

Table de matières

Remerciements	III
Avant-propos	V
Introduction	XV
 Chapitre I : Microalgues, applications, systèmes de production et modèles de croissance	 1
1.1. Introduction	3
1.2. Microalgues	4
1.3. Utilisation des microalgues	7
1.3.1. Production de biomasse à but alimentaire	8
1.3.2. Production des molécules à haute valeur ajoutée	9
<i>1.3.2.1. Pigments</i>	9
<i>1.3.2.2. Lipides et AGPI</i>	10
<i>1.3.2.3. Polysaccharides</i>	11
<i>1.3.2.4. Substances bioactives</i>	11
1.3.3. Applications environnementales	12
<i>1.3.3.1. Traitement des eaux usées</i>	12
<i>1.3.3.2. Agriculture</i>	13
<i>1.3.3.3. Production de biohydrogène</i>	13
<i>1.3.3.4. Capture de CO₂</i>	14
<i>1.3.3.5. Production de biocarburants</i>	16
<i>1.3.3.6. Systèmes de support de vie : Le Projet MELISSA</i>	18
1.4. Systèmes de production	20

1.4.1.	Définition d'un bioréacteur	21
1.4.2.	Modes de fonctionnement d'un bioréacteur	21
1.4.3.	Ecosystèmes Naturels	22
1.4.4.	Bassins artificiels ouverts	22
1.4.5.	Systèmes industriels fermés : Les photobioréacteurs	23
1.5.	Un point sur les modèles microalgaux	25
1.5.1.	Modélisation des flux de matière ou gazeux	25
1.5.2.	Modèles de cinétique cellulaire	26
1.5.2.1.	<i>Modèles tenant compte de la lumière</i>	26
1.5.2.2.	<i>Modèles tenant compte de la lumière et du carbone</i>	30
1.5.2.3.	<i>Modèles tenant compte d'autres composants du milieu réactionnel</i>	32
1.6.	Conclusion	36
Chapitre II : Identification du modèle		37
2.1.	Introduction	39
2.2.	Profil d'évolution de la biomasse en mode batch	40
2.3.	Microalgue modèle : <i>Porphyridium purpureum</i>	41
2.3.1.	Facteurs physiques	43
2.3.1.1.	<i>Lumière et agitation</i>	43
2.3.1.2.	<i>Température</i>	44
2.3.2.	Facteurs chimiques : Nutriments	44
2.3.2.1.	<i>Source de carbone</i>	44
2.3.2.2.	<i>Source d'azote</i>	45
2.3.2.3.	<i>Source de phosphore</i>	45

2.3.2.4.	<i>Salinité du milieu de culture</i>	46
2.3.2.5.	<i>Autres macro et micronutriments</i>	46
2.3.3.	Milieu de culture	47
2.4.	Matériels et méthodes	48
2.4.1.	Préparation de l'inoculum	48
2.4.2.	Description du dispositif expérimental	49
2.4.3.	Stérilisation du photobioréacteur	50
2.4.4.	Démarrage de la culture	50
2.4.5.	Méthodes de suivi de la croissance	52
2.4.5.1.	<i>Comptage cellulaire par microscopie</i>	52
2.4.5.2.	<i>Comptage cellulaire par granulométrie laser</i>	52
2.4.5.3.	<i>Mesures spectrophotométriques</i>	53
2.4.5.4.	<i>Mesure de la matière sèche</i>	54
2.4.6.	Méthodes de suivi des conditions de culture	55
2.4.6.1.	<i>pH et oxygène dissous</i>	55
2.4.6.2.	<i>Evolution du débit et de la composition du gaz d'alimentation</i>	55
2.4.6.3.	<i>Intensités lumineuses incidente et sortante</i>	55
2.4.6.4.	<i>Carbone inorganique total</i>	56
2.5.	Choix du modèle	60
2.5.1.	Modèle de croissance pour <i>Porphyridium purpureum</i>	60
2.5.2.	Modèle d'évolution du carbone inorganique total (CIT)	62
2.6.	Identification des paramètres	64
2.6.1.	Planification d'expériences	64
2.6.2.	Etude de l'influence de l'apport de CO ₂	66
2.6.3.	Etude de l'influence de l'apport de lumière	70

2.6.4.	Culture à conditions optimales : étude de répétabilité	74
2.6.5.	Étude du transfert gaz-liquide sur le photobioréacteur : Détermination expérimentale du $k_L a CO_2$	76
2.6.6.	Identification des paramètres du modèle	80
2.7.	Validation du modèle de croissance	82
2.8.	Conclusion	86
Chapitre III : Estimation d'état		89
3.1.	Introduction	91
3.2.	Représentation d'état	94
3.3.	Observabilité des systèmes	95
3.3.1.	Définition de l'observabilité	95
3.3.2.	Observabilité d'un système linéaire	95
3.3.3.	Observabilité d'un système non-linéaire	95
3.4.	Filtre de Kalman	98
3.5.	Filtre de Kalman discret	99
3.6.	Filtre de Kalman étendu	100
3.7.	Résultats en mode batch	103
3.8.	Résultats en mode continu	118
3.9.	Conclusion	120
Chapitre IV : Définition de la stratégie de commande et synthèse des lois de commande		121
4.1.	Introduction	123
4.2.	Stratégie de commande	125

4.3.	Modèle retenu	125
4.4.	Commande non-linéaire	126
4.5.	Commande linéaire	128
4.6.	Régulation par PID Ziegler-Nichols	131
4.7.	Commande par retour d'état linéarisant	133
4.7.1.	Linéarisation par retour d'état	133
4.7.2.	Commande du système linéarisé	135
4.7.3.	Mise en œuvre de la commande du photobioréacteur	136
4.7.3.1.	<i>Premier cas : $y = X$</i>	136
4.7.3.2.	<i>Second cas : $y = CIT/X$</i>	137
4.7.4.	Remarque : Platitude	139
4.8.	Régulation par modèle Générique (GMC)	140
4.9.	Commande prédictive non linéaire (CPNL)	142
4.9.1.	Application à la culture de <i>Porphyridium purpureum</i>	142
4.9.2.	Problème d'optimisation	143
4.9.3.	Prise en compte des erreurs du modèle	144
4.9.4.	Résolution du problème d'optimisation : approche séquentielle CVP	145
4.10.	Validation par simulation	148
4.11.	Conclusion	158
Chapitre V : Validation expérimentale		161
5.1.	Introduction	163
5.2.	Nouveau dispositif expérimental : photobioréacteur de 9,6 l.	164
5.3.	Préparation du photobioréacteur	170

5.3.1.	Mesure expérimentale du temps de mélange	171
5.3.2.	Détermination du $k_L a O_2$ et calcul du $k_L a CO_2$	174
5.4.	Précultures et premiers essais	176
5.5.	Résultats expérimentaux	180
5.5.1.	Filtre de Kalman étendu	181
5.5.2.	Lois de commande	188
5.6.	Conclusion	195
Conclusions et Perspectives		197
Références Bibliographiques		203
Annexe A : Matériels et méthodes (Complément)		217
Annexe B : Observabilité du système		233
Annexe C : Résultats expérimentaux (Complément)		237

Rapport-Gratuit.com

Introduction

1. Contexte et Motivations

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques qui attirent l'attention des scientifiques et des industriels en raison de leurs nombreuses potentialités. La principale concerne la production des métabolites d'intérêt thérapeutique ou industriel tels les acides gras polyinsaturés à grande chaîne (AGPI), les pigments, les polysaccharides, les vitamines ou divers composés biologiquement actifs. Mais les microalgues peuvent aussi être utilisées pour la protection de l'environnement en utilisant leur capacité à fixer le dioxyde de carbone et certains métaux lourds lors de leur croissance (traitement des eaux usées, réduction des gaz à effet de serre) et à produire de l'énergie sans dégagement de gaz à effet de serre (production de biofuel).

La recherche de nouvelles technologies permettant la production et l'utilisation d'une énergie propre et renouvelable a remis récemment sur le devant de la scène la production biologique d'hydrogène grâce aux capacités des microalgues. Malgré cela, le monde scientifique ne s'intéresse que depuis peu aux microalgues. Le développement de la biotechnologie des microalgues est ralenti par les performances de croissance limitées dans les photobioréacteurs industriels.

La culture des microorganismes à petite échelle est donc une étape indispensable avant d'aborder la culture à grande échelle. Celle-ci permet de réaliser un grand nombre d'expériences tout en limitant les volumes manipulés, le temps de travail et les coûts de matière première. La production industrielle de ces micro-organismes passe par le développement de photobioréacteurs fermés, stérilisables, contrôlés et à haute productivité.

L'objectif de la culture de microalgues en mode continu est de réguler la concentration en biomasse autour d'une consigne constante tout au long de la période de culture, indépendamment des perturbations que peut subir le système (variation du métabolisme des algues, de l'intensité lumineuse, du pH,...). En l'occurrence, les microalgues sont maintenues

dans la phase de croissance exponentielle, en jouant notamment sur le débit d'alimentation en milieu de culture. La commande de ce système est habituellement réalisée par des commandes simples de type *PID*, réglées par des techniques empiriques (Ziegler-Nichols).

L'objectif de la thèse est de proposer et valider des stratégies de commande pour la culture de microalgues dans un photobioréacteur continu. Pour celà, il faudra choisir une microalgue modèle, identifier les variables influentes et définir les méthodes de mesure ou d'estimation nécessaires à la mise en place d'un contrôle de la production.

Ce travail est le résultat de la coopération entre l'Ecole Centrale Paris ECP et l'Ecole Supérieure d'Electricité SUPELEC qui ont décidé de réunir leurs compétences et leur savoir-faire par l'association de deux équipes. L'une est l'équipe Bioprocédés du Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux de l'ECP qui développe une importante activité expérimentale dans le domaine des procédés de culture de microalgues, et met en œuvre, à partir de ses expériences, des modèles dynamiques de croissance de microalgues. L'autre est le Département d'Automatique de SUPELEC qui travaille sur la conduite de bioréacteurs, notamment dans le domaine de la commande prédictive, et qui développe également des compétences dans le secteur des capteurs logiciels.

2. Méthodologie de travail et apport de la thèse

L'axe central de ce travail de thèse est de proposer des nouvelles technologies de commande et de surveillance automatique du procédé qui s'avèrent essentielles pour atteindre deux objectifs : la maîtrise de la qualité de la biomasse produite et la diminution des contraintes et des coûts de fonctionnement.

Une première étape consiste à choisir une microalgue, à établir un modèle pour sa croissance et à calibrer les paramètres cinétiques et de transfert de l'énergie lumineuse à partir de campagnes expérimentales dans de petits photobioréacteurs (2,5 litres).

La microalgue choisie en tant que microorganisme modèle est *Porphyridium purpureum*. Elle a été retenue suite aux expériences menées par le Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux (LGPM) de l'Ecole Centrale Paris sur la culture de cette espèce, dont les paramètres essentiels sont aujourd'hui connus et maîtrisés. Il existe aussi un grand nombre de données disponibles et de travaux la concernant. Cette microalgue est une source importante d'acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont essentiels pour les humains et utilisés également dans la nutrition animale. Elle possède de nombreux pigments comme la

chlorophylle *a* et *d* et des phycobiliprotéines (phycoérythrine et phycocyanine) et produit des polysaccharides, ce qui attire l'attention des industriels.

Les paramètres du modèle ont été obtenus à partir des données acquises le long de la phase exponentielle de la culture de *Porphyridium purpureum* sous différentes conditions expérimentales. L'aspect de validation du modèle de croissance sur les données expérimentales a été particulièrement abordé. Les variables influentes, les méthodes de mesure et d'estimation nécessaires à la mise en place d'un système de commande de la production ont été identifiées.

Dans un deuxième temps, la combinaison d'un modèle du système avec certaines mesures physiques au sein d'un algorithme d'observation d'état ont permis d'élaborer un capteur logiciel qui fournit une bonne estimation des états du système et particulièrement de ceux qui ne sont pas mesurés par des capteurs physiquement installés sur le dispositif expérimental ou obtenus à l'issue de longues et coûteuses analyses. Il s'agit notamment de l'estimation de la concentration en biomasse qui n'est obtenue que par des mesures hors-ligne, ce qui est incompatible avec la mise au point d'un système de commande et de régulation de cette variable.

A partir des résultats obtenus sur le photobioréacteur de 2,5 litres, et dans le but de mettre au point un système de commande et de régulation, un nouveau photobioréacteur de 9,6 litres, fonctionnant en mode continu a été utilisé. Dans le cas de ce travail plusieurs dispositifs de mesure et de commande ont été mis en place. Cela a permis d'accéder à l'évolution des principales variables (CO_2 dissous ; O_2 dissous, pH, intensité lumineuse). Ces capteurs physiques ont été très utiles pour l'obtention d'un maximum de mesures en temps réel afin de valider le capteur logiciel proposé.

Nous proposons plusieurs démarches pour la commande de la culture de microalgues. Il s'agit de techniques plus élaborées combinées avec des régulateurs linéaires classiques : commande non-linéaire et linéaire, commande par modèle générique GMC, commande linéarisante par retour d'état et commande prédictive non-linéaire. A partir du modèle identifié, les lois de commande citées précédemment ont été mises en œuvre et testées en simulation. Cependant, ces types de commande sont fortement dépendants de la précision et de la fiabilité des mesures des états. Aussi, puisque les états ne sont pas toujours faciles à mesurer en ligne (notamment la concentration en biomasse), le filtre de Kalman étendu a été couplé au système de commande. Les essais en simulation nous ont permis de choisir une loi

de commande, de la mettre au point et de la valider expérimentalement sur le photobioréacteur continu de 9,6 litres. La réalisation d'expériences a permis d'analyser et de valider le comportement de notre capteur logiciel et des lois de commande sur le système réel à l'origine de ce travail méthodologique.

3. Organisation de la thèse

Cette thèse essaie d'aider au développement de la biotechnologie des microalgues qui est ralenti par les performances de croissance limitées dans les photobioréacteurs industriels. En plus de la partie d'introduction et d'une partie dédiée aux conclusions et perspectives, ce manuscrit est divisé en cinq chapitres dont le détail est donné ci-dessous.

Chapitre I : Microalgues : applications, systèmes de production et modèles de croissance

Ce premier chapitre est consacré à une présentation générale des microalgues ainsi que de leurs possibilités d'exploitation : production de biomasse à but alimentaire, production de molécules à haute valeur ajoutée et applications environnementales. Ensuite, une description des systèmes de production de microalgues est présentée. L'objectif est de familiariser le lecteur non-spécialiste en bioprocédés avec ces microorganismes. Par ailleurs, un récapitulatif de modèles développés pour expliquer la croissance microalgale est exposé. Parmi ces modèles, nous allons choisir le modèle de simulation qui sera simplifié et utilisé comme modèle de commande dans les chapitres ultérieurs.

Chapitre II : Identification du modèle

Le choix de la microalgue à étudier, d'un modèle pour le système, l'identification des paramètres ainsi que la validation du modèle, à partir de données expérimentales, sont présentés dans ce chapitre.

Porphyridium purpureum est la microalgue retenue pour cette étude. Les facteurs physiques (lumière, agitation, température) et chimiques (différents nutriments) les plus importants et nécessaires pour sa croissance ainsi que le milieu de culture utilisé sont exposés. Cette microalgue sera, dans un premier temps, cultivée en mode batch dans des photobioréacteurs de 2,5 litres. Le protocole opératoire (la préparation de l'inoculum, la définition des paramètres de culture, la stérilisation du réacteur et le démarrage de la culture) ainsi que les méthodes à utiliser pour le suivi de la croissance et des conditions de culture sont détaillés.

Le choix du modèle s'est fait en considérant que la lumière et le dioxyde de carbone ont une influence importante sur la croissance cellulaire. Le modèle dynamique retenu, établi au laboratoire de Génie de Procédés et Matériaux (LGPM), combine les bilans massiques de chaque constituant macroscopique (*biomasse* et *carbone inorganique total*), le modèle de transfert du CO_2 , le modèle de cinétique cellulaire établi par Baquerisse (1999) et le modèle relatif à l'énergie lumineuse de Krystallidis (1994).

Le modèle retenu comporte treize paramètres dont cinq sont spécifiques à la microalgue utilisée et dépendent des conditions de culture. Notre démarche consistera à identifier ces paramètres à partir des résultats expérimentaux (étude de l'influence de l'intensité lumineuse incidente et du pourcentage de CO_2 dans le gaz d'alimentation) à l'aide du logiciel *Aspen Custom Modeler*®. La valeur du coefficient de transfert gaz-liquide $k_L a(CO_2)$ sera déterminée expérimentalement. Les sept autres paramètres seront calculés ou repris dans la littérature. Enfin, une étape de validation, fondamentale pour pouvoir démontrer que le modèle atteint bien les objectifs qui lui ont été assignés, est réalisée sur les jeux de données non utilisées pour l'identification des paramètres.

Chapitre III : Estimation d'état

Le développement d'un capteur logiciel (filtre de Kalman étendu) pour estimer la concentration en biomasse à partir du modèle du procédé et de la mesure de la concentration en carbone inorganique total fait l'objet du chapitre III. Une description de l'algorithme qui combine le modèle d'observation et les mesures physiques nécessaires pour obtenir une estimation des valeurs des variables d'état est donnée. A l'aide des simulations numériques (sous *Matlab*® et *Simulink*®) et des données expérimentales, l'efficacité de l'approche proposée est démontrée. Pour le lecteur non-spécialiste en Automatique, des notions de base sont présentées.

Chapitre IV : Définition de la stratégie de commande et synthèse des lois de commande

La conception des différentes lois de commande adaptées à notre bioprocédé est traitée dans ce chapitre. Une introduction synthétique de certains concepts de base de l'automatique est présentée. Ensuite, la conception des différentes lois de commande adaptées à la culture de microalgues dans un photobioréacteur est abordée : commandes non-linéaire et linéaire, régulation par *PID*, commande par modèle générique GMC, commande linéarisante par retour

d'état et commande prédictive non-linéaire CPNL. A l'aide des simulations numériques, les différentes stratégies sont comparées et leur efficacité est démontrée.

Chapitre V : Validation expérimentale

Ce chapitre présente le dispositif expérimental conçu pour la validation de l'estimateur d'état et des lois de commande choisies. Il s'agit d'un photobioréacteur de 9,6 litres (volume utile) de type colonne à bulles, similaire à ceux de 2,5 litres utilisés pour l'identification et la validation du modèle mathématique. La préparation et la mise en route du photobioréacteur sont abordées. Des essais en mode continu, ici présentés, ont permis de valider en temps réel le filtre de Kalman étendu et les lois de commande choisies.

Conclusions et Perspectives

Cette dernière partie expose le bilan des travaux réalisés et présentés dans ce mémoire. Des perspectives dans la continuité du sujet abordé sont proposées, en particulier en ce qui concerne l'implémentation de la commande prédictive sur le photobioréacteur pilote et l'application des algorithmes proposés à d'autres microalgues.

Annexes

Ce mémoire inclut trois annexes, une première décrivant les matériels et méthodes utilisés dans cette thèse, en complément de l'information donnée dans le chapitre II du mémoire, une deuxième détaillant la démonstration de l'observabilité du système et une troisième regroupant les résultats des expériences non utilisées pour la validation des lois de commande.

Chapitre I

Table de matières

1.1.	Introduction	3
1.2.	Microalgues	4
1.3.	Utilisation des microalgues	7
1.3.1.	Production de biomasse à but alimentaire	8
1.3.2.	Production des molécules à haute valeur ajoutée	9
1.3.2.1.	Pigments	9
1.3.2.2.	Lipides et AGPI	10
1.3.2.3.	Polysaccharides	11
1.3.2.4.	Substances bioactives	11
1.3.3.	Applications environnementales	12
1.3.3.1.	Traitement des eaux usées	12
1.3.3.2.	Agriculture	13
1.3.3.3.	Production de biohydrogène	13
1.3.3.4.	Capture de CO ₂	14
1.3.3.5.	Production de biocarburants	16
1.3.3.6.	Systèmes de support de vie : Le Projet MELISSA	18
1.4.	Systèmes de production	20
1.4.1.	Définition d'un bioréacteur	21
1.4.2.	Modes de fonctionnement d'un bioréacteur	21
1.4.3.	Ecosystèmes Naturels	22
1.4.4.	Bassins artificiels ouverts	22
1.4.5.	Systèmes industriels fermés : Les photobioréacteurs	23
1.5.	Un point sur les modèles microalgaux	25
1.5.1.	Modélisation des flux de matière ou gazeux	25
1.5.2.	Modèles de cinétique cellulaire	26
1.5.2.1.	Modèles tenant compte de la lumière	26
1.5.2.2.	Modèles tenant compte de la lumière et du carbone	30
1.5.2.3.	Modèles tenant compte d'autres composants du milieu réactionnel	32
1.6.	Conclusion	36

Microalgues : applications, systèmes de production et modèles de croissance

1.1. Introduction

Au cours de ces dernières années, l'activité de recherche dans le domaine des microalgues s'est accrue et l'on connaît mieux maintenant leurs potentialités. Ainsi l'intérêt industriel vis-à-vis de ces microorganismes photosynthétiques va croissant. Leur application la plus importante concerne la production de molécules à haute valeur ajoutée mais il est aussi envisageable d'utiliser les microalgues pour des applications environnementales : capture de CO_2 , traitement des eaux usées et production d'engrais. Plus récemment un regain d'intérêt est né de la possibilité de produire des biocarburants comme une des énergies alternatives du futur.

Ce premier chapitre est consacré à une présentation générale des microalgues, et plus particulièrement de leur rôle sur notre planète, ainsi que des nouvelles possibilités d'exploitation de ces microorganismes. Nous proposerons ensuite une description des systèmes de production de microalgues et un récapitulatif de modèles développés pour expliquer leur croissance.

1.2. Microalgues

Avant l'apparition de la vie, l'atmosphère de la Terre était riche en gaz carbonique et en méthane. Ce sont dans ces conditions hostiles que les premiers microorganismes sont apparus : les cyanobactéries il y a 3,5 milliards d'années et les eucaryotes il y a 1,8 milliards d'années (Pflug, 1987). Ces algues bleues, rouges, vertes et brunes ont joué et jouent encore un rôle essentiel sur la planète. C'est grâce à ces organismes que l'atmosphère initiale hostile au développement d'espèces animales a été transformée en cette atmosphère respirable que l'on connaît aujourd'hui. Comme toutes les plantes, les microalgues sont capables, grâce à la photosynthèse, de recycler le dioxyde de carbone en oxygène et de convertir l'énergie solaire en une matière première constituant la base de la chaîne alimentaire des autres êtres vivants.

Au cours de leur évolution, ces microorganismes ont pu coloniser la quasi-totalité des niches écologiques dont la plupart sont des milieux extrêmes. Leur capacité d'adaptation à n'importe quel type de milieu est remarquable car ils peuvent fabriquer des structures de résistance lorsque les conditions écologiques sont défavorables. Ainsi, nous pouvons trouver des microalgues dans des environnements acides, alcalins, et même riches en acide sulfhydrique. D'autres supportent le froid ou au contraire les hautes températures ou la sécheresse (Couté, 1995). La plupart des algues se développent en milieu aquatique mais certaines sont terrestres et sont même capables de se développer sur les troncs des arbres ou façades des maisons. Cette adaptabilité à des conditions environnementales diverses s'explique d'une part grâce à un polymorphisme avec une certaine résistance développée lorsque les conditions sont défavorables à leur développement et, d'autre part, grâce à la production de métabolites en fortes concentrations lorsque leur milieu est modifié. Cette adaptation à des milieux très différents explique la variété d'espèces qui comporte actuellement, selon les estimations, entre 20 000 et 40 000 espèces différentes (Thurman, 1997). Malgré cela, le monde scientifique ne s'intéresse que depuis peu aux microalgues. Leur étude reste limitée à une cinquantaine d'espèces clairement identifiées et à une vingtaine réellement exploitées.

Contrairement aux végétaux aquatiques que l'on appelle communément « algues », l'existence des microalgues est ignorée du grand public. Ces organismes se distinguent de leurs congénères, par leur taille de l'ordre de quelques micromètres. En

conséquence, à l'œil nu, une microalgue est totalement invisible. Quelquefois et grâce à des conditions environnementales favorables, elles forment des « efflorescences » massives et monospécifiques (appelées fleur d'eau ou *bloom* en anglais) qui peuvent entraîner une coloration des eaux (cf. tableau 1.1) (Couté, 1995).



Figure 1.1 : Coloration des surfaces des étangs due à la prolifération des microalgues.

(D'après <http://www.watertwinning.saglik.gov.tr>)

On peut trouver également, des microalgues sous la forme d'un revêtement gluant appelé « biofouling » sur les structures immergées comme les coques de bateaux. Certaines espèces s'installent sur les murs des monuments ou sur les troncs des arbres en leur donnant une coloration très vive qui permet de les identifier (cf. figure 1.2). D'autres microalgues vivent en symbiose avec des animaux (coraux, mollusques) et aussi, avec des champignons en formant des lichens.



Figure 1.2 : Présence des microalgues sur les troncs des arbres (a. et b.) et monuments (c.).

(D'après <http://www.watertwinning.saglik.gov.tr>)

Les microalgues appartiennent au règne des eucaryotes caractérisés principalement par l'absence de racines, de tissus vasculaires et de feuilles mais possédant de la chlorophylle ainsi que d'autres pigments pour réaliser la photosynthèse.

Les cyanobactéries ont une morphologie proche des algues « *stricto sensus* » et sont capables de réaliser une photosynthèse aérobie. C'est pourquoi elles sont classées dans la catégorie des cyanophycées ou des algues bleues. Cependant, elles ne possèdent pas certains organites intracellulaires propres aux eucaryotes (noyau, mitochondrie, chloroplaste). La mureïne présente dans la paroi cellulaire montre une affinité bactérienne particulière (Skulberg *et al*, 1993).

Les modes de multiplication ou reproduction de ces microorganismes sont très variés et constituent souvent des outils de classification. Les microalgues se multiplient soit par scission des cellules en deux parties jusqu'à la production des spores, soit en se transformant directement en gamète où en engendrant ceux-ci dans des cellules particulières.

Leur morphologie est aussi diversifiée que leur physiologie, leur manière de se multiplier et de se reproduire. Des cellules sphériques sont les plus souvent rencontrées (*Haematococcus*, *Porphyridium*, *Nannocloropsis*) mais il existe aussi, des cellules en forme de spirale (*Arthrospira* ou Spiruline), d'étoile (*Staurastrum*) ou de croissant (*Closterium*) (cf. figure 1.3).

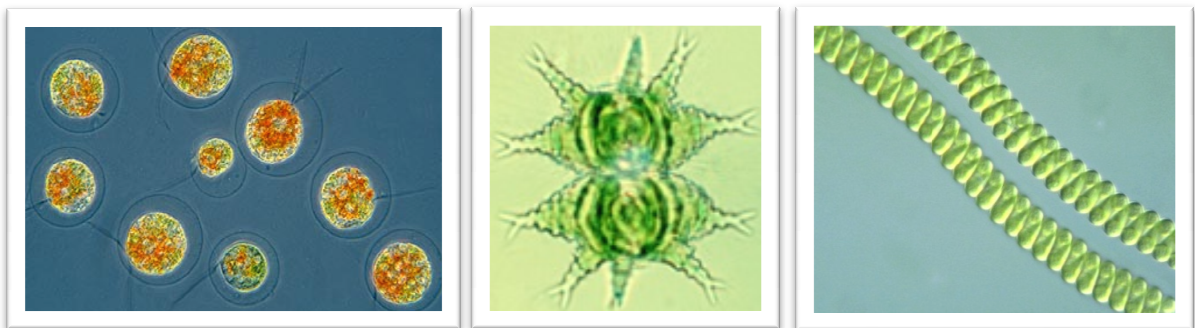


Figure 1.3 : Quelques exemples de microalgues : *Haematococcus*, *Staurastrum* et *Spirulina*.

