Aix*Marseille université
Socialement engagée

NNT/NL : 0000AIXM0000/000ED000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 28 février 2023 par

Cyril LEFRANC

Optimisation d'un bioréacteur de Type « Soft-Mixer » : pour la croissance de microalgues

Discipline
SCIENCES POUR L'INGENIEUR :

Spécialité
Mécanique et physique des fluides

École doctorale
N°353 et Science pour l'ingénieur

Laboratoire/Partenaires de recherche
Laboratoire IRPHE
et
L'entreprise PLANKTOVIE

Composition du jury

Jérôme NOIR Institut de Géophysique de Zurich	Rapporteur
Eric ROTTINGER Institut IRCAN de Nice	Rapporteur
Sylvie TAMBUTTE Centre Scientifique de Monaco	Présidente
Patrice MEUNIER IRPHE	Directeur de thèse
Olivier DETOURNAY PLANKTOVIE	Co-encadrant de thèse

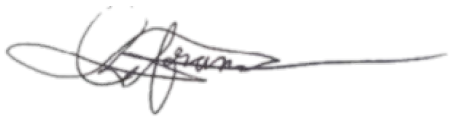
irphé Institut de Recherche sur les Phénomènes Hors Equilibre

PLANKTOVIE Innovation for Aquatic Animal Research

Affidavit

Je soussigné, Cyril Lefranc, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Patrice Meunier et Olivier Detournay, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.
Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 26 décembre 2022

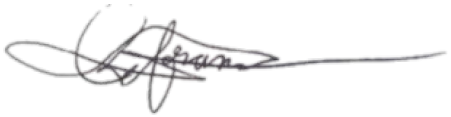


Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Affidavit

I, undersigned, Cyril Lefranc, hereby declare that the work presented in this manuscript is my own work, carried out under the scientific direction of Patrice Meunier and Olivier Detournay, in accordance with the principles of honesty, integrity and responsibility inherent to the research mission. The research work and the writing of this manuscript have been carried out in compliance with both the French national charter for Research Integrity and the Aix-Marseille University charter on the fight against plagiarism.
This work has not been submitted previously either in this country or in another country in the same or in a similar version to any other examination body.

Place to Marseille (France) , date 1er décembre 2022



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

C. Lefranc, O. Detournay, and P. Meunier (Dated: 9 December 2022), Gas injection into a tilted rotating cylinder, PHYSICS OF FLUIDS (en cours de soumission).

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

Journée de l'école doctorale n°353 du 2 juin 2022.

Aquaculture Europe 2021, Octobre 4 - 7, 2021 - Funchal, Madeira, International Conference

Résumé :

Les toxines marines représentent une source très variée de molécules pour les nouvelles thérapies. Toutefois, elles sont actuellement très onéreuses car elles ne peuvent être produites en grande quantité. En effet, les micro-algues qui contiennent naturellement ces molécules, les dinoflagellés, ne peuvent pas être cultivées dans des photobioréacteurs (PBR) traditionnels car elles sont extrêmement sensibles au cisaillement.

Dans cette thèse, nous expérimentons la culture de dinoflagellés dans un PBR innovant, le Dinophyt, développé par l'IRPHE et la société Planktovie. Ce PBR, constitué d'un cylindre tournant autour de son axe, incliné par rapport à la verticale, permet d'apporter une grande quantité de CO_2 aux microalgues avec des forces de cisaillement beaucoup plus faibles (< 2,2 $mN.m^{-2}$) que dans les PBR traditionnels (> 100 $mN.m^{-2}$).

Dans une première partie, le flux de CO_2 a été mesuré pour différentes vitesses de rotation. Le flux est inversement proportionnel à la racine carrée du nombre d'Ekman, ce qui s'explique par la présence de couches d'Ekman.

Dans une deuxième partie, nous avons cultivé le dinoflagellé *Amphidinium carterae* dans le Dinophyt. En variant la vitesse de rotation, le renouvellement de milieu, le contrôle du pH et l'apport de CO_2, nous avons montré que la culture d'*A. carterae* dans ce Dinophyt est robuste par rapport à ces paramètres, ce qui rend son utilisation industrielle possible.

Dans une troisième partie, des Dinophyts de volumes industriels (> 100L) sont utilisés pour la culture d'*A. carterae.* Les rendements sont au moins 2 fois plus élevés que dans les PBR classiques, avec une production moyenne de 145 millions de cellules par litre par jour.

Mots-clés : Photobioréacteur, Diffusion de CO2, Dinoflagellés, Cisaillement, Flux scalaire, Ecoulement tournant, Amphidinium carterae.

Abstract :

Marine toxins represent a very diverse source of molecules for new therapies. However, they are currently very expensive because they cannot be produced in large quantities. Indeed, the microalgae that naturally contain these molecules, the dinoflagellates, cannot be grown in traditional photobioreactors (PBRs) because they are extremely sensitive to shear.
In this thesis, we experiment the culture of dinoflagellates in an innovative PBR, the Dinophyt, developed by IRPHE and the company Planktovie. This PBR, consisting of a cylinder rotating around its axis, inclined to the vertical, allows to bring a large amount of CO_2 to the microalgae with much lower shear forces (< 2.2 $mN.m^{-2}$) than in traditional PBRs (> 100 $mN.m^{-2}$).
In a first part, the CO_2 flux was measured for different rotation speeds. The flux is inversely proportional to the square root of the Ekman number, which is explained by the presence of Ekman layers.
In a second part, we grew the dinoflagellate *Amphidinium carterae* in Dinophyt. By varying the rotation speed, medium renewal, pH control and CO_2 supply, we showed that the culture of *A. carterae* in this Dinophyt is robust with respect to these parameters, which makes its industrial use possible.
In a third part, Dinophytes of industrial volumes (> 100L) are used for the culture of *A. carterae*. The yields are at least 2 times higher than in conventional PBRs, with an average production of 145 million cells per liter per day.

Key words : Photobioreactor, CO2 diffusion, Dinoflagellates, shear, scalar flow, rotating flow, *Amphidinium carterae.*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le professeur Patrice Meunier et mon co-directeur de thèse M. Olivier Detournay. Merci pour la confiance qu'ils m'ont accordée. M. Patrice Meunier m'a permis de faire avancer mes recherches grâce à ses connaissances en physique, en mécanique des fluides et à sa maîtrise du domaine de la recherche fondamentale. M. Olivier Detournay m'a proposé ce sujet et accueilli dans les locaux de son entreprise d'innovation. J'ai pu profiter de son expérience de la recherche appliquée à des projets industriels. Leur disponibilité à mon égard et les discussions que j'ai eues avec eux ont été déterminantes, pour le biologiste que je suis, pour réaliser et finaliser cette recherche. Je leur exprime à tous deux ma profonde gratitude.

Je souhaite remercier Mme Tambutté, M. Noir et M. Röttinger pour m'avoir fait l'honneur d'accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à la société Planktovie et aux membres du laboratoire IRPHE qui m'ont permis de travailler sur ce sujet de thèse, qui m'ont apporté leur soutien et leurs conseils.

Merci aux membres de l'atelier du laboratoire IRPHE, pour avoir pris le temps de concevoir et réaliser les pièces nécessaires au fonctionnement des expériences et pour leur expertise lorsqu'ils m'ont laissé l'opportunité de les réaliser moi-même.

Merci à Jérôme Jusseaume du bureau d'études Beconcepto, pour la conception et ses nombreux conseils sur les Dinophyts à volumes industriels (V3 et V4).

Un grand merci à Mme Ange Laeticia Rakiswendé Ouédraogo, M. Baptiste Roumezi pour leurs soutiens techniques et leurs conseils pendant ces 3 années de recherche.

Merci à mes parents, ma sœur et mes amis, pour avoir été disponibles et à mon écoute.

Table des matières :

Affidavit **2**
Affidavit **3**
Liste de publications et participation aux conférences **4**
Liste des tables : **13**
Chapitre 1 : Intérêt pour les molécules bioactives **14**
1.1. Présentation des molécules bioactives 15
1.1.1. Les molécules bioactives en pharmacologie 15
1.1.2. Molécules marines et leurs sources 18
1.2. La Biologie des dinoflagellés 22
1.2.1. Phylogénie des dinoflagellés 22
1.2.2. Morphologie des dinoflagellés 23
1.2.3. Métabolisme des dinoflagellés 25
1.2.4. Culture de dinoflagellés 27
1.2.5. Besoins physico-chimiques des dinoflagellés 28
1.2.5.1. La salinité : 28
1.2.5.2. Le pH de l'eau : 29
1.2.5.3. Les nutriments : 30
1.2.5.4. La température : 31
1.2.5.5. Le Dioxyde de carbone (CO_2) : 32
1.3. La Culture de dinoflagellés en bioréacteurs 32
1.3.1. Les photobioréacteurs plats 33
1.3.2. Les photobioréacteurs en colonnes ou fermenteurs 34
1.4. La mécanique des fluides en bioréacteurs 36
1.4.1. La force de cisaillement 37
1.4.2. Le nombre d'Ekman 38
1.4.3. Le flux de CO_2 : advection ou diffusion 38
Chapitre 2 : Matériel et méthodes **40**
2.1. Dispositifs expérimentaux 41
2.2. Moteurs 44
2.3. Cylindre, volume, rapport d'aspect et moteurs 45
2.4. Apport de CO_2 46
2.5. Mesures de données physiques 49
2.5.1. Diffusion du CO_2 et prise de données physiques 49
2.5.1.1. Mesure de la concentration de CO_2 dans le liquide du Dinophyt 49

2.5.1.2. Mesure du pourcentage molaire de CO_2 dans l'air 50
2.5.2. Fluctuation de température : convection et advection 52
2.6. Dispositif pour les expériences de biologie 55
2.6.1. Apport de Lumière 55
2.6.2. Contrôle de la température 57
2.6.3. Contrôle du pH 58
2.6.4. Préparation du milieu de culture 58
2.6.5. Comptage cellulaire 60
Chapitre 3 : Etude du mélange du CO2 dans un bioréacteur de type Dinophyt 61
Chapitre 4 : Résultats préliminaires sur l'usage du Dinophyt avec tampon carbonate 70
4.1. Consommation des NP par la culture 71
4.2. Comparaison de différents pourcentages molaires de CO_2 74
Chapitre 5 : Une nouvelle génération de Dinophyt 77
5.1. Contrôle du pH des cultures 78
5.2. Comparaison de la croissance cellulaire pour deux apports différents de CO_2 82
Chapitre 6 : Optimisation de la culture dans un Dinophyt 85
6.1. Comparaison de différentes vitesses angulaires sur la croissance cellulaire 86
6.2. Comparaison de différents pH sur la croissance cellulaire 89
6.3. Comparaison de différents pourcentages molaires de CO_2 sur la croissance cellulaire 90
Chapitre 7 : La culture en Dinophyt de grands volumes, effet d'échelle 93
7.1. Croissance cellulaire en Dinophyt de volume industriel : Le Dinophyt V3 95
7.2. Croissance cellulaire en Dinophyt annulaire : 97
Le Dinophyt V4 97
Chapitre 8 : Conclusions 103
8.1. Synthèse 104
8.2. Perspectives 105
Bibliographie : 107

Table des illustrations :

Figure 1.1 : Proportion des molécules Naturelles Marine découvertes.....18
Figure 1.2 : L'éponge Cryptotethya crypta. 20
Figure 1.3. : Exemple d'un médicament commercialisé. 21
Figure 1.4: Morphologie générale des dinoflagellés. 24
Figure 1.5: Schéma morphologique du stade mobile d'un dinoflagellé.....25
Figure 1.6: Modèle de Margalef sur le développement de blooms phytoplanctoniques. 26
Figure 1.7: Concentration cellulaire moyenne de culture d'A. carterae. 28
Figure 1.8 : Représentation du complexe PCP d'A. carterae.....29
Figure 1.9 : Concentration cellulaire moyen en fonction du pH.....30
Figure 1.10 : Géométries de photobioréacteurs fermés. 33
Figure 1.11 : Photobioréacteur en panneaux plats 34
Figure 1.12 : Photobioréacteur en colonnes à bulles.....35
Figure 1.13 : Photobioréacteur fermenteur en verre à hélice. 36
Figure 1.14 : La formation d'un profil de vitesse à la surface d'une paroi 37
Figure 2.1 : Le principe du Soft-mixer inspiré de précession de la terre.....41
Figure 2.2 : Dispositif initial pour la prise de données physiques. 42
Figure 2.3 : Dispositif expérimental pour la prise de données biologiques.....43
Figure 2.4 : Photo du Dinophyt 1L (a) et 169L (b) 44
Figure 2.5 : Propagation du cisaillement d'un fluide dans un cylindre incliné.....45
Figure 2.6 : Le principe du DINOPHYT. 47
Figure 2.7 : Grille de plexiglass soutenant la membrane microporeuse dans un Dinophyt. ..48
Figure 2.8 : Ratio de solutions de bicarbonates et carbonates de potassium. 48
Figure 2.9 : photo du Dinophyt pour les mesures physiques avec un capteur CO_2. 50
Figure 2.10 : Diffusion du CO_2 dans la cuve a tampon $CaCO_3$. 51
Figure 2.11 : Photo de la cuve à tampon carbonate pourvue d'une turbine Rushton. 51
Figure 2.12 : Diffusion du CO_2 dans la cuve a tampon $CaC0_3$ mise en rotation à 30rpm et incliné de 3°, selon la présence/absence d'une turbine. 52
Figure 2.13 : Fluctuations de température sans caisse isotherme et ventilateur (A) puis avec caisse isotherme et usage d'un ventilateur (B). 53
Figure 2.14 : Bioréacteur installé dans une caisse isotherme dont la température est régulée 54
Figure 2.15 : Fluctuations de pourcentage molaire de CO2 (%).....55
Figure 2.16 : Méthode de prise de mesure de l'intensité lumineuse moyenne émise par les LED sur les Dinophyts de 1 à 9,8L. 56

Figure 2.17 : Schéma des points de mesure de l'intensité lumineuse moyenne émise par les LED autour du Dinophyt 169L. 57

Figure 2.18 : Effet de l'injection de CO2 dans une cuve de culture 58

Figure 2.19 : Lame de comptage (Iprasense©). 60

Figure 2.20 : Le logiciel Horus analyse l'image de l'échantillon et reconnaît les cellules 60

Figure 4.1 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt 1L avec membrane microporeuse et tampon carbonate 5%, sans renouvellement du milieu 72

Figure 4.2 : Concentration de nitrates dans le Dinophyt 1L lors d'une culture d'A carterae 73

Figure 4.3 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt 1L avec membrane microporeuse et tampon carbonate 5%, avec 10% de renouvellement quotidien du milieu 74

Figure 4.4 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt 3L avec membrane microporeuse avec 20% de renouvellement quotidien du milieu 75

Figure 4.5 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt 3L avec membrane microporeuse avec 10% de renouvellement quotidien du milieu où l'on compare des tampons carbonate produisant un pourcentage de CO_2 de 5% et 10%. 76

Figure 5.1 : Schéma du Dinophyt V2 78

Figure 5.2 : Photos des Dinophyts V2 79

Figure 5.3 : Variations de pH selon l'apport de CO_2 79

Figure 5.4 : Schémas de deux Dinophyts l'un avec apport de CO_2 par la surface libre (A), l'autre avec apport de CO_2 par la membrane (B) 80

Figure 5.5 : Variations de pH selon qu'on apporte le CO_2 par la surface libre ou par la membrane microporeuse avec mousse égalisant les volumes de gaz disponibles pour les deux dispositifs. 81

Figure 5.6 : Croissance de la culture d'A. carterae en Dinophyt avec membrane microporeuse comparée à une culture en Dinophyt 83

Figure 5.7 : Taux de croissance et temps de doublement (d en jours) d'A. carterae en Dinophyt. 84

Figure 6.1 : Croissance en triplicata temporel de la culture d'A. carterae en Dinophyt 1L mis en rotation à 15 ; 30 et 60 rpm. 87

Figure 6.2 : Taux de croissance μ de la culture d'A. carterae en Dinophyt 1L mise en rotation à 15 ; 30 et 60 rpm. Le temps de doublement d est indiqué en j^{-1} 88

Figure 6.3 : Croissance de la culture d'A. carterae en Dinophyt 1L, en rotation à 45 rpm, CO_2 10%, taux de renouvellement de 10% du milieu de culture 89

Figure 6.4 : Taux de croissance μ de la culture d'A. carterae en Dinophyt 1L, en rotation à 45 rpm, CO_2 10%, taux de renouvellement de 10%. 90

Figure 6.5 : Croissance en duplicata de la culture d'A. carterae en Dinophyt 1L, en rotation à 45 rpm, taux de renouvellement du milieu de 10% 91

Figure 7.1 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt 169L avec membrane, en rotation à 12 rpm, sans renouvellement du milieu 96

Figure 7.2 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt 169L avec membrane, en rotation à 12 rpm, taux de renouvellement du milieu de 20%[1]. 97

Figure 7.3 : Photo du Dinophyt V4 avec éclairage autour et au centre de la culture. 98

Figure 7.4 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt V4, jusqu'à épuisement du milieu de culture 99

Figure 7.5 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt V4 avec la lumière est réglée selon la concentration cellulaire 100

Liste des tables :

Table 1.1 - Extrait d'une liste d'exemples de molécules marines ayant abouti au développement de médicaments……19
Table 1.2 - Extrait d'une liste d'exemples de molécules marines en phase clinique pour le développement de médicaments ……20
Table 1.3 - Influence de différents enrichissements de milieu F/2 sur la croissance d'Amphidinium carterae 29
Table 1.4 - Comparaison de la diffusivité D du CO2 et de l'hydrogène dans l'air et l'eau ... 36
Table 2.1 - Différents volumes de culture utiles des bioréacteurs en fonction du diamètre interne du cylindre 44
Table 2.2 - Caractéristiques techniques de la membrane microporeuse……45
Table 2.3 - Pourcentage molaire obtenue avec différentes préparations de tampons carbonate ……47
Table 2.4 - Caractéristiques techniques du capteur CO2……48
Table 2.5 - Caractéristiques des rampes LED Aquamedic……53
Table 2.6 - Caractéristiques du luxmètre utilisé pour mesurer l'intensité lumineuse……53
Table 2.7 - Caractéristiques du contrôleur de pH relié à une électrovanne……55
Table 2.8 - Caractéristiques du milieu Necton : Nutribloom plus……56
Table 2.9 - Caractéristiques du sel naturel Royal Ion Balanced Pro……56
Table 4.1 - Présentation des paramètres d'expériences réalisées avec tampon carbonate ……71
Table 5.1 - Présentation des paramètres d'expériences comparant deux apports différents de CO2……82
Table 6.1 - Présentation des paramètres d'expériences réalisées en faisant varier différents paramètres (Vitesse angulaire, pH et pourcentage de CO2) ……86
Table 7.1 - Récapitulatif des différentes versions de Dinophyts V1 à V4……94
Table 7.2 - Présentation des paramètres d'expériences réalisées en Dinophyts V3 et V4 (volumes > 100L) …… ……95
Table 7.3 - Récapitulatif de la production de cellules en Dinophyts comparés aux meilleurs rendements dans la littérature ……101

Chapitre 1 : Intérêt pour les molécules bioactives

1.1. Présentation des molécules bioactives

L'utilisation de produits naturels à des fins médicales date de plusieurs milliers d'années. Les hommes et les femmes de l'ancienne Egypte utilisaient certaines parties de plantes pour le traitement de maladies (Romano et al., 2017). Ce n'est pas tant la plante mais les molécules bioactives qu'elle produit qui ont un intérêt en santé humaine. Le terme « molécule bioactive » est une expression d'usage courant comprenant des substances qui peuvent, à de faibles concentrations, moduler des processus physiologiques. On peut distinguer, parmi les molécules bioactives, celles composées d'acides aminés regroupant les peptides, les protéines et d'autres plus petites. Ces molécules sont produites via des mécanismes cellulaires complexes et dont l'action biologique va dépendre de cette séquence d'acides aminés elle-même dépendante du code génétique inscrit dans l'organisme qui les produit. Ce sont des molécules relativement grosses allant de 5000 Dalton (unité de masse atomique, unité noté Da) pour les plus petits peptides à 10^6 Da pour les grosses protéines complexes. Les molécules qui ne sont pas composées d'acides aminés sont en général plus petites et offrent un arsenal chimique extrêmement varié, classé en différentes familles selon les fonctions chimiques présentes. Parmi celles-ci on trouve les polykétides qui sont des molécules synthétisées par des enzymes spécialisées, comme la polykétide synthase. Ces composés mesurent entre 33 et 220 kDa (Bau chart et al., 2012 ; Bon et al., 2022).

1.1.1. Les molécules bioactives en pharmacologie

Détournés de leur usage premier, les agrumes donnent accès à de nombreuses molécules bioactives : des vitamines, des antioxydants, des huiles essentielles dont les bienfaits sur l'organisme et les propriétés antifongiques ne sont plus à démontrer (Putnik et al., 2017). Les champignons offrent également un large spectre de molécules bioactives en pharmacologie. Ces organismes produisent naturellement des molécules ayant des activités anticancéreuses (Aras et al., 2018) et des antibiotiques (De Simeis et Serra, 2021).

L'utilisation de venin animal est intéressante pour la fabrication de médicaments. Plusieurs d'entre eux basés sur des composants du venin sont commercialisés dans certains pays ou en cours d'essais cliniques. Avec le venin de certaines vipères, il est produit un traitement contre l'hypertension par exemple (Rima et al., 2018).

Dans nos sociétés occidentales aujourd'hui, la population est vieillissante et souffre de plus en plus de maladies chroniques (cancer, maladies neurodégénératives), de maladies infectieuses (COVID) et d'infections bactériennes multirésistantes aux antibiotiques (MRD-bacteria). Pour répondre à ces enjeux de santé publique, l'industrie pharmaceutique manque aujourd'hui drastiquement de nouvelles structures moléculaires originales, capables de se lier et de moduler des cibles cellulaires impliquées dans des mécanismes physiopathologiques. Ceci est particulièrement vrai pour les canaux ioniques présents à la surface de toutes nos cellules et qui gouvernent un grand nombre de fonctions comme nos sens, la rythmicité cardiaque, la perception de la douleur, etc. Par ailleurs, certains de ces canaux sont exprimés en grande quantité à la surface de cellules tumorales, faisant d'eux une cible de choix pour vaincre le cancer. Ces canaux ioniques constituent aujourd'hui une cible pharmaceutique des plus importantes. En effet, environ 18% de nos médicaments actuels ciblent au moins un canal ionique. Et pourtant, seuls 8% d'entre eux ont fait l'objet du développement de médicaments modulant leur activité, faute de molécules capables de s'y lier. Ceci démontre non seulement

l'importance pharmacologique de cette classe de molécules, mais également le besoin d'identifier de nouvelles structures moléculaires capables de moduler les canaux ioniques (Santos et al. 2016).

Le développement d'un nouveau médicament est un long parcours présentant plusieurs phases permettant de tester et d'éliminer les mauvais candidats médicaments pour le statut final de médicament commercialisable. Il y a en premier lieu des phases dites « précliniques » qui font intervenir des essais sur cultures cellulaires (in vitro) puis ensuite au sein d'organismes animaux vivants. Les essais sur les animaux sont réalisés sur trois espèces différentes dont un rongeur afin d'étudier l'effet de la molécule. Différents critères sont observés comme le mécanisme d'action, la vitesse de diffusion dans l'organisme, la distribution de la molécule dans les tissus, l'impact environnemental, la toxicité… Lors de cette étape d'essais, il est estimé la dose à administrer chez l'homme en partant d'une dose non toxique chez l'animal. Si une molécule présente une trop forte toxicité ou trop peu d'efficacité alors elle est considérée non conforme et ne valide pas l'étape de la phase préclinique. Une fois la phase préclinique validée, viennent les phases d'évaluation clinique qui sont le début des expérimentations sur l'homme. La sécurité et l'efficacité du candidat médicament sont évaluées sur des volontaires sains ou malades. Une balance bénéfices risques est alors définie pour le candidat, c'est-à-dire une comparaison entre bénéfices pour la santé et inconvénients potentiels. Cette balance doit être positive pour que le médicament soit commercialisable. Il y a 3 phases cliniques successives. La phase I teste l'évolution de la molécule dans l'organisme en fonction du temps et la toxicité. Les volontaires suivent des examens médicaux pour obtenir des données et vérifier différents paramètres cardiaques, respiratoires…La phase II permet de déterminer chez des volontaires malades la dose minimale efficace du candidat médicament et les possibles effets indésirables. Une seconde étape de cette phase s'effectue sur plusieurs centaines de malades avec la dose minimale définie précédemment pour rechercher un bénéfice sur la santé. Une fois cette phase validée, la phase III évalue l'efficacité du médicament sur des centaines de patients (cancer) à des milliers (maladies courantes : hypertension ; INSERM.fr). Chaque phase clinique dure plusieurs années. Ainsi, le processus complet de développement d'un médicament dure jusqu'à 15 ans pour un coût de 1,8 milliard d'euros. Ce prix exorbitant s'explique par le fait que beaucoup de molécules sont éliminées durant les phases de développement car elles présentent une toxicité trop élevée ou une efficacité trop faible (www.chu-st-etienne.fr ; www.ligue-cancer.net).

Les médicaments peuvent être classés en différentes catégories. Il existe les « Biologics » qui sont des molécules de grandes tailles, comme les protéines et les anticorps qui sont très chers à produire (culture cellulaire animale, levures…) et présentent peu de succès contre les cancers et nouvelles maladies infectieuses (coronavirus ; Biotechprimer.com). Une autre catégorie de médicaments sont les petites molécules (peptides) dont une partie est produites par voie de synthèse. La majeure partie des petites molécules sont obtenues dans la nature. Il y a les molécules terrestres et les molécules marines. Près de 70% de ces molécules sont connues et il est difficile d'identifier les 30% restant à découvrir. Les molécules inconnues sont pour la plupart confinées au sein de niches écologiques difficiles d'accès ou encore produites par des microorganismes très difficiles à détecter et/ou à cultiver (Malve 2016).

Trouver de nouvelles structures moléculaires demande souvent de faire appel à la chimie de synthèse combinatoire qui repose sur le principe de faire réagir différentes familles de molécules entre elles pour obtenir un nombre important de nouvelles molécules en seulement quelques étapes. Ensuite, ces molécules nouvellement crées sont testées pour y

trouver une éventuelle activité biologique. De nombreux peptides ont été obtenus avec cette méthode par le couplage des 20 acides aminés naturels (Ortholand, 2004). Toutefois, certaines molécules montrent une remarquable complexité (avec des systèmes de structures imbriquées) rendant leur synthèse en laboratoire très difficile et souvent impossible. De plus, ces molécules synthétiques nécessitent de multiples étapes de production, avec de nombreuses erreurs d'assemblages possibles, cela représente souvent un coût financier important qui n'est pas compatible avec le développement de médicaments (Leal et al., 2014). La chimie de synthèse combinatoire n'a donc pas réussi à honorer les promesses faites dans les années 90 (Banaigs et Kornprobst, 2007). De ce fait, la production et l'approvisionnement de ces molécules bioactives demeurent un enjeu crucial pour le développement de nouveaux médicaments.

Par conséquent, depuis les années 90, la bioprospection a connu un regain d'intérêt important afin de trouver de nouvelles structures chimiques originales capables de se lier et moduler l'activité de cibles pharmacologiques d'intérêt en santé humaine. Par soucis de simplicité, ces campagnes de bioprospection se sont, dans un premier temps, attardées à cribler la chimiodiversité terrestre qui est relativement bien connue à ce jour. On estime en effet que 70% des molécules terrestres ont d'ores et déjà été répertoriées. Les molécules non encore identifiées se cachent très vraisemblablement au sein de niches écologiques difficiles d'accès. Par voie de conséquence, la découverte de nouvelles structures chimiques originales proviendra en majorité des milieux aquatiques. Il est connu que seul 1 des 3 embranchements du règne végétal (Embryophytes) est sorti des eaux pour s'adapter au milieu terrestre. Parmi les 2 autres embranchements restants, les Glaucophytes (microalgues unicellulaires) et les Rhodobiontes (algues rouges), seules les Glaucophytes (14 espèces) se sont adaptées aux eaux douces et produisent des métabolites originaux. Beaucoup d'entre elles sont consommées quotidiennement sous forme de gélifiants ou d'épaississants comme c'est le cas pour les dérivés codés de E400 à E407 sur les emballages alimentaires. N'ayant par ailleurs aucun équivalent terrestre, la gestion des stocks naturels des algues rouges et brunes est absolument indispensable (Kornprobst, 2005 ; Qiu et al., 2006).

Dans le règne animal, seuls 4 phyla sur 28 ont émergé afin de peupler les biotopes terrestres. Sur les phyla aquatiques, 8 d'entre-eux sont exclusivement marins. Les autres phyla se sont adaptés aux milieux d'eau douce pour les conquérir. Cette vaste biodiversité marine offre dès lors un réservoir de chimiodiversité incommensurable sans équivalent sur terre (Figure 1.1, Kornprobst, 2005 ; Carroll et al., 2019). Parmi ces taxons, le nombre de molécules bioactives connues produites par les Dinophycae est sous-estimé. En effet, de nombreuses espèces de cnidaires et spongiaires hébergent des microalgues symbiotiques comme les Dinophycea qui sont les producteurs primaires de beaucoup de molécules attribuées initialement aux hôtes symbiotiques. On peut citer l'exemple de la molécule dihydrodinophysistoxin-1, détectée à l'origine dans une éponge marine, qui provient en fait du dinoflagellé *Dinophysis norvegica* (Carroll et al., 2022).

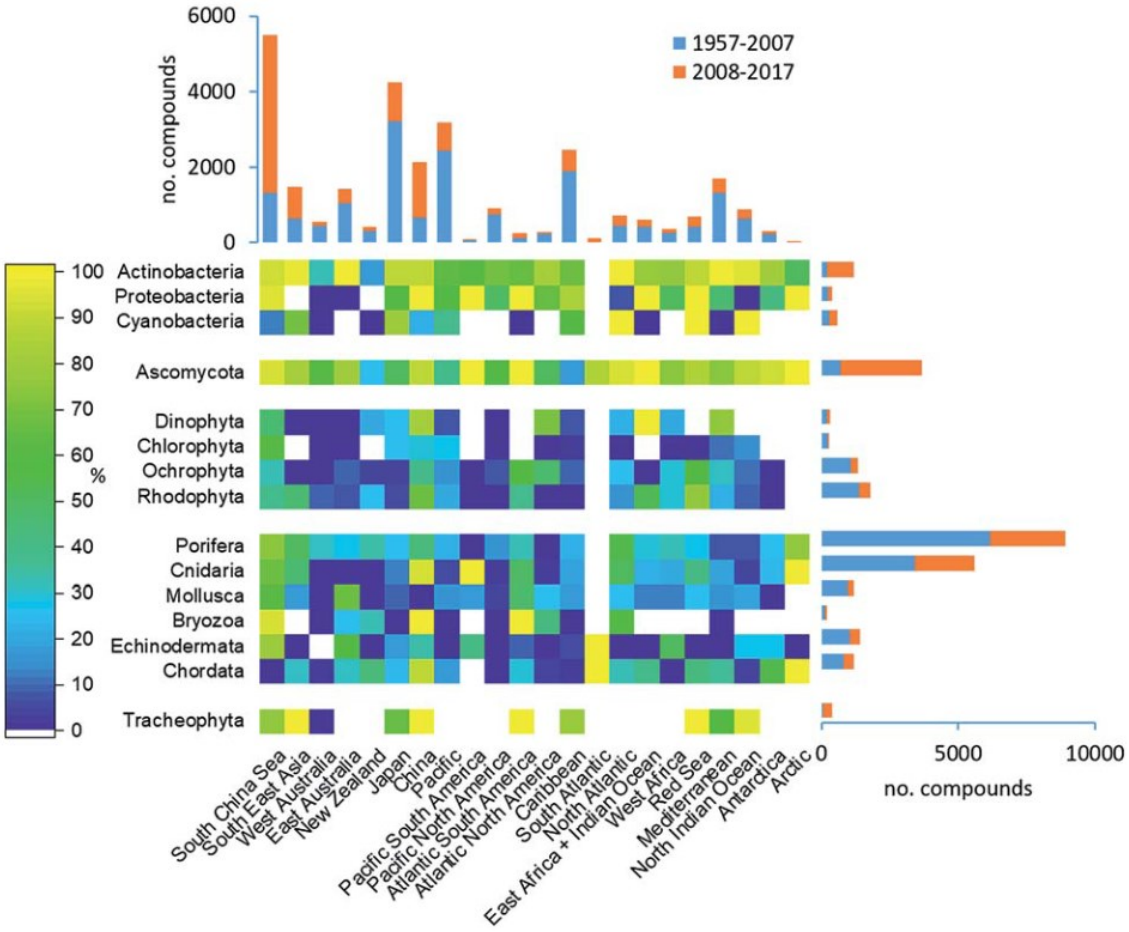


Figure 1.1 : Proportion des molécules Naturelles Marine découvertes : par phylum et région géographique entre 1957 et 2017 (Carroll et al., 2019).

1.1.2. Molécules marines et leurs sources

Dans les pays tels que le Japon, Taïwan et la Chine, la pharmacopée traditionnelle traitait des troubles divers à l'aide de composants bioactifs extraits de coraux et d'éponges. Puis dès 1950, au laboratoire d'Osborn à New York, était extrait une toxine appelée "Holothurine" d'un concombre de mer. Cette toxine a montré une capacité antitumorale chez la souris. En 1969, la première molécule marine aux propriétés anticancéreuses utilisée pour des soins chez l'Homme provenait d'une éponge. Elle est encore utilisée aujourd'hui, pour traiter certaines leucémies et lymphomes (Romano et al., 2017). Dans les années 50, le chimiste Bergmann a découvert les arabinosides en étudiant une éponge des Caraïbes connue sous le nom de *Cryptotethya crypta* (Figure 1.2). Ces composés chimiques ont des propriétés anti-cancéreuses et anti-virales permettant de perturber les mécanismes de croissance et de réplication des cellules cancéreuses et infectées par des virus. Ce n'est qu'ensuite que furent créés des analogues de synthèse des arabinoses, l'ara-C et l'ara-A, pour être commercialisés. Synthétisé en 1959, l'ara-C a été breveté comme anti-leucémique par la firme Upjohn en 1963 (Kornprobst, 2005, Banaigs et Kornprobst, 2007, table 1.1).

Compound name	Trademark	Marine Organism	Molecular target	Europe Active Clinical trials	Disease area	Company/ Institution
Belantamab mafodotin-blmf	Blenrep TM (2020)*	Mollusk/cyanobacterium	BCMA	[7+]	Cancer: Relapsed/refractory multiple myeloma	[GlaxoSmithKline]
Lurbinectedin	Zepzelca TM (2020)*	Tunicate	RNA Polymerase II	[6+]	Cancer: Metastatic Small Cell Lung Cancer	[Pharmamar]
Enfortumab Vedotin-ejfv	PADCEV™ (2019)*	Mollusk/cyanobacterium	Nectin-4	[3+]	Metastatic urothelial cancer	[Astellas Pharma & Seattle Genetics]
Polatuzumab vedotin (DCDS-4501A)	Polivy TM (2019)*	Mollusk/ cyanobacterium	CD76b & microtubules	[4+]	Cancer: Non-Hodgkin lymphoma, Chronic lymphocytic leukemia, Lymphoma, B-Cell lymphoma, Folicular	[Genetech/ Roche]
Plitidepsin **	Aplidin®	Tunicate	eEF1A2	[6+]	Cancer: Multiple Myeloma, Leukemia, Lymphoma	[Pharmamar]
Brentuximab vedotin (SGN-35)	Adcetris® (2011) *	Mollusk/ cyanobacterium	CD30 & microtubules	[37+]	Cancer: Anaplastic large T-cell systemic maglinant lymphoma, Hodgkin's disease	[Seattle Genetics]
Eribulin Mesylate (E7389)	Halaven® (2010) *	Sponge	Microtubules	[11+]	Cancer: Metastatic Breast Cancer	[Eisai Inc.]
Omega-3-acid ethyl esters	Lovaza® (2004) *	Fish	Trygliceride-synthesizing enzymes	None	Hypertriglyceridemia	[Glaxo Smith Kline]
Omega-3-carboxylic acid	Epanova® (2014)*	Fish	Triglyceridesynthesizing enzymes	[6+]	Hypertriglyceridemia	[AstraZeneca]
Ziconotide	Prialt® (2004) *	Cone snail	N-TypeCa channel	[3+]	Pain: Severe Chronic Pain	[Jazz Pharmaceuticals]
Vidarabine (Ara-A)	Vira-A® (1976)*	Sponge	Viral DNA polymerase	None	Antiviral: Herpes Simplex Virus	[Mochida Pharmaceutical Co.]
Cytarabine (Ara-C)	Cytosar-U® (1969) *	Sponge	DNA polymerase	[140+]	Cancer:Leukemia	[Pfizer]

Table 1.1 : Extrait d'une liste d'exemples de molécules marines ayant abouti au développement de médicaments (Voser et al. 2022).

Compound name	Trademark	Marine organism	Molecular Target	Europe - Active Clinical Trials	Disease Area	Company/ Institution
Plinabulin (NPI-2358)	NA	Fungus	Microtubules	None	Cancer: Non-Small Cell Lung Cancer, Brain Tumor	[BeyondSpring Pharmaceuticals]
Tetrodotoxin	Halneuron™	Pufferfish	Sodium Channel	None	Pain: Chronic Pain	[Wex Pharmaceutical Inc.]
Lurbinectedin (PM01183)	Zepzelka™	Tunicate	RNA Polymerase II	[4+]	Cancer: Ovarian Cancer, Breast Cancer, SCLC	[Pharmamar]
Marizomib (Salinosporamide A; NPI-0052)	NA	Bacterium	20S proteasome	[1+]	Cancer: Non-Small Cell Lung Cancer, Pancreatic Cancer, Melanoma, Lymphoma, Multiple Myeloma	[Triphase]

Table 1.2 : Extrait d'une liste d'exemples de molécules marines en phase clinique pour le développement de médicaments (Voser et al. 2022).



Figure 1.2 : L'éponge Cryptotethya crypta.

La Tétrodotoxine est connue pour être la molécule produite au sein d'une certaine espèce de poisson, le poisson-globe. Cette molécule se retrouve également chez d'autres espèces marines (gobies, étoiles de mer, poulpes…) et notamment le dinoflagellé *Alexandrium tamarense*. La Tétrodotoxine intervient sur les récepteurs cellulaires de neurones impliqués dans la douleur (Nieto et al., 2012, table 1.2). Un médicament, le Tectin développé par Wex Phamaceuticals est en phase 3 clinique pour le contrôle de la douleur chez des patients atteints de cancer (Assunção et al. 2017).

L'ecteinascidine-743 (Yondelis™, Figure 1.3), est une molécule aux propriétés antitumorales particulièrement prometteuses. Le Yondelis est extrait de l'ascidie *Ecteinascidia turbinata*, d'abord obtenu à partir de récolte à petite échelle en milieu naturel permettant la réalisation des essais précliniques, il fut ensuite récolté à grande échelle à partir de l'espèce cultivée, permettant de réaliser les essais cliniques. Elle est maintenant produite par hémisynthèse et une équipe de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS de Gif-sur-Yvette vient de breveter sa synthèse totale, ce qui constitue un début de solution pour produire ces substances de façon économiquement exploitable par synthèse chimique.

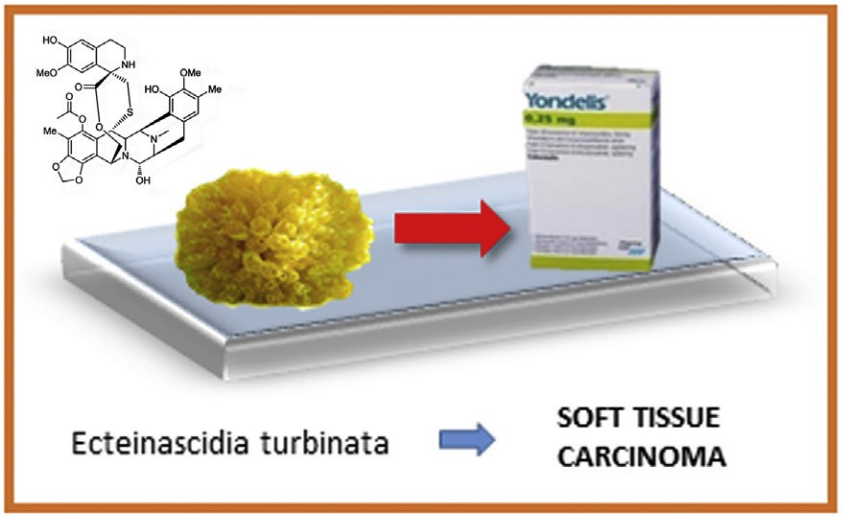


Figure 1.3. : Exemple d'un médicament commercialisé et issu de recherches sur un organisme marin : le tunicier Ecteinascidia turbinata.

La difficulté majeure en bioprospection est de sélectionner, parmi des dizaines de milliers, l'organisme qui pourra fournir des molécules aux propriétés pharmacologiques désirées. Cela nécessite de connaître ces organismes et de savoir où les trouver. Par ailleurs, une fois identifié, cet organisme doit être enclin à produire la molécule désirée en quantités suffisantes pour sa caractérisation chimique et fonctionnelle. Il devra être bien souvent placé dans des conditions de culture adaptées à la biosynthèse de ces molécules, ce qui ne peut se réaliser qu'au prix d'une connaissance approfondie de ces organismes.

L'embranchement des Cnidaires (coraux, anémones, méduses, etc) est l'une des premières branches de l'arbre de vie animal. L'extrême diversité de ce phylum associée aux propriétés antifouling (qui empêche des organismes étrangers de coloniser un support) observées sur le terrain, a conduit les biochimistes à cribler les cnidaires dans le but de trouver des composés bioactifs qui pourraient aider à lutter contre les troubles majeurs de santé publique. Parmi tous les phyla passés au crible pour trouver de nouveaux composés, les cnidaires se sont révélés être l'une des sources les plus importantes de molécules bioactives. De plus, il a été démontré que ces composés ont une forte probabilité de montrer une bioactivité efficace (des capacités anti-inflammatoires, antibiotiques, antitumorales, anticancereuses, antibacteriales and antifongiques) pour la santé publique (Blunt et al., 2008 ; Leal et al., 2013 ; Rocha et al., 2011). Malgré ce rapport positif, très peu de molécules atteignent le stade d'essai clinique (Mayer et Gustafson, 2008) car l'un des problèmes majeurs, associés aux premières phases de la découverte de médicaments marins à partir d'invertébrés, est le manque d'approvisionnement constant et fiable en biomasse (Hill et Fenical, 2010). De plus, les molécules tant convoitées sont souvent produites en infimes quantités (ppm : parts par million). Récemment, il a été montré que les micro-organismes symbiotiques, y compris les protistes et

les microalgues (dinoflagellés), sont en fait producteurs d'un grand nombre de métabolites autrefois considérés comme produits par leur hôte invertébré (Dunlap et al., 2007 ; Gordon et Leggat, 2010 ; Gordon et al., 2013 ; Harel et al., 2008 ; Haygood et al., 1999 ; Hill et Fenical, 2010 ; Piel, 2004).

Les dinoflagellés sont particulièrement connus pour leurs capacités à produire des toxines marines. Ces toxines sont à l'origine des problèmes environnementaux liés aux efflorescences algales (red tides). Cependant, finement dosées, ces molécules peuvent avoir des propriétés biologiques hors du commun dans de nombreux domaines de santé, allant du contrôle de la douleur, à la lutte contre le cancer (Assunção et al., 2017 ; Blunt et al., 2018 ; Martinez et al., 2019).

Les toxines marines forment un groupe important de molécules produites par près d'une centaine d'espèces de microalgues. Plus de 70% de ces espèces appartiennent à la famille des dinoflagellés (Assunção et al., 2017). Nombre de ces toxines tirent leur bioactivité de leur capacité à se lier avec une très forte affinité et avec une haute spécificité aux canaux ioniques. La Yessotoxine, produite par quelques dinoflagellés comme *Protoceratium reticulatum* et *Lingulodinium polyedrum*, permet d'agir sur des récepteurs cellulaires en lien avec des maladies neuro-dégénératives tel qu'Alzheimer (Botelho et al., 2022). La Maitotoxine, produite par plusieurs genres de dinoflagellés (*Gambierdiscus sp., Amphidinium sp., Prorocentrum sp.)* est connue pour être impliquée dans la régulation de canaux ioniques utilisant le Calcium (Ca2+) intervenant dans les réactions cellulaires inflammatoires (Assunção et al. 2017). La palytoxine s'est révélée posséder des propriétés anti-tumorales puissantes (Detournay et al., brevet : n°WO 2015/090591 A1 ; 2015) et dont les mécanismes originaux d'induction de mort cellulaire laissent entrevoir un bel avenir pour ces toxines marines (Detournay et al., submitted).

Les dinoflagellés se sont avérés être une formidable source biotechnologique de toxines, avec des activités biologiques utiles pour un large éventail de domaines pharmacologiques, médicaux et de la biochimie. Toutefois, les dinoflagellés ne sont pas présents dans le milieu naturel en concentration suffisante pour l'exploitation, ce qui rend non rentable leur récolte. Beaucoup de ces dinoflagellés ont développé des symbioses avec des cnidaires et spongiaires et se retrouvent peu en forme libre dans les océans. Ceci rend les toxines issues de ces dinoflagellés très rares, même pour réaliser des tests précliniques. La synthèse chimique reste très difficile à réaliser. Il nous faut donc les cultiver efficacement pour permettre une production de masse, atteignant ainsi des quantités moléculaires suffisantes pour pouvoir organiser des campagnes de criblage qui nécessitent plusieurs grammes de molécules purifiées. L'usage de photobioréacteur pour la culture de dinoflagellés afin d'obtenir de grandes concentrations de toxines est donc nécessaire à développer. Les conditions nutritionnelles et opérationnelles telles que la lumière, les modes d'aération et d'agitation, doivent tenir compte de la biologie des dinoflagellés.

1.2. La Biologie des dinoflagellés

1.2.1. Phylogénie des dinoflagellés

Les dinoflagellés ou dinophycées, ou encore péridiniens font partie du règne des eucaryotes et de l'embranchement des dinophytes (Sialve et Steyer, 2013). En se basant sur des critères morphologiques et moléculaires, douze ordres de dinoflagellés peuvent être distingués.

Le nombre d'espèces vivantes de dinoflagellés est estimé entre 2 000 et 2 500, attribué à environ 300 genres (Taylor et al., 2008). Parmi ces genres de dinoflagellés, certains sont benthiques, c'est-à-dire qu'ils ont besoin d'un substrat où se fixer pour vivre et se développer. D'autres genres sont dits pélagiques signifiant qu'ils vivent libres dans la colonne d'eau où ils vont trouver les nutriments nécessaires à leur développement.

Le genre *Amphidinium* est un groupe important de dinoflagellés de l'ordre des Gymnodiniales. *Amphidinium operculatum* Claparède et Lachmann, est l'espèce type du genre dinoflagellé *Amphidinium* (Jørgensen et al., 2004). *Amphidinium carterae Hulburt* (1957) est un dinoflagellé benthique toxique (Mandal et al., 2011) produisant des substances polymères extracellulaires qui sont bénéfiques pour sa croissance mais induisant la prolifération d'algues nuisibles (Liu et al., 2017).

1.2.2. Morphologie des dinoflagellés

Les dinoflagellés sont des organismes unicellulaires, dont la cellule est protégée par une thèque de cellulose (enveloppe de protection). Ces organismes possèdent deux flagelles leur permettant d'effectuer de relatifs déplacements tournoyants (du grec dino qui veut dire « toupie ») et des migrations verticales. Le groupe est très diversifié et il est classé entre les animaux et les végétaux puisque la moitié des espèces ne sont pas photosynthétiques et qu'elles se nourrissent d'autres organismes planctoniques (Mollo et Noury, 2013).

Ce sont des protistes de taille généralement comprise entre 10 et 100 µm, même si certains spécimens peuvent mesurer jusqu'à 2 mm (*Noctiluca scintillans*, Ollevier et al., 2021). De plus, les informations sur le cycle de vie ainsi que les caractéristiques morphologiques ne sont pas connues pour la plupart des dinoflagellés car la collecte des données peut être extrêmement difficile, en particulier pour les nombreuses espèces rares et hétérotrophes (Hoppenrath, 2017).

Les dinoflagellés sont morphologiquement distincts des autres eucaryotes dans la structure de leur flagellation en dinokont (deux flagelles dissemblables) et un noyau dinokaryote = dinokaryon (chromosomes condensés en permanence sans histone, sans nucléosome) (Hoppenrath, 2017).

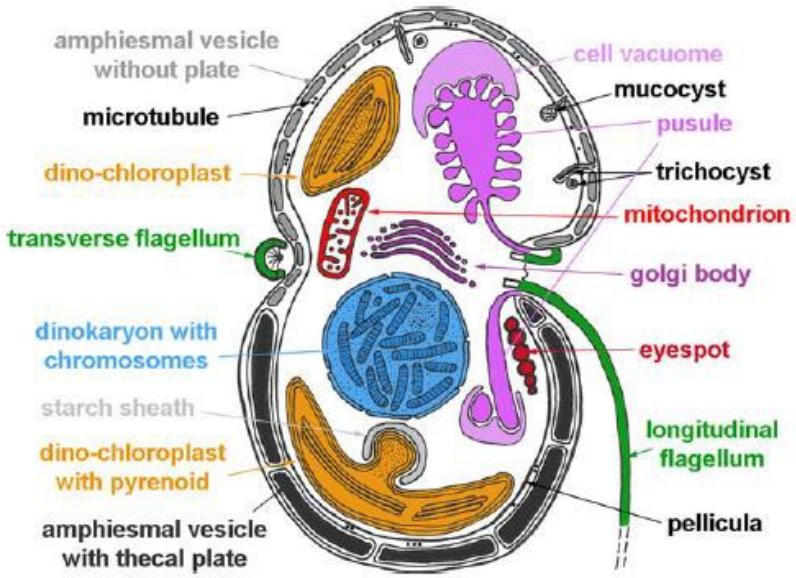


Figure 1.4: Morphologie générale des dinoflagellés et leurs ultrastructures caractéristiques (Hoppenrath, 2017).

Les vésicules alvéolaires se trouvant sous la membrane cellulaire forment ensemble l'amphiesma (paroi). Parmi les dinoflagellés, certains présentent une forme cuirassée, alors les vésicules contiennent des plaques thécales (plaques de cellulose) qui forment une « armure ». Selon les conditions environnementales, les cellules peuvent perdre leur thèque. Les dinoflagellés cuirassés possèdent deux régions de plaques principales composées de deux à 100 plaques individuelles. Les bords des plaques se chevauchent, s'écartant au fur et à mesure que la cellule augmente en taille et permettant à la cellule de s'étendre. Les plaques sont de formes très variées, allant de formes sphériques comme chez le genre *Peridinium* à des formes allongées ressemblant à des cornes comme les espèces du genre *Ceratium*. En outre, certaines espèces ont des crêtes ou des arêtes - en particulier les membres du genre *Dinophysiales*. Chez certaines espèces, les crêtes peuvent être creuses et abriter des cyanobactéries qui fournissent de l'azote fixe à l'hôte. Ce phénomène est plus fréquent dans les eaux pauvres en azote (Radmer, 1996 ; Hoppenrath et al., 2013 ; Virginia Institute of Marine Science). Les flagelles se trouvent dans des rainures, les uns dans le cingulum (ceinture) et les autres partiellement en sens longitudinal dans le sulcus (sillon). Chez la plupart des dinoflagellés, le cingulum divise le dinoflagellé en une partie supérieure (épithèque) et une partie inférieure (hypothèque) comme représenté sur la figure 1.4. Les dinoflagellés sont pourvus « d'eyespots », organelles sensibles à la lumière composées de gouttelettes lipidiques emballées dans des couches de membranes empilées. Ils contiennent des composés caroténoïdes qui sont excitables par la lumière et permettent à l'organisme de détecter la direction de la lumière. Les dinoflagellés possèdent aussi comme organite, la pusule, une vacuole spéciale de fonction encore inconnue, ouverte aux bases des flagelles. Les dinoflagellés peuvent contenir différents types d'extrusomes (organites qui sécrètent de la matière vers l'extérieur) : trichocystes, mucocystes, taeniocystes et/ou nématocystes. De nombreux dinoflagellés produisent des trichocystes défensifs, jusqu'à plusieurs centaines par cellule. Ces trichocystes sont libérés lors d'une hydratation rapide, éjectant de longs filaments protéiques en forme de tige, semblables à ceux que l'on trouve chez les ciliés comme la paramécie. L'effet ressemble à l'explosion d'une bombe aérosol (dinophyta.org de dr.Hoppenrath).

Les dinoflagellés sont connus pour être plus sensibles aux turbulences qui ont lieu dans la colonne d'eau que beaucoup d'autres microalgues (diatomés, cynaobactéries, haptophytes…). Cette fragilité au stress hydrodynamique se manifeste par la production de composés oxydant (ROS) et lipoperoxydes. Ces derniers induisant l'oxydation des lipides intracellulaires, ils provoquent des dommages sur la cellule (Camacho et al.2011 ; Wang et al., 2018 ; Lobaton et al. 2019). Chez certaines espèces comme *Pyrocystis lunala,* les turbulences provoquent une déformation de la cellule. Jalaal et al. (2020) décrit que cette déformation induit l'activation de canaux ioniques et la production d'une intense lumière (bioluminescence). A forte concentration (million de cellule/ml), ces dinoflagellés sont capables de colorer l'eau sur les littoraux, visibles la nuit. Des études montrent que la sensibilité des dinoflagellés est indépendante de la présence ou absence de plaque thécale (figure 1.5, Cussatlegras et Le Gal, 2005 ; Gallardo-Rodriguez et al., 2012a ; Gallardo-Rodriguez et al., 2012b ; Wang et al., 2018).

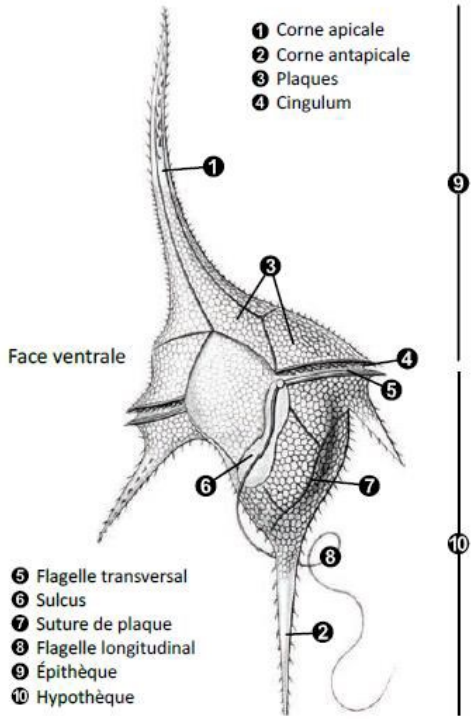


Figure 1.5: Schéma générique des principaux caractères morphologiques du stade mobile d'un dinoflagellé (Ceratium sp.), annoté depuis un schéma s'Ernest Haeckel.

Ainsi la culture de dinoflagellés en bioréacteurs nécessite d'adapter les conditions de culture et limiter les forces de mélange qui sont sources de stress et délétères (Parker et al., 2002 ; Havskum et al., 2005).

1.2.3. Métabolisme des dinoflagellés

Les dinoflagellés ont adopté un large choix de modes trophiques et d'habitats. Ils peuvent être photosynthétiques (organisme capable d'utiliser l'énergie lumineuse pour produire les nutriments nécessaires à sa croissance), hétérotrophes (organisme obtenant les nutriments nécessaires à sa croissance en ingérant d'autres organismes vivants) ou mixotrophes (organisme capable d'effectuer la photosynthèse ou d'être hétérotrophe selon les conditions environnementales). D'autre part, leurs interactions avec d'autres organismes sont multiples : certains sont planctoniques (Alexandrium sp., Amphidinium sp.,…) alors que d'autres vivent

en symbiose (Symbiodinium sp. ; Revel, 2015) ou sont parasites (Amoebophrya sp. ; Syndinium sp. ; Park et al., 2004 ; Chambouvet, 2009). Le cas de la symbiose le plus connu est le mutualisme entre l'embranchement des cnidaires (coraux durs et mous, anémones, méduses et hydrocoraux) et les dinoflagellés du genre *Symbiodinium* communément appelées zooxanthelles (Davy *et al.*, 2012). Les flagelles des dinoflagellés leur permettant d'optimiser leur localisation dans la colonne d'eau et d'éviter de sédimenter en l'absence de turbulences. Cette caractéristique semble être un élément clés dans leur compétition avec les diatomées (Figure 1.6, Smayda et Reynolds, 2001). Ces dernières sont adaptées à des conditions de remontées d'eaux puissances (upwellings) et celles des eaux tempérées du printemps et de l'hiver. Les dinoflagellés voient leur capacité de nage diminuer en présence de turbulences (ε = 0.05 cm2 s-3) générées par un vent de 54km/h (ressenti jusqu'à 10m de profondeur), qui provoquent la rétractation des flagelles (Havskum et al., 2005).

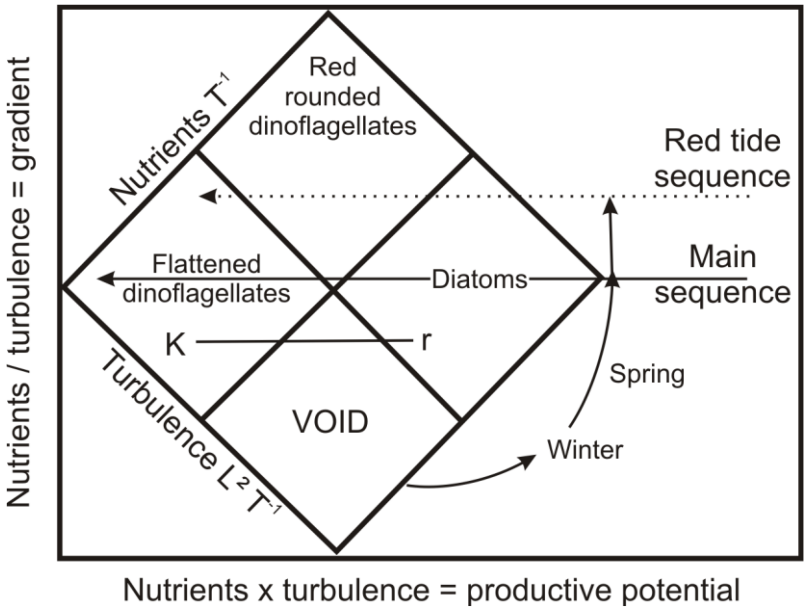


Figure 1.6: Modèle de Margalef sur le développement de blooms phytoplanctoniques en fonction de la turbulence et la disponibilité en nutriments pour les dinoflagellés et les diatomées (figure reprise par Smayda et Reynolds, 2001).

Lorsque les conditions environnementales sont favorables comme des eaux chaudes et de faibles turbulences, une multiplication des dinoflagellés peut avoir lieu et atteindre des densités de 10^5 à 10^6 cellules·L^{-1}. Une telle densité de cellules pigmentées colore l'eau des mers et des lacs intensément, ce phénomène est communément appelé marée rouge. Dans certains cas, cette prolifération peut conduire par la même occasion à la production de toxines (HAB, Harmful Algal Bloom) (Dia et al., 2014 ; Mangialajo et al., 2017).

Le cycle de vie d'une espèce de phytoplancton comprend quatre phases principales :
- La phase de croissance (mitotique et asexuée) ;
- La phase sexuelle (méiotique) ;
- La phase de repos (kyste)
- Et la phase de sénescence (Figueroa et al, 2010).

Au moins 10% de tous les dinoflagellés, et jusqu'à 28% dans les zones tempérées, sont des producteurs de kystes au repos (dinokyste). Après la reproduction sexuée, les dinoflagellés

produisent des stades diploïdes benthiques résistants (kystes) essentiels à la survie saisonnière de ces espèces (Ribeiro et al., 2011).

Les toxines marines produites par les dinoflagellés sont connues pour provoquer des pertes importantes dans les secteurs de l'aquaculture, des loisirs et de l'industrie du tourisme. En tant que proie à la base de la chaîne alimentaire, les dinoflagellés se retrouvent concentrés dans les animaux marins tels que les poissons, les crustacés et les mollusques. Ainsi concentrés, les dinoflagellés provoquent la mort de poissons, de mollusques et crustacés par la toxicité, ainsi que les problèmes de santé humaine liés à la consommation de ces animaux. Comme exemples parmi tant d'autres, on peut citer l'intoxication paralysante par les mollusques (IPM), l'empoisonnement neurotoxiques par les mollusques et l'irritation respiratoire (NSP), l'empoisonnement à l'azaspiracide (AZP), l'intoxication diarrhéique par les mollusques et les crustacés (DSP), l'empoisonnement du poisson par la ciguatera (CFP), une irritation des voies respiratoires chez l'homme, ou la contamination des coquillages (Backer et McGillicuddy, 2006).

1.2.4. Culture de dinoflagellés

Le métabolisme et la croissance des dinoflagellés sont fortement dépendants de facteurs physicochimiques tels que la salinité, la température, l'intensité lumineuse et les turbulences (mouvements de masse d'eau). Ensuite d'autres paramètres secondaires influencent le développement de la culture de dinoflagellés comme le pH de l'eau, la quantité de CO_2 dissous pour la photosynthèse, l'azote et le phosphore disponibles.

Les dinoflagellés ont de faibles taux de croissance spécifique (μ) en comparaison aux autres microalgues. Ceci est lié à l'efficacité de la récolte de la lumière car la capacité photosynthétique par unité de la chlorophylle A chez les dinoflagellés n'est pas différente de celui des diatomées. En raison de leurs faibles concentrations en biomasse (ordre du mg/L), des volumes extrêmement importants de culture sont nécessaires pour produire des quantités infimes de toxines.

Parmi les dinoflagellés, le genre *Amphidinium* est connu pour produire différents amphidinols. Ces molécules ont des propriétés antifongiques qui rendent la production de la microalgue particulièrement intéressante pour l'industrie agro-alimentaire. Des entreprises comme Immunrise s'intéressent à la culture d'*Amphidinium sp*. pour l'épandage des microalgues dans les vignobles et ainsi lutter contre le mildiou de la vigne. Le genre *Amphidinium* est un modèle très utilisé pour l'étude des dinoflagellés qui sont peu connus en comparaison d'autres microalgues (*Nannochloropsis sp.*, des diatomées : *Thalassiosira sp.*, des cyanobactéries : *Anabaena sp.* PCC7120). L'expérimentation et la production de beaucoup d'espèces de dinoflagellés sont soumises à réglementation du fait de la dangerosité des molécules produites par ces espèces. Toutefois, *Amphidinium* est l'un des genres de dinoflagellés dont l'utilisation en laboratoire n'est pas soumise à réglementation ce qui en fait un dinoflagellé modèle. Des expériences présentent le dinoflagellé marin : *Amphidinium carterae* comme étant un bon candidat pour une production à grande échelle, au vu de ses caractéristiques intéressantes (Fuentes-Grünewald C. et al., 2016). Pour toutes ces raisons, *Amphidinium carterae* a été choisi pour la culture d'un dinoflagellé en photobioréacteur.

1.2.5. Besoins physico-chimiques des dinoflagellés

1.2.5.1. La salinité :

La salinité contrôle l'activité enzymatique en modifiant le pH mais aussi la consommation énergétique allouée à la régulation osmotique (source). Dans leurs travaux testant différents niveaux de salinités variant de 20 à 60‰ sur les cellules d'*Amphidinium carterae*, Lee et al. (2003), ont conclu que les optima de salinité pour d'importantes multiplications cellulaires étaient compris entre 23 et 32‰. Des salinités très basses comme 16‰ ou très hautes (à partir de 50‰) provoquent une inhibition de la croissance et peuvent être létales pour la culture (Figure 1.7) (Lee et al., 2003 ; Hotos et Avramidou, 2021 ; Jiang et al., 2021).

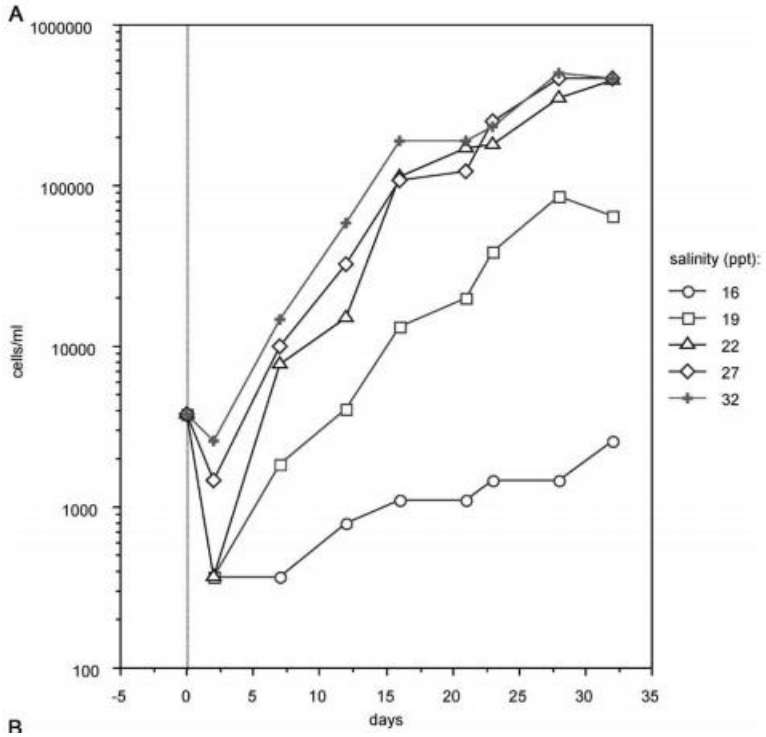


Figure 1.7: Concentration cellulaire moyenne de culture d'A. carterae à différentes salinité (Lee et al., 2003).

Par la photosynthèse, les micro-organismes photo-trophiques peuvent convertir l'énergie lumineuse de la lumière du soleil en énergie chimique sous la forme d'hydrates de carbone.

$$nCO2 + nH2O => (CH2O)n + nO2$$

La photosynthèse a lieu habituellement dans les chloroplastes comme c'est le cas chez les dinoflagellés. Ces chloroplastes sont composés de la chlorophylle A (Chla), le caroténoïde bêta-carotène et un groupe de xanthophylles qui semble être unique aux dinoflagellés, généralement la péridinine, la dinoxanthine et la diadinoxanthine. Ces pigments donnent à de nombreux dinoflagellés leur couleur brun doré typique (Hackett et al., 2004). La péridinine absorbe la lumière bleu-vert dans les longueurs d'onde de 470 à 550 nm, où l'absorption par la chlorophylle A est faible, et il transfère l'énergie lumineuse absorbée aux molécules de

chlorophylle avec une très grande efficacité. Cette efficacité de transfert est située entre 88% et 95%.

Après le transfert, la Chlorophylle entraîne l'excitation sur les complexes de récolte de la lumière liés à la membrane et au photosystème II (PS-II) (Damjanović et al., 2000). Les antennes du LHC (Antenne collectrice de lumière) chez *A. carterae* sont composées d'un système accessoire soluble Peridinin-Chlorophyll protein (PCP, figure 1.8).

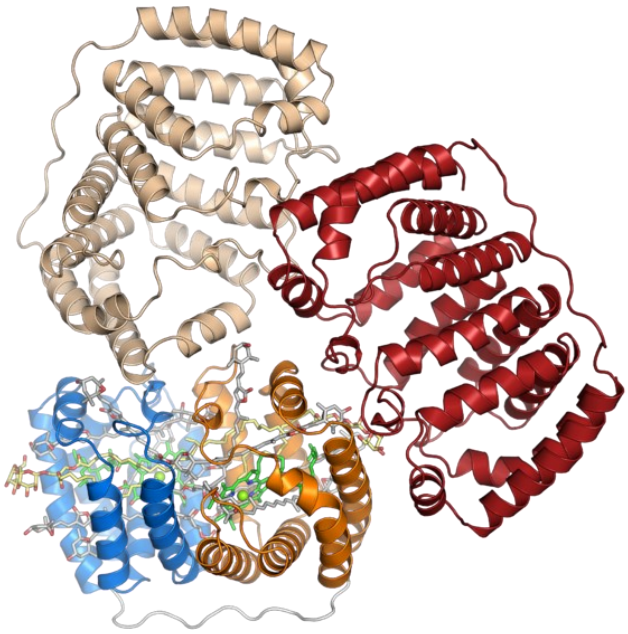


Figure 1.8 : Représentation du complexe PCP d'A. carterae. Seule la protéine est représentée pour les monomères en haut et à droite, tandis que l'ensemble des éléments du complexe sont représentés pour le monomère inférieur gauche.

Ces PCP sont un trimère dont chaque monomère est composé de 2 Chla + 8 caroténoïdes (péridinine). C'est le seul système connu où les caroténoïdes jouent le rôle principal de LHC et supplante les chlorophylles. Ce complexe peut capter 100% des triplets Chla à RT ce qui fait que le système est très efficace en termes de photosynthèse et de photoprotection. (Kvicalova et al., 2016). Le complexe PCP est présent chez la plupart des dinoflagellés photosynthétiques. La structure du PCP de l'espèce *A. carterae* a un rapport caroténoïde/chlorophylle de 4 : 1, indiquant le rôle dominant des caroténoïdes comme absorbeurs de lumière.

1.2.5.2. Le pH de l'eau :

La valeur du pH est un facteur important pour la culture des microalgues, car il affecte de nombreux mécanismes associés à la croissance cellulaire, au métabolisme et à l'absorption d'ions (Khalil et al., 2010). En effet, la croissance des microalgues peut-être affectée par les changements de pH, car le pH détermine la solubilité et la disponibilité du CO_2 et d'autres nutriments essentiels, les activités intracellulaires, des enzymes associées à la paroi cellulaire, et la production de divers produits.

Un pH acide modifie les capacités d'absorption des nutriments, interfère avec les processus cellulaires, et induit une toxicité des métaux. Un pH alcalin réduit l'affinité des algues pour le CO_2 et augmente la flexibilité des cellules mères, retardant l'achèvement du cycle cellulaire (Juneja et al., 2013).

Le pH approprié pour la plupart des microorganismes phototrophes varie selon les espèces, dans la gamme de 6 à 10. Le pH optimal pour toute souche isolée est la valeur du pH dans lequel la souche est adaptée à la croissance, et tout changement peut influencer la croissance et la concentration de la biomasse (Goldman et al., 1982). Lors de la dissolution du CO_2 dans l'eau, du HCO_{3-} est produit par réaction chimique avec l'eau et fait chuter le pH.

$$nCO_2 + nH_2O \Rightarrow nHCO_{3-} + nH^+$$

Si cette baisse du pH se produit de manière importante (plusieurs degrés de pH), cela endommage considérablement les cellules (Westerhoff et al., 2010 ; Dason & Colman, 2004).

Pour plusieurs niveaux de pH testés sur la concentration cellulaire d'*A. carterae*, les pH optimaux étaient les pH de 6,45 et de 8 (Figure 1.9, Lee et al., 2003).

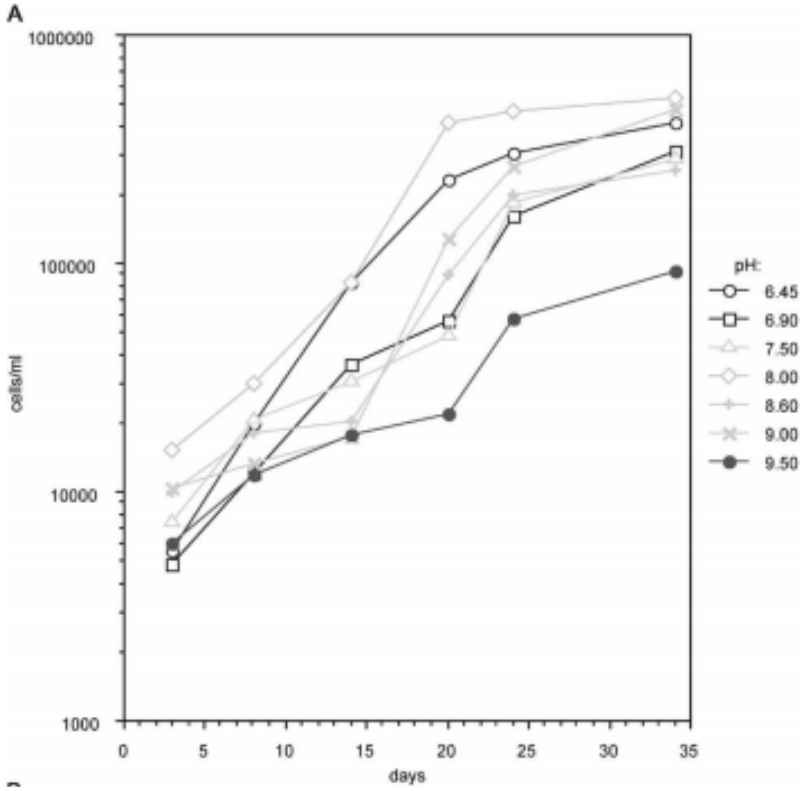


Figure 1.9 : Concentration cellulaire moyen en fonction du pH sur les cultures de A. carterae. (Lee et al., 2003)

1.2.5.3. Les nutriments :

Les macroéléments importants pour la culture de dinoflagellés sont l'azote et le phosphore. *A. carterae* peut valoriser aussi bien les nitrates, les nitrites, les arginines et

l'ammonium. Pour les trois premières, la croissance est similaire pour des apports de 1 mg d'atome N L-1. Cependant, pour l'ammonium, les résultats ne sont visibles qu'à partir des concentrations de 2 mg d'atome N L-1 car pauvre en azote. En effet, l'ammonium a un effet toxique en raison de la formation de molécules ammonium hydratées (NH3, H2O) qui peuvent passer à travers la membrane cellulaire induisant des cellules non mobiles, grandes et arrondies (Dixon et Syrett, 1988).

Le fer est important pour l'assimilation des formes chimiques de l'azote, qui, après le carbone, est le deuxième élément nutritif le plus abondant dans la cellule. Il permet la production de métalloenzymes par la cellule.

Les densités cellulaires d'*Amphidinium carterae* peuvent doubler lorsque les apports en milieu nutritif ou les apports en nitrate sont doublés. Dixon et Syrett (1988) ont constaté ceci dans leur expérience avec le doublement du milieu F/2. Une augmentation au-delà du double entraîne une légère variation de la densité cellulaire. Cependant, une augmentation des phosphates ou des vitamines est sans effet sur la croissance (Table 1.3).

Enrichissement en nutriments (milieu f/2)	Nombre de cellules finales par ml (x105)
Normal	12
2 x Normal	21
4 x Normal	22
8 x Normal	23
2 x Nitrate	21
2 x Phosphate	13
2 x Vitamines	12

Table 1.3 : Influence de différents enrichissements de milieu F/2 sur la croissance d'Amphidinium carterae (Dixon et Syrett 1988).

Le phosphore (P) joue un rôle essentiel dans la structure cellulaire et la fonction des organismes vivants car il est nécessaire dans les molécules vitales telles que les acides nucléiques (ADN, ARN), les phospholipides (constituants de la membrane), l'inositol triphosphate (molécule de signalisation), le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) et sa forme phosphorylée (NADPH), ainsi que l'adénosine triphosphate (ATP). De plus, de nombreuses enzymes critiques dans les principales voies métaboliques et la progression du cycle de division cellulaire sont régulées par phosphorylation. Ainsi, la disponibilité du phosphore a un impact sur la survie et la vitalité du phytoplancton marin et donc influence la production primaire marine (Li et al., 2016).

1.2.5.4. La température :

La température est l'un des facteurs les plus importants dans la culture de micro-organismes et elle est fortement corrélée avec le taux de croissance spécifique μ (Ho et al., 2014). Les taux de croissance augmentent proportionnellement à la température jusqu'à ce que la température optimale soit atteinte et qu'il y ait une forte baisse par la suite (Ho et al., 2013). Une basse température peut également entraîner de la photo-inhibition (Juneja et al., 2013) en ayant pour effet de diminuer l'efficacité des réactions chimiques au niveau de la membrane cellulaire. L'augmentation des températures réduit la synthèse des protéines ou dénature les protéines, inhibant le métabolisme cellulaire. L'augmentation des températures entraîne

également les dommages photo-oxydants et les microalgues réagissent en faisant croître la concentration de pigment comme mesure antioxydante. En effet, les caroténoïdes sont connus pour absorber l'énergie lumineuse et protéger la chlorophylle des dommages de la lumière. De nombreuses microalgues peuvent s'adapter à une baisse de température jusqu'à 15 °C en dessous de l'optimum, mais un dépassement de la température optimale de 2 - 4 °C peut nuire à la croissance cellulaire et provoquer la mort cellulaire (James et al., 2013).

Dans leur étude Kitaya et al., (2009) préconisent une température optimale de 29 °C pour *A. carterae* mais Lee et al. (2003) comparent pour une large gamme de températures différentes et montrent que la plage 20 à 31 °C permet un bon développement d'*A. carterae*.

1.2.5.5. Le Dioxyde de carbone (CO_2) :

Le carbone est le principal constituant des cellules de microalgues. Il représente plus de 50% de la masse cellulaire et il est obtenu sous forme de CO_2 pour les algues photo-autotrophes.

La concentration atmosphérique de CO_2 est faible (0,03-0,04%) et elle n'est pas optimale pour une photosynthèse efficace. De plus, la plupart des microorganismes phototrophes ont une faible capacité de liaison au CO_2 de la Rubisco (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase /oxygénase), qui est l'enzyme clé de l'assimilation du CO_2 à travers le cycle de Calvin. Pour contourner cette problématique, les microalgues se sont adaptées en développant des mécanismes de concentration de carbone (CCM), dans lequel le carbone disponible externe est efficacement accumulé à l'intérieur de la cellule à proximité de la Rubisco dans le carboxysome (Chang et al., 2017). Cela suggère que la croissance cellulaire des microorganismes phototrophes pourrait être fortement influencée par l'ajustement de la concentration de CO_2 dans le milieu.

Pour les cultures à grande échelle, la capture du CO_2 atmosphérique grâce à l'échange de gaz-liquide de l'air au micro-organisme est la méthode la plus couramment utilisée. Cependant, la concentration élevée de CO_2 peut entraîner une baisse du pH, qui inhibe la croissance cellulaire. La demande de CO_2 de la culture peut être calculée sur une base stœchiométrique par la teneur en carbone de la biomasse. La fraction de carbone varie de 0,45 pour les algues à haute teneur en glucides et de 0,8 pour les cellules riches en huile. Ainsi, le besoin stœchiométrique de CO_2 des algues est de 1,85 g CO_2/g de biomasse ou plus (Posten, 2009).

1.3. La Culture de dinoflagellés en bioréacteurs

La culture de dinoflagellés a beaucoup progressé ces 20 dernières années avec le développement et la mise au point de photobioréacteurs fermés (PBR). Ce type de PBR est crucial pour la culture de dinoflagellés, il permet de mieux contrôler les paramètres physico-chimiques de la culture qu'en système ouvert (type « raceways »). Les systèmes fermés sont également moins soumis aux risques de contamination (bactéries, protozoaires, champignons et autres souches de microalgues). Au sein des bioréacteurs, la production de cellules peut être comparée d'un système à l'autre. Cette production est définie comme l'augmentation de concentration cellulaire (nombre de cellules par millilitre) $C(t_2)$-$C(t_1)$ divisée par le temps nécessaire à cette augmentation :

$$P = \frac{C(t_2) - C(t_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (1)$$

Dans un procédé industriel, cette augmentation de cellule peut être obtenue en prélevant une partie du liquide contenant le milieu de culture et les cellules, puis en renouvelant le milieu. Si la concentration cellulaire augmente exponentiellement avec le temps, la production instantanée de cellules (P en cell/ml/j) est calculée par la formule :

$$P = \frac{C}{d} \ln(2) \quad (2)$$

Avec :
C la concentration cellulaire (cell/ml)
d le temps de doublement du nombre de cellules (en jours)
ln(2)=0,6931 le logarithme népérien de 2

Le temps de doublement est mesuré au cours des expériences grâce à la formule :

$$d = \log(2) \frac{(t_2 - t_1)}{\ln(C(t_2)) - \ln(C(t_1))} \quad (3)$$

Le but d'un bioréacteur est d'optimiser la production de cellules, c'est-à-dire de maximiser la concentration cellulaire et de réduire le temps de doublement. Deux grandeurs auxquelles nous allons faire attention par la suite.

Différents types de bioréacteur fermés ont été développés et ont montré de l'intérêt à la culture de dinoflagellés (Pan et al., 1999 ; Parker et al., 2002 ; Rodrigez et al., 2007 ; Lobaton et al., 2019 ; Camacho et al., 2021). Parmi les photobioréacteurs de type fermé, on distingue 2 grands ensembles de bioréacteurs : les bioréacteurs plats et ceux en colonnes. Ces deux types de PBR sont souvent pourvus d'hélices et/ou d'aérateurs (gaz pulsés ; Figure 1.10) pour mélanger la culture et apporter les nutriments et gaz nécessaires à la croissance.

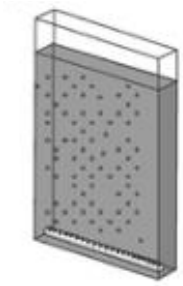


Figure 1.10 : Géométries de photobioréacteurs fermés les plus utilisés pour la culture de dinoflagellés : le réacteur à plaques planes ; d'autres conceptions sont déduites de cette géométrie de base.

1.3.1. Les photobioréacteurs plats

Le terme « photobioréacteurs plats » désigne des systèmes à panneaux plats verticaux (Figure 1.11, Kromkamp et al., 2009 ; Zittelli et al., 2013 ; López-Rosales et al., 2018). Ils permettent d'optimiser l'apport de lumière sur toute la surface du panneau en limitant l'ombrage que peuvent se faire les cellules de dinoflagellés entre elles. Ces panneaux peuvent être inclinés et orientés de différentes manières pour modifier l'intensité, la pénétration de la lumière et ainsi améliorer la productivité.



Figure 1.11 : Photobioréacteur en panneaux plats (Kromkamp et al., 2009).

Ces PBR nécessitent que l'oxygène produite par la photosynthèse des dinoflagellés soit dégazé pour contrôler le pH et éviter les effets oxydatifs néfastes de l'oxygène sur les cellules.

1.3.2. Les photobioréacteurs en colonnes ou fermenteurs

Les photobioréacteurs de type fermenteurs (FTRs = Fermenter-Type Reactors) reprennent le principe des colonnes à bulles (figure 1.12) où est intégré une zone ascendante d'aération et une zone descendante. Ce photobioréacteur est placé verticalement avec une injection de gaz en bas de colonne. Le FTR est caractérisé par un faible ratio surface/volume (SVR), donc une faible surface photosynthétique, nécessitant un mixage efficace pour optimiser les cycles entre zones éclairées et zones d'ombres, contrairement aux PBR plats (Camacho et al., 2011 ; Zittelli et al., 2013 ; López-Rosales et al., 2018).



Figure 1.12 : Photobioréacteur en colonnes à bulles, pour 320L de volume de culture par colonne (Fuentes et al., 2016).

Dans ces PBR, le CO_2 est apporté à la culture par le système de bullage, il permet aussi l'agitation nécessaire au mélange du milieu et la répartition homogène des cellules. Cependant pour que l'apport de CO_2 soit efficace, un débit de gaz continu doit être apporté (Tredici et al., 2015). On sait que la force de mélange occasionnée par un système de bullage provoque des dommages sur les cellules de dinoflagellés. Pour la culture de dinoflagellés dans ce type de système, l'aération par bullage est limitée à un faible débit ($200ml.min^{-1}$) comme le montre Camacho et al. (2011) dans ses expériences sur différentes souches de dinoflagellés (*Protoceratium reticulatum*, *Alexandrium minutum)*. Pour améliorer le mélange, un système avec hélice (figure 1.13) est souvent installé. Toutefois, l'énergie émise à l'extrémité de chaque pâle est aussi destructrice pour les cellules de dinoflagellés.

Dans cette thèse, nous allons nous focaliser sur la culture d'*Amphidinium carterae*, qui a déjà été étudiée par plusieurs équipes. Dans leurs travaux de recherche, l'équipe de Fuentes et al. (2016) utilise un PBR en colonnes à bulles de 320L (figure 1.12), pour la culture d'*Amphidinium carterae*. Ils utilisent de l'eau de mer à la salinité de 35g/L et un apport de CO_2 sous forme de mélange gazeux comprimé au pourcentage de 2,5% de CO_2. Ils obtiennent une concentration maximale de $4,4.10^6$ cell/ml et un temps de doublement minimum de 3,1 (+/- 1,7) j. Rahman Shah et al. (2016) utilisent un PBR en colonnes à bulles de 700L sous forme de 12 colonnes de 60L de cultures interconnectées pour la culture d' *Amphidinium carterae*. Ils obtiennent une concentration cellulaire maximale de $6,8.10^4$ cell/ml et un temps de doublement minimum de 2,11J. Molina-Miras et al (2018) utilisent un PBR en colonnes à bulles de 320L. Le CO_2 est apporté pour contrôler le pH et le stabiliser à pH = 8,5 et cultiver des cellules d' *Amphidinium carterae*. Ils obtiennent une concentration cellulaire maximale de $1,7.10^6$ cell/ml et un temps de doublement minimum de 1,27j.

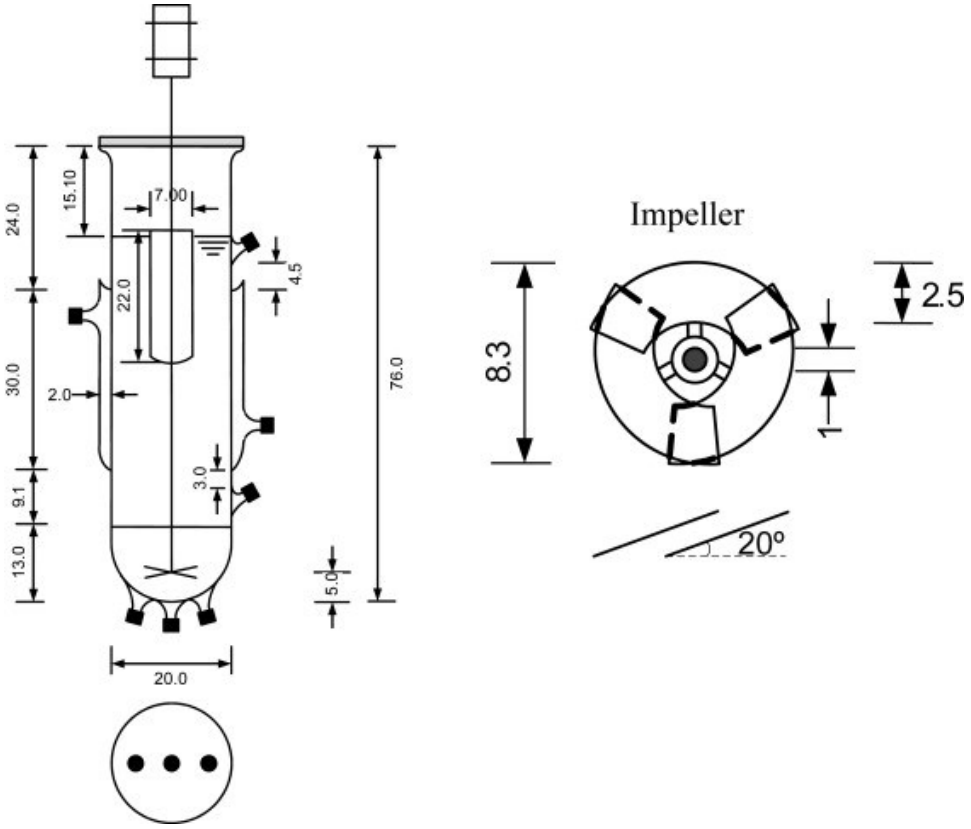


Figure 1.13 : Photobioréacteur fermenteur en verre à hélice (Camacho et al., 2011).

Ainsi, beaucoup d'efforts et de ressources ont été consacrés à l'amélioration des modes de culture des dinoflagellés dans les photobioréacteurs, afin d'obtenir des concentrations de biotoxines plus importantes. Les conditions nutritionnelles et opérationnelles, telles que la lumière et les modes d'aération et d'agitation, doivent tenir compte du fait que les dinoflagellés obéissent à des rythmes circadiens spécifiques et sont extrêmement sensibles aux forces de mélange lorsqu'ils sont cultivés dans un réacteur. Les méthodes conventionnelles d'ingénierie et de conception de bioréacteurs doivent donc être dépassées, afin de contourner la croissance fastidieuse et la sensibilité des cellules de dinoflagellés.

1.4. La mécanique des fluides en bioréacteurs

Un bioréacteur contient un fluide composé de différents éléments comme le milieu de culture (eau, sels minéraux et nutriments) et le modèle biologique que l'on souhaite cultiver. Le fluide est mis en mouvement afin d'homogénéiser les organismes et les nutriments, généralement par une pale en rotation ou un système de bullage. Ce mélange permet surtout d'augmenter les flux de gaz (O_2 et CO_2) nécessaires à la respiration (pendant la nuit) et à la photosynthèse (pendant la journée). Malheureusement, cette agitation du fluide génère du cisaillement qui peut être néfaste pour les dinoflagellés.

1.4.1. La force de cisaillement

Dans un fluide en mouvement où des cellules sont présentes, ces cellules vont être étirées d'autant plus que le fluide est visqueux et que l'écoulement est intense. Il s'agit de la conséquence d'une force, la force de cisaillement décrite selon la formule suivante :

$$F = \eta \frac{dv}{dz} \quad (4)$$

Le gradient de vitesse dv/dz est lié au profil de vitesse à la surface de la micro-algue (figure 1.14). Ce profil peut être dû à la différence de vitesse entre le fluide et la micro-algue comme pour la nage de la micro-algue dans un écoulement au repos. Cette nage étant faible, elle n'entraîne pas de détérioration de la micro-algue. Ce profil de vitesse peut aussi être dû aux inhomogénéités (ou hétérogénéités) de vitesse au sein du fluide, engendrées par une pale ou des bulles en mouvement. Ces différences de vitesse peuvent être importantes et peuvent endommager ou entraîner la mort des micro-algues. La mesure des gradients de vitesse et plus particulièrement du cisaillement est donc primordiale pour la caractérisation des bioréacteurs.

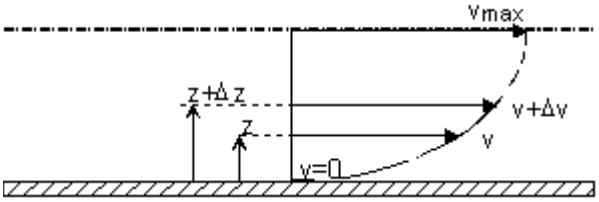


Figure 1.14 : Schéma montrant la formation d'un profil de vitesse à la surface d'une paroi à cause des forces de frottement (v=vitesse du fluide ; z = distance à la paroi)

La viscosité dynamique η a une dimension : $[\eta] = M.L^{-1}.T^{-1}$ soit $kg.m^{-1}.s^{-1}$. Elle est caractéristique du fluide et dépend de la température. Pour de l'eau à 20°C, elle vaut 1. 10^{-3} $kg.m^{-1}.s^{-1}$. Elle diminue avec la température et vaut 0,89. 10^{-3} $kg.m^{-1}.s^{-1}$ pour de l'eau à 25°C. Elle augmente légèrement pour l'eau salée (à $35g.L^{-1}$ et 20°C) et vaut 1.07 10^{-3} $kg.m^{-1}.s^{-1}$ pour les milieux de culture utilisés pour les micro-algues.

La force de cisaillement s'exprime généralement en $N.m^{-2}$, c'est à dire en $kg.m^{-1}.s^{-2}$ dans la littérature scientifique.

Le taux de dissipation d'énergie cinétique turbulente noté ε est une grandeur également utilisée dans la littérature pour quantifier les forces de frottement sur les dinoflagellés. Il s'exprime en $m^2.s^{-3}$ et il est relié en ordre de grandeur à la force de cisaillement selon la formule suivante :

$$\varepsilon = \frac{\eta}{\rho}\left(\frac{dv}{dz}\right)^2 \quad (5)$$

Avec :
ρ la masse volumique du fluide.
dv/dz le gradient de vitesse dans le fluide (s^{-1}).

1.4.2. Le nombre d'Ekman

La viscosité du fluide influe aussi sur le régime d'écoulement obtenu. Pour des fortes viscosités, l'écoulement reste laminaire. Pour des faibles viscosités, l'écoulement devient turbulent. Cette transition est en général caractérisée par le nombre de Reynolds, qui est le rapport des forces inertielles sur les forces visqueuses (c'est à dire de cisaillement).

Cependant, dans cette thèse, l'écoulement est en forte rotation. La force de Coriolis est donc dominante pour des faibles perturbations. Il est donc plus intéressant de définir un nombre d'Ekman pour caractériser l'amplitude de la force visqueuse. Ce nombre est une mesure de l'atténuation visqueuse du mouvement donné au fluide par la rotation. Il a été nommé en l'honneur de Vagn Walfrid Ekman, un océanographe suédois qui a beaucoup travaillé sur le comportement des fluides océaniques et l'influence du vent sur les océans. Le nombre d'Ekman donne le rapport entre la force visqueuse et la force de Coriolis dans un référentiel en rotation à la vitesse angulaire Ω.

$$Ek = \frac{\nu}{\Omega L^2} \tag{6}$$

Avec :
$\nu = \frac{\eta}{\rho}$ la viscosité cinématique en $m^2.s^{-1}$,
ρ la masse volumique,
Ω la vitesse angulaire en $rad{\cdot}s^{-1}$,
L une longueur caractéristique en m,

Ce nombre est très important dans les fluides tournants, car il quantifie l'épaisseur des couches limites d'Ekman, qui sont proportionnelles à $L\ E^{1/2}$. Ce sont ces couches limites qui atténuent fortement l'écoulement et qui gouvernent donc l'amplitude des écoulements forcés résonnants. Ces couches jouent aussi un rôle très important car elles limitent le transfert de gaz le long de la membrane d'échange. En effet, la vitesse est nulle à l'intérieur de ces couches limites. Les gaz doivent donc traverser cette couche par diffusion plutôt que par advection.

1.4.3. Le flux de CO_2 : advection ou diffusion

En présence d'écoulement, le flux de CO_2 est un transport de molécules qui dépend de l'écoulement. On parle alors de mouvement par advection (Medouar et al. 2012) où le CO_2 est déplacé passivement dans la direction de l'écoulement du fluide porteur. Le processus d'advection déplace les molécules de CO_2 selon l'équation suivante :

$$J_A = v.c \tag{7}$$

Avec :
J_A, le flux d'advection exprimé en $mol.m^{-2}.s^{-1}$ (ou $kg.m^{-2}.s^{-1}$),
v, la vitesse d'entraînement du fluide porteur exprimé en $m.s^{-1}$,
c, la concentration du constituant considéré exprimée en $mol.m^{-3}$ (ou $kg.m^{-3}$).

En l'absence d'écoulement, le CO2 se répand par diffusion dans le liquide. La diffusion est l'échange de matière qui a lieu spontanément entre deux masses de fluide dans le même état physique (liquide ou gazeux), et à la même température, mais présentant une différence de

concentration du constituant considéré. Il résulte du seul mouvement propre des molécules qui suivent le gradient de concentration. Le flux est donc proportionnel à la diffusivité (qui caractérise le mouvement d'agitation des molécules) et au gradient de concentration, comme décrite par la loi de Fick :

$$J_D = -D\frac{\partial c}{\partial x} \tag{8}$$

Avec :
J_D, le flux diffusif dans la direction des x croissants, exprimé en $mol.m^{-2}.s^{-1}$ (ou $kg.m^{-2}.s^{-1}$)
D, la diffusivité du constituant considéré exprimé en $m^2.s^{-1}$,
c, la concentration du constituant considéré exprimée en $mol.m^{-3}$ (ou $kg.m^{-3}$).

Cette relation met en évidence que, dans une phase, s'il existe un gradient de concentration, la mobilité des molécules entraîne un flux de matière qui tend à égaliser les concentrations (le signe − est introduit pour tenir compte du fait que flux et gradient de concentration sont de signe opposé, le flux s'établissant vers la concentration la plus faible).

La diffusivité du CO_2 est 10000 fois plus faible dans l'eau que dans l'air (voir table 1.4). Cela indique que le CO_2 s'homogénéise plus facilement dans les gaz que dans les liquides. Dans l'eau, la diffusivité augmente légèrement avec la température : elle monte d'environ 4 % par degré. La diffusivité du CO_2 est 500 fois plus faible que la viscosité cinématique. On s'attend ainsi à avoir des structures non mélangées de CO_2 qui sont 20 fois plus fines que les tourbillons présents dans l'écoulement.

	Température (°C)	Diffusivité dans l'air ($m^2.s^{-1}$)	Diffusivité dans l'eau ($m^2.s^{-1}$)
CO_2	25°C	$16{,}4x10^{-6}$	$2x10^{-9}$
Hydrogène	25°C	$41x10^{-6}$	$4{,}8x10^{-9}$

Table 1.4 : Comparaison de la diffusivité D du CO_2 et de l'hydrogène dans l'air et l'eau (Wilke et Chang 1995).

Pour conclure, la diffusion du CO_2 dans l'eau est extrêmement faible. C'est pour cela que le flux de CO_2 reste très faible en l'absence de mélange par advection. L'optimisation de ce flux grâce à un écoulement adéquat est donc un élément déterminant dans la mise au point des bioréacteurs.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

La culture en milieu fermé du dinoflagellé *Amphidium carterae* nécessite de mettre au point un bioréacteur réunissant les conditions de culture vues précédemment. Soit un photobioréacteur capable d'apport en CO_2 dissous et de lumière non limitants, mais également de pouvoir mélanger les microalgues et le milieu de culture avec des forces de cisaillement inférieures à 0,0022 $N.m^{-2}$ (limite physiologique de *A. carterae* ; Lobaton, 2019). Pour cela, nous utilisons un bioréacteur sans hélice de type Soft-mixer, selon le brevet n° FR1651703 (Meunier et al. 2017). Ce bioréacteur est géoinspiré de la précession de la Terre, se compose d'un cylindre mis en rotation sur un axe et incliné de quelques degrés (1 à 10°). Le mélange qui en résulte a été caractérisé par Meunier (2020).

2.1. Dispositifs expérimentaux

Le principe du bioréacteur de type Soft-mixer s'inspire du mouvement de précession de la terre. Ce mouvement correspond à la rotation de l'axe de la terre avec une période très grande (26000 ans) comparé à la rotation propre de la terre autour de son axe. L'angle entre les deux axes est de 23,5° (voir figure 2.1). Le mouvement d'un fluide dans un objet en précession a été beaucoup étudié dans une configuration sphérique (Busse 1968, Noir et al. 2001), sphéroidale (Sloudsky 1895, Poincaré 1910, Noir et al. 2003) et cylindrique (Gans 1970, Manasseh 1992, Meunier 2008). Mc Ewan (1970) a montré que l'écoulement engendré par la précession du cylindre peut être généré de manière plus simple en appliquant ce mouvement de précession uniquement au couvercle du cylindre tournant (voir figure 2.1c). En effet, le mouvement du couvercle crée alors un forçage qui est de nombre d'onde azimuthal m=1, exactement comme pour la précession. Ce couvercle, incliné d'un petit angle α, tourne donc à une vitesse angulaire Ω_p dans le cylindre tournant à Ω. Si l'on choisit $\Omega_p=-\Omega$, alors le couvercle est immobile dans le référentiel du laboratoire. Ainsi on obtient très facilement cet écoulement avec une surface libre si l'axe du cylindre est incliné d'un angle α. Pour cela, il faut que la surface libre reste horizontale, ce qui est vrai lorsque la vitesse de rotation reste faible.

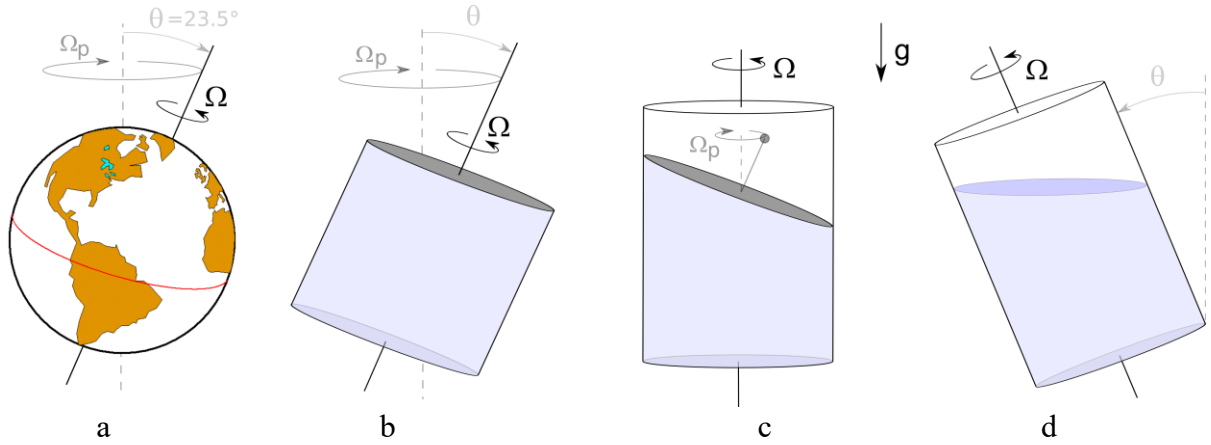


Figure 2.1 : Le principe du Soft-mixer inspiré de précession de la terre, tournant à la vitesse angulaire W.

Le dispositif expérimental du Soft mixer consiste donc en un cylindre tournant autour de son axe, avec une hauteur d'eau présentant une surface libre. L'axe peut être ajusté à l'aide de 4 pieds réglables (voir figure 2.2). Dans nos expériences, l'angle a été varié de 0,5° à 9°, avec une précision de 0,1°.

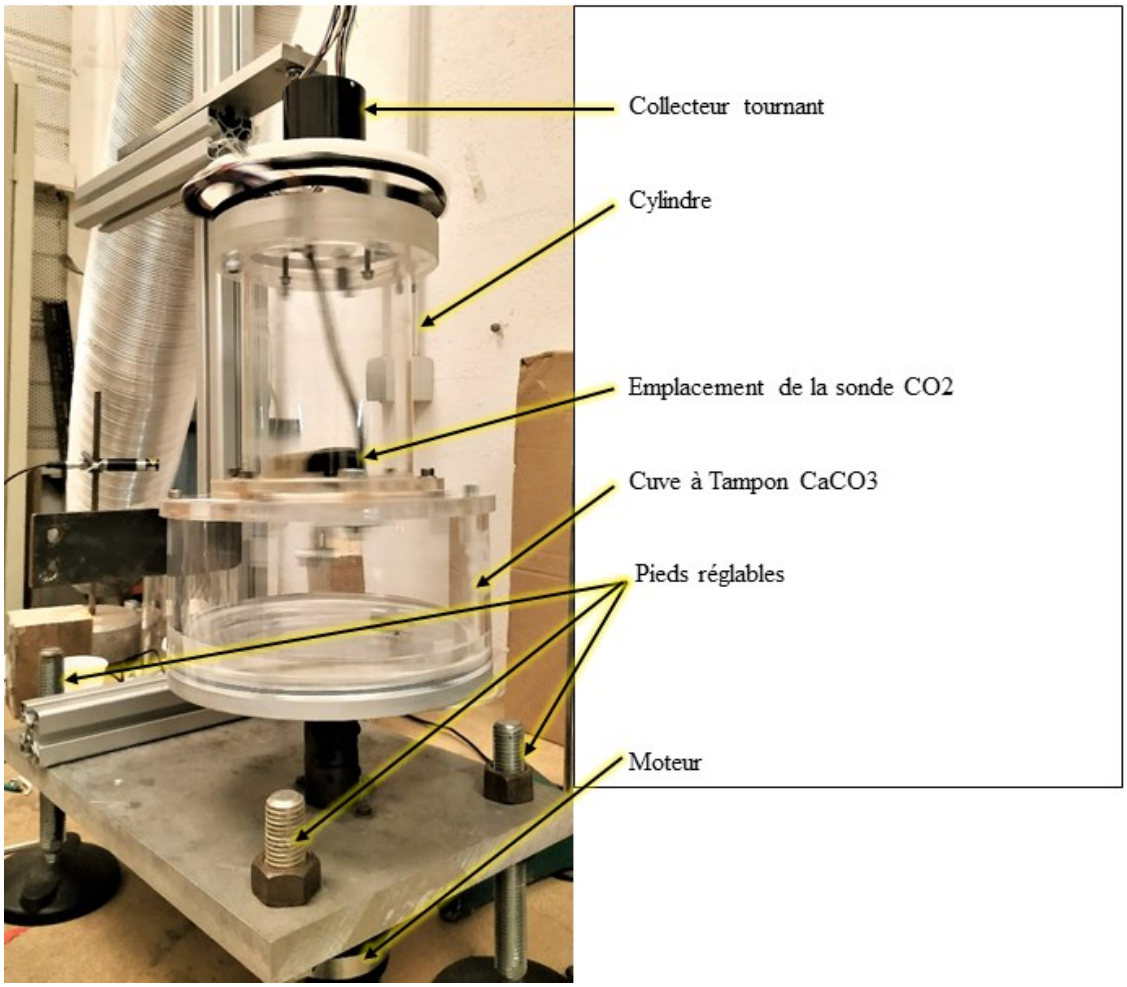
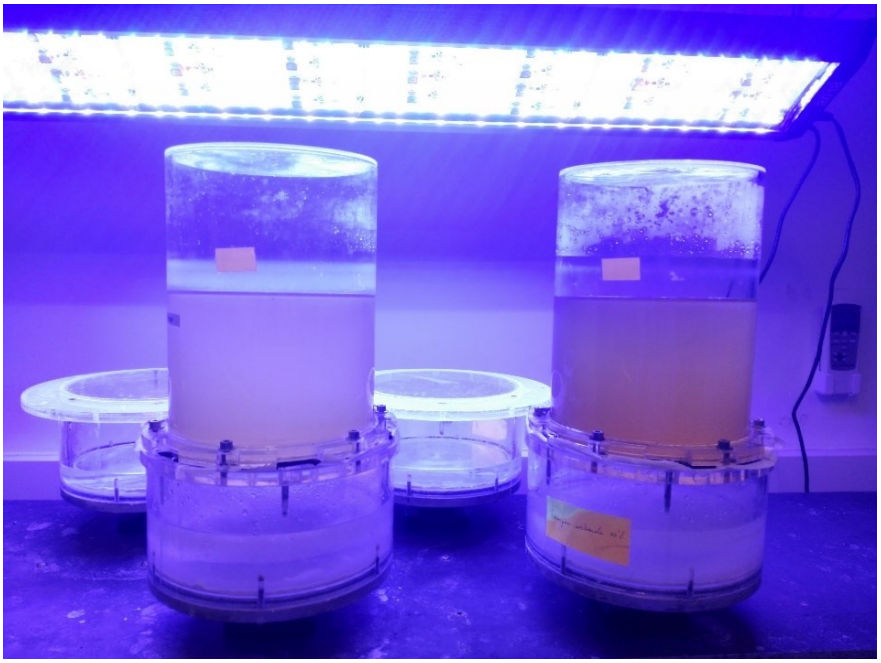
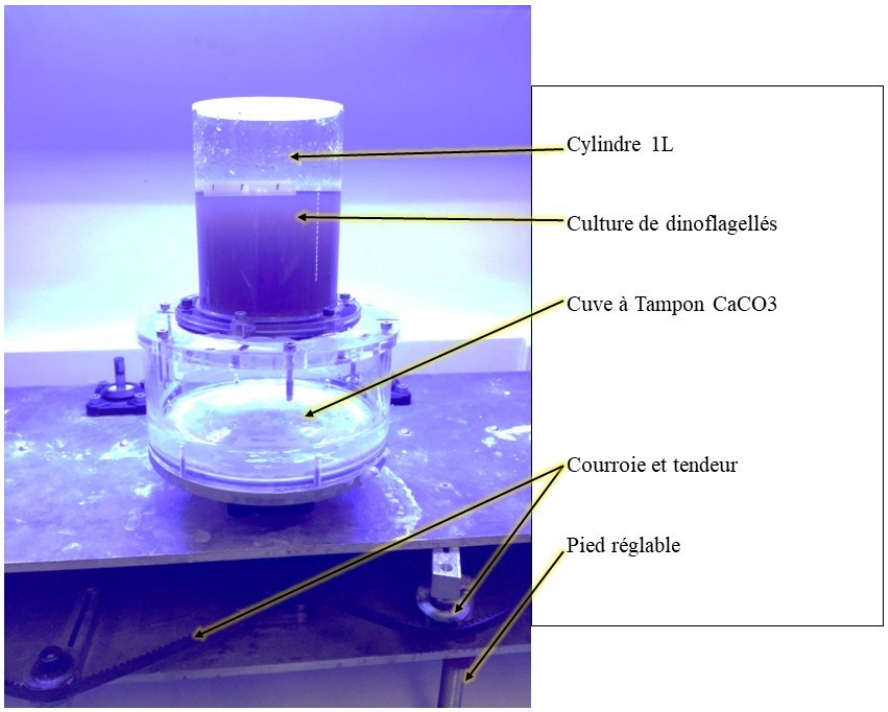


Figure 2.2 : Dispositif initial pour la prise de données physiques dans un bioréacteur innovant.

L'expérimentation s'effectue avec plusieurs dispositifs expérimentaux. Un premier dispositif est utilisé pour obtenir des données de physique et de mécanique des fluides sur l'apport de CO_2 dissous et la caractérisation du mélange des gaz dans le bioréacteur (voir figure 2.2). Des expériences préliminaires de culture de dinoflagellés avec mesure de données biologiques sont réalisées à l'aide de soft-mixers composés de cuve de 1 et 3L. Ces cuves sont installées en séries et mises en rotation à l'aide de courroies et roues dentées (figure 2.3).



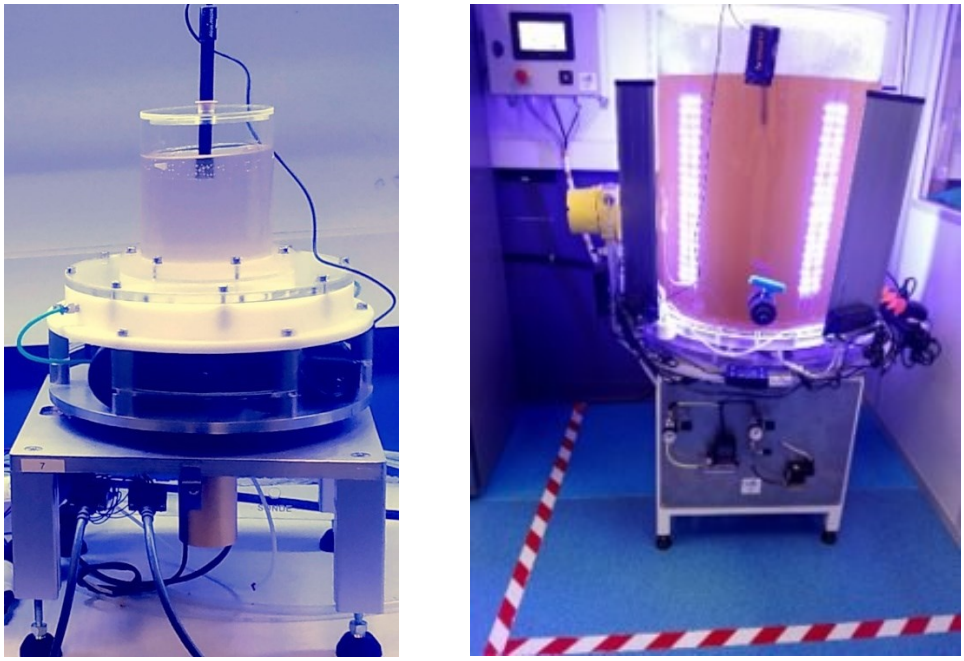
a



b

Figure 2.3 : Dispositif expérimental pour la prise de données biologiques préliminaires dans des bioréacteurs innovants installés en série, en cuve de 3 L (a) ; en cuve de 1 L (b).

Ensuite d'autres dispositifs expérimentaux sont utilisés pour la culture de dinoflagellés et la mesure de données biologiques pour optimiser la croissance (figure 2.4). Ces dispositifs sont appelés Dinophyts dans la suite.



a b

Figure 2.4 : Photo du Dinophyt 1L (a) et 169L (b) en fonctionnement pour la culture d'Amphidinium carterae.

2.2. Moteurs

Pour mettre en rotation les différents soft-mixer, des moteurs sont utilisés tel qu'un moteur Brushless. Ce type de moteur est puissant et il est capable de mettre en rotation des cuves de plusieurs centaines de kg. Toutefois, à faible consigne de vitesse (< 5 rotations par minute = rpm) et un poids supérieur à 30kg, le moteur fait des saccades et est imprécis sur la vitesse de rotation. Deux moteurs Brushless sont utilisés : un moteur (motoréducteur avec réduction x16, Maxon EC 60 flat, couple moteur de 4,8 Nm.) pour le dispositif expérimental dédié aux mesures physiques, le second pour mettre en rotation le photobioréacteur de 169L (motoréducteur avec réduction x100, Maxon ECMAX30L/PM42 * 24V/0100, couple moteur de 4,2 Nm). Ce moteur avec le rapport de réduction entre le pignon et la roue dentée de : 62/20 permet d'entraîner la rotation du bioréacteur avec 13Nm de couple. Toutefois, la technologie Brushless ne permet pas d'entraîner en rotation de manière stable au niveau de ses limites d'utilisation comme à faible vitesse (5tr/min dans notre situation) par exemple. Le moteur doit « vaincre » les frottements dus au lancement en rotation avant de produire une rotation stable avec l'inertie.

Dans le nouveau système, des moteurs de type pas-à-pas sont utilisés pour les Dinophyts de 1 à 9,8L de volume. Ce type de moteur est très précis dans le positionnement et permet une bonne stabilité durant l'accélération comparé aux moteurs Brushless. Les moteurs pas à pas sont précis et efficaces au niveau de leurs limites de vitesse. Néanmoins, ces moteurs ont des puissances plus petites que les moteurs Brushless. Dans le cas de notre système, un collecteur tournant est installé (Mophlon, MAPH200-01-P0610-S06) pour apporter des gaz et du courant électrique aux bioréacteurs et récupérer des signaux de sondes paramétriques pour la collecte de données. Un premier lot de moteurs pas à pas avait été utilisé pour ce système avec un couple moteur de 1 Nm. Ce couple aurait été suffisant pour entraîner des cuves de culture jusqu'à 10 L mais était sous-dimensionné devant la résistance qu'oppose le collecteur

tournant. Ainsi, nous avons équipé le système avec des moteurs pas à pas plus puissants (Trinamic motion control PD60-4-1276-TMCL) possédant 200 pas décomposés en 256 µpas avec un couple moteur de 3,1 Nm. Ces moteurs ont un rapport de réduction entre le pignon et la roue dentée de 60/15 permettant d'entraîner la rotation du bioréacteur avec 9,1 Nm de couple. Les moteurs pas à pas pour le système de culture en volume 1 à 9,8L présentent l'avantage, en plus de proposer un entraînement stable en continu, d'être cinq fois plus économique que les moteurs Brushless pour notre système.

2.3. Cylindre, volume, rapport d'aspect et moteurs

Le cylindre incliné composant le bioréacteur Soft-mixer est constitué de Plexiglas pour laisser passer la lumière pour la croissance des micro-algues et pour permettre des visualisations dans le cas des mesures physiques. Le diamètre est varié entre 10cm et 60cm afin de contenir différents volumes adaptés aux expériences.

La hauteur de liquide est soigneusement sélectionnée pour créer un écoulement résonnant générant un mélange efficace. En effet, lorsque le cylindre est mis en rotation autour de son axe, la surface libre (qui précesse à -Ω dans le référentiel du cylindre tournant) force des perturbations sous forme d'un cisaillement du fluide (voir figure 2.5). Comme décrit par Meunier et al. (2020), les particules du fluide, étant en rotation dans le cylindre, sont soumises à la force de Coriolis et se mettent à osciller en suivant un mouvement elliptique. Ces oscillations se propagent ensuite dans tout le cylindre à 30° par rapport à l'axe du cylindre sous forme d'ondes inertielles.

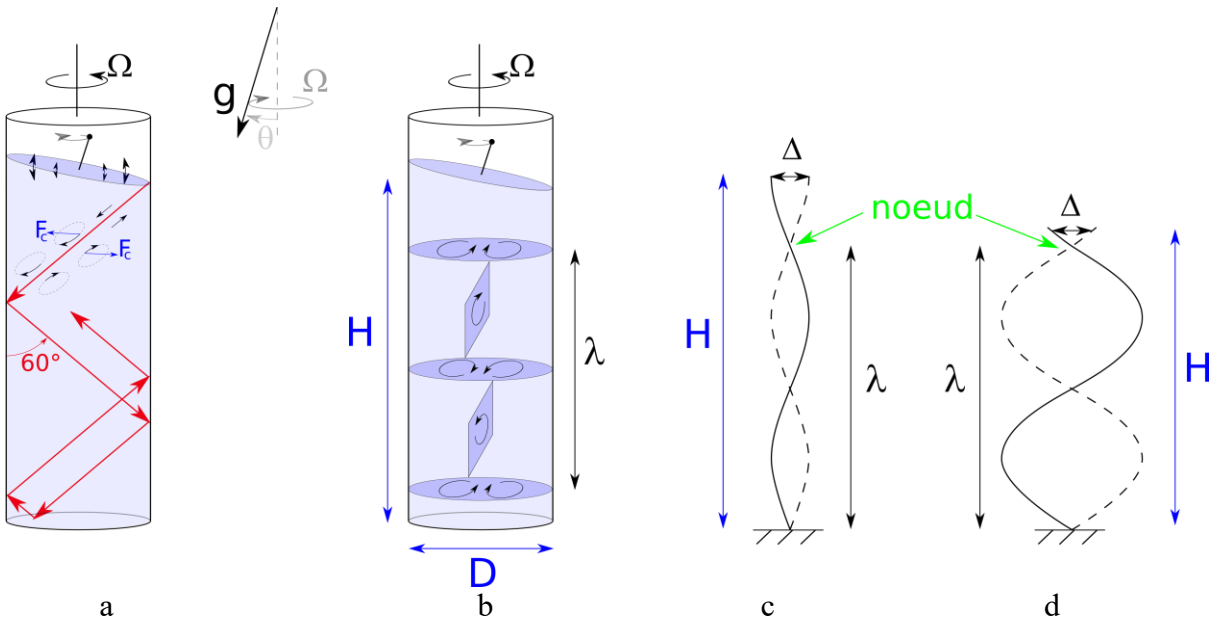


Figure 2.5 : Propagation du cisaillement d'un fluide dans un cylindre incliné mis en rotation (vitesse angulaire Ω) ; source : « Pour La Science », n°512 – Juin 2020.

Ces ondes se réfléchissent sur les parois et interfèrent pour donner un mode global d'oscillations avec une longueur d'onde λ dans la direction de l'axe (voir figure 2.5). Pour le premier mode global, la longueur d'onde vaut 1,9898 fois le diamètre D du cylindre. Ce mode possède des oscillations à grandes amplitudes (ventres) et petites amplitudes (nœuds). Si l'on

provoque un mouvement de la surface libre soit une excitation Δ du fluide, située au niveau d'un ventre du mode, alors l'amplitude du mode global est sensiblement égale à Δ (figure 2.5). Au contraire, si l'on provoque la même excitation Δ au niveau d'un nœud du mode, alors l'amplitude du mode doit être grande afin de créer un mouvement d'ordre Δ proche du nœud. Dans la limite où l'excitation est exactement au nœud, l'amplitude du mode devrait être infinie. On retrouve le même phénomène sur une corde de guitare que l'on excite (fait vibrer) à des distances différentes du point d'ancrage (Meunier et al., 2020). La résonance de ce mode a lieu lorsque la hauteur est égale à λ/2, λ, 3λ/2, 2λ… Afin d'obtenir un écoulement le plus efficace possible, avec un angle le plus faible possible, il est donc intéressant de choisir la hauteur de fluide égale à l'une de ces hauteurs résonnantes. Dans toutes nos expériences, nous avons choisi la première hauteur résonnante qui est très proche du diamètre du cylindre. Le volume de solution aqueuse $H\pi D^2/4$ utilisé pour les expériences est choisi précisément de telle sorte que la hauteur d'eau H dans le cylindre occupée par la solution est égale au diamètre du cylindre D. Le volume de liquide est donc égal à $\pi D^3/4$.

Différents volumes de solutions sont utilisés dans des Soft-mixer de différentes tailles. Un Soft-mixer de diamètre interne 10,45 cm autorise 858ml de volume en respectant le rapport d'aspect précédent. D'autres volumes sont utilisés pour les expériences comme ceux référencés dans la table 2.1.

Volume interne (en L)	**Diamètre interne du cylindre (en m)**
0,85	0,104
1,04	0,110
2,65	0,150
9,80	0,232
169,56	0,600

Table 2.1 : Différents volumes de culture utiles des bioréacteurs en fonction du diamètre interne du cylindre. Ce volume correspond à une hauteur résonante égale au diamètre.

2.4. Apport de CO_2

Dans un réacteur de type soft-mixer, nous apportons le CO_2 à la colonne d'eau en utilisant une membrane microporeuse placée sous le liquide et reposant sur une grille (voir figure 2.6).

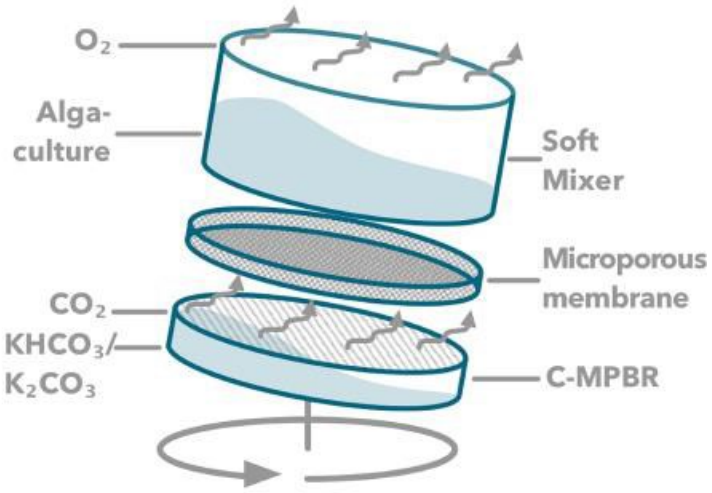


Figure 2.6 : Le principe du DINOPHYT combinant la technologie Soft-Mixer et une membrane microporeuse.

Il s'agit de la membrane Celgard N°4560 qui est poreuse aux gaz et hydrophobe (imperméable à l'eau). Les propriétés techniques de cette membrane sont résumées dans la table 2.2.

Basic Film Properties	Unit of Measure	Typical Value
Laminated Film Total Thickness	µm	90
Laminated Film Gurley (ASTM)	Seconds	10
Microporous Membrane (Typical Properties)		
Thickness	Thickness	25
Gurley (JIS)	Seconds	200
Porosity (calculated)	%	55
TD Shrinkage @ 90°C / 1 Hour (typical)	%	0
MD Shrinkage @ 90°C / 1 Hour (typical / max)	%	1.1 / 5.0
TD Tensile Strength (typical / min)	Kg/cm2	130 / 80
MD Tensile Strength (typical / min)	Kg/cm2	1170 / 770
Puncture Strength (typical / min)	Grams Force (gf)	325 / 200

Table 2.2 : Caractéristiques techniques de la membrane microporeuse Celgard 4560.

La grille sur laquelle repose la membrane microporeuse (figure 2.7) présente un quadrillage d'épaisseur 2,5 mm, de 10 mm de haut pour des carrés vides de 18 mm de côté. Un joint torique noir assure l'étanchéité de la cuve entre la grille et la membrane microporeuse. Pour le Dinophyt 169L, l'épaisseur de la grille ainsi que la taille des carrés a été doublée (5mm

d'épaisseur et carrés vides de 40 mm de côté) et une seconde grille avec des carrés de dimensions 18 par 18 mm a été installée. Ces grilles permettent de soutenir la membrane face au poids du volume d'eau très important dans ce Dinophyt de 169L de volume utile.

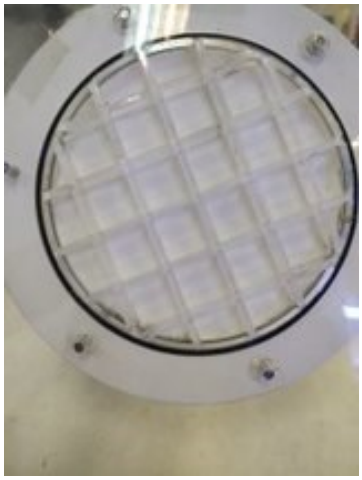


Figure 2.7 : Grille de plexiglass soutenant la membrane microporeuse dans un Dinophyt.

Dans les premiers bioréacteurs, le CO_2 gazeux est produit par une solution liquide de tampon carbonate placé dans le fond d'un réservoir. Le CO_2 présent sous la membrane est soit apporté par le collecteur tournant et une conduite de gaz, soit produit à la suite d'une réaction chimique produite par un tampon carbonate. Le tampon carbonate est préparé en mélangeant des carbonates de potassium ($K2CO_3$) et bicarbonates de potassium ($KHCO_3$) en poudre à de l'eau osmosée (déminéralisée) selon la formule suivante :

$$Y=1{,}2439X^{-0{,}549}$$

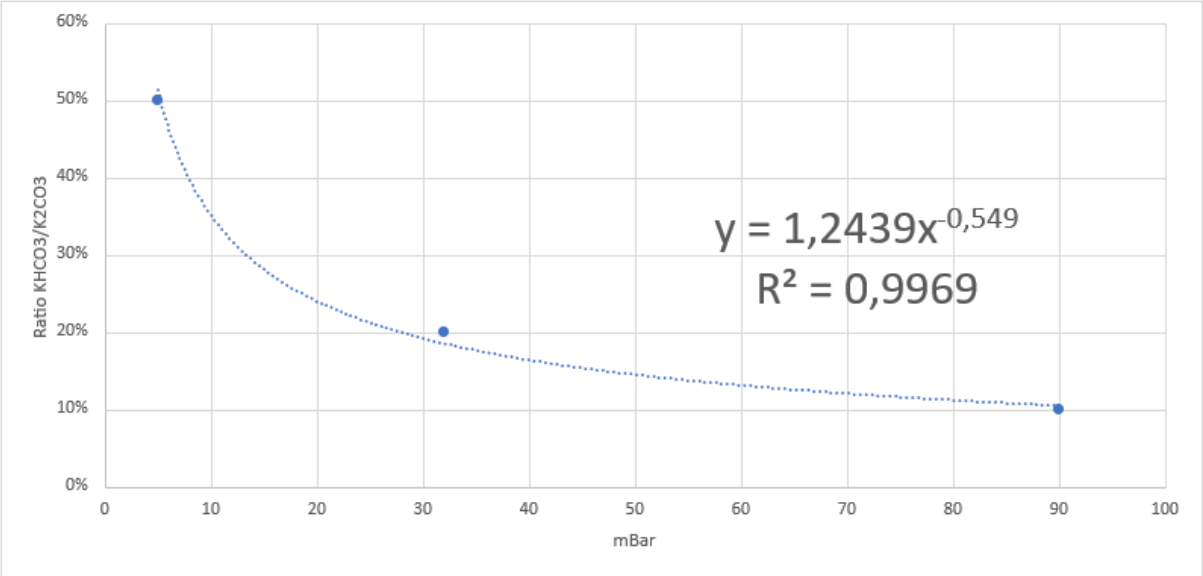


Figure 2.8 : Ratio de solutions de bicarbonates et carbonates de potassium selon la pression partielle de CO_2 ciblée. Un mBar de CO_2 vaut 1% de CO_2 en pourcentage molaire.

A partir de la figure 2.8, il est possible d'obtenir différentes solutions tampons modifiant le rapport de $KHCO_3$ sur K_2CO_3 utilisés. Les tampons carbonates obtenus produisent différents pourcentages molaires de CO_2 dans l'air (% CO2) par réaction chimique (table 2.3). Des solutions 3 mole (3M) de $KHCO_3$ et $K2CO_3$ sont préparés à partir de poudre de $KHCO_3$ à 100,11 $g.mol^{-1}$ de masse molaire et $K2CO_3$ à 138,20 $g.mol^{-1}$ de masse molaire.

Pourcentage molaire de CO_2 issu du tampon carbonate (%/mBar)	Pourcentage de K2CO3 (3M)	Pourcentage de KHCO3 (3M)
2% / 20	17%	83%
4% / 40	12%	88%
8% / 80	8%	92%
12% / 120	6%	94%

Table 2.3 : Pourcentage molaire obtenue avec différentes préparations de tampons carbonate.

Le tampon carbonate une fois préparé est mis en bouteille hermétiquement fermée et conservée à température ambiante à l'abri d'une source de chaleur.

Dans les derniers bioréacteurs, le CO_2 présent sous la membrane est apporté par un collecteur tournant situé le long de l'axe de rotation sous le cylindre (voir figure 2.4). Le mélange gazeux est contrôlé par un régulateur de débit (Alicat MFC n°MC-1SLPM-D/5M) ou dans une chambre d'homogénéisation afin de fixer un $\%CO_2$ constant. Cette pression partielle a été variée entre 2 et 10 % au cours de la thèse. L'apport de CO2 est régulé par le pH car l'apport de CO2 acidifie le milieu, ce qui est néfaste pour la croissance des microalgues. Lorsque le pH baisse en dessous d'une valeur seuil, la pompe de recirculation du gaz s'arrête et les électrovannes se ferment.

2.5. Mesures de données physiques

Le but de ces expériences est de mesurer le flux de CO2 à travers la membrane en fonction des différents paramètres de rotation (de 4 à 60rpm), d'angle (de 0,5 à 9°) et de pression partielle de CO2 (2 et 6 %). Pour cela, nous avons imposé une pression partielle de CO2 sous la membrane à t=0 et nous avons mesuré la pression partielle de CO2 juste au-dessus de la surface libre.

2.5.1. Diffusion du CO_2 et prise de données physiques

2.5.1.1. Mesure de la concentration de CO_2 dans le liquide du Dinophyt

Pour la prise de données de diffusion du CO_2, nous utilisons un capteur atmosphérique de la marque Cozir. Les propriétés techniques du capteur sont résumées dans la table 2.4. Le capteur de CO_2 est positionné dans la cuve en rotation, à 1cm au-dessus de la surface libre du liquide en mouvement (figure 2.9).

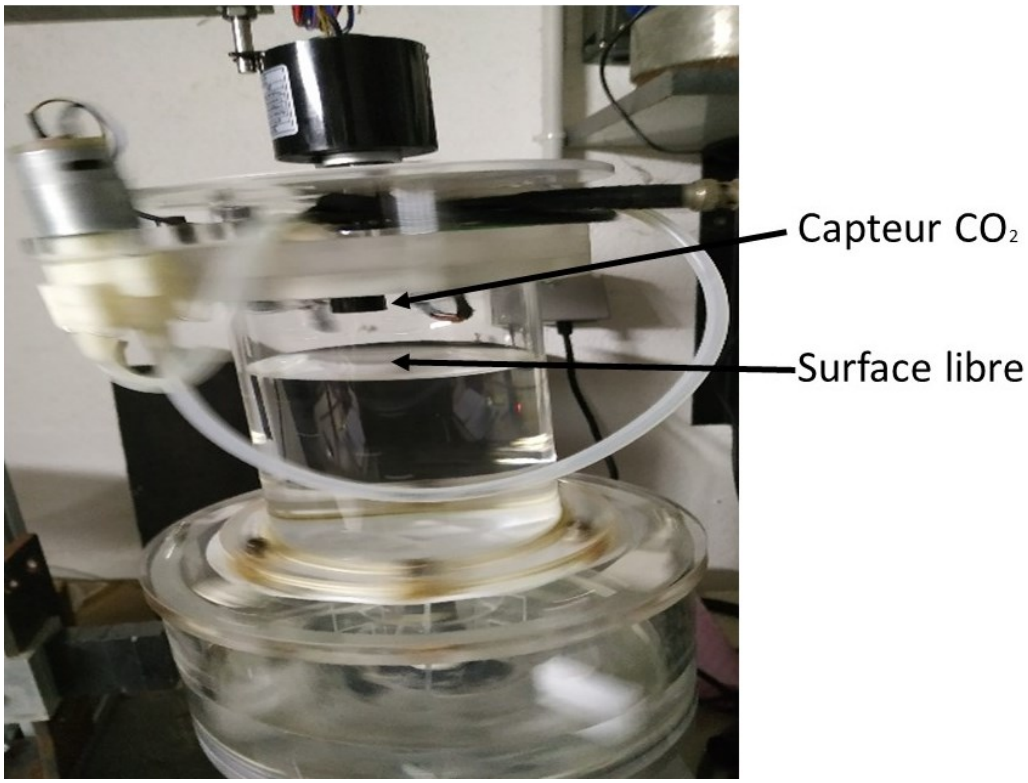


Figure 2.9 : photo du Dinophyt pour les mesures physiques avec un capteur CO_2 au-dessus de la surface libre.

La prise de donnée de diffusion du CO_2 est prise de manière indirecte. Après sa diffusion à travers la membrane dans l'eau, le CO_2 s'équilibre en concentration avec le volume d'air (V = 141cm3) au-dessus de la colonne d'eau (V = 896 cm3).

Nom du capteur de CO_2	**ExplorIR®-WV 20 %**
Marque	Cozir
Plage de mesure	0-20 % (0-200 kppm ou 200 mBar)
Type de capteur	Infrarouge
Précision	+/- 70 ppm
Sortie de données	USB

Table 2.4 : Caractéristiques techniques du capteur CO_2 atmosphérique.

2.5.1.2. Mesure du pourcentage molaire de CO_2 dans l'air

On prend la mesure de la valeur maximale de pourcentage molaire de CO_2 dans l'air sous la membrane (%CO_2) produite par le tampon carbonate avant d'entamer une expérience. On observe dans les premières mesures que le temps de diffusion du CO_2 pour remplir la cuve sous la membrane est long (plusieurs heures avant d'atteindre la valeur maximale du tampon carbonate en CO_2) comme le montre la figure 2.10.

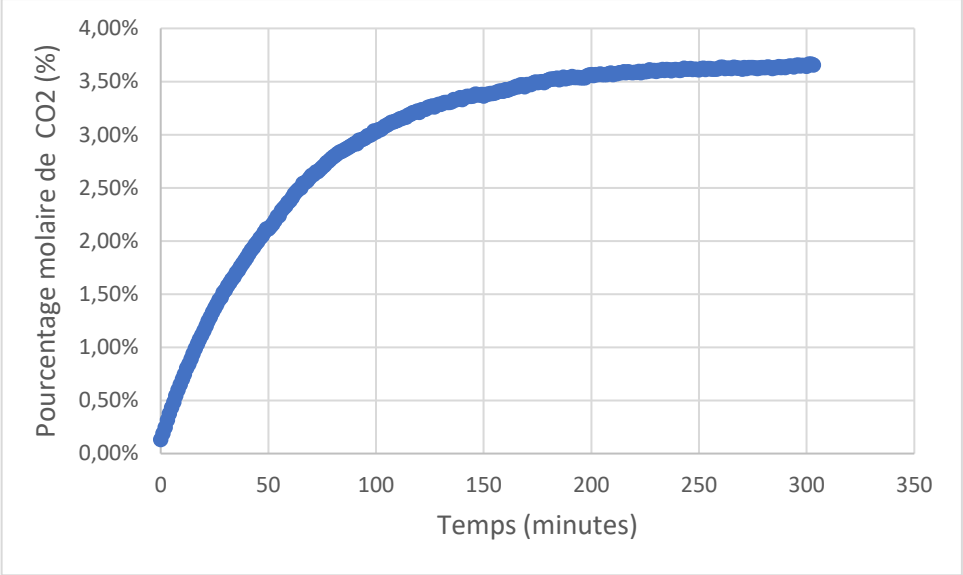


Figure 2.10 : Diffusion du CO_2 dans la cuve a tampon $CaCO_3$ mise en rotation à 30rpm et incliné de 3°, la pression partielle maximale du tampon (3,6 %) est atteinte après plus de 200 minutes.

Ce temps n'est pas négligeable devant le temps caractéristique de saturation en CO_2 dans le bioréacteur au-dessus de la membrane (de l'ordre de 1 à 3 jours). Nous décidons alors d'ajouter une turbine Rushton dans la cuve à tampon carbonate pour accélérer l'homogénéisation du CO2 sous la membrane. Celle-ci est mise en action par un aimant (positionné en-dehors du système) et la mise en rotation du bioréacteur (figure 2.11).

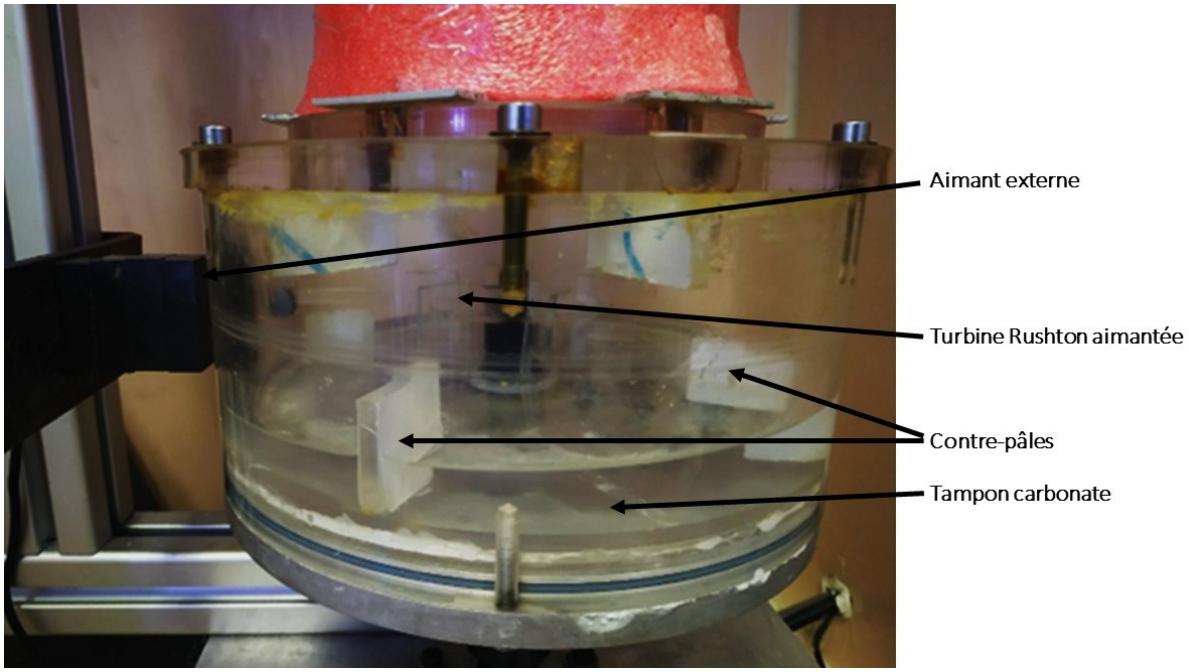


Figure 2.11 : Photo de la cuve à tampon carbonate pourvue d'une turbine Rushton aimantée et de contre pâles fixes dans la cuve.

La turbine Rushton est mise en action pendant 1 heure avant de placer de l'eau osmosée dans le bioréacteur et de commencer une nouvelle expérience avec prise de données.

On observe à la figure 2.12 que le taux de CO_2 dans le bioréacteur au-dessus de la membrane augmente plus rapidement avec la turbine Rushton. Les mesures de temps caractéristiques auraient donc été surestimés d'environ 30 % en l'absence de turbine Rushton. Ainsi, les expériences sont lancées après plus d'une heure d'homogénéisation du CO_2 produit par le tampon dans la cuve à tampon carbonate avec la turbine Rushton.

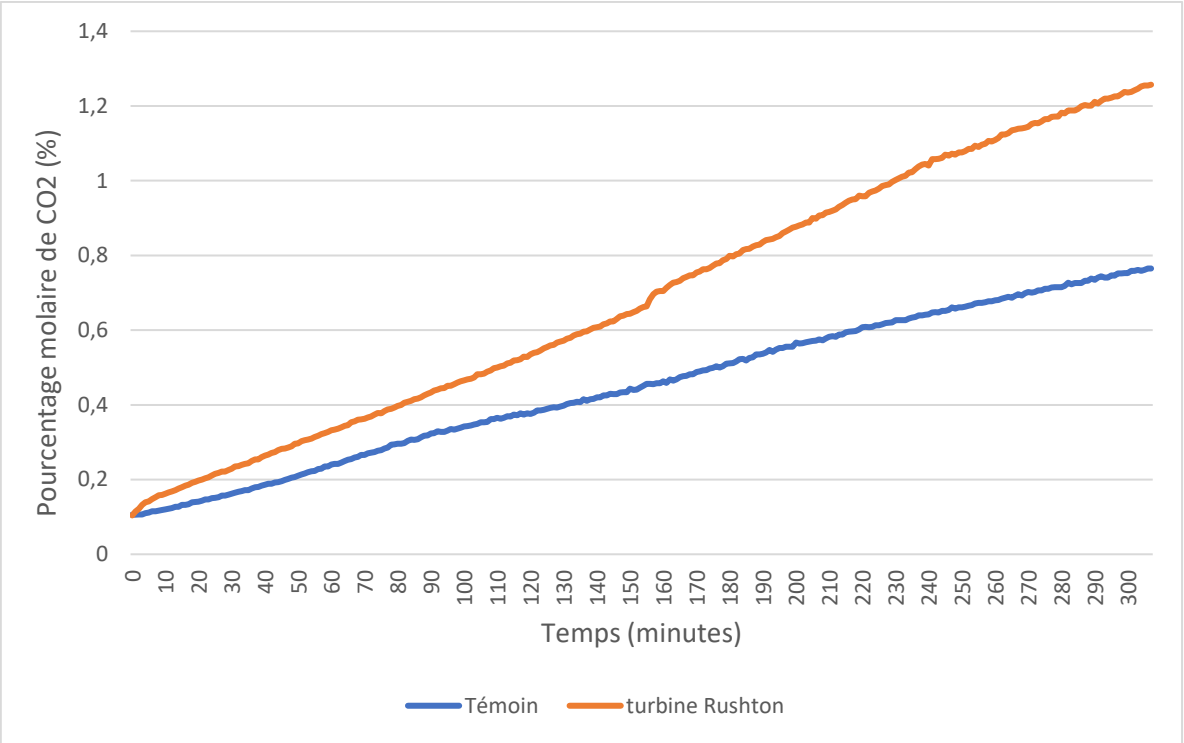


Figure 2.12 : Diffusion du CO_2 dans la cuve a tampon $CaC0_3$ mise en rotation à 30rpm et incliné de 3°, selon la présence/absence d'une turbine.

2.5.2. Fluctuation de température : convection et advection

Après quelques expériences, des fluctuations du %CO_2 apparaissent. Il est suspecté des variations de température qui provoqueraient de la convection et de l'advection des gaz stockés dans le bioréacteur. On utilise alors une caisse isotherme et des capteurs de température pour respectivement réduire et mesurer les fluctuations de température au cours du temps (figure 2.13).

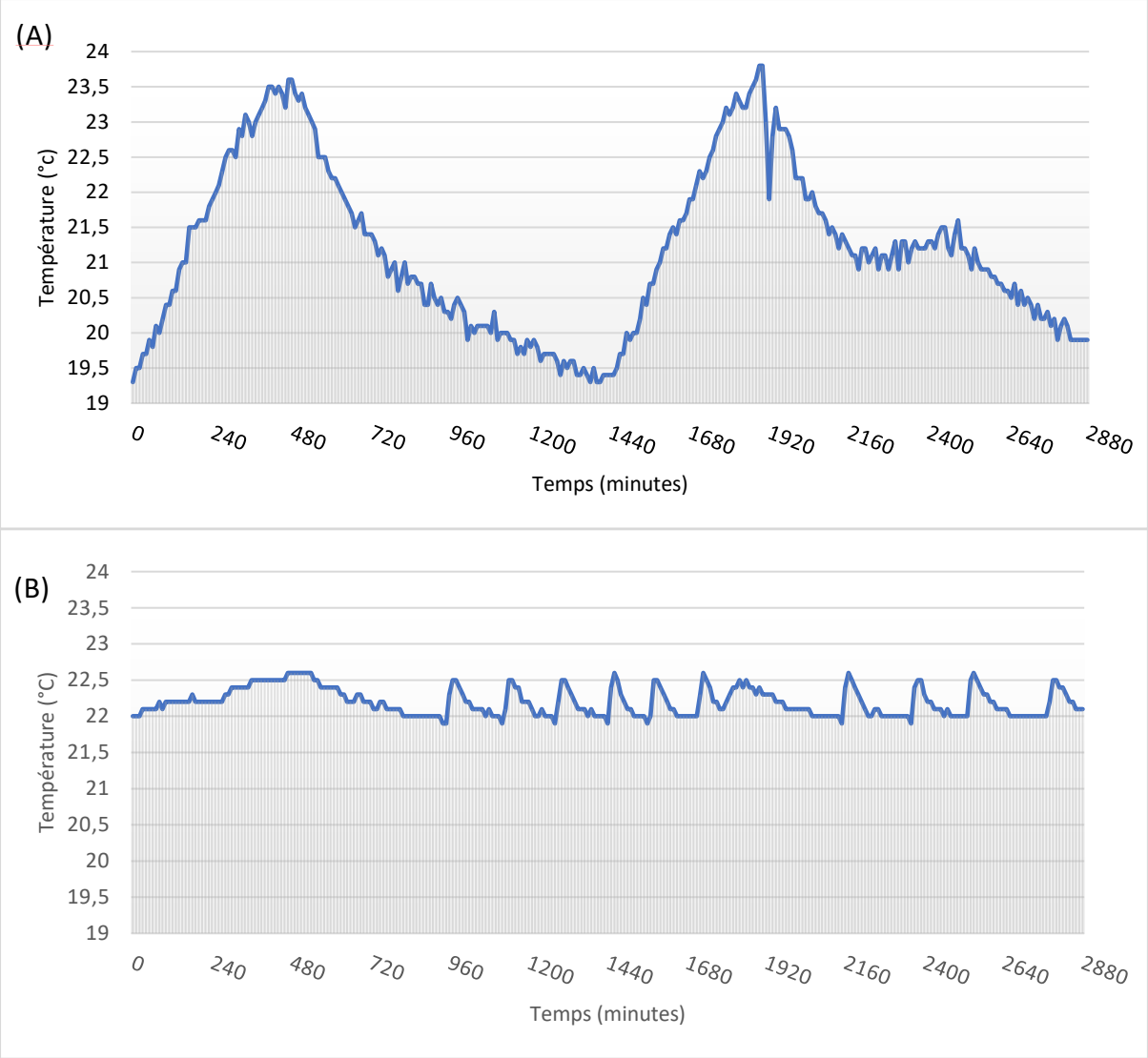


Figure 2.13 : Fluctuations de température sans caisse isotherme et ventilateur (A) puis avec caisse isotherme et usage d'un ventilateur (B).

Les fluctuations de température étant de 3-4°C par jour, elles sont réduites à 0,2-0,3°C à l'aide d'un ventilateur (figure 2.13).



Figure 2.14 : Bioréacteur installé dans une caisse isotherme dont la température est régulée à l'aide d'un ventilateur (en bas à droite de la caisse).

Le ventilateur est mis en marche lorsque la température diminue en dessous d'une valeur consigne dans la caisse isotherme, le moteur du ventilateur produit de la chaleur qui est ensuite répartie autour du bioréacteur en quelques minutes (figure 2.14). En renouvelant les expériences, on observe que la prise de données est plus précise (figure 2.15).

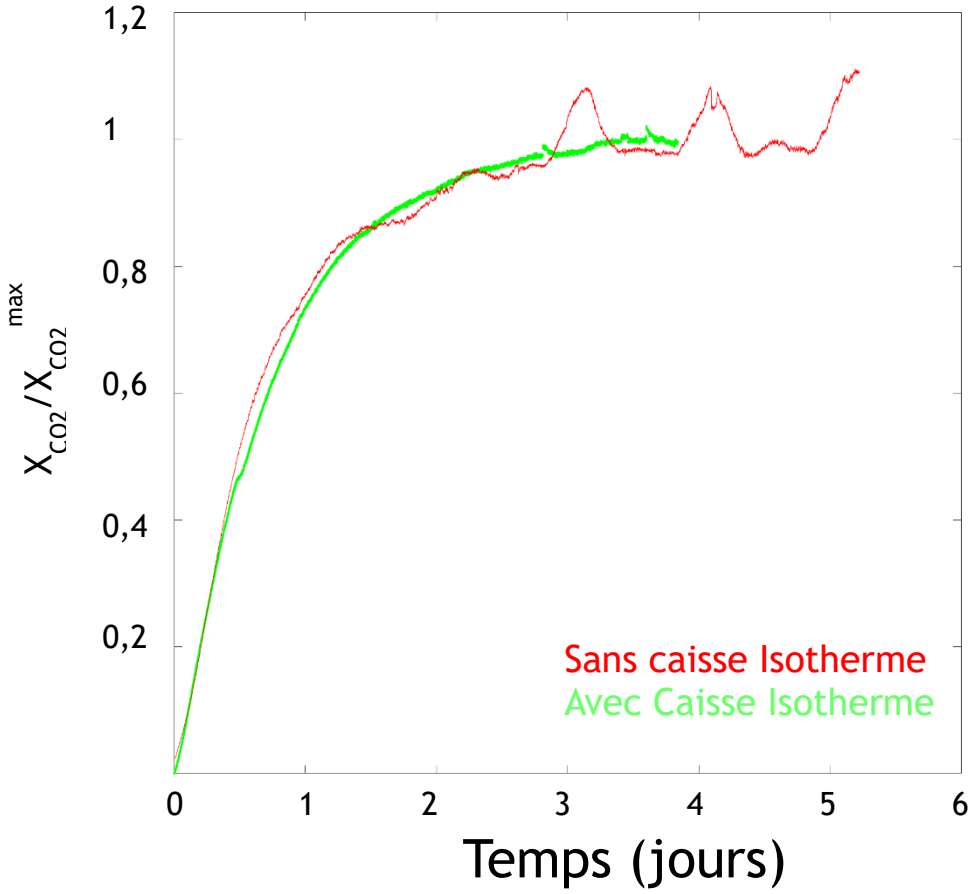


Figure 2.15 : Fluctuations de pourcentage molaire de CO_2 XCO2(%) sans caisse isotherme et ventilateur (rouge) puis avec caisse isotherme et usage d'un ventilateur (vert).

Ensuite, des expériences à différentes vitesses de rotation sont réalisées (de 4 à 60 rpm), différents tampons carbonates produisant différents pourcentages molaires de CO_2 dans l'air (de 2 et 6 %) sont testés et les données de pourcentage de CO_2 sont récupérées chaque minute durant les expériences.

2.6. Dispositif pour les expériences de biologie

A partir du Soft-mixer que l'on convertit en Dinophyt selon le brever n°FR3117505 (Detournay *et al.* 2022) à l'aide d'une membrane microporeuse Celgard et d'une rampe LED, il est possible de mettre en culture des microalgues.

2.6.1. Apport de Lumière

La lumière apportée à la culture de dinoflagellés est réalisée par une rampe LED Aquamedic – Aquarius 120 (table 2.5) pour les Dinophyts 1 à 9,8L. Plusieurs rampes LED Aquamedic – Aquarius 90 sont utilisées pour le Dinophyt 169L.

Nom de la rampe led	Aquarius 90	Aquarius 120
Marque	Aquamedic	Aquamedic
Puissance totale (W)	118	155
Dimensions (LxlxH en mm)	840 x 210 x 25	1100 x 210 x 25
Lumens total (lm)	7678	9945
Couleurs lumineuses – Température de couleur	white 6.000 – 6.500 K / royal blue 450 – 455 nm / red 620 – 625 nm / purple 395 – 405 nm / blue 460 – 465 nm / UV 365 – 370 nm	

Table 2.5 : Caractéristiques des rampes LED Aquamedic utilisées pour les différents Dinophyts.

La lumière est réglée sur chaque LED par un boîtier de contrôle et l'intensité lumineuse est mesurée par un luxmètre (table 2.6).

Nom du luxmètre	MQ510 - Apogée Instruments
Unité de mesure de l'intensité lumineuse	$\mu mol.m^2.s^{-1}$
Plage de mesure	0 à 4000 $\mu mol.m^2.s^{-1}$
Précision	de 0,05 % et 5% sous l'eau
Champ de vision	180°
Dimensions du capteur	24 mm de diamètre et 37mm de hauteur

Table 2.6 : Caractéristiques du luxmètre utilisé pour mesurer l'intensité lumineuse apporté par les LED aux différents Dinophyts.

Pour la LED Aquarius 120 sur les Dinophyts 1 à 9,8L, l'intensité lumineuse moyenne est mesurée en 5 points (figure 2.16) et notée PAR (Rayonnement Photosynthétiquement Actif en anglais) en $\mu mol.m^2.s^{-1}$.Les cuves de culture absorbent jusqu'à 10% du PAR mesuré par le luxmètre avant que la lumière atteigne la culture de dinoflagellés.

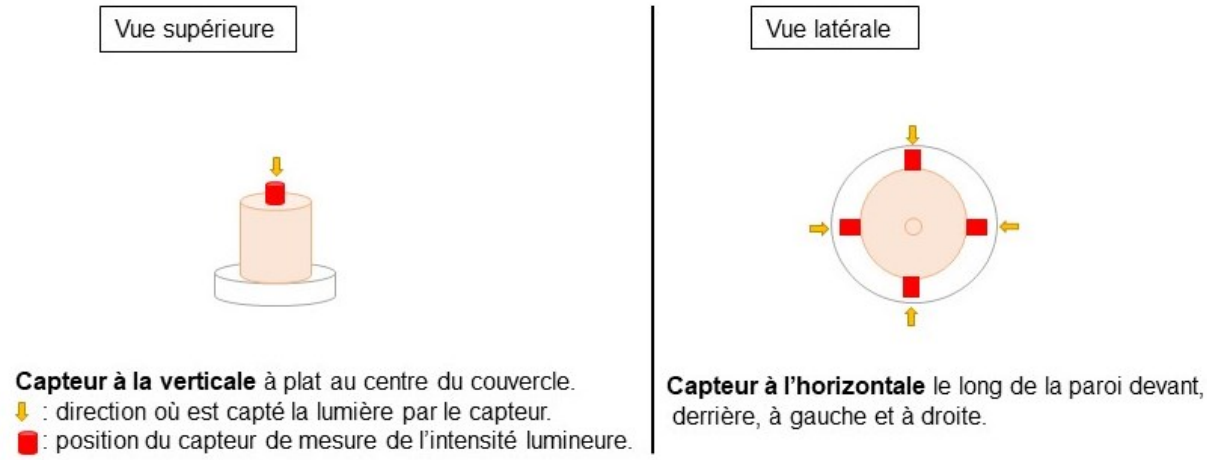


Figure 2.16 : Méthode de prise de mesure de l'intensité lumineuse moyenne émise par les LED sur les Dinophyts de 1 à 9,8L.

Pour le Dinophyt de 169L et les LED Aquarius 90, la mesure de l'intensité lumineuse moyenne est réalisée en 9 points (figure 2.17) :
- 4 points entre les lampes

- 4 points devant chaque lampe

- Et 1 point du dessus de la cuve

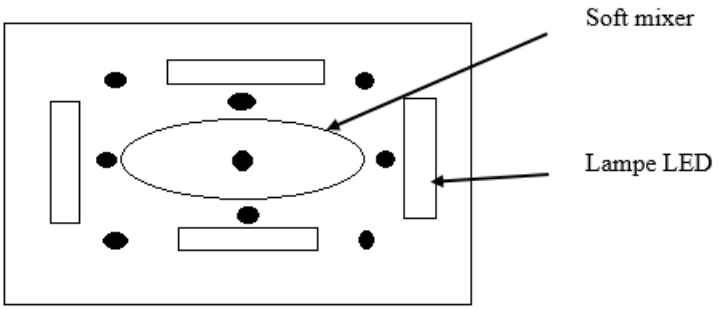


Figure 2.17 : Schéma des points de mesure de l'intensité lumineuse moyenne émise par les LED autour du Dinophyt 169L à l'aide d'un Luxmètre.

2.6.2. Contrôle de la température

Il n'a pas été installé de sonde de température dans les Dinophyts pour suivre la température des cultures de dinoflagellés, afin de limiter les éléments pouvant perturber le mélange dans le bioréacteur. Cependant, pour limiter les risques de variations très importantes à l'intérieur de la culture, la température du laboratoire est fixée à 19°C (à l'aide d'un climatiseur). Pour les faibles volumes, la température de la culture reste très proche de la température de la pièce. Cependant, pour le gros bioréacteur de 169l, la température de la culture a augmenté à cause de la présence des panneaux lumineux et de la dissipation de la lumière dans le milieu pour les grandes concentrations de cellules : la température a pu monter jusqu'à 25°C en fin d'expérience. Il a donc été nécessaire de mieux réguler la température dans les prochains bioréacteurs de grand volume.

2.6.3. Contrôle du pH

Il a été installé un pH mètre (table 2.7) sur le Dinophyt de 169L. Le pH variant avec l'apport de CO_2, on relie la sonde pH à une électrovanne pour contrôler l'apport de CO_2.

Nom de l'appareil	pH controller Aquamedic
Gamme de mesure	3,5 à 10,5
Précision	à 0,01 près
Hysteresis	0,01

Table 2.7 : Caractéristiques du contrôleur de pH relié à une électrovanne.

Une valeur consigne pH (8,1) est programmée pour que les variations de pH soient légères (entre 7,8 et 8,2) et ne perturbent pas la croissance des dinoflagellés tout en permettant un apport de CO_2 à la culture. Une boucle de régulation est installée avec un pH-mètre sur chaque cuve pour contrôler l'apport de CO_2 indépendamment sur chaque cuve de culture comme le montre la figure 2.18.

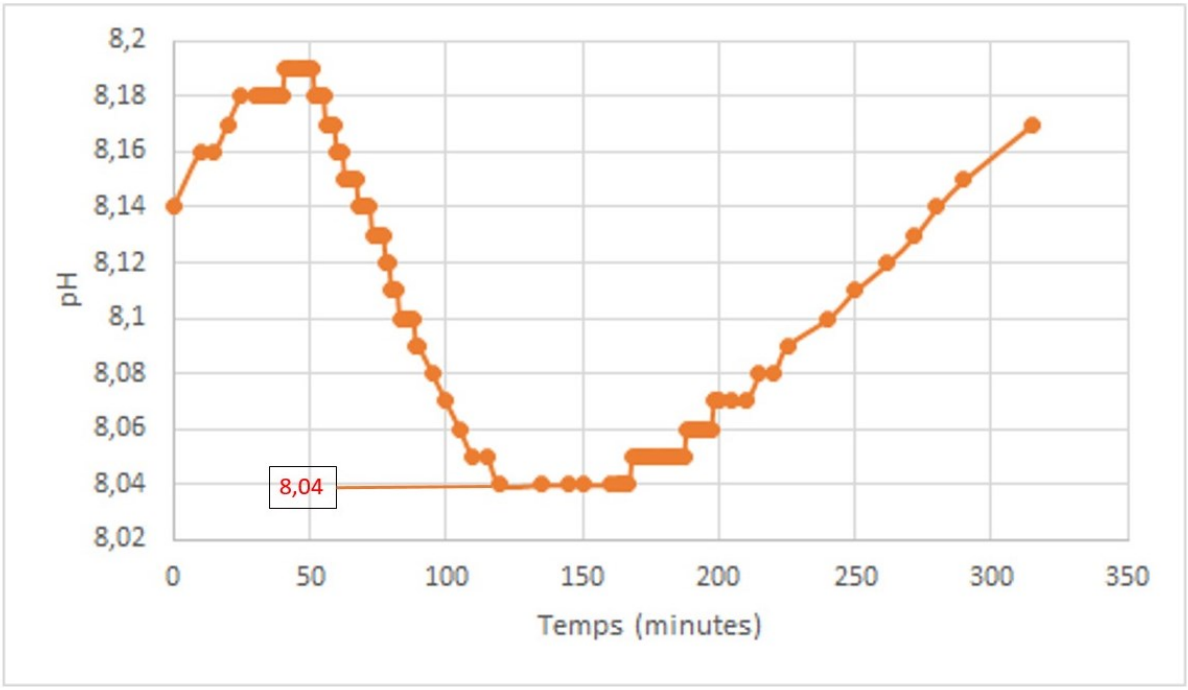


Figure 2.18 : Effet de l'injection de CO_2 dans une cuve de culture pour la régulation du pH au cours du temps.

2.6.4. Préparation du milieu de culture

Les dinoflagellés sont cultivés dans les Dinophyts à l'aide d'un milieu de culture. Ce milieu est préparé à partir de milieu Necton (Nutribloom, table 2.8) à la concentration de 2/1000 dans de l'eau de mer reconstituée (à salinité 35 $g.L^{-1}$). Un renouvellement du milieu de culture est réalisé fréquemment durant la culture en retirant un pourcentage (1 à 20%) du volume total de culture (avec les dinoflagellés). Ce volume est remplacé par de l'eau salée (35$g.L^{-1}$) et du milieu de culture à la même concentration utilisée précédemment (2/1000). Ce changement de

milieu se fait lorsque le Dinophyt n'est pas en rotation. Un changement de milieu dure quelques minutes dans des volumes de 1 à 9L et jusqu'à 20 minutes en volume industriel (supérieur à 100L).

Nom des éléments	Concentration en %
N	2,8
P	0,31
Fe	0,112
Zn	0,014
Mo	0,01
Mn	0,006
Mg	0,005
Co	0,001
Cu	0,001
Thiamine	0,0035
Biotine	0,0005
Vitamine B12	0,0003
N : P	9 : 1

Table 2.8 : Caractéristiques du milieu Necton : Nutribloom plus.

L'eau de mer pour le milieu de culture est reconstituée à partir d'eau osmosée et de sel naturel Royal Nature Ion Balanced Pro (table 2.9). La consommation du milieu nutritif par les dinoflagellés est compensée par le renouvellement du milieu (TR en % du volume total).

Nom des éléments	Concentration dans une eau reconstituée (ppm)
Na	11000
Cl	20000
Mg0	1320
Ca	420
K	400
S	900
Br	70
Sr	8
P	0.08
NO3	0.06
Si	2.9
I	0.07
MO	0.01
Zn	0.01
Fe	0.004
Cu	0.0004
Li	0.1
B	4.5
C	30
F	12

Table 2.9 : Caractéristiques du sel naturel Royal Ion Balanced Pro pour une eau reconstituée à la salinité de 35 $g.L^{-1}$.

2.6.5. Comptage cellulaire

Les comptages cellulaires d'*A. carterae* sont effectués à l'aide d'un appareil de comptage, le Norma XS (Iprasense©). Cet appareil prend une photo de la culture à fort grossissement et haute résolution. Ensuite, l'appareil relié à un ordinateur et le logiciel Horus (Iprasense©), analysent l'image pour déterminer la densité cellulaire de l'échantillon. Pour ce faire, des lames à chambre de comptage à volume connu sont utilisées (Figure 2.19)



Figure 2.19 : Lame de comptage (Iprasense©), pourvue de 4 chambres de comptage.

Le comptage cellulaire est réalisé de la manière suivante :

- Prélèvement de 1ml de culture
- Ajout de 1µl de Lugol
- Homogénéiser par renversement du tube
- Injection sur lame des échantillons de 4µL de volume
- Insertion de la lame avec les échantillons dans le support prévu à cet effet
- Lancer l'analyse sur le logiciel.
-

Le logiciel analyse les images et entoure les formes identifiées comme des cellules. Différents réglages sont possibles pour une meilleure précision de comptage comme le montre la figure 2.20. Les comptages sont précis à +/- 20000 cellules par ml près.

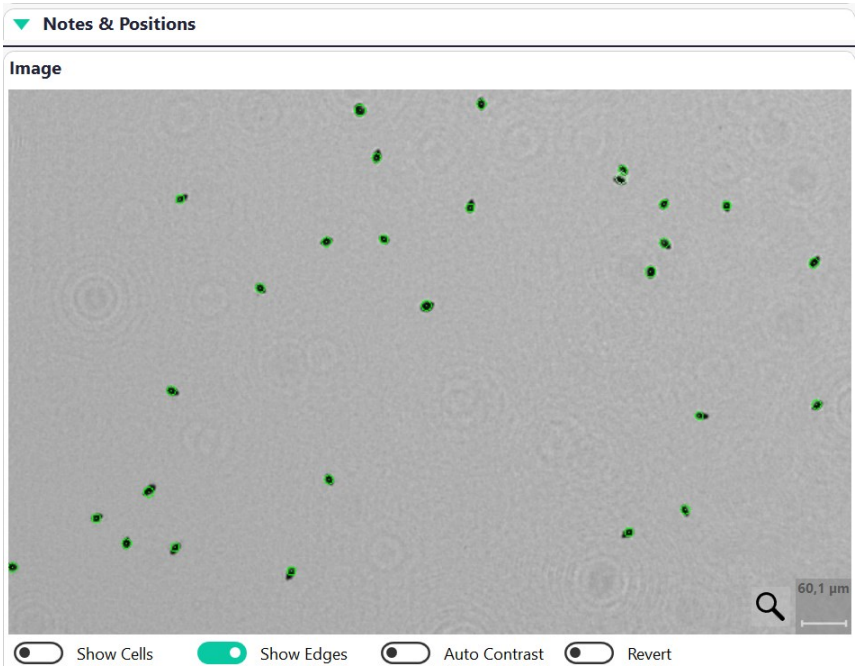


Figure 2.20 : Le logiciel Horus analyse l'image de l'échantillon et reconnaît les cellules en les entourant par un cercle vert.

Chapitre 3 : Etude du mélange du CO2 dans un bioréacteur de type Dinophyt

Ce chapitre est un article soumis pour être publié dans la revue Physics of fluids.

Résumé :

Le flux de CO_2 diffusant à l'intérieur d'un nouveau type de bioréacteurs a été mesuré expérimentalement. Ce bioréacteur géo inspiré consiste en un cylindre partiellement rempli tournant autour de son axe incliné par rapport à la verticale, imitant ainsi le mouvement de précession de la Terre. La hauteur de fluide est choisie égale à 2 rayons afin que le premier mode de Kelvin soit résonnant. Le CO_2 diffuse à travers une membrane située au fond du liquide. La pression partielle de CO_2 au-dessus de la surface libre est mesurée en fonction du temps. Cette évolution temporelle est modélisée par la présence de couches diffusives sans advection au niveau de la surface libre et au niveau de la membrane. Ce modèle de base mène à une valeur expérimentale pour le CO_2 à la membrane, qui s'avère être inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre d'Ekman. Cette valeur est en accord avec la présence de couches d'Ekman d'épaisseur proportionnelle à la racine carrée du nombre d'Ekman. A un nombre d'Ekman donné, le flux dépend faiblement de l'angle d'inclinaison α avec une loi d'échelle $\alpha^{1/4}$.

Gas injection into a tilted rotating cylinder

C. Lefranc,[1] O. Detournay,[1] and P. Meunier[2]
[1)]*Planktovie, Marseille, France*[a)]
[2)]*Aix Marseille Univ, CNRS, Centrale Marseille, IRPHE - Marseille, France*

(*Electronic mail: patrice.meunier@univ-amu.fr)

(Dated: 16 May 2023)

The flux of CO_2 diffusing inside a new type of bioreactors has been measured experimentally. This geoinspired bioreactor consists in a partially filled cylinder rotating around its axis tilted with respect to the vertical, thus mimicking the precession motion of the Earth. The height of fluid is chosen equal to 2 radii in order for the first Kelvin mode to be resonant. The CO_2 diffuses through a membrane located at the bottom of the liquid. The partial pressure of CO_2 above the free surface is measured as a function of time. This temporal evolution is modeled by the presence of diffusive layers with no advection at the top and the bottom of the liquid. This basic model leads to an experimental value for the flux of CO_2 at the membrane, which is found to be proportional to the inverse square root of the Ekman number. This is in agreement with the presence of Ekman layers of thickness proportional to the square root of the Ekman number. At a given Ekman number the flux weakly depends on the tilt angle α with a scaling as $\alpha^{1/4}$.

I. INTRODUCTION

Precession is known to create very energetic flows due to resonances of inertial modes. In this paper, we quantify the flux of gas into a rotating cylinder tilted with respect to the gravity.

The inlet of oxygen and CO_2 within a bioreactor is a crucial question in biotechnologies. Indeed, the diffusive flux of gas, proportional to the surface of the bioreactor, increases less than its volume when the size increases. This strongly limits the maximal concentration of cells and leads to very slow cell growth for large scale bioreactors[1]. To solve this, additional convective mixing is done by introducing bubbles or using rotating blades. It partially solves the problem but also creates a strong shear that inhibits the growth of many cells and can even be lethal for fragile cells[2,3].

Recently, Meunier (2020)[4] proposed a new geoinspired bioreactor consisting in a cylinder rotating at Ω around an axis tilted with respect to gravity. This bioreactor generates a soft mixing, as efficient as using a Rushton turbine but with a shear 30 times smaller. The flow in such a tilted rotating cylinder or in a tilted annulus[5] is very close to the one inside a precessing cylinder[6,7]. For small enough velocities the free surface remains horizontal. It is thus precessing at $-\Omega$ in the rotating frame of the cylinder, with an angle equal to the angle between gravity and the cylinder's axis. This motion of the free surface creates a forcing of Kelvin modes[8] with azimuthal wavenumbers equal to $m = 1$. As in precessing cylinders, the amplitude of each Kelvin mode diverges when the height of fluid is equal to a multiple of the half wavelength of the mode[4,6]. The inertial modes are saturated at low Ekman number by surface Ekman pumping[4,9,10] leading to an amplitude scaling as the inverse square root of the Ekman number.

At small Ekman numbers, the flow exhibit a triadic instability[11] due to the nonlinear coupling between the forced Kelvin mode and two free modes with azimuthal wavenumbers separated by 1[4,12]. The most unstable wavenumbers and the viscous growth rate can be predicted analytically, in excellent agreement with the experimental results[13] and the numerical results[14–17].

The mixing property of this type of flows has been studied for a precessing sphere[18], a partly filled tilted rotating cylinder[4] and a partly filled sphere rotating around its horizontal axis[19]. However, all these works are focused on the mixing within the bulk of fluid thanks to experimental injection of a dye or thanks to numerical simulations with two types of tracers. The flux of a scalar through the interface or through a diffusing boundary has never been studied. Nevertheless, it is the flux of gas which governs the growth of cells in bioreactors. The goal of this paper is to quantify the flux of CO_2 injected through a membrane at the bottom of the liquid. The experimental set-up and the governing parameters are described in Section II. Experimental and theoretical results are presented and discussed in Section III. Conclusions follow in Section IV.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Experimental set-up for a soft mixer

The bladeless mixer under consideration in this paper consists of a circular cylinder rotating around its axis at the angular velocity Ω (see Fig 1). It is equal to 0.26, 0.52, 1.05, 2.1, 4.2 rad/s for a CO_2 partial pressure of 20 mbar and equal to 0.79, 1.6, 3.1 and 6.3 rad/s for a partial pressure of 90 mbar. The radius R of the cylinder is equal to 5.23 cm. The cylinder, made of PMMA, is filled with distilled water up to a height $H = 10.45$cm, which is defined for a vertical cylinder. The kinematic viscosity $\nu = 10^{-6}\mathrm{m}^2/\mathrm{s}$ at a temperature of 20° is known with an accuracy of 1%. The axis of the cylinder, defined as the z-axis, is slightly tilted by an angle α with respect to the gravity $\mathbf{g}$. The liquid is located above a porous membrane with a thickness of 90 microns allowing CO_2 diffusion into the liquid. Gaseous CO_2 below the membrane is obtained from a solution of K_2CO_3 and $KHCO_3$ at various concentrations. To obtain a CO_2 partial pressure of 20mbar,

[a)]Aix Marseille Univ, CNRS, Centrale Marseille, IRPHE - Marseille, France

242ml of K_2CO_3 at 3M and 158ml of $KHCO_3$ at 3M are used. To obtain a CO_2 partial pressure of 90mbar, 30ml of K_2CO_3 at 3M and 370ml of $KHCO_3$ at 3M are used. In order to ensure that the partial pressure of CO_2 below the membrane is always at the desired value, the mixture of air and CO_2 is mixed with a Rushton turbine which rotates at $-\Omega$ with respect to the cylinder. This motion is obtained by keeping the Rushton turbine motionless compared to the laboratory thanks to inner and outer magnets.

The goal of the experiment is to measure the concentration of CO_2 inside the liquid as a function of time. This is done thanks to a CO_2 sensor located above the free surface which gives the partial pressure of CO_2 with an accuracy of 2%. This indirect measurement gives a value which is close to the concentration of CO_2 times the Henry's constant $k_H = 0.34 \times 10^{-3}$mol/m^3/Pa if the volume above the interface is small and if the CO_2 flux at the free surface is large. The volume above the free surface is equal to $V_{\text{gas}} = 154$ml for all experiments except for a tilt angle $\alpha = 9^\circ$ where $V_{\text{gas}} = 418$ml. We will show that it is sufficient to measure accurately the flux of CO_2 through the membrane.

The resistance of the membrane to the flux of CO_2 has been neglected. Indeed, the Gurley porosity of the membrane is equal to 10 seconds, which is defined as the time needed for 0.1 liter of air pushed with a pressure difference of 121 mbar to go through a surface of 1 squared inch (equal to 6.45 cm^2). In our experiments, for the lowest pressure difference of 20mbar and a surface of the membrane of 66 cm^2, a volume of 0.46 liters of gas (needed to saturate the liquid that has a volume 0.61 liter) would diffuse through the membrane in 2.7 seconds. This is much faster than the time measured in the experiments (of the order of hours). It means that the membrane is not inhibiting the flux of CO_2.

Preliminary experiments revealed the presence of daily oscillations of the measured CO_2 partial pressure. They were due to the thermal dependence of the Henry's constant and to convection that enhanced the CO_2 flux. In order to remove these experimental imperfections, the set-up was introduced in a thermally insulated box, heated with a small fan controlled by a thermometer. The temperature fluctuations were then decreased from 2 degrees to 0.1 degree, which prevented any oscillations on the partial pressure of CO_2. Furthermore, the side of the cylinder was insulated using 1cm of foam, which prevented visualizations during the experiments.

B. Non-dimensional parameters

The fluid problem is governed by four non-dimensional parameters. The Ekman number $E = \nu/(\Omega R^2)$ is varied from 10^{-5} to 10^{-3}. The tilt angle α is varied from 0.5 to 9 degrees in order to get a sufficient forcing for the instability to occur while maintaining a small amplitude of the forced Kelvin mode for the asymptotic theories to remain valid. The Froude number $Fr = \Omega^2 R/g$ is smaller than 0.2 such that the free surface remains horizontal. Finally, when a passive scalar is injected, an additional parameter arises : the Schmidt number $Sc = \nu/\kappa$ ($\kappa = 1.8 \times 10^{-9}$m^2/s being the molecular diffusivity of CO_2 in water) which is equal to 550 in our experiments. The aspect ratio $h = H/R$ is a key parameter due to the presence of resonances, as will be shown in the next subsection. It was chosen equal to 2 within 1% in order to select the first resonance of the first mode. Finally, the volume of gas V_{gas} above the liquid is important in order to quantify the flux of CO_2 at the free surface. The ratio $V_{\text{gas}}/V_{\text{liq}}$ was chosen equal to 0.172 for small tilt angles α. It was enlarged to 0.467 for $\alpha = 9^\circ$ to prevent the liquid to touch the top cover.

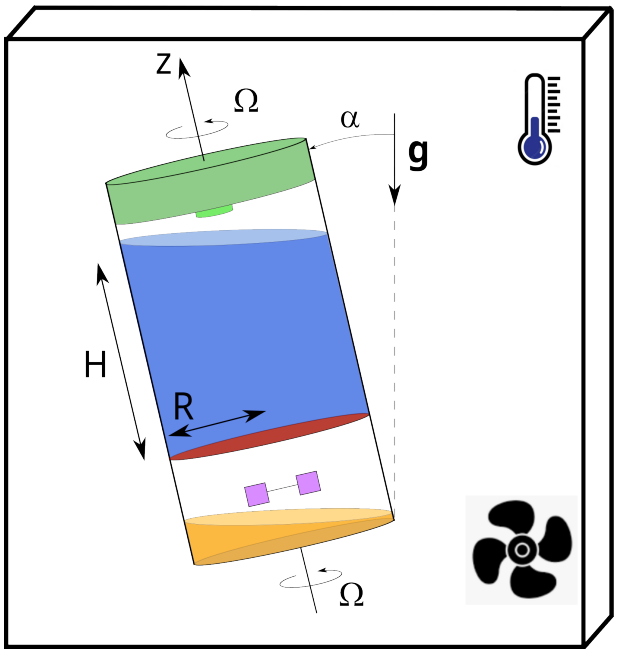


FIG. 1. Set-up for the measurement of the flux of CO_2 through the membrane. The liquid (in blue) is located above a membrane (in red) inside a cylinder tilted at an angle α and rotating at Ω. The CO_2 sensor device (green) measures the CO_2 partial pressure above the interface. CO_2 is introduced below the membrane thanks to a solution of potassium carbonate (orange) and mixed with a Rushton turbine (purple). The whole set-up is located in a temperature controlled insulating box (black).

C. Resonance of a Kelvin mode

The fluid height is carefully selected to create a resonant flow generating efficient mixing within the bulk. Indeed, when the cylinder is rotated about its axis, the free surface (which precesses at $-\Omega$ around the z-axis in the rotating cylinder frame of reference) forces inertial waves which reflect off the walls and interfere to give a global mode of oscillations. These Kelvin modes[8] have a vertical velocity given by

$$w = a_i \sin\left(\frac{2\pi z}{\lambda_i}\right) J_1\left(\frac{2\pi r\sqrt{3}}{\lambda_i}\right) \sin(\theta + \Omega t) \qquad (1)$$

in the frame of the cylinder (J_1 being the Bessel function of the first kind). The axial wavelength λ_i is fixed by the forcing frequency $-\Omega$ which is here equal to -1 when dimensionalised

by the angular velocity of the cylinder. The axial wavelength is thus equal to $\lambda_1 = 3.98R$, $\lambda_2 = 1.91R$ and $\lambda_3 = 1.24R$ for the first modes[4]. At a given amplitude a_i, the axial velocity of the i-th mode vanishes at $\lambda_i/2$, λ_i, $3\lambda_i/2$, $2\lambda_i$... If the free surface is located at one of these nodes, the amplitude a_i of the corresponding mode must be infinite in order for w to satisfy the boundary condition set by the oscillation of the free surface

$$w(z=H) = \alpha\Omega R\sin(\theta+\Omega t). \qquad (2)$$

This is similar to the resonance of a string with one end vibrated with a finite amplitude at the node of the mode. In order to obtain the most efficient flow with the smallest possible angle it is therefore interesting to choose the fluid height equal to one of these resonant heights. In all our experiments, we chose the first resonant height of the first mode which is very close to $2R$. In that case, Meunier (2020)[4] showed that the saturation by Ekman pumping saturates the divergence of the amplitude at a value $a_i = 0.31\alpha\Omega RE^{-1/2}$ for weak forcing. However, at large tilt angles and/or small Ekman numbers, the flow becomes unstable with respect to a triadic resonance. The critical Ekman number is approximately equal to 4×10^{-4} for $\alpha = 3^\circ$ and is nearly proportional to α until 9°. It should be noted that the precession of the free surface does not excite any surface gravity waves. Indeed, their frequency $\omega = \sqrt{gk+\sigma k^3/\rho}$ (where $\sigma = 70$ mN/m is the surface tension and $\rho = 1000$ kg/m^3 is the density) is always larger than 25 rad/s for a wavenumber k larger than π/R. This is much larger than the excitation frequency Ω which is at most equal to 6.28 rad/s for the largest rotation speed (equal to 60rpm).

III. FLUX OF CO_2

A. Experimental measurements for $\alpha = 3^\circ$

Before each experiment, the cylinder is rotated in order for the gaseous CO_2 to be homogeneous below the membrane while the upper part above the membrane is empty. At $t = 0$, the cylinder is stopped, distilled water is introduced in the upper part, the top cover is fixed and the cylinder is rotated again. The total filling and spin-up stage lasts about ten minutes. This is much faster than the duration of the experiments that ranges from 1 to 5 days. Figure 2(a) shows the partial pressure of CO_2 measured above the liquid for a partial pressure of CO_2 $P_0 = 20$mbar below the membrane. The partial pressure increases with time and saturates at P_0 when the liquid has a concentration in CO_2 equal to $k_H P_0$. The curve is very similar to a law of the form $1-\exp(-t/\tau)$ except for the smallest angular velocity (magenta line) which exhibits small daily oscillations probably due to a very small fluctuation of the temperature. The characteristic time is of the order of a day. This is much faster than the diffusive time $H^2/\kappa = 70$ days that would be measured in the absence of flow.

This enhanced diffusion is due to entrainment by the flow. Indeed, Figure 2(a) clearly shows that the partial pressure increases faster when the angular velocity of the cylinder increases. It goes from about 3 days for the smallest angular

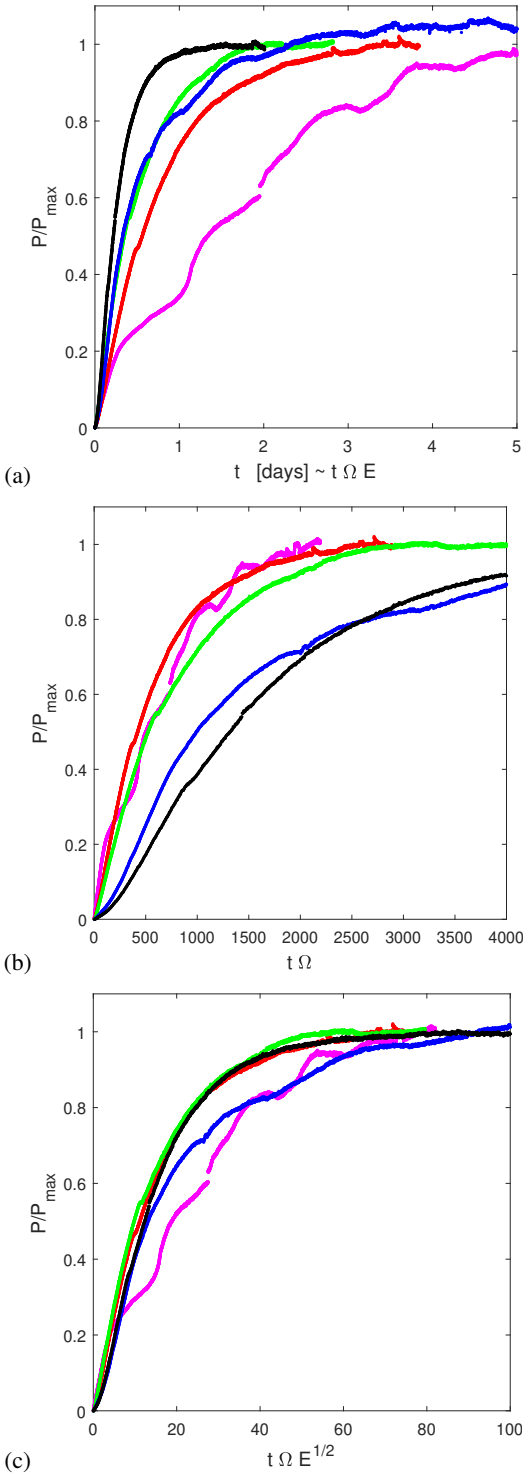


FIG. 2. Partial pressure of CO_2 measured above the free surface for a partial pressure of CO_2 P_0 below the membrane equal to 20mbar. The liquid contains distilled water without CO_2 at $t = 0$. The tilt angle is equal to 3°. The angular velocity of the cylinder is equal to $\Omega = 0.26$rad/s (magenta), to $\Omega = 0.52$rad/s (red), to $\Omega = 1.05$rad/s (green), to $\Omega = 2.1$rad/s (blue) and to $\Omega = 4.2$rad/s (black). Time is dimensional in (a), dimensionalised by Ω in (b) and dimensionalised by $\Omega\sqrt{E}$ in (c). $H/R = 2$.

velocity to about 0.5 day for the largest angular velocity. This enhancement of the diffusion by the flow has already been observed for a gas oscillating in a channel[20]. It suggests that the characteristic time may be rescaled by the advective time $1/\Omega$ rather than the diffusive time. However, Fig. 2(b) indicates that the curves do not collapse when the partial pressure is plotted as a function of $t\Omega$. With this temporal scaling the partial pressure increases slower when the angular velocity of the cylinder increases. Furthermore, the characteristic time is much larger than the rotation period: it is at least equal to a few thousand rotation periods.

Fig. 2(c) shows the partial pressure of CO_2 with times dimensionalised by the characteristics time $\Omega^{-1}E^{-1/2}$. Clearly, the curves seem to collapse much better, except for the smallest angular velocity (which is probably perturbed by the daily oscillations). This scaling as $E^{-1/2}$ suggests that the Ekman layers may have a dominant role in the diffusion process. However, it should be noted that the time of saturation is much larger than the spin-up time by one to two orders of magnitude although they have the same scaling as $E^{-1/2}$.

B. Model with diffusive layers

We assume that CO_2 is homogenized extremely fast inside the bulk of the water. Indeed, Meunier (2020)[4] measured the characteristic time for mixing when introducing directly a passive scalar inside the liquid. The characteristic time is of the order of 10 rotation periods. This is much faster than the characteristic times measured while introducing the passive scalar through the membrane (of the order of a few thousands of rotation periods). As a consequence, the limiting process for transport of CO_2 from underneath the membrane to the liquid is simply due to the presence of an Ekman layer of thickness δ proportional to $R\sqrt{E}$ where the flow is nearly motionless. Assuming that CO_2 diffuses without advection over the lengthscale δ gives a molar flux $\int \kappa \partial_z c_{CO_2} dS$ above the membrane equal to

$$\Phi_{\text{membrane}} = \kappa \frac{k_H P_0 - c}{\delta} \pi R^2 \tag{3}$$

where c is the CO_2 concentration above the Ekman layer. Indeed, the CO_2 concentration at the membrane is equal to its saturated value $k_H P_0$ if the membrane has a large enough permeability. The thickness of the diffusive layer δ at the bottom will be calculated by fitting the model to the experimental data.

In a similar way, the molar flux of CO_2 at the interface is equal to

$$\Phi_{\text{interface}} = \kappa \frac{c - k_H P}{\delta'} \pi R^2 \tag{4}$$

where P is the partial pressure of CO_2 in the gas above the interface. Here, we have assumed that there is a diffusive layer of thickness δ' below the interface which does not need to scale as $E^{1/2}$ since it may not be an Ekman layer.

The total number of moles of CO_2 inside the gas $n_{\text{gas}} = PV_{\text{gas}}/(RT)$ (with $R = 8.314\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ and $T = 293\text{K}$) is governed by

$$\frac{dn_{\text{gas}}}{dt} = \Phi_{\text{interface}}. \tag{5}$$

The total number of moles $n_{\text{liq}} = cV_{\text{liq}}$ of CO_2 inside the liquid is governed by

$$\frac{dn_{\text{liq}}}{dt} = \Phi_{\text{membrane}} - \Phi_{\text{interface}}. \tag{6}$$

Defining new variables $x_{\text{liq}} = c/(k_H P_0)$ and $x_{\text{gas}} = P/P_0$ that vary from 0 to 1, the differential equations can be written

$$\frac{dx_{\text{liq}}}{dt} = \frac{1 - x_{\text{liq}}}{\tau} - \mu \frac{x_{\text{liq}} - x_{\text{gas}}}{\tau} \tag{7}$$

and

$$\frac{dx_{\text{gas}}}{dt} = \beta\mu \frac{(x_{\text{liq}} - x_{\text{gas}})}{T} \tag{8}$$

where

$$\tau = \frac{V_{\text{liq}}\delta}{\pi R^2 \kappa} = \frac{H\delta}{\kappa} \tag{9}$$

is the characteristic time and

$$\mu = \frac{\delta}{\delta'} \tag{10}$$

is the ratio of the thicknesses. The parameter

$$\beta = k_H RT \frac{V_{\text{liq}}}{V_{\text{gas}}} \tag{11}$$

corresponds to the ratio between the number of mole of CO_2 in the liquid and the gas at saturation. In our experiments β is large (equal to 4.8 for most tilt angles) because the volume of gas has been chosen small. Although the full solution is given in the appendix, it is interesting to study the approximate solution for large β: Eq. (8) indicates that the term $x_{\text{gas}} - x_{\text{liq}}$ must remain small. Neglecting this term in Eq. (7) leads to a simple solution

$$x_{\text{liq}} = 1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \tag{12}$$

Introducing this approximate solution in (8) gives a simple differential equation for x_{gas} which can be solved as

$$x_{\text{gas}} = \frac{1}{1 - (\beta\mu)^{-1}} \left[(1 - e^{-t/\tau}) - \frac{1 - e^{-t\beta\mu/\tau}}{\beta\mu} \right] \tag{13}$$

This approximate law is plotted in Fig.3. It fits extremely well the experimental data for a characteristic time τ equal to 0.24 days. It can be noted that the slope at $t = 0$ vanishes because the CO_2 measurement is done in the air above the free surface rather than in the liquid. Indeed, Eq.(8) indicates that dx_{gas}/dt vanishes since x_{gas} and x_{liq} are initially equal to

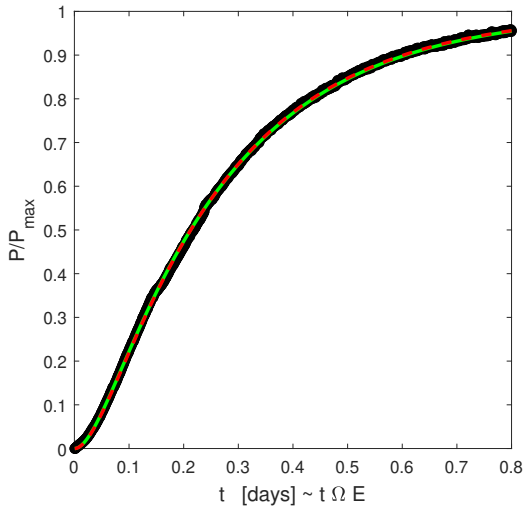


FIG. 3. Partial pressure of CO_2 measured above the free surface for a partial pressure of CO_2 P_0 below the membrane equal to 20mbar, a tilt angle 3° and an angular velocity $\Omega = 4.2$rad/. Symbols correspond to the experimental result. The red dashed line corresponds to the approximate solution (13) with $\tau = 0.24$ days and $\mu = 1.2$. The green solid line corresponds to the full solution (14) with $\tau = 0.19$ days and $\mu = 0.8$.

0. There is a very quick increase of the slope during a time $\tau/(\mu\beta)$. It is the time needed for the first term to become larger than the second term. After this transient time, the solution is very close to a decaying exponential $1 - e^{-t/\tau}$.

The full model is solved in the appendix and leads to a concentration of CO_2 in the gas equal to

$$x_{\text{gas}} = \frac{\beta\mu}{\lambda_+ - \lambda_-}\left[\frac{e^{t\lambda_+/\tau} - 1}{\lambda_+} + \frac{1 - e^{t\lambda_-/\tau}}{\lambda_-}\right] \qquad (14)$$

with

$$\lambda_\pm = -\frac{1+\mu+\beta\mu}{2} \pm \sqrt{\frac{(1+\mu+\beta\mu)^2}{4} - \beta\mu}. \qquad (15)$$

This solution, plotted as a green line in Fig. 3, also fits extremely well the experimental data. However, the characteristic time $\tau = 0.19$ day needed to fit the data is slightly smaller than the time $\tau = 0.24$ day estimated from the approximate solution. The 25% difference is due to the fact that the coefficient β is not infinite as assumed for the approximate solution. In the following we will thus use the full solution (14) to fit the experimental data for each experiment.

C. Dependence on the Ekman number

By fitting the partial pressure of CO_2 as a function of time with Eq. (14), we can extract the characteristic time $\tau = H\delta/\kappa$ and the ratio of the thicknesses $\mu = \delta/\delta'$ for each experiment. The time τ is plotted as a function of the Ekman number in Fig. 4(a). The first observation is that the characteristic time is independent of the imposed CO_2 pressure P_0. This is simply due to the linearity of the equation with respect to the CO_2 concentration. It also means that the CO_2 concentration is sufficiently low to remain a passive scalar without buoyancy effect. When dimensionalized by Ω, the time τ is very well fitted by a law scaling as $E^{-1/2}$. From (9), it means that the layer of the diffusive thickness δ at the bottom scales as $E^{1/2}R$ (using the fact that $H/R = 2$ and that $S = \nu/\kappa$). It suggests that the diffusive layer has the same thickness as the Ekman boundary layer.

From these measurements, it is possible to calculate the initial flux at the membrane $\Phi = \pi R^2 \kappa k_H P_0/\delta$ since δ is known from (9). The flux is plotted as a function of the Ekman number in Fig. 4(b). It also scales as $E^{-1/2}$, in agreement with the assumption $\delta \sim E^{1/2}R$. It seems that the flux at the membrane is only governed by the Ekman number. It is weakly influenced by the nature of the bulk flow. Indeed, there is no difference between the laminar regime (for $E > 4\times10^{-4}$ at this tilt angle) and the unstable regime (for $E < 4\times10^{-4}$). This is very different from the homogenization of a scalar introduced in the bulk: the transition to turbulence decreases the bulk mixing time by a factor ten[4]. This is probably due to the fact that the amplitude of the flow and of the Ekman pumping does not increase in the presence of the triadic resonance.

D. Dependence on the tilt angle

The time τ is plotted as a function of the tilt angle in Fig. 5(a). It only decreases by a factor 2 when the tilt angle increases by a factor 20. Assuming in the model that the thickness of the diffusive layer δ is exactly equal to the thickness of the Ekman boundary layer $E^{1/2}R$ would lead to a time τ independent of the tilt angle. Here, the weak dependence on the tilt angle suggests as before that the bulk flow has only a weak influence on the flux at the membrane. Experimentally, the time τ is well fitted by a law scaling as $\alpha^{-1/4}$ corresponding to a flux scaling as $\alpha^{1/4}$. This scaling exponent is slightly smaller than the exponent for the characteristic velocity in the bulk of the cylinder. Indeed, these experiments have been done in the turbulent regime where the amplitude of the forced Kelvin mode scales as $\alpha^{1/2}$, as shown by Lagrange et al.[13].

From all these measurements, it is possible to give universal laws for the characteristic time

$$\tau = \frac{1.65S}{E^{1/2}\alpha^{1/4}}\Omega^{-1} \qquad (16)$$

and for the thickness of the bottom diffusive layer

$$\delta = \frac{0.83E^{1/2}}{\alpha^{1/4}}R \qquad (17)$$

for this aspect ratio $H/R = 2$. The flux is thus equal to

$$\Phi = \frac{3.81R\kappa}{E^{1/2}\alpha^{1/4}}(k_H P_0 - c) \qquad (18)$$

where c is the CO_2 concentration in the bulk, P_0 is the CO_2 partial pressure below the membrane and α is the tilt angle

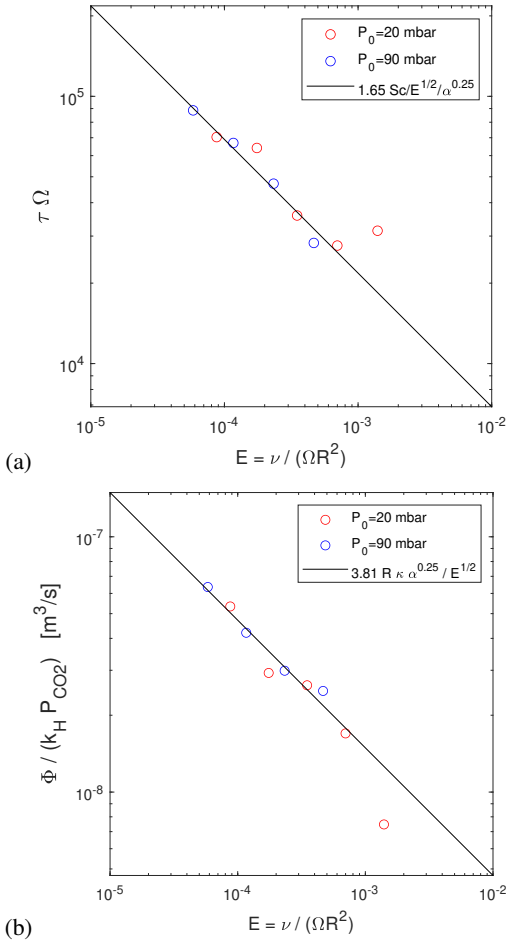


FIG. 4. (a) Characteristic diffusion time through the membrane $\tau = H\delta/\kappa$ as a function of the Ekman number for a diffusive bottom layer of thickness δ. (b) Initial CO_2 flux Φ through the membrane as given by (3) with δ measured from τ. Symbols correspond to experimental measurements obtained by fitting the model to the increase of the partial pressure of CO_2. The solid lines correspond to scalings laws obtained for Ekman layers given by (16) in (a) and (18) in (b). $\alpha = 3°$, $H/R = 2$.

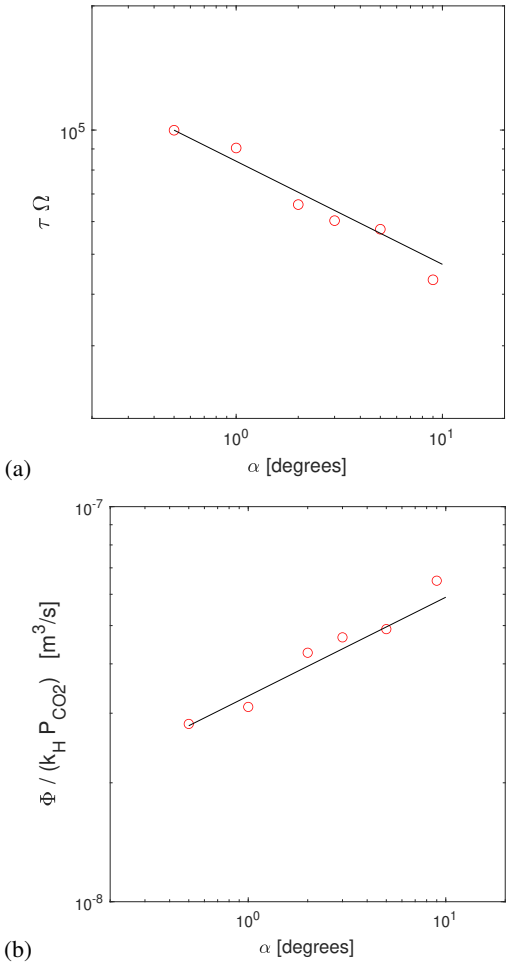


FIG. 5. (a) Characteristic diffusion time through the membrane $\tau = H\delta/\kappa$ as a function of the tilt angle for a diffusive bottom layer of thickness δ. (b) CO_2 flux Φ through the membrane as given by (3) with δ measured from τ. Symbols correspond to experimental measurements obtained by fitting the model to the increase of the partial pressure of CO_2. The solid lines correspond to an empirical law (16) scaling as $\alpha^{-1/4}$ in (a) and an empirical law (18) scaling as $\alpha^{1/4}$ in (b). $E = 1.2\times10^{-4}$, $H/R = 2$.

in degrees. These laws have been measured only for an aspect ratio $H/R = 2$. The same scaling laws are expected for other resonant heights although the numerical coefficients will probably be different. Outside the resonances, it is not clear how the flux depends on H. Indeed, the amplitude of the flow strongly depends on H. But the flux seems to be weakly dependent on the amplitude of the flow, which might weaken the dependence of the flux on H.

Finally, it should be noted that these measurements have been done for the diffusion of CO_2 with $S = 550$. We have chosen to write the numerical coefficient for τ as $1.65S$ rather than 908 such that the law for δ is independent of S. Indeed, it is highly probable that the thickness of the diffusive layer is equal to the thickness of the Ekman layer, which is independent of S. However, it is possible that the numerical coefficients might still depend weakly on the Schmidt number.

IV. CONCLUSION

In this paper, we have measured the flux of CO_2 diffusing inside a tilted rotating cylinder. The height of fluid is chosen equal to 2 radii in order for the first Kelvin mode to be resonant. The flux is inferred from the temporal evolution of the partial pressure of CO_2 above the free surface. At a constant tilt angle, the flux is proportional to $E^{-1/2}$. This is in agreement with the presence of Ekman layers of thickness proportional to $E^{1/2}$ where the CO_2 must diffuse without advection. The flux is found to be nearly independent of the nature of the flow (laminar or turbulent). It also weakly depends on the tilt angle with a scaling as $\alpha^{1/4}$.

All these measurements have been obtained for a fixed aspect ratio and for a fixed Schmidt number. It would thus be interesting to vary these parameters in the future. The theory

should also be improved by taking into account the flow above the Ekman layer, which is known analytically in the laminar regime. However, the advection-diffusion solution in the Ekman layer will probably be difficult to solve analytically.

These measurements have also been obtained for a laminar boundary layer. Indeed the boundary layer Reynolds number $E^{-1/2}$ is always below the critical value of 150 given by Sous et al.[21]. It is possible that a new regime occurs in the case of a turbulent boundary layer with a larger flux at the membrane.

These measurements are extremely useful for the new generation of geoinspired bioreactors based on the principle of a tilted rotating cylinder. Indeed, these bioreactors require a maximum flux of CO_2 and oxygen while minimizing the shear stress. These quantitative results will allow the fine tuning of the partial pressure of oxygen and CO_2 for the upscaling and during the production process.

AUTHORS DECLARATION

The authors have no conflicts to disclose

Appendix A: Full solution to the model with diffusive layers

We present the solution to the two coupled equations (7) and (8) for the non-dimensional concentration of CO_2 in the liquid $x_{\rm liq}$ and the non-dimensional partial pressure of CO_2 $x_{\rm gas}$ above the free surface. In these equations, the parameter β is known from the experiments whereas $\tau = H\delta/\kappa$ and $\mu = \delta/\delta'$ will be fitted to get δ and δ'

Defining a new variable $X = (x_{\rm liq}, x_{\rm gas})$ and a non-dimensional time $T = t/\tau$, the two differential equations can be combined in a single differential equation

$$\frac{dX}{dT} = MX + \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad \text{with } M = \begin{pmatrix} -(1+\mu) & \mu \\ \beta\mu & -\beta\mu \end{pmatrix} \tag{A1}$$

The eigen values of the matrix M are equal to

$$\lambda_\pm = -\frac{1+\mu+\beta\mu}{2} \pm \sqrt{\frac{(1+\mu+\beta\mu)^2}{4} - \beta\mu}. \tag{A2}$$

The corresponding eigen vectors are equal to

$$X_\pm = \left(1 + \frac{\lambda_\pm}{\beta\mu}, 1\right). \tag{A3}$$

Assuming that the solution is of the form

$$X(t) = A_+(T)X_+ e^{\lambda_+ T} + A_-(T)X_- e^{\lambda_- T} \tag{A4}$$

and introducing this form into (A1) leads to a linear system for A'_+ and A'_- which can be solved as

$$A'_+(T) = \frac{\beta\mu}{\lambda_+ - \lambda_-} e^{-\lambda_+ T} \;\; ; \;\; A'_-(T) = \frac{-\beta\mu}{\lambda_+ - \lambda_-} e^{-\lambda_- T} \tag{A5}$$

Integrating and introducing into (A4) leads to the general solution

$$x_{\rm gas} = \frac{\beta\mu}{\lambda_+ - \lambda_-}\left[\frac{-1}{\lambda_+} + B_+ e^{\lambda_+ T} + \frac{1}{\lambda_-} + B_- e^{\lambda_- T}\right] \tag{A6}$$

$$x_{\rm liq} = \frac{\beta\mu}{\lambda_+ - \lambda_-}\left[(1+\frac{\lambda_+}{\beta\mu})(\frac{-1}{\lambda_+} + B_+ e^{\lambda_+ T}) + (1+\frac{\lambda_-}{\beta\mu})(\frac{1}{\lambda_-} + B_- e^{\lambda_- T})\right] \tag{A7}$$

where B_+ and B_- are two constants to be determined with the initial conditions. For $x_{\rm liq} = x_{\rm gas} = 0$ at $t = 0$, the constants should be $B_+ = 1/\lambda_+$ and $B_- = -1/\lambda_-$ such that the concentration in the gas is finally given by

$$x_{\rm gas} = \frac{\beta\mu}{\lambda_+ - \lambda_-}\left[\frac{e^{T\lambda_+} - 1}{\lambda_+} + \frac{1 - e^{T\lambda_-}}{\lambda_-}\right] \tag{A8}$$

In the limit of large β, the eigen values are equivalent to $\lambda_+ = -1$ and $\lambda_- = -\beta\mu$ such that this solution is similar to the approximate solution (13) at first order in β^{-1}.

If the liquid is initially saturated ($x_{\rm liq} = 1$) and the gas has no CO_2 ($x_{\rm gas} = 0$), the constants should be $B_+ = 1 + 1/\lambda_+$ and $B_- = -1 - 1/\lambda_-$ such that the solution is given by

$$x_{\rm gas} = \frac{\beta\mu}{\lambda_+ - \lambda_-}\left[\frac{e^{T\lambda_+} - 1}{\lambda_+} + \frac{1 - e^{T\lambda_-}}{\lambda_-} + (e^{T\lambda_+} - e^{T\lambda_-})\right] \tag{A9}$$

In the limit of large β, this solution is approximately equal to $1 - \exp(-\beta\mu T)$ at first order in β^{-1}.

[1] F. Garcia-Ochoa and E. Gomez, "Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview," Biotechnology advances **27**, 153–176 (2009).

[2] R. Cherry and E. Papoutsakis, "Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors," Bioprocess Engineering **1**, 29–41 (1986).

[3] P. M. Doran, "Design of mixing systems for plant cell suspensions in stirred reactors," Biotechnology progress **15**, 319–335 (1999).

[4] P. Meunier, "Geoinspired soft mixers," J. Fluid Mech. **903** (2020).

[5] W. Xu and U. Harlander, "Inertial mode interactions in a rotating tilted cylindrical annulus with free surface," Phys. Rev. Fluids **5**, 094801 (2020).

[6] R. Thompson, "Diurnal tides and shear instabilities in a rotating cylinder," J. Fluid Mech. **40**, 737–751 (1970).

[7] A. McEwan, "Inertial oscillations in a rotating fluid cylinder," J. Fluid Mech. **40**, 603–640 (1970).

[8] L. Kelvin, "Vibrations of a columnar vortex," Phil. Mag. **10**, 155–168 (1880).

[9] R. F. Gans, "On the precession of a resonant cylinder," J. Fluid Mech. **476**, 865–872 (1970).

[10] P. Meunier, C. Eloy, R. Lagrange, and F. Nadal, "A rotating fluid cylinder subject to weak precession," J. Fluid Mech. **599**, 405–440 (2008).

[11] R. R. Kerswell, "Secondary instabilities in rapidly rotating fluids: inertial wave breakdown," J. Fluid Mech. **382**, 283–306 (1999).

[12] R. Lagrange, C. Eloy, F. Nadal, and P. Meunier, "Instability of a fluid inside a precessing cylinder," Phys. Fluids **20(8)**, 081701 (2008).

[13] R. Lagrange, P. Meunier, F. Nadal, and C. Eloy, "Precessional instability of a fluid cylinder," J. Fluid Mech. **666**, 104–145 (2011).

[14] T. Albrecht, H. Blackburn, J. Lopez, R. Manasseh, and P. Meunier, "Triadic resonances in precessing rapidly rotating cylinder flows," J. Fluid Mech. **778** (2015).

[15] A. Giesecke, T. Albrecht, T. Gundrum, J. Herault, and F. Stefani, "Triadic resonances in nonlinear simulations of a fluid flow in a precessing cylinder," New Journal of Physics **17**, 113044 (2015).

[16] T. Albrecht, H. M. Blackburn, J. M. Lopez, R. Manasseh, and P. Meunier, "On triadic resonance as an instability mechanism in precessing cylinder flow," J. Fluid Mech. **841** (2018).

[17] J. M. Lopez and F. Marques, "Rapidly rotating precessing cylinder flows: forced triadic resonances," J. Fluid Mech. **839**, 239–270 (2018).

[18] S. Goto, M. Shimizu, and G. Kawahara, "Turbulent mixing in a precessing sphere," Physics of Fluids **26**, 115106 (2014).

[19] D. Watanabe and S. Goto, "Simple bladeless mixer with liquid–gas interface," Flow **2**, E28 (2022).

[20]V. Kozlov and D. Polezhaev, "Enhanced mass transfer in air oscillating in a channel with periodically varying radius," International Journal of Heat and Mass Transfer **167**, 120818 (2021).
[21]D. Sous, J. Sommeria, and D. Boyer, "Friction law and turbulent properties in a laboratory Ekman boundary layer," Phys. Fluids **25**, 046602 (2013).

Chapitre 4 : Résultats préliminaires sur l'usage du Dinophyt avec tampon carbonate

Le premier dispositif expérimental pour la culture d'*Amphidinium carterae* est composé d'une cuve à tampon carbonate placée sous une membrane microporeuse. Ce tampon carbonate produit du CO_2 qui diffuse lentement à travers la membrane dans la culture comme le montre la figure 2.9. Ce système (figure 2.6) est relativement simple et peu coûteux à mettre en place comparé à un système pourvu de bouteilles de gaz et d'un système de contrôle des paramètres de la culture (pH, CO_2 dissous, température, lumière). Il ne permet pas de contrôler l'apport de CO_2 selon les besoins de la culture. Nous avons utilisé ce système pour réaliser des expériences exploratoires en vue de produire de la biomasse de dinoflagellés à haut rendement (table 4.1).

Paramètre en variable	**Concentration cellulaire**	**NP**	**CO2**
N° figure	4.1	4.3	4.4
Vitesse angulaire (rpm)	60	60	30
Pourcentage de CO2 (%)	5	5	0.5 / 1 / 5 / 10
Salinité (g/L)	35	35	35
Concentration du milieu (ml)	2/1000	2/1000	2/1000
Volume des cuves (L)	1	1	3
Angle d'inclinaison	3°	3°	3°
Intensité lumineuse (PAR) / (heures D/N)	150 / (24/0)	150 / (24/0)	150 / (24/0)
Taux de renouvellement du milieu (%)	0	10	20

Table 4.1 : Présentation des paramètres d'expériences réalisées avec tampon carbonate.

4.1. Consommation des NP par la culture

Dans un premier temps, le Dinophyt est composé d'une cuve à tampon carbonate située sous la membrane microporeuse. La figure 4.1 décrit la croissance cellulaire dans un Dinophyt de 1L en rotation à 60 rpm et un tampon carbonate produisant 5% de pourcentage molaire de CO_2 dans l'air. Dans cette première expérience, nous ne renouvelons pas le milieu afin de déterminer les limites du système en termes de croissance cellulaire sans la moindre perturbation. La culture est démarrée avec une densité cellulaire de $5{,}65 \times 10^5$ cell/ml et croit jusqu'à atteindre $4{,}23 \times 10^6$ cell/ml au 9ème jour de culture. Le temps de doublement (d) correspond au nombre de jours nécessaires à un doublement du nombre de cellules. Le temps de doublement le plus court observé est d = 1,76j, lors du 2nd jour de culture.

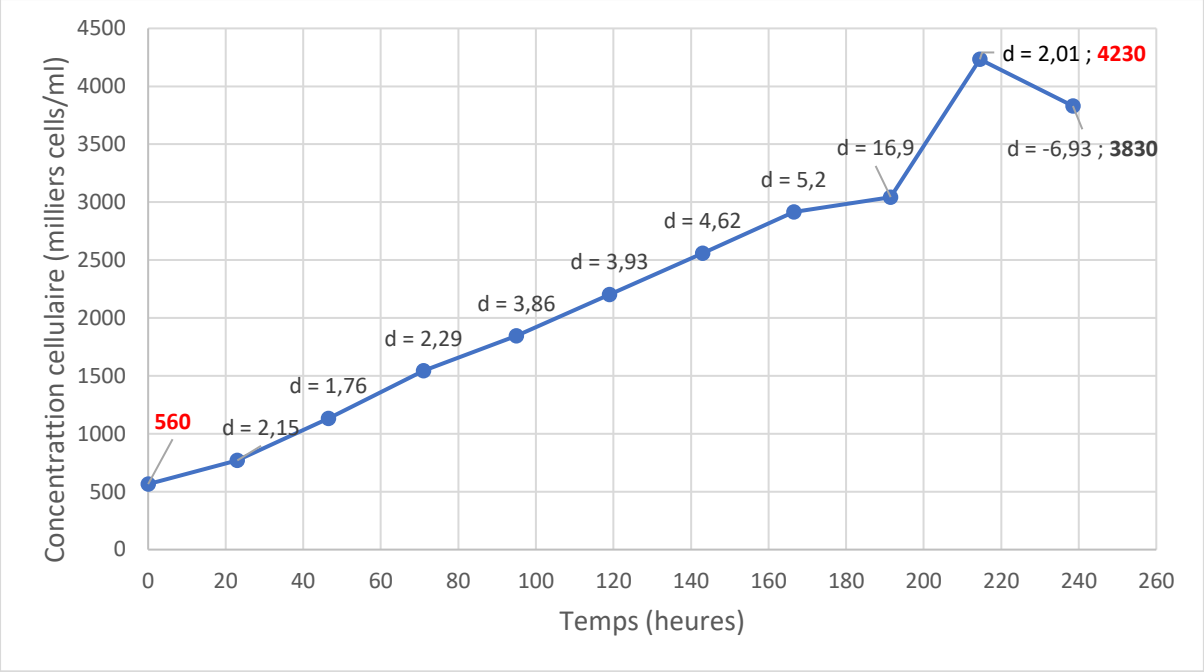


Figure 4.1 : Croissance et temps de division cellulaire (d en jour) d'A. carterae en Dinophyt 1L avec membrane microporeuse et tampon carbonate 5%, sans renouvellement du milieu de culture et un éclairage continu 24L/0N. Le temps de doublement d est indiqué en j.

Lors de la même expérience, nous dosons quotidiennement les nitrates (NO_3) pour mesurer l'épuisement du milieu de culture (figure 4.2). Nous observons une consommation des nitrates de jour en jour et un épuisement après 9 jours. Au 10eme jour, la culture cesse de croître et une baisse de la densité cellulaire apparaît de $4{,}2x10^6$ à $3{,}8x10^6$ cell/ml (figure 4.1). A plus forte densité cellulaire, le milieu doit s'épuiser plus rapidement et donc nécessiter un renouvellement fréquent. Par ailleurs, plusieurs travaux de Molina-miras et al. (2018, 2022) et d'autres articles (Fuentes et al., 2015 ; Flynn et al., 2008) montrent également que les nitrates et phosphates (PO_4^{3-}) présents dans le milieu sont consommés en quelques jours à peine. Les mêmes travaux montrent également une corrélation entre la croissance cellulaire et la concentration en NP dans le milieu.

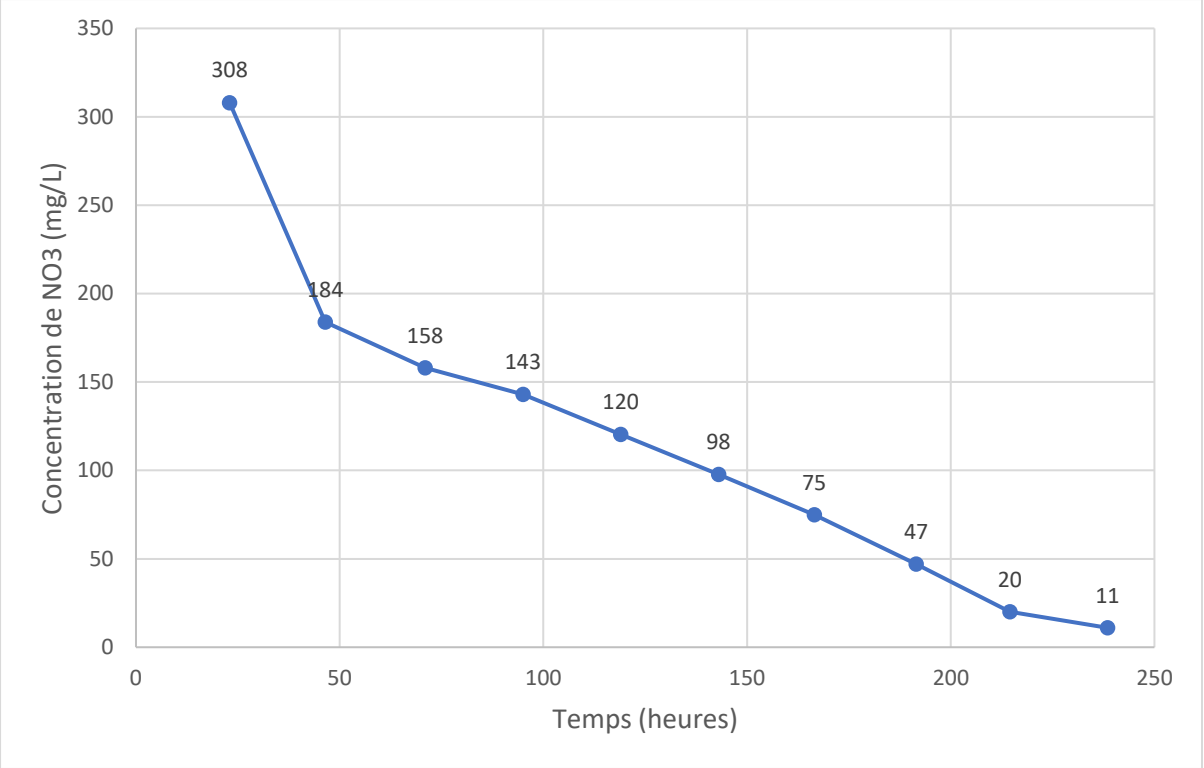


Figure 4.2 : Concentration de nitrates dans le Dinophyt 1L lors d'une culture d'A carterae pendant 10 jours sans renouvellement du milieu.

On essaye ensuite dans deux Dinophyts 1L de comparer l'effet du renouvellement de milieu avec ou sans ajout d'azote et de phosphore (NP, figure 4.3). La culture avec ajout de NP montre une meilleure croissance cellulaire atteinte, avec $2x10^6$ cell/ml en 145 heures contre 220 heures pour la même densité cellulaire, sans ajout de NP.

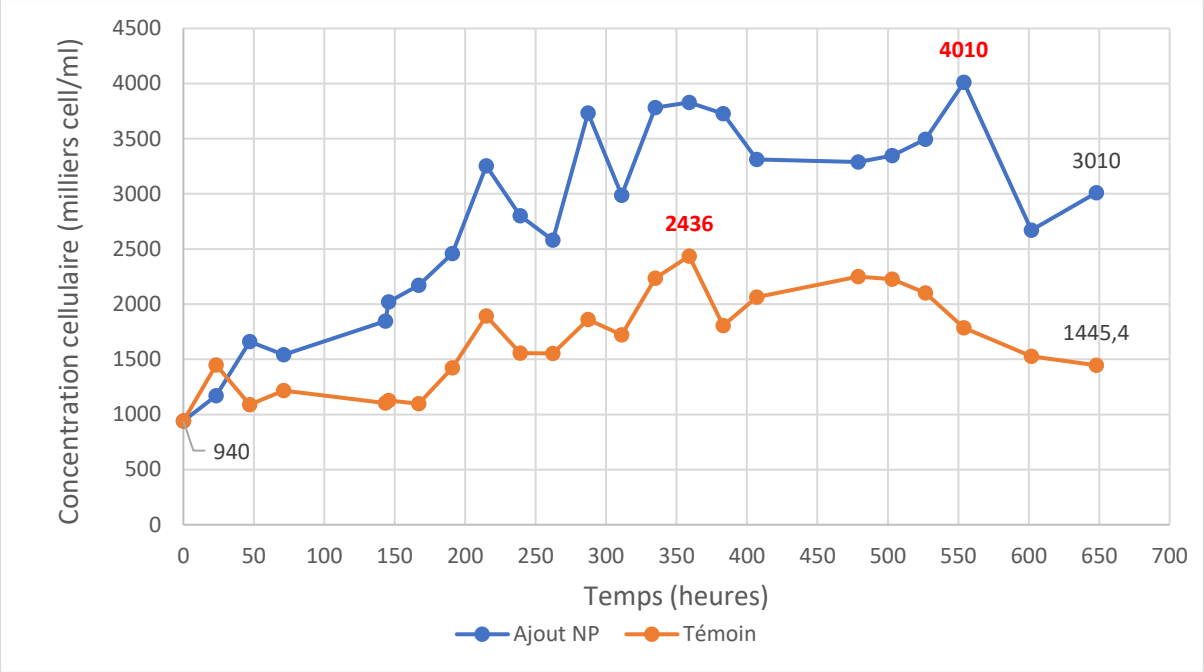


Figure.4.3 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt 1L avec membrane microporeuse et tampon carbonate 5%, avec 10% de renouvellement quotidien du milieu de culture, avec éclairage continu 24L/0N où l'on compare la présence/absence d'ajout de NP quotidien).

Nous obtenons une densité cellulaire maximale de $4x10^6$ cell/ml avec NP contre $2,4x10^6$ de cell/ml sans ajout de NP. Il semble que l'ajout de NP ait un effet positif sur la croissance cellulaire à partir d'une densité cellulaire de $1,5x10^6$ cell/ml et 48 heures de culture. Cette observation est confirmée par les travaux et échanges avec la société de bio production Immunrise sur *A. carterae*.

4.2. Comparaison de différents pourcentages molaires de CO_2

Dans la figure 4.4, nous observons la croissance cellulaire dans quatre Dinophyts de 3L, en rotation à 30 rpm. Chaque Dinophyt est composé d'un tampon carbonate produisant des pourcentages molaires de CO_2 de 0,5%, 1%, 5% et 10%. Les cultures pour les 4 conditions de pourcentage de CO_2 voient leur densité cellulaire augmenter au même rythme de $4x10^4$ cell/ml à plus de $2x10^5$ cell/ml. Nous n'observons pas de différence sur la croissance cellulaire pendant les 4 premiers jours de cette expérience. Pour la culture avec 10 % de CO_2, la courbe de croissance se différencie des trois autres à partir du 5ème jour. La culture avec un pourcentage de CO_2 de 5% montre une croissance qui stagne du 4eme au 6eme jour avant de retrouver une croissance similaire à la culture ayant 10% de CO_2. Nous observons un retard de 24 heures dans la croissance pour la culture à 5% vis-à-vis de la culture à 10% de CO_2.

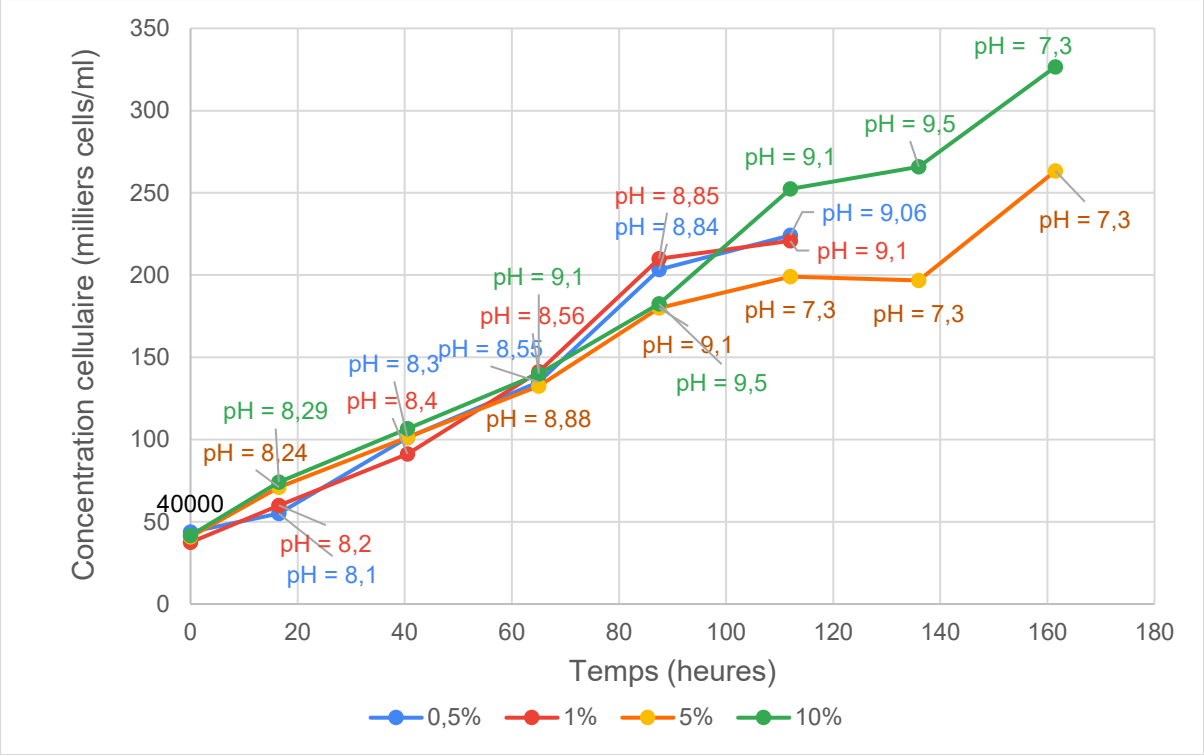


Figure 4.4 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt 3L avec membrane microporeuse avec 20% de renouvellement quotidien du milieu de culture, avec un éclairage continu 24L/0N où l'on compare différents tampons carbonate produisant un pourcentage de CO_2 allant de 0,5 à 10%.

Dans les premiers jours, nous observons une évolution du pH qui augmente de 8,2 à 9,1 dans les différentes conditions et cela sans possibilité de contrôler cette évolution. Nous observons à nouveau une variation du pH des cultures du jour 4 au jour 5, de 9,1 à 7,3 pour la condition 5% de CO_2. Puis le même phénomène s'observe pour la condition 10% de CO_2 du jour 6 au jour 7. Le pH semble se stabiliser dans les derniers jours de l'expérience pour les conditions 5 et 10% de CO_2, autour de 7,3 contrairement aux cultures à 0.5 et 1% de CO_2 où le pH monte au-delà de 9. Malgré cette augmentation du pH au-delà de 9, il ne semble pas que cela affecte négativement la croissance des cultures.

Nous pensons qu'à densité cellulaire inférieure à $5x10^5$ cell/ml, le pourcentage molaire de CO_2 du tampon carbonate n'a aucun effet sur la culture et n'est donc pas un facteur limitant dans ce cas. Li et al. (2020) montre dans son étude que la concentration de CO_2 dans le milieu n'induit pas d'effet sur la croissance cellulaire s'il n'est pas combiné à d'autres facteurs tels que la température et l'intensité lumineuse.

Nous prolongeons l'expérience avec les tampons carbonates à 5 et 10% de CO_2 dans des Dinophyts de 3L pour voir à partir de quelle densité cellulaire, le pourcentage de CO_2 devient un facteur important. A cette fin, nous démarrons les cultures à une concentration de $5,9x10^5$ cell/ml. Nous observons, à la figure 4.5 que les cultures dans les deux conditions atteignent la concentration de $2x10^6$ cell/ml en même temps, à 162 heures de culture (6 jours). Ensuite une stagnation de la densité cellulaire est observée dans les différentes conditions. La concentration maximale atteinte est respectivement de 2,28 et $2,22x10^6$ de cell/ml pour les conditions de tampon 5% et 10% au bout de 8 et 9 jours de culture. Le pH varie peu de 7,02 à 7,27 dans les deux conditions. Avec l'erreur de mesure prise en compte, ces variations ne sont

pas assez marquées pour être significatives. Toutefois, le système ne permet pas d'obtenir plus de données sur le pH ni un suivi régulier quotidien pour observer des variations journalières.

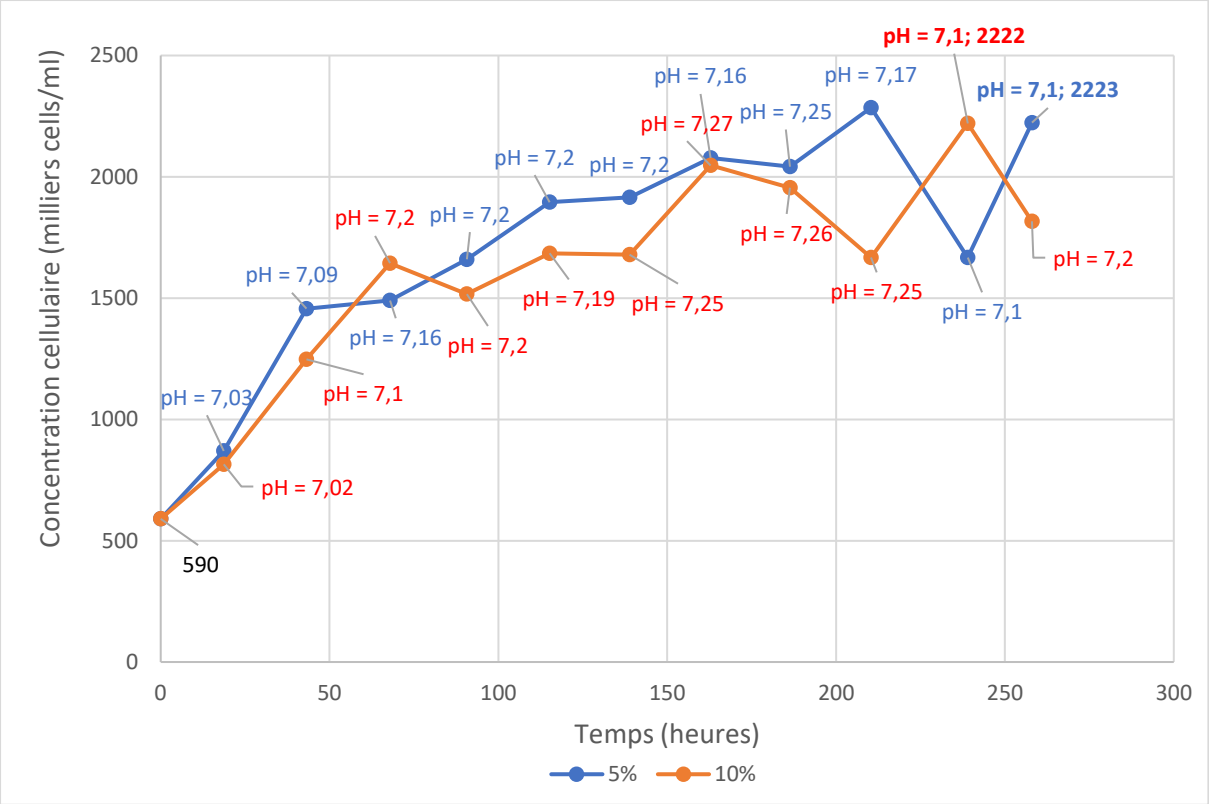


Figure 4.5 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt 3L avec membrane microporeuse avec 10% de renouvellement quotidien du milieu de culture, un éclairage continu 24L/0N où l'on compare des tampons carbonate produisant un pourcentage de CO_2 de 5% et 10%.

Au bout de 10 jours d'expérience, il ne semble pas que les pourcentages de CO_2 de 5 et 10% aient un effet différent sur les cultures. Malgré le renouvellement quotidien du milieu, nous remarquons que les cultures n'évoluent plus après 6 jours et que l'on n'atteint pas la densité de $4x10^6$ cell/ml comme en Dinophyt 1L (figure 4.3). Il semble que nous soyons arrivés en limite du système où plus de contrôle sur les paramètres de la culture sont nécessaires. Le système de Dinophyt avec un tampon carbonate est efficace pour produire de la biomasse algale avec une concentration cellulaire dépassant les $4x10^6$ cell/ml en 10 jours de culture. Cette concentration cellulaire est comparable à la production maximale obtenue par d'autres équipes comme Fuentes-Grünewald et al. (2016) avec $4,4x10^6$ cell/ml ; Molina-Miras et al. (2018) avec $2,19x10^6$ cell/ml. Toutefois, nous sommes limités à comparer deux cuves en parallèle et les comparaisons temporelles ne sont pas possibles du fait de la diffusion non contrôlable du CO_2 produit par le tampon carbonate. Le pH qui est un paramètre important pour la culture de *A. carterae* n'est pas contrôlable dans ce système. Celui-ci est rendu inadapté pour des perspectives de contrôle des cultures à des fins de production industrielle. Il faut donc améliorer le Dinophyt, remplacer le tampon carbonate par un système permettant de contrôler le flux de CO_2.

Chapitre 5 : Une nouvelle génération de Dinophyt

Pour cette nouvelle génération de Dinophyt V2, chaque cuve est mise en rotation à l'aide d'un moteur dédié et piloté par ordinateur. Ceci facilite le contrôle de la rotation de chaque Dinophyt par rapport au précédent système pourvu d'un moteur unique pour plusieurs Dinophyt. De plus, nous utilisons une version améliorée du Dinophyt où le CO_2 est apporté par une bouteille contenant du gaz sous pression.

5.1. Contrôle du pH des cultures

L'ouverture et la diffusion du CO_2 vers le Dinophyt sont contrôlées par une sonde pH (figure 5.1). Dans un réservoir en amont des Dinophyts, un mélange gazeux enrichi en CO_2 est préparé à 5% de CO_2 et homogénéisé à l'aide d'une pompe à air (débit 12 litres/heure) et d'une sonde CO_2 (ExplorIR®-W CO2 Sensor de chez GasSensingSolutions).

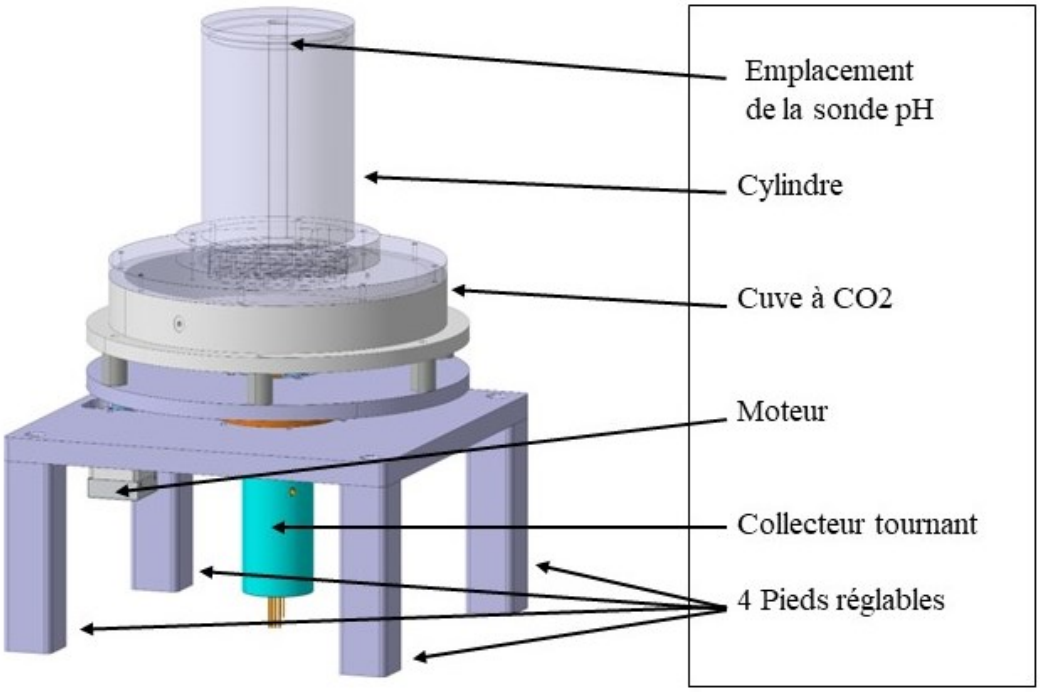


Figure 5.1 : Schéma du Dinophyt V2 avec CO_2 gazeux apporté à l'aide d'un collecteur tournant sous le contrôle d'une sonde pH.

Chaque sonde pH dans les Dinophyts contrôle l'activation d'une électrovanne pour apporter du CO_2 à la culture d'*A. carterae* qui en a besoin. Nous contrôlons ainsi les variations de pH dans chaque culture à l'aide d'une valeur consigne (8,1) qui active l'apport de CO_2 depuis le réservoir (figure 2.7). Cette valeur consigne de pH a été choisie à partir des travaux de Lee et al. (2003) montrant l'optimum de pH pour la culture d'*A. carterae*.

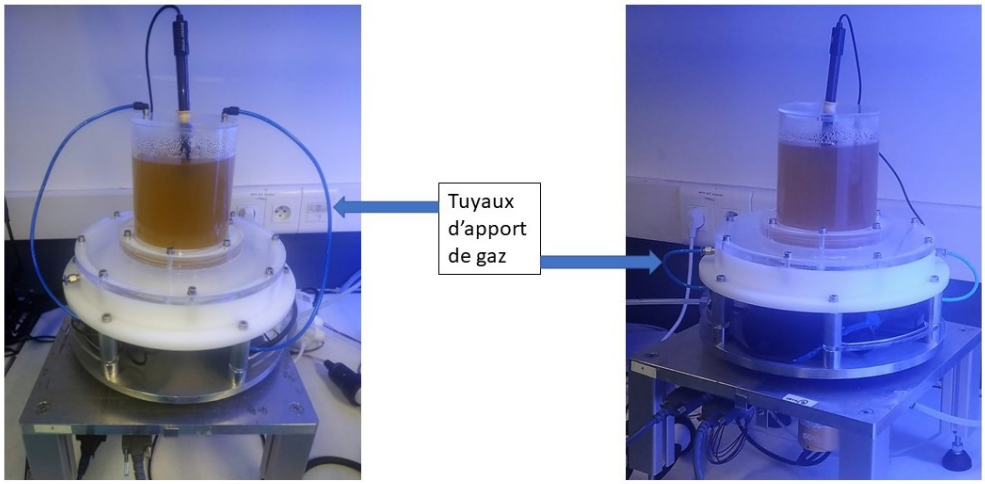


Figure 5.2 : Photos des Dinophyts V2, selon l'apport de CO_2 par la surface libre (A) ou par la membrane microporeuse (B).

Des essais préliminaires de la régulation du pH, avec l'apport de CO_2 par le collecteur tournant, ont été réalisés à la figure 5.3. Lors d'une injection de CO_2 apporté par la membrane microporeuse, nous observons que le pH descend jusqu'à 7.38 contre 7,74 pour l'autre Dinophyt (surface libre). Ce delta de pH de 0.36 entre les deux conditions est significativement différent. Cette différence vient du temps d'injection qui est de 20 minutes pour la condition membrane contre 18 minutes pour la condition surface libre. De plus, dans la configuration membrane, le volume sous la membrane (V=1334 cm3), où est stocké le CO_2, est supérieur à celui dans la cuve, au-dessus de l'eau (V=286 cm3). Ceci crée un réservoir à CO_2 qui est plus important pour la condition membrane que la condition surface libre, ce qui a comme effet de faire baisser le pH à une valeur plus basse dans le Dinophyt avec membrane.

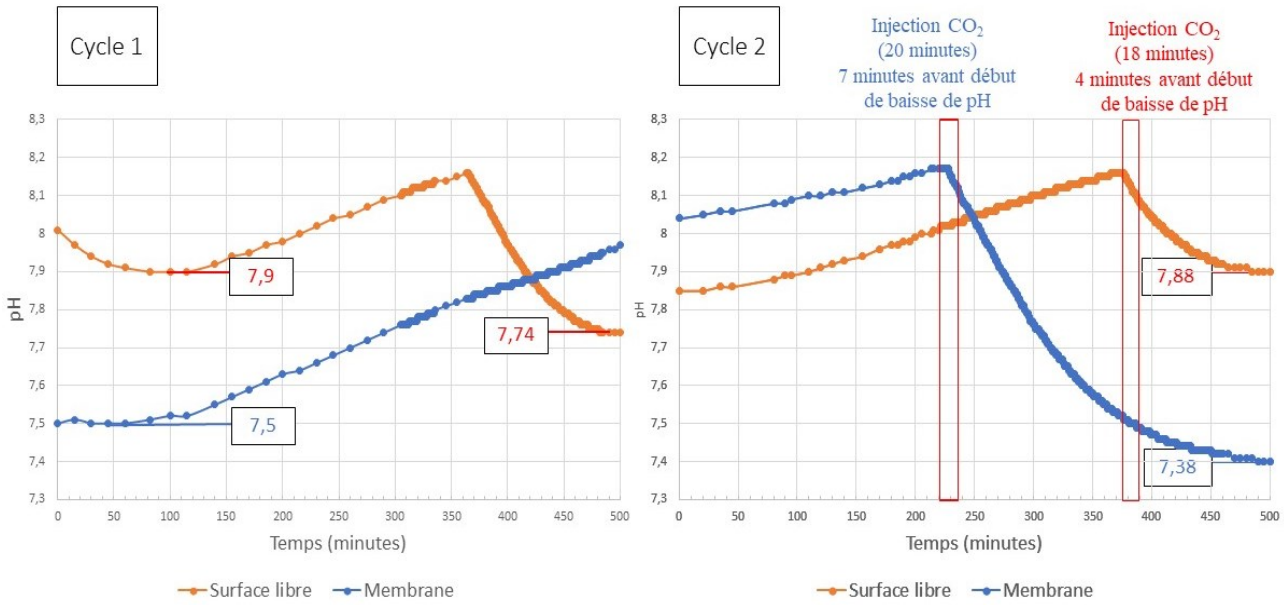
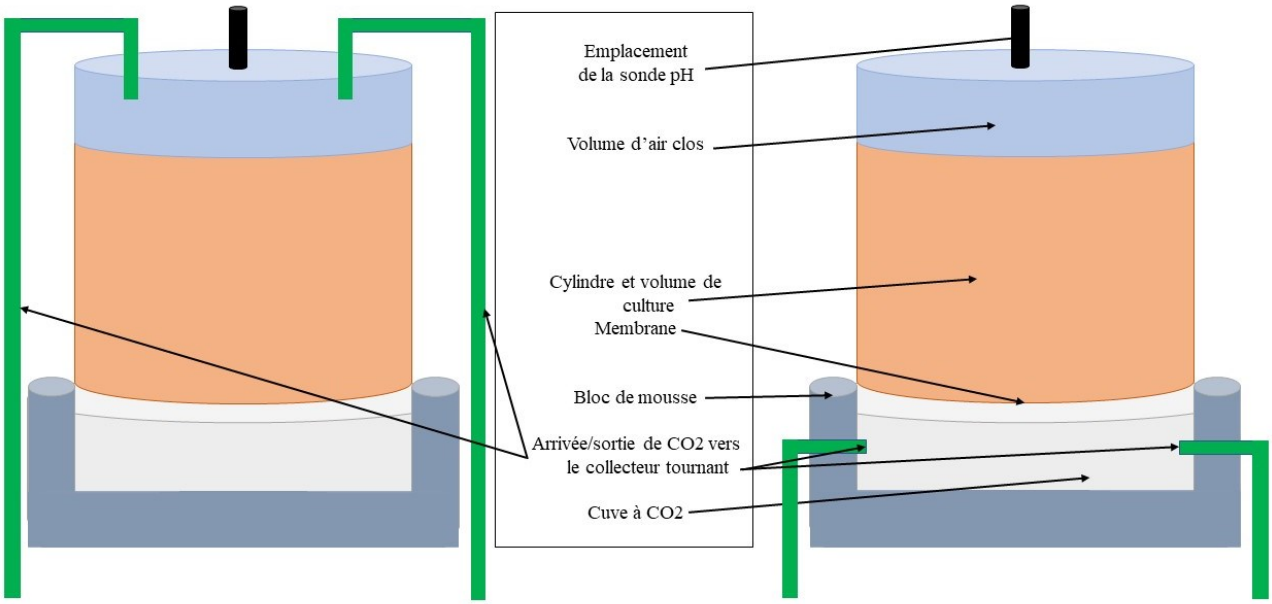


Figure 5.3 : Variations de pH selon l'apport de CO_2 par la surface libre ou par la membrane microporeuse.

Nous nous posons plusieurs questions, à savoir, est-ce que ce volume sous-membrane et cet effet réservoir à CO_2 sont bénéfiques ou délétères pour la culture ? Ensuite, dans des conditions comparables d'apport de CO_2, lequel des Dinophyts celui avec la membrane microporeuse ou celui avec la surface libre permet une meilleure croissance ?

Avant de comparer l'effet de l'apport de CO_2 gazeux par la surface libre à un apport par la membrane microporeuse, nous nous assurons d'avoir des conditions comparables dans les deux cas. Nous réduisons le volume sous la membrane microporeuse à l'aide de mousse isotherme et de colle époxy pour qu'il soit égal à celui figurant au-dessus de la surface libre dans chaque Dinophyt.



(A) (B)

Figure 5.4 : Schémas de deux Dinophyts l'un avec apport de CO_2 par la surface libre (A), l'autre avec apport de CO_2 par la membrane (B), pour lesquels les volumes de stockage du CO_2, aux abords de la culture, ont été égalisés.

Ensuite nous mettons deux Dinophyts V2 en culture avec des dinoflagellés, l'un avec apport de CO_2 par la surface libre et l'autre avec apport de CO_2 par la membrane comme indiqué à la figure 5.4. Nous observons après un jour de culture que les fluctuations de pH sont de 0,16 et 0,26 pour, respectivement, les conditions « surface libre » et « membrane » (figure 5.5). Les valeurs minimales de pH dans les deux systèmes sont respectivement de 8,04 et 7,91 pour les conditions surface libre et membrane. Ces valeurs sont supérieures à celles observées dans les réacteurs sans comblement du volume sous membrane par la mousse isotherme (figure 5.3). Le delta de 0.13 unité pH entre les deux conditions est considéré comme non significatif compte tenu de la précision de mesure et que les valeurs sont du même ordre de grandeur.

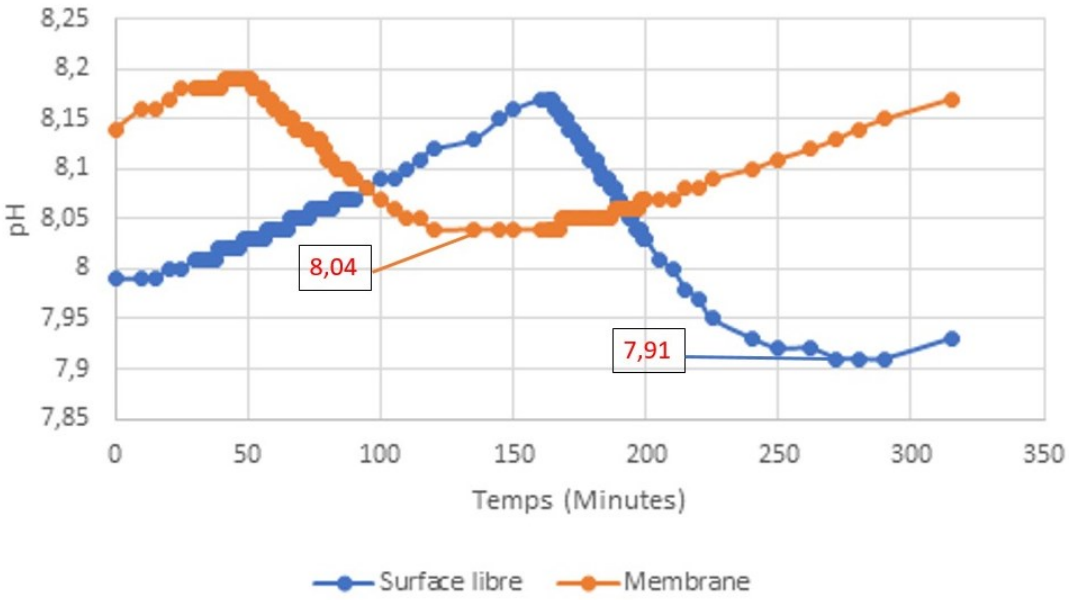


Figure 5.5 : Variations de pH selon qu'on apporte le CO_2 par la surface libre ou par la membrane microporeuse avec mousse égalisant les volumes de gaz disponibles pour les deux dispositifs.

Pour les expériences suivantes (table 5.1)., nous comparons des systèmes dont les volumes de stockage du CO_2 sont égaux comme dans la figure 5.4.

Paramètre en variable	Surface libre / Membrane
N° figure	5.6
Vitesse angulaire (rpm)	45
Pourcentage de CO2 (%)	5
Consigne pH	8,1
Salinité (g/L)	35
Concentration du milieu (ml)	2/1000
Volume des cuves (L)	1
Angle d'inclinaison	3°
Intensité lumineuse (PAR) / (heures D/N)	100 à 150 / (16/8)
Taux de renouvellement du milieu (%)	10

Table 5.1 : Présentation des paramètres d'expériences comparant deux apports différents de CO2.

5.2. Comparaison de la croissance cellulaire pour deux apports différents de CO_2

Lors de la mise en culture d'*A. carterae* dans deux Dinophyts, l'un alimenté en CO_2 à travers une membrane microporeuse (MM) située sous la cuve et l'autre alimenté en CO_2 apporté par le haut de la cuve et la surface libre (SL) du milieu de culture, nous obtenons les résultats de croissance présentés à la figure 5.6. Nous n'observons pas de différence significative entre les deux conditions, en duplicat (n=2). Dans le cas présent, l'éclairage est réglé à 100 PAR de moyenne puis 150 PAR une fois la concentration cellulaire de $3x10^5$ cell/ml atteinte.

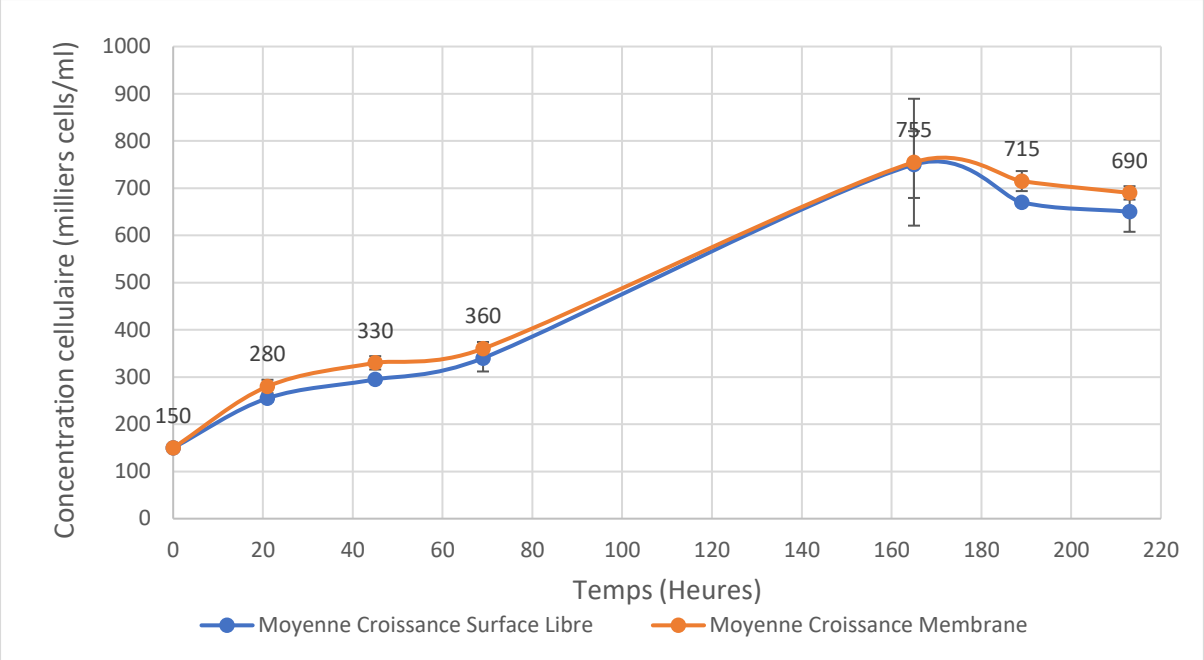


Figure 5.6 : Croissance de la culture d'A. carterae en Dinophyt avec membrane microporeuse comparée à une culture en Dinophyt où le CO_2 est apporté par la surface libre. L'éclairage 16L/8N vaut 100 PAR (J0-J3) puis 150 PAR et le taux de renouvellement du milieu est de 10%. Les barres d'erreurs sont obtenues en répétant l'expérience 3 fois pour chaque condition testée et en prenant la variance de la mesure.

Comme le montre la figure 5.7, nous obtenons dans ces conditions des temps de doublement cellulaire (d) de 0.98j et 1,14j, au bout de 24 heures de culture, dans les deux conditions. Ces temps sont inférieurs au meilleur temps d = 1,7j obtenu avec la précédente génération de Dinophyt dans le même volume (1L).

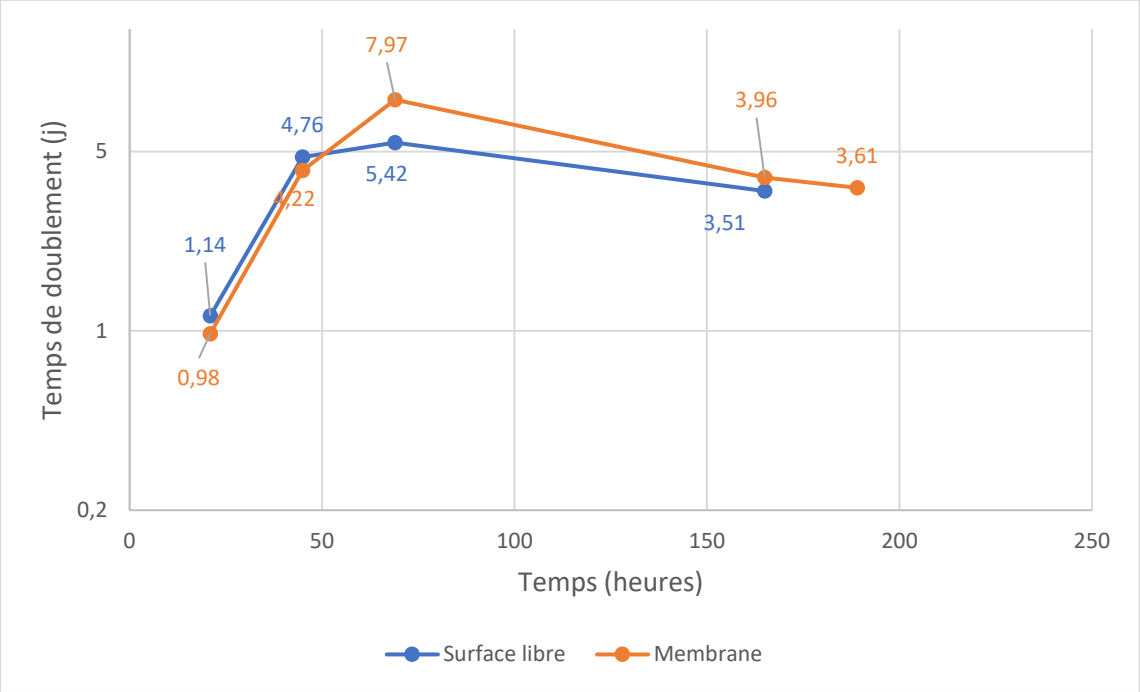


Figure 5.7 : Temps de doublement d'A. carterae en Dinophyt avec membrane comparée à une culture en Dinophyt où le CO_2 est apporté par la surface libre.

Nous pouvons affirmer qu'aucune de ces méthodes d'apport de CO_2 n'est meilleure l'une que l'autre pour la culture d'*A. carterae*. La membrane n'apporte pas d'avantage visible, à la vue de ces premiers résultats pour une densité cellulaire inférieure à $1x10^6$ cell/ml. Dans les travaux de Fan et al. (2007), la comparaison de bioréacteur à membrane avec d'autres bioréacteurs (surface libre, colonne à bulles) montre une meilleure diffusion du CO_2 et O_2 dans le système à membrane. Cette meilleure diffusion se traduit par une meilleure fixation du CO_2 par les algues. Toutefois, ces résultats ne sont pas comparables à nos résultats étant donné que notre système de bioréacteur est très différent de ce qui existe dans les autres laboratoires. Nous pouvons néanmoins comparer les rendements de production pour *A. carterae* entre les différents bioréacteurs qui existent. Dans nos conditions, sans optimiser d'autres paramètres que l'apport de CO_2, nous obtenons un temps de doublement minimum de 0,98j contre 1,27j pour Molina-Miras et al. (2018, colonne à bulle 80L) et 2,22j pour les bioréacteurs de Fuentes-Grünewald et al. (2016). Ainsi, nos conditions de culture offrent déjà un taux de production intéressante.

Après avoir observé la comparaison entre différents systèmes de Dinophyts pour l'apport de CO_2, nous allons observer l'effet de différents paramètres sur la culture de *A. carterae*.

Chapitre 6 : Optimisation de la culture dans un Dinophyt

Dans le précédent chapitre, nous avons montré que les apports de CO_2 par une membrane microporeuse ou par la surface libre n'impactaient pas différemment les cultures pour leur croissance ni pour les variations du pH du milieu de manière significative. Dans ce chapitre, nous avons cherché à optimiser la croissance de la culture *A. carterae* en utilisant la nouvelle génération de Dinophyt (table 6.1). Nous avons commencé par comparer différentes vitesses angulaires pour la mise en suspension et le mélange des cultures. Ensuite nous avons comparé l'effet de différentes valeurs consignes de pH sur les cultures. Puis nous avons utilisé différentes pressions partielles de CO_2 pour voir leurs effets sur les cultures. Enfin, nous avons testé l'effet de différentes intensités lumineuses sur la culture de *A. carterae*.

Paramètre en variable	Vitesse angulaire	pH	CO2
N° figure	6.1	6.3	6.5
Vitesse angulaire (rpm)	15 / 30 / 60	45	45
Pourcentage de CO2 (%)	5	5	5 / 10
Consigne pH	8,1	7 / 7,5 / 8	8,1
Salinité (g/L)	35	35	35
Concentration du milieu (ml)	2/1000	2/1000	2/1000
Volume des cuves (L)	1	1	1
Angle d'inclinaison	3°	3°	3°
Intensité lumineuse (PAR) / (heures D/N)	150 / (24/0)	150 / (16/8)	150 / (16/8)
Taux de renouvellement du milieu (%)	0	10	10

Table 6.1 : Présentation des paramètres d'expériences réalisées en faisant varier différents paramètres (vitesse angulaire, pH et pourcentage de CO2).

6.1. Comparaison de différentes vitesses angulaires sur la croissance cellulaire

Des Dinophyts 1L sont mis en rotation à différentes vitesses angulaires soit 15 ; 30 et 60 rpm (figure 6.1). Les cultures et milieu de culture pour *A. carterae* utilisés ont été acclimatés à la vitesse de rotation du système pendant plusieurs jours. La densité de culture a été égalisée entre toutes les cultures à $2x10^5$ cell/ml avant le lancement de l'expérience.

Sur la figure 6.1, on s'aperçoit que la croissance des cultures soumises à une vitesse de rotation de 15 rpm est inférieure à la croissance des cultures soumises aux vitesses supérieures.

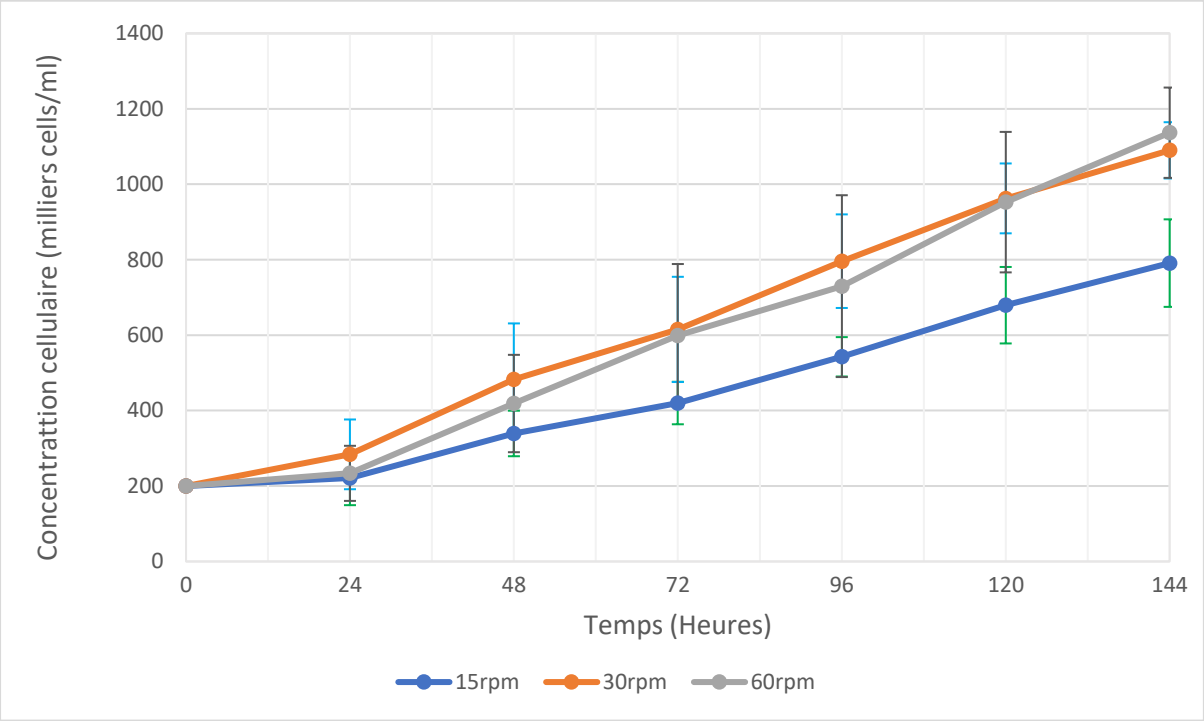


Figure 6.1 : Croissance en triplicata temporel de la culture d'A. carterae en Dinophyt 1L mis en rotation à 15 ; 30 et 60 rpm. Les barres d'erreurs sont obtenues en répétant l'expérience 3 fois pour chaque condition testée et en prenant la variance de la mesure.

En observant le temps de doublement des cultures d'*A. carterae* dans ces différentes conditions, la différence entre les conditions est peu visible comme le montre la figure 6.2. Nous observons à nouveau des temps de doublement très courts, inférieurs à 2j (au bout de 48h) pour toutes conditions comme cela avait été observé dans le chapitre précédent (figure 5.7).

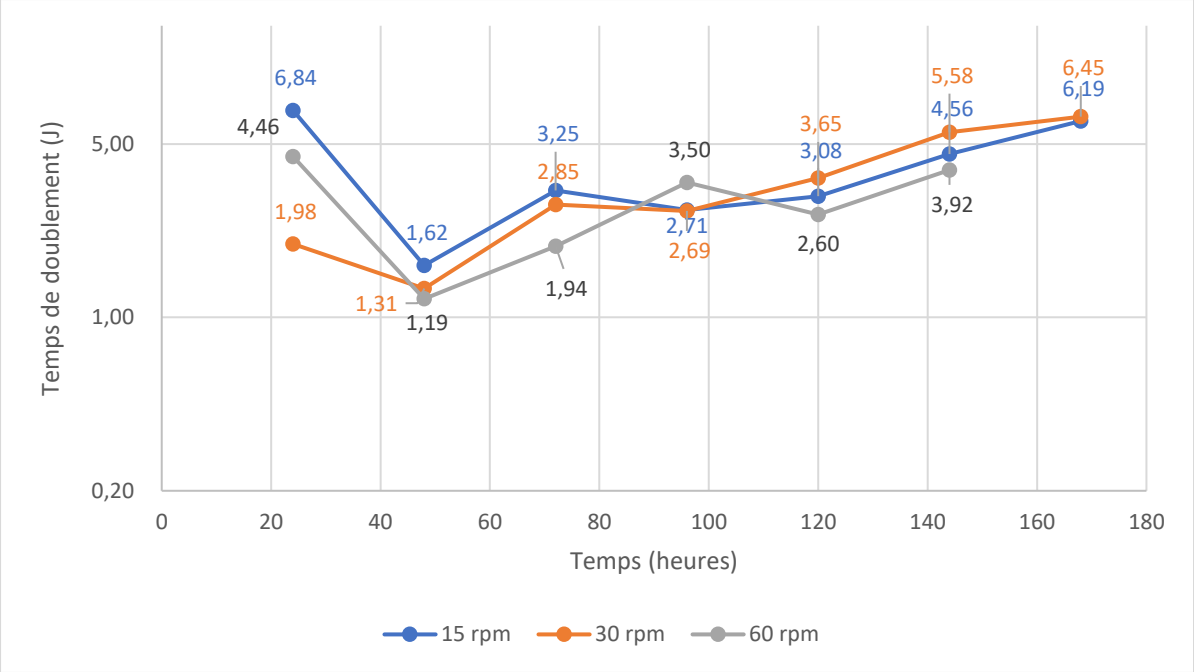


Figure 6.2 : Temps de doublement de la culture d'A. carterae en Dinophyt 1L mise en rotation à 15 ; 30 et 60 rpm.

Nous observons à 60 rpm dans un volume de 1L qu'un creux à la surface de l'eau se forme. Cela atteste de la présence d'un vortex, à cette vitesse angulaire dans le Dinophyt 1L.

L'étude de Lobaton et al. (2019) montre qu'*A. carterae* présente une tolérance physiologique aux forces de cisaillement jusqu'à un taux de dissipation d'énergie ε de 0,12 $m^2.s^{-3}$. Nous pensons que *A. carterae* est sensible au cisaillement donc nous choisissons la force de cisaillement comme valeur de référence. Nous allons déterminer la force de cisaillement s'exerçant dans le Dinophyt et la comparer à la valeur maximale supportée par *A. carterae*.

La valeur limite de ε = 0,12 $m^2.s^{-3}$ obtenue par Lobaton et al. (2019) équivaut au cisaillement $\frac{dv}{dz}$ de 350 s^{-1} (voir chapitre 1 – équation (5)). La force de cisaillement F est donc de 350 $mN.m^{-2}$. En comparant cette mesure réalisée par d'autres équipes sur d'autres bioréacteurs, Camacho et al. (2011) annonce (après correction) une mesure de force de cisaillement limite de 160 $mN.m^{-2}$ pour *Protoceratium reticulatum*. Pour *Lingulodinium polyedrum* un dinoflagellé bioluminescent (Maldonado et al., 2007) trouve une valeur de 1400 $mN.m^{-2}$. Dans un Dinophyt 1 litre, en rotation à 60 rpm, nous sommes à 2,2 $mN.m^{-2}$, ce qui est largement en deçà de la force de cisaillement maximale supportée par ces dinoflagellés. Pour les expériences suivantes, nous choisissons la vitesse angulaire intermédiaire entre 30 et 60 rpm, soit 45 rpm comme vitesse optimale pour la culture.

6.2. Comparaison de différents pH sur la croissance cellulaire

La littérature (Dason et al. 2004 ; Li et al., 2020) montre qu'*A. carterae* a une bonne croissance uniquement pour des pH compris entre 7,0 et 8,0. C'est pourquoi, nous souhaitons comparer la croissance à différentes valeurs de pH comprises entre ces valeurs soit : 7.0 ; 7,5 et 8,0 (figure 6.3).

En observant la croissance des cultures d'*A. carterae* dans différentes conditions de pH, il n'y a pas de différence significative entre les cultures. Bien que la culture à pH 7,5 montre une croissance légèrement supérieure entre les jours 3 et 8. Ces différences s'estompent par la suite. La production maximale de biomasse est obtenue entre 100 et 250 heures pour des concentrations cellulaires entre 6 et $18x10^5$ cell/ml. La production de cellule journalière vaut $1,75x10^5$ cell/ml/jour (figure 6.3).

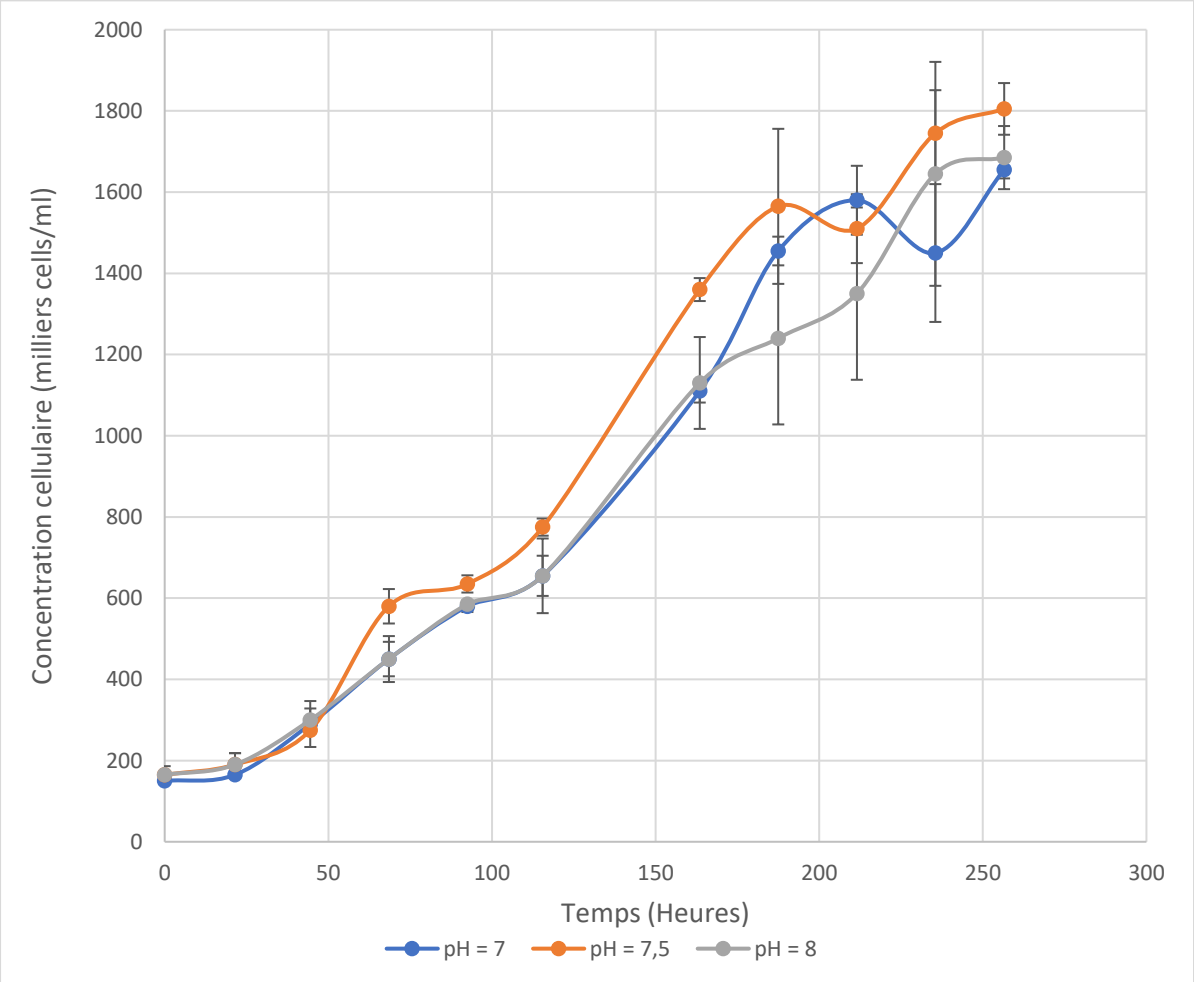


Figure 6.3 : Croissance de la culture d'A. carterae en Dinophyt 1L, en rotation à 45 rpm, CO_2 10%, taux de renouvellement de 10% du milieu de culture, lumière réglée à 150 PAR avec des consignes pH de 7 ; 7.5 et 8 (n=2). Les barres d'erreurs sont obtenues en répétant l'expérience 3 fois pour chaque condition testée et en prenant la variance de la mesure.

Nous observons à la figure 6.4 que les temps de doublement pendant la phase exponentielle sont courts avec d= 0,9j ; 1,2j et 1,5j respectivement pour les conditions à pH

7.5 ; 7 et 8. Cette différence sur le temps de doublement ne se maintient pas avec le temps mais permet une production de biomasse 20% supérieure à pH 7,5 vis-à-vis des autres conditions au 3eme jour de culture. Dans leurs travaux, Dason et al. (2004) montrent qu'*A. carterae* présente une meilleure affinité pour le CO_2 dans un milieu à pH 8,0 par rapport un milieu à pH 7,0. De plus, ils observent également une capacité photosynthétique 32% supérieure dans un milieu à pH 8,0 contre un milieu à pH 7,0. Cependant, cette différence d'affinité et de capacité photosynthétique, pour différents pH, ne semble pas se traduire par une meilleure croissance cellulaire dans nos expériences.

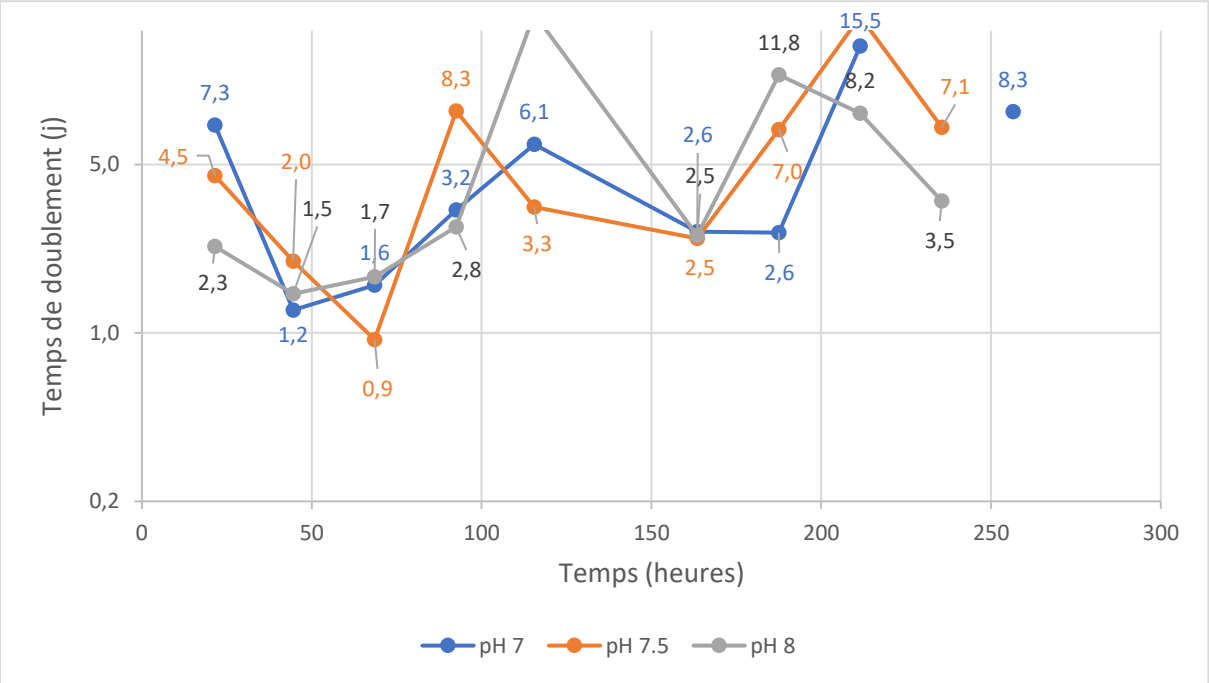


Figure 6.4 : Temps de doublement de la culture d'A. carterae en Dinophyt 1L, en rotation à 45 rpm, CO_2 10%, taux de renouvellement de 10%, lumière réglée à 150 PAR avec des consignes pH de 7 ; 7.5 et 8.

Nous pouvons conclure que les différentes consignes de pH n'ont pas d'effet certain sur les cultures. Néanmoins, nous avons pu observer de meilleurs temps de doublement à pH 7.5 notamment au 3ème jour se traduisant par une densité cellulaire 20% supérieure aux autres conditions à ce moment de la croissance. Cela indique que le Dinophyt fonctionne bien sur une large gamme de pH pour *A. carterae*.

6.3. Comparaison de différents pourcentages molaires de CO_2 sur la croissance cellulaire

Le système actuel de Dinophyt dispose d'une chambre de mélange des gaz où l'on peut programmer une consigne en pourcentage molaire de CO_2 disponible pour les cultures. Une seule valeur consigne est programmable à la fois et les Dinophyts sont reliés indépendamment les uns des autres à cette chambre de mélange. Des électrovannes enregistrent l'apport de CO_2 à chaque Dinophyt sous le contrôle d'une sonde pH. Ainsi il est possible de tester l'effet d'un pourcentage molaire de CO_2 sur plusieurs Dinophyts en même temps mais pour une consigne de CO_2 unique. La comparaison de différents pourcentages de CO_2 sur les cultures peut se faire

uniquement en « décalé dans le temps ». Pour ce faire, nous avons mis des cultures en duplicata dans des Dinophyts 1L, en rotation à 45 rpm, incliné à 3° et éclairé en régime 16/8 heures (jour/nuit) et 150 PAR d'intensité pendant plusieurs jours. Les cultures sont arrêtées dès qu'une phase stationnaire survient dans la croissance. C'est le signe que la densité cellulaire maximale est atteinte. Au-delà, les cultures entament une phase de décroissance en l'absence de dilution importante dans un milieu neuf.

Dans la figure 6.5, nous observons l'effet de différentes consignes de pourcentage molaire de CO_2 (5% contre 10%) sur la culture d'*A. carterae* en Dinophyts 1L. Nous n'observons pas de différences significatives sur la densité cellulaire pendant les 3 premiers jours de culture. C'est ensuite, à compter du 4eme jour, que les cultures alimentées avec la consigne de 10% de CO_2 montrent une meilleure croissance. Nous observons 1,13x10^6 cell/ml pour la condition 10% contre 8,03x10^5 cell/ml pour la condition 5% à 160 heures de culture. Enfin les cultures atteignent des densités cellulaires finales différentes avec 1,68x10^6 cell/ml pour la condition 10% contre 9x10^5 cell/ml pour la condition 5%. Au-delà de 150 heures de culture, la condition 5% de CO_2 amorce une phase stationnaire jusqu'à atteindre sa densité maximale vers 235 heures de culture. Pour la consigne CO_2 de 10%, la phase stationnaire s'amorce plus tard, à partir de 235 heures.

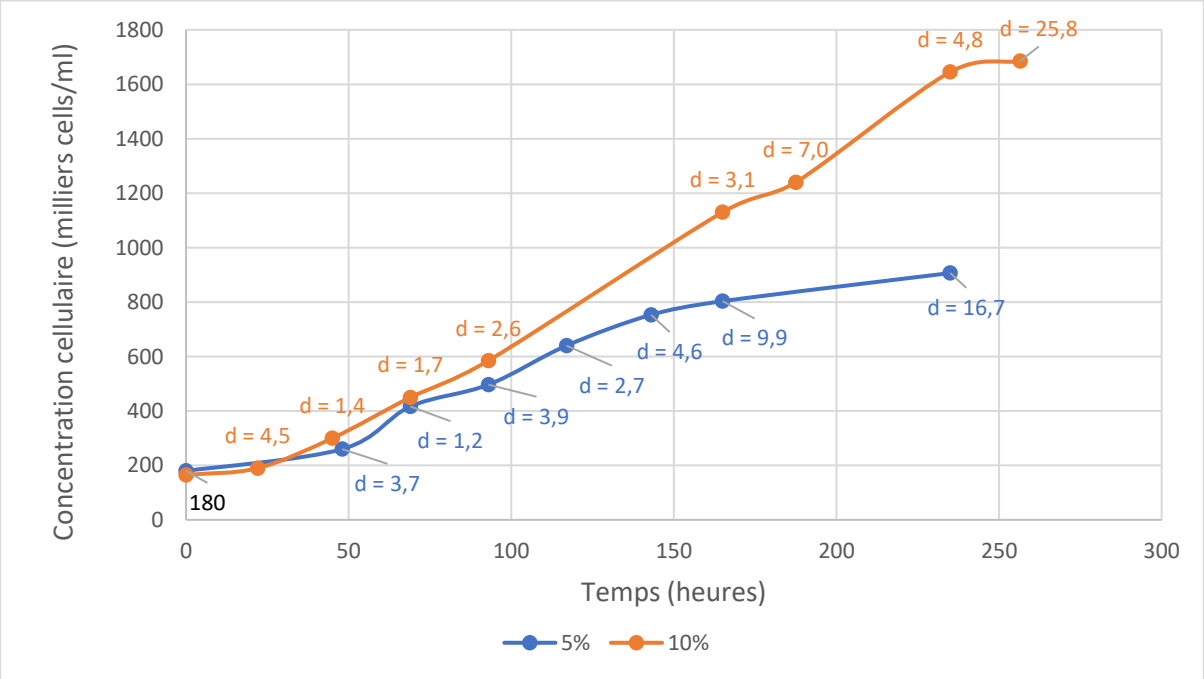


Figure 6.5 : Croissance en duplicata de la culture d'A. carterae en Dinophyt 1L, en rotation à 45 rpm, taux de renouvellement du milieu de 10%, lumière réglée à 150 PAR (16/8 heures jour/nuit), une consigne de pH = 8 et des consignes de CO_2 de 5 % comparé à 10%. Le temps de doublement d est indiqué en j.

Nous observons que la culture à 10% de CO_2 présente un temps de doublement très faible dès le 2nd jours avec d = 1,4j contre d = 3,7j pour la culture à 5% de CO_2. Ce n'est que 24 heures plus tard que la culture à 10% de CO_2 amorce une phase de croissance accrue avec un temps de doublement de 1,2j. Puis les temps de doublement s'allongent pour la condition à 5% de CO_2 avec d > 3j. Tandis que dans la condition à 10% de CO_2, le temps de doublement reste inférieur à 3j pendant 5 jours.

Nous remarquons ainsi que la teneur en CO_2 ne semble pas un élément limitant à faible densité cellulaire lors des premiers jours de culture. Ensuite, l'effet d'un meilleur pourcentage molaire de CO_2 disponible pour la culture est visible. Ceci semble montrer que l'apport de CO_2 n'est pas suffisant avec un pourcentage de 5% quand le nombre de cellules est important.

Plusieurs études (Errera et al., 2014 ; Raven et al. 2020) montrent qu'une augmentation du CO_2 disponible pour les cellules facilite son assimilation et permet aux cellules d'allouer plus d'énergie à la croissance. Nous remarquons également que l'utilisation d'une consigne en CO_2 supérieure à 5% permet d'atteindre une densité cellulaire maximale plus élevée en fin d'expérience.

Cependant, nous avons observé les temps d'ouverture des vannes pour l'apport de CO_2. Dans les deux conditions, ces temps n'excèdent pas 8 heures pendant la durée totale de l'expérience. Dans les derniers jours de l'expérience, avec une densité de cellules importante et consommant toujours plus de CO_2, nous pouvions observer que la condition à 5% était en défaut de CO_2. Toutefois, nous n'avons pas observé d'augmentation importante des temps d'ouverture de vannes pour les deux conditions. Ceci semble indiquer que le CO_2 n'était pas limitant dans le milieu pour un pourcentage de 5%. Ce raisonnement s'appuie sur l'hypothèse d'un flux de CO_2 proportionnel au temps d'ouverture des vannes. Mais les volumes sous la membrane et au-dessus de la surface libre permettent de stocker du CO_2 et de le fournir au bioréacteur même lorsque les vannes sont fermées. Il semblerait que ces fluctuations favorisent la disponibilité en CO_2 pour la condition 10% par rapport à la condition 5%. Ceci pourrait expliquer la différence de densité cellulaire alors que les vannes ne sont pas ouvertes 100% du temps.

Chapitre 7 : La culture en Dinophyt de grands volumes, effet d'échelle

Dans ce chapitre, nous avons utilisé des Dinophyts de 98L et 169L pour observer l'effet de cette technologie sur la croissance des dinoflagellés dans des volumes semi-industriels. Dans la suite de ce chapitre, nous nommerons ces Dinophyts de 169L et 98L respectivement Dinophyt V3 et Dinophyt V4 comme présentés à la table 7.1 et la table 7.2.

	Volumes utiles	Caractéristiques
Dinophyt V1	1 à 5L	Cylindres avec tampon carbonate, un moteur et une rampe led unique pour 1 à 9 cuves.
Dinophyt V2	1 à 9L	Cylindres avec électrovannes, contrôleur pH, bouteille de CO_2, un moteur dédié à chaque cuve et une rampe led pour 2 cuves.
Dinophyt V3	169L	Cylindre avec électrovannes, contrôleur pH, bouteille de CO_2, un moteur et 4 rampes led dédiées à la cuve.
Dinophyt V4	98L	Cuve annulaire avec électrovannes, contrôleur pH, bouteille de CO_2, un moteur et 8 rampes led intérieures/extérieures de l'annulaire et dédiées à la cuve.

Table 7.1 : Récapitulatif des différentes versions de Dinophyts V1 à V4.

Paramètre en variable	Concentration cellulaire max.	Renouvèlement milieu	Concentration cellulaire max.	Lumière
N° figure	7.1	7.2	7.4	7.5
Forme PBR	Cylindrique (V3)	Cylindrique (V3)	Annulaire (V4)	Annulaire (V4)
Vitesse angulaire (rpm)	12	12	12	12
Pourcentage de CO2 (%)	10	10	10	10
Consigne pH	8,1	8,1	8,1	8,1
Salinité (g/L)	35	35	35	35
Concentration du milieu (ml)	2/1000	2/1000	2/1000	2/1000
Volume des cuves (L)	169	169	98	98
Angle d'inclinaison	3°	3°	3°	3°
Intensité lumineuse (PAR) / heures (D/N)	405 / (24/0)	405 / (24/0)	405 / (24/0)	120 à 405 / (24/0)
Taux de renouvellement du milieu (%)	0	10	0	0

Table 7.2 : Présentation des paramètres d'expériences réalisées en Dinophyts V3 et V4 (volumes > 100L).

7.1. Croissance cellulaire en Dinophyt de volume industriel : Le Dinophyt V3

Le Dinophyt V3 se compose d'un cylindre comme sur les Dinophyts V2 vus précédemment (figure 2.4 ; B). Le rapport de la hauteur d'eau sur le diamètre est toujours de 1/1. Le CO_2 est apporté par un collecteur tournant et des électrovannes reliées à une consigne pH et un capteur de CO_2. Ce dernier fixe une consigne de pourcentage molaire du CO_2 présent sous la membrane microporeuse. Le Dinophyt est éclairé par 4 rampes leds positionnées tout autour de la cuve de culture (figure 2.13).

Nous observons sur la figure 7.1, la croissance cellulaire dans un Dinophyt V3. La culture d'*A. carterae* présente une phase de latence de plus de 72 heures avant une phase de croissance exponentielle. La densité cellulaire passe de $2{,}2 \times 10^5$ cell/ml à $4{,}62 \times 10^5$ cell/ml en 24 heures soit un temps de doublement d = 0,93j. Ensuite le temps de doublement s'allonge jusqu'à 2,88j durant 48 heures. Puis nous observons l'amorce d'une phase stationnaire de la croissance cellulaire pour atteindre $1{,}11 \times 10^6$ cell/ml comme densité maximale après 307 heures

de culture. Après la phase stationnaire, la population d'*A. carterae* décline par manque de renouvellement du milieu.

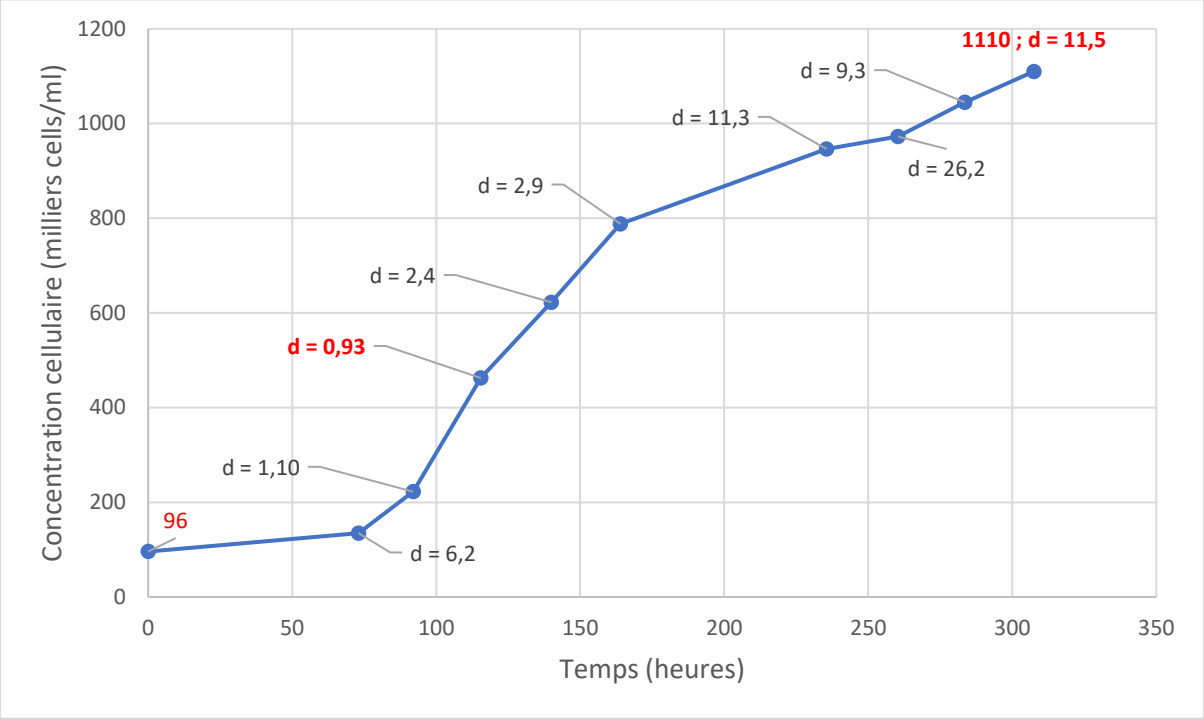


Figure 7.1 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt 169L avec membrane, en rotation à 12 rpm, sans renouvellement du milieu, lumière réglée à 405 PAR (24/0 heures jour/nuit), une consigne de pH = 8,1 et consigne de CO_2 de 10%. Le temps de doublement d est indiqué en j.

En rotation à 12 rpm, le Dinophyt V3 mélange efficacement car le nombre d'Ekman est inférieur à 10^{-4} (Meunier et al., 2020). Les cellules sont soumises à une force de cisaillement de 0,4 $mN.m^{-2}$. Dans ces conditions, le Dinophyt V3 induit une force de cisaillement F plus faible que le Dinophyt V2 avec F = 2,2 $mN.m^{-2}$ pour 1L en rotation à 60 rpm.

Ensuite nous avons réalisé une culture en effectuant 20% de changement de milieu quotidien pour modéliser une phase de production et tenter de soutenir la croissance au-delà des $1,1x10^6$ cell/ml atteints précédemment. Nous observons la croissance cellulaire de cette culture à la figure 7.2. La densité cellulaire maximale observée est de $5,35x10^5$ cell/ml au bout de 183 heures de culture. Au-delà, la densité cellulaire décroît malgré les changements de milieu quotidien. Nous observons que les temps de doublement varient peu entre 0,90 et 2,0j, de 40 heures à 180 heures de culture. Nous observons que les temps de doublement restent inférieurs à 2j . Ils sont même inférieurs ou égaux à 1j pendant plusieurs jours. Pour la culture de la figure 7.1, la phase de croissance dure 72 heures contre 140 heures pour la culture de la figure 7.2. Cela semble montrer que le changement de milieu soutient la croissance avec des temps de doublement inférieures à 2j. Les temps de doublement enregistrés lors des phases de croissance des deux cultures semblent similaires.

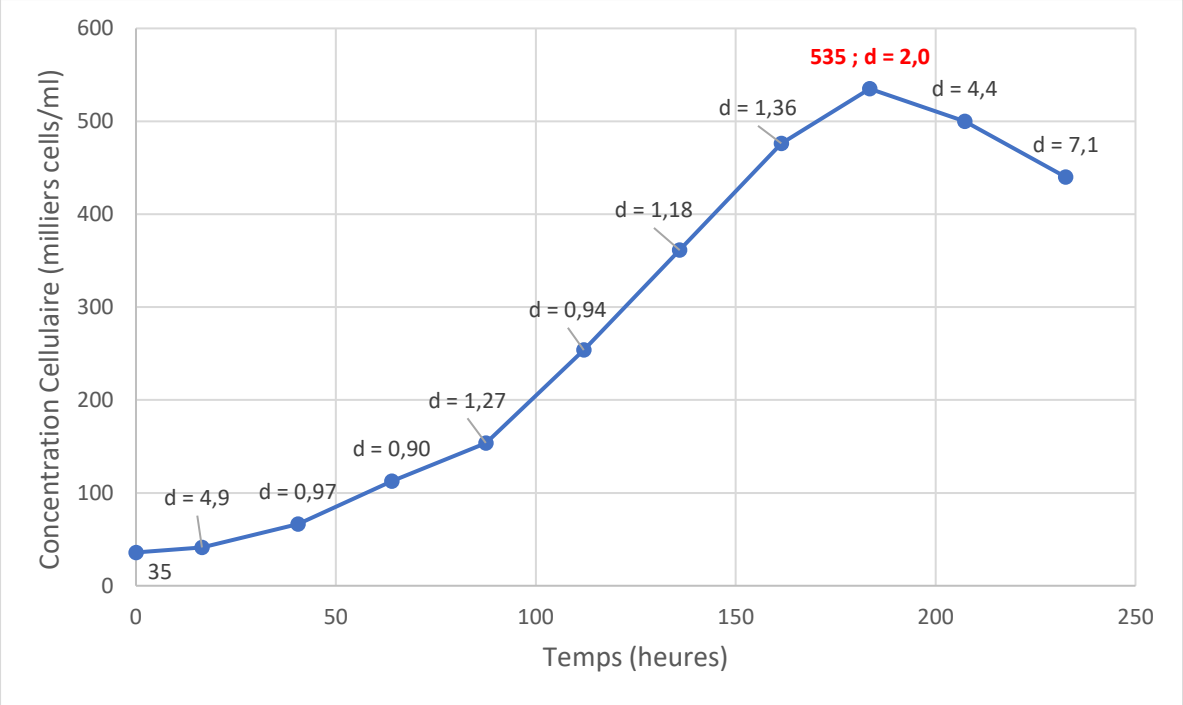


Figure 7.2 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt 169L avec membrane, en rotation à 12 rpm, taux de renouvellement du milieu de 20%, lumière réglée à 405 PAR (24/0 heures jour/nuit), une consigne de pH = 8,1 et consigne de CO_2 de 10%. Le temps de doublement d est indiqué en j.

En comparant la concentration cellulaire maximale obtenue en 12 jours avec celles de la littérature, nous observons qu'elle est inférieure à Fuentes *et al.* (2016) obtenant $4{,}44 \times 10^6$ cell/ml sur un temps très long (223 jours de culture) et Molina-Miras et al. (2018) ayant obtenu $1{,}7 \times 10^6$ cell/ml après 25 jours de culture. La concentration cellulaire maximale obtenue avec le Dinophyt V3 est toutefois supérieure à $6{,}9 \times 10^4$ cell/ml, obtenue en 15 jours par Rahman Shah *et al.* (2016).

Nous observons qu'à une densité supérieure à 9×10^5 cell/ml, la culture est suffisamment dense pour bloquer les rayons de lumières. Ainsi, les cellules se font de l'ombre entre elles. L'intensité lumineuse est de 400 PAR en moyenne à l'extérieur du Dynophyt V3. Cette intensité chute à 0 PAR au centre de la cuve avec une densité supérieure ou égale à 9×10^5 cell/ml. Le Dinophyt V3, avec sa mise en rotation, mélange les cellules dans tout le volume. Les cellules passent alors d'une zone éclairée à une zone sombre et vice-versa. Ce processus interrompt la photosynthèse réalisée par les cellules plusieurs fois par minutes comme décrit par Chang et al. (2017). Nous pensons que ces interruptions dans le processus de photosynthèse limitent la croissance cellulaire et donc la production de biomasse.

7.2. Croissance cellulaire en Dinophyt annulaire : Le Dinophyt V4

Suite à ce constat du manque de lumière dans le Dinophyt V3 réalisé dans la section précédente, nous avons amélioré la forme du Dinophyt pour permettre l'apport de lumière depuis le centre du Dinophyt. Dans cette version, le Dinophyt V4 est conçu en forme d'anneau avec un cylindre central creux pouvant accueillir jusqu'à 4 rampes leds supplémentaires

comme le permet sa forme sur la figure 7.3. Les parties, entre les parois du cylindre interne et celles du cylindre externe présentées en jaune, accueillent le liquide pour la culture.

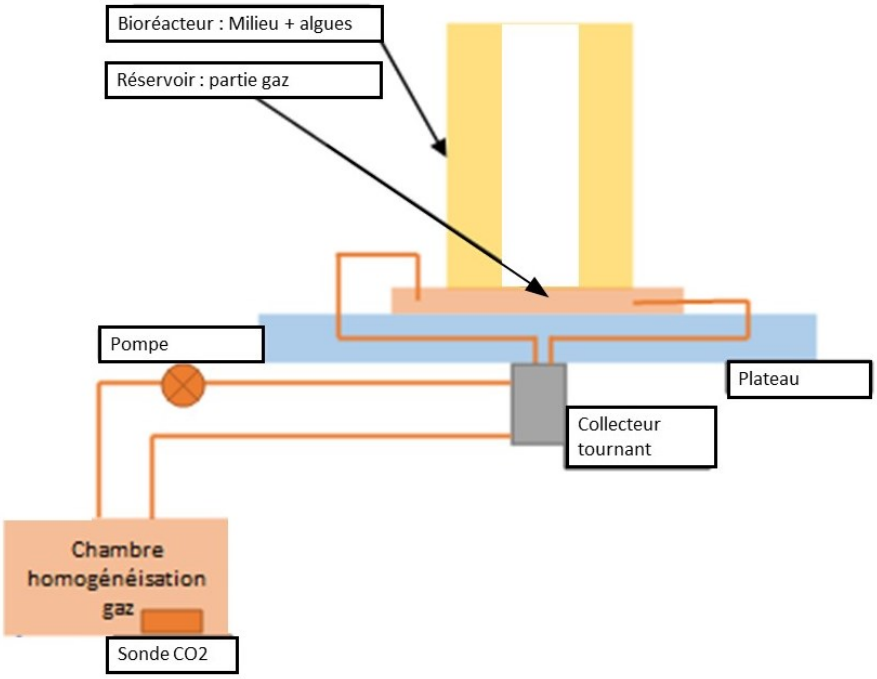


Figure 7.3 : Schema du Dinophyt V4 avec éclairage autour et au centre de la culture.

Cependant, la présence d'un cylindre central modifie l'écoulement. Les modes globaux ont une longueur d'onde différente, qui dépend du rapport entre le rayon du cylindre intérieur et extérieur. Pour le Dynophyt V4, le rayon intérieur vaut 9,8 cm et le rayon extérieur vaut 29,5 cm. Le rapport des rayons vaut 0,33 et la longueur d'onde prédite théoriquement vaut ainsi 2,66 fois le rayon extérieur (voir la théorie de Lin *et al.,* 2014). Il faut donc modifier la hauteur d'eau afin de se placer à une demi-longueur d'onde, c'est à dire à une hauteur égale à 1,33 fois le rayon soit 39,6cm.

Nous avons effectué des cultures successives d'*A. carterae* dans le Dinophyt V4. Le meilleur résultat obtenu est présenté à la figure 7.4. Cette culture a été ensemencée à $4{,}67 \times 10^5$ cell/ml. Les rampes leds installées dans l'anneau central et autour de la cuve ont été allumées dès le début de cette expérience (figure 7.4).

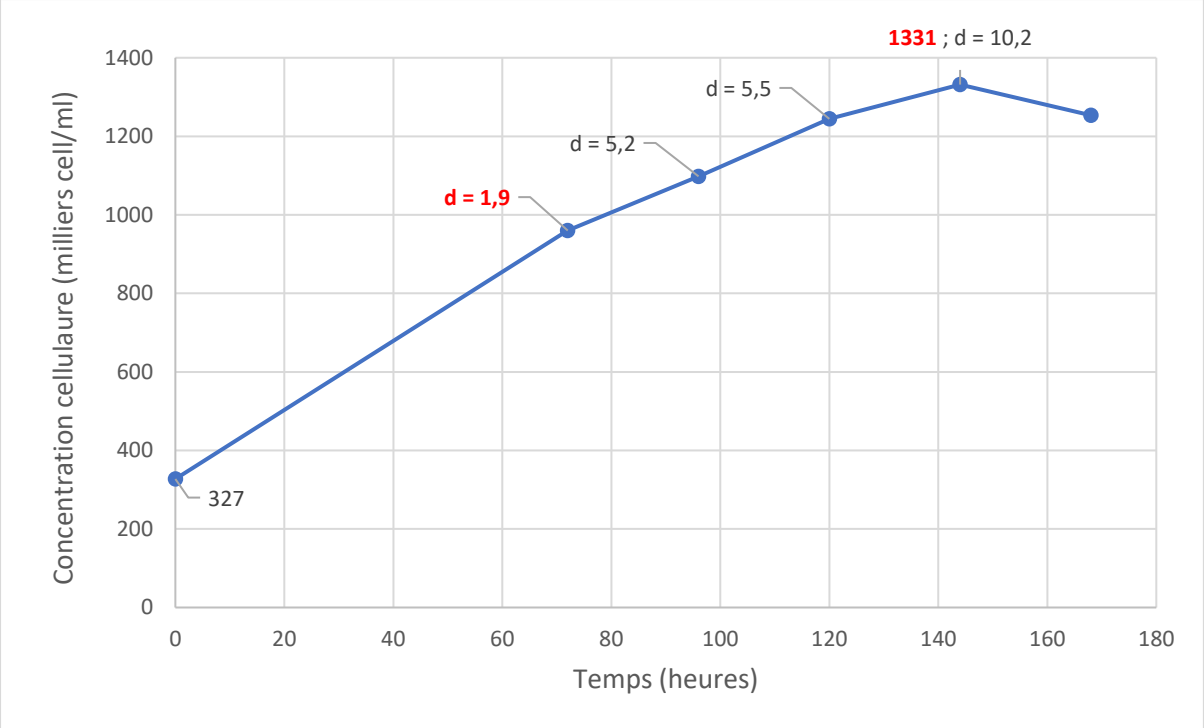


Figure 7.4 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt V4, jusqu'à épuisement du milieu de culture, la lumière réglée à 405 PAR à l'intérieur et à l'extérieur du bioréacteur. Le temps de doublement d est indiqué en j.

Nous observons une croissance cellulaire de $3{,}27 \times 10^5$ cell/ml à $9{,}6 \times 10^5$ cell/ml dans les premières 72 heures, soit un temps de doublement de 1,9j. Ensuite, le temps de doublement augmente à plus de 5j pendant 48 heures, ceci jusqu'à atteindre la densité cellulaire maximale de $1{,}33 \times 10^6$ cell/ml après 144 heures. Ensuite la densité cellulaire diminue. Cependant, il est possible qu'une phase d'adaptation soit présente le premier jour, ce qui diminuerait légèrement le temps de doublement sur les deuxième et troisième jours, bien qu'il n'y ait pas de mesure quotidienne sur cette période.

Avec le Dinophyt V4, nous obtenons une concentration cellulaire maximale légèrement supérieure à celle obtenue avec le Dinophyt V3 avec respectivement 1,33 et $1{,}11 \times 10^6$ cell/ml. A partir de la densité cellulaire de 4×10^5 cell/ml, la concentration maximale est atteinte en 207 heures en Dinophyt V3 contre 144 heures en Dinophyt V4. Ces densités cellulaires sont importantes pour des photobioréacteurs de plus de 100L. Néanmoins, il devrait être possible d'obtenir une densité cellulaire plus élevée, se rapprochant plus des 4×10^6 cell/ml obtenus en Dinophyt V1 de 1L.

Ces concentrations cellulaires maximales obtenues sont supérieures à $6{,}9 \times 10^4$ cell/ml, atteinte en 15 jours par Rahman Shah *et al.* (2016) en colonnes multiples pour un total de 700L (table 7.3). Fuentes et al. (2016) obtiennent une concentration cellulaire maximale de $4{,}4 \times 10^6$ cell/ml après 223 jours de culture (dans 320L) et Molina-miras et al. (2018) obtiennent $1{,}7 \times 10^6$ cell/ml après 25 jours de culture (dans 80L).

Durant nos expériences avec le Dinophyt V4, les renouvellements de milieu n'ont pas permis de dépasser la biomasse maximale de $1{,}33 \times 10^6$ cell/ml. En ajustant la lumière à la concentration cellulaire, la croissance cellulaire était parfois meilleure d'un jour à l'autre avec

un temps de doublement minimal de 0,86j mais la densité cellulaire maximale atteinte était plus faible avec 8,14x10^5 cell/ml avant de décroître (figure 7.5).

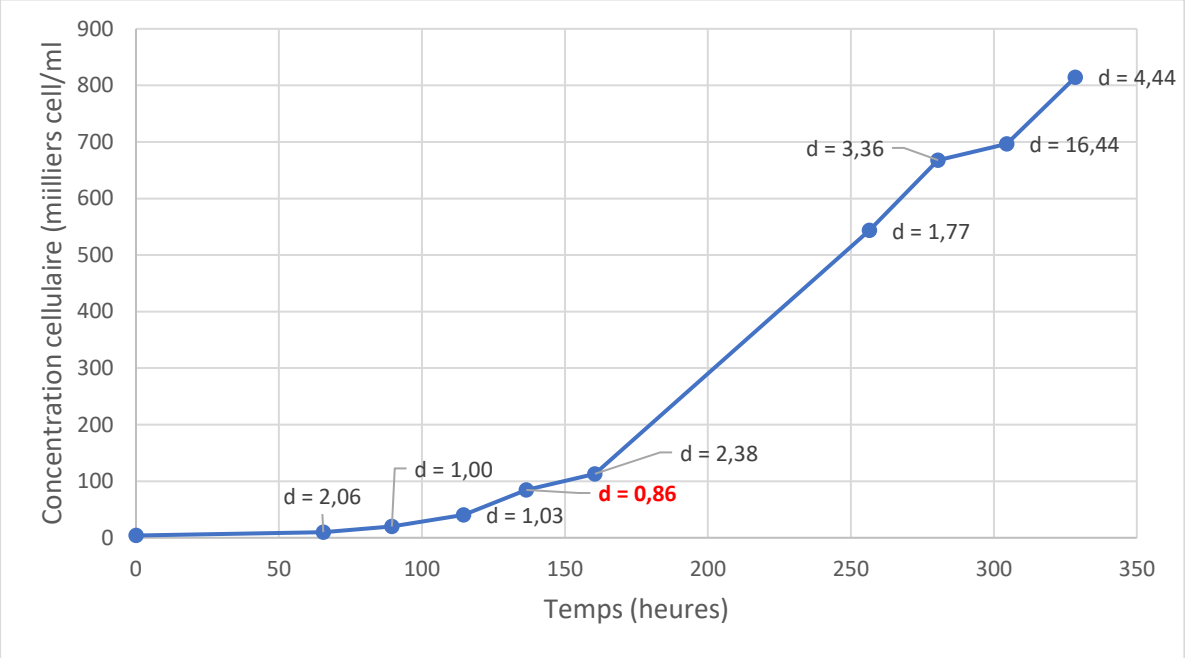


Figure 7.5 : Croissance d'A. carterae en Dinophyt V4, la lumière est réglée à 120 PAR à l'extérieur du bioréacteur (de 0 à 160 heures) puis 240 PAR à l'extérieur et 405 PAR au centre du bioréacteur (de 160 à 280 heures), enfin 405 PAR à l'extérieur et intérieur du bioréacteur (de 280 à 330 heures), sans renouvellement du milieu de culture. Le temps de doublement d est indiqué en j.

Source	Concentration cellulaire maximale (cell/ml)	Temps de doublement minimum (j)	Production moyenne de cellules (x10^6 cell/L/jour)	Production maximale de cellules (x10^6 cell/L/jour)
Dinophyt V3	1,11x10^6	0,90 (+/- 0,1)	100,4	245
Dinophyt V4	1,33x10^6	0,86	145,6	211
PBR – 700L Rahman Shah et al. (2016)	6,9x10^4	2,11	4,53	4,56
PBR – 80L Molina-Miras et al. (2018)	1,7x10^6	1,27	72,6	110
PBR - 320L Fuentes *et al.* (2016)	4,44x10^6	3,1 (+/- 1,7)	-	-

Table 7.3 : Récapitulatif de la production de cellules en Dinophyts comparée aux meilleurs rendements dans la littérature. PBR = PhotoBioRéacteur.

En conclusion, nous observons que les Dinophyts V3 et V4 permettent d'atteindre des temps de doublement dans les meilleures conditions de 0,9j et 0,86j respectivement. Ces valeurs sont meilleures que les résultats obtenus par Molina-miras et al (2018) avec d = 1,27j, Rahman et al. (2016) avec d = 3,1j et Fuentes et al. (2016) avec d = 2,22j dans les meilleures conditions.

A partir des données présentées dans les travaux de Rahman Shah et al. (2016) et Molina-miras et al. (2018) nous avons pu déterminer une production moyenne de cellules par litre par jour. Elle a été calculée à partir de la différence entre les concentrations initiales, finales (cell/L) et moyennées par le temps de culture (jours). Nous avons pu constater que le Dinophyt V4 a un rendement de production 2 fois supérieur à celui du PBR décrit par Molina-Miras et al. (2018) (145x10^6 cell/L/J vs 72,6x10^6 cell/L/J). Rahman Shah et al. (2016) obtiennent des rendements encore inférieurs avec 4,5x10^6 cell/L/J. Fuentes et al. (2016) donnent la concentration cellulaire maximale mais par la concentration cellulaire initiale. Il ne nous est pas possible de déterminer la production moyenne de cellules par litre par jour de Fuentes et al. (2016). Nous obtenons ainsi des résultats majeurs dans le cadre d'une application à visée de production industrielle de biomasse.

Notre meilleure production de cellules par litre par jour est obtenue avec le Dinophyt V3 avec 245x10^6 cell/L/J contre 211x10^6 cell/L/J avec le Dinophyt V4. Notre meilleure production est plus de deux fois supérieure à celle de Molina-Miras (110x10^6 cell/L/J ; 2018) et bien supérieure à celle de Rahman Shah (4,56x10^6 cell/L/J ; 2016). Fuentes et al. (2016) donnent simplement la meilleure biomasse quotidienne produite (125 mg/L). Avec la biomasse obtenue en fin de culture (0,496 g/L) et la densité maximale de 4,44x10^6 cell/ml, nous calculons une masse des cellules chez Fuentes de 113 pg/cell. Cette valeur est bien inférieure aux 2900

pg/cell qu'obtiennent Rahman Shah et al. (2016) en moyenne dans leurs cultures. De telles différences sur la masse cellulaire de ces dinoflagellés rendent tout calcul imprécis à partir de la biomasse.

Le Dinophyt V4 fait intervenir une forme nouvelle de bioréacteur avec son anneau de culture autour d'un puits de lumière. Il est possible que des éléments ne soient pas encore bien maîtrisés bien que le rapport entre la hauteur d'eau et la largeur de l'anneau ait été scrupuleusement respecté.

Ainsi, nous pouvons dire que le Dinophyt s'adapte bien au changement d'échelle avec les V3 et V4 et permet la culture cellulaire en volumes de culture industrielle supérieurs à 100L. Ces dernières versions permettent d'obtenir une production moyenne de cellules journalière meilleure que celles obtenues dans la littérature. Nous avons obtenu de très bon temps de doublement lors des phases de croissance des cultures. Le Dinophyt mélange plus efficacement avec l'augmentation d'échelle de culture en gardant des forces de cisaillement plus faibles à mesure que le volume augmente. Ce dernier paramètre fait de ce bioréacteur un excellent candidat pour de futures installations de production industrielle de Dinoflagellés.

Chapitre 8 : Conclusions

8.1. Synthèse

Les Dinoflagellés sont de plus en plus regardés pour leurs nombreuses applications. Ils produisent naturellement des molécules pouvant être utilisées comme fongicide pour l'agriculture, comme anti-douleur et anti-cancer pour la médecine. La culture de dinoflagellés pour des applications pharmaceutiques implique des productions importantes de biomasse à haut rendement. Cependant, les systèmes actuels de production à grande échelle génèrent beaucoup de cisaillement peu compatible avec la sensibilité des dinoflagellés aux forces de cisaillement.

Cette thèse présente un nouveau concept de photobioréacteur, le Dinophyt avec une caractérisation fondamentale, expérimentale et son optimisation à des fins de production industrielle.

L'écoulement et le mélange de ce type de mélangeur ont été caractérisés avant la thèse par Meunier et al. (2020). Dans cette thèse, nous avons mesuré le flux de gaz dans le Dinophyt lors de la diffusion de CO_2 par la membrane. Ces mesures étaient fidèles à la théorie prenant en compte une couche d'Ekman dans laquelle le CO_2 diffuse sans être advecté par l'écoulement. Le flux de CO_2 dépend du nombre d'Ekman E suivant une loi d'échelle $E^{-1/2}$ pour un angle d'inclinaison α du bioréacteur fixe. Il dépend très peu de l'angle d'inclinaison car il varie comme $\alpha^{1/4}$.

Nous avons ensuite expérimenté la culture d'*Amphidinium carterae* dans un Dinophyt V1 avec des moyens de contrôle des paramètres de culture limités. Les résultats obtenus étaient pourtant très prometteurs avec des densités maximales allant de $2x10^6$ à $4x10^6$ cell/ml en 7 à 10 jours. Molina-Miras *et al*. (2018) ont obtenu $1,7x10^6$ cell/ml en plus de 20 jours et Fuentes *et al*. (2016) ont obtenu $4,4x10^6$ cell/ml avec une culture de plus de 180 jours. Toutefois, le Dinophyt V1 ne permettait pas de contrôler l'apport de CO_2 et les paramètres physico-chimiques du milieu de culture tel le pH.

Avec le Dinophyt V2, le bioréacteur a été amélioré pour permettre le contrôle du pH et de l'apport de CO_2. Nous avons testé deux manières d'apporter le CO_2, soit par la surface libre soit par une membrane microporeuse. Il s'est avéré qu'en conditions comparables, les deux méthodes d'apport de CO_2 ne présentaient pas de différence d'effet sur les cultures.

En comparant plusieurs paramètres physico-chimiques (vitesse de rotation, pH, pourcentage de CO_2) pour optimiser la culture d'*A. carterae* dans le Dinophyt V2, nous avons observé de faibles effets sur la culture, d'un paramètre à l'autre. Le Dinophyt a montré dans ces expériences, sa capacité à être robuste face à des variations de paramètres. Ainsi ce bioréacteur semble être un bon candidat pour la culture à échelle industrielle.

Comme évoqué précédemment, la culture de dinoflagellés est intéressante pour les molécules produites par ces microalgues. Pour obtenir une quantité de l'ordre du mg de molécules, minimum nécessaire aux besoins des industries pharmaceutiques, il faut de grands volumes supérieurs à 80 litres permettant de récolter un nombre suffisant de cellules de dinoflagellés. Nous avons développé un Dinophyt V3 de plus de 160L pour confirmer que les conditions de culture en grands volumes permettent de soutenir une culture de dinoflagellés dense (supérieure à $1x10^6$ cell/ml) et des rendements aussi bons qu'en petits volumes (1L). A l'issue de nos expériences, nous avons obtenu une densité cellulaire maximale intermédiaire

entre celles obtenues dans la littérature dans des colonnes à bulles de 80 à 700L (Fuentes et al., 2016 ; Rahman Shah *et al.,* 2016 ; Molina-Miras et al., 2018). Nous avons obtenu de meilleurs temps de doublement lors des meilleures phases de croissance comparées à la littérature en bioréacteurs à grands volumes. De plus, nous avons obtenu une meilleure production cellulaire par litre par jour ($145x10^6$ cell/L/J), ce qui est un prérequis indispensable à une application industrielle visant à produire de la biomasse.

Les résultats obtenus avec le Dinophyt V3 n'ont pas permis d'atteindre la même densité cellulaire qu'en Dinophyt V1. Nous pensons que cette différence est liée à l'absorbance de la lumière par les dinoflagellés qui limitent la croissance cellulaire en grand volume de culture. Le rayon des Dinophyts V3 étant 6 fois plus grand que celui des Dinophyts V1 (1L), la lumière est rapidement absorbée lorsque la densité cellulaire augmente. Ainsi nous avons développé le Dinophyt V4 en forme annulaire pour apporter de la lumière par le centre de la cuve. A l'issue de différentes cultures réalisées dans le Dinophyt V4, nous sommes parvenus à obtenir une légère augmentation de la densité cellulaire maximale par rapport au Dinophyt V3.

D'après nos estimations, à ces volumes (100-200L), en phase de déploiement industriel, il serait possible de baisser les couts de production de molécules extraites de la biomasse de dinoflagellés autour des 200€/mg. Ces couts pourraient encore baisser jusqu'à 100€/mg pour des volumes allant jusqu'à 600L par réacteur, ce qui est parfaitement réalisable grâce à la géométrie annulaire. Ce type de réacteur viendrait renforcer une stratégie de développement d'une unité de production industrielle visant à produire de telles molécules qui seraient proposées au marché de la découverte de médicaments pour des prix abordables.

8.2. Perspectives

Les Dinophyts V3 et V4 permettent, par leur géométrie et leur volume, d'obtenir une efficacité de mélange importante (Ekman $< 10^{-4}$) avec de très faibles forces de cisaillement ($F < 0{,}4$ mN.m^{-2}). Ce bioréacteur est donc très intéressant pour la culture de micro-algues très fragiles et sensibles au cisaillement. En effet, il existe des micro-algues qui sont plus sensibles qu'*Amphidinium carterae* (Gallardo et al., 2012) comme le dinoflagellé *Protoceratium reticulatum*. Il serait donc très intéressant de faire des tests de culture de ce dinoflagellé.

Le Dinophyt V4 présente un volume inférieur au Dinophyt V3 avec 71 litres de différence. Il pourrait être intéressant d'essayer la culture en Dinophyt de volume supérieur à 200L en annulaire afin d'atteindre une production de cellule par jour supérieure à celle du Dinophyt V3. Pour ce faire, un effort sur la qualité d'apport de la lumière aux dinoflagellés est nécessaire. Nous pensons que l'intensité lumineuse (PAR) doit être augmentée pour ne pas être limitante. Il est possible qu'un rayonnement lumineux homogène favorise la croissance cellulaire plutôt que l'usage de leds de différentes longueurs d'ondes comme c'est le cas dans cette thèse.

Les expériences avec la technologie Dinophyt se sont concentrées sur la production de biomasse. Pour répondre le mieux possible au besoins des industries pharmaceutiques, il faudra mesurer la concentration de molécules d'intérêt présente dans les dinoflagellés en faisant varier différents paramètres de culture. Ceci pour aboutir à des conditions de culture permettant de stimuler la production de ces molécules (Ryderheim et al.,2021).

Lors des cultures en Dinophyts V1 et V2 de 1L, nous nous sommes limités à la vitesse de 60 rpm pour éviter la déformation de la surface libre. Il pourrait être intéressant d'observer ce que provoque cette déformation sur le mélange du milieu de culture et sur la diffusion du CO_2 dans le milieu. Nous avons modélisé le flux de CO_2 à travers la membrane. Il serait intéressant d'expliquer et d'écrire la théorie du comportement du flux de CO_2 par la surface libre.

Durant cette thèse, le modèle biologique utilisé était le Dinoflagellé *Amphidinium carterae*. Il pourrait être fructueux d'essayer de mettre en culture d'autres espèces de dinoflagellés ou micro-organismes sensibles aux forces de cisaillement. Ceci pourrait aboutir à la création d'une plateforme de production de dinoflagellés en volumes industriels. Cette plateforme produirait des cultures d'algues à haute densité desquelles seraient extraites des molécules d'intérêt pour de nombreux domaines biotechnologiques (ex : pharmacologie, agriculture, écotoxicologie, etc).

D'autres types cellulaires, tels que les cellules souches, pourraient également tirer parti du Dinophyt. Ces cellules, à partir desquelles il est généré des lymphocytes thérapeutiques, sont de plus en plus utilisées en immuno-oncologie. En raison de la difficulté à les produire à grande échelle, en raison de leur sensibilité aux forces de cisaillement, ces thérapies innovantes sont excessivement chères (400 k€/patient), ce qui limite fortement leur utilisation. Produire les cellules souches dans le Dinophyt permettrait de diminuer drastiquement les coûts de production, rendant accessible l'immunothérapie cellulaire au plus grand nombre de patients.

Ce travail a permis de mettre en évidence l'intérêt de se pencher sur des aspects encore mal décrits en biologie cellulaire, tels que les forces de cisaillement, pourtant primordiaux à l'heure où les enjeux de la bioproduction sont mis sur le devant de la scène internationale.

Bibliographie :

1. Aras, Aliye, Sumbul Khalid, Saima Jabeen, Ammad Ahmad Farooqi, et Baojun Xu. « Regulation of Cancer Cell Signaling Pathways by Mushrooms and Their Bioactive Molecules: Overview of the Journey from Benchtop to Clinical Trials ». *Food and Chemical Toxicology* 119 (septembre 2018): 206-14. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.038.
2. Assunção, Joana, A. Guedes, et F. Malcata. « Biotechnological and Pharmacological Applications of Biotoxins and Other Bioactive Molecules from Dinoflagellates ». *Marine Drugs* 15, nº 12 (20 décembre 2017): 393. https://doi.org/10.3390/md15120393.
3. Backer, Lorr Aine C, et Dennis J Mcgillicuddy. « Harmful Algal Blooms : At the Interface between Coastal Oceanography and Human Health ». *Oceanography* 19, nº 2 (2006): 94-106. https://doi.org/10.5670.
4. Bauchart, Caroline. « Contribution à l'étude d'oligopeptides (< 5 kDa) générés par la préparation et la digestion de deux aliments carnés, la viande bovine et la chair de la truite », avril 2012, 249. https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00688406/
5. Balgobin, Ravi. « Bubble-Free Oxygen and Carbon Dioxide Mass Transfer in Bioreactors Using Microporous Membranes », Electronic Thesis and Dissertation Repository, nº 438 (avril 2012): 141. https://ir.lib.uwo.ca/etd/438/
6. Banaigs B. et Kornprobst J-M., "La biodiversité marine et le médicament : espoirs, réalités et contraintes", l'actualité chimique - mars 2007 - n° 306. https://new.societechimiquedefrance.fr/wp-content/uploads/2019/12/2007-306-mars-p.7-Banaigs.pdf
7. Bilad, M.R., Hassan A. Arafat, et Ivo F.J. Vankelecom. « Membrane Technology in Microalgae Cultivation and Harvesting: A Review ». *Biotechnology Advances* 32, nº 7 (novembre 2014): 12831300. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.008.
8. Blunt, John W., Anthony R. Carroll, Brent R. Copp, Rohan A. Davis, Robert A. Keyzers, et Michèle R. Prinsep. « Marine Natural Products ». *Natural Product Reports* 35, nº 1 (2018): 853. https://doi.org/10.1039/C7NP00052A.
9. Bon, Cécile, Stéphanie Cabantous, Sylviane Julien, Valérie Guillet, Christian Chalut, Julie Rima, Yoann Brison, et al. « Solution Structure of the Type I Polyketide Synthase Pks13 from Mycobacterium Tuberculosis ». *BMC Biology* 20, nº 1 (décembre 2022): 147. https://doi.org/10.1186/s12915-022-01337-9.
10. Botelho, Maria João, Jelena Milinovic, Narcisa M. Bandarra, et Carlos Vale. « Alzheimer's Disease and Toxins Produced by Marine Dinoflagellates: An Issue to Explore ». *Marine Drugs* 20, nº 4 (avril 2022): 253. https://doi.org/10.3390/md20040253.
11. Camacho, F. García, J.J. Gallardo Rodríguez, A. Sánchez Mirón, E.H. Belarbi, Y. Chisti, et E. Molina Grima. « Photobioreactor Scale-up for a Shear-Sensitive Dinoflagellate Microalga ». *Process Biochemistry* 46, nº 4 (avril 2011): 93644. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.005.
12. Camacho-Muñoz, Dolores, Radisti A. Praptiwi, Linda A. Lawton, et Christine Edwards. « High Value Phycotoxins From the Dinoflagellate Prorocentrum ». *Frontiers in Marine Science* 8 (2 juin 2021): 638739. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.638739.
13. Carroll, Anthony R., Brent R. Copp, Rohan A. Davis, Robert A. Keyzers, et Michèle R. Prinsep. « Marine Natural Products ». *Natural Product Reports* 36, nº 1 (2019): 12273. https://doi.org/10.1039/C8NP00092A.

14. Chambouvet, Aurélie. « Les amoebophryidae (Syndiniales) parasitoïdes de dinoflagellés: cycle de vie, dynamique et spécificité in situ ». *Parasitologie*, 2009, 188. https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01111122
15. Chang, J. -S., P. -L. Show, T. -C. Ling, C. -Y. Chen, S. -H. Ho, C. -H. Tan, D. Nagarajan, et W. -N. Phong. « 11 - Photobioreactors ». In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, édité par Christian Larroche, Maria Ángeles Sanromán, Guocheng Du, et Ashok Pandey, 313-52. Elsevier, 2017. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63663-8.00011-2.
16. Cussatlegras, A. S., et P. Le Gal. « Dinoflagellate Bioluminescence in Response to Mechanical Stimuli in Water Flows ». *Nonlinear Processes in Geophysics* 12, nº 3 (21 février 2005): 337-43. https://doi.org/10.5194/npg-12-337-2005.
17. Davy, Simon K., Denis Allemand, et Virginia M. Weis. « Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76, nº 2 (juin 2012): 229-61. https://doi.org/10.1128/MMBR.05014-11.
18. De Simeis, Davide, et Stefano Serra. « Actinomycetes: A Never-Ending Source of Bioactive Compounds—An Overview on Antibiotics Production ». *Antibiotics* 10, nº 5 (22 avril 2021): 483. https://doi.org/10.3390/antibiotics10050483.
19. DETOURNAY, Olivier, et Patrice MEUNIER. Système, procédé et ensemble pour la culture cellulaire. FR3117505A1, filed 11 décembre 2020, et issued 17 juin 2022. https://patents.google.com/patent/FR3117505A1/fr?oq=FR3117505.
20. Dia, A., L. Guillou, S. Mauger, E. Bigeard, D. Marie, M. Valero, et C. Destombe. « Spatiotemporal Changes in the Genetic Diversity of Harmful Algal Blooms Caused by the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium Minutum* ». *Molecular Ecology* 23, nº 3 (février 2014): 549-60. https://doi.org/10.1111/mec.12617.
21. Dixon, G. K., et P. J. Syrett. « The Growth of Dinoflagellates in Laboratory Cultures ». *New Phytologist* 109, nº 3 (juillet 1988): 297-302. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb04198.x.
22. Errera, R. M., S. Yvon-Lewis, J. D. Kessler, et L. Campbell. « Reponses of the Dinoflagellate Karenia Brevis to Climate Change: PCO2 and Sea Surface Temperatures ». *Harmful Algae* 37 (1 juillet 2014): 110-16. https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.05.012.
23. Flynn, Kevin J. « The importance of the form of the quota curve and control of non-limiting nutrient transport in phytoplankton models ». *Journal of Plankton Research* 30, nº 4 (1 avril 2008): 423-38. https://doi.org/10.1093/plankt/fbn007.
24. Franklin, D. J., et J. A. Berges. « Mortality in Cultures of the Dinoflagellate *Amphidinium Carterae* during Culture Senescence and Darkness ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271, nº 1553 (22 octobre 2004): 20992107. https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2810.
25. Gallardo-Rodríguez, J.j., F. García-Camacho, A. Sánchez-Mirón, L. López-Rosales, Y. Chisti, et E. Molina-Grima. « Shear-Induced Changes in Membrane Fluidity during Culture of a Fragile Dinoflagellate Microalga ». *Biotechnology Progress* 28, nº 2 (2012a): 467-73. https://doi.org/10.1002/btpr.737.
26. Gallardo-Rodríguez, J., A. Sánchez-Mirón, F. García-Camacho, L. López-Rosales, Y. Chisti, et E. Molina-Grima. « Bioactives from Microalgal Dinoflagellates ». *Biotechnology Advances*, Special issue on ACB 2011, 30, nº 6 (1 novembre 2012a): 1673-84. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.07.005.
27. Goldman, Joel C, et Mark R Dennett. « Effect of Nitrogen-Mediated Changes in Alkallnity on PH Control and C02 Supply in Intensive Microalgal Cultures ». *Biotechnology Bioengineering* 24 (mars 1982): 13. https://doi-org.lama.univ-amu.fr/10.1002/bit.260240308.

28. Hackett, Jeremiah D., Donald M. Anderson, Deana L. Erdner, et Debashish Bhattacharya. « Dinoflagellates: A Remarkable Evolutionary Experiment ». *American Journal of Botany* 91, nº 10 (octobre 2004): 1523-34. https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1523.
29. Havskum, Harry, Per Juel Hansen, et Elisa Berdalet. « Effect of Turbulence on Sedimentation and Net Population Growth of the Dinoflagellate *Ceratium Tripos* and Interactions with Its Predator, *Fragilidium Subglobosum* ». *Limnology and Oceanography* 50, nº 5 (septembre 2005): 1543-51. https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.5.1543.
30. Ho, Shih-Hsin, Ming-Chang Chan, Chen-Chun Liu, Chun-Yen Chen, Wen-Lung Lee, Duu-Jong Lee, et Jo-Shu Chang. « Enhancing Lutein Productivity of an Indigenous Microalga Scenedesmus Obliquus FSP-3 Using Light-Related Strategies ». *Bioresource Technology* 152 (janvier 2014): 275-82. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.031.
31. Ho, Shih-Hsin, Po-Jen Li, Chen-Chun Liu, et Jo-Shu Chang. « Bioprocess Development on Microalgae-Based CO2 Fixation and Bioethanol Production Using Scenedesmus Obliquus CNW-N ». *Bioresource Technology* 145 (octobre 2013): 142-49. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.119.
32. Hoppenrath, Mona, Nicolas Chomérat, Takeo Horiguchi, Michael Schweikert, Yukio Nagahama, et Shauna Murray. « Taxonomy and Phylogeny of the Benthic Prorocentrum Species (Dinophyceae)—A Proposal and Review ». *Harmful Algae* 27 (juillet 2013): 1-28. https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.03.006.
33. Hotos, George N., et Despoina Avramidou. « The Effect of Various Salinities and Light Intensities on the Growth Performance of Five Locally Isolated Microalgae [Amphidinium Carterae, Nephroselmis Sp., Tetraselmis Sp. (Var. Red Pappas), Asteromonas Gracilis and Dunaliella Sp.] in Laboratory Batch Cultures ». *Journal of Marine Science and Engineering* 9, nº 11 (16 novembre 2021): 1275. https://doi.org/10.3390/jmse9111275.
34. Jalaal, Maziyar, Nico Schramma, Antoine Dode, Hélène de Maleprade, Christophe Raufaste, et Raymond E. Goldstein. « Stress-Induced Dinoflagellate Bioluminescence at the Single Cell Level ». *Physical Review Letters* 125, nº 2 (6 juillet 2020): 028102. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.125.028102.
35. James, Gabriel O., Charles H. Hocart, Warwick Hillier, G. Dean Price, et Michael A. Djordjevic. « Temperature modulation of fatty acid profiles for biofuel production in nitrogen deprived Chlamydomonas reinhardtii ». *Bioresource technology* 127 (2013): 441-47. https://doi-org.lama.univ-amu.fr/10.1016/j.biortech.2012.09.090.
36. Jiang, Zong-Pei, Yuqi Tong, Mengmeng Tong, Jiajun Yuan, Qin Cao, et Yiwen Pan. « The Effects of Suspended Particulate Matter, Nutrient, and Salinity on the Growth of Amphidinium Carterae Under Estuary Environmental Conditions ». *Frontiers in Marine Science* 8 (12 juillet 2021): 690764. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.690764.
37. Jørgensen, Mårten Flø, Shauna Murray, et Niels Daugbjerg. « Amphidinium Revisited. I. Redefinition of Amphidinium (Dinophyceae) Based on Cladistic and Molecular Phylogenetic Analyses1 ». *Journal of Phycology* 40, nº 2 (2004): 351-65. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03131.x.
38. Juneja, Ankita, Ruben Ceballos, et Ganti Murthy. « Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review ». *Energies* 6, nº 9 (3 septembre 2013): 4607-38. https://doi.org/10.3390/en6094607.
39. Khalil, Zeinab I., Mohsen M. S. Asker, Salwa El-Sayed, et Imam A. Kobbia. « Effect of PH on Growth and Biochemical Responses of Dunaliella Bardawil and Chlorella Ellipsoidea ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, nº 7 (juillet 2010): 1225-31. https://doi.org/10.1007/s11274-009-0292-z.

40. Kitaya Y., Xiao L., Masuda A., Ozawa T., Tsuda M., Omasa K. (2008) Effects of temperature, photosynthetic photon flux density, photoperiod and O2 and CO2 concentrations on growth rates of the symbiotic dinoflagellate, *Amphidinium* sp.. In: Borowitzka M.A., Critchley A.T., Kraan S., Peters A., Sjøtun K., Notoya M. (eds) Nineteenth International Seaweed Symposium. Developments in Applied Phycology, vol 2. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9619-8_36
41. Kornprobst, Jean-Michel. *J.-M. Kornprobst, Substances naturelles d'origine marine, Tec&Doc Lavoisier, 2005, 2 Vol. 1830 pages*, 2005.
42. Kromkamp, Jc, J Beardall, A Sukenik, J Kopecky, J Masojidek, S van Bergeijk, S Gabai, E Shaham, et A Yamshon. « Short-Term Variations in Photosynthetic Parameters of Nannochloropsis Cultures Grown in Two Types of Outdoor Mass Cultivation Systems ». *Aquatic Microbial Ecology* 56 (3 septembre 2009): 309-22. https://doi.org/10.3354/ame01318.
43. Kvíčalová, Zuzana, Jan Alster, Eckhard Hofmann, Petro Khoroshyy, Radek Litvín, David Bína, Tomáš Polívka, et Jakub Pšenčík. « Triplet–Triplet Energy Transfer from Chlorophylls to Carotenoids in Two Antenna Complexes from Dinoflagellate Amphidinium Carterae ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857, nº 4 (avril 2016): 341-49. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2016.01.008.
44. Lauritano, Chiara, Maria Immacolata Ferrante, et Alessandra Rogato. « Marine Natural Products from Microalgae: An -Omics Overview ». Marine Drugs 17, no 5 (7 mai 2019): 269. https://doi.org/10.3390/md17050269.
45. Leal, Miguel, Christopher Sheridan, Ronald Osinga, Gisela Dionísio, Rui Rocha, Bruna Silva, Rui Rosa, et Ricardo Calado. « Marine Microorganism-Invertebrate Assemblages: Perspectives to Solve the "Supply Problem" in the Initial Steps of Drug Discovery ». *Marine Drugs* 12, nº 7 (30 juin 2014): 3929-52. https://doi.org/10.3390/md12073929.
46. Lee, John J, Muki Shpigel, Scott Freeman, Oded Zmora, Sophia Mcleod, Stacea Bowen, Michael Pearson, et A Szostek. « Physiological Ecology and Possible Control Strategy of a Toxic Marine Dinoflagellate, Amphidinium Sp., from the Benthos of a Mariculture Pond ». *Aquaculture* 217, nº 1-4 (mars 2003): 351-71. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00373-3.
47. Li, Meizhen, Xinguo Shi, Chentao Guo, et Senjie Lin. « Phosphorus Deficiency Inhibits Cell Division But Not Growth in the Dinoflagellate Amphidinium carterae ». *Frontiers in Microbiology* 7 (2016). https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00826.
48. Li, Pei-Feng, Gui-Peng Yang, et Chun-Ying Liu. « Combined Effects of Elevated Temperature and PCO2 on the Production of DMSP and DMS in the Culture of Amphidinium Carterae ». *Journal of Applied Phycology* 32, nº 2 (1 avril 2020): 1063-74. https://doi.org/10.1007/s10811-020-02058-8.
49. Lin, Yufeng, Jerome Noir, et Andrew Jackson. « Experimental Study of Fluid Flows in a Precessing Cylindrical Annulus ». *Physics of Fluids* 26, nº 4 (avril 2014): 046604. https://doi.org/10.1063/1.4871026.
50. Liu, Shuya, Zhiming Yu, Xiuxian Song, et Xihua Cao. « Effects of Modified Clay on the Physiological and Photosynthetic Activities of Amphidinium Carterae Hulburt ». *Harmful Algae* 70 (1 décembre 2017): 64-72. https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.10.007.
51. Lobaton, Hugo F. « CULTIVATION OF AMPHIDINIUM CARTERAE IN A BUBBLE COLUMN PHOTOBIOREACTOR: ENERGY DISSIPATION RATE CHARACTERIZATION ». *Journal of Engineering and Applied Sciences* 14, nº 10 (mai 2019): 6. https://www.researchgate.net/publication/333825042
52. López-Rosales, L., A. Sánchez-Mirón, F. García-Camacho, A.R. Place, Yusuf Chisti, et E. Molina-Grima. « Pilot-Scale Outdoor Photobioreactor Culture of the Marine Dinoflagellate

Karlodinium Veneficum: Production of a Karlotoxins-Rich Extract ». *Bioresource Technology* 253 (avril 2018): 94-104. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.101.
53. Maldonado, Elisa M., et Michael I. Latz. « Shear-Stress Dependence of Dinoflagellate Bioluminescence ». *The Biological Bulletin* 212, nº 3 (juin 2007): 242-49. https://doi.org/10.2307/25066606.
54. Malve, Harshad. « Exploring the Ocean for New Drug Developments: Marine Pharmacology ». *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* 8, nº 2 (2016): 83. https://doi.org/10.4103/0975-7406.171700.
55. Mangialajo, Luisa, Anna Fricke, Gala Perez-Gutierrez, Daniela Catania, Cécile Jauzein, et Rodolphe Lemee. « Benthic Dinoflagellate Integrator (BEDI): A New Method for the Quantification of Benthic Harmful Algal Blooms ». *Harmful Algae* 64 (avril 2017): 1-10. https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.03.002.
56. Martínez, Kevin A., Chiara Lauritano, Dana Druka, Giovanna Romano, Teresa Grohmann, Marcel Jaspars, Jesús Martín, et al. « Amphidinol 22, a New Cytotoxic and Antifungal Amphidinol from the Dinoflagellate Amphidinium Carterae ». *Marine Drugs* 17, nº 7 (27 juin 2019): 385. https://doi.org/10.3390/md17070385.
57. MEUNIER, Patrice, et Richard Manasseh. Melangeur sans pale et procede. World Intellectual Property Organization WO2017149034A1, filed 1 mars 2017, et issued 8 septembre 2017. https://patents.google.com/patent/WO2017149034A1/fr?oq=Brevet+:+FR1651703.
58. Meunier, P. « Geoinspired Soft Mixers ». *Journal of Fluid Mechanics* 903 (25 novembre 2020): A15. https://doi.org/10.1017/jfm.2020.634.
59. Molina-Miras, A., A. Morales-Amador, C.R. de Vera, L. López-Rosales, A. Sánchez-Mirón, M.L. Souto, J.J. Fernández, M. Norte, F. García-Camacho, et E. Molina-Grima. « A Pilot-Scale Bioprocess to Produce Amphidinols from the Marine Microalga Amphidinium Carterae: Isolation of a Novel Analogue ». *Algal Research* 31 (avril 2018): 87-98. https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.010.
60. Molina-Miras, Alejandro, Alejandro Bueso-Sánchez, María del Carmen Cerón-García, Asterio Sánchez-Mirón, Antonio Contreras-Gómez, et Francisco García-Camacho. « Effect of Nitrogen, Phosphorous, and Light Colimitation on Amphidinol Production and Growth in the Marine Dinoflagellate Microalga Amphidinium Carterae ». *Toxins* 14, nº 9 (28 août 2022): 594. https://doi.org/10.3390/toxins14090594.
61. Mollo, Pierre, et Anne Noury. *Le manuel du plancton*. Book, Whole. Paris: C. L. Mayer, 2013. https://go.exlibris.link/c52X6Xyl.
62. Nieto, Francisco Rafael, Enrique José Cobos, Miguel Ángel Tejada, Cristina Sánchez-Fernández, Rafael González-Cano, et Cruz Miguel Cendán. « Tetrodotoxin (TTX) as a Therapeutic Agent for Pain ». *Marine Drugs* 10, nº 2 (février 2012): 281-305. https://doi.org/10.3390/md10020281.
63. Ollevier, Anouk, Jonas Mortelmans, Anaïs Aubert, Klaas Deneudt, et Michiel B. Vandegehuchte. « Noctiluca scintillans: Dynamics, Size Measurements and Relationships With Small Soft-Bodied Plankton in the Belgian Part of the North Sea ». *Frontiers in Marine Science* 8 (2021). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2021.777999.
64. Ortholand, Jean-Yves. « Combinatorial Chemistry in the Discovery of New Medicines: 10 Years of Progress ». *ChemInform* 35, nº 23 (8 juin 2004). https://doi.org/10.1002/chin.200423258.
65. Pan, Y, A. D. Cembella, et M. A. Quilliam. « Cell Cycle and Toxin Production in the Benthic Dino¯agellate Prorocentrum Lima ». *Marine Biology* 134 (1999): 541-49.

66. Park Myung Gil, Wonho Yih, et D. Wayne Coats. « Parasites and Phytoplankton, with Special Emphasis on Dinoflagellate Infections1 ». *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 51, nº 2 (mars 2004): 145-55. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00539.x.
67. Parker, N S, A P Negri, D M F Frampton, L Rodolfi, et M R Tredici. « Growth of the Toxic Dinoflagellate Alexandrium Minutum (Dinophyceae) Using High Biomass Culture Systems ». *Journal of Applied Phycology* 14 (octobre 2002): 313-24. https://doi-org.lama.univ-amu.fr/10.1023/A:1022170330857.
68. Posten, Clemens. "Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae." *Engineering in Life Sciences* 9.3 (2009): 165-177. https://doi-org.lama.univ-amu.fr/10.1002/elsc.200900003
69. Putnik, Predrag, Danijela Bursać Kovačević, Anet Režek Jambrak, Francisco Barba, Giancarlo Cravotto, Arianna Binello, Jose Lorenzo, et Avi Shpigelman. « Innovative "Green" and Novel Strategies for the Extraction of Bioactive Added Value Compounds from Citrus Wastes—A Review ». *Molecules* 22, nº 5 (27 avril 2017): 680. https://doi.org/10.3390/molecules22050680.
70. Qiu, Yin-Long, Libo Li, Bin Wang, Zhiduan Chen, Volker Knoop, Milena Groth-Malonek, Olena Dombrovska, et al. « The Deepest Divergences in Land Plants Inferred from Phylogenomic Evidence ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, nº 42 (17 octobre 2006): 15511-16. https://doi.org/10.1073/pnas.0603335103.
71. Radmer, Richard J. « Algal Diversity and Commercial Algal Products ». *BioScience* 46, nº 4 (avril 1996): 263-70. https://doi.org/10.2307/1312833.
72. Rahman Shah, Md Mahfuzur, Kalpa W. Samarakoon, So-Jeong An, You-Jin Jeon, et Joon-Baek Lee. « Growth Characteristics of Three Benthic Dinoflagellates in Mass Culture and Their Antioxidant Properties ». *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 11, nº 4 (15 juin 2016): 268-77. https://doi.org/10.3923/jfas.2016.268.277.
73. Raven, John A., Christopher J. Gobler, et Per Juel Hansen. « Dynamic CO2 and PH Levels in Coastal, Estuarine, and Inland Waters: Theoretical and Observed Effects on Harmful Algal Blooms ». *Harmful Algae* 91 (janvier 2020): 101594. https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.012.
74. Revel, Johana. « Médiateurs Chimiques Dans La Symbiose Cnidaire-Dinoflagellés: Caractérisation, Distribution et Réponse Au Stress ». *Sciences Agricoles*, 2015, 303. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01310668
75. Rifaie-Graham, Omar, Nikolas F. B. Galensowske, Charlie Dean, Jonas Pollard, Sandor Balog, Micael G. Gouveia, Mohamed Chami, et al. « Shear Stress-Responsive Polymersome Nanoreactors Inspired by the Marine Bioluminescence of Dinoflagellates ». *Angewandte Chemie International Edition* 60, nº 2 (11 janvier 2021): 904-9. https://doi.org/10.1002/anie.202010099.
76. Rima, Mohamad, Seyedeh Alavi Naini, Marc Karam, Riyad Sadek, Jean-Marc Sabatier, et Ziad Fajloun. « Vipers of the Middle East: A Rich Source of Bioactive Molecules ». *Molecules* 23, nº 10 (22 octobre 2018): 2721. https://doi.org/10.3390/molecules23102721.
77. Rodriguez, J.J.G., M.delC.C. Garcia, F.G. Camacho, A.S. Miron, E.H. Belarbi, et E.M. Grima. « New Culture Approaches for Yessotoxin Production from the Dinoflagellate Protoceratium Reticulatum ». *Biotechnology Progress* 23, nº 2 (9 avril 2007): 339-50. https://doi.org/10.1021/bp060221u.
78. Romano, G., M. Costantini, C. Sansone, C. Lauritano, N. Ruocco, et A. Ianora. « Marine Microorganisms as a Promising and Sustainable Source of Bioactive Molecules ». *Marine Environmental Research* 128 (juillet 2017): 5869. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.002.

79. Ryderheim, Fredrik, Erik Selander, et Thomas Kiørboe. « Predator-Induced Defence in a Dinoflagellate Generates Benefits without Direct Costs ». *The ISME Journal* 15, nº 7 (juillet 2021): 2107-16. https://doi.org/10.1038/s41396-021-00908-y.
80. Santos, Rita, Oleg Ursu, Anna Gaulton, A. Patrícia Bento, Ramesh S. Donadi, Cristian G. Bologa, Anneli Karlsson, et al. « A Comprehensive Map of Molecular Drug Targets ». *Nature Reviews Drug Discovery* 16, nº 1 (janvier 2017): 19-34. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230.
81. Seto, Drajad S., Lee Karp-Boss, et Mark L. Wells. « Effects of Increasing Temperature and Acidification on the Growth and Competitive Success of Alexandrium Catenella from the Gulf of Maine ». *Harmful Algae* 89 (novembre 2019): 101670. https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101670.
82. Sialve, Bruno, et Jean-Philippe Steyer. « Les microalgues, promesses et défis », 2013.
83. Skulberg, Olav M. « Microalgae as a Source of Bioactive Molecules – Experience from Cyanophyte Research ». *Journal of Applied Phycology* 12 (octobre 2000): 341-48. https://doi.org/10.1023/A:1008140403621.
84. Smayda, T. J. « Community Assembly in Marine Phytoplankton: Application of Recent Models to Harmful Dinoflagellate Blooms ». *Journal of Plankton Research* 23, nº 5 (1 mai 2001): 447-61. https://doi.org/10.1093/plankt/23.5.447.
85. Taylor, D.L. « Taxonomy of some common Amphidinium species ». *British Phycological Journal* 6, nº 2 (31 octobre 1971): 129-33. https://doi.org/10.1080/00071617100650151.
86. Tredici, M.R., N. Bassi, M. Prussi, N. Biondi, L. Rodolfi, G. Chini Zittelli, et G. Sampietro. « Energy Balance of Algal Biomass Production in a 1-Ha "Green Wall Panel" Plant: How to Produce Algal Biomass in a Closed Reactor Achieving a High Net Energy Ratio ». *Applied Energy* 154 (septembre 2015): 1103-11. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.086.
87. Verma, Arjun, Abanti Barua, Rendy Ruvindy, Henna Savela, Penelope A. Ajani, et Shauna A. Murray. « The Genetic Basis of Toxin Biosynthesis in Dinoflagellates ». *Microorganisms* 7, nº 8 (29 juillet 2019): 222. https://doi.org/10.3390/microorganisms7080222.
88. Voser, Tanja M., Max D. Campbell, et Anthony R. Carroll. « How Different Are Marine Microbial Natural Products Compared to Their Terrestrial Counterparts? » *Natural Product Reports* 39, nº 1 (2022): 7-19. https://doi.org/10.1039/D1NP00051A.
89. Wang, Chinchin, et Christopher Q. Lan. « Effects of Shear Stress on Microalgae – A Review ». *Biotechnology Advances* 36, nº 4 (juillet 2018): 986-1002. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.001.
90. Westerhoff, Paul, Qiang Hu, Mario Esparza-Soto, et Wim Vermaas. « Growth parameters of microalgae tolerant to high levels of carbon dioxide in batch and continuous-flow photobioreactors ». *Environmental Technology* 31, nº 5 (14 avril 2010): 523-32. https://doi.org/10.1080/09593330903552078.
91. Wilke, C. R., et Pin Chang. « Correlation of Diffusion Coefficients in Dilute Solutions ». *AIChE Journal* 1, nº 2 (juin 1955): 264-70. https://doi.org/10.1002/aic.690010222.
92. Yeung, P. K. K., et J. T. Y. Wong. « Inhibition of Cell Proliferation by Mechanical Agitation Involves Transient Cell Cycle Arrest at G 1 Phase in Dinoflagellates ». *Protoplasma* 220, nº 34 (1 mars 2003): 17378. https://doi.org/10.1007/s00709-002-0039-2.
93. Zittelli, Graziella Chini, Liliana Rodolfi, Niccoló Bassi, Natascia Biondi, et Mario R. Tredici. « Photobioreactors for Microalgal Biofuel Production ». In *Algae for Biofuels and Energy*, édité par Michael A. Borowitzka et Navid R. Moheimani, 115-31. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_7.