milieu hypotonique (eau distillée) vers le milieu hypertonique (vacuole), la vacuole se remplit alors d'eau et la cellule gonfle. L'utilisation d'une solution de NaCl (0.85 %) permet de maintenir l'équilibre, puisque le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire ont des pressions osmotiques comparables. Dans ce cas, le volume d'eau qui pénètre dans la vacuole est égal à celui qui en sort, les cellules conservent donc leur forme (Pigault, 2010). Les essais préliminaires ont montré que *R. subcapitata* était capable de croître en présence de NaCl (0.85 %) et la remise en suspension du culot de microalgues dans 50 mL de NaCl (0.85 %) et son mélange avec 50 mL de solution d'alginate a permis d'obtenir des

billes de transparence élevée à la lumière ce qui est un avantage pour la culture des microalgues immobilisées.

8.1.2 Avantages de l'utilisation de stratégie de culture en deux étapes avec la culture immobilisée des microalgues

L'utilisation de stratégie de culture en deux étapes avec la culture libre a fait l'objet de nombreux travaux de recherche (Huntley & Redalje, 2007; Massart et al., 2010; Rodolfi et al., 2009). Bien qu'elle ait permis une augmentation de la production des lipides chez les microalgues étudiées, son application reste discutable puisqu'elle conduit à une augmentation du bilan énergétique du procédé. En effet, après la première étape de culture dans des conditions optimales de croissance, les microalgues en suspension sont collectées par centrifugation pour être transférées dans un milieu carencé en azote ou en phosphore pour déclencher l'accumulation des lipides, puis elles sont collectées encore une fois en fin de culture pour les extraire. L'utilisation de la culture immobilisée comme le propose cette étude avec *R. subcapitata* permet une réduction du coût énergétique du procédé. Les billes sont collectées par un simple tamisage à la fin de chaque étape. Ainsi, le volume de la suspension de microalgues à centrifuger après la dissolution des billes pour l'extraction des lipides à la fin de culture sera réduit. En effet, le volume de tampon phosphate utilisé pour dissoudre les billes et libérer les cellules est réduit par rapport à la centrifugation de tout le milieu de culture dans le cas de culture libre de microalgues.

8.2 Intérêts et retombées du projet

Cette étude a permis d'apprendre à maîtriser la culture de la microalgue *R. subcapitata* dans des billes d'alginate pour une longue durée (10 jours) sans altérer sa viabilité et à produire une quantité élevée de lipides. Selon leur composition, ces lipides peuvent être convertis en biodiesel ou utilisées pour la production d'aliments et d'autres bioproduits. La production des lipides chez *R. subcapitata* libre a été déjà étudiée (Gonçalves et al., 2013), mais la récolte de la biomasse à partir du milieu de culture est coûteuse en énergie. L'intégration de la technologie

d'immobilisation dans la culture de cette microalgue pour la production des lipides comme le propose ce travail pour la première fois a permis de faciliter sa récolte. Les industriels peuvent commencer à cultiver *R. subcapitata* dans des billes d'alginate à grande échelle et d'ajuster par la suite les conditions de culture, à mesure que de nouveaux résultats sont générés. De cette manière, le système de culture sera amélioré en continu, ce qui encourage l'innovation technologique sur le long terme.

8.3 Recommandations

Les résultats obtenus dans ce projet laissent entrevoir d'autres pistes pour augmenter davantage la productivité lipidique de *R. subcapitata* immobilisée. Il est connu que la lumière joue un rôle important dans la culture des microalgues photosynthétiques et elle a aussi un effet sur le métabolisme des lipides (Breuer et al., 2013; Hu et al., 2008; Pal et al., 2011; Takeshita et al., 2014; Vitova et al., 2015; Wahidin et al., 2013). Il serait pertinent de chercher à augmenter la productivité lipidique de *R. subcapitata* immobilisée en variant l'intensité lumineuse et le cycle de lumière. Ainsi, il convient de déterminer la composition en acides gras des lipides afin de cibler le domaine d'application. Enfin, une transition à une échelle semi-industrielle puis industrielle serait souhaitable.

8.4 Perspectives

Une première perspective de recherche vise à réaliser une analyse du procédé de production de lipides chez les microalgues immobilisées pour cibler les éléments à améliorer afin de réduire les coûts de production. À titre d'exemple, dans un système de production de lipides en continu, les billes doivent être renouvelées chaque fois qu'elles sont saturées de cellules de microalgues, ce qui augmenterait les coûts du procédé et réduirait l'attractivité économique de la technologie. Pour réduire les coûts de fabrication des billes, il est suggéré de recycler une partie des microalgues (Cao et al., 2022) et de récupérer l'alginate, après dissolution des billes dans le tampon phosphate de sodium, pour refaire de nouvelles billes. Dans une étude portant sur le traitement des eaux usées par des microalgues immobilisées, Murujew et al. (2021) ont

montré qu'il est possible de récupérer jusqu'à 70 % d'alginate après dissolution des billes. Ainsi, l'utilisation de billes d'algues fabriquées à partir d'alginate recyclé et vierge a conduit à des taux d'élimination comparables d'azote et du phosphore des eaux usées. Toutefois, les billes fabriquées d'alginate recyclé ont montré une résistance mécanique inférieure à celle des billes fabriquées d'alginate vierge. Pour augmenter leur résistance, il est possible d'ajouter une certaine quantité d'alginate vierge. L'étude a montré que la récupération de l'alginate peut entraîner une réduction nette des coûts de 60 %. Il serait alors intéressant de tester cette technique avec *R. subcapitata* immobilisée pour réduire les coûts de production des lipides.

Il serait aussi intéressant de coupler la culture de *R. subcapitata* immobilisée avec le traitement des eaux et le recyclage du CO₂ industriel comme l'a réalisé Cao et al. (2022) avec *Chlorella vulgaris* (FACHB-8). Ceci permettrait de proposer un processus intégré de culture de la microalgue immobilisée, de recyclage des eaux usées et du CO₂ industriel, de production de lipides, et ce, suivant une récolte aisée des microalgues.

CONCLUSION

Ce projet s'est intéressé à l'étude de l'immobilisation de la microalgue d'eau douce *Raphidocelis subcapitata* dans des billes d'alginate pour produire une quantité élevée de lipides. Selon leur composition, ces derniers peuvent être utilisés pour produire du biodiesel, des aliments ou d'autres bioproduits. Le travail a été divisé en trois parties.

La première partie s'est intéressée à l'étude de la croissance de la microalgue et la stabilité des billes sous différentes concentrations en alginate (1 %, 1,5 % et 2 %) et en CaCl₂ (0,2 %, 0,5 % et 1 %). Les résultats ont montré que l'alginate et les cations Ca²⁺ ne contribuent pas directement à la croissance des cellules de microalgues mais jouent un rôle important dans la préservation de l'intégrité des billes, leur protection de la dissolution et dans le transfert des nutriments et du CO₂. La croissance la plus élevée ($3,92 \times 10^6 \pm 0,39$ cellules/billes) a été obtenue avec les concentrations d'alginate 1,5 % et de CaCl₂ 0,2 %. Cependant, les billes ont commencé à rétrécir et ont entraîné un relargage de cellules dans le milieu de culture après le 8^e jour. De toutes les combinaisons étudiées, la combinaison 2 % alginate et 1 % CaCl₂ a été la meilleure, car elle a assuré la stabilité des billes et la croissance de la microalgue pendant les 10 jours de culture, avec une faible concentration de cellules libres détectées dans le milieu de culture. Ces concentrations ont été alors déterminées comme concentrations optimales pour l'immobilisation de *R. subcapitata*. Ainsi, une méthode de calcul du nombre de cellules de *R. subcapitata* immobilisées par litre de milieu de culture a été développée dans ce projet. Cette méthode pourrait être appliquée pour exprimer la croissance de n'importe quelle espèce de microalgue immobilisée dans des billes d'alginate (par volume de milieu de culture utilisé) quelle que soit l'application envisagée.

Après la détermination des conditions optimales d'immobilisations, la capacité de la microalgue immobilisée à accumuler les lipides a été évaluée. La production de biomasse et de lipides chez la microalgue a été quantifiée durant sa culture en *batch*, avec suivi des concentrations en azote et en phosphore dans le milieu de culture. Les résultats ont montré que

R. subcapitata immobilisée était capable d'accumuler $24,7 \pm 2,5$ % de son poids sec en lipides lorsque les nitrates et les phosphates étaient épuisés dans le milieu de culture. Une productivité lipidique $PL = 29,8 \pm 3,0$ mg/L/jour a été enregistrée durant la phase stationnaire de croissance.

La dernière partie du travail s'est concentrée sur l'optimisation des conditions de culture de la microalgue immobilisée pour améliorer sa productivité lipidique. Dans un premier temps, les effets des carences en azote et en phosphore sur l'accumulation des lipides et la production de biomasse ont été évalués individuellement. Les résultats ont montré que la carence en azote et en phosphore favorisent l'accumulation des lipides dans la microalgue, mais la carence en azote est plus efficace que la carence en phosphore. Une teneur en lipides de $31,7 \pm 3,2$ (% MS) et une productivité lipidique $PL = 11,1 \pm 1,1$ mg/L/jour ont été observées sous carence en N contre une teneur en lipides de $19,4 \pm 1,9$ % (% MS) et une productivité lipidique $PL = 7,7 \pm 0,8$ mg/L/jour sous carence en P. Néanmoins, ces conditions d'induction de l'accumulation des lipides (N-ou P-) ont entraîné un ralentissement de la croissance. Pour résoudre cette difficulté et augmenter la productivité lipidique de la microalgue, une stratégie a été appliquée en deux étapes. *R. subcapitata* immobilisée a d'abord été cultivée dans des conditions d'apports optimales en N et P ($1,5$ g/L NaNO_3 , 20 mg/L K_2HPO_4) pour l'obtention d'une production maximale en biomasse, puis les billes ont été transférées dans un milieu de culture avec carence en azote pour induire l'accumulation des lipides. Par cette stratégie de culture, *R. subcapitata* immobilisée a atteint $37,9 \pm 3,8$ % de son poids sec en lipides et une productivité lipidique de $PL = 40,3 \pm 4,0$ mg/L/jour sous carence en N. Cette valeur est environ 3,6 fois supérieure à celle obtenue dans la culture directe des cellules sous carence en N ($PL = 11,1 \pm 1,1$ mg/L/jour).

Dans l'ensemble, les résultats obtenus ont permis d'atteindre l'objectif général du projet et laissent entrevoir d'autres pistes pour augmenter davantage la productivité lipidique de *R. subcapitata* immobilisée. Il serait intéressant d'améliorer le rendement en biomasse de la microalgue et sa productivité lipidique en variant l'intensité lumineuse et le cycle de lumière. Il convient aussi de passer à une échelle semi-industrielle puis industrielle.

Par ailleurs, une analyse du procédé de production des lipides chez les microalgues immobilisées est nécessaire pour cibler les éléments à améliorer afin de réduire les coûts de production. Par exemple, pour réduire les coûts de fabrication des billes dans un système de production en continu, il est suggéré de récupérer l'alginate, après dissolution des billes, et de recycler une partie des microalgues pour refaire de nouvelles billes.

Enfin, il serait intéressant de coupler la culture de *R. subcapitata* immobilisée avec le traitement des eaux et le recyclage du CO₂ industriel. Ceci permettrait de proposer un processus intégré de culture de la microalgue immobilisée, de recyclage des eaux usées et du CO₂ industriel, de production de lipides, et ce, suivant une récolte aisée des microalgues.

ANNEXE I

RÉSUMÉ GRAPHIQUE ARTICLE 1

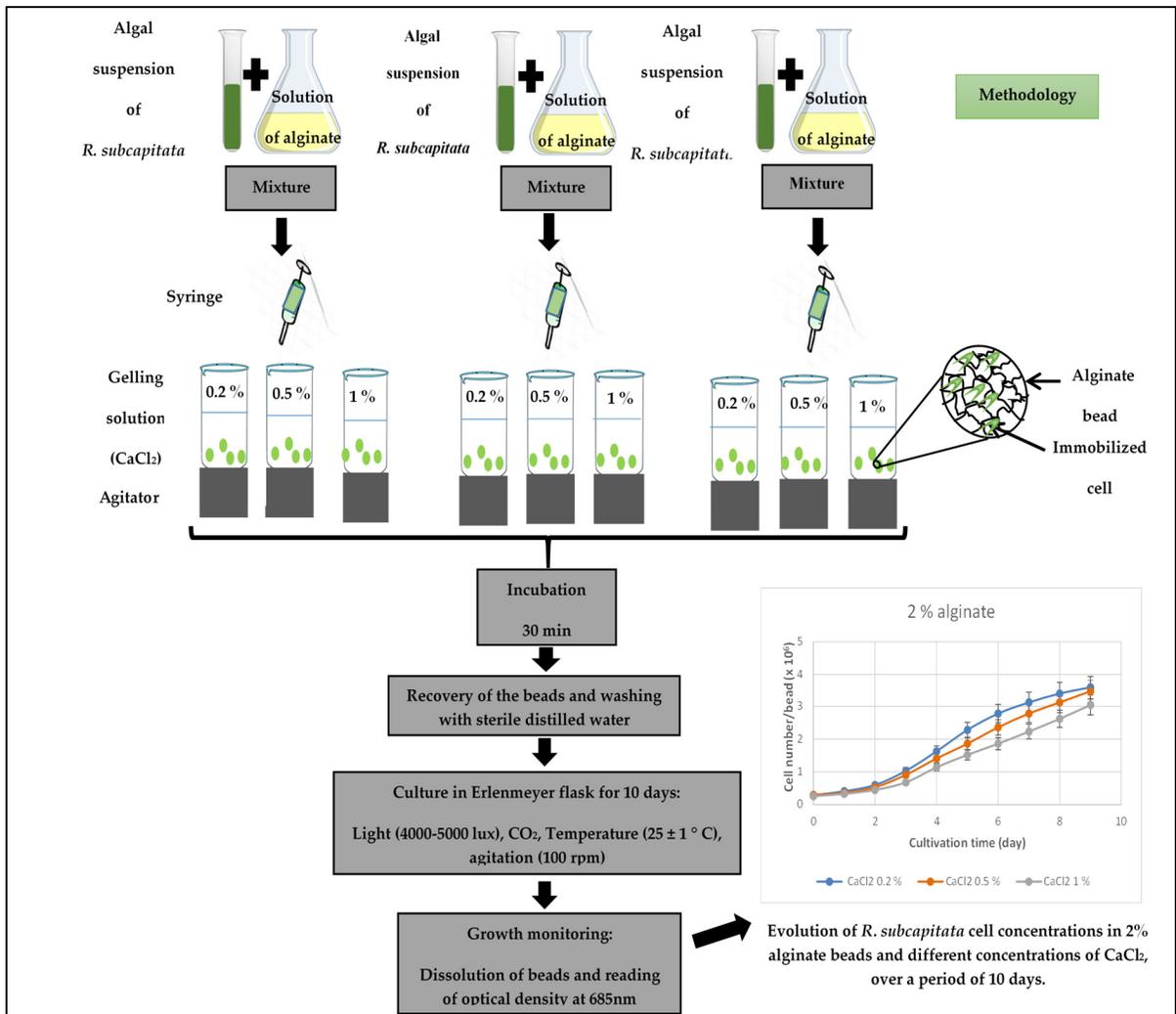


Figure-A I-1 Résumé graphique article 1

ANNEXE II

RÉSUMÉ GRAPHIQUE ARTICLE 2

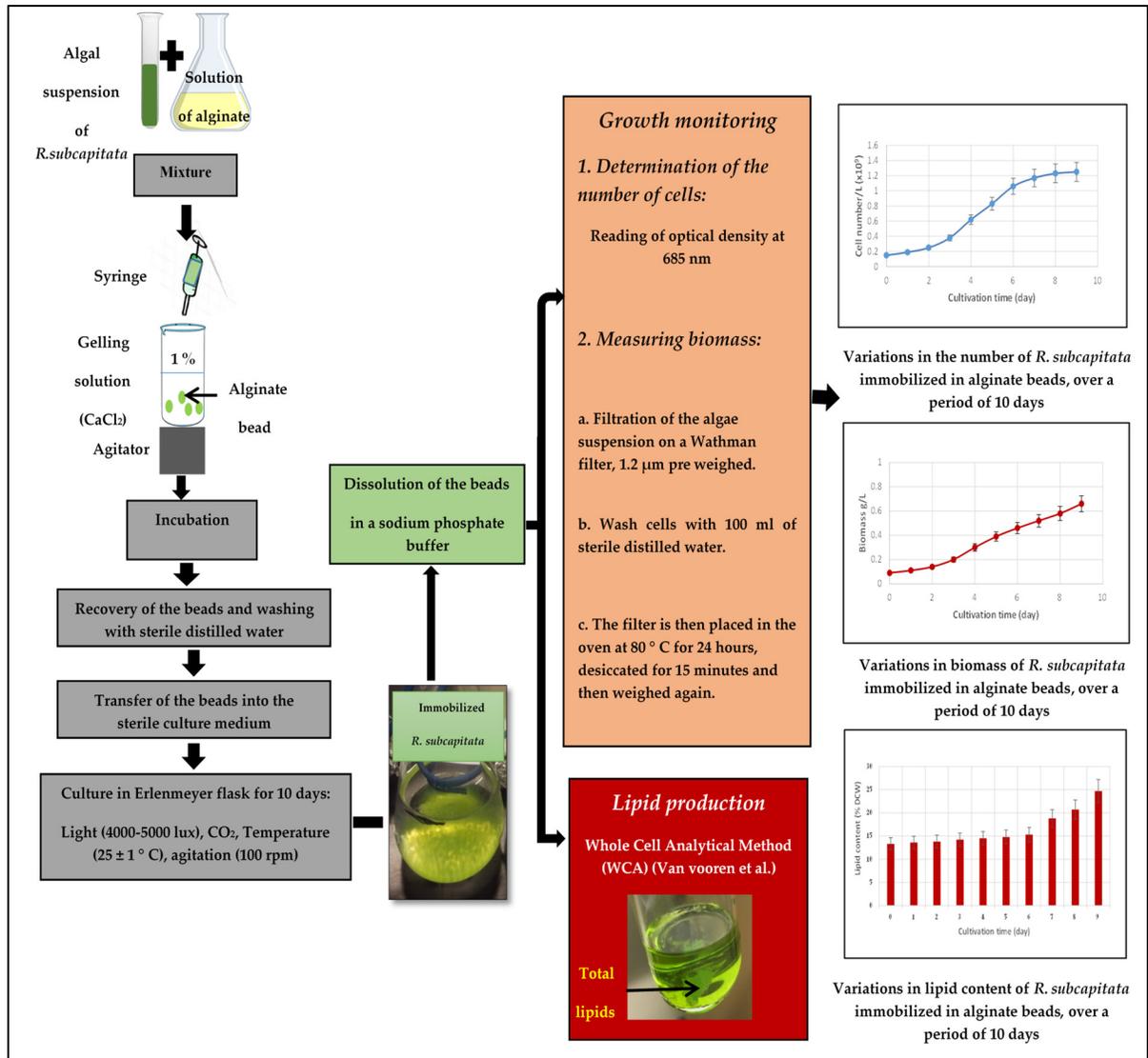


Figure-A II-1 Résumé graphique article 2

ANNEXE III

RÉSUMÉ GRAPHIQUE ARTICLE 3

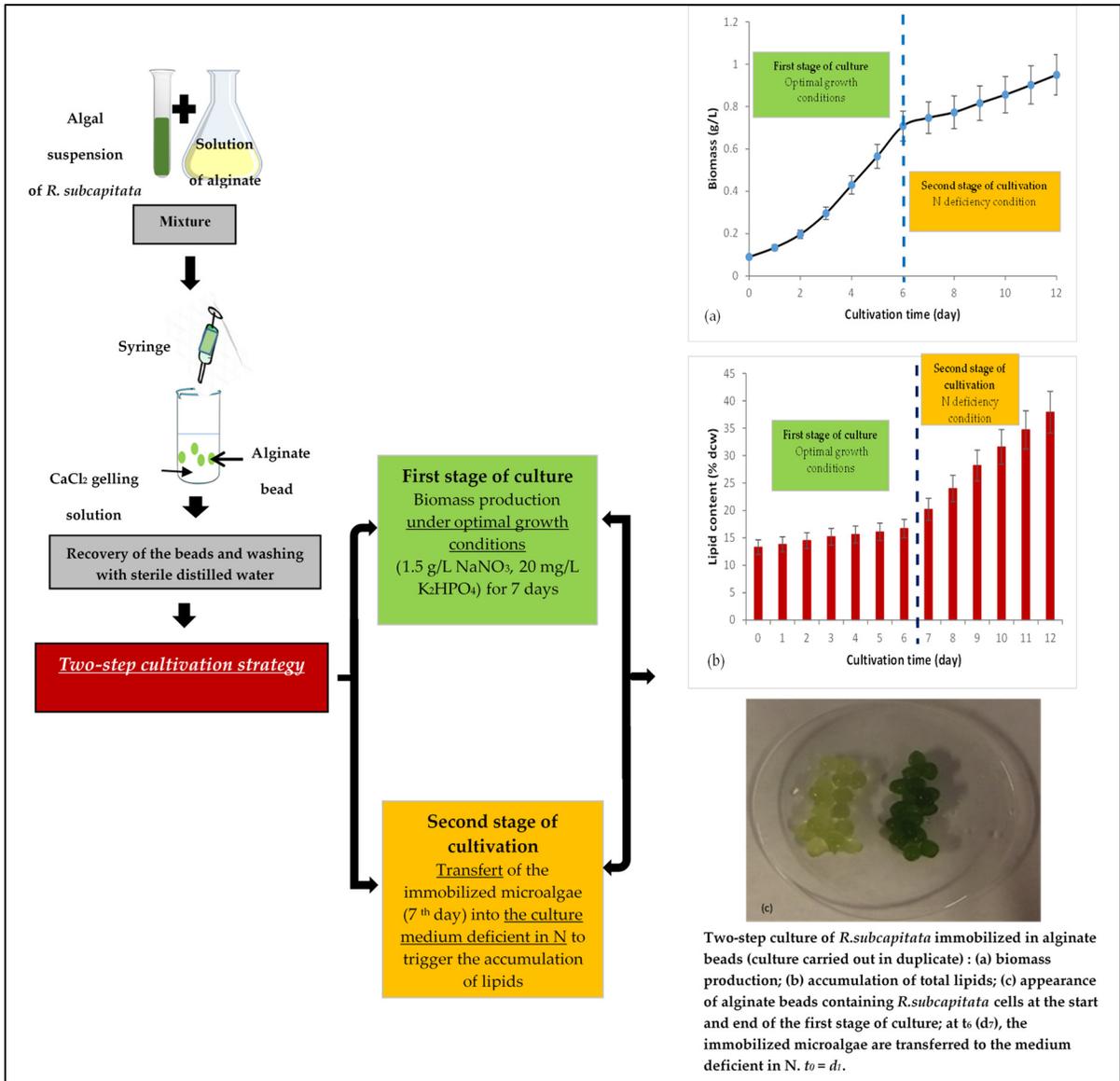


Figure-A III-1 Résumé graphique article 3

LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abasalizadeh, F., Moghaddam, S. V., Alizadeh, E., Kashani, E., Fazljou, S. M. B., Torbati, M., & Akbarzadeh, A. (2020). Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. *Journal of biological engineering*, 14(1), 1-22. doi: <https://doi.org/10.1186/s13036-020-0227-7>
- Abe, K., Matsumura, I., Imamaki, A., & Hirano, M. (2003). Removal of inorganic nitrogen sources from water by the algal biofilm of the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 325-328. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1023657310004>
- Adam, S., Kumar, P., Santhanam, P., Kumar, S., & Prabhavathi, P. (2015). Bioremediation of tannery wastewater using immobilized marine microalga *Tetraselmis* sp.: experimental studies and pseudo-second order kinetics. *J Mar Biol Oceanogr* 4, 1, 2. Repéré à <https://www.researchgate.net/publication/277341333>
- Adetya, N. P., Arifin, U. F., & Anggriyani, E. (2021). The removal of chromium (VI) from tannery waste using *Spirulina* sp. immobilized silica gel. *Turkish Journal of Chemistry*, 45(6), 1854-1864. doi: <https://doi.org/10.3906/kim-2106-22>
- Aguilar-May, B., & del Pilar Sánchez-Saavedra, M. (2009). Growth and removal of nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of the marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Journal of applied phycology*, 21(3), 353-360. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9376-7>
- Ahmed, N. B., Masse, S., Laurent, G., Piquemal, J.-Y., Yéprémian, C., Brayner, R., & Coradin, T. (2018). Optical microalgal biosensors for aqueous contaminants using organically doped silica as cellular hosts. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410(4), 1205-1216. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0405-8>
- Ait Bellah, L., Baldini, L., Béchu, T., Braconnier, C., Damar, J., Ferré, A.-S., . . . Vidal, M. (2014). LES MICRO-ALGUES, une usine photo-synthétique pour le recyclage du CO₂ et la production de biocarburants? (Rapport de projet professionnel) Repéré à <https://www.scribd.com/document/329131794/Les-Micro-Algues>
- Akhtar, N., Iqbal, J., & Iqbal, M. (2004). Removal and recovery of nickel (II) from aqueous solution by *loofa* sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies. *Journal of hazardous materials*, 108(1-2), 85-94. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.01.002>

- Akhtar, N., Iqbal, M., Zafar, S. I., & Iqbal, J. (2008). Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in *loofa* sponge for removal of Cr (III). *Journal of Environmental Sciences*, 20(2), 231-239. doi: [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)60036-4](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)60036-4)
- Alam, M. M., Mumtaz, A. S., Russell, M., Grogger, M., Veverka, D., & Hallenbeck, P. C. (2019). Isolation and Characterization of Microalgae from Diverse Pakistani Habitats: Exploring Third-Generation Biofuel Potential. *Energies*, 12(14), 2660. doi: <https://doi.org/10.3390/en12142660>. Repéré à <https://www.mdpi.com/1996-1073/12/14/2660>
- Amsden, B. (1998). Solute diffusion in hydrogels.: An examination of the retardation effect. *Polymer Gels and Networks*, 6(1), 13-43. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-7822\(97\)00012-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-7822(97)00012-9)
- André, J.-C. (2003). Sur la crédibilité des conséquences de l'effet de serre. *Comptes Rendus Geoscience*, 335(6-7), 503-507. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1631-0713\(03\)00099-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1631-0713(03)00099-3)
- Antal, T. K., Kukarskikh, G. P., Volgusheva, A. A., Krendeleva, T. E., Tyystjärvi, E., & Rubin, A. B. (2016). Hydrogen photoproduction by immobilized S-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*: Effect of light intensity and spectrum, and initial medium pH. *Algal Research*, 17, 38-45. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.009>
- Aslani, P., & Kennedy, R. A. (1996). Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. *Journal of controlled release*, 42(1), 75-82. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(96\)01369-7](https://doi.org/10.1016/0168-3659(96)01369-7)
- Aydinoğlu, D., Şen, S., Helvacıoğlu, E., Nugay, T., & Nugay, N. (2013). Tuning of heavy metal removal efficiency from water via micro algae/hydrogel composites. *E-polymers*, 13(1). doi: <https://doi.org/10.1515/epoly-2013-0116>
- Ayehunie, S., Belay, A., Baba, T. W., & Ruprecht, R. M. (1998). Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: official publication of the International Retrovirology Association*, 18(1), 7-12. doi: <https://doi.org/10.1097/00042560-199805010-00002>
- Bahlawan, S., Ash, Z., Damayanti, A., Putri, A., Dewi, R., Triwibowo, B., & Prasetiawan, H. (2022). Comparative Study on the Various Hydrolysis and Fermentation Methods of *Chlorella vulgaris* Biomass for the Production of Bioethanol. *International Journal of Renewable Energy Development*, 11(2). Repéré à https://www.researchgate.net/publication/359101964_Comparative_Study_on_the_Various_Hydrolysis_and_Fermentation_Methods_of_Chlorella_vulgaris_Biomass_for_the_Production_of_Bioethanol

- Ballerini, D. (2011). *Les biocarburants: répondre aux défis énergétiques et environnementaux des transports*. Editions Technip. Repéré à https://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=Fbu4N8Dq80QC&oi=fnd&pg=PA343&dq=production+de+biom%C3%A9thane+%C3%A0+partir+des+microalgues&ots=XfdZ7QoGwl&sig=V7von8poX7GXq93PUhOoBDU01tY&redir_esc=y#v=onepage&q=production%20de%20biom%C3%A9thane%20%C3%A0%20partir%20des%20microalgues&f=false
- Barquilha, C. E., Cossich, E. S., Tavares, C. R., & da Silva, E. A. (2019). Biosorption of nickel and copper ions from synthetic solution and electroplating effluent using fixed bed column of immobilized brown algae. *Journal of Water Process Engineering*, 32, 100904. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100904>
- Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1489-1500. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>
- Bayat, Z., Hassanshahian, M., & Cappello, S. (2015). Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments: a mini review. *The open microbiology journal*, 9, 48. doi: <https://doi.org/10.2174%2F1874285801509010048>
- Beardall, J., Johnston, A., & Raven, J. (1998). Environmental regulation of CO₂-concentrating mechanisms in microalgae. *Canadian journal of botany*, 76(6), 1010-1017. doi: <https://doi.org/10.1139/b98-079>
- Bélaïr, V. (2012). *Développement de nouvelles techniques d'extraction des lipides à partir des microalgues en vue de leur valorisation en biocarburant*. (Mémoire de maîtrise, Université Laval, Québec, Canada). Repéré à <https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/24174>
- Bélangier-Lépine, F. (2019). *Culture d'un consortium d'algues-bactéries dans des eaux usées industrielles pour l'obtention de produits biosourcés utilisables par les entreprises locales*. (Thèse de doctorat, Université du Québec à Montréal avec Université du Québec à Trois-Rivières, Canada). Repéré à <https://depot-e.uqtr.ca/id/eprint/8800/1/032273593.pdf>
- Béliveau, M.-O., Bertrand-Lehouillier, V., Carrier, J., Tremblay, J., & Larrivée, M. (2013). Optimisation de la culture de microalgues pour la production de biodiésel. Affiche présentée à colloque de l'ARC "La gestion de la propriété intellectuelle : courants de pensée et facteurs de succès", lors du 81e Congrès de l'Acfas à l'Université Laval, Québec, Canada. Repéré à <https://eduq.info/xmlui/handle/11515/37138>
- Benasla, A., & Hausler, R. (2018). Optimisation of growth of *Raphidocelis subcapitata* immobilised for biofuel production: Influence of alginate and CaCl₂ concentrations on growth. *Environments*, 5(5), 60. doi: <https://doi.org/10.3390/environments5050060>

- Benasla, A., & Hausler, R. (2020). Growth and production of lipids in *Raphidocelis subcapitata* immobilized in sodium alginate beads. *Energies*, 13(2), 506. doi: <https://doi.org/10.3390/en13020506>
- Benlot, C., Blanchouin, N., Prat, R., Rubinstein, J.-P., & Vonarx, V. (s.d.). La photosynthèse par les expériences: Spectres d'absorption des différents pigments d'une feuille [Notes de cours]. Repéré à <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese/exp233.html#ancre38775>
- Bennouna, C. (2018). Choisir son système de culture de microalgues. Repéré à <https://www.synoxis-algae.com/choisir-son-systeme-de-culture-de-microalgues/>
- Bensalem, S. (2019). *Extraction de composés énergétiques à partir de microalgues par application conjuguée d'impulsions de champ électrique et de sollicitations mécaniques dans un système microfluidique*. (Thèse de doctorat, Université Paris Saclay, Paris, France). Repéré à <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02293027/>
- Berdan, R. (2021). *Euglena gracilis* from Boreal labs Differential Interference Contrast microscopy (DIC) 630X [Image]. Repéré le 27 janvier 2022 à <https://www.canadiannaturephotographer.com/euglenoids.html>
- Bernard, O., Blonz, C., & Hidoine, B. (2008). Projet Shamash: production de biocarburants lipidiques par des microalgues. *Interstices*. Repéré à <https://interstices.info/projet-shamash-production-de-biocarburants-lipidiques-par-des-microalgues/#:~:text=Le%20projet%20Shamash%2C%20financ%C3%A9%20par,m%C3%A9thyl%20%C3%A0%20partir%20de%20microalgues.>
- Berrada, S. (2009). Les lipides : structure, propriétés et applications technologiques [Notes de cours]. Repéré à <http://biotec.ac-dijon.fr/IMG/pdf/Lipides.pdf>
- Besson, A. (2013). *Etude multi-échelle de la récolte de Dunaliella salina-Développement d'un procédé d'autofloculation-flottation de microalgues*. (Thèse de doctorat, Université de Toulouse, Toulouse, France). Repéré à <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01221439>
- Bhagavan, N., & Ha, C.-E. (2015). Chapter 16 - Lipids I: Fatty Acids and Eicosanoids. Dans N. Bhagavan & C.-E. Ha (Éds.), *Essentials of medical biochemistry* (2nd éd., pp. 269-297). doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416687-5.00016-6>
- Bhola, V., Desikan, R., Santosh, S. K., Subburamu, K., Sanniyasi, E., & Bux, F. (2011). Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(3), 377-382. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.11.006>

- Bilanovic, D., Shelef, G., & Sukenik, A. (1988). Flocculation of microalgae with cationic polymers—effects of medium salinity. *Biomass*, 17(1), 65-76. doi: [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(88\)90071-6](https://doi.org/10.1016/0144-4565(88)90071-6)
- Blanco, A., Sanz, B., Llama, M. a. J., & Serra, J. L. (1999). Biosorption of heavy metals to immobilised *Phormidium laminosum* biomass. *Journal of biotechnology*, 69(2-3), 227-240. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00046-2)
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917. doi: <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Blouin, D., Patry, A., Boulfroy, E., & Legault, I. (2002). *Programme de mise en valeur des ressources du milieu forestier - Rapport final – Volet 1 : Étude sur le potentiel d'utilisation du chitosane comme facteur de croissance et de protection des plants contre le gel et les maladies*. Repéré à http://cerfo.qc.ca/wp-content/uploads/2020/01/Rapport_final_CERFO_2002-07.pdf
- Bobin, J.-L., Nifenecker, H., & Stéphan, C. (2021). 2. Les combustibles fossiles. Dans *L'Énergie dans le monde* (pp. 21-36). doi: <https://doi.org/10.1051/978-2-7598-0103-9.c005>
- Boileau, M.-È. (2015). *Évaluation du potentiel d'utilisation d'une eau usée industrielle comme substrat de culture pour des microalgues d'eau douce dans une optique de production de biocarburants de 3e génération*. (Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Québec, Canada). Repéré à <https://savoirs.usherbrooke.ca/handle/11143/6068>
- Bolto, B., & Gregory, J. (2007). Organic polyelectrolytes in water treatment. *Water Research*, 41(11), 2301-2324. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.012>
- Bonnefond, H., Combe, C., Cadoret, J.-P., Sciandra, A., & Bernard, O. (2020). Potentiel des microalgues. Dans S. Baumberger (Éd.), *Chimie verte et industries agroalimentaires - Vers une bioéconomie durable*. Lavoisier. Repéré à <https://hal.inria.fr/hal-02421830/document>
- Bosma, R., Van Spronsen, W. A., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2003). Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae. *Journal of applied phycology*, 15(2), 143-153. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1023807011027>
- Bou Saab, H. (2011). *Bioconversion éco-compatible de triterpénoïdes par des bactéries immobilisées sur Luffa cylindrica*. (Thèse de doctorat, Université de Haute Alsace-Mulhouse, Mulhouse, France). Repéré à <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00704061/>

- Bouabidi, Z. B., El-Naas, M. H., & Zhang, Z. (2019). Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 17(1), 241-257. doi: <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0795-7>
- Bouarab, L., Loudiki, M., & Dauta, A. (2002). Croissance en autotrophie et en mixotrophie de la microalgue *Micractinium pusillum* Fres. isolée d' un lagunage naturel: influence de la lumière et de la température. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 15(1), 73-86. doi: <https://doi.org/10.7202/705437ar>
- Bougaran, G., & Saint-Jean, B. (2014). Microalgues: de petits végétaux aux grandes promesses! *Biofutur*, (360), 28-31. Repéré à <https://archimer.ifremer.fr/doc/00252/36321/>
- Bourat, G. (1992). Fermentations - Propriétés des micro-organismes : Fermentation en continu-discontinu, dite de type fed-batch. Dans *Techniques de l'ingénieur*. Repéré à <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/archives-th12/archives-bioproc%C3%A9d%C3%A9s-et-bioproductions-tiabi/archive-1/fermentations-j6002/fermentation-en-continu-discontinu-dite-de-type-fed-batch-j6002niv10004.html#:~:text=Il%20s'agit%20d'une,volume%20du%20fermenteur%20varie%20continuellement.>
- Bourrelly, P. (s.d.). Chrysophycées. Dans *Encyclopædia Universalis*. Repéré à <https://www.universalis.fr/encyclopedie/chrysophycees/>
- Boyaval, P., Lebrun, A., & Goulet, J. (1985). Etude de l'immobilisation de *Lactobacillus helveticus* dans des billes d'alginate de calcium. *Le Lait*, 65(649-650), 185-199. doi: <https://doi.org/10.1051/lait:1985649-65013>
- Branco-Vieira, M., San Martin, S., Agurto, C., Santos, M. A. d., Freitas, M. A., Mata, T. M., . . . Caetano, N. S. (2018). Potential of *Phaeodactylum tricornutum* for biodiesel production under natural conditions in Chile. *Energies*, 11(1), 54. doi: <https://doi.org/10.3390/en11010054>
- Brautaset, T., & Ellingsen, T. E. (2011). Lysine: Industrial Uses and Production. Dans M. Moo-Young (Éd.), *Comprehensive Biotechnology* (Second éd., Vol. 3, pp. 572-586). Repéré à <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/turbidostat>
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557-577. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., & Wijffels, R. H. (2013). Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, *143*, 1-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.105>
- Canbay, E., Kose, A., & Oncel, S. S. (2018). Photobiological hydrogen production via immobilization: understanding the nature of the immobilization and investigation on various conventional photobioreactors. *3 Biotech*, *8*(5), 1-8. doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1266-3>
- Cañizares, R., Rivas, L., Montes, C., Dominguez, A., Travieso, L., & Benitez, F. (1994). Aerated swine-wastewater treatment with K-carrageenan-immobilized *Spirulina maxima*. *Bioresource Technology*, *47*(1), 89-91. doi: [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90035-3)
- Cantin, I. (2010). *La production de biodiesel à partir des microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe*. (Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada). Repéré à https://savoirs.usherbrooke.ca/bitstream/handle/11143/7093/cufe_Cantin_essai113.pdf?sequence=1
- Cao, S., Teng, F., Lv, J., Zhang, Q., Wang, T., Zhu, C., . . . Tao, Y. (2022). Performance of an immobilized microalgae-based process for wastewater treatment and biomass production: nutrients removal, lipid induction, microalgae harvesting and dewatering. *Bioresource Technology*, 127298. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127298>
- Cao, S., Teng, F., Wang, T., Li, X., Lv, J., Cai, Z., & Tao, Y. (2020). Characteristics of an immobilized microalgae membrane bioreactor (iMBR): Nutrient removal, microalgae growth, and membrane fouling under continuous operation. *Algal Research*, *51*, 102072. doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102072>
- Cao, Y. R., Liu, Z., Cheng, G. L., Jing, X. B., & Xu, H. (2010). Exploring single and multi-metal biosorption by immobilized spent *Tricholoma lobayense* using multi-step response surface methodology. *Chemical Engineering Journal*, *164*(1), 183-195. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.08.055>
- Cardozo, K. H., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., . . . Colepicolo, P. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *146*(1-2), 60-78. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.05.007>
- Carver, S. M., Hulatt, C. J., Thomas, D. N., & Tuovinen, O. H. (2011). Thermophilic, anaerobic co-digestion of microalgal biomass and cellulose for H₂ production. *Biodegradation*, *22*(4), 805-814. doi: <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9419-z>

- Casadevall, E., Bailliez, C., Berkaloff, C., Brenckmann, F., Chirac, C., Corre, B., & Coute, A. (1985). Production of renewable hydrocarbons through the culture of green unicellular alga *Botryococcus*: Study of the factors affecting the production of hydrocarbons: Final report. Production d'hydrocarbures renouvelables par la culture de l'algue verte *Botryococcus braunii*: Etude des facteurs affectant la production des hydrocarbures: Rapport final (Rapport technique n° EUR-9826). Repéré à <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/7769795>
- Castro, M. L. Y., & Ballesteros, F. C. (2020). Nutrient removal and biomass production by immobilized *Chlorella vulgaris*. Dans V. Naddeo, M. Balakrishnan & K. Choo (Éds.), *Frontiers in Water-Energy-Nexus—Nature-Based Solutions, Advanced Technologies and Best Practices for Environmental Sustainability* (pp. 187-190). doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-13068-8_46
- Cavalla, M. (2000). Les algues - Les microalgues. Repéré à http://mcavalla.free.fr/rsr/Algues_operon.pdf
- Centre des sciences et technologies environnementales, , Direction générale des sciences et de la technologie,, Environnement Canada. (2007). Méthode d'essai biologique : Essai d'inhibition de la croissance d'une algue d'eau douce (Rapport n° SPE 1/RM/25). Repéré à <https://www.ec.gc.ca/faunescience-wildlifescience/default.asp?lang=Fr&n=AFA6529F-1#table2>
- Chader, S., Mahmah, B., Chetehouna, K., & Mignolet, E. (2011). Biodiesel production using *Chlorella sorokiniana* a green microalga. *Revue des Energies Renouvelables*, 14(1), 21-26. Repéré à <https://www.asjp.cerist.dz/en/downArticle/401/14/1/120127>
- Chamoumi, M. (2013). *Optimisation de la production du biodiesel à partir d'huiles de microalgues et d'huiles usées*. (Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Québec, Canada). Repéré à <https://savoirs.usherbrooke.ca/bitstream/handle/11143/6164/MS00301.pdf>
- Chaplin, M. (2007). Water Structure and Science : Agar. Repéré à <https://web.archive.org/web/20071016213723/http://www.lsbu.ac.uk/water/hyagar.html>
- Chen, B.-Y., Chen, C.-Y., Guo, W.-Q., Chang, H.-W., Chen, W.-M., Lee, D.-J., . . . Chang, J.-S. (2014). Fixed-bed biosorption of cadmium using immobilized *Scenedesmus obliquus* CNW-N cells on loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *Bioresource Technology*, 160, 175-181. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.006>
- Chen, C.-Y., Kuo, E.-W., Nagarajan, D., Ho, S.-H., Dong, C.-D., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2020). Cultivating *Chlorella sorokiniana* AK-1 with swine wastewater for simultaneous wastewater treatment and algal biomass production. *Bioresource Technology*, 302, 122814. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122814>

- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71-81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
- Chen, Y., Liu, J., & Ju, Y.-H. (1998). Flotation removal of algae from water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12(1), 49-55. doi: [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(98\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(98)00059-9)
- Cheng, P., Ji, B., Gao, L., Zhang, W., Wang, J., & Liu, T. (2013). The growth, lipid and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* with attached cultivation. *Bioresource Technology*, 138, 95-100. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.150>
- Cherif Antar, A. (2020). Module bio production [Notes de cours]. Repéré à https://elearn.univ-tlemcen.dz/pluginfile.php/127682/mod_resource/content/1/Module%20Bioproduction.pdf
- Chevalier, P., & de la Noüe, J. (1985). Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(12), 621-624. doi: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90032-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90032-8)
- Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(6), 1133-1152. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chong, K. F., Loh, K. P., Ang, K., & Ting, Y. P. (2008). Whole cell environmental biosensor on diamond. *Analyst*, 133(6), 739-743. doi: <https://doi.org/10.1039/B719881G>
- Chouteau, C., Dzyadevych, S., Chovelon, J.-M., & Durrieu, C. (2004). Development of novel conductometric biosensors based on immobilised whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(9), 1089-1096. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.10.012>
- Chrysophyceae*. (2022). Dans *Wikipédia*. Repéré le 20 janvier 2022 à https://fr.wikipedia.org/wiki/Chrysophyceae#cite_note-2
- Chu, W.-L., See, Y.-C., & Phang, S.-M. (2009). Use of immobilised *Chlorella vulgaris* for the removal of colour from textile dyes. *Journal of applied phycology*, 21(6), 641-648. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9396-3>

- Clares, M. E., Guerrero, M. G., & García-González, M. (2015). Cadmium removal by *Anabaena* sp. ATCC 33047 immobilized in polyurethane foam. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(5), 1793-1798. doi: <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0743-4>
- Clément-Larosière, B. (2012). *Etude de la croissance de Chlorella vulgaris en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO₂*. (Thèse de doctorat, Ecole centrale de Paris, Châtenay-Malabry, France). Repéré à <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00697006>
- Coenzyme A. (2020). Dans *Wikipédia*. Repéré le 23 mars 2022 à https://fr.wikipedia.org/wiki/Coenzyme_A
- Combe, C. (2016). *Effets quantitatifs et qualitatifs de la lumière sur la croissance des microalgues en culture dense et sur leur production de molécules d'intérêt: vers l'optimisation des procédés de production de microalgues*. (Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France,). Repéré à <https://www.theses.fr/2016PA066120>
- Complexe cytochrome *b₆f*. (2021). Dans *Wikipédia*. Repéré le 23 mars 2022 à https://fr.wikipedia.org/wiki/Complexe_cytochrome_b6f#:~:text=Dans%20la%20photosynth%C3%A8se%2C%20le%20complexe,vers%20le%20lumen%20des%20thylako%C3%AFdes.
- Connaissance des énergies. (2011). Microalgues. Repéré à <https://www.connaissancedesenergies.org/fiche-pedagogique/microalgues#:~:text=Les%20microalgues%20sont%20des%20micro,00%20environ%20ont%20%C3%A9t%C3%A9%20%C3%A9tudi%C3%A9es>.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146-1151. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>
- Coudret, A., & Ducher, M. (1993). Les β -carboxylations dans les systèmes cellulaires de type C3. *Acta Botanica Gallica*, 140(1), 101-112. doi: <https://doi.org/10.1080/12538078.1993.10515573>
- De Reviens, B. (s.d.). Algues. Dans *Encyclopædia Universalis*. Repéré à <https://www.universalis.fr/encyclopedie/algues/8-habitat/#DE131025>

- Decamp, A. (2020). *Etude des conditions d'accumulation et de production de polysaccharides solubles (ou exopolysaccharides-EPS) chez des microalgues marines cultivées en photobioréacteur*. (Thèse de doctorat, Université de Nantes, Nantes, France). Repéré à <http://archive.bu.univ-nantes.fr/pollux/show.action?id=51973b61-e34a-49f9-b723-5cd4fbb469e7>
- Dejoye, C. (2013). *Eco-extraction et analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant*. (Thèse de doctorat, Université d'Avignon, Avignon, France). Repéré à <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01712195>
- Del Río, E., Armendáriz, A., García-Gómez, E., García-González, M., & Guerrero, M. G. (2015). Continuous culture methodology for the screening of microalgae for oil. *Journal of biotechnology*, 195, 103-107. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.024>
- Del Río, E., García-Gómez, E., Moreno, J., Guerrero, M. G., & García-González, M. (2017). Microalgae for oil. Assessment of fatty acid productivity in continuous culture by two high-yield strains, *Chlorococcum oleofaciens* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Algal Research*, 23, 37-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.01.003>
- Demirbas, A., & Demirbas, M. F. (2010). Biodiesel from Algae. Dans *Algae energy: algae as a new source of biodiesel* (pp. 139-157). Springer, Londres. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-84996-050-2_6
- Difusa, A., Mohanty, K., & Goud, V. (2015). Advancement and challenges in harvesting techniques for recovery of microalgae biomass. Dans P. Thangavel & G. Sridevi (Éds.), *Environmental Sustainability* (pp. 159-169). doi: https://doi.org/10.1007/978-81-322-2056-5_9
- Dinesh Kumar, S., Santhanam, P., Prabhavathi, P., Kanimozhi, B., Abirami, M., Park, M. S., & Kim, M.-K. (2018). Optimal conditions for the treatment of shrimp culture effluent using immobilized marine microalga *Picochlorum maculatum* (PSDK01). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(3), 1177-1185. doi: <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0855-y>
- Divakaran, R., & Sivasankara Pillai, V. (2002). Flocculation of algae using chitosan. *Journal of applied phycology*, 14(5), 419-422. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1022137023257>
- Doré-Deschênes, F. (2009). *Utilisation des microalgues comme source d'énergie durable*. (Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Longueuil, Québec, Canada). Repéré à https://savoirs.usherbrooke.ca/bitstream/handle/11143/7149/cufe_Deschenes_essai80.pdf?sequence=1

- Draget, K. I., Steinsvåg, K., Onsøyen, E., & Smidsrød, O. (1998). Na- and K-alginate; effect on Ca^{2+} -gelation. *Carbohydrate Polymers*, 35(1), 1-6. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00237-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00237-3). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861797002373>
- Driche, E.-H. (2020). Milieux de culture et fermentation industrielle [Notes de cours]. . Repéré à <https://www.univ-chlef.dz/fsnv/wp-content/uploads/chapitre-II-Milieux-de-cultures-et-fermentation-industrielle-PDF-final.pdf>
- Duliège, M. (2017). *Encapsulation et élicitation de microalgues pour la cosmétique* (Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France). Repéré à <https://hal.sorbonne-universite.fr/LCMD/tel-02512611v1>
- Dulieu, C., Poncelet, D., & Neufeld, R. J. (1999). Encapsulation and immobilization techniques. Dans W. M. Kühtreiber, R. P. Lanza & W. L. Chick (Éds.), *Cell encapsulation technology and therapeutics* (pp. 3-17). Springer. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1586-8_1
- Eaton, A. D., Franson, M. A. H., Clesceri, L. S., Rice, E. W., & Greenberg, A. E. (2005). *Standard methods for the examination of water & wastewater: American Public Health Association. Laboratory Section* (21 éd.). Washington DC, USA.
- Edzwald, J. (1993). Algae, bubbles, coagulants, and dissolved air flotation. *Water Science and Technology*, 27(10), 67-81. doi: <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0207>
- El-Sheekh, M. M., Metwally, M. A., Allam, N. G., & Hemdan, H. E. (2017). Effect of algal cell immobilization technique on sequencing batch reactors for sewage wastewater treatment. *International Journal of Environmental Research*, 11(5), 603-611. doi: <https://doi.org/10.1007/s41742-017-0053-z>
- El Hifnawy, C. (2016). *Identifier des microalgues pour le traitement des eaux usées et la production de biocarburant*. (Rapport du stage Master 2 Recherche, Université Libanaise, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Liban). Repéré à <https://www.researchgate.net/publication/327845792>
- EMO. (s.d.). La flottation à air dissous DAF. Repéré à <https://www.emo-france.com/produits/epaississement/flottateur/>
- Encarnação, T., Palito, C., Pais, A. A., Valente, A. J., & Burrows, H. D. (2020). Removal of pharmaceuticals from water by free and imobilised microalgae. *Molecules*, 25(16), 3639. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25163639>
- Encyclopædia Britannica, I. (2019). Chloroplast structure [image]. Repéré le 2 mars 2022 à <https://www.britannica.com/science/chloroplast> . By courtesy of *Encyclopædia Britannica, Inc.*, Copyright 2019. Utilisée avec permission

- Erkaya, I. A., Arica, M. Y., Akbulut, A., & Bayramoglu, G. (2014). Biosorption of uranium (VI) by free and entrapped *Chlamydomonas reinhardtii*: kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 299(3), 1993-2003. doi: <https://doi.org/10.1007/s10967-014-2964-x>
- Escudero-Oñate, C., & Ferrando-Climent, L. (2019). Microalgae for biodiesel production and pharmaceutical removal from water. Dans K. Gothandam, S. Ranjan, N. Dasgupta & E. Lichtfouse (Éds.), *Nanoscience and biotechnology for environmental applications* (Vol. 22, pp. 1-28). Springer. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-97922-9_1
- Falkowski, P. G., & Raven, J. (2013). *Aquatic Photosynthesis (Second Edition) [Version Princeton University Press]*. . doi: <https://doi.org/10.1515/9781400849727>
- Falkowski, P. G., Sukenik, A., & Herzig, R. (1989). Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). II. Relative abundance of chloroplast proteins. *Journal of phycology*, 25(3), 471-478. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1989.tb00252.x>
- Fan, J., Andre, C., & Xu, C. (2011). A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS letters*, 585(12), 1985-1991. doi: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.018>
- Favenec, J.-P. (2010). L'avenir du pétrole. Repéré à https://www.sciencespo.fr/ceri/sites/sciencespo.fr/ceri/files/art_jpf.pdf
- Feldmann, J., & Magne, F. (s.d.-a). Chlorophycées. Dans *Encyclopædia Universalis*. Repéré à <https://www.universalis.fr/encyclopedie/chlorophycees/>
- Feldmann, J., & Magne, F. (s.d.-b). Rhodophycées. Dans *Encyclopædia Universalis*. Repéré à <https://www.universalis.fr/encyclopedie/rhodophycees-algues-rouges/#V200023B>
- Feng, P., Deng, Z., Fan, L., & Hu, Z. (2012). Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(4), 405-410. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.05.007>
- Ferrando, L., & Matamoros, V. (2020). Attenuation of nitrates, antibiotics and pesticides from groundwater using immobilised microalgae-based systems. *Science of the Total Environment*, 703, 134740. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134740>
- Ferrédoxine. (2022). Dans *Wikipédia*. Repéré le 23 mars 2022 à <https://fr.wikipedia.org/wiki/Ferr%C3%A9doxine>
- Ferro, Y., Perullini, M., Jobbagy, M., Bilmes, S. A., & Durrieu, C. (2012). Development of a biosensor for environmental monitoring based on microalgae immobilized in silica hydrogels. *Sensors*, 12(12), 16879-16891. doi: <https://doi.org/10.3390/s121216879>

- Fierro, S., del Pilar Sánchez-Saavedra, M., & Copalca, C. (2008). Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*. *Bioresource Technology*, 99(5), 1274-1279. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.043>
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Foobar. (2006). File: Palmitic acid synthesis fr.png [image]. Repéré le 15 juin 2022 à https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Palmitic_acid_synthesis_fr.png
- Fortier, J.-F. (2009). Nitrate réductase : définition, explications. Repéré à <https://www.aquaportail.com/definition-5580-nitrate-reductase.html>
- Fortier, J.-F. (2019). Photosystème I [Image]. Repéré le 24 février 2022 à <https://www.aquaportail.com/definition-1234-photosysteme-1.html>
- Fortier, J.-F. (2021). Rhodophycées : définition, explications. Repéré à <https://www.aquaportail.com/definition-3691-rhodophycece.html>
- Fortier, J.-F. (2022). Agaropectine : définition, explications. Repéré à <https://www.aquaportail.com/definition-521-agaropectine.html>
- Frappart, M., Massé, & Jaouen, P. (s.d.). Comparaison des systèmes de récolte en fonction de leur consommation énergétique [image]. Repéré le 26 février 2024 à https://www.researchgate.net/figure/Comparaison-des-systemes-de-recolte-en-fonction-de-leur-consommation-energetique_fig12_335234501
- Frense, D., Müller, A., & Beckmann, D. (1998). Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 51(1-3), 256-260. doi: [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(98\)00203-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(98)00203-2)
- Fritz Dufour, M. (2018). *The Costs and Implications of Our Demand for Energy: A Comparative and Comprehensive Analysis of the Available Energy Resources: How Fossil Fuels Have Created an Energy Crisis/Exploring Our Alternatives/The Future of Energy* [Version google livres]. Repéré à https://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=4YpeDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA174&dq=Fritz,+D.+The+Costs+and+Implications+of+Our+Demand+for+Energy:+A+Comparative+and+Comprehensive+Analysis+of+the+Available+Energy+Resources&ots=RH2g13JiDK&sig=19nt-Bclh-8jNez8MNkS1wW8sNs&redir_esc=y#v=onepage&q=Fritz%2C%20D.%20The%20Costs%20and%20Implications%20of%20Our%20Demand%20for%20Energy%3A%20A%20Comparative%20and%20Comprehensive%20Analysis%20of%20the%20Available%20Energy%20Resources&f=false

- Fukuda, H., Kondo, A., & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5), 405-416. doi: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80288-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80288-7)
- Gaamoune, S. (2018). *Le role des biofilms d'algues dans les traitements biologiques des eaux*. (Mémoire de maîtrise, Université Farhat Abbas – Sétif, Sétif, Algérie). Repéré à <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/bitstream/123456789/2415/1/M%c3%a9moire%20de%20magister.pdf>
- Gardner, R., Peters, P., Peyton, B., & Cooksey, K. E. (2011). Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the *chlorophyta*. *Journal of applied phycology*, 23(6), 1005-1016. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9633-4>
- Gastineau, R. (2011). *Biodiversité, reproduction et phylogénie des diatomées bleues du genre Haslea et valorisation de leurs pigments de type marennine*. (Thèse de doctorat, Université du Maine, Le Mans, France). Repéré à <http://hal.univ-nantes.fr/tel-00690700/>
- Gavrilescu, M., & Chisti, Y. (2005). Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, 23(7–8), 471-499. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.03.004>
- Gbassi, G. K. (2010). *Aspects physicochimiques de l'encapsulation et de la désencapsulation des probiotiques*. (Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, Strasbourg, France). Repéré à <https://www.theses.fr/2010STRA6179>
- Go, S., Lee, S.-J., Jeong, G.-T., & Kim, S.-K. (2012). Factors affecting the growth and the oil accumulation of marine microalgae, *Tetraselmis suecica*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(1), 145-150. doi: <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0635-7>
- Golueke, C. G., Oswald, W. J., & Gee, H. K. (1967). Effect of nitrogen additives on algal yield. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 823-834. Repéré à <https://www.jstor.org/stable/25035931>
- Gonçalves, A. L., Pires, J., & Simões, M. (2013). Lipid production of *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 4(14). doi: <https://doi.org/10.1186/2251-6832-4-14>
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C., & Simões, M. (2016). Biotechnological potential of *Synechocystis salina* co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: nutrients removal, biomass and lipid production. *Bioresource Technology*, 200, 279-286.

- Gonzalez, B. (s.d.). Diagramme prédominance [image]. Repéré le 23 mars 2022 à http://www.ac-grenoble.fr/loubet.valence/userfiles/file/Disciplines/Sciences/SPC/TS/Eau/eau_enviroment/co/solubilite_pH.html
- Goold, H., Beisson, F., Peltier, G., & Li-Beisson, Y. (2015). Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant cell reports*, 34(4), 545-555. doi: <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1711-7>
- Gosset, A. (2018). *Evaluation de l'écotoxicité des rejets urbains par temps de pluie: Développement d'une batterie de bioessais et application à la conception de biocapteurs*. (Thèse de doctorat, Université de Lyon, Lyon, France). Repéré à <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02004353>
- Gouveia, L. (2011). Microalgae as a Feedstock for Biofuels. Dans *Microalgae as a Feedstock for Biofuels* (pp. 1-69). Springer, Berlin, Heidelberg. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-17997-6_1
- Grima, E. M., Belarbi, E.-H., Fernández, F. A., Medina, A. R., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20(7-8), 491-515. doi: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)
- Groga, N. (2012). *Structure, fonctionnement et dynamique du phytoplancton dans le lac de Taabo (Côte d'Ivoire)*. (Thèse de doctorat, Université de Toulouse, Toulouse, France). Repéré à <https://oatao.univ-toulouse.fr/6981/1/Groga.pdf>
- Gross, M., Henry, W., Michael, C., & Wen, Z. (2013). Development of a rotating algal biofilm growth system for attached microalgae growth with in situ biomass harvest. *Bioresource Technology*, 150, 195-201. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.016>
- Guckert, J. B., & Cooksey, K. E. (1990). Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high Ph-induced cell cycle Inhibition *Journal of phycology*, 26(1), 72-79. doi: <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1990.00072.x>
- Guedri, H., & Durrieu, C. (2008). A self-assembled monolayers based conductometric algal whole cell biosensor for water monitoring. *Microchimica Acta*, 163(3), 179-184. doi: <https://doi.org/10.1007/s00604-008-0017-2>
- Hadiyanto, A., Pradana, L., Buchori, C., & Budiayati, S. (2014). Biosorption of heavy metal Cu²⁺ and Cr²⁺ in textile wastewater by using immobilized algae. *Res. J. Appl. Sci. Eng. Technol*, 7(17), 3539-3543. doi: <http://dx.doi.org/10.19026/rjaset.7.706>

- Hammadi, H. (2013). *Étude de l'aspect dynamique de la photosynthèse par l'analyse des oscillations complexes de la fluorescence chlorophyllienne induites sous lumières sinusoïdales*. (Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières, Québec, Canada). Repéré à <https://depot-e.uqtr.ca/id/eprint/7297/1/030619159.pdf>
- Hariyadi, D. M. (2011). *Investigations of nano and microparticles for drug and protein delivery produced by atomisation of biopolymer solutions*. (Thèse de doctorat, Université de Queensland, Queensland, Australie). Repéré à <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:275401>
- Heasman, M., Diemar, J., O'connor, W., Sushames, T., & Foulkes, L. (2000). Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs—a summary. *Aquaculture Research*, 31(8-9), 637-659. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.318492.x>
- Heldt, H.-W., & Piechulla, B. (2011). 15 - Lipids are membrane constituents and function as carbon stores. Dans H.-W. Heldt & B. Piechulla (Éds.), *Plant Biochemistry* (4th éd., pp. 359-398). doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384986-1.00015-6>
- Heldt, H.-W., & Piechulla, B. (2021). Chapter 15 - Lipids Are Membrane Constituents and Function as Carbon Stores. Dans H.-W. Heldt & B. Piechulla (Éds.), *Plant biochemistry* (5th éd., pp. 335-371). doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818631-2.00015-5>
- Hersant, G., Tremblay, A., Berthelot, L., Rousseau, J., & Bernier, R. (2012). Projet ALHURE: Valorisation des huiles et des fibres d'une algue brune (*Saccharina longicuris*) pour le marché des biomatériaux (Rapport de recherche n° 12-01). Repéré à https://www.researchgate.net/profile/Gregory-Hersant/publication/282573477_Valorisation_des_huiles_et_des_fibres_d'une_algue_brune_Saccharina_longicuris_pour_le_marche_des_biomateriaux/links/5612763308ae4f0b65153e3b/Valorisation-des-huiles-et-des-fibres-dune-algue-brune-Saccharina-longicuris-pour-le-marche-des-biomateriaux.pdf
- Hétérocyste. (2021). Dans *Wikipédia*. Repéré le 10 janvier 2022 à <https://fr.wikipedia.org/wiki/H%C3%A9t%C3%A9rocyste>
- Hickman, M. (2013). Algues bleu-vert. Dans *Encyclopédie canadienne*. Repéré à <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/algues-bleu-vert>
- Hodac, L. (2008). SAG 117.79 *Rhodorus marinus* [image]. Repéré le 1 mars 2022 à https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=117.79

- Hu, J., Liu, H., Shukla, P., Lin, W., & Luo, J. (2020). Nitrogen and phosphorus removals by the agar-immobilized *Chlorella saccharophila* with long-term preservation at room temperature. *Chemosphere*, 251, 126406. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126406>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54(4), 621-639. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Huang, B. (2018). *Réponses physiologiques et biochimiques à une limitation nutritive en phosphore ou en azote sur la réorientation métabolique des lipides polaires chez différentes espèces de microalgues marines*. (Thèse de doctorat, Le Mans université, Le Mans, France).
- Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., & Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied energy*, 87(1), 38-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.06.016>
- Hui, È. (2017). *Caractérisation et optimisation d'hydrogels de chitosane bioactifs et injectables pour applications biomédicales*. (Mémoire de maîtrise, École de technologie supérieure, Montréal, Québec, Canada). Repéré à <https://espace.etsmtl.ca/id/eprint/1996/>
- Huntley, M. E., & Redalje, D. G. (2007). CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 12(4), 573-608. doi: <https://doi.org/10.1007/s11027-006-7304-1>
- IGVBiotech. (2003). File: Photobioreactor PBR 500 P IGV Biotech.jpg [Image]. Repéré le 4 avril 2022 à https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Photobioreactor_PBR_500_P_IGV_Biotech.jpg
- IGVBiotech. (2013). File: Photobioreactor PBR 4000 G IGV Biotech.jpg [image]. Repéré le 4 avril 2022 à https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Photobioreactor_PBR_4000_G_IGV_Biotech.jpg
- JanB46. (2011). File: Microalgenkwekerij te Heure bij Borculo.jpg [Image]. Repéré le 3 avril 2022 à https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microalgenkwekerij_te_Heure_bij_Borculo.jpg

- Jeanfils, J., & Collard, F. (1983). Effect of immobilizing *Scenedesmus obliquus* cells in a matrix on oxygen evolution and fluorescence properties. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 17(4), 254-257. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00510426>
- Jenck, J., Lépine, O., Legrand, J., Dreno, P., Grizeau, D., & Dupré, C. (2011). Valorisation industrielle des microalgues photosynthétiques. Dans *Techniques de l'ingénieur*. Repéré à <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/archives-th12/archives-innovations-technologiques-tiaint/archive-1/valorisation-industrielle-des-microalgues-photosynthetiques-in201/>
- Jeong, D., & Jang, A. (2021). Mitigation of self-shading effect in embedded optical fiber in *Chlorella sorokiniana* immobilized polyvinyl alcohol gel beads. *Chemosphere*, 283, 131195. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131195>
- Johnson, M. B., & Wen, Z. (2010). Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(3), 525-534. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2133-2>
- Jones, M. (2010). File: Calvin-cycle4.svg [Image]. Repéré le 15 septembre 2022 à <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Calvin-cycle4.svg>
- Joyon, L., & Mignot, J.-P. (s.d.). Euglénophycées. Dans *Encyclopædia Universalis*. Repéré à <https://www.universalis.fr/encyclopedie/euglenophycees/>
- Kadam, K. L. (2002). Environmental implications of power generation via coal-microalgae cofiring. *Energy*, 27(10), 905-922. doi: [https://doi.org/10.1016/S0360-5442\(02\)00025-7](https://doi.org/10.1016/S0360-5442(02)00025-7)
- Kadimpati, K. K., Mondithoka, K. P., Bheemaraju, S., & Challa, V. R. M. (2013). Entrapment of marine microalga, *Isochrysis galbana*, for biosorption of Cr (III) from aqueous solution: isotherms and spectroscopic characterization. *Applied Water Science*, 3(1), 85-92. doi: <https://doi.org/10.1007/s13201-012-0062-1>
- Kandasamy, G., & Shaleh, S. R. M. (2018). Flotation removal of the microalga *Nannochloropsis* sp. using *Moringa* protein–oil emulsion: A novel green approach. *Bioresource Technology*, 247, 327-331. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.187>
- Kandilian, R., Jesus, B., Legrand, J., Pilon, L., & Pruvost, J. (2017). Light transfer in agar immobilized microalgae cell cultures. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 198, 81-92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2017.04.027>

- Kandilian, R., Pruvost, J., Legrand, J., & Pilon, L. (2014). Influence of light absorption rate by *Nannochloropsis oculata* on triglyceride production during nitrogen starvation. *Bioresource Technology*, 163, 308-319. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.045>
- Kaparapu, J. (2017). Micro algal immobilization techniques. *J Algal Biomass Utiln*, 8, 64-70. Repéré à <https://www.researchgate.net/publication/341992146>
- Kashyap, S., Sundararajan, A., & Ju, L. K. (1998). Flotation characteristics of cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* for gas vesicle production. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(5), 636-641. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981205\)60:5%3C636::AID-BIT14%3E3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981205)60:5%3C636::AID-BIT14%3E3.0.CO;2-A)
- Kaya, V. M., & Picard, G. (1996). Stability of chitosan gel as entrapment matrix of viable *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on screens for tertiary treatment of wastewater. *Bioresource Technology*, 56(2-3), 147-155. doi: [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00013-2](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00013-2)
- Khan, S. A., Rashmi, Hussain, M. Z., Prasad, S., & Banerjee, U. C. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(9), 2361-2372. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.04.005>
- Khozin-Goldberg, I., & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67(7), 696-701. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010>
- Khozin-Goldberg, I., Iskandarov, U., & Cohen, Z. (2011). LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(4), 905-915. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3441-x>
- Khozin-Goldberg, I., Shrestha, P., & Cohen, Z. (2005). Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1738(1-3), 63-71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.09.005>
- Khromova, Y. L. (2006). The effect of chlorides on alginate gelation in the presence of calcium sulfate. *Colloid Journal*, 68(1), 115-119. doi: <https://doi.org/10.1134/S1061933X06010157>
- Kiani, K. S., Ullah, I., Javaid, A., Islam, A., & Younas, F. (2021). Immobilised microalgae simultaneously treat wastewater and produce biomass for biofuel production. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-13. doi: <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.2004590>

- Kim, D.-G., La, H.-J., Ahn, C.-Y., Park, Y.-H., & Oh, H.-M. (2011). Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. *Bioresource Technology*, 102(3), 3163-3168. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.108>
- Kim, S. G., Choi, A., Ahn, C. Y., Park, C. S., Park, Y. H., & Oh, H. M. (2005). Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular flotation and growth stage determination. *Letters in applied microbiology*, 40(3), 190-194. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01654.x>
- Knothe, G. (2005). Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel processing technology*, 86(10), 1059-1070. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2004.11.002>
- Knothe, G. (2006). Analyzing biodiesel: standards and other methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(10), 823-833. doi: <https://doi.org/10.1007/s11746-006-5033-y>
- Knuckey, R. M., Brown, M. R., Robert, R., & Frampton, D. M. (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, 35(3), 300-313. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2006.04.001>
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food microbiology*, 21(4), 377-397. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>
- Kube, M., Fan, L., & Roddick, F. (2021). Alginate-immobilised algal wastewater treatment enhanced by species selection. *Algal Research*, 54, 102219. doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102219>
- Kube, M., Mohseni, A., Fan, L., & Roddick, F. (2019). Impact of alginate selection for wastewater treatment by immobilised *Chlorella vulgaris*. *Chemical Engineering Journal*, 358, 1601-1609. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.065>
- Kumar, V. B., Pulidindi, I. N., Kinel-Tahan, Y., Yehoshua, Y., & Gedanken, A. (2016). Evaluation of the potential of *Chlorella vulgaris* for bioethanol production. *Energy & Fuels*, 30(4), 3161-3166. doi: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.energyfuels.6b00253>

- Labranche, J. (2015). *Concentration et transformation de la biomasse algale dans un procédé synergique de production de biocarburant*. (Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Québec, Canada). Repéré à https://savoirs.usherbrooke.ca/bitstream/handle/11143/14947/Labranche_Joey_MScA_2015.pdf?sequence=1
- Labriet, M., Waaub, J.-P., & Prades, J. A. (2000). Stratégies de gestion des gaz à effet de serre au Québec : grandes lignes et enseignements d'une recherche interdisciplinaire - Rapport de recherche. *Natures Sciences Sociétés*, 8(4), 68-75. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1240-1307\(01\)80010-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1240-1307(01)80010-8). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1240130701800108>
- Lacour, T. (2010). *Influence du statut azoté et du cycle lumineux diurne sur le métabolisme lipidique d'Isochrysis sp.(Haptophyceae)*. (Thèse de doctorat, Université de la méditerranée (Aix-Marseille 2), Aix-en-Provence-Marseille, France). Repéré à <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00852596>
- Lam, M. K., & Lee, K. T. (2011). Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): win-win strategies toward better environmental protection. *Biotechnology Advances*, 29(1), 124-141. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.10.001>
- Lam, M. K., & Lee, K. T. (2012a). Immobilization as a feasible method to simplify the separation of microalgae from water for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, 191, 263-268. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.03.013>
- Lam, M. K., & Lee, K. T. (2012b). Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30, 673-690. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.008>
- Langlois, C. (2006). Diatomées. Repéré à http://step.ipgp.fr/images/a/a0/Langlois_biogeopal_TD5_FicheDiatomees.pdf
- Lau, P., Tam, N., & Wong, Y. (1997). Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology*, 18(9), 945-951. doi: <https://doi.org/10.1080/09593331808616614>
- Lau, P., Tam, N., & Wong, Y. (1998). Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 63(2), 115-121. doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00111-9)
- Launay, Y., Jousseume, L., & Zribi, E. (s.d.). Les algocarburants, la promesse énergétique attendue ? Repéré à <https://locayestpe.wixsite.com/algocarburants/micro-algues>

- Le Treut, H. (2015). Changement climatique et gaz à effet de serre: un problème ancien qui évolue de manière extrêmement rapide. *Cites*, (3), 175-184. doi: <https://doi.org/10.3917/cite.063.0175>
- Lebeau, T., Gaudin, P., Junter, G.-A., Mignot, L., & Robert, J.-M. (2000). Continuous marenin production by agar-entrapped *Haslea ostrearia* using a tubular photobioreactor with internal illumination. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(5), 634-640. doi: <https://doi.org/10.1007/s002530000380>
- Lee, H., Shim, E., Yun, H.-S., Park, Y.-T., Kim, D., Ji, M.-K., . . . Choi, J. (2016). Biosorption of Cu (II) by immobilized microalgae using silica: kinetic, equilibrium, and thermodynamic study. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1025-1034. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4609-1>
- Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., & Oh, H.-M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101(1, Supplement), S75-S77. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.058>
- Lee, J., Cho, D.-H., Ramanan, R., Kim, B.-H., Oh, H.-M., & Kim, H.-S. (2013). Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 131, 195-201. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.130>
- Lee, Y.-K., & Shen, H. (2004). Basic Culturing Techniques. Dans A. Richmond (Éd.), *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* (pp. 40-56). Repéré à https://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=KdHgq2CbTPwC&oi=fnd&pg=PR5&ots=4BODLwRzjI&sig=QugNsJaBFQ_PpBO0NKXBBBq6FFY&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Lemire-Lamothe, M. (2016). *Étude du mode trophique d'un consortium Chlorella spp. cultivé dans des eaux usées industrielles à des fins énergétiques*. (Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières, Québec, Canada). Repéré à <https://depot-e.uqtr.ca/id/eprint/7850/1/031261331.pdf>
- Li, X., Moellering, E. R., Liu, B., Johnny, C., Fedewa, M., Sears, B. B., . . . Benning, C. (2012). A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 24(11), 4670-4686. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105106>
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q., & Dubois-Calero, N. (2008). Biocatalysts and bioreactor design. *Biotechnology Progress*, 24(3), 815-820. Repéré à https://www.academia.edu/10946517/ARTICLES_BIOCATALYSTS_AND_BIOREACTOR_DESIGN_Biofuels_from_Microalgae

- Liu, J., Yuan, C., Hu, G., & Li, F. (2012). Effects of light intensity on the growth and lipid accumulation of microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 under nitrogen limitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(8), 2127-2137. doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9639-2>
- Liu, T., Wang, J., Hu, Q., Cheng, P., Ji, B., Liu, J., . . . Chen, L. (2013). Attached cultivation technology of microalgae for efficient biomass feedstock production. *Bioresource Technology*, 127, 216-222. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.100>
- Liu, Z.-Y., Wang, G.-C., & Zhou, B.-C. (2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99(11), 4717-4722. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.073>
- Lobakova, E., Vasilieva, S., Shibzukhova, K., Morozov, A., Solovchenko, A., Orlova, A., . . . Kirpichnikov, M. (2017). Immobilization of cyanobacteria and microalgae on polyethylenimine-based sorbents. *Microbiology*, 86(5), 629-639. doi: <https://doi.org/10.1134/S0026261717050137>
- Lopez, B. R., Hernandez, J.-P., Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2017). Immobilization of microalgae cells in alginate facilitates isolation of DNA and RNA. *Journal of Microbiological Methods*, 135, 96-104. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.005>
- Lorenz, M. (2016). SAG 61.81 *Raphidocelis subcapitata* [image]. Repéré le 1 mars 2022 à https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=61.81
- Lorius, C. (2003). Effet de serre : les lacunes du savoir et de la perception. *Comptes Rendus Geoscience*, 335(6-7), 545-549. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1631-0713\(03\)00097-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1631-0713(03)00097-X)
- Luan, T., Jin, J., Chan, S. M., Wong, Y., & Tam, N. F. (2006). Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process biochemistry*, 41(7), 1560-1565. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.020>
- MacIntyre, H. L., Kana, T. M., Anning, T., & Geider, R. J. (2002). Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria 1. *Journal of phycology*, 38(1), 17-38. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.00094.x>
- Mages, M., Óvári, M., & Kröpfl, K. (2004). Biofilms as bio-indicator for polluted waters? *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(4), 1095-1101. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2291-5>

- Mandal, S., & Mallick, N. (2009). Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(2), 281-291. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1935-6>
- Marcilhac, C. (2014). *Étude des conditions de culture d'un écosystème complexe microalgues/bactéries: application au développement d'un procédé d'extraction-valorisation des nutriments issus des digestats*. (Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, Rennes, France). Repéré à <https://www.theses.fr/2014REN1S078>
- Marechal, E. (2021). Carburants à base d'algues oléagineuses Principes, filières, verrous. Dans *Techniques de l'Ingenieur* (p. IN186 v182). Repéré à <https://hal.inria.fr/hal-03143875/>
- Martin, N., Bernat, T., Dinasquet, J., Stofko, A., Damon, A., Deheyn, D. D., . . . Smith, A. G. (2021). Synthetic algal-bacteria consortia for space-efficient microalgal growth in a simple hydrogel system. *Journal of applied phycology*, 33(5), 2805-2815. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02528-7>
- Martins, S. C. S., Martins, C. M., Fiúza, L. M. C. G., & Santaella, S. T. (2013). Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African journal of biotechnology*, 12(28). doi: <https://doi.org/10.5897/AJB12.2677>
- Massart, A., Aubry, É., & Hantson, A.-L. (2010). Étude de stratégies de culture de *Dunaliella tertiolecta* combinant haute densité cellulaire et accumulation de lipides en vue de produire du biodiesel. *BASE*. Repéré à <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=6237>
- Maswana, T., Lindblad, P., & Maneeruttanarungroj, C. (2020). Improved biohydrogen production by immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp. CU2551 incubated under aerobic condition. *Journal of applied phycology*, 32(5), 2937-2945. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02184-3>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Melis, A., & Happe, T. (2001). Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant physiology*, 127(3), 740-748. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.010498>
- Millette, M. (2003). *Études d'immobilisation de bactéries lactiques et de leurs métabolites comme moyen de contrôle de microorganismes pathogènes dans les viandes*. (Mémoire de maîtrise, Université du Québec, Centre INRS-Institut Armand Frappier, Québec, Canada). Repéré à <https://espace.inrs.ca/id/eprint/2206>

- Mizuno, Y., Sato, A., Watanabe, K., Hirata, A., Takeshita, T., Ota, S., . . . Kawano, S. (2013). Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresource Technology*, *129*, 150-155. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.030>
- Molino, A., Larocca, V., Chianese, S., & Musmarra, D. (2018). Biofuels Production by Biomass Gasification: A Review. *Energies*, *11*(4), 811. doi: <https://doi.org/10.3390/en11040811>
- Monteiro, C. M., Castro, P. M., & Malcata, F. X. (2012). Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress*, *28*(2), 299-311. doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.1504>
- Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. P. J. (2019). *21st Century Guidebook to Fungi (2e édition) [Chapitre mis disponible en ligne par l'auteur]*. Repéré à http://www.davidmoore.org.uk/21st_century_guidebook_to_fungi_platinum/Ch17_11.htm
- Moreira Dos Santos, M., Moreno-Garrido, I., Gonçalves, F., Soares, A. M., & Ribeiro, R. (2002). An in situ bioassay for estuarine environments using the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Environmental toxicology and chemistry*, *21*(3), 567-574. doi: <https://doi.org/10.1002/etc.5620210315>
- Moreira, S. M., Moreira-Santos, M., Guilhermino, L., & Ribeiro, R. (2006). Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. *Enzyme and Microbial Technology*, *38*(1-2), 135-141. doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.005>
- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource Technology*, *99*(10), 3949-3964. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040>
- Moreno-Garrido, I. (2013). Microalgal Immobilization Methods. Dans J. M. Guisan (Éd.), *Immobilization of Enzymes and Cells* (Third éd., Vol. 1051, pp. 327-347). Repéré à <https://www.siirt.edu.tr/dosya/personel/gida-biyoteknolojisinde-immobilize-hucre-ve-enzim-uygulamalari-ders-kitabi-siirt-2020421142923321.pdf#page=326>
- Moreno-Garrido, I., Campana, O., Lubián, L. M., & Blasco, J. (2005). Calcium alginate immobilized marine microalgae: Experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. *Marine Pollution Bulletin*, *51*(8-12), 823-829. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.06.008>
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, *27*, 31-36. doi: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)

- Murujew, O., Whitton, R., Kube, M., Fan, L., Roddick, F., Jefferson, B., & Pidou, M. (2021). Recovery and reuse of alginate in an immobilized algae reactor. *Environmental Technology*, 42(10), 1521-1530. doi: <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1673827>
- Mussnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A., & Kruse, O. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of biotechnology*, 150(1), 51-56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.030>
- Nafe Aziz, R. P., Ibrahim, A., & Ahmed, A. (2018). Promising Applications for the Production of Biofuels Through Algae. Dans J. K. Patra, C. Vishnuprasad, N, & G. Das (Éds.), *Microbial Biotechnology: Applications in Agriculture and Environment* (Vol. 1, pp. 81-103). doi: https://doi.org/10.1007/978-981-10-6847-8_4
- Nazos, T. T., & Ghanotakis, D. F. (2021). Biodegradation of phenol by alginate immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Archives of Microbiology*, 203(9), 5805-5816. doi: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02570-6>
- Nghiem-Xuan, R. m. (2019). *Optimisation de la culture d'Haslea ostrearia en photobioréacteur*. (Thèse de doctorat, Université de Nantes, Nantes, France). Repéré à <http://archive.bu.univ-nantes.fr/pollux/show.action?id=6c006604-7a78-4972-90b0-26a470eec4cc>
- Ogbonna, J. C., Yada, H., & Tanaka, H. (1995). Kinetic study on light-limited batch cultivation of photosynthetic cells. *Journal of fermentation and Bioengineering*, 80(3), 259-264. doi: [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)90826-L](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)90826-L)
- Oh, H.-M., Lee, S. J., Park, M.-H., Kim, H.-S., Kim, H.-C., Yoon, J.-H., . . . Yoon, B.-D. (2001). Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49. *Biotechnology letters*, 23(15), 1229-1234. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1010577319771>
- Ohlrogge, J., & Browse, J. (1995). Lipid biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7), 957. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC160893/pdf/070957.pdf>
- Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Bergé, J. P., Del Pino, V., Uronen, P., & Legrand, C. (2012). Seasonal variation of lipids and fatty acids of the microalgae *Nannochloropsis oculata* grown in outdoor large-scale photobioreactors. *Energies*, 5(5), 1577-1592. doi: <https://doi.org/10.3390/en5051577>
- Orr, L., & Govindjee. (2013). Photosynthesis Web resources. *Photosynthesis Research*, 115(2-3), 179-214. doi: <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9840-3>
- Oyadomari, J. (2003). *Dinobryon cylindrique* [Image]. Repéré le 25 février 2022 à https://www.keweenawalgae.mtu.edu/gallery_pages/chrysophyceans.htm#

- Oyadomari, J. (2005). *Anabaena planctonica* [image]. Repéré le 1 mars 2022 à https://www.keweenawalgae.mtu.edu/gallery_pages/cyanobacteria4.htm#Anabaena
- Ozer, T. B., Erkaya, I. A., Udoh, A. U., Duygu, D. Y., Akbulut, A., Bayramoglu, G., & Arica, M. Y. (2012). Biosorption of Cr (VI) by free and immobilized *Pediastrum boryanum* biomass: equilibrium, kinetic, and thermodynamic studies. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(7), 2983-2993. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0809-0>
- Pahl, S. L., Lee, A. K., Kalaitzidis, T., Ashman, P. J., Sathe, S., & Lewis, D. M. (2013). Harvesting, thickening and dewatering microalgae biomass. Dans M. Borowitzka & N. Moheimani (Éds.), *Algae for biofuels and energy* (Vol. 5, pp. 165-185). doi: https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_10
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., & Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(4), 1429-1441. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3170-1>
- Panouillé, M., & Larreta-Garde, V. (2009). Gelation behaviour of gelatin and alginate mixtures. *Food hydrocolloids*, 23(4), 1074-1080. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.06.011>
- Parent, S. (2021). Le rôle du fer en horticulture. Repéré à <https://www.pthorticulture.com/fr/zone-du-savoir/le-role-du-fer-en-horticulture/>
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., & Gislerød, H. R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 15(1), 1-9. doi: <https://doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3>
- Perales-Vela, H. V., Pena-Castro, J. M., & Canizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64(1), 1-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.024>
- Perrin, J. F. (2019). Modes discontinus. Repéré à http://www.perrin33.com/genie_ferment/tech/modal_slf_1.php
- Perullini, M., Ferro, Y., Durrieu, C., Jobbagy, M., & Bilmes, S. A. (2014). Sol-gel silica platforms for microalgae-based optical biosensors. *Journal of biotechnology*, 179, 65-70. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.007>
- Petit, M. (2001). L'humanité face à l'effet de serre additionnel qu'elle crée. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science*, 333(12), 775-786. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1251-8050\(01\)01649-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1251-8050(01)01649-4). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1251805001016494>

- Petrusevski, B., Bolier, G., Van Breemen, A., & Alaerts, G. (1995). Tangential flow filtration: a method to concentrate freshwater algae. *Water Research*, 29(5), 1419-1424. doi: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00269-D](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00269-D)
- Phéophytine. (2017). Dans *Wikipédia*. Repéré le 24 février 2022 à <https://fr.wikipedia.org/wiki/Ph%C3%A9ophytine#:~:text=Une%20ph%C3%A9ophytine%20est%20une%20chlorophylle,central%20de%20magn%C3%A9sium%20Mg2%2B.&text=Dans%20ces%20deux%20cas%2C%20la,un%20et%20l'autre%20cas.>
- Photosynthèse. (2021). Dans *Wikipédia*. Repéré le 3 janvier 2022 à <https://fr.wikipedia.org/wiki/Photosynth%C3%A8se>
- Pienkos, P. T., & Darzins, A. (2009). The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 3, 431-440. doi: <https://doi.org/10.1002/bbb.159>
- Pigault, C. (2010). Osmose - Pression osmotique [Notes de cours]. Repéré à http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/2010_Strasbourg_Pigault_Osmose/co/15_cellules_vegetales.html
- Pires, J., Gonçalves, A., Martins, F., Alvim-Ferraz, M., & Simões, M. (2014). Effect of light supply on CO₂ capture from atmosphere by *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 19(7), 1109-1117. doi: <https://doi.org/10.1007/s11027-013-9463-1>
- Poelman, E., De Pauw, N., & Jeurissen, B. (1997). Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae. *Resources, conservation and recycling*, 19(1), 1-10. doi: [https://doi.org/10.1016/S0921-3449\(96\)01156-1](https://doi.org/10.1016/S0921-3449(96)01156-1)
- Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 165-177. doi: <https://doi.org/10.1002/elsc.200900003>
- Prevost, H., & Divies, C. (1987). Fresh fermented cheese production with continuous pre-fermented milk by a mixed culture of mesophilic lactic *streptococci* entrapped in Ca-Al ginate. *Biotechnology letters*, 9(11), 789-794. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01028285>
- Prevost, H., Divies, C., & Rousseau, E. (1985). Continuous yoghurt production with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* entrapped in Ca-alginate. *Biotechnology letters*, 7(4), 247-252. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01042371>

- Pruvost, J., Leguic, B., Cornet, J.-F., & Lombard, C. (2017). Culture de microalgues et cyanobactéries : interactions avec la source de carbone. Biofixation du CO₂ par microalgues. Dans *Techniques de l'ingénieur*. Repéré à <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/chimie-du-vegetal-et-produits-biosources-42570210/biofixation-du-co2-par-microalgues-chv7005/culture-de-microalgues-et-cyanobacteries-interactions-avec-la-source-de-carbone-chv7005niv10001.html#1.3>
- Raphidocelis subcapitata*. (2021). Dans *Wikipédia*. Repéré le 19 janvier 2022 à https://fr.wikipedia.org/wiki/Raphidocelis_subcapitata
- Rashid, N., Rehman, M. S. U., & Han, J.-I. (2013). Use of chitosan acid solutions to improve separation efficiency for harvesting of the microalga *Chlorella vulgaris*. *Chemical Engineering Journal*, 226, 238-242. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.062>
- Raven, J. A., & Beardall, J. (2003). Carbon acquisition mechanisms of algae: carbon dioxide diffusion and carbon dioxide concentrating mechanisms. Dans A. W. Larkum, S. E. Douglas & J. A. Raven (Éds.), *Photosynthesis in algae* (pp. 225-244). doi: https://doi.org/10.1007/978-94-007-1038-2_11
- Revathi, S., Kumar, S. M., Santhanam, P., Kumar, S. D., Son, N., & Kim, M.-K. (2017). Bioremoval of the indigo blue dye by immobilized microalga *Chlorella vulgaris* (PSBDU06). Repéré à <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/39294>
- Richardson, B., Orcutt, D., Schwertner, H., Martinez, C. L., & Wickline, H. E. (1969). Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Applied microbiology*, 18(2), 245-250. doi: <https://doi.org/10.1128/am.18.2.245-250.1969>
- Richmond, A. (2008). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology [Version John Wiley & Sons]*. Repéré à https://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=KdHgq2CbTPwC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Richmond,+A.,+2004.+Handbook+of+microalgal+culture:+biotechnology+and+applied+phycology.&ots=4BNmIxzFgI&sig=StwZ2ym1bcKN8p9cONsPA_TJFIA&redir_esc=y#v=onepage&q=Richmond%2C%20A.%2C%202004.%20Handbook%20of%20microalgal%20culture%3A%20biotechnology%20and%20applied%20phycology.&f=false
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100-112. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.22033>. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22033>

- Roessler, P. G. (1988). Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. *Archives of biochemistry and biophysics*, 267(2), 521-528. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90059-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90059-8)
- Rolland, L. (2013). *Propriétés physico-chimiques de capsules d'hydrogel à coeur liquide*. (Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, Paris, France). Repéré à <https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-00919083>
- Roopnarain, A., Gray, V., & Sym, S. (2014). Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 156, 408-411. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.092>
- Roose, J. L. (s.d.). Photosystem II [image]. Repéré le 24 février 2022 à <https://newunderthesunblog.wordpress.com/the-basics/the-light-reactions/photosystem-ii/>
- Ruiz-Marin, A., Canedo-López, Y., & Chávez-Fuentes, P. (2020). Biohydrogen production by *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* immobilized cultivated in artificial wastewater under different light quality. *Amb Express*, 10(1), 1-7. doi: <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01129-w>
- Ruiz-Marin, A., & Mendoza-Espinosa, L. G. (2008). Ammonia removal and biomass characteristics of alginate-immobilized *Scenedesmus obliquus* cultures treating real wastewater. *Fresenius Environmental Bulletin*, 17(9 A), 1236-1241. Repéré à <https://www.researchgate.net/publication/236578748>
- Rushan, N. H., Yasin, N. H. M., Said, F. M., & Ramesh, N. (2020). Immobilised *Chlorella vulgaris* as an alternative for the enhancement of microalgae oil and biodiesel production. *Bull Chem React Eng Catal*, 15(2), 379-389. Repéré à <https://core.ac.uk/download/pdf/323115714.pdf>
- Salim, S., Bosma, R., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2011). Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of applied phycology*, 23(5), 849-855. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9591-x>
- Sander, K., & Murthy, G. S. (2010). Life cycle analysis of algae biodiesel. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 15(7), 704-714. doi: <https://doi.org/10.1007/s11367-010-0194-1>
- Santos, A., Janssen, M., Lamers, P., Evers, W., & Wijffels, R. (2012). Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. *Bioresource Technology*, 104, 593-599. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.084>

- Schnurr, P. J., Espie, G. S., & Allen, D. G. (2013). Algae biofilm growth and the potential to stimulate lipid accumulation through nutrient starvation. *Bioresource Technology*, 136, 337-344. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.036>
- Schoefs, B. (s.d.). La photosynthèse : Le Photosystème I et ses relations avec le photosystème II [Notes de cours]. Repéré à https://ressources.unisciel.fr/photosynthese/co/grain_49_1.html
- Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., & Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current opinion in biotechnology*, 21(3), 277-286. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.005>
- Seki, H., & Suzuki, A. (2002). Adsorption of heavy metal ions to flocc-type biosorbents. *Journal of colloid and interface science*, 249(2), 295-300. doi: <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8297>
- SEMAE. (s.d.). La cellule végétale [image]. Repéré le 21 septembre 2022 à <https://www.semae-pedagogie.org/sujet/cellule-vegetale/>
- Sembiring, Z. (2012). Immobilization of *Chetoceros* sp microalgae with silica gel through encapsulation technique as adsorbent of Pb metal from solution. *Oriental Journal of Chemistry*, 28(1), 271-278. Repéré à <http://repository.lppm.unila.ac.id/2973/>
- Shahidi, F., & Wanasundara, U. N. (1998). Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 9(6), 230-240. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00044-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00044-2)
- Sharma, K. K., Schuhmann, H., & Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532-1553. doi: <https://doi.org/10.3390/en5051532>
- Shen, Y., Zhu, W., Li, H., Ho, S.-H., Chen, J., Xie, Y., & Shi, X. (2018). Enhancing cadmium bioremediation by a complex of water-hyacinth derived pellets immobilized with *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*, 257, 157-163. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.060>
- Shifrin, N. S., & Chisholm, S. W. (1981). Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles 1. *Journal of phycology*, 17(4), 374-384. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1981.tb00865.x>
- Sialve, B., Bernet, N., & Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27(4), 409-416. Repéré à <https://hal.inria.fr/hal-00854465/>

- Sialve, B., & Steyer, J.-P. (2013). Les microalgues, promesses et défis. *Innovations Agronomiques*, 26, 25-39. Repéré à <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01137072/>
- Simionato, D., Block, M. A., La Rocca, N., Jouhet, J., Maréchal, E., Finazzi, G., & Morosinotto, T. (2013). The response of *Nannochloropsis gaditana* to nitrogen starvation includes de novo biosynthesis of triacylglycerols, a decrease of chloroplast galactolipids, and reorganization of the photosynthetic apparatus. *Eukaryotic cell*, 12(5), 665-676. doi: <https://doi.org/10.1128/EC.00363-12>
- Simon, M. (2009). La photosynthèse. Repéré à <https://www.cours-pharmacie.com/biologie-vegetale/la-photosynthese.html#>
- Smith, V. H., Sturm, B. S., Denoyelles, F. J., & Billings, S. A. (2010). The ecology of algal biodiesel production. *Trends in ecology & evolution*, 25(5), 301-309. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.11.007>
- Smrdel, P., Bogataj, M., Zega, A., Planinšek, O., & Mrhar, A. (2008). Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation. *Journal of Microencapsulation*, 25(2), 90-105. doi: <https://doi.org/10.1080/02652040701776109>
- Spilling, K., Seppälä, J., & Tamminen, T. (2011). Inducing autoflocculation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* through CO₂ regulation. *Journal of applied phycology*, 23(6), 959-966. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9616-5>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96. doi: <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Sriharan, S., Bagga, D., & Nawaz, M. (1991). The effects of nutrients and temperature on biomass, growth, lipid production, and fatty acid composition of *Cyclotella cryptica* Reimann, Lewin, and Guillard. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28(1), 317-326. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02922611>
- Srinuanpan, S., Cheirsilp, B., Boonsawang, P., & Prasertsan, P. (2019). Immobilized oleaginous microalgae as effective two-phase purify unit for biogas and anaerobic digester effluent coupling with lipid production. *Bioresource Technology*, 281, 149-157. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.085>
- Stansell, G. R., Gray, V. M., & Sym, S. D. (2012). Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *Journal of applied phycology*, 24(4), 791-801. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9696-x>
- Storz, H., Zimmermann, U., Zimmermann, H., & Kulicke, W.-M. (2010). Viscoelastic properties of ultra-high viscosity alginates. *Rheologica acta*, 49(2), 155-167. doi: <https://doi.org/10.1007/s00397-009-0400-x>

- Suali, E., & Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316-4342. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.03.047>
- Sukačová, K., Trtílek, M., & Rataj, T. (2015). Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment. *Water Research*, 71, 55-63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.049>
- Takeshita, T., Ota, S., Yamazaki, T., Hirata, A., Zachleder, V., & Kawano, S. (2014). Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. *Bioresource Technology*, 158, 127-134. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.135>
- Taleb, A. (2015). *Production de biodiesel à partir des microalgues: recherche des souches accumulatrices des lipides et optimisation des conditions de culture en photobioréacteurs*. (Thèse de doctorat, Université Nantes Angers Le Mans, Nantes, France). Repéré à <https://www.theses.fr/2015NANT2007>
- Tam, N., Chan, M., Wong, Y., Popov, V., Itoh, H., & Mander, U. (2010). Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by immobilized microalgal beads. Dans V. Popov, H. Itoh, U. Mander & C. A. Brebbia (Éds.), *Waste management and the environment V* (Vol. 140, pp. 391-402). Repéré à https://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=2gNWWKwbBUC&oi=fnd&pg=PA391&ots=kLDDy-U33S&sig=1tqtDaRlll3v35F1cNKyYz4WSjE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Tameeria. (2007). Fichier:Thylakoid membrane.png [image]. Repéré le 2 mars 2022 à https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thylakoid_membrane.png
- Taylor, G. T. (1983). File: Diatoms through the microscope.jpg [Image]. Repéré le 22 février 2022 à https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diatoms_through_the_microscope.jpg
- Tessier, L. (2018). Croissance typique d'une culture microbienne en mode discontinu [Image]. Repéré le 19 avril 2022 à <https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/index.fcgi?id=116219&msg=MSG013>
- Thiriet-Rupert, S. (2017). *Etude des facteurs de transcription impliqués dans l'accumulation lipidique en condition de stress azoté chez la microalgue haptophyte Isochrysis affinis galbana*. (Thèse de doctorat, Université du Maine, Le Maine, France). Repéré à <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01648362/>
- Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P., & Skjåk-Bræk, G. (1996). Alginate polycation microcapsules: II. Some functional properties. *Biomaterials*, 17(11), 1069-1079. doi: [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85907-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85907-2)

- Tissot, B. (2001). Quel avenir pour les combustibles fossiles ? Les avancées scientifiques et technologiques permettront-elles la poursuite d'un développement soutenable avec les énergies carbonées ? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science*, 333(12), 787-796. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1251-8050\(01\)01692-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1251-8050(01)01692-5)
- Tomaselli, L. (2004). The Microalgal Cell. Dans A. Richmond (Éd.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 1-19). Repéré à https://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=KdHgq2CbTPwC&oi=fnd&pg=PR5&ots=4BOdLwRzjI&sig=QugNsJaBFQ_PpBO0NKXBBBq6FFY&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Tonon, T., Harvey, D., Larson, T. R., & Graham, I. A. (2002). Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*, 61(1), 15-24. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00201-7)
- Twist, H., Edwards, A. C., & Codd, G. A. (1997). A novel in-situ biomonitor using alginate immobilised algae (*Scenedesmus subspicatus*) for the assessment of eutrophication in flowing surface waters. *Water Research*, 31(8), 2066-2072. doi: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00035-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00035-3)
- United Nations Development Programme (UNDP), & Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1990). *Training Manual on Gracilaria Culture and Seaweed Processing in China*. Repéré à <https://www.fao.org/3/AB730E/AB730E03.htm>
- Van Vooren, G., Le Grand, F., Legrand, J., Cuiné, S., Peltier, G., & Pruvost, J. (2012). Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology*, 124, 421-432. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.009>
- Vandamme, D., Foubert, I., Meesschaert, B., & Muylaert, K. (2010). Flocculation of microalgae using cationic starch. *Journal of applied phycology*, 22(4), 525-530. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9488-8>
- Varaprasad, D., Ragasudha, N., Paramesh, K., Chandramati Shankar, P., Nazaneen Parveen, S., & Chandrasekhar, T. (2020). Production of bioethanol from green alga *Chlorella vulgaris*: an important approach to utilize algal feedstock or waste. Dans S.K. Ghosh, R. Sen, H. N. Chanakya & A. Pariatamby (Éds.), *Bioresource Utilization and Bioprocess* (pp. 57-65). doi: https://doi.org/10.1007/978-981-15-1607-8_6
- Vasilieva, S., Lobakova, E., Grigoriev, T., Selyakh, I., Semenova, L., Chivkunova, O., . . . Scherbakov, P. (2021). Bio-inspired materials for nutrient biocapture from wastewater: Microalgal cells immobilized on chitosan-based carriers. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101774. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101774>

- Veillette, M. (2016). *Production de biodiesel à partir de microalgues par catalyses homogène et hétérogène*. (Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke avec Université Claude Bernard Lyon 1, Sherbrooke, Québec, Canada). Repéré à <https://savoirs.usherbrooke.ca/handle/11143/9752>
- Villay, A. (2013). *Production en photobioréacteurs et caractérisation structurale d'un exopolysaccharide produit par une microalgue rouge, Rhodella violacea: application à l'obtention d'actifs antiparasitaires*. (Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France). Repéré à <https://www.theses.fr/2013CLF22429>
- Vincent, E. (2010). *Les alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie. Application à la construction d'un biomatériau*. (Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré-Nancy 1, Nancy, France). Repéré à <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732593/>
- Vitova, M., Bisova, K., Kawano, S., & Zachleder, V. (2015). Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1204-1218. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.012>
- Voo, W.-P., Lee, B.-B., Idris, A., Islam, A., Tey, B.-T., & Chan, E.-S. (2015). Production of ultra-high concentration calcium alginate beads with prolonged dissolution profile. *RSC Advances*, 5(46), 36687-36695. doi: <https://doi.org/10.1039/C5RA03862F>
- Vrba, R. (2021). *Effets interactifs du chlorure de benzalkonium et de la lumière nocturne sur les biofilms aquatiques (Rapport de stage)*. Repéré à <https://hal.inrae.fr/hal-03318079/document>
- Wahidin, S., Idris, A., & Shaleh, S. R. M. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 129, 7-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.032>
- Wang, B., Lan, C. Q., & Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances*, 30(4), 904-912. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.019>
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(5), 707-718. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., . . . Ruan, R. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), 1174-1186. doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>

- Willaert, R. (2011). Cell Immobilization and Its Applications in Biotechnology: Current Trends and Future Prospects. Dans E. M. T. El-Mansi, C. F. A. Bryce, A. L. Demain & A. R. Allman (Éds.), *Fermentation Microbiology and Biotechnology* (Third éd., pp. 313-367). Repéré à https://www.researchgate.net/publication/290128097_Cell_Immobilization_and_Its_Applications_in_Biotechnology
- Wolff, A. (2012). L'utilisation des microalgues pour la fabrication de biocarburants: analyse de la chaîne de valeur-contexte français et international (Rapport de stage Mineure en Environnement CERES-ERTI. École Normale Supérieure). Repéré à <http://www.ceres.ens.fr/IMG/file/travaux-etudiants/rapport-CERES-DGEC-AWolff.pdf>
- Wordpress. (2016). Propriétés des alginates. Repéré à <https://jcmarot.files.wordpress.com/2016/12/proprie3a9tc3a9s.pdf>
- Wutthithien, P., & Incharoensakdi, A. (2022). Improved biohydrogen production by co-cultivation of N₂-fixing cyanobacterium *Fischerella muscicola* TISTR 8215 and microalga *Chlorella* sp. *Journal of applied phycology*, 1-10. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02766-3>
- Xia, C., Zhang, J., Zhang, W., & Hu, B. (2011). A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnology for biofuels*, 4(1), 1-10. doi: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-15>
- Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G., & Ying-Xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101(14), 5494-5500. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>
- Xu, Y., Purton, S., & Baganz, F. (2013). Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology*, 129, 296-301. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.068>
- Xue, S., Su, Z., & Cong, W. (2011). Growth of *Spirulina platensis* enhanced under intermittent illumination. *Journal of biotechnology*, 151(3), 271-277. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.012>
- Yaici, A. (2021). Lipogénèse [Vidéo en ligne]. Repéré à <https://www.youtube.com/watch?v=8qF1wBk4eDE>

- Yoon, K., Han, D., Li, Y., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2012). Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 24(9), 3708-3724. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100701>
- Zhang, L. J., Ying, G. G., Chen, F., Zhao, J. L., Wang, L., & Fang, Y. X. (2012). Development and application of whole-sediment toxicity test using immobilized freshwater microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(2), 377-386. doi: <https://doi.org/10.1002/etc.734>
- Zhou, W., Cheng, Y., Li, Y., Wan, Y., Liu, Y., Lin, X., & Ruan, R. (2012). Novel fungal pelletization-assisted technology for algae harvesting and wastewater treatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(2), 214-228. doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9667-y>
- Zienkiewicz, K., Du, Z.-Y., Ma, W., Vollheyde, K., & Benning, C. (2016). Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae—molecular, cellular and physiological insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9), 1269-1281. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.008>
- Zinkone, T. n. R. (2018). *Broyage à billes de microalgues: étude et modélisation par classe de taille, application au bioraffinage*. (Thèse de doctorat, Université de Nantes, Nantes, France). Repéré à <https://www.theses.fr/2018NANT4084>
- Zinsou, C. (s.d.). Biosynthèse les lipides (lipogénèse) [Notes de cours]. Repéré à <http://calamar.univ-ag.fr/deugsv/Documents/Cours/Bioch-Zinsou/Lipidsynt10.pdf>
- Ziolkowska, J. R., & Simon, L. (2014). Recent developments and prospects for algae-based fuels in the US. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 29, 847-853. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.09.021>