(D'après <http://www.microscopy-uk.org.uk> and <http://protist.i.hosei.ac.jp>)

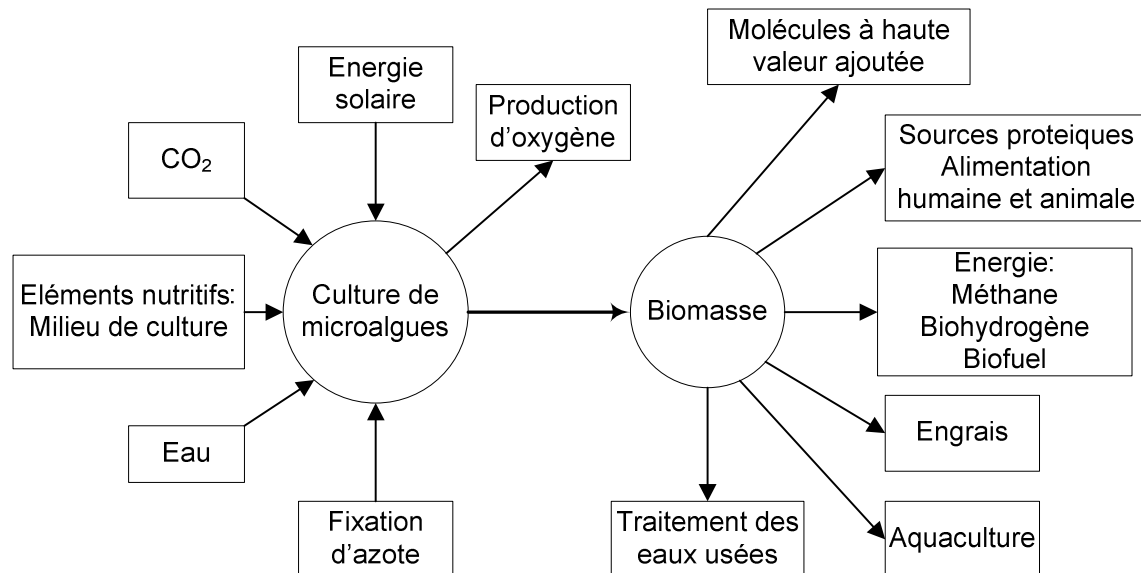
Concernant la nutrition, la plupart des microalgues sont photoautotrophes, c'est-à-dire qu'elles utilisent le CO_2 comme source de carbone et qu'elles tirent leur énergie de la photosynthèse. Cependant, il existe aussi des microalgues hétérotrophes qui sont capables d'utiliser une source de carbone organique pour se développer. Les différents modes de nutrition des microalgues sont résumés dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 : Modes de nutrition des microalgues

<i>Microalgues</i>	Source de Carbone		Source d'énergie	
	CO_2	Composés organiques	Lumière	Oxydation des composés organiques ou inorganiques
Photoautotrophe	✓		✓	
Photohétérotrophe		✓	✓	
Chimioautotrophe	✓			✓
Chimiohétérotrophe		✓		✓

1.3. Utilisation des microalgues

Il est possible de décomposer l'utilisation des microalgues dans l'industrie en trois parties : la production de biomasse à but alimentaire, la production de molécules spécifiques dites à haute valeur ajoutée et les applications environnementales. La seconde s'intéresse à certains composés biochimiques des microalgues et regroupe la plupart des applications industrielles.

**Figure 1.4 : Domaines d'application des cultures de microalgues**

1.3.1. Production de biomasse à but alimentaire

L'utilisation des microalgues comme source de nourriture vient des pratiques ancestrales de populations sujettes à la famine. Les chinois utilisaient la microalgue *Nostoc commune* pour assurer l'alimentation il y a plus de 2000 ans (Danxiang *et al.*, 2004). Actuellement, la plus connue dans ce domaine est une microalgue appelée *Arthrospira platensis*, ou Spiruline, que l'on trouve comme complément à l'alimentation dans de nombreux pays comme le Japon, l'Inde ou le Mexique (Richmond, 1987 ; Vonshak, 1997 ; Fox, 1999). Elle joue dans certains pays un rôle essentiel, comme sur les bords du lac Tchad, où elle est récoltée et consommée depuis toujours et représente actuellement la ressource principale pour faire face à la famine (Vonshak, 1997 ; Borowitzka, 1999 ; Fox, 1999 ; Hu, 2004).

Le contenu élevé en protéines (entre 12 et 65 % de la matière sèche d'après Coutteau, 1996) de plusieurs espèces de microalgues est une des principales raisons pour les considérer comme une source non conventionnelle de protéines (Cornet, 1998 ; Fox, 1999, Soletto *et al.*, 2005). De plus, grâce à leur capacité à synthétiser tous les acides aminés, elles représentent une source potentielle pour l'apport de ces molécules aux humains et aux animaux.

Leur contenu en lipides varie entre 1 et 70% de la matière sèche (M.S.). Les lipides algaux sont composés de glycérol, d'acides gras estérifiés, saturés ou non saturés. Les microalgues représentent aussi une source importante de presque toutes les vitamines essentielles et sont également riches en pigments (Becker, 2004a).

Alors que ces microorganismes sont bénéfiques dans la nutrition humaine, ils sont également incorporés dans l'alimentation d'animaux comme les poissons, les animaux domestiques ou d'élevage. Une partie considérable (30%) de la production mondiale de microalgues est destinée à l'alimentation animale (Becker, 2004a). Ainsi, leur petite taille confère aux microalgues un rôle essentiel dans l'élevage larvaire de certains mollusques et poissons, dans la nutrition de crevettes et comme nutriment de base dans les écloséries d'huîtres ou de palourdes. Elles sont aussi utilisées indirectement pour l'élevage des turbots, en nourrissant le zooplancton qui sert ensuite de nourriture aux jeunes turbots (Muller-Feuga, 2000 ; Becker, 2004b).

1.3.2. Production des molécules à haute valeur ajoutée

Alors que les applications alimentaires proviennent le plus souvent de coutumes ancestrales, la production de molécules à haute valeur ajoutée est beaucoup plus récente. Ces molécules peuvent être extraites lorsque leur concentration est suffisante. La microalgue est alors cultivée pour un élément particulier de sa composition. Parmi ces molécules on trouve : les pigments, les acides gras, les polysaccharides et les composés bioactifs.

1.3.2.1. Pigments

Dans leur milieu naturel, on trouve différentes espèces de microalgues se développant à des profondeurs d'eau bien différentes. Certaines d'entre elles, se trouvant en eau profonde, et donc, éloignées du soleil, ont subi une évolution biochimique permettant d'accroître la variété de leurs pigments afin d'élargir leur spectre d'absorption pour capter les radiations lumineuses nécessaires à la photosynthèse. Ceci explique la diversité des couleurs rencontrées chez les microalgues, qui vont du vert au rouge, en passant par le bleu.

En plus de la chlorophylle (0,5 à 1% de la matière sèche (M.S.)) qui est le pigment photosynthétique primaire chez toutes les algues photosynthétiques, on trouve toute une gamme de pigments supplémentaires de type caroténoïdes (0,1 à 0,2% de la M.S.) et phycobiliprotéines (phycoérythrine et phycocyanine). Les pigments principalement exploités sont la phycocianine d'*Arthrospira platensis* (spiruline), la phycoérythrine de *Porphyridium purpureum*, l'astaxanthine d'*Haematococcus pluvialis* ou le β -carotène de *Dunaliella salina* (Becker, 2004a ; Dufossé *et al.*, 2005).

Les applications de la production de pigments sont variées. Les caroténoïdes sont utilisés principalement en tant que colorant naturel alimentaire (jus d'orange par exemple) et comme additif dans l'alimentation animale (pour donner une couleur orangée à la chair du poisson et au jaune d'œuf de la poule) mais ils trouvent aussi des applications dans la cosmétique (Del Campo *et al.*, 2000 ; Mojaat *et al.*, 2007)). D'ailleurs, ils agissent comme provitamine A (García-González *et al.*, 2005). Un effet thérapeutique préventif vis-à-vis du cancer est aussi parfois attribué à ces molécules (Guerin *et al.*, 2003). Par contre, les phycobiliprotéines sont largement utilisées dans des laboratoires en immunologie. En

effet, leurs propriétés en font des réactifs fluorescents hautement sensibles et très puissants (Hu, 2004).

1.3.2.2. Lipides et AGPI

Les microalgues ont un avantage sur les espèces oléagineuses terrestres : elles peuvent accumuler jusqu'à 50% de leur poids sec en acides gras, permettant d'envisager des rendements à l'hectare supérieurs aux espèces oléagineuses terrestres.

Parmi tous les acides gras présents dans leur composition, certains ont un intérêt spécifique : l'acide γ -linolénique GLA (18 :3, *cis* 6, 9, 12), l'acide arachidonique AA (20 :4 *cis* 5, 8, 11, 14), l'acide eicosapentaénoïque EPA (20 :5 *cis* 5, 8, 11 14, 17) et l'acide docosahexaénoïque DHA (22 :6 *cis* 4, 7, 10, 13, 16, 19) (Certik et Shimizu, 1999).

A l'heure actuelle, les lipides neutres comme les triglycérides et les acides gras libres (estérifiés ou non) sont les plus exploités dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Ces lipides neutres sont obtenus à partir des huiles de poisson. Leur caractéristique principale est la présence des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI). Les microalgues sont riches en AGPI et présentent l'avantage de ne pas contenir de cholestérol, de ne pas avoir d'odeur et de goût désagréables et d'être cultivables en photobioréacteurs. Elles représentent une alternative intéressante face à la production d'AGPI à partir des huiles de poisson. Quelques espèces de microalgues comme *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium*, *Nitzschia laevis*, *Mortierella*, *Pythium* et *Parietochloris incisa* ont montré un énorme potentiel de production industrielle présentant entre 7 et 50 % d'EPA dans leur huiles (Certik et Shimizu, 1999 ; Khozing-Goldberg *et al.*, 2006).

La présence des glycolipides comme les acides gras polyinsaturés à longues chaînes leur permettent d'entrer sur le marché des réactifs biochimiques et de la recherche médicale grâce aux propriétés anti HIV prometteuses (Muller-Feuga, 1997).

Les phospholipides constituent également une opportunité de valorisation intéressante des microalgues. Présents dans tous les organismes, ils participent à des fonctions cellulaires diverses. Ce sont des vecteurs d'acides gras ou des principes actifs grâce à leur double polarité (hydrophobe et hydrophile). Aujourd'hui, un mélange de

phospholipides est commercialisé dans les secteurs agroalimentaire et pharmaceutique sous le nom générique de lécithine obtenue à partir du soja.

1.3.2.3. Polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères solubles dans l'eau, ce qui leur donne des propriétés rhéologiques intéressantes particulièrement utiles dans l'industrie alimentaire pour gélifier certains liquides et en cosmétique, comme épaississants de crèmes. Des effets anti-cancérigènes leur ont aussi été attribués (Girardin-Andréani, 2005).

Certaines espèces de microalgues comme *Porphyridium purpureum* et *Arthrospira platensis*, synthétisent des exopolysaccharides de nature hydrophile et polyanionique (Becker, 2004a), capables de retenir l'eau et piéger les cations empêchant la dessiccation de la cellule. Ces propriétés de concentration ont suggéré des applications biotechnologiques dans le domaine de l'environnement via la détoxification de milieux pollués par les métaux lourds (Pb, As, Hg, Cd.) et dans le domaine de la biorécupération de métaux comme l'or et l'uranium.

1.3.2.4. Substances bioactives

Un grand nombre de substances ayant une activité biologique intéressante ont été trouvés dans l'environnement marin. Une étude systématique des extraits algaux à démarré dans les années cinquante avec l'identification des produits antibiotiques. Les microalgues représentent une source potentielle de molécules qui sont difficiles à obtenir par voie synthétique (Muller-Feuga, 1997). Ces molécules qui présentent des propriétés antibiotiques, antivirales, antiradicalaires et antiprolifératrices ont fait l'objet de nombreux travaux.

Des tests réalisés *in vitro* montrent des activités antibiotiques chez certaines microalgues. Une activité antivirale a été révélée chez les cyanobactéries principalement dans un produit extracellulaire chez *Arthrospira platensis* contre le virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1), le virus de l'herpès simplex 1 et le herpès virus humain type 6 (HHV-6). Chez *Porphyridium purpureum*, des essais *in vitro* sur ses exopolysaccharides (EPS) montrent une activité antivirale contre le cytomégalovirus humain (HCMV) (Rechter *et al.*, 2006). Dans certains cas, les toxicités ou inactivités *in vivo* de ces substances réduisent leurs potentielles applications médicales.

La microalgue *Porphyridium purpureum* produit également, des superoxydes dismutases (SOD), substances à activité antiradicalaire utilisées dans le traitement de pathologies chroniques comme le SIDA et certaines formes de cancers (Gorecki *et al.*, 1991 ; Kurth *et al.*, 2007). Des soins cosmétiques anti-âge sont aussi fabriqués en utilisant des propriétés antiradicalaires d'origine microalgale.

1.3.3. Applications environnementales

Les caractéristiques biochimiques et physiologiques des microalgues sont aussi exploitées pour des applications concernant l'environnement : elles se révèlent utiles pour dépolluer les eaux usées, pour capturer et valoriser le CO_2 et pour produire de l'énergie propre comme les biocarburants.

1.3.3.1. Traitement des eaux usées

Depuis plusieurs dizaines d'années, diverses installations ont été construites pour le traitement des eaux usées. Il s'agit des bassinsensemencés d'une microalgue particulière (généralement des algues vertes : *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Skeletonema* et *Scenedesmus*) (Metting, 1996 ; Hussenot *et al.*, 1998) qui sont remplis d'eau polluée. Les microalgues y sont utilisées de deux façons (cf. figure 1.5), soit directement, en se servant de leur capacité à fixer certains métaux lourds ainsi que d'autres composés organiques toxiques, soit indirectement, pour fournir de l'oxygène dissous aux bactéries qui se chargeront de dépolluer l'eau contaminée (Cañizares *et al.*, 1993). Des techniques comme l'immobilisation des cellules microalgales sur un support permettant de récupérer en continu des métabolites sécrétés dans le milieu de culture ont été mises au point ces dernières années (Patnaik *et al.*, 2001).

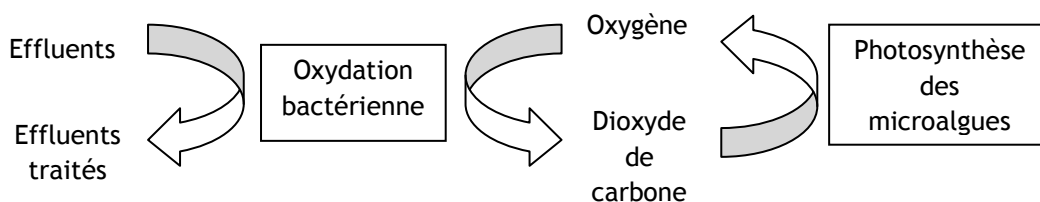


Figure 1.5 : Utilisation de microalgues pour le traitement des eaux usées

La culture des microalgues en eaux usées combine l'avantage de traiter ces dernières en produisant au même temps de la biomasse algale qui peut être exploitée pour produire d'autres molécules intéressantes ou de l'énergie. Le challenge reste à trouver un

système dans lequel les déchets résiduels, les microalgues et la production d'énergie pourraient cohabiter avec de bonnes performances techniques et économiques.

1.3.3.2. Agriculture

La biomasse algale est connue pour améliorer la composition minérale des sols et leur capacité de liaison avec l'eau (Riley, 2002). Ce sont les cyanobactéries qui, grâce à leur capacité de fixer l'azote gazeux, contribuent à maintenir la fertilité des écosystèmes naturels ou de cultures. Leur présence dans les champs de riz améliore la qualité des récoltes. Malgré tout, c'est une technique qui n'a pas été adoptée largement par les agriculteurs mais qui mérite d'être reconsidérée et améliorée (Roger, 2004). Par exemple, au Japon, *Chlorella vulgaris*, est utilisée pour stimuler la biosynthèse de chlorophylle ce qui améliore la croissance des plantes. Elle est aussi considérée comme un engrais car elle favorise la croissance d'actinomycètes, bactéries utiles dans le sol (Yamaguchi, 1997).

1.3.3.3. Production de biohydrogène

L'hydrogène est un vecteur d'énergie et non une source. Il n'est ni toxique, ni polluant et est plus énergétique que le pétrole ou le gaz naturel. Il est très abondant sous forme d'eau mais il est difficile de le trouver à l'état pur. Deux techniques actuellement utilisées permettent de produire de l'hydrogène : l'électrolyse à partir de l'eau et le *vaporeformage* à partir des dérivés des combustibles fossiles. Les rendements obtenus sont très faibles (25% en électrolyse) et le dégagement de CO_2 reste élevé.

La découverte de la photoproduction d'hydrogène par les microalgues est attribuée à Hans Gaffron en 1939 (Melis and Happe, 2006). Certaines microalgues vertes et cyanobactéries produisent de l'hydrogène de façon transitoire lors de la photosynthèse grâce à l'enzyme hydrogénase. Le problème majeur de cette technique vient du fait que la production d'hydrogène est une voie de secours qui permet de faciliter la survie de la cellule dans des conditions d'anoxie et qu'une fois que la cellule retrouve son fonctionnement « classique » et produit de l'oxygène, la production d'hydrogène s'arrête.

Chlamydomonas reinhardtii est la microalgue la plus étudiée. Elle est capable de produire de l'hydrogène grâce à une hydrogénase à fer chloroplastique (Melis and Happe, 2001) qui est extrêmement sensible à l'oxygène (Ghirardi *et al.*, 2000) et qui n'est active qu'en conditions anaérobies. Une fois activée, elle est capable d'induire un

dégagement d' H_2 à la lumière. Aujourd'hui, la séparation temporelle des phases oxygénique et anaérobie, est la technique de production d' H_2 la plus efficace à partir de cette microalgue. En plaçant des cellules en anoxie et en ajoutant du DCMU (3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-diméthylurea) ou en carence de soufre pour inhiber le photosystème II (PSII) (Melis *et al.*, 2000), une production d' H_2 en présence de lumière est immédiatement observée. Une phase de croissance et accumulation de réserves à grande activité photosynthétique est préalablement accomplie (Melis and Happe, 2001). Différentes vitesses maximales de production d'hydrogène ont été obtenues avec cette méthode. Dans le cas d'un photobioréacteur à géométrie torique, elle est de $1,7 \text{ ml. h}^{-1}$ par litre de culture (Degrenne *et al.*, 2007).

Il reste encore un long chemin à faire avant d'arriver à l'industrialisation de la production d'hydrogène à partir des microalgues. Le choix de la méthode de production reste ouvert, plusieurs solutions peuvent être envisagées. La compréhension des mécanismes biologiques est une étape incontournable quelque soit l'approche choisie.

1.3.3.4. Capture de CO_2

Les gaz à effet de serre sont reconnus pour être les grands responsables du réchauffement climatique. La combustion des énergies fossiles (charbon, pétrole, gaz) dans les transports, le chauffage des logements, l'industrie et la production d'électricité sont les principales sources de rejets de CO_2 dans l'atmosphère avec 49 milliards de tonnes à l'échelle mondiale (en 2004) selon le Groupe Intergouvernemental d'Experts sur l'Evolution du Climat (GIEC).

La capture à la source du CO_2 , c'est-à-dire sur les grands sites industriels et de production d'électricité, pour le piéger dans le sol de façon à freiner le réchauffement climatique, constitue actuellement une voie de recherche. Le problème principal est la concentration parfois faible du CO_2 dans les effluents gazeux qui peut varier selon le type de procédé, de quelques pour cents à environ 20%. Plusieurs voies technologiques sont en compétition :

- Capture à la centrale avant combustion (décarbonation pré-combustion) : combustion d'hydrogène produit à partir de gaz naturel ou de combustibles solides et capture du CO_2 .

- Capture à la centrale après combustion (post-combustion) : traitement des fumées industrielles où les concentrations en CO_2 sont faibles.
- Oxycombustion ou combustion à l'oxygène.
- Capture de CO_2 par la biomasse (naturelle ou pour produire des biocarburants).
- Capture de CO_2 au niveau des véhicules.

La capture de CO_2 en utilisant des microorganismes est la voie naturelle la plus importante et a été l'objet de plusieurs études. Le CO_2 est transformé en matière organique (hydrates de carbone, lipides, protéines) grâce à la photosynthèse. Les microalgues ne tolèrent pas seulement le dioxyde de carbone mais aussi le dioxyde de soufre, l'oxyde d'azote et les composés organiques volatils (COV) présents dans les effluents gazeux (Brown, 1996). Les espèces les plus utilisées sont *Chlorella sp.*, *Scenedesmus obliquus*, *Spirulina sp.*, *Botryococcus braunii*, *Synechococcus sp.*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Synechocystis aquatilis* ou *Monoraphidium minutum*. Dépendant de l'espèce choisie, la productivité de matière organique se situe entre 0,18 et 0,4 grammes par litre par jour (Keffer *et al.*, 2002 ; Steward *et al.*, 2005 ; Grecque de Morais *et al.*, 2007a ; Grecque de Morais *et al.*, 2007b ; Skjånes *et al.*, 2007 ; Chiu *et al.*, 2008).

Concernant la capture de CO_2 au niveau des véhicules, une nouvelle voie a été ouverte : des chercheurs au Pays de Galles ont conçu un boîtier capable de capturer le dioxyde de carbone ou l'oxyde nitreux : la « Greenbox » (cf. figure 1.6). Elle est installée à la place du pot d'échappement de plusieurs véhicules (voitures, bus, poids lourds) afin de capturer le dioxyde de carbone qui sera transporté et relâché dans un photobioréacteur pour nourrir des algues génétiquement modifiées. Celles-ci seront ensuite broyées pour produire des biocarburants utilisables par les voitures flexi-fuel. Les tests ont montré un taux de capture situé entre 85 et 95%. La réduction de la taille du boîtier permettra de la rendre compatible à tous les modèles de voitures. Sa commercialisation n'est pas encore assurée (Source : www.checkbiotech.org).



Figure 1.6 : Principe de la « Greenbox » (d'après www.checkbiotech.org)

1.3.3.5. Production de biocarburants

A l'heure actuelle, dans le contexte des changements climatiques et de la flambée des prix du baril de pétrole, les biocarburants obtenus à partir de matériaux organiques renouvelables se présentent comme une alternative aux énergies d'origine fossile pour réduire les émissions de gaz à effet de serre (GES) et assurer une indépendance énergétique.

Une distinction est faite entre les *biocarburants de première génération*, principalement issus de produits alimentaires (betterave à sucre, graines de colza, tournesol, etc) et les *biocarburants de seconde génération* qui proviennent de sources ligno-cellulosiques (le bois, les feuilles) ou de nouvelles technologies qui permettent de convertir la biomasse en liquide. L'inconvénient majeur pour le développement des biocarburants de première génération est la compétition établie avec les cultures

alimentaires. Leur production demande des moyens de production agricole intensive et une quantité considérable d'engrais et de produits phytosanitaires.

Il existe de nouvelles filières intéressantes pour l'environnement et aux meilleurs rendements qui émergent de façon progressive. Sachant que la biomasse microalgale contient trois composants principaux dont les hydrates de carbone, les protéines et les huiles naturelles, on peut résumer leur utilisation pour la production des biocarburants en quatre procédés différents :

- Production d'éthanol par fermentation.
- Production de méthane par voie biologique ou par gazéification thermique.
- Production de biodiesel.
- Production de vapeur ou électricité par combustion directe de la biomasse microalgale.

Pour que la production de biocarburants soit économiquement intéressante, il faudra que la biomasse soit utilisée aussi efficacement que possible. Alors, les quatre options énumérées précédemment pourront être employées combinées.

L'approche la plus simpliste consiste à produire du méthane gazeux : les deux voies de production possibles (biologique et thermique) ne sont pas sensibles à la façon dont la biomasse est introduite au procédé. La gazéification est une technologie « brutale » dans le sens qu'elle implique la décomposition de n'importe quelle forme de carbone organique en méthane. En revanche, la production d'éthanol est la technique la plus efficace pour la conversion de la fraction d'hydrate de carbone.

La production de biodiesel à partir de microalgues particulièrement riches en huiles permet d'envisager des rendements à l'hectare très supérieurs aux espèces oléagineuses terrestres. D'après Sheehan et ses collaborateurs, ceux-ci seraient multipliés par 30 (Sheehan *et al.*, 1998). Selon Siaut et son équipe, les chlorophycées comme *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans* ou *Chlamydomonas reinhardtii* ont une accumulation de lipides pouvant aller jusqu'à 60% de la matière sèche sous la forme de triglycérides (Siaut *et al.*, 2007).

Les microalgues représentent une alternative intéressante permettant une production de biomasse sans déforestation ni compétition avec les cultures alimentaires.

Leur rendement photosynthétique est beaucoup plus élevé, elles n'ont pas besoin d'apport de produits phytosanitaires et elles produisent de nombreux sous-produits valorisables (Chisti, 2007). Un rendement optimal en huile nécessite une concentration en CO_2 d'environ 13% lors de la croissance des microalgues. Ce nutriment peut être obtenu à un coût très faible grâce au couplage du procédé microalgal avec une source industrielle de CO_2 (une centrale thermique au charbon ou au gaz naturel ou une unité de fermentation alcoolique), ce qui représente une voie d'avenir face aux problèmes environnementaux (Sawayama *et al.*, 1995). Ainsi, la croissance des microalgues est possible en conditions atmosphériques (380 ppm de CO_2) mais les rendements sont faibles.

Des processus multidisciplinaires combinant différents produits dérivés des microalgues représentent une bonne alternative pour utiliser la biomasse de façon efficace. Par exemple, en combinant la production des aliments pour les animaux à partir des composants de la biomasse algale, la gazéification biologique et la production de biodiesel en capturant le CO_2 . Un autre exemple est la production de biomasse en utilisant le CO_2 capturé pour produire ensuite de l'hydrogène biologique et exploiter la biomasse de façon à extraire des biomolécules intéressantes (cf. chapitre I, §1.2.1.2) ou d'autres biocarburants (Sheehan *et al.*, 1998 ; Skjanes *et al.*, 2007).

1.3.3.6. *Systèmes de support de vie : Le Projet MELISSA*

Lorsque l'homme s'éloigne de la surface terrestre, il doit mettre en œuvre des systèmes spécifiques permettant d'assurer sa survie dans un environnement hostile. Dans un système de support de vie, les fonctions vitales sont maintenues grâce à l'apport d'air, de nourriture, d'eau et d'énergie, et l'élimination ou stockage des déchets. Ils peuvent être de type boucle ouverte (sans récupération des ressources) ou boucle fermée (recyclage des ressources). C'est dans les systèmes de support de vie biorégénératifs à boucle fermée que les organismes vivants, tels que les plantes ou les microorganismes, permettent la production et la dégradation de molécules organiques.

Pour faire partie de la ration alimentaire de l'équipage, les microorganismes doivent être non dangereux et fournir un apport nutritionnel important. Les microalgues les plus étudiées dans le cadre des applications spatiales sont les algues vertes et les cyanobactéries car elles possèdent une croissance rapide, un métabolisme contrôlable, un taux de récupération élevé et des échanges gazeux compatibles avec les besoins humains.

Arthospira platensis, *Chlorella* et *Scenedesmus* répondent à ces critères (Godia *et al.*, 2004).

Le projet MELISSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative ou en français : Option système de support vie micro-écologique) est développé par l'Agence Spatiale Européenne (ESA). Il est basé uniquement sur des étapes biologiques utilisant principalement des micro-organismes. MELISSA permet d'assurer l'air, l'eau et la nourriture des astronautes dans une boucle fermée dans laquelle est produite la Spiruline qui doit être séchée pour être consommée ou incorporée dans la nourriture. Le cycle de la matière a été réduit au minimum puisque cet écosystème artificiel ne comporte que cinq étapes majeures et donc cinq compartiments (Godia *et al.*, 2002) (cf. figure 1.7).

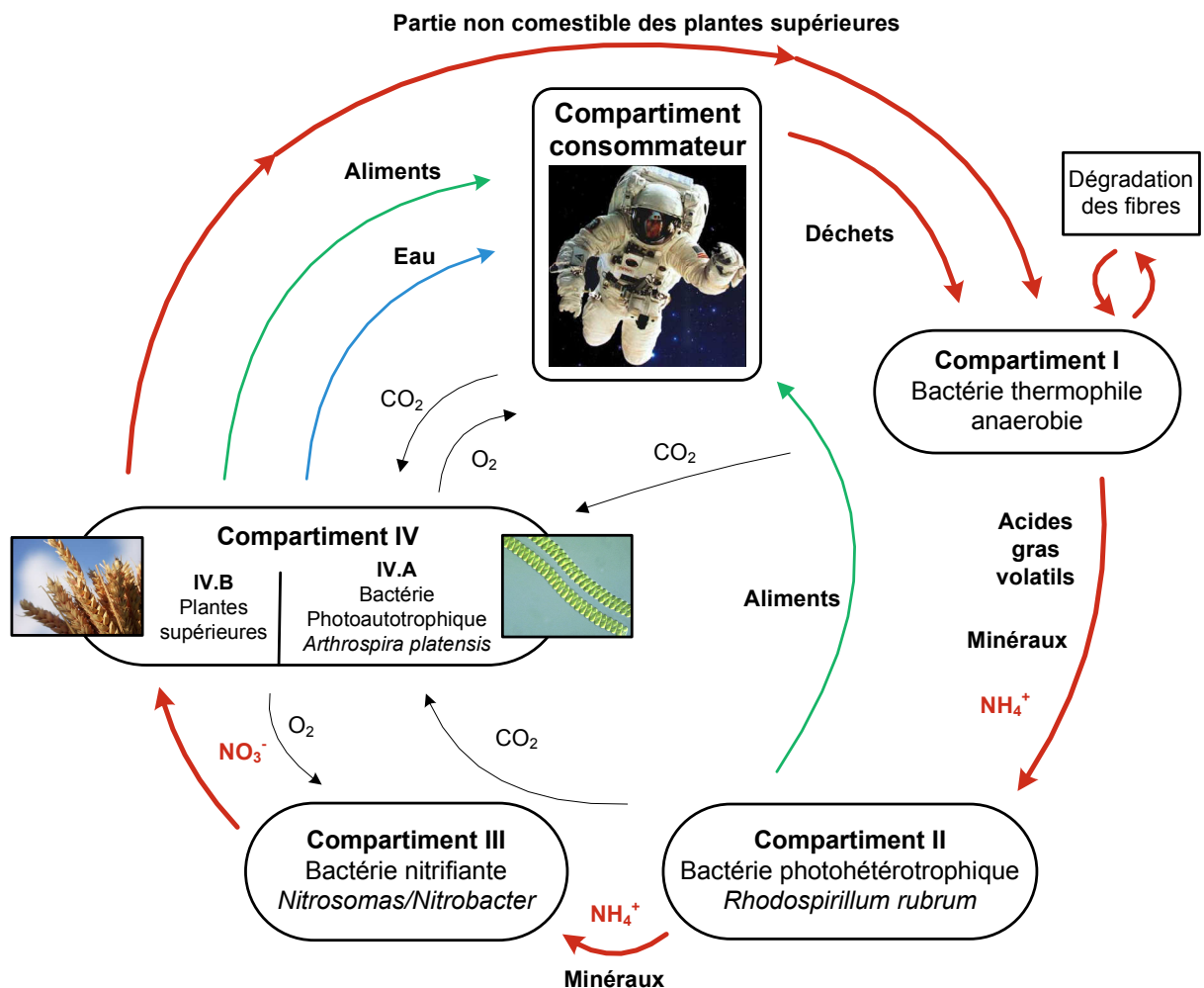


Figure 1.7 : Boucle MELISSA

Les cinq compartiments sont :

1. le compartiment consommateur qui produit les déchets solides, liquides et gazeux,

et les compartiments de recyclage :

2. le compartiment liquéfacteur (I) qui transforme les déchets solides et liquides en dioxyde de carbone, acide gras volatils et ammoniacque,
3. le compartiment photohétérotrophe (II) qui transforme les acides gras volatiles et une partie de l'ammoniacque en biomasse consommable,
4. le compartiment nitrificateur (III) qui permet de transformer une partie de l'ammoniacque en nitrate pour obtenir une proportion idéalement assimilable d'azote pour la photosynthèse,
5. le compartiment photoautotrophe (IV) qui produit la nourriture et l'oxygène à partir du dioxyde de carbone, d'eau et de minéraux. Les plantes supérieures sont utilisées pour équilibrer la ration alimentaire et la microalgue *Arthrospira platensis* pour la régénération rapide de l'atmosphère avec un bon rendement. Cette étape photosynthétique, de même que l'étape photohétérotrophe, nécessitent de l'énergie lumineuse, solaire ou artificielle.

Le fonctionnement de la boucle MELISSA servira à montrer le potentiel de la biotechnologie à fournir des solutions pour les systèmes de support de vie régénératifs. La complexité du système corrobore la nécessité de développer des algorithmes de contrôle-commande basés sur des modèles mathématiques décrivant les principaux aspects physiques et biologiques des photobioréacteurs.

1.4. Systèmes de production

Au vu de la diversité d'applications énumérées précédemment, le potentiel et l'intérêt des microalgues est évident. Les premières tentatives de mise au point de procédés de production intensive datent de la seconde guerre mondiale, les allemands souhaitaient résoudre les problèmes liés au ravitaillement de leurs troupes en tentant de combler le manque de protéines (Von Vitsch, 1970). A la fin de la guerre, ces efforts de culture furent repris partout dans le monde et les premières difficultés comme l'identification et la maîtrise des paramètres de culture furent rencontrées (Richmond,

1987). Aujourd'hui, il existe une grande diversité de photobioréacteurs qui sont présentés dans différents ouvrages et articles (Tredici *et al.*, 1998 ; Borowitzka, 1999 ; Chisti, 1999 ; Csögör *et al.*, 1999 ; Merchuk *et al.*, 1999 ; Acién *et al.*, 2001 ; Pulz, 2001).

1.4.1. Définition d'un bioréacteur

Cette partie s'adresse aux lecteurs non spécialistes en bioprocédés.

Bien que le mot « bioréacteur » recouvre une grande variété de dispositifs, nous pouvons dire qu'il s'agit d'un espace contrôlé contenant des organismes vivants qui interagissent avec différents substrats. En suivant cette définition, nous pouvons trouver les dispositifs de laboratoire (le plus souvent des cultures pures), les bassins artificiels, mais aussi les écosystèmes naturels (lacs ou lagunes). Ces systèmes sont composés de microorganismes, des substrats nécessaires pour leur croissance (c.-à-d. C, N, K, Na, Fe,...), des catalyseurs pour démarrer ou accélérer une réaction et des produits synthétisés par ces microorganismes.

Les photobioréacteurs se différencient des bioréacteurs classiques par la nécessité de fournir un substrat additionnel (lumière) en plus de conditions générales de culture.

1.4.2. Modes de fonctionnement d'un bioréacteur

Mode discontinu ou batch : Il s'agit d'une introduction unique d'un inoculum et des éléments nutritifs nécessaires à la croissance biologique suivie d'une période de culture et de la récolte finale des microorganismes. Le système est fermé (aucun apport ni prélèvement n'est réalisé) et garde un volume constant, ce qui limite la contamination par d'autres microorganismes. Ce mode est recommandé lorsque l'on cherche à travailler dans des conditions axéniques. Cependant, il est mal adapté à un échantillonnage régulier qui pourrait conduire à une modification du volume de culture.

Mode semi-continu ou fedbatch : L'inoculum est introduit et la culture est alimentée de son volume de départ (V_0) jusqu'à son volume final (V_f). En effet, l'apport des différents éléments nutritifs se fait au fur et mesure des besoins constatés des microorganismes ce qui permet donc un meilleur contrôle de conditions de croissance.

Mode continu: A volume constant, le flux d'alimentation en nutriments est égal au soutirage de milieu réactionnel. C'est le mode de fonctionnement qui permet d'appliquer

les techniques de contrôle en toute liberté et représente un très bon outil pour l'étude approfondie des phénomènes de transformation de cellules lors de leur croissance.

1.4.3. *Ecosystèmes Naturels*

Un système naturel est aussi un bioréacteur mais les entrées ne sont pas maîtrisées puisqu'elles sont forcées par l'environnement (température, lumière, ...). Ce sont des systèmes plus complexes qu'un photobioréacteur industriel puisque plusieurs espèces de nature différente sont impliquées lors d'une culture. L'agitation permanente indispensable pour assurer l'homogénéisation de la biomasse est aussi difficile à maîtriser.

Il existe des cas intermédiaires entre bioréacteur et écosystème naturel. Par exemple, dans le cas de l'épuration par lagunage, le bioréacteur est un étang naturel dopé par un apport de matière organique dans lequel participent des bactéries, du zooplancton, des algues et des plantes aquatiques.

1.4.4. *Bassins artificiels ouverts*

C'est une méthode artisanale de conception simple, et parfois rudimentaire, impliquant souvent des tailles importantes (jusqu'à 300 ha.). L'utilisation de l'énergie solaire comme source de lumière n'engendre pas de coût de fonctionnement supplémentaire (Pulz *et al.*, 1998). Ce sont des systèmes très simples et robustes qui ressemblent au milieu naturel de croissance des microorganismes. Cependant, la production des microalgues dans ces systèmes présente de nombreux inconvénients liés à l'absence de contrôle des conditions de culture, aux problèmes de contamination par d'autres organismes (bactéries, champignons, levures...) et à la limitation des microalgues en lumière du fait de l'absence de dispositifs de mélange. A ceci, il faut ajouter la sensibilité des cultures à la température qui doit être contrôlée pour atteindre des rendements corrects (Borowitzka, 1999).

De nouveaux systèmes ouverts notamment améliorés ont été installés en Californie, Hawaii (cf. figure 1.8) et à Roswell (Nouveau-Mexique). La productivité maximale obtenue est de 50 grammes de microalgues par mètre carré par jour. Ces bons résultats ont été obtenus en utilisant des espèces natives qui se sont naturellement développés dans les étangs. Au contraire, les espèces cultivées au laboratoire ne sont pas si performantes. Des problèmes liés aux basses températures ont été rencontrés,

particulièrement la nuit, ce qui a conduit au développement d'une certaine forme de contrôle de température avec la clôture des étangs (Sheehan *et al.*, 1998).

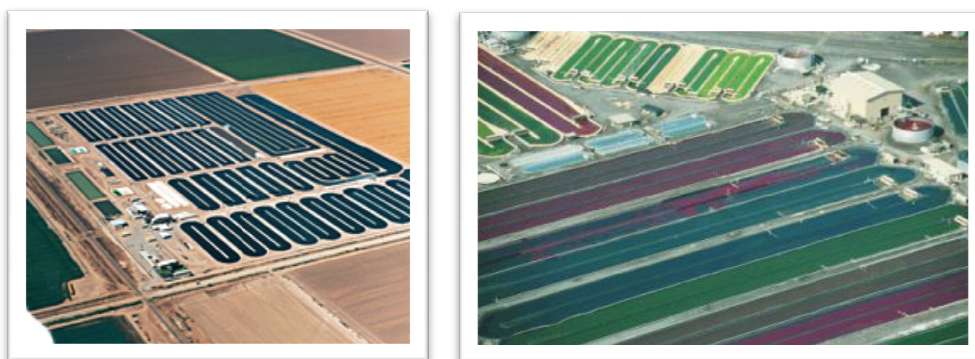


Figure 1.8 : Quelques exemples de bassins de culture de microalgues en Californie et Hawaï
(D'après <http://www.erthrise.com> et <http://juliemurphree.org>)

Actuellement, les recherches s'orientent plus vers des applications répondant à des besoins précis car les possibilités de culture se limitent à quelques espèces de microalgues robustes vis-à-vis des contaminations extérieures qui se développent déjà la plupart du temps dans le milieu de culture sans intervention humaine.

Toutefois, ces procédés de production des microalgues ne doivent pas être ignorés. Quand on connaît la richesse nutritionnelle d'espèces comme la spiruline et la rareté de l'eau douce dans les régions arides des pays en voie de développement où le climat est chaud et ensoleillé, l'intérêt est évident.

1.4.5. Systèmes industriels fermés : Les photobioréacteurs

Pour un meilleur contrôle du procédé, une solution possible consiste à effectuer des cultures fermées. Le principe des systèmes fermés utilisés pour la culture microalgale est de mettre en contact les microalgues avec de la lumière naturelle, artificielle ou une combinaison des deux à travers un matériau transparent.

Il existe de nombreux types de photobioréacteurs mais le principe de conception reste toujours lié à l'objectif de diminuer le trajet de la lumière afin d'obtenir une grande quantité d'énergie disponible par cellule grâce à un grand rapport surface/volume (Borowitzka, 1999). Les microalgues nécessitent un apport important d'énergie photonique. La lumière incidente sur la culture diminue rapidement avec la concentration

en biomasse d'où l'apparition des gradients lumineux dans le bioréacteur qui limitent la croissance et rendent le procédé difficile à gérer. Deux géométries pour les photobioréacteurs fermés sont préférées pour la production à grande échelle : les réacteurs plats et les réacteurs tubulaires.



Figure 1.9 : Photobioréacteur tubulaire (D'après : Controlled Environment Agriculture & Energy Working Group of California Polytechnic State University)

Ils offrent différents avantages: ils permettent la culture des souches microalgales sensibles qui ne pourraient pas faire face aux microorganismes polluants installés dans les systèmes ouverts, les productivités sont sensiblement plus élevées et peuvent être obtenues par un ajustement des conditions optimales de culture, les molécules destinées à la fabrication de produits de beauté ou les soins de santé peuvent être produites en respectant les normes de pureté et sûreté du produit. Des photobioréacteurs pour la production des molécules pharmaceutiques en suivant les lignes directrices relatives aux bonnes pratiques de fabrication (BPF) ont été également décrits (Walter *et al.*, 2003; Lucumi and Posten, 2006).

On remarque toutefois dans la littérature qu'aucun procédé *a priori* idéal n'a été mis au point à ce jour. Le prix très élevé des photobioréacteurs ralentit les travaux de

recherche. La production des molécules intéressantes justifie l'investissement porté à la culture en photobioréacteur (Pulz, 2001). La culture industrielle de ces microorganismes passe par le développement de photobioréacteurs fermés, stérilisables, contrôlés et à haute productivité.

D'un point de vue industriel, les photobioréacteurs entrent directement en compétition avec les fermenteurs où se développent des organismes tels que les bactéries ou des levures. Outre l'absence de besoin en lumière, ces derniers possèdent l'avantage physiologique d'avoir des temps de doublement de l'ordre de quelques dizaines de minutes, contre environ 24 heures pour les microalgues (Chisti *et al.*, 1999).

1.5. Un point sur les modèles microalgaux

Les types de modèles utilisés dans le domaine des bioprocédés sont aussi nombreux que les objectifs fondamentaux pour lesquels ces modèles ont été développés. Les modèles sont en effet des outils de plus en plus utilisés pour l'interprétation des résultats expérimentaux, l'optimisation et l'automatisation des bioprocédés.

La modélisation d'un système biologique peut présenter différents niveaux de complexité selon l'utilité de ces modèles. D'un côté, il existe des modèles complexes dit *structurés* qui cherchent à décrire le plus précisément possible les réactions physico-chimiques entre les différents constituants intracellulaires des microorganismes. Les paramètres intervenant dans ces modèles sont généralement très difficiles à identifier.

D'un autre côté, on trouve les modèles *non-structurés* où la population de microorganismes est globalisée dans une seule variable qu'on appelle communément la biomasse. Dans ce cas, les modèles décrivent uniquement les variations de quelques constituants en fonction du temps sous l'influence des paramètres d'action (température, pH..., par exemple) (Dochain, 2001). Ces modèles sont considérablement plus simples que les précédents et permettent généralement une bonne description du système dans une large gamme de conditions.

1.5.1. Modélisation des flux de matière ou gazeux

Dans un bioréacteur parfaitement mélangé, nous pouvons exprimer le comportement dynamique des différents composants de la réaction biologique par les

bilans de matière qui expriment la variation de la quantité d'un composé comme égale à la somme de ce qui est produit ou apporté, diminuée de ce qui est consommé ou soutiré.

Un bilan gazeux est également nécessaire. Il prendra en compte les espèces qui peuvent passer dans la phase gazeuse et s'échapper du bioréacteur ou celles qui passent de la phase gazeuse à la phase liquide. Il faut alors ajouter dans le bilan un terme de transfert avec l'extérieur. Le coefficient global de transfert de matière k_La est également pris en compte. Il traduit la capacité de transfert d'un gaz considéré dépend fortement de la géométrie et de l'agitation du système, des conditions opératoires et de la surface d'échange (taille de bulles) entre les phases gaz et liquide et de leur propriétés physico-chimiques (Bailey and Ollis, 1986).

1.5.2. Modèles de cinétique cellulaire

Dans le cas de la simulation ou commande de bioprocédés, il est nécessaire de relier les vitesses de réaction aux variables du système. Tout d'abord, il faut pouvoir connaître quels sont les facteurs physico-chimiques et biologiques qui influencent la cinétique. Ces facteurs doivent être alors capables de représenter l'influence des différents constituants du système sur la vitesse de croissance. Une connaissance des phénomènes liés au procédé permettra aussi de déterminer précisément la possible activation ou inhibition de la vitesse de réaction par les variables du système. Parfois, il peut arriver qu'une variable soit activatrice et qu'elle devienne inhibitrice à concentration élevée.

La plupart de ces types d'expressions sont souvent obtenus à partir d'expériences en laboratoire. De ce fait, elles présentent des problèmes d'identification des paramètres dus essentiellement au manque de reproductibilité caractéristique des procédés biotechnologiques et parfois, au manque d'information au niveau des données expérimentales.

1.5.2.1. Modèles tenant compte de la lumière

La majorité des modèles formulés pour les microalgues utilisent certains paramètres d'action pour décrire la variation de la concentration cellulaire en fonction du temps. L'intensité lumineuse a été longtemps considérée comme le facteur explicatif le plus important affectant la croissance cellulaire. En effet, sa distribution dans un photobioréacteur n'est pas homogène et l'absorption de la lumière par la biomasse

conduit à une atténuation significative du faisceau lumineux qui traverse la culture. La lumière peut donc devenir limitante ou inhibitrice lors de la croissance cellulaire et de ce fait, elle est prise en compte dans un modèle comme un substrat. Plusieurs auteurs s'intéressent à modéliser l'influence de la lumière sur la croissance des cellules microalgales (Dermoun, 1987 ; Cornet *et al.*, 1995 ; Molina Grima *et al.*, 1996 ; Ramesh, 1997 ; Muller Feuga, 1999 ; Wu and Merchuk, 2001 ; Carvalho and Malcata, 2003 ; Fleck-Schneider *et al.*, 2007)

Nous allons présenter par la suite (cf. tableau 1.2) un récapitulatif des modèles de type limitation et inhibition-limitation tenant compte de la lumière.

Tableau 1.2 : Modèles appliqués à la culture de microalgues tenant compte de la lumière

Modèles de type limitation	
Monod (1942) : Appliqué à <i>Arthrospira platensis</i> (Cornet <i>et al.</i> , 1995)	
$\mu = \mu_{max} \frac{I}{K_I + I}$	μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})
	I = intensité lumineuse moyenne au sein du réacteur ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)
	K_I = constante de saturation de Monod pour la lumière ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)
Tamiya (1953) : Appliqué à <i>Chlorella vulgaris</i> (Tamiya <i>et al.</i> , 1953) et <i>Isochrysis galbana</i> (Molina Grima <i>et al.</i> , 1996)	
$\mu = \frac{\mu_{max} I}{\mu_{max} + I}$	μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})
	I = intensité lumineuse lumineuse moyenne au sein du réacteur ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

Van Oorschot (1955) : Appliqué à *Isochrysis galbana* (Molina Grima *et al.*, 1996)

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - e^{\left(-\frac{I}{I_{max}} \right)} \right)$$

μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})

I = intensité lumineuse moyenne au sein du réacteur ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

I_{max} = intensité lumineuse pour laquelle $\mu = \mu_{max}$

Moser (1958) :

$$\mu = \mu_{max} \frac{I^n}{K_I^n + I^n}$$

μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})

I = intensité lumineuse moyenne au sein du réacteur ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

K_I = constante d'affinité à la lumière ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

n = exposant (sans dimension)

Peeters et Eilers (1978) : Appliqué à *Porphyridium purpureum* (Dermoun, 1987)

$$\mu = \frac{2 \mu_{max} \left(1 + \delta \frac{I/I_{opt}}{\left(I/I_{opt} \right)^2 + 2 \left(I/I_{opt} \right) + 1} \right)}{1}$$

μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})

I = intensité lumineuse moyenne au sein du réacteur ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

I_{opt} = intensité lumineuse pour laquelle $\mu = \mu_{max}$

δ = coefficient d'acuité de la courbe

Ramesh (1997) : Appliqué à *Scrippsiella* sp.

Porphyridium cruentum (You and Barnett, 2004)

μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})

A, K_I = constantes

K = équivalent de l'énergie de désactivation

I = intensité lumineuse moyenne au sein du réacteur ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

I_c = intensité lumineuse pour laquelle il n'y avait aucune vitesse de croissance mesurable ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

$$\mu = \frac{\mu_{max}(I - I_c)}{K_1 + (I - I_c)} - A e^{(-K)/I}$$

Carvalho et Malcata (2003) : Loi d'Arrhenius appliqué à *Pavlova lutheri*

μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})

K_3, K_4, K_5 = constantes

$$\mu_{max} = \frac{K_3 I}{K_4 T + I} e^{K_5 I / RT}$$

I = intensité lumineuse moyenne au sein du réacteur ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

T = température (K)

R = constante de gaz parfaits ($8,314 kJ.mol^{-1}.K^{-1}$)

Modèles de type inhibition-limitation

Andrews-Haldane (1968) : Appliqué à *Chlorella vulgaris* (Ogawa et Aiba, 1981)

Scenedesmus acutus (Ogawa et Aiba, 1981)

Isochrysis galbana (Molina Grima *et al.*, 1996)

Haematococcus lacustris (Moya *et al.*, 1997)

μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})

$$\mu = \frac{\mu_{max} I}{K_S + I + \frac{I^2}{K_I}}$$

I = intensité lumineuse moyenne au sein du réacteur ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

K_S = constante d'affinité à la lumière ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

K_I = constante d'inhibition ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

Steele (1977) : Appliqué à *Isochrysis galbana* (Molina Grima *et al.*, 1996)

μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})

$$\mu = \mu_{max} \frac{I}{I_{max}} e^{\left(1 - \frac{I}{I_{max}}\right)}$$

I = intensité lumineuse moyenne au sein du réacteur ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

I_{max} = intensité lumineuse pour laquelle $\mu = \mu_{max}$

Moser modifié : Appliqué à *Isochrysis galbana* (Molina Grima *et al.*, 1996)

$$\mu = \mu_{max} \frac{I_{av}^{n2/I_{in}}}{\left[I_k + \left(\frac{I_n}{K_I} \right)^{n1} \right]^{n2/I_{in}} + I_{av}^{n2/I_{in}}}$$

μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})

I_{av} = intensité lumineuse moyenne ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

I_K = amplitude de I ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

I_K = Intensité lumineuse incidente ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

K_I = constante d'affinité à la lumière ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

$n1$ = exposant (sans dimension)

$n2$ = intensité lumineuse de photoinhibition

Muller-Feuga (1999) : Appliqué à *Porphyridium cruentum*

$$\mu = \frac{2 \mu_{max}(1 - \rho_e)(\rho - \rho_e)}{(1 - \rho_e)^2 + (\rho - \rho_e)^2}$$

$$\rho = \frac{I}{I_{opt}}$$

$$\rho_e = \frac{I_{eq}}{I_{opt}}$$

μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})

I = Intensité lumineuse incidente ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

I_{opt} = intensité lumineuse incidente pour laquelle

$\mu = \mu_{max}$ ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

I_{eq} = intensité lumineuse incidente pour laquelle

$\mu = 0$ ($\mu E.m^{-2}.s^{-1}$)

ρ = ratio normalisé

ρ_e = ratio de maintenance normalisé

1.5.2.2. Modèles tenant compte de la lumière et du carbone

Certains auteurs considèrent que le dioxyde de carbone peut avoir un effet très sensible lors de la croissance des microorganismes photosynthétiques et que cet effet doit être incorporé dans l'expression de la vitesse de croissance. De ce fait, Baquerisse (1999) et Nouals (2000) ont introduit le concept de carbone inorganique total qui traduit la quantité de carbone disponible dans le milieu de culture pour la croissance. En effet, dans un photobioréacteur, le dioxyde de carbone injecté réagit avec l'eau pour former des ions carbonates et bicarbonates et les cellules de *Porphyridium purpureum* cultivées utilisent l'ensemble de formes carbonées comme substrat pour leur croissance (Baquerisse, 1999 ;

Nouals, 2000). Le carbone inorganique total est utilisé pour étudier avec la lumière leurs effets sur la vitesse de croissance.

Tableau 1.3 : Modèles appliqués à la culture de microalgues tenant compte de la lumière et du carbone

Baquerisse (1999) : Appliqué à *Porphyridium purpureum*

μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})

CIT = concentration en carbone inorganique total (mol/l)

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{E}{E_{opt}} \right) e^{\left(1 - \frac{E}{E_{opt}}\right)} \left(\frac{CIT}{CIT_{opt}} \right) e^{\left(1 - \frac{CIT}{CIT_{opt}}\right)}$$

E = énergie lumineuse disponible par cellule ($\mu E \cdot 10^9 \text{ cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

E_{opt}, CIT_{opt} = à $\mu = \mu_{max}$

$$E = \frac{(I_{IN} - I_{OUT})A_r}{V \cdot X}$$

V, A_r = volume utile (dm^3) et surface éclairée du réacteur (dm^2)

I_{IN}, I_{OUT} = intensités lumineuses incidente et sortante ($\mu E \cdot dm^{-2} \cdot s^{-1}$)

X = concentration cellulaire ($10^9 \text{ cell} \cdot dm^{-3}$)

Nouals (2000) : Appliqué à *Porphyridium purpureum*

μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{E}{K_E + E} \right) \left(\frac{CIT_{cell}}{K_{CL} + CIT_{cell}} \right) \left(\frac{K_{CI}}{K_{CI} + CIT_{cell}} \right)$$

CIT_{cell} = carbone inorganique total accessible par cellule (mmol/ 10^9 cell .)

E = énergie lumineuse disponible par cellule ($\mu E \cdot 10^9 \text{ cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

$$\mu_{max} = \frac{\mu_{max, T_{opt}} e^{\left[\frac{E_g}{R} \left(\frac{1}{T_{opt}} - \frac{1}{T} \right) \right]}}{\left[1 + A e^{\left[\frac{\Delta G_d}{R} \left(\frac{1}{T_{opt}} - \frac{1}{T} \right) \right]} \right]}$$

K_E, K_{CL} = constantes de demi-saturation pour E et pour CIT

K_{CI} = constante d'inhibition pour CIT_{cell}

$$E = \frac{(I_{IN} - I_{OUT})A_r}{V \cdot X}$$

T, T_{opt} = température et température optimale pour la croissance (K)

$\mu_{max, T_{opt}}$ = vitesse maximale de croissance à

T_{opt} (h^{-1})
E_g = énergie d'activation du processus de croissance ($kJ.mol^{-1}$)
ΔG_d = variation d'énergie libre de la réaction de dénaturation des protéines ($kJ.mol^{-1}$)
R = constante de gaz parfaits ($8,314 kJ.mol^{-1}.K^{-1}$)
A = constante (sans dimension)
V, A_r = volume utile (dm^3) et surface éclairée du réacteur (dm^2)

1.5.2.3. Modèles tenant compte d'autres composants du milieu réactionnel

L'effet d'autres nutriments est également abordé dans la littérature. Ce type de modèles prend en compte l'influence du phosphore et de l'azote pour certaines microalgues.

La notion de quota cellulaire est introduite par Droop (1983) pour définir la quantité de nutriment total par unité de biomasse. Cette notion associée à celle du réservoir interne de nutriment dans la cellule nous permet de différencier deux phénomènes qui ont lieu lors du processus de croissance cellulaire : la prise et l'assimilation des nutriments par la cellule et leur conversion en biomasse. Ce modèle (cf. tableau 1.4) a été appliqué pour représenter la limitation par le phosphore sur la croissance des microalgues et du phytoplancton.

La croissance de *Spirulina platensis* sous limitation d'azote et de soufre a été étudiée par Cornet *et al.* (1998) en utilisant la loi de Monod. Ce modèle (cf. tableau 1.4) suppose que sous limitation de ces deux nutriments la croissance des microalgues a lieu grâce au glycogène cellulaire accumulé et qu'elle s'arrête lorsque les cellules atteignent une taille maximale.

Martinez Sancho *et al.* (1999) ont également utilisés un modèle de type Monod pour expliquer la limitation et l'inhibition par le phosphore sur la croissance de *Scenedesmus obliquus* (cf. tableau 1.4). Cette expression inclut l'utilisation des réserves

de phosphore par la cellule lorsque la concentration en phosphore devient nulle ou trop élevée.

Un modèle traduisant l'influence du pH sur la croissance cellulaire et la relation existant entre la vitesse maximale de croissance μ_{max} et le coefficient de transfert du dioxyde de carbone $k_L a(CO_2)$ a été proposé par Spolaore (2005) sur la microalgue *Nannochloropsis oculata* (cf. tableau 1.4). L'influence de la température est également prise en compte à l'aide d'une variante des lois de Roels et Ahhrenius.

Estrada-Duran (2007) a proposé un modèle qui traduit l'effet limitant de l'énergie lumineuse et du carbone inorganique total disponibles par cellule ainsi que l'effet limitant du phosphore et l'effet limitant puis inhibant de l'azote. Il s'agit d'une amélioration du modèle initialement proposé par Nouals (2000). La modélisation a été faite par deux biais, considérant au début seulement la disponibilité par cellule d'azote et de phosphore et ensuite seulement la concentration des ces substrats (cf. tableau 1.4).

Tableau 1.4 : Modèles appliqués à la culture de microalgues tenant compte d'autres composants du milieu réactionnel

Droop (1968) : Appliqué à <i>Chlorella</i> sp. (Grover, 1991)	
Croissance du phytoplancton (Bernard et Gouzé, 2002)	
$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{K_Q}{Q}\right)$	
	μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})
	K_Q = quota de subsistance pour lequel $\mu = 0$ ($g.cellules^{-1}$)
	Q = quota cellulaire ($g.cellules^{-1}$)
Cornet (1998) : Appliqué à <i>Spirulina platensis</i>	
$r_x = R \left[\frac{C_N}{K_N + C_N} \frac{C_S}{K_S + C_S} + \frac{C_{PC}}{K_{PC} + C_{PC}} \left(\frac{K_N}{K_N + C_N} + \frac{K_S}{K_S + C_S} \right) \right]$	
	r_x = vitesse volumétrique moyenne de synthèse de biomasse ($kg.m^{-3}.h^{-1}$)
	R = vitesse volumétrique moyenne de biomasse ($kg.m^{-3}.h^{-1}$)
	μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})
	N, S, P, PC = azote, soufre, phosphore et

$$R = \gamma C_{PC} \left(\frac{1}{V_2} \right) \int_{V_2} \mu_{max} \left(\frac{4\pi J}{K_J + 4\pi J} \right) dV$$

phycocyanine respectivement

C_i = concentration des différents composés (g/L)

K_i = constantes de demi-saturation (g/L)

γ = ratio volume illuminé/volume total du réacteur (sans dimension)

J = intensité lumineuse spécifique moyenne (direction z du réacteur) ($W.m^{-2}$)

V, V_2 = volume total et illuminé du réacteur (m^3)

Martinez Sancho (1999) : Appliqué à *Scenedesmus obliquus* (Martinez *et al.*, 1999)

μ_{m1} = vitesse maximale de croissance (h^{-1})

μ_{m2} = vitesse maximale de croissance en absence de phosphore (h^{-1})

$$\mu = \frac{\mu_{m1} K_{PI} P + \mu_{m2} P^2 + \mu_{m3} K_P K_{PI}}{K_P K_{PI} + K_{PI} P + P^2}$$

μ_{m3} = vitesse maximale de croissance en excès de phosphore (h^{-1})

K_{PI}, K_P = constantes d'inhibition et de saturation du phosphore (μM)

P = concentration de phosphore (μM)

Spolaore (2005) : Appliqué à *Nannochloropsis oculata*

$$\mu = \mu_{max0} \frac{e^{\left[\frac{E_g}{R}(T_f)\right]}}{\left[1 + A e^{\left[\frac{\Delta G_d}{R}(T_f)\right]}\right]} \frac{e^{[b(pH_f)]}}{[1 + c e^{[d(T_f)]]}}$$

μ_{max0} = paramètre du modèle (h^{-1})

CIT_{cell} = carbone inorganique total accessible par cellule ($mmol/10^9$ cell.)

$$\left(\frac{k_L a}{k_L a_{opt}} \right)^h \left(\frac{E}{K_E + E} \right) \left(\frac{CIT_{cell}}{K_{CL} + CIT_{cell}} \right)$$

E = énergie lumineuse disponible par cellule ($\mu E. 10^9 cell.^{-1} s^{-1}$)

K_E, K_{CL} = constantes de demi-saturation pour E et pour CIT

$$T_f = \left(\frac{1}{T_{opt}} - \frac{1}{T} \right)$$

T, T_{opt} = température et température optimale pour la croissance (K)

$$pH_f = \left(\frac{1}{pH_{opt}} - \frac{1}{pH} \right)$$

pH, pH_{opt} = pH et pH optimal pour la croissance

E_g = énergie d'activation du processus de croissance (kJ.mol⁻¹)

ΔG_d = variation d'énergie libre de la réaction de dénaturation des protéines (kJ.mol⁻¹)

R = constante de gaz parfaits (8,314 kJ.mol⁻¹.K⁻¹)

A, b, c, d, h = constantes (sans dimension)

Estrada Duran (2007) : Appliqué à *Porphyridium purpureu*

μ_{max} = vitesse maximale de croissance (h⁻¹)

E_{cell} = énergie lumineuse disponible par cellule (μE. 10⁹cell.⁻¹ s⁻¹)

CIT_{cell} = carbone inorganique total disponible par cellule (mmol/10⁹ cell.)

P_{cell} = phosphore disponible par cellule (mg/10⁹ cell.)

N_{cell} = azote disponible par cellule (mg/10⁹ cell.)

$K_E, K_{CL}, K_{LP_{cell}}, K_{LN_{cell}}$ = constantes de demi-saturation pour $E_{cell}, CIT_{cell}, P_{cell}$ et N_{cell} (mêmes unités que $E_{cell}, CIT_{cell}, P_{cell}$ et N_{cell} respectivement)

$KI_{N_{cell}}$ = constante d'inhibition pour N_{cell} (mêmes unités que N_{cell})

P = concentration en phosphore (mg/L)

N = concentration en azote (mg/L)

K_{LP}, K_{LN} = constantes de demi-saturation pour P et N (mêmes unités que P et N respectivement)

KI_N = constante d'inhibition pour N (mêmes unités que N)

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{E_{cell}}{K_E + E_{cell}} \right) \left(\frac{CIT_{cell}}{K_{CL} + CIT_{cell}} \right)$$

$$\left(\frac{P_{cell}}{K_{LP_{cell}} + P_{cell}} \right) \left(\frac{N_{cell}}{K_{LN_{cell}} + N_{cell}} \right)$$

$$\left(\frac{KI_{N_{cell}}}{KI_{N_{cell}} + N_{cell}} \right)$$

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{E_{cell}}{K_E + E_{cell}} \right) \left(\frac{CIT_{cell}}{K_{CL} + CIT_{cell}} \right)$$

$$\left(\frac{P}{K_{LP} + P} \right) \left(\frac{N}{K_{LN} + N} \right) \left(\frac{KI_N}{KI_N + N} \right)$$

1.6. Conclusion

Grâce à leurs caractéristiques biochimiques spécifiques et très variées, les microalgues représentent aujourd'hui une grande voie de recherche à approfondir. Parmi les milliers d'espèces qui existeraient dans la nature, seulement quelques centaines sont conservées et étudiées par la communauté scientifique et quelques dizaines sont produites en quantités industrielles. Les problèmes liés au réchauffement climatique attirent le regard vers ces microorganismes capables de consommer le dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère pour produire de la biomasse contenant des acides gras utilisés pour la fabrication des biocarburants, de l'hydrogène biologique et d'autres molécules à haute valeur ajoutée. L'utilisation des microalgues génétiquement modifiées est également un défi prometteur. Certains essais ont été faits lors de la production d'hydrogène biologique avec de bons résultats.

L'expansion croissante de la biotechnologie microalgale oblige à une amélioration et optimisation continues des systèmes de production microalgaux qui sont de deux types : fermés et ouverts. Chacun présente des avantages et des inconvénients. En effet, les systèmes ouverts sont économiquement plus avantageux puisque la source d'énergie utilisée est le soleil mais ils présentent des difficultés de contrôle des conditions opératoires ce qui conduit à une faible productivité. En revanche, les photobioréacteurs fermés sont bien plus chers mais la productivité obtenue est nettement supérieure et le contrôle et la régulation des paramètres de culture sont envisageables.

Plusieurs dizaines de modèles peuvent être trouvés dans la littérature. Ils traduisent l'influence de plusieurs paramètres de culture sur la vitesse de croissance cellulaire. La bonne connaissance de phénomènes liés au procédé et l'analyse des données disponibles permettra de choisir un modèle qui pourra être utilisé pour développer des observateurs d'état. Le modèle de bilan de matière peut également être utilisé comme base pour des lois de commande qui seront développées par la suite.

Chapitre II

Table de matières

2.1.	Introduction	39
2.2.	Profil d'évolution de la biomasse en mode batch	40
2.3.	Microalgue modèle : <i>Porphyridium purpureum</i>	41
2.3.1.	<i>Facteurs physiques</i>	43
2.3.1.1.	Lumière et agitation	43
2.3.1.2.	Température	44
2.3.2.	<i>Facteurs chimiques : Nutriments</i>	44
2.3.2.1.	Source de carbone	44
2.3.2.2.	Source d'azote	45
2.3.2.3.	Source de phosphore	45
2.3.2.4.	Salinité du milieu de culture	46
2.3.2.5.	Autres macro et micronutriments	46
2.3.3.	<i>Milieu de culture</i>	47
2.4.	Matériels et méthodes	48
2.4.1.	<i>Préparation de l'inoculum</i>	48
2.4.2.	<i>Description du dispositif expérimental</i>	49
2.4.3.	<i>Stérilisation du photobioréacteur</i>	50
2.4.4.	<i>Démarrage de la culture</i>	50
2.4.5.	<i>Méthodes de suivi de la croissance</i>	52
2.4.5.1.	Comptage cellulaire par microscopie	52
2.4.5.2.	Comptage cellulaire par granulométrie laser	52
2.4.5.3.	Mesures spectrophotométriques	53
2.4.5.4.	Mesure de la matière sèche	54
2.4.6.	<i>Méthodes de suivi des conditions de culture</i>	55
2.4.6.1.	pH et oxygène dissous	55
2.4.6.2.	Evolution du débit et de la composition du gaz d'alimentation	55
2.4.6.3.	Intensités lumineuses incidente et sortante	55
2.4.6.4.	Carbone inorganique total	56
2.5.	Choix du modèle	60
2.5.1.	<i>Modèle de croissance pour <i>Porphyridium purpureum</i></i>	60
2.5.2.	<i>Modèle d'évolution du carbone inorganique total (CIT)</i>	62
2.6.	Identification des paramètres	64
2.6.1.	<i>Planification d'expériences</i>	64
2.6.2.	<i>Etude de l'influence de l'apport de CO₂</i>	66
2.6.3.	<i>Etude de l'influence de l'apport de lumière</i>	70
2.6.4.	<i>Culture à conditions optimales : étude de répétabilité</i>	74
2.6.5.	<i>Etude du transfert gaz-liquide sur le photobioréacteur : Détermination expérimentale du $k_L a_{CO_2}$</i>	76
2.6.6.	<i>Identification des paramètres du modèle</i>	80
2.7.	Validation du modèle de croissance	82
2.8.	Conclusion	86

Identification du modèle

2.1. Introduction

La modélisation d'un système consiste à décrire en faisant appel à des équations s'appuyant sur des lois phénoménologiques ou empiriques (conservation de la masse, loi des gaz parfaits, principes de la thermodynamique...) qui se traduisent en équations. La difficulté, dans le cas des systèmes biochimiques, est de faire entrer dans les modèles les composantes biologiques. Dans la plupart de cas, les équations du vivant sont mal connues ou reposent sur des lois empiriques.

La modélisation d'un procédé de culture des microalgues dans un photobioréacteur repose essentiellement sur les lois de croissance de ces microorganismes. Les microalgues sont des microorganismes unicellulaires qui consomment des espèces chimiques présentes dans le milieu de culture (substrats) dont elles tirent l'énergie nécessaire à leur croissance avec l'aide de la lumière lors de la photosynthèse. La relation entre la vitesse de croissance et la quantité de substrat consommée est essentielle mais impossible à mesurer au niveau du microorganisme individuel. C'est pourquoi, en faisant l'hypothèse que tous les individus de la même

espèce sont identiques et qu'ils ont tous l'accès égal aux nutriments, nous pouvons raisonner au niveau d'une population pour mesurer leur croissance.

Dans cet esprit, une première étape consistera à définir la microalgue à étudier, à établir un modèle pour le système de culture et à calibrer les paramètres de ce modèle à partir de campagnes expérimentales. Enfin, une étape de validation sera fondamentale pour pouvoir démontrer, sur la base de données expérimentales, que le modèle atteint bien les objectifs qui lui ont été assignés.

2.2. Profil d'évolution de la biomasse en mode batch

Pour l'identification et la validation du modèle nous avons choisi de travailler en mode batch (cf. chapitre I, §1.3.2.). En effet, ce mode de culture se caractérise par la facilité de mise en œuvre des photobioréacteurs en laboratoire.

Dans ce type de système, des quantités déterminées de milieu de culture et d'inoculum sont introduites, les microalgues vont se développer jusqu'à la mort des cellules. La croissance des microalgues en mode batch suit une courbe bien définie caractérisée sommairement par 4 phases qui sont le reflet des changements dans la biomasse et dans son environnement (cf. figure 2.1) (Lee and Shen, 2004).

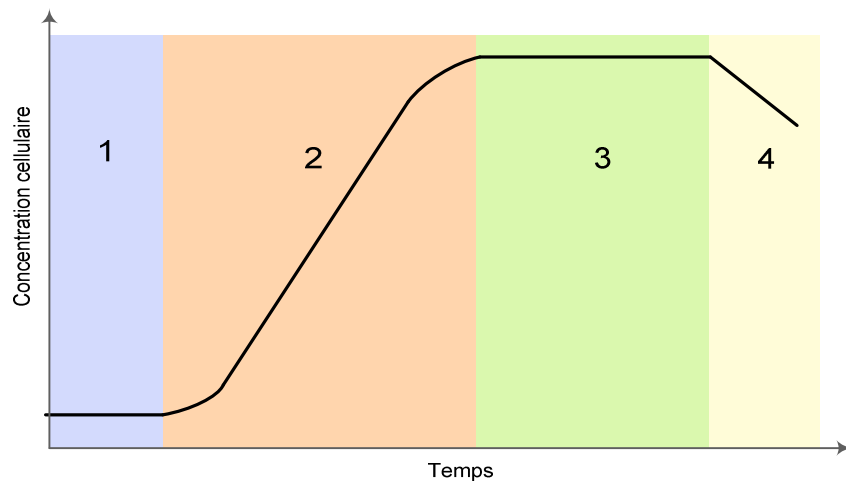


Figure 2.1 : Courbe de croissance typique dans un système batch

Phase de latence (1): Elle correspond à la phase d'adaptation des cellules aux nouvelles conditions de culture. La vitesse de croissance n'est pas très élevée. Ceci est

probablement dû au stress induit par le passage des cellules d'un milieu concentré à un milieu dilué.

Phase exponentielle (2) : Les cellules se multiplient au maximum de leur capacité en mettant à profit les nutriments présents dans le milieu. La division cellulaire suit une fonction exponentielle. La vitesse de croissance est maximale.

Phase stationnaire ou « plateau » (3) : Les nutriments sont épuisés et/ou certains composés issus de la multiplication cellulaire limitent la reproduction. Le nombre de cellules devient constant.

Phase de décroissance (4) : Le milieu est pollué comme conséquence de la mort cellulaire.

2.3. Microalgue modèle : *Porphyridium purpureum*

Porphyridium purpureum (préalablement nommée *Porphyridium cruentum*) est une microalgue unicellulaire autotrophe appartenant à la classe de Rhodophycées, sous-classe Bangiophycidées, ordre Porphyridiales, famille Porphyridiaceae, genre *Porphyridium* (Vonshak, 1988).

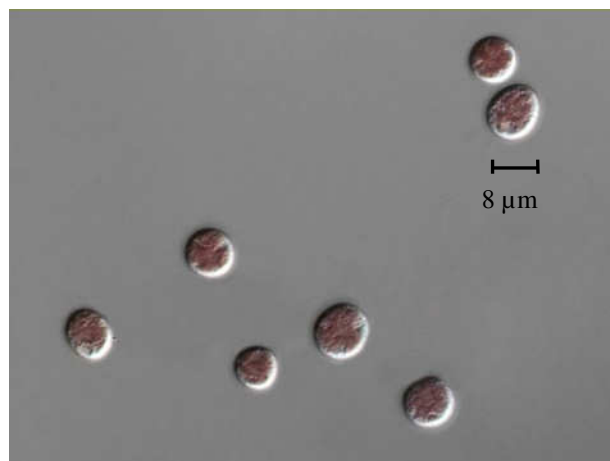


Figure 2.2 : Cellules de *Porphyridium purpureum* observées au microscope (grossissement 40x)

De forme sphérique, de petite taille (une dizaine de μm) et dépourvue de paroi cellulaire (Adda *et al.*, 1986 ; Arad *et al.*, 1988), elle se trouve généralement dans le milieu de façon solitaire ou sous la forme d'agrégats formant des colonies irrégulières scellées par du mucilage amorphe souvent sécrété par la cellule. Cette couche formée la

protège des agressions extérieures et la rend particulièrement résistante au stress hydrodynamique. Cette substance est un polysaccharide sulfoné soluble dans l'eau qui est à l'origine d'une viscosité élevée spécialement sous conditions de limitation (Adda *et al.*, 1986 ; Arad *et al.*, 1988 ; Ramus *et al.*, 1989).

Cette microalgue est également, une source importante d'acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont essentiels pour les humains et utilisés également dans la nutrition animale. En moyenne, la biomasse contient (en matière sèche) 1,6 % d'acide palmitique (16:0) ; 0,4 % d'acide linoléique (18:2 ω 6) ; 1,3 % d'acide arachidonique (20:4 ω 6) ; et 1,3 % d'acide eicosapéntanoïque (20:5 ω 3) (Rebollos Fuentes *et al.*, 2000). En conditions optimales de croissance, l'acide gras dominant est l'acide 20:5. En conditions limitées de croissance, par exemple, à haute concentration cellulaire, à intensité lumineuse faible, en-dessous de la température optimale et à salinité élevée, les acides gras 20:4 ω 6 et 18:2 ω 6 deviennent majoritaires (Arad and Richmond, 2004).

Elle possède aussi un appareil pigmentaire complexe et efficace lui permettant d'absorber des photons pour une très large gamme de longueurs d'onde. Ceci s'explique par les conditions naturelles en eaux profondes où elle se développe, sous les populations d'algues vertes. Nous pouvons trouver dans sa composition de la chlorophylle *a* et *d* et des phycobiliprotéines (phycoérythrine et phycocyanine) (Tomaselli, 2004).

Cette espèce a été retenue dans cette étude en tant que microorganisme modèle pour les raisons suivantes :

- le grand nombre de données disponibles et de travaux la concernant, ce qui est particulièrement utile pour détailler le modèle cinétique,
- sa robustesse face aux perturbations hydrodynamiques,
- l'expérience du Laboratoire de Génie de Procédés et Matériaux (LGPM) de l'Ecole Centrale Paris sur la culture de cette espèce, dont les paramètres essentiels sont aujourd'hui connus et maîtrisés,
- la faisabilité de la culture de cette espèce dans les photobioréacteurs existant au laboratoire.

Dans ce qui suit, nous allons voir les facteurs physiques (lumière, agitation, température) et chimiques (différents nutriments) les plus importantes et nécessaires pour la croissance de *Porphyridium purpureum* ainsi que le milieu de culture utilisé.

2.3.1. Facteurs physiques

Lors de la culture de la microalgue *Porphyridium purpureum*, trois paramètres physiques très importants doivent être pris en compte : la lumière, l'agitation et la température.

2.3.1.1. Lumière et agitation

Comme tout organisme photosynthétique, *Porphyridium purpureum* trouve sa source d'énergie dans la lumière. Celle-ci a une influence notable sur la composition de la biomasse produite et sur la vitesse de croissance. En absence de lumière, il n'y aura pas de production de matière organique et un excès de lumière pourra provoquer un phénomène de photoinhibition. Les meilleures vitesses de photosynthèse vont s'obtenir avec une alternance de périodes de lumière et d'ombre (Masojídek *et al.*, 2004) :

- pendant la période de lumière, l'énergie lumineuse est absorbée et convertie en énergie chimique qui permet de produire des enzymes (NADPH₂ et ATP) et de l'oxygène,
- pendant la période d'ombre, le NADPH₂ et l'ATP sont utilisés pour réduire le dioxyde de carbone et le transformer en molécules organiques.

La photosynthèse augmente avec la lumière. Cependant, pour obtenir une bonne productivité, il faudra envoyer une quantité de lumière correspondant au niveau situé juste en dessous du point de photolyse (destruction par l'effet photoélectrique). De plus, la lumière fournie à la culture ne sera pas disponible en quantité égale à chaque point du bioréacteur. Ainsi, pour optimiser la répartition de lumière vis-à-vis des cellules, il faut équiper le photobioréacteur d'un système d'agitation approprié.

Une forte intensité lumineuse liée à une agitation régulière permettront une croissance optimale. On veillera à ce que toutes les cellules reçoivent des charges de lumière fréquentes et soient rapidement protégées d'une exposition trop longue en les faisant plonger et remonter les plus souvent possible. Par contre, si la lumière et l'agitation sont faibles, la croissance sera lente mais la production des pigments sera plus élevée (Fox, 1999). En effet, les microalgues répondent à des changements de l'intensité lumineuse incidente par des modifications de leur composition macromoléculaire notamment au niveau de la teneur en protéines et en sucres totaux.

2.3.1.2. Température

C'est un facteur qui conditionne la conversion globale de l'énergie lumineuse et en conséquence la croissance cellulaire. La plupart des microorganismes survivent à l'exposition à de larges plages de températures. Mais en général, il existe une température optimale pour la croissance. Dans le cas de *Porphyridium purpureum*, elle se situe entre 21 et 26°C et est probablement plus proche de 26°C. L'exposition à des températures supérieures à 26°C ou inférieures à 21°C, entraîne une diminution sensible de la vitesse de multiplication voire un arrêt quasi-total de la croissance (Golueke and Oswald, 1962).

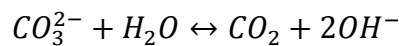
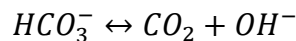
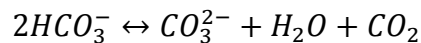
2.3.2. Facteurs chimiques : Nutriments

Nous pouvons récapituler les principaux nutriments nécessaires pour la croissance microalgale comme suit :

2.3.2.1. Source de carbone

Pour obtenir la croissance cellulaire ainsi qu'une vitesse de production élevée, l'ajout de dioxyde de carbone (CO_2) et/ou de bicarbonate (HCO_3^-) est nécessaire. Contrairement aux plantes terrestres, l'apport de CO_2 atmosphérique ne suffit pas pour obtenir une croissance rapide. La vitesse spécifique maximale de croissance est améliorée par l'injection d'un mélange air- CO_2 dans le photobioréacteur (Vonshak, 1988).

Le système tampon bicarbonate-carbonate peut fournir le CO_2 nécessaire à la photosynthèse par les réactions suivantes :



La fixation photosynthétique du CO_2 qui permet la croissance cellulaire, comprend la formation et accumulation des ions OH^- dans le milieu de culture ce qui est à l'origine d'une augmentation graduelle du pH . A l'inverse, l'ajout du CO_2 tend à faire diminuer le pH . L'ajout du CO_2 gazeux est donc considéré par certains auteurs comme la meilleure méthode et la plus appropriée pour contrôler le pH et obtenir des rendements élevés (Grobbelar and Soeder, 1985). Il existe un pourcentage optimal pour la croissance : Iqbal

et ses collaborateurs affirment que la croissance optimale est obtenue avec un pourcentage compris entre 2,5 et 5% (Iqbal *et al.*, 1993)

Les microalgues admettent des variations lentes et progressives de *pH*, mais elles peuvent être détruites suite à des variations brutales. Le *pH* influence aussi indirectement la croissance cellulaire en intervenant dans la solubilité de certains éléments nutritifs : les carbonates et les phosphates de Ca, Mg ou Fe ont tendance à précipiter quand le *pH* du milieu augmente.

Porphyridium purpureum tolère des variations de *pH* entre 5,2 et 8,3 (Golueke and Oswald, 1962). Colman et Gehl (1983) ont démontré l'existence d'un *pH* optimal de croissance de 7,5.

2.3.2.2. Source d'azote

La source d'azote pour la culture est le nitrate de sodium ou de potassium (NaNO_3 ou KNO_3). Le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) peut également être utilisé. La teneur initiale en azote dans le milieu (concentrations initiales inférieures ou égales à 50 mg/l) influence la vitesse spécifique de croissance des cellules, les volumes cellulaires et la biomasse atteinte en fin de culture (Estrada Duran, 2007). Les cellules de *Porphyridium purpureum* forment des réserves azotées pendant leur croissance et les utilisent pour pouvoir continuer à se diviser quand l'azote dans le milieu est épuisé, ou dans le cas d'une carence initiale (Dermoun, 1987 ; Estrada Duran, 2007). La carence en azote peut donner à la culture une couleur pâle (décoloration des cellules) et peut entraîner une baisse du volume cellulaire. Ces effets sont d'autant plus importants que la carence est plus forte (Dermoun, 1987).

2.3.2.3. Source de phosphore

La carence en phosphore ressemble beaucoup à celle en azote. La teneur initiale en cet élément modifie la phase exponentielle de croissance et influence la biomasse obtenue en fin de culture. La croissance cellulaire se voit limitée à concentrations égales ou inférieures à 30 mg/l (Estrada Duran, 2007). La carence en phosphore peut arrêter la synthèse du phycobilisome et produire une dégradation légère du collecteur d'énergie lumineuse de l'appareil photosynthétique (Collier and Grossman, 1992). Les cellules de

Porphyridium purpureum stockent le phosphore intracellulaire pour être utilisé lorsque cet élément sera absent dans le milieu.

Le phosphore peut être apporté par n'importe quel orthophosphate soluble (PO_4^{2-}) : phosphate monoammonique ($NH_4H_2PO_4$), phosphate dipotassique (K_2HPO_4), phosphate trisodique dodecahydraté ($Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$) ou l'acide phosphorique (H_3PO_4)

2.3.2.4. Salinité du milieu de culture

L'augmentation de la salinité peut avoir comme conséquence le léger accroissement de la teneur totale en lipides chez certaines espèces de microalgues (Iwamoto and Sato, 1986 ; Borowitzka and Borowitzka, 1988). La caroténogénèse peut également être influencée chez certaines souches (Cifuentes *et al.*, 2001).

Porphyridium purpureum montre une grande tolérance vis-à-vis de la teneur en sels et leur répartition dans le milieu de culture. Elle est capable de bien se développer dans un milieu contenant de la moitié à deux fois la concentration en chlorure de sodium (NaCl) de l'eau de mer (Vonshak, 1988). D'autres auteurs considèrent qu'une salinité de 25% semble être optimale mais il est tout à fait probable que la croissance soit encore acceptable entre 10 et 30% (Lee and Bazin, 1991 ; Mulyaldi, 1995).

2.3.2.5. Autres macro et micronutriments

Plusieurs éléments organiques et inorganiques sont utilisés pour la nutrition des microalgues. Outre le carbone (C), l'azote (N) et le phosphore (P) qui sont les éléments les plus importants, le soufre (S), le sodium (Na), le chlore (Cl), le potassium (K), le fer (Fe), le magnésium (Mg), le calcium (Ca) et les éléments trace B, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, Va et Se sont également incorporés dans le milieu nutritif microalgal (Marschner, 1995).

Très peu de données sont disponibles dans la littérature pour *Porphyridium purpureum*. Les effets de certains nutriments mentionnés ci-dessus ont été étudiés sur d'autres microalgues. Néanmoins, ces effets qui sont détaillés par la suite, nous permettent d'avoir une idée sur la façon dont ces éléments agissent sur la souche choisie.

La concentration en sodium (Na) est liée à celle du potassium (K). Le rapport K/Na est très important pour éviter l'inhibition de la croissance. Dans le cas d'*Arthrospira platensis*, l'inhibition apparaît pour un rapport K/Na >5, mais la vitesse de

croissance est constante si le rapport est inférieur à 5 quelque soit la teneur en Na (Zarrouck, 1966).

Le chlore (Cl) intervient comme coenzyme dans la photosynthèse. Il a une influence marquée sur la vitesse de croissance des cultures. Les observations des expériences effectuées sur la spiruline montrent un resserrement très accentué des cellules suivi de la destruction très rapide de la culture quand cet élément est absent (Fox, 1999).

Le Fer (Fe) intervient notamment comme catalyseur lors de la synthèse de la chlorophylle. La quantité présente dans le milieu de culture n'agit pas sur la vitesse de croissance cellulaire. Il est généralement apporté par une solution de sulfate de fer acidulé et de préférence associé à un agent chélatant (ou compléxant) comme l'EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique) pour éviter sa précipitation et favoriser son assimilation au niveau cellulaire (Fox, 1999). L'EDTA n'influe sur la culture qu'à de fortes concentrations et, à ce moment là, une toxicité apparaît.

2.3.3. Milieu de culture

La culture de *Porphyridium purpureum* est réalisée en utilisant un milieu liquide adapté à cette espèce nommé Hemerick (1973). Le *pH* de cette solution est ajusté à la valeur de $7 \pm 0,05$ avant stérilisation par autoclavage. Sa composition est donnée dans le tableau 2.1 :

Tableau 2.1 : Composition du milieu de culture Hemerick
pour *Porphyridium purpureum*

Eléments principaux	
NaCl	29 g/l
MgSO ₄ .7 H ₂ O	12,3 g/l
NaNO ₃	1,7 g/l
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,47 g/l
KCl	0,75 g/l
K ₂ HPO ₄	175 mg/l
FeEDTA	50 mg/l
Solution de microéléments	1 ml/l
Eau distillée	q.s.p. 1 litre

Solution de microéléments	
H_3BO_3	2 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,8 mg/l
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,02 mg/l
ZnCl_2	0,10 mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 mg/l
NH_4VO_3	0,02 mg/l
CoSO_4	0,05 mg/l

2.4. Matériels et méthodes

La microalgue *Porphyridium purpureum* qui servira pour l'identification et la validation du modèle mathématique sera, dans un premier temps, cultivée à petite échelle, en mode batch, dans des photobioréacteurs de 2,5 litres. Malgré le fait qu'une culture batch ne requiert aucune intervention extérieure après inoculation et afin d'effectuer ces cultures dans des conditions similaires pour pouvoir comparer les résultats, la préparation de l'expérience et la connaissance des méthodes de suivi sont primordiales.

Notre protocole opératoire implique : la préparation de l'inoculum, la définition des paramètres de culture, la stérilisation du réacteur, le démarrage de la culture et les méthodes à utiliser pour le suivi de la croissance et des conditions de culture.

2.4.1. Préparation de l'inoculum

En début de culture, une certaine quantité de microalgues est introduite lors de la phase d'inoculation. L'état de cet inoculum est essentiel, car il conditionne la croissance initiale et donc les résultats finaux.

Lors de l'inoculation, les microalgues passent donc du milieu concentré (préculture) à un milieu dilué (photobioréacteur) ce qui est la cause de la phase de latence observée en début de culture durant laquelle la culture ne croît plus et peut même dépérir avant de s'habituer à ce nouvel environnement et de commencer réellement à se développer. Un facteur important à prendre en compte est l'état des précultures. En effet, elles doivent disposer des caractéristiques les plus équivalentes possibles. Pour disposer d'un inoculum dans des conditions similaires, nous avons choisi de travailler avec des

précultures ayant été renouvelées tous les quinze jours, ce qui correspond donc à une phase exponentielle théoriquement stable.

La souche de *Porphyridium purpureum* SAG1380 utilisée, provient du Sammlung von Algenkulturen Pflanzphysiologischer Institut der Universität Göttingen (Allemagne). L'entretien de la souche est alors réalisé en milieu liquide dans des flacons Erlenmeyer de 500 ml qui sont placés dans un incubateur Minitron à atmosphère contrôlée dans les conditions suivantes :

- Température : 25 °C
- Eclairement : continu
- Intensité lumineuse incidente : $70 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Agitation : 90 rpm
- % CO_2 : 1%

Les précultures sont diluées (dilution par deux) toutes les deux semaines dans du milieu Hemerick.

2.4.2. Description du dispositif expérimental

Ce dispositif a pour but essentiel de montrer la faisabilité du procédé et de permettre de collecter les données expérimentales nécessaires à l'identification des paramètres du modèle retenu et sa validation postérieure. Ces photobioréacteurs peuvent fonctionner en mode semi-continu (discontinu pour la phase liquide et continu pour la phase gazeuse) ou en mode continu.

Il s'agit d'un photobioréacteur de type colonne à bulles (cf. figure 2.3). Le volume de culture est de 2,5 litres. Ce dispositif est construit en verre avec un grand rapport surface/volume ($44 \text{ m}^2/\text{m}^3$) pour permettre une bonne pénétration de la lumière. Il est équipé d'une double enveloppe par laquelle circule de l'eau thermostatée qui permet de maintenir la température à 25°C.

Il comporte également un système d'agitation et d'aération par bullage qui assure l'apport de la source carbonée. Un mélange gazeux (air/ CO_2) est injecté de façon continue dans le photobioréacteur. Ce mélange gazeux injecté par la partie centrale inférieure de la colonne diffuse au travers d'un filtre stérilisant Millipore et est ensuite fractionné à l'aide d'une pastille de verre fritté installé à la base du photobioréacteur. Les débits gazeux

d'entrée sont contrôlés par des débitmètres volumiques. (Brook Instruments type R2-15AA pour l'air et type R2-15AAA pour le CO_2). Dans la gamme de débits utilisés dans cette thèse nous avons un réacteur parfaitement agité.

Quatre lampes fluorescentes blanches et trois lampes de lumière rose installées autour de la colonne sur deux cotés permettent d'avoir un système d'éclairage approprié très proche de la lumière solaire. La cuve cylindrique du photobioréacteur présente une surface éclairée de $0,1 \text{ m}^2$.

La partie supérieure de la colonne comporte des orifices permettant d'effectuer les prélèvements et l'alimentation en continu et une sortie de gaz équipée d'un filtre à $0,2 \mu\text{m}$ (Midisart). Une surverse est reliée à une fiole de garde. Les prélèvements sont effectués à l'aide de pipettes stériles dans un cône de stérilité assuré par la flamme d'un bec bunsen.

2.4.3. Stérilisation du photobioréacteur

La stérilisation du réacteur est une étape importante pour le succès d'une culture. La présence de contaminants comme les bactéries peut nuire à la culture et conduire à des résultats erronés. En effet, les bactéries peuvent entrer en compétition avec les microalgues cultivées diminuant ainsi leur vitesse de croissance. Nous avons constaté sur quelques cultures des débuts de contaminations bactériennes. Ce problème peut avoir trois origines : présence de contamination dans le milieu de culture et/ou dans la souche inoculée ou simplement la présence des dépôts de microalgues demeurant accrochées en certains endroits parfois inaccessibles de la cuve en verre nettoyée manuellement.

Avant de mettre en marche le photobioréacteur, la cuve en verre vide, le matériel à utiliser pour leur remplissage et le milieu de culture sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes. Le remplissage du bioréacteur doit se faire sous une hotte à flux laminaire.

2.4.4. Démarrage de la culture

Suite à la stérilisation du matériel, l'inoculum est introduit dans la cuve en verre sous conditions stériles dans une hotte à flux laminaire. Le réacteur est installé sur son bâti. Les systèmes de régulation de la température et d'aération sont mis en fonctionnement. Finalement, le système d'éclairage est mis sous tension.

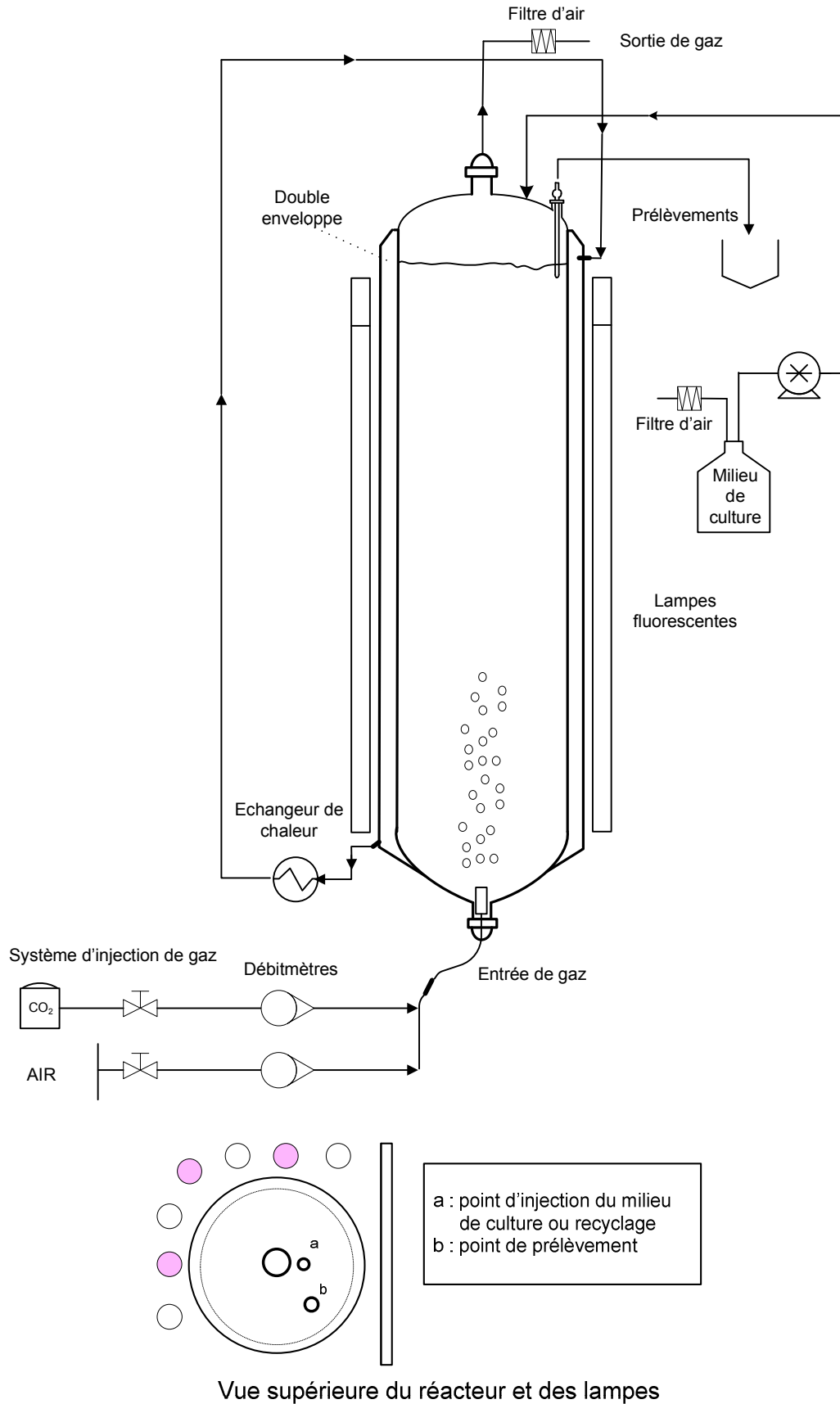


Figure 2.3 : Schéma du photobioréacteur de 2,5 litres

Les premières heures sont critiques et conditionnent le bon déroulement d'une culture. Il est nécessaire alors d'éclairer le réacteur avec une faible intensité lumineuse pour éviter un stress de la culture pendant la phase de latence. Lorsque la concentration cellulaire commence à croître, le flux lumineux est progressivement augmenté jusqu'à atteindre la valeur désirée avant le début de la phase exponentielle de croissance. De la même façon, le début de l'injection de CO_2 est un passage délicat dans le processus de démarrage. En effet, l'ajout de CO_2 modifie entre autres le pH initial de la culture qui est fixé à 7. Il faut donc laisser la culture quelques heures (6h environ) sans CO_2 et ensuite l'augmenter progressivement, comme dans le cas de la lumière.

2.4.5. Méthodes de suivi de la croissance

Quatre techniques indépendantes permettent de déterminer l'évolution de la concentration cellulaire d'une culture de microalgues : comptage par microscopie, comptage par granulométrie laser, mesure de la densité optique par spectrophotométrie et mesure de la matière sèche. Toutes ces techniques sont réalisées hors ligne. Le temps nécessaire pour effectuer la mesure dépend de la méthode choisie et peut varier entre 15 minutes et 24 heures. Le volume de l'échantillon varie en fonction de la méthode choisie et peut aller de 1.10^{-4} ml à 100ml.

2.4.5.1. Comptage cellulaire par microscopie

Le comptage de cellules par unité de volume est effectué sur une lame de Malassez au microscope optique (grossissement x40). Pour chaque détermination, quatre comptages sont effectués sur quatre lames différentes, la moyenne et l'écart-type sont ensuite calculés. Le calcul du nombre de cellules dépend du nombre de carreaux pris en compte, des limites choisies (limites de carreaux de la cellule) et de la dilution effectuée sur l'échantillon. Le volume utilisé pour le comptage est de l'ordre de 1.10^{-4} ml. Le principe de cette méthode est détaillé dans l'annexe A-1. L'une de désavantages de cette méthode réside dans le fait que la méthode ne prend pas en compte le diamètre cellulaire.

2.4.5.2. Comptage cellulaire par granulométrie laser

La granulométrie a pour objet la détermination de la forme et de la distribution des diamètres de petites particules. La distribution granulométrique est déduite de l'interaction entre un ensemble de particules et le faisceau laser incident par l'analyse de la tache de

diffraction du faisceau. L'annexe A-2 présente plus de détails sur le principe de cette méthode.

L'application de cette méthode au comptage de microalgues a été validée pour notre microalgue modèle *Porphyridium purpureum*. Un protocole expérimental a été proposé (cf. Annexe A-4). Les granulométries en fonction du type de prétraitement de l'échantillon et en fonction de la dilution appliquée à celui-ci ont été étudiées. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus par le comptage par microscopie. Les résultats sont satisfaisants et très proches. Le caractère reproductible de la mesure granulométrique a été également confirmé (cf. Annexe A-5).

Le comptage cellulaire est réalisé en utilisant un granulomètre laser QICPIC de SYMPATEC (cf. figure 2.4). Les analyses se font en voie liquide en utilisant le système de présentation d'échantillon LIXELL qui comporte une cellule de 0,2 mm de longueur de trajet optique. L'échantillon est dilué et soumis à un prétraitement (voir annexe A-4) pour éviter la présence d'agrégats cellulaires. Un logiciel intégré au système facilite le traitement des données. Cet appareil nous permet de déterminer la taille des particules, différents facteurs de forme et plus spécifiquement la distribution des différentes tailles d'un échantillon.

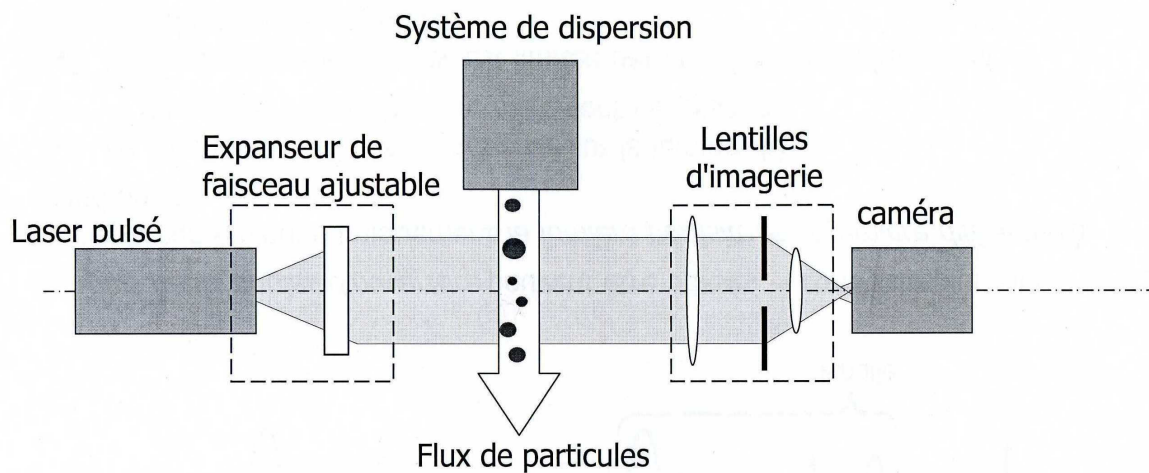


Figure 2.4 : Schéma du granulomètre laser (Source : Sympatec)

2.4.5.3. Mesures spectrophotométriques

Il s'agit d'une méthode de mesure indirecte de la biomasse. La mesure à 760 nm indique la turbidité d'une solution microalgale (Dermoun, 1987) laquelle, ayant été

corrélée au comptage cellulaire par granulométrie, permet une estimation de la concentration en biomasse. Cette courbe d'étalonnage est établie en utilisant plusieurs échantillons pris lors de la phase exponentielle de la culture (cf. Annexe A-6)

La concentration en pigments est également accessible par cette méthode : la concentration en chlorophylle à 680 nm (Dermoun, 1987) et celle en phycoérythrine à 545 nm (Bermejo *et al.*, 2002). Le rapport d'absorbances 545nm/760nm nous permet d'estimer le contenu de phycoérythrine par cellule.

2.4.5.4. Mesure de la matière sèche

La mesure de la matière sèche est classiquement utilisée pour déterminer la concentration en biomasse microalgale. Cette méthode nécessite des volumes d'échantillons importants (de 50 à 100 ml) ce qui la rend non-envisageable comme mesure de routine dans des réacteurs de petit volume. Des plus, la mesure peut être faussée à cause de la présence de cellules mortes ou de polysaccharide produits par la microalgue. Dans notre étude, cette mesure est effectuée seulement en fin de culture.

La procédure à suivre est la suivante :

- un prélèvement de 50 ou 100 ml (suivant la concentration) est effectué,
- l'échantillon est centrifugé à 4000 rpm pendant 25 minutes,
- un filtre Whatman GF/C 90 mm est séché à 105 °C et pesé après refroidissement dans un dessiccateur,
- le culot issu de la centrifugation est filtré,
- la matière récupérée sur le filtre est rincée à l'eau distillée,
- le filtre est introduit à sécher dans le four à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (24 h environ),
- le filtre et le culot sont pesés après refroidissement dans un dessiccateur.

La matière sèche (*MS*) en g/l est calculée en utilisant la formule suivante :

$$MS = \frac{\text{poids}(\text{filtre} + \text{culot sec}) - \text{poids}(\text{filtre})}{\text{volume d'échantillon}} \quad (2.1)$$

2.4.6. Méthodes de suivi des conditions de culture

2.4.6.1. *pH* et oxygène dissous

Ces deux mesures sont effectuées à l'aide de sondes spécifiques sur des prélèvements quotidiens (sonde Radiometer Analytical pour le *pH* et sonde INGOLD type 170 % air pour l'O₂ dissous). Afin de prévenir toute dérive, ces appareils sont régulièrement étalonnés.

2.4.6.2. *Evolution du débit et de la composition du gaz d'alimentation*

Le débit du gaz injecté dans le photobioréacteur est vérifié à l'aide d'un débitmètre à bulle. La composition du gaz d'alimentation est quant à elle mesurée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Le prélèvement de l'échantillon de gaz (0,3 ml) servant à l'analyse est réalisé à l'aide d'une seringue par piquage dans le tuyau d'alimentation.

Le laboratoire est équipé d'un chromatographe GIRA GC180 doté de deux colonnes : un tamis moléculaire rempli de zéolites et une colonne Porapak Q remplie d'adsorbants organiques (copolymères styrène-divinylbenzène). Cet appareillage permet l'analyse des gaz permanents. Le tamis moléculaire permet entre autres, la séparation de l'azote et de l'oxygène et le piègage du CO₂. La colonne Porapak Q quant à elle est plus adaptée à nos besoins puisqu'elle permet de détecter la présence du CO₂. Le détecteur utilisé est un catharomètre.

Un étalonnage de la technique de dosage a été réalisé à partir de mélanges air-CO₂ de composition connue (bouteilles avec 1% et 3% de CO₂). Les résultats sont montrés en annexe A-6.

2.4.6.3. *Intensités lumineuses incidente et sortante*

Les intensités lumineuses sont évaluées à partir de 10 mesures effectuées en dix endroits préalablement définis du réacteur. Le capteur utilisé est le LI-COR LI-190SA relié au boîtier de mesure LI-250. L'intensité incidente est obtenue en orientant le capteur vers les lampes fluorescentes et l'intensité sortante vers la cuve en verre contenant la culture.

2.4.6.4. Carbone inorganique total

a) Définition

Le carbone inorganique total (*CIT*) est la somme des espèces de carbone inorganique dans une solution. Elles incluent le dioxyde de carbone, l'acide carbonique et les anions bicarbonate et carbonate. Le dioxyde de carbone et l'acide carbonique sont en général regroupés sous le terme « *dioxyde de carbone dissous* » car il est en pratique difficile de les séparer et la concentration en acide carbonique est largement inférieure à celle en dioxyde de carbone.

Dans les cultures de microalgues, le *CIT* est un paramètre important lié au *pH*. En effet, les variations de *pH* sont dues principalement à la dissolution de dioxyde de carbone qui conduit à la formation des ions carbonates et bicarbonate jusqu'à ce que l'équilibre entre ces trois formes soit atteint. La perte de dioxyde de carbone dans le milieu due à la consommation des cellules est partiellement compensée par sa régénération à partir des espèces carbonates et bicarbonates (Camacho Rubio *et al.*, 1999).

La concentration en carbone inorganique total s'exprime en mol de carbone par unité de volume comme suit :

$$[CIT] = [CO_2(diss)] + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}]$$

où:

$[CIT]$ est la concentration en carbone inorganique total (mol. l⁻¹),

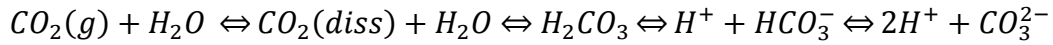
$[CO_2(diss)]$ est la concentration en CO_2 dissous (mol. l⁻¹) qui est égal à la somme de concentrations en dioxyde de carbone et d'acide carbonique $[CO_2(diss)] = [CO_2(diss)] + [H_2CO_3]$,

$[HCO_3^-]$ est la concentration en ions bicarbonates (mol. l⁻¹),

$[CO_3^{2-}]$ est la concentration en ions carbonates (mol. l⁻¹).

b) Equilibre chimique du système

Chacune des molécules ci-dessus mentionnées est liée par l'équation suivante, dérivée de l'équilibre du pH :



Le dioxyde de carbone à l'état gazeux injecté dans la culture se dissout dans l'eau et le CO_2 dissout réagit avec de l'eau pour former de l'acide carbonique. Ce dernier, en étant un diacide, cède ses deux protons en fonction des constantes d'acidité des couples acido-basiques (H_2CO_3/HCO_3^-) et (HCO_3^-/CO_3^{2-}) et de la composition initiale en solutés acido-basiques de l'eau. Une production instantanée d'ions bicarbonates et carbonates est observée. Ces réactions et leurs constantes d'acidité sont récapitulées dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Réactions chimiques mises en jeu lors de l'équilibre du système et leurs constantes d'équilibre

Réactions	Constantes d'équilibre
$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$	$K_1 = \frac{[HCO_3^-][H^+]}{[CO_2]}$
$HCO_3^- \rightleftharpoons 2H^+ + CO_3^{2-}$	$K_2 = \frac{[CO_3^{2-}][H^+]}{[HCO_3^-]}$

c) Equilibre gaz liquide du système

La concentration en dioxyde de carbone dissous (mol l^{-1}) est liée à la pression partielle par la loi de Henry :

$$[CO_2(diss)] = \frac{P \cdot y_{CO_2}}{H} = \frac{P_{CO_2}}{H} \quad (2.2)$$

avec :

P : pression de la phase gazeuse (atm),

y_{CO_2} : fraction molaire de CO_2 dans la phase gazeuse (sans dimension),

P_{CO_2} : pression partielle en CO_2 dans la phase gazeuse en équilibre avec le liquide (atm),

H : constante de Henry (atm l mol^{-1}) qui dépend du pH , de la température et de la composition du milieu.

d) Méthode de détermination du CIT

La méthode choisie a été décrite et utilisée par Marty et ses collaborateurs (Marty *et al.*, 1995) pour la culture des microorganismes. Selon les auteurs, il s'agit d'une méthode très précise pour des concentrations faibles en CIT allant jusqu'à 10^{-6} mol/l. Elle a été reprise et utilisée par Nouals (2000), Spolaore (2005) et Estrada Duran (2007) dans le cas de la culture de microalgues (*Porphyridium purpurem* et *Nannochloropsis oculata*). Dans ce cas là, la technique donne des résultats acceptables pour une gamme de concentrations en CIT comprise entre 5.10^{-4} et 1.10^{-2} mol/l (Spolaore, 2005).

Cette méthode consiste donc à prélever un échantillon de 5 ml dans une bouteille de volume connu équipée d'un septum. Quelques gouttes d'HCl 1N sont ajoutées à la seringue à travers le septum pour acidifier la solution (pH inférieur à 3) et convertir les bicarbonates et carbonates en CO_2 aqueux. L'échantillon est ensuite agité jusqu'à ce que l'équilibre entre les phases gaz et liquide soit atteint (30 minutes environ). A l'aide d'une seringue, un échantillon gazeux (1ml) est prélevé et analysé par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) pour obtenir la quantité de CO_2 .

e) Calcul de la concentration en CIT

Pour calculer la concentration en CIT il faut tenir compte :

- du nombre total de moles de CO_2 dans la phase gazeuse à l'équilibre : obtenu à partir de l'équation des gaz parfaits.

$$n_{CO_2 total}^g = \frac{P_{CO_2} V_g}{R T} \quad (2.3)$$

$$P_{CO_2} = y_{CO_2} P_{atm} \quad (2.4)$$

avec :

P_{CO_2} : pression partielle en CO_2 (atm),

V_g : volume de la phase gazeuse (l),

R : constante des gaz parfaits ($0,082 \text{ atm l mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T : température (K)

y_{CO_2} : fraction molaire de CO_2 dans la phase gazeuse (sans dimension),

P_{atm} : pression atmosphérique (atm)

- du nombre de moles de CO_2 initial dans l'air contenu dans la bouteille :

$$n_{CO_2 initial}^g = \frac{P_{CO_2}^{air} V_g}{R T} \quad (2.5)$$

avec :

$P_{CO_2}^{air}$: pression partielle du CO_2 dans l'air (atm),

- du nombre de moles de CO_2 désorbées :

$$n_{CO_2 désorbées}^g = n_{CO_2 total}^g - n_{CO_2 initial}^g \quad (2.6)$$

- du nombre de moles de CO_2 en phase liquide : obtenu à partir de la loi de Henry.

$$n_{CO_2}^{liq} = \frac{P_{CO_2} V_{liq}}{H} \quad (2.7)$$

avec :

V_{liq} : volume de la phase liquide (l),

H : constante de Henry du milieu utilisé à température ambiante (atm l mol^{-1})

La concentration en CIT est donc calculée en utilisant l'équation suivante :

$$[CIT] = \frac{n_{CO_2}^{liq} + n_{CO_2 désorbées}^g}{V_{liq}} \quad (2.8)$$

2.5. Choix du modèle

L'étape de modélisation représente une partie importante de ce travail de thèse. D'un point de vue quantitatif, un photobioréacteur est un système complexe et la modélisation de son comportement est par conséquent une tâche laborieuse. L'importance qualitative est également claire : en effet, une grande partie du reste de l'étude dépend directement de la modélisation du photobioréacteur étudié. La qualité et la structure du modèle doivent correspondre aux buts pour lesquels le modèle a été élaboré.

Nous considérons que la lumière et le dioxyde de carbone ont une influence importante sur la croissance cellulaire et cela a motivé notre choix. Le modèle dynamique retenu combine les bilans massiques de chaque constituant macroscopique, le modèle de transfert du CO_2 , le modèle de cinétique cellulaire établi par Baquerisse (1999) et le modèle relatif à l'énergie lumineuse de Krystallidis (1994). Il se base sur l'hypothèse que les réactions se déroulent en phase liquide et que le photobioréacteur est parfaitement mélangé.

Les bilans massiques effectués pour la concentration en biomasse X et la concentration en Carbone Inorganique Total CIT s'expriment sous la forme d'équations différentielles ordinaires. Dans ce qui suit, les équations définissant la dynamique du système sont détaillées.

2.5.1. Modèle de croissance pour *Porphyridium purpureum*

La dynamique de variation de la concentration en biomasse, notée X , pour un système en continu, est donnée par :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X + \frac{F_{in}}{V} X_{in} - \frac{F_{out}}{V} X_{out} \quad (2.9)$$

où:

μ est la vitesse spécifique de croissance (h^{-1}),

X est la concentration en biomasse dans le photobioréacteur (10^9 cellules. l^{-1})

F est le débit de liquide alimenté ou soutiré ($l. h^{-1}$)

V est le volume de la phase liquide dans le photobioréacteur (l)

Les indices *in* et *out* représentent respectivement les quantités entrantes et sortantes des éléments dans le système.

Il faut noter que la concentration en biomasse est représentée par le nombre de cellules dans le réacteur plutôt que par la concentration en matière sèche. Ce choix est dû au fait que la concentration en matière sèche peut-être faussée à cause de la présence de polysaccharides sulfonés produits par *Porphyridium purpureum*. Dans ce cas, une mesure de la matière sèche demande de séparer les cellules des polysaccharides installés autour d'elles ce qui s'avère difficile à réaliser. Par ailleurs, la mesure de la matière sèche oblige à prélever quelques dizaines de ml. par analyse (cf. § 2.4.6.4.) ce qui n'est pas envisageable dans des réacteurs de petit volume.

La vitesse spécifique de croissance μ est principalement influencée par l'énergie lumineuse par cellule (notée E) et par la concentration en carbone inorganique total [CIT] (Baquerisse, 1999). Après avoir testé plusieurs formes de modèles parfois complexes, cet auteur a opté pour un modèle de forme simple de type Steele (cf. Chap. I, § 1.4.2). Ceci permet de travailler avec un nombre réduit des paramètres ce qui peut représenter un avantage lors de la synthèse d'une loi de commande pour le système.

Chaque variable explicative considérée admet une valeur optimale, c'est-à-dire une valeur pour laquelle la vitesse spécifique de croissance atteint un maximum. Les effets limitant et inhibiteur de ces deux substrats sont pris en compte, ce qui permet d'écrire:

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{E}{E_{opt}} \right) e^{\left(1 - \frac{E}{E_{opt}}\right)} \left(\frac{CIT}{CIT_{opt}} \right) e^{\left(1 - \frac{CIT}{CIT_{opt}}\right)} \quad (2.10)$$

avec

μ : vitesse spécifique de croissance (h^{-1}),

E : énergie lumineuse disponible par cellule ($\mu\text{Einstein} \cdot \text{s}^{-1} \cdot 10^9 \text{cellules}^{-1}$),

CIT : concentration en carbone inorganique total ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$),

μ_{max} , E_{opt} et CIT_{opt} sont respectivement la vitesse spécifique de croissance maximale, l'énergie lumineuse disponible par cellule et la concentration en carbone inorganique total pour lesquelles $\mu = \mu_{max}$. Ce sont des paramètres du modèle qui doivent être identifiés à partir des expériences réalisées en mode batch dans le photobioréacteur.

L'énergie lumineuse disponible par cellule E définit la quantité d'énergie "retenue" par les cellules microalgales rapportée à 1 g. de biomasse (Krystallidis, 1994). Elle est donnée par :

$$E = \frac{(I_{in} - I_{out}) A_r}{V X} \quad (2.11)$$

où:

A_r est la surface éclairée du photobioréacteur (m^2),

V est le volume utile du photobioréacteur (l),

I_{in} et I_{out} sont respectivement les intensités lumineuses entrantes et sortantes ($\mu\text{Einstein. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$).

L'intensité lumineuse sortante I_{out} est fonction de l'intensité lumineuse entrante et de la quantité en biomasse selon la relation :

$$I_{out} = C_1 I_{in} X^{C_2} \quad (2.12)$$

où C_1 et C_2 sont des constantes qui dépendent du type d'éclairage et de la géométrie du bioréacteur.

2.5.2. Modèle d'évolution du carbone inorganique total (CIT)

La dynamique d'évolution de la concentration en carbone inorganique total est donnée par :

$$\frac{dCIT}{dt} = -\mu \frac{X}{Y_{X/CIT}} - m X_C + \frac{F_{in}}{V} CIT_{in} - \frac{F_{out}}{V} CIT_{out} + k_L a ([CO_2^*] - [CO_2]) \quad (2.13)$$

où:

$Y_{X/CIT}$ est le rendement qui représente la quantité de substrat *CIT* nécessaire à l'augmentation de la biomasse (nombre de cellules / mol de *CIT*) (Nouals,2000),

m est le taux spécifique de maintenance (h^{-1}),

X_C est la concentration molaire de carbone dans la biomasse et est défini par l'équation suivante : $X_C = 0,004 X$ (mol de *CIT*/litre) (Baquerisse, 1999),

$k_L a$ est le coefficient de transfert de dioxyde de carbone de la phase gazeuse à la phase liquide (h^{-1}),

$[CO_2]$ et $[CO_2^*]$ sont respectivement les concentrations molaires de dioxyde de carbone réel et en équilibre avec la phase gazeuse dans le milieu de culture.

A noter qu'à l'équation de bilan matière de base a été rajouté le terme de maintenance, la vitesse de consommation du substrat et le terme de transfert gaz-liquide (cf. Chap. I, § **1.4.1**). Concernant ce dernier, nous avons utilisé la Loi de Henry qui établit à l'équilibre la concentration en gaz dissous dans un liquide pour déterminer $[CO_2^*]$. Le coefficient $k_L a$ dépend fortement de l'agitation et donc de la surface d'échange entre les phases liquide et gazeuse (taille des bulles) (Bailey and Ollis, 1986).

La concentration $[CO_2^*]$ est donnée par :

$$[CO_2^*] = \frac{P_{CO_2}}{H} \quad (2.14)$$

où P_{CO_2} est la pression partielle en dioxyde de carbone dans les gaz d'alimentation et H est la constante de Henry pour le milieu de culture Hemerick.

La concentration $[CO_2]$ est calculée à partir du *CIT* et du *pH* dans le milieu de culture à partir de la relation (Nouals, 2000) :

$$[CO_2] = \frac{[CIT]}{\left[1 + \frac{K_1}{10^{-pH}} + \frac{K_1 K_2}{10^{-2pH}}\right]} \quad (2.15)$$

Récapitulatif :

Le modèle retenu qui sera utilisé dans les chapitres suivants pour développer des lois de commande pour le système, comporte principalement les deux équations différentielles ordinaires suivantes :

$$\begin{aligned}\dot{X} &= \mu X + \frac{F_{in}}{V} X_{in} - \frac{F_{out}}{V} X_{out} \\ \dot{CIT} &= -\mu \frac{X}{Y_{X/CIT}} - m X_C + \frac{F_{in}}{V} CIT_{in} - \frac{F_{out}}{V} CIT_{out} + k_L a ([CO_2^*] - [CO_2])\end{aligned}\quad (2.16)$$

2.6. Identification des paramètres

Lorsque le modèle a été défini, il est alors possible d'attribuer une valeur numérique aux paramètres soit sur la base d'une connaissance *a priori* de leur valeur (résultats proposés dans la littérature), soit à partir des données expérimentales. Etant donné la complexité des modèles (présence de non-linéarités) et le manque de résultats expérimentaux à la fois nombreux et fiables, cette tâche s'avère délicate.

Le modèle défini par les équations (2.16) comporte treize paramètres dont cinq sont spécifiques à la microalgue utilisée (*Porphyridum purpureum* cultivé en milieu Hemerick) et dépendent des conditions de culture (géométrie du photobioréacteur, intensité lumineuse incidente, pourcentage de carbone injecté dans la culture, etc): μ_{max} , CIT_{opt} , E_{opt} , C_1 et C_2 . Notre démarche consistera à identifier ces paramètres à partir des résultats expérimentaux à l'aide du logiciel *Aspen Custom Modeler*®. La valeur du coefficient de transfert gaz-liquide $k_L a(CO_2)$ sera déterminée expérimentalement. Les sept autres paramètres seront calculés ou repris dans la littérature.

2.6.1. Planification d'expériences

Il est essentiel que les données expérimentales contiennent suffisamment d'information pour assurer l'identification pratique des paramètres du modèle. Il est important de planifier les expériences à réaliser de manière à assurer l'obtention des valeurs fiables des paramètres.

La stratégie suivie a été de réaliser une campagne expérimentale permettant l'estimation de paramètres et la validation du modèle. La règle ici, étant donné que les microalgues ont des temps de génération relativement longs, est dans un premier temps d'étudier l'influence de deux facteurs au maximum. Donc, cette première campagne expérimentale a pris en compte les facteurs les plus importants pour la croissance de *Porphyridium purpureum* d'après l'étude bibliographique réalisée: l'intensité lumineuse incidente et le pourcentage de CO_2 dans le gaz d'alimentation.

Deux expérimentations servant à l'étude de répétabilité ont été menées dans les conditions optimales de croissance connues : $I_{in} = 120 \mu\text{Einstein. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, débit de gaz = 2,5 VVH, % CO_2 dans le mélange gazeux = 2% , éclairage continu. L'objectif de ces manipulations est d'estimer l'erreur expérimentale.

Pour toutes les autres expériences, seul le niveau de la condition opératoire concernée a varié, tous les autres facteurs ont été maintenus à leur valeur optimale. Le plan expérimental est résumé dans le tableau suivant :

Tableau 2.3 : Domaines des variations de facteurs pour les expériences destinées à l'identification et la validation du modèle retenu

Réacteur	I_{in} ($\mu\text{Einstein. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$)	% CO_2
<i>Porphy 1</i>	120	1
<i>Porphy 2</i>	120	5
<i>Porphy 3</i>	60	2
<i>Porphy 4</i>	160	2
<i>Conditions optimales</i>		
<i>Porphy 5</i>	120	2
<i>Porphy 6</i>	120	2

Les domaines de variations des facteurs ont été volontairement choisis importants. L'objectif était d'obtenir des conditions de croissances suffisamment variées pour observer des niveaux de facteurs limitants et inhibiteurs.

Nous avons donc réalisé une campagne expérimentale comprenant six photobioréacteurs de 2,5 litres pour la culture de *Porphyridium purpureum*. Pour toutes ces cultures, la concentration initiale X_0 est de l'ordre de $0,5 \cdot 10^9$ cellules ml^{-1} .

2.6.2. Etude de l'influence de l'apport de CO_2

Les conditions expérimentales testées au cours des cultures *Porphy 1* et *Porphy 2* correspondent aux conditions qui sont rassemblées dans le tableau 2.3. Ces conditions n'ont pas été appliquées dès l'ensemencement des réacteurs : l'intensité lumineuse incidente a d'abord été fixée à $45 \mu\text{Einstein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ avant d'être augmentée progressivement.

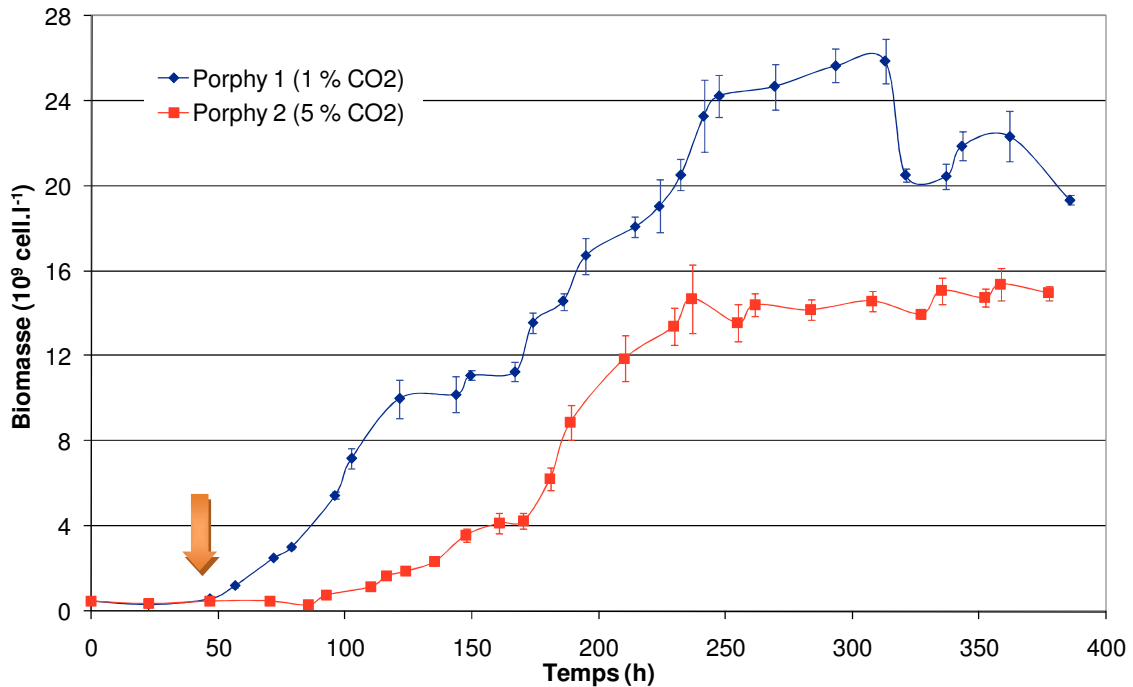


Figure 2.5 : Evolution des concentrations cellulaires en fonction du temps. La flèche indique l'augmentation de l'intensité lumineuse incidente

La croissance de *Porphy 1* est caractérisée par une phase de latence d'environ 48h. Une phase d'accélération de 30h précède la phase exponentielle d'une durée de 160h. Ainsi, nous observons une phase de ralentissement de la croissance au bout de 230h à 250h de culture. La concentration cellulaire se stabilise à $25 \cdot 10^9$ cellules l^{-1} . A partir de 300h, on remarque le début de la phase de décroissance.

D'autre part, la culture *Porphy 2* présente une phase de latence de 72h. Cela vient certainement du fait que le pourcentage en CO_2 est assez élevé. La durée de la phase

exponentielle est également perturbée. Elle est limitée à 100h. Une variation significative de la concentration cellulaire sur le plateau qui s'étend sur 80h est également observée. Cette concentration se stabilise à 15.10^9 cellules.l⁻¹.

Tableau 2.4 : Vitesses maximales de croissance lors de l'étude de l'influence de l'apport en CO_2

Réacteur	% CO_2	μ_{max} (h ⁻¹)
<i>Porphy 1</i>	1	0,0173
<i>Porphy 2</i>	5	0,0137

Ainsi, l'analyse des vitesses spécifiques maximales de croissance durant la phase exponentielle (cf. tableau 2.4) montre que la plus grande vitesse et par conséquent le temps de doublement le plus court, est atteinte pour un pourcentage de 1% en dioxyde de carbone dans le gaz d'alimentation. A partir de ces deux expériences réalisées nous pouvons affirmer que l'enrichissement du gaz d'alimentation à 5% de dioxyde de carbone provoque une baisse significative de la concentration cellulaire qui est environ la moitié de celle observée pour un mélange avec 1% de CO_2 (cf. figure 2.5).

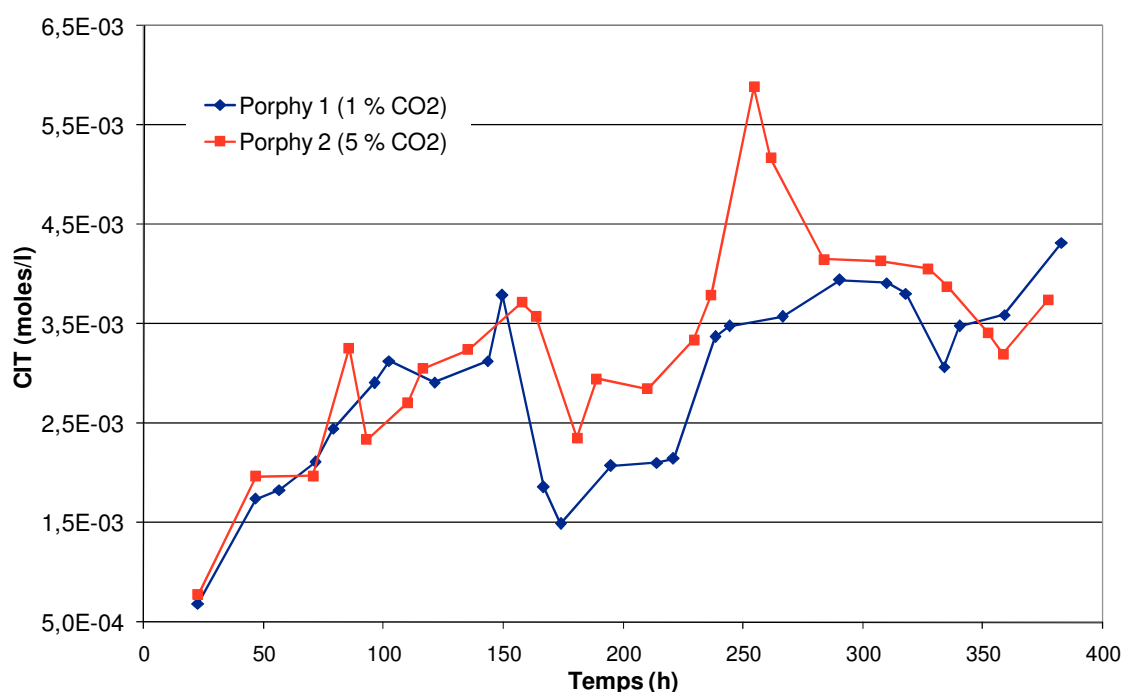


Figure 2.6 : Evolution des concentrations en carbone inorganique total CIT en fonction du temps lors de l'étude de l'influence du pourcentage de CO_2 .

En ce qui concerne l'évolution du *CIT* (cf. figure 2.6), on peut remarquer que pour 5% de CO_2 dans le gaz d'alimentation, la courbe se situe au-dessus de celle avec un pourcentage de 1% ce qui est tout à fait logique. La concentration en carbone inorganique total a tendance à s'accroître lors de nos expérimentations. Des valeurs faibles caractérisent le début. Une augmentation progressive se produit tout au long de ces expériences. Ainsi, quelques pics sont observés. Ces variations généralement brutales sont liées aux difficultés de stabiliser la composition du gaz d'alimentation. En effet, les débitmètres massiques s'avèrent très sensibles aux variations de pression du circuit d'air comprimé

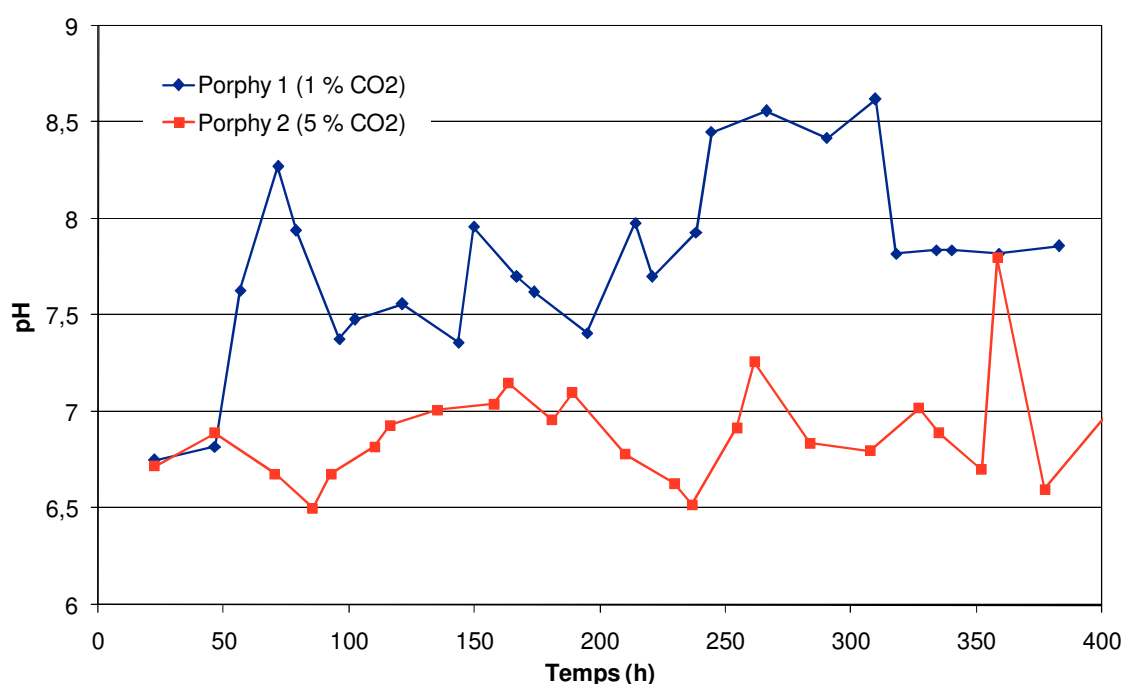


Figure 2.7 : Evolution du *pH* en fonction du temps dans l'étude du pourcentage de CO_2

L'apport de CO_2 est à relier avec le *pH* des cultures. En effet, l'augmentation de la quantité injectée de CO_2 dans le gaz d'alimentation diminue le *pH* alors que les concentrations en *CIT* restent du même ordre de grandeur ($10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). Cet apport a donc peu d'influence sur la concentration en *CIT* mais modifie le *pH* (cf. figure 2.7).

Les variations de *pH* sont très marquées et sont généralement comprises entre 6,5 et 8,5. Il tend à augmenter au cours de la croissance, mais pour l'expérience à 5% en CO_2 cette augmentation a lieu après une légère acidification du milieu. Ces valeurs sont tout à fait acceptables. Nos résultats sont en adéquation avec ceux que nous avons répertoriés. Golueke et Oswald (1962) affirment que le *pH* d'une culture de *Porphyridium purpureum*

peut varier entre 6,5 et 7. Ensuite, Speer et son équipe (1963) montrent que les cellules de *Porphyridium* peuvent supporter des variations de pH entre 5,2 et 8,3. Nos résultats se rapprochent davantage de ceux de Ucko et ses collaborateurs (1989) dans le sens où ils obtiennent une croissance optimale entre 6,0 et 8,5. Ces évolutions sont tout à fait en accord avec les évolutions des concentrations cellulaires. L'expérience menée à 5% de CO_2 montre des valeurs de pH plus faibles. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'absorption du CO_2 est plus importante et la vitesse de consommation du CO_2 dissous est plus lente. Par conséquent, la concentration cellulaire augmente plus lentement (cf. figure 2.5).

La concentration en oxygène dissous augmente au cours des expériences ce qui traduit la croissance des microalgues (cf. figure 2.8). De plus, on observe une augmentation importante de sa valeur en fin de phase exponentielle de croissance (concentration cellulaire maximale) suivi d'une diminution qui semble indiquer la mort des microorganismes.

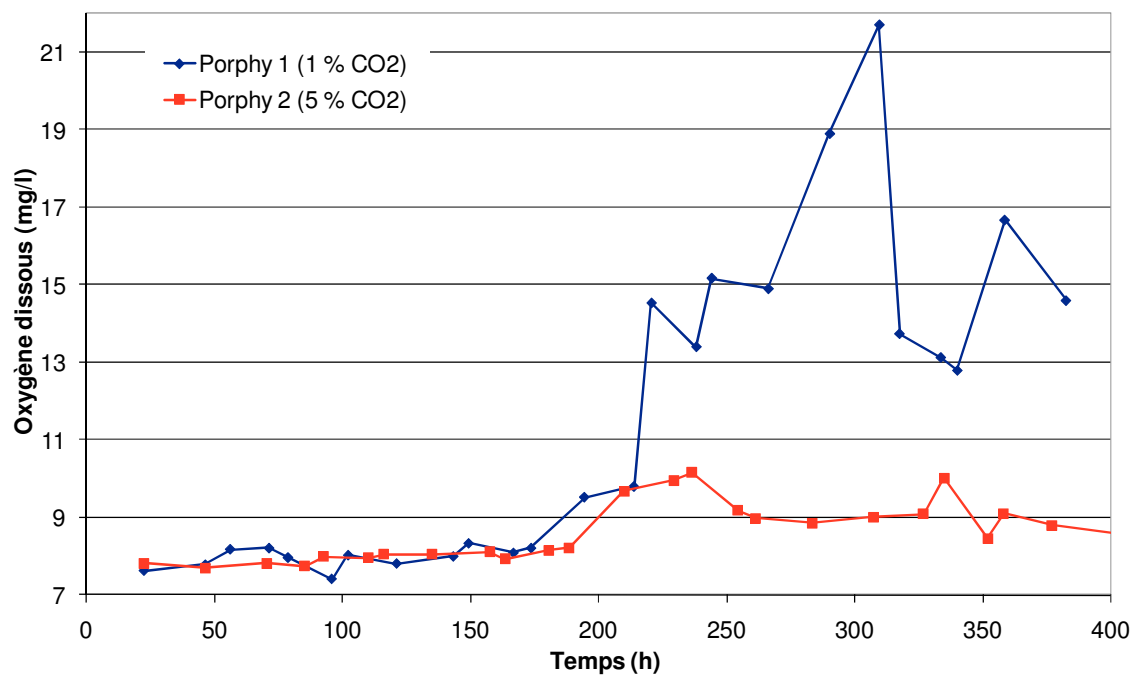


Figure 2.8 : Evolution temporelle des concentrations en oxygène dissous pour l'étude de l'influence du pourcentage de CO_2

On observe aussi qu'une concentration élevée en CO_2 inhibe l'activité photosynthétique limitant la production d'oxygène dissous. Plus le pourcentage en CO_2 dans le gaz d'alimentation augmente, plus la croissance est lente et les concentrations cellulaires diminuent.

2.6.3. Etude de l'influence de l'apport de lumière

Deux expériences ont été réalisées à des intensités lumineuses incidentes différentes : 60 et 300 $\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (*Porphy 3* et *Porphy 4* respectivement).

Il était initialement prévu (pour le réacteur *Porphy 4*) que l'intensité lumineuse soit 300 $\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nous avons changé cette valeur à 160 $\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ car notre dispositif ne le permettait pas. En effet, la configuration utilisée au laboratoire permet seulement un éclairage équivalent à 120 $\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sur chaque réacteur. Nous avons donc intégré à la structure 4 lampes additionnelles de façon à avoir une intensité incidente plus importante (cf. Fig 2.8).

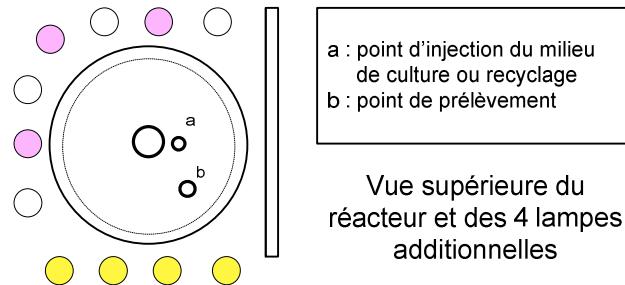


Figure 2.9 : Vue supérieure du photobioréacteur et de leur système d'illumination modifié

Comme dans les expériences précédentes, les conditions de culture n'ont pas été appliquées dès l'ensemencement des photobioréacteurs : l'intensité lumineuse incidente a d'abord été fixée à 30 $\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ avant d'être augmentée progressivement (40, 60 et 160 $\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) afin d'éviter une inhibition par la lumière.

Tableau 2.5 : Vitesses maximales de croissance lors de l'étude de l'influence de l'apport de lumière

Réacteur	I_{in} ($\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	μ_{max} (h^{-1})
<i>Porphy 3</i>	60	0,0181
<i>Porphy 4</i>	160	0,0219

Il ressort de la figure 2.10 que l'augmentation de l'intensité lumineuse incidente sur la culture améliore la vitesse maximale de croissance de cellules (cf. tableau 2.5). La vitesse la plus élevée et par conséquent le temps de doublement le plus court, sont

obtenus à $160 \mu\text{Einstein.m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La vitesse en phase exponentielle est limitée pour l'expérience *Porphy 3* menée à $60 \mu\text{Einstein.m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ici, la croissance s'arrête rapidement (après 250h de culture). Elle atteint des faibles concentrations en biomasse de l'ordre de $20.10^9 \text{ cellules.l}^{-1}$. Ainsi, cette expérience donne lieu à une phase de démarrage d'une courte durée. La culture *Porphy 4* présente une augmentation de la durée de cette phase (environ 24h de plus). Ce décalage n'affecte pas le déroulement de l'expérimentation puisque la croissance ne semble pas avoir été limitée durant cette période.

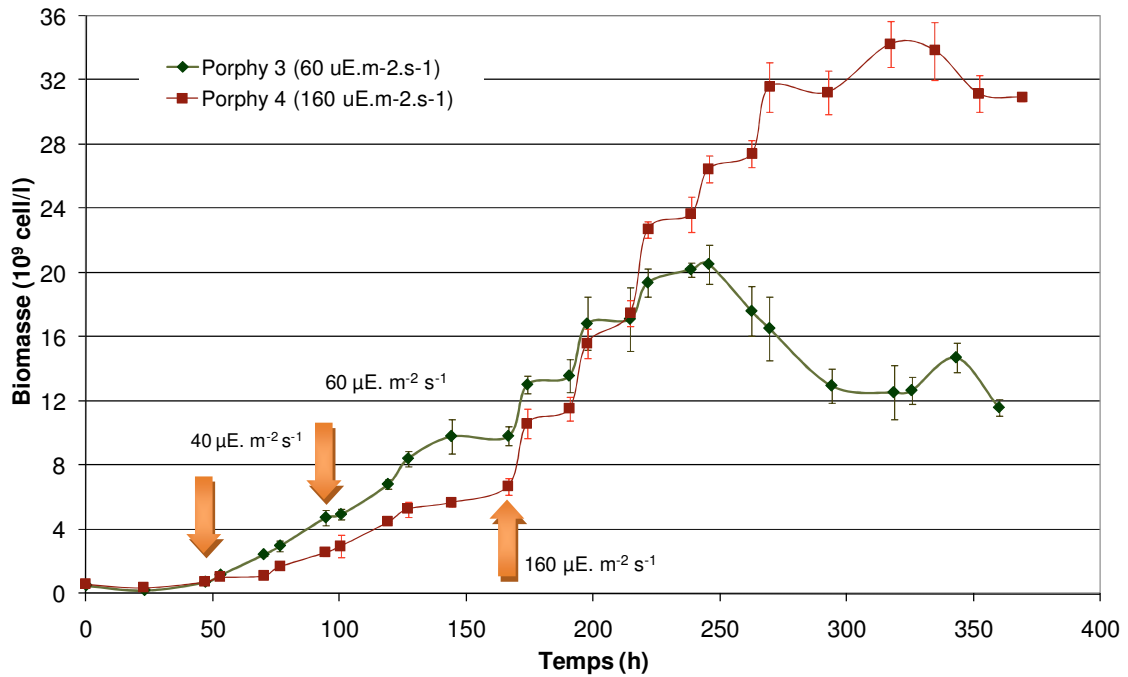


Figure 2.10 : Evolution des concentrations cellulaires en fonction du temps. Les flèches indiquent l'augmentation de l'intensité lumineuse incidente.

Si on compare la durée des phases exponentielles (cf. figure 2.10) ainsi que les concentrations cellulaires atteintes lorsque la croissance commence à ralentir, on observe que la phase exponentielle de l'expérience *Porphy 4* est la plus longue et que la concentration en biomasse en fin de cette phase est presque deux fois plus élevée que pour l'autre expérience.

D'autre part, la figure 2.11 montre l'évolution de l'énergie lumineuse accessible par cellule. Ces résultats mettent en évidence que, lorsque la culture se développe, le milieu devient alors très dense et l'énergie lumineuse accessible par cellule diminue et, à partir d'une certaine valeur, devient limitante pour la croissance.

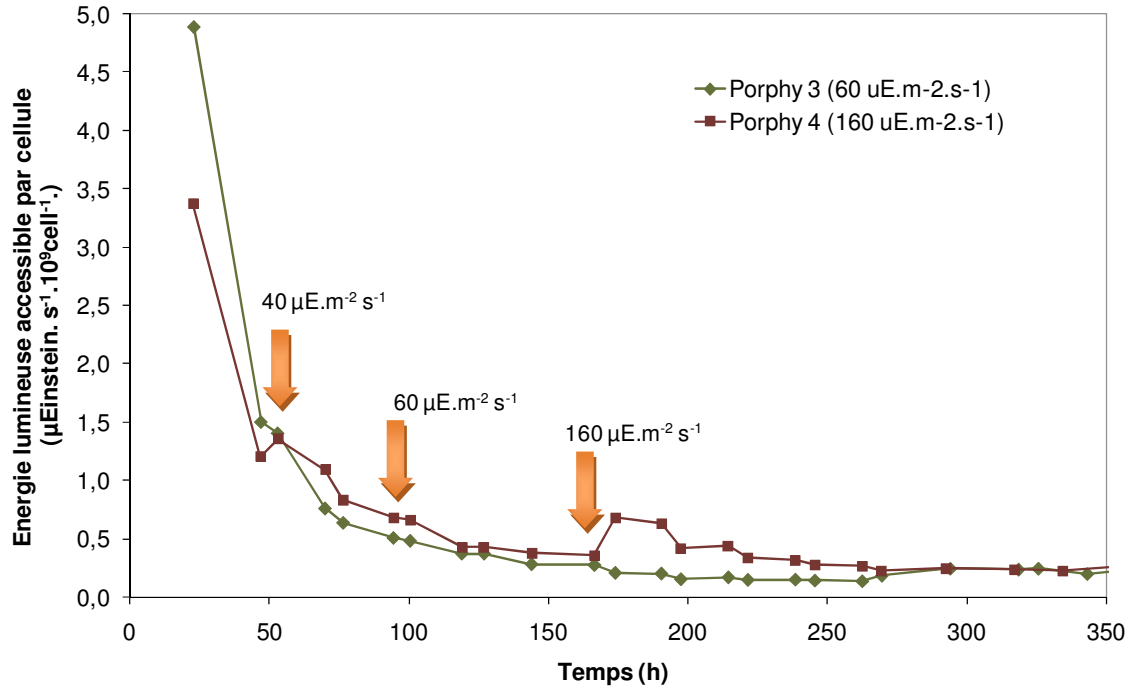


Figure 2.11 : Evolution de l'énergie lumineuse disponible par cellule lors de l'étude de l'influence de l'intensité lumineuse incidente.

Concernant la concentration en carbone inorganique total *CIT* (cf. figure 2.12), les résultats montrent une augmentation progressive de cette concentration lors des expériences. Partant des valeurs faibles ($2,6 \cdot 10^{-4}$ moles/l), cette concentration peut atteindre une valeur de $1,55 \cdot 10^{-2}$ moles/l, comme c'est le cas de l'expérience *Porphy 4*. Comme dans l'étude précédente, les variations parfois brutales sont liées aux difficultés de régler les débitmètres volumiques installés dans le dispositif expérimental.

La figure 2.13 présente l'évolution et le comportement caractéristique du *pH* lors de la culture de *Porphyridium purpureum*. Si l'on regarde la courbe pour l'expérience *Porphy 4*, on remarque que le *pH* subit une légère diminution, puis remonte pour se rapprocher d'une valeur de 8 en fin d'expérimentation (à 400h). L'augmentation de sa valeur est normale et traduit la croissance des cellules puisque le CO_2 injecté a tendance à acidifier le milieu de culture, alors que la consommation par les microalgues tend à l'alcaliniser. Le *pH* reste dans une plage de valeurs comprises entre 6,5 et 8,5.

Le comportement pour l'expérience *Porphy 3* est plus chaotique. Ces fluctuations sont également dues à la difficulté de régler le débit d'injection de CO_2 .

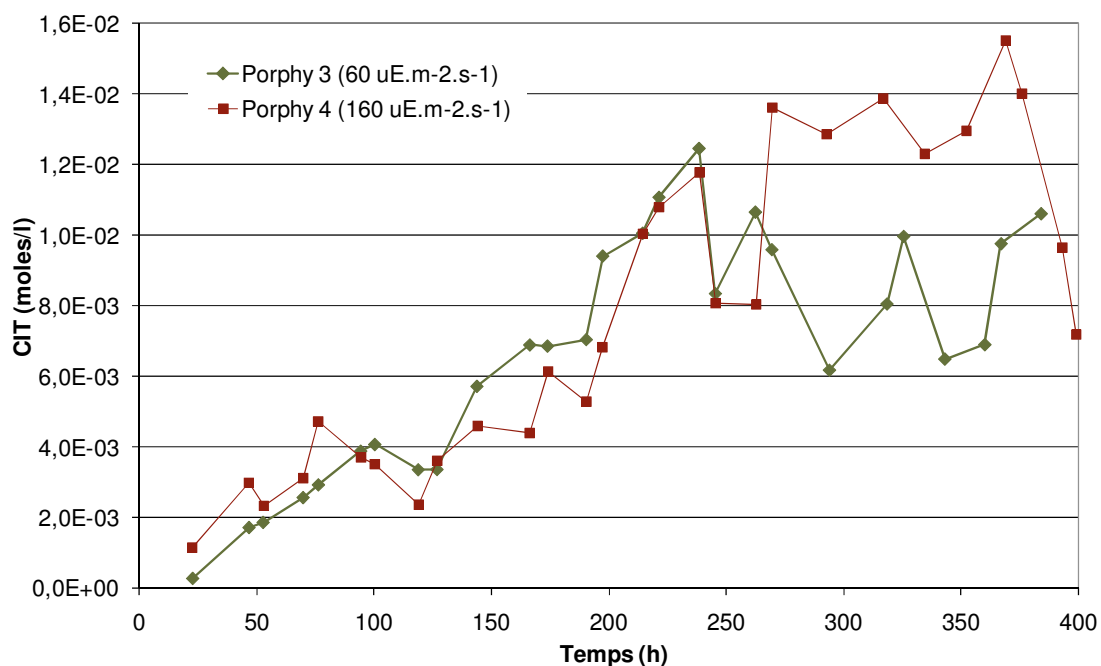


Figure 2.12 : Evolution temporelle des concentrations en carbone inorganique total *CIT* lors de l'étude de l'influence de l'intensité lumineuse incidente.

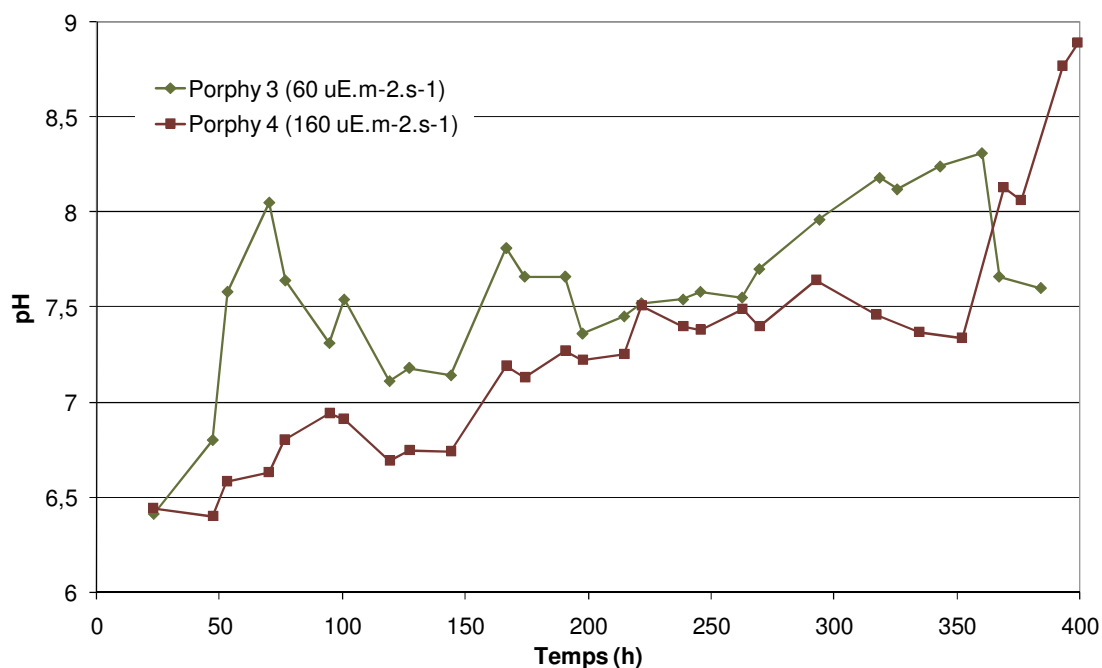


Figure 2.13 : Evolution temporelle du *pH* lors de l'étude de l'influence de l'intensité lumineuse incidente

Comme précédemment, les concentrations en oxygène dissous (cf. figure 2.14) sont globalement croissantes ce qui traduit l'activité photosynthétique et donc la croissance des microalgues. Ces concentrations sont comprises entre 7 et 12 mg/l.

Néanmoins, on peut remarquer sur la figure 2.14 qu'il y a deux pics d'environ 19 mg/l à 350h de culture. Nous avons remarqué le même phénomène lors de la culture à 1% de CO_2 (*Porphy 1*) (cf. figure 2.8). Ce comportement semble indiquer le début de la phase de décroissance. Cette hypothèse est incertaine et sa validité reste à vérifier.

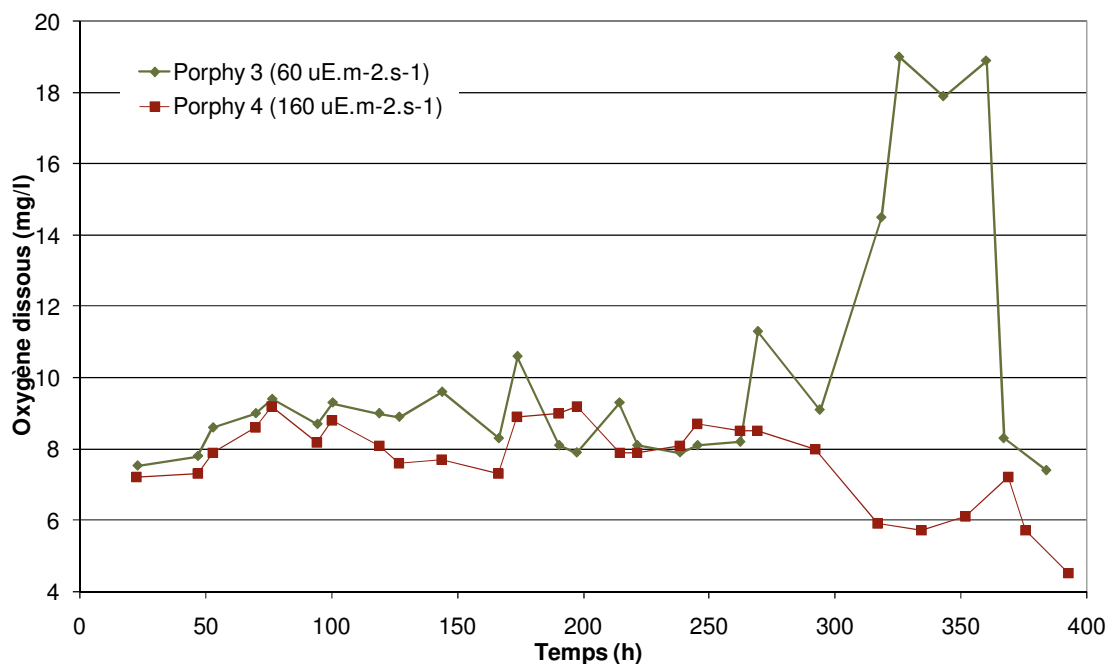


Figure 2.14 : Evolution temporelle des concentrations en oxygène dissous lors de l'étude de l'influence de l'intensité lumineuse incidente

2.6.4. Culture à conditions optimales : étude de répétabilité

Une étude de répétabilité a été également conçue. Nous avons prévu de démarrer deux cultures selon la même procédure et avec le même appareillage. L'objectif de ces expériences est de reproduire une culture dans les conditions optimales de croissance mentionnées dans la partie 2.6.1. de ce chapitre.

Il est nécessaire de signaler que le déroulement de ces nouveaux essais a été perturbé par des problèmes concernant leur alimentation en gaz. Le pourcentage de CO_2 dans le gaz d'alimentation n'a pas pu être réglé à 2%. Le débit a été soit inférieur (0,04%) soit supérieur (9,09%). Vu les résultats obtenus pour cette culture, nous avons décidé de refaire ces essais en tentant de régler avec plus de précision le débit du CO_2 à l'entrée. Les expériences ont été refaites et les résultats sont montrés ci-dessous. L'évolution de la concentration cellulaire est proche pour ces deux expériences (cf. figure 2.15).

Tableau 2.6 : Vitesses maximales de croissance lors de l'étude de répétabilité : cultures à conditions optimales

Réacteur	μ_{max} (h ⁻¹)
Porphy 5	0,0235
Porphy 6	0,0225
Moyenne	0,0230
Ecart-type	0,00071

Une phase de latence de 48 heures environ a lieu au début de chaque expérience. Une phase d'accélération courte de 25 heures environ succède à la phase de latence. La durée de la phase exponentielle est de 150 heures et elle cesse dès que la concentration cellulaire atteint $14 \cdot 10^9$ cellules.l⁻¹.

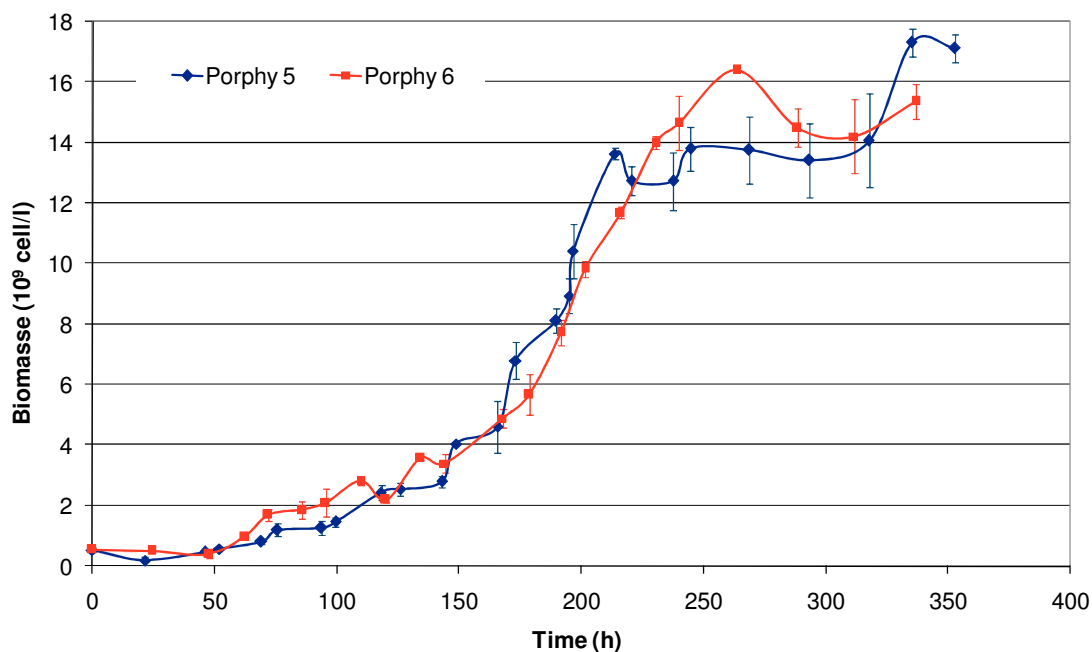


Figure 2.15 : Evolution de la concentration cellulaire en fonction du temps : cultures à conditions optimales (C.O.)

Les profils observés sont pratiquement identiques et d'autre part les durées de différentes phases sont similaires. L'analyse de vitesses maximales de croissance montre une certaine homogénéité ($\mu_{max} = 0,023$ h⁻¹ environ).

2.6.5. Etude du transfert gaz-liquide sur le photobioréacteur : Détermination expérimentale du $k_L a(CO_2)$

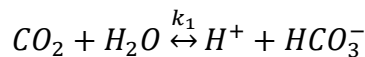
L'échange de CO_2 avec les microorganismes photosynthétiques est un phénomène complexe. En effet, le CO_2 peut réagir avec H_2O , OH^- et NH_3 présents dans le milieu de culture ce qui peut accélérer sa vitesse d'absorption (Talbot *et al.*, 1991). Le transfert du CO_2 de la phase gazeuse à la phase liquide dépend à la fois des cinétiques de diffusion et, en fonction des vitesses de réaction observées, des cinétiques de réaction dans le film liquide adjacent à l'interface gaz-liquide. Ce transfert est caractérisé par le coefficient de transfert volumique global noté $k_L a(CO_2)$ qui est le produit du coefficient de transfert de CO_2 global k_L ($m\ s^{-1}$) multiplié par l'aire interfaciale d'échange notée a ($m^2\ m^{-3}$). Dans le cas de gaz faiblement solubles (O_2 et CO_2), la résistance au transfert se situe majoritairement du côté liquide, c'est pourquoi le coefficient de transfert volumique coté liquide est considéré comme le coefficient de transfert volumique global.

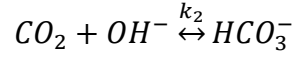
Le calcul du $k_L a(CO_2)$ peut se faire à partir du $k_L a(O_2)$ (Talbot *et al.*, 1991, Acién Fernández, 1996). Cette méthode ne peut être appliquée que si l'absorption du CO_2 n'est pas influencée par les réactions chimiques et est indépendante de sa vitesse de réaction dans le film liquide adjacent à la surface. Dans ce cas là, le facteur d'accélération chimique E_{ch} doit être égal à 1. La théorie de la pénétration de Higbie (1935) nous permet de calculer E_{ch} en fonction de la cinétique réactionnelle du CO_2 dans le milieu de culture. E_{ch} représente le rapport du flux moyen d'absorption dans un liquide agité en présence de réaction au flux d'absorption purement physique et il peut être calculé à partir du nombre de Hatta (Ha) comme suit (Villermaux, 1995):

$$E_{ch} = \sqrt{Ha^2 + 1} \quad (2.17)$$

$$Ha = \frac{\sqrt{K D_{CO_2}}}{k_L} \quad (2.18)$$

Dans notre cas, le CO_2 dissous réagit avec l'eau et les ions hydroxydes selon les réactions suivantes (le milieu de culture est dépourvu de NH_3 , il n'y a donc pas de réaction avec ce composé) :





où

$$K = k_1 + k_2 [OH^-] \quad (2.19)$$

avec :

Ha : nombre de Hatta (sans dimension),

D_{CO_2} : coefficient de diffusion du dioxyde de carbone coté liquide ($m^2 s^{-1}$),

K : constante cinétique chimique globale (s^{-1}),

$[OH^-]$: concentration en ions OH ($mol l^{-1}$),

k_1 et k_2 : constantes cinétiques des réactions à l'équilibre (s^{-1} et $l mol^{-1} s^{-1}$)

A $25^\circ C$, les valeurs de k_1 et k_2 sont respectivement de $0,0261 s^{-1}$ et de $8416,32 l mol^{-1} s^{-1}$ (Pearson *et al.*, 1954). Le pH de travail réglé à 7,4 permet de déterminer la concentration en ions OH^- : $[OH^-] = 2,5119.10^{-7} mol l^{-1}$ et par conséquent $K = 0,0282 s^{-1}$. Le coefficient de diffusion du dioxyde de carbone pour le milieu Hemerick à $25^\circ C$ est $D_{CO_2} = 1,75.10^{-9} m^2 s^{-1}$ (Nouals, 2000).

Sachant que dans une colonne à bulles comme la nôtre, le coefficient volumique de transfert du CO_2 coté liquide k_L est de l'ordre de 1 à $4.10^{-4} m s^{-1}$ (Roizard *et al.*, 1997) nous obtenons le nombre de Hatta grâce à l'équation (2.18) :

$$1.10^{-4} < k_L < 4.10^{-4}$$

$$0,0176 < Ha < 0,0702$$

Le facteur d'accélération E_{ch} calculé sur la base des valeurs obtenues précédemment en utilisant l'équation (2.17) est égal à 1 et l'on peut conclure que le transfert gaz-liquide dans le photobioréacteur type colonne à bulles n'est pas influencé par les réactions chimiques et il est alors possible de relier le $k_L a(CO_2)$ au $k_L a(O_2)$ par une équation qui prend en compte la différence de diffusivité entre les deux gaz (Camacho Rubio *et al.*, 1999):

$$k_L a(CO_2) = \sqrt{\frac{D_{CO_2}}{D_{O_2}}} k_L a(O_2) \quad (2.20)$$

où D_{CO_2} et D_{O_2} sont respectivement les coefficients de diffusion du CO_2 et O_2 dans le milieu Hemerick qui sont donnés par les relations suivantes (Nouals, 2000) :

$$D_{CO_2} = \frac{5,88 \cdot 10^{-12} \cdot T}{\eta} \quad (m^2/s) \quad (2.21)$$

$$D_{O_2} = \frac{7,50 \cdot 10^{-12} \cdot T}{\eta} \quad (m^2/s) \quad (2.22)$$

dont T est la température (°K) et η est la viscosité dynamique (Pa.s). L'équation (2.20) devient :

$$k_L a(CO_2) = 0.885 k_L a(O_2) \quad (2.23)$$

➤ *Méthode expérimentale de détermination du $k_L a(O_2)$ et calcul du $k_L a(CO_2)$*

La valeur du coefficient volumique de transfert d'oxygène est obtenue par une technique dynamique (Leveau and Bouix, 1988) grâce à une sonde à oxygène dissous. Après avoir désorbé tout l'oxygène dissous du milieu de culture à l'aide d'un balayage à l'azote, on reprend l'injection d'air dans les conditions de débit à tester. On suit alors l'augmentation de la concentration en oxygène dissous jusqu'à la saturation du milieu (cf. figure 2.16).

Le $k_L a(O_2)$ est normalement obtenu en traçant la courbe de variation de la concentration d'oxygène en fonction du temps dont $C_{O_2}^*$ (mol l⁻¹) est la concentration en oxygène dissous à saturation :

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = f(C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (2.24)$$

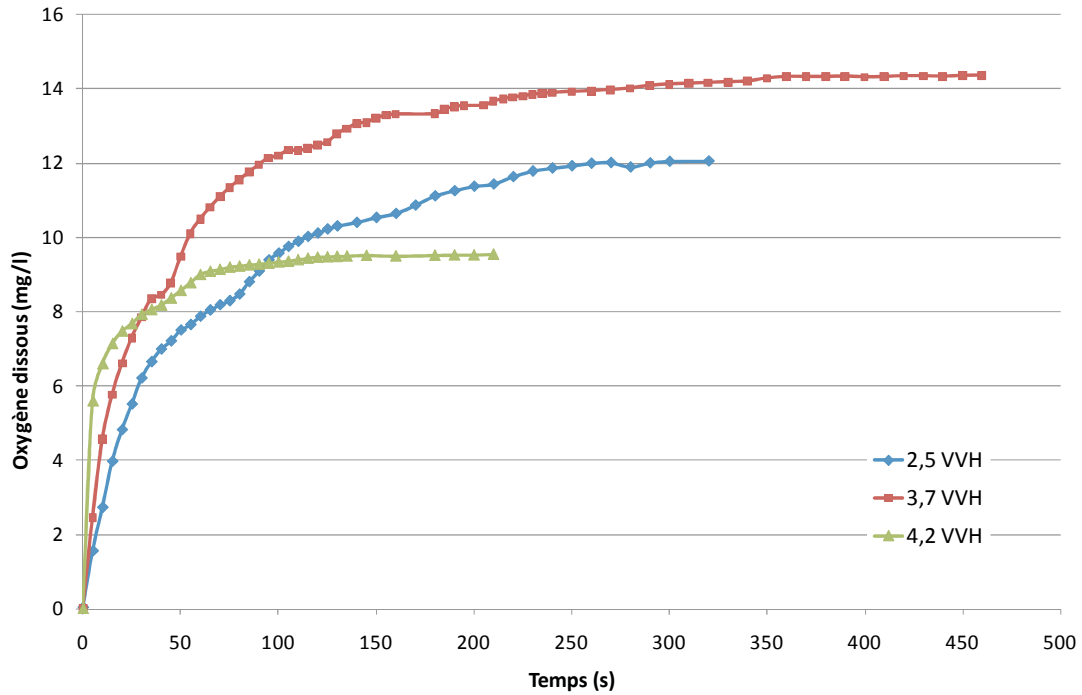


Figure 2.16 : Evolution de la concentration en oxygène dissous après désorption par l'azote pour trois débits d'aération testés

La pente de la droite $\ln(\Delta C_{O_2}) = f(t)$ nous donne la valeur du $k_L a(O_2)$ (cf. figure 2.17). L'équation (2.23) nous permet de calculer la valeur du $k_L a(CO_2)$ qui est présentée dans le tableau 2.7.

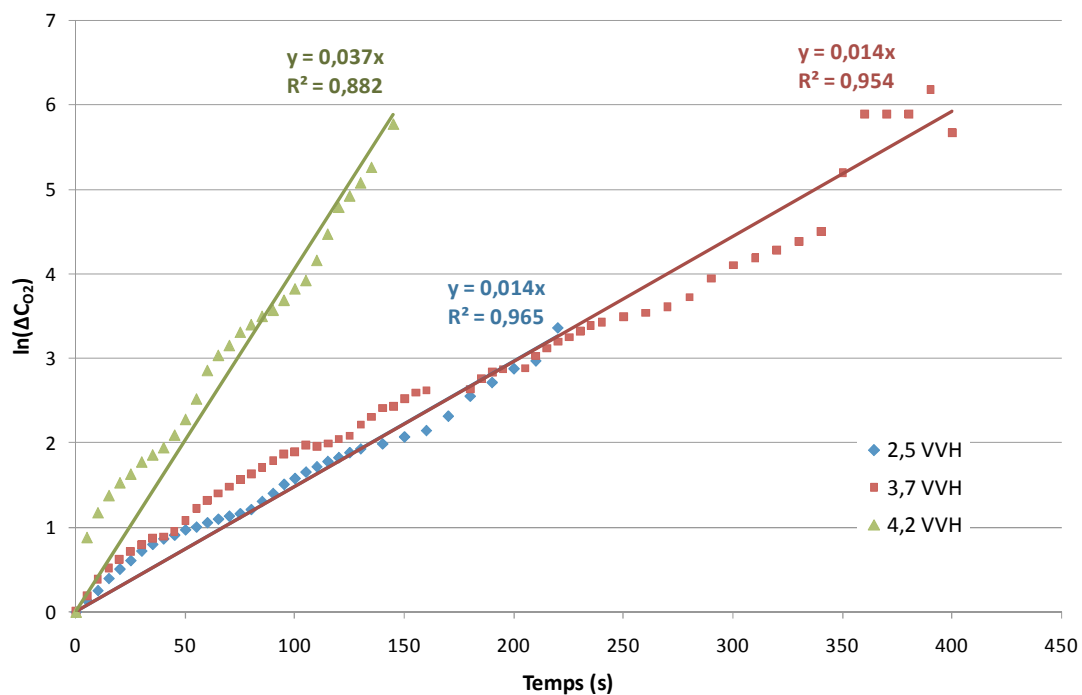


Figure 2.17 : Calcul du $k_L a(O_2)$ pour trois débits d'aération testés

Tableau 2.7 : Valeurs de $k_L a(O_2)$ et $k_L a(CO_2)$ pour trois débits d'aération testés

Débit (VVH)	$k_L a(O_2)$ (s ⁻¹)	$k_L a(CO_2)$ (s ⁻¹)
2,5	0,014	0,0124
3,7	0,014	0,0124
4,2	0,037	0,0327

La valeur retenue de $k_L a(CO_2)$ pour notre modèle est égale à 0,0124 s⁻¹ ou 44,64 h⁻¹.

2.6.6. Identification des paramètres du modèle

Les expériences ont permis de définir 55 points expérimentaux issus de la phase exponentielle de croissance de *Porphyridium purpureum* qui seront utilisés pour l'identification des paramètres et pour la validation du modèle. La régression de paramètres est réalisée en utilisant le logiciel Aspen Custom Modeler. Nous avons utilisé la méthode des moindres carrés qui minimise l'erreur carrée absolue entre la valeur observée et la valeur prédite pour le modèle.

Des essais successifs en utilisant 29 points expérimentaux nous ont permis de déterminer les paramètres cinétiques et de transfert de l'énergie lumineuse. Chacun de ces points est composé de trois variables (μ, E, CIT) sélectionnées pour décrire les variations de μ .

Pendant la phase exponentielle de croissance dans une culture en mode batch, la vitesse de croissance peut-être calculée en mesurant l'évolution de la concentration de la biomasse au cours du temps comme suit:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.25)$$

où :

μ est la vitesse de croissance (h⁻¹) et

X est la concentration en biomasse (g/l).

L'intégration de l'équation (2.25) nous permet d'obtenir l'expression suivante :

$$\ln(X) = \mu t + Cte \quad (2.26)$$

Si l'on porte graphiquement $\ln(X)$ en fonction du temps, la phase exponentielle sera représentée par une droite dont la pente sera égale à la vitesse de croissance (μ).

La valeur de μ a été donc calculée entre deux prélèvements. Les valeurs de E et CIT sont des valeurs moyennes de ces variables obtenues par interpolation linéaire pour les deux prélèvements réalisés. Dans le cas du modèle d'énergie lumineuse ces expériences nous ont permis de calculer les constantes C_1 et C_2 pour le photobioréacteur utilisé. Les tests successifs de régression donnent les valeurs récapitulées dans le tableau 2.8. La somme des carrés des écarts est de $6,39.10^{-3}$ pour l'estimation des paramètres cinétiques et de $4,71.10^{-3}$ pour l'estimation des constantes C_1 et C_2 .

Tableau 2.8 : Paramètres identifiés

<i>Paramètres</i>	<i>Valeurs</i>	<i>Unités</i>	<i>Intervalles de confiance à 95%</i>
μ_{max}	0,03033	h^{-1}	[0,0138 0,0468]
CIT_{opt}	12,93	mmole l-1	[9, 74 16,12]
E_{opt}	1,1963	$\mu E s^{-1} 10^9 cell^{-1}$	[0,4763 1,9163]
C_1	0,6479	sans unité	[0,5762 0,7196]
C_2	-1,016	sans unité	[-1,116 -0,916]

D'autres paramètres nécessaires au modèle sont récapitulés dans le tableau 2.9. Ils dépendent la microalgue cultivée et des ses conditions de culture. La constante de Henry (Ridley, 1965) dépend de la température, du pH et de la salinité. Pour le milieu Hemerick utilisé et pour la gamme des variations de pH obtenues lors de nos expériences (pH compris entre 6,5 et 8,5), nous avons calculé une valeur moyenne. Les valeurs de K_1 et K_2 qui dépendent également de la salinité, du pH et de la température, ont été calculées pour la même gamme de variation du pH (Nouals, 2000). Les constantes $Y_{X/CIT}$ et m ont été obtenues à partir de l'équation stœchiométrique de la production de biomasse (Nouals, 2000). Ar et V sont des constantes du photobioréacteur.

Tableau 2.9 : Paramètres du modèle

<i>Paramètres</i>	<i>Valeurs</i>	<i>Unités</i>
H	34,03	atm l mol ⁻¹
K_1	1,02 10 ⁻⁶	sans unité
K_2	8,32 10 ⁻¹⁰	sans unité
m	0,001	h ⁻¹
$Y_{X/CIT}$	198,1	10 ⁹ cell mol ⁻¹ CIT
Ar	10,96	dm ²
V	2,5	dm ³

2.7. Validation du modèle de croissance

L'étape essentielle après l'identification des paramètres est leur validation sur le jeu de données non utilisées pour cette identification. La validation est l'étape la plus importante du processus de modélisation. Elle donne un sens à tout ce qui a été fait auparavant. C'est une tâche sans laquelle on ne peut pas garantir que le modèle prédit le comportement du photobioréacteur.

Les expériences en batch dans les photobioréacteurs de 2,5 litres nous ont permis de valider le modèle retenu. Le modèle décrit dans les équations (2.9) – (2.12) permet de simuler le comportement du système pendant la phase exponentielle de croissance. Il a été testé sur 3 cultures (26 points non utilisée pour l'identification des paramètres) menées sur le photobioréacteur de 2,5 litres. Les figures qui suivent (2.18 à 2.22) comparent les résultats simulés et expérimentaux pour chaque culture. Ces résultats correspondent à l'évolution de la concentration cellulaire. Chacune de ces figures se rapportent à la seule phase exponentielle considérée.

L'ensemble des résultats montre que la régression des paramètres du modèle permet d'obtenir une représentation acceptable des expérimentations. Cependant, l'expérience *Porphy 2* (figure 2.20) semble être moins bien représentée que les autres. Au départ, les concentrations issues de la simulation du modèle sont proches de mesures, puis

le modèle surestime la croissance. L'écart pourrait provenir d'un mauvais réglage du débit d'air ou d'une mauvaise mesure de la concentration en *CIT* (mesurée par chromatographie en phase gazeuse CPG).

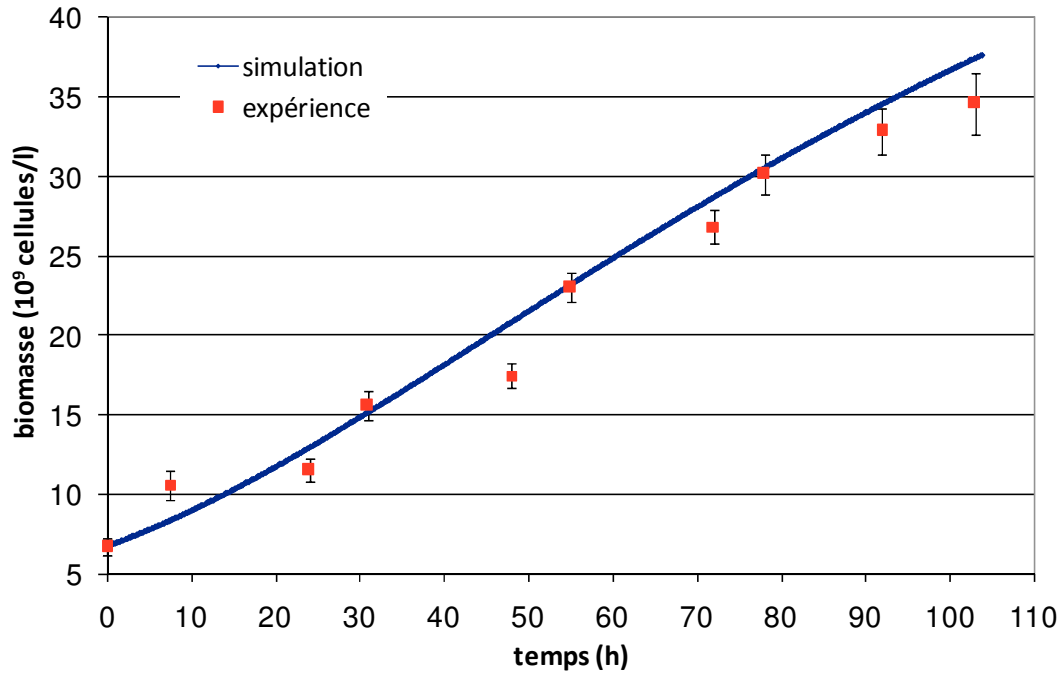


Figure 2.18 : Comparaison simulation/expérience pour une culture avec une intensité lumineuse incidente de $160 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (*Porphy 4*)

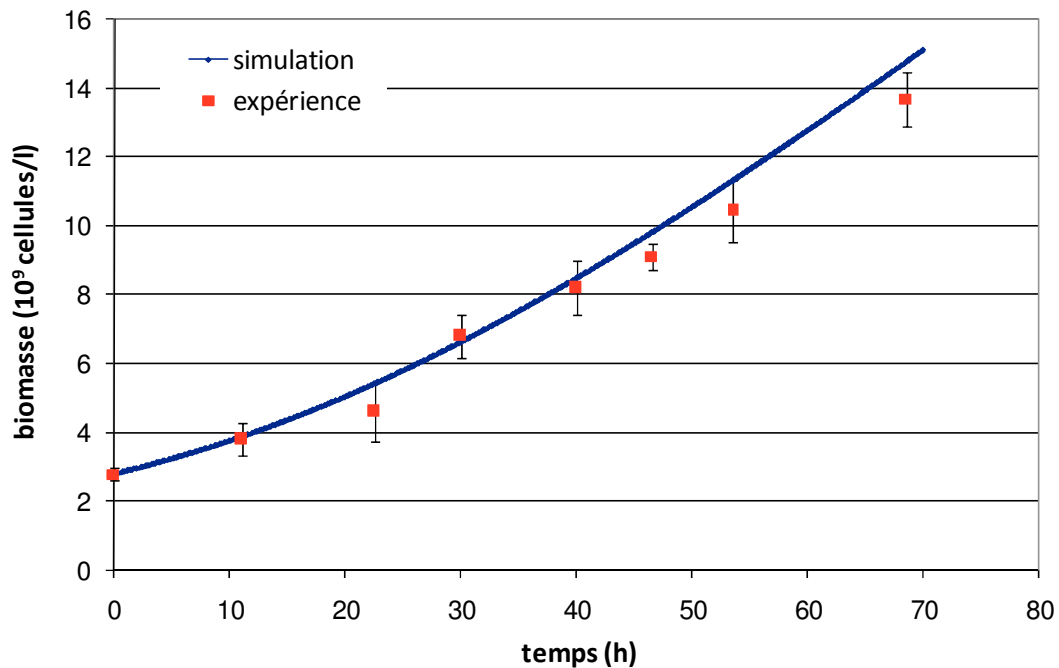


Figure 2.19 : Comparaison simulation/expérience pour une culture à conditions optimales (*Porphy 5*)

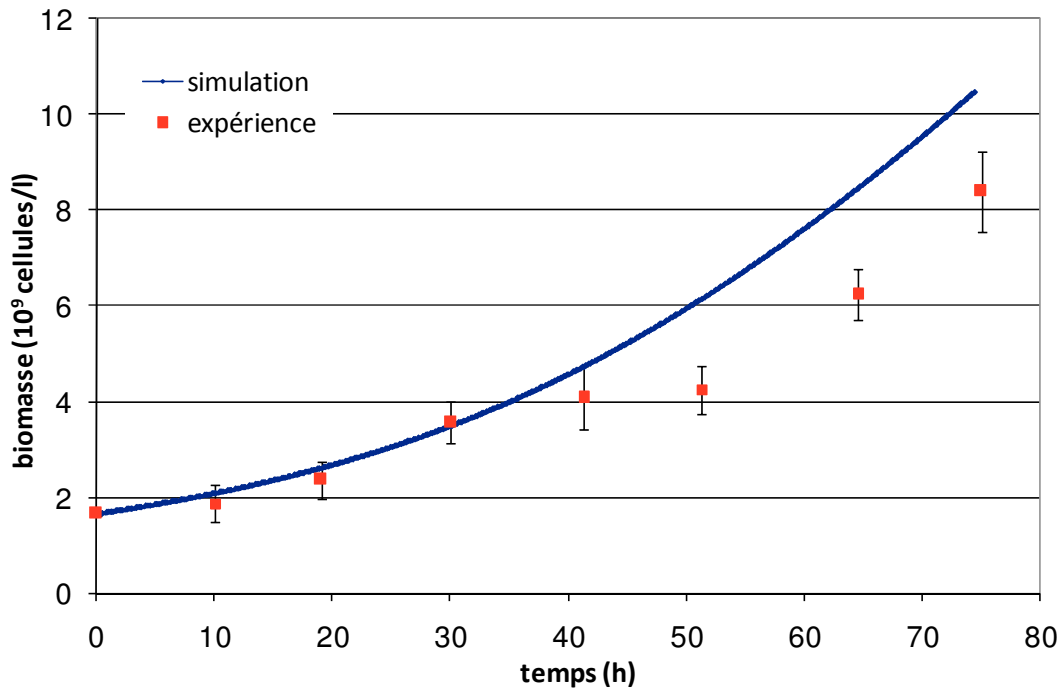


Figure 2.20 : Comparaison simulation/expérience pour une culture avec 5% de CO_2 dans le gaz d'alimentation (*Porphy 2*)

Les expériences utilisées pour l'identification des paramètres ont été également étudiées en simulation. Les résultats sont montrés dans les figures suivantes.

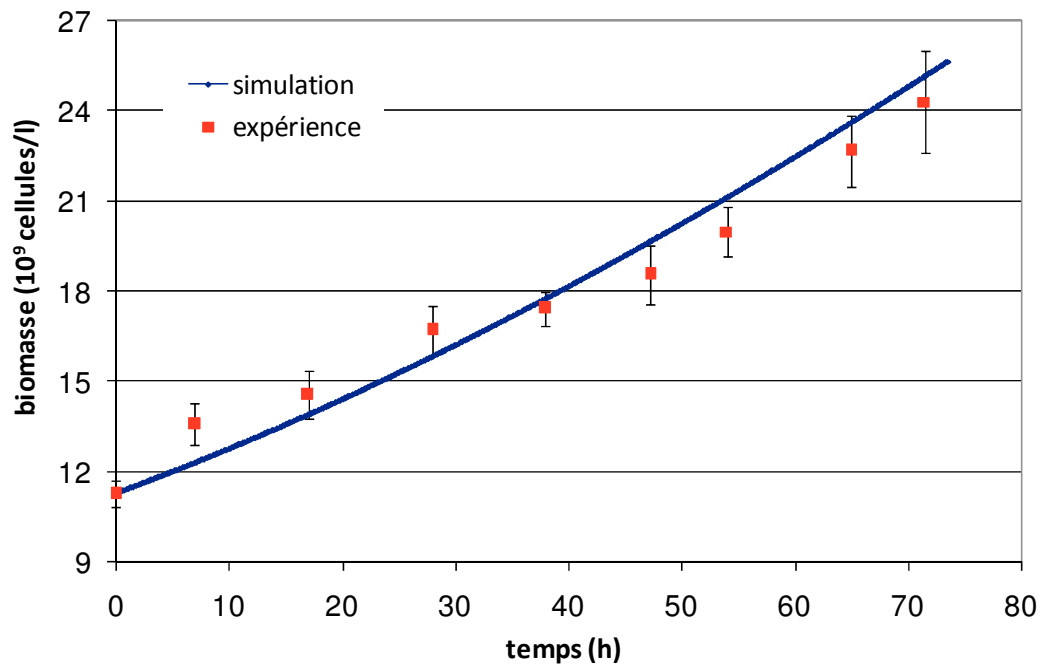


Figure 2.21 : Comparaison simulation/expérience pour une culture avec 1% de CO_2 dans le gaz d'alimentation (*Porphy 1*)

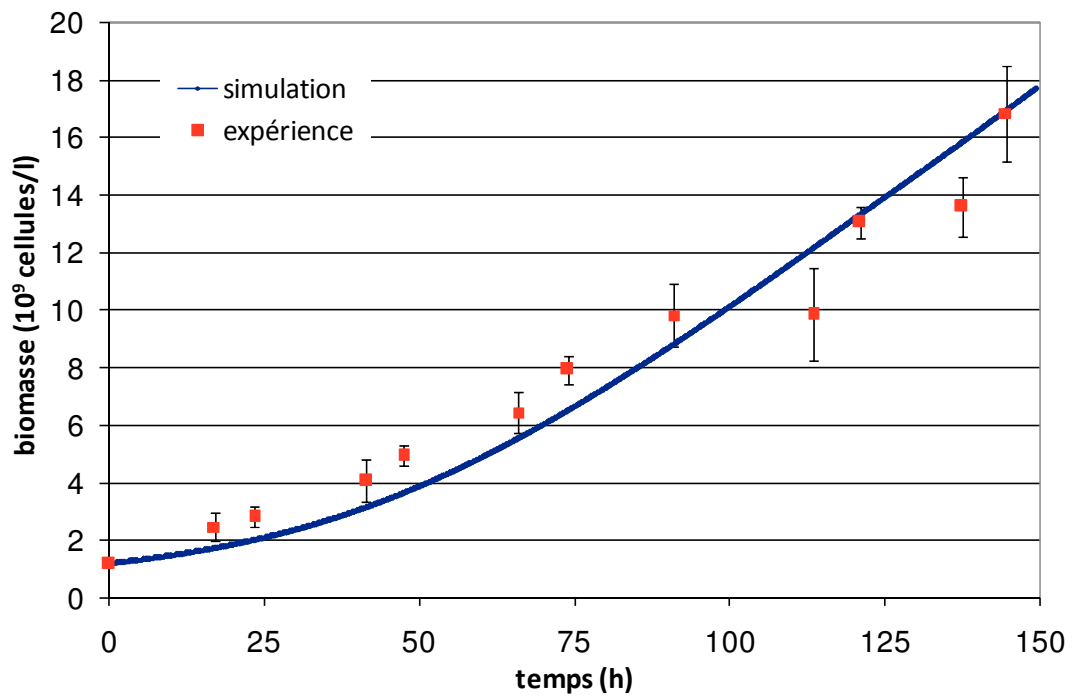


Figure 2.22 : Comparaison simulation/expérience pour une culture avec une intensité lumineuse incidente de $60 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (*Porphy 3*)

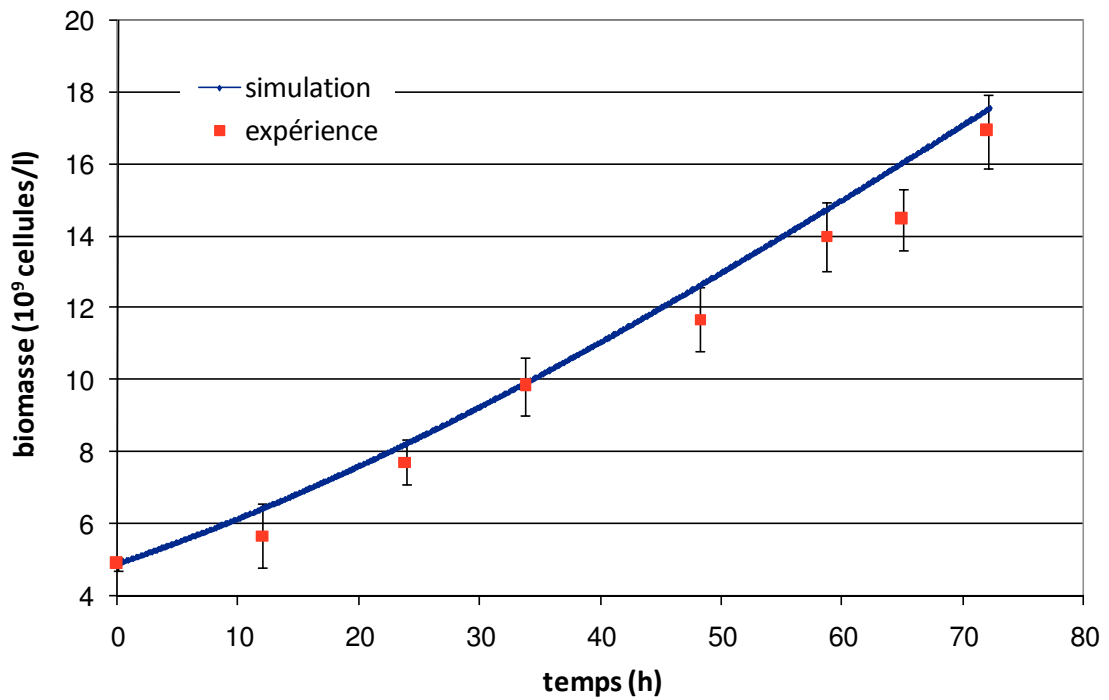


Figure 2.23 : Comparaison simulation/expérience pour une culture à conditions optimales (*Porphy 6*)

L'erreur moyenne existant entre la valeur mesurée et la valeur simulée s'élève à 16.8 % (cf. tableau ci-dessous), valeur qui semble correcte compte tenu des erreurs sur les mesures de la concentration en biomasse et/ou *CIT*. La fiabilité du modèle est ainsi démontrée.

Tableau 2.7 : Erreur entre valeurs expérimentales et valeurs simulées

<i>Expérience</i>	<i>Erreur moyenne (%)</i>
<i>Porphy 1</i>	12,04
<i>Porphy 2</i>	29,92
<i>Porphy 3</i>	10,43
<i>Porphy 4</i>	15,43
<i>Porphy 5</i>	15,82
<i>Porphy 6</i>	11,14

La validation du modèle donne globalement des résultats satisfaisants tant pour les expériences ayant servi à l'estimation de paramètres (*Porphy 1, 3 et 6*) que pour les expériences utilisées pour la validation (*Porphy 2, 4 et 5*). Le modèle de croissance est donc capable de prédire les données expérimentales pour l'ensemble d'expériences réalisées en mode discontinu. Donc, ce modèle peut servir au développement d'un estimateur d'état et à l'établissement d'une loi de commande du réacteur

2.8. Conclusion

Afin de proposer des stratégies de commande, le modèle de fonctionnement du photobioréacteur a été choisi. Une campagne expérimentale a été entreprise afin de calibrer les paramètres du modèle et, en même temps, de le valider.

Les expériences réalisées mettent en évidence l'effet de la disponibilité en carbone inorganique total et en lumière sur la croissance de *Porphyridium purpureum*. Le modèle retenu comporte ces deux variables qui permettent de décrire le comportement global des microalgues dans le réacteur sans se limiter à sa périphérie comme dans le cas de la seule prise en compte de la lumière comme variable influente.

Le modèle validé peut maintenant être exploité pour les prochains objectifs de notre travail : estimation d'état et proposition des stratégies de commande. La notion de carbone inorganique total nous permettra de mettre au point des estimateurs logiciels de façon à obtenir en ligne et en temps réel la concentration en biomasse. Le modèle de croissance sera ensuite utilisé pour proposer des commandes plus élaborées, combinées avec des régulateurs classiques.

Chapitre III

Table de matières

3.1.	Introduction	91
3.2.	Représentation d'état	94
3.3.	Observabilité des systèmes	95
3.3.1.	Définition de l'observabilité	95
3.3.2.	Observabilité d'un système linéaire	95
3.3.3.	Observabilité d'un système non-linéaire	95
3.4.	Filtre de Kalman	98
3.5.	Filtre de Kalman discret	99
3.6.	Filtre de Kalman étendu	100
3.7.	Résultats en mode batch	103
3.8.	Résultats en mode continu	118
3.9.	Conclusion	120

Estimation d'état

3.1. Introduction

Le chapitre précédent a été consacré au modèle du bioprocédé qui est l'élément clé dans l'estimation d'état. En effet, ce modèle sert à établir le rapport entre les mesures et l'état à estimer. Ce chapitre se concentre sur l'algorithme qui combine le modèle d'observation et les mesures physiques nécessaires pour obtenir une estimation des valeurs des variables d'état.

Connaissant la complexité des bioprocédés et la présence des contraintes de modélisation (sélection des états à estimer et des mesures disponibles pour cette estimation ainsi que qualité du modèle), nous essayons de fournir certaines solutions pour le développement de capteurs logiciels pour la culture de la microalgue *Porphyridium purpureum* afin de minimiser le nombre de variables à mesurer en ligne.

Il est souvent difficile, pour des raisons économiques ou technologiques, de mesurer toutes les variables nécessaires à la commande d'un système. Lorsque l'état d'un système n'est pas mesurable, on peut reconstruire cet état à partir d'un modèle dynamique du système et des mesures d'autres états.

Le principe de l'observateur est montré sur la figure 3.1. Il s'agit d'un système dynamique qui est couplé au processus en prenant en compte la commande u , mais

également les sorties mesurées du système y dans le but de corriger les écarts éventuels entre les sorties mesurées du processus et celles du modèle. On utilise la notation « chapeau » pour exprimer une estimation : x représente l'état réel du système non mesuré et \hat{x} représente l'estimation de l'état réalisée par l'observateur.

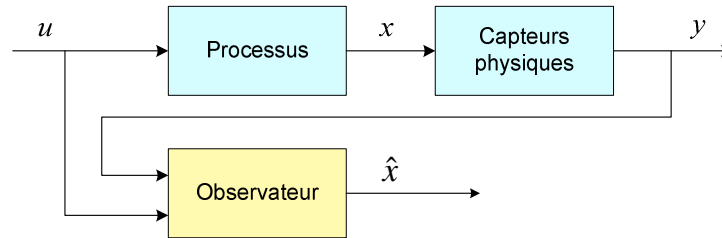


Figure 3.1 : Principe de l'observateur

Dans les années soixante-dix, Luenberger a proposé un observateur d'état déterministe pour les systèmes linéaires (Luenberger, 1971). Kalman a également formulé un observateur pour les systèmes linéaires en considérant une approche stochastique (Kalman, 1960). Dans le cas des systèmes non-linéaires, l'observation d'état est un domaine où la recherche est encore très active. Plusieurs méthodes existent mais le filtre de Kalman étendu (FKE) reste l'observateur le plus utilisé (Norgaard *et al.*, 2000 ; Jørgensen *et al.*, 2007).

L'un des principaux obstacles pour le développement des bioprocédés se trouve dans le fait que, dans la plupart des cas, la surveillance du procédé en temps réel est limitée à cause du manque des capteurs appropriés ou de leur coût excessif. En effet, les sondes utilisées pour mesurer les variables biologiques au niveau industriel, sont moins fiables que leurs équivalents dans d'autres industries comme la chimie. Afin de surmonter ces difficultés, les « capteurs logiciels » basés sur des estimateurs d'état ont été conçus de façon à pouvoir surveiller ces variables biologiques et résoudre le problème de manque d'instrumentation fiable.

En effet, l'objectif d'un capteur logiciel est de fournir une estimation des états d'un système et particulièrement de ceux qui ne sont pas mesurés par des capteurs physiquement installés sur le système ou obtenus à l'issue de longues et coûteuses analyses. La combinaison d'un modèle du système avec certaines mesures physiques au sein d'un algorithme d'observation d'état permettra d'atteindre cet objectif.

De nombreuses méthodes permettent de construire un observateur d'état pour un photobioréacteur. Leur développement et implémentation dépend du mode opératoire : batch, fed-batch ou continu. Chaque mode présente des problèmes opérationnels différents.

Dans les cas des microalgues, très peu de travaux ont été répertoriés dans la littérature. Un observateur non-linéaire à grand-gain a été développé par Bernard et ses collaborateurs pour estimer la concentration en biomasse, la concentration en azote dans le milieu de culture et le quota cellulaire d'azote de *Dunaliella tertiolecta* cultivée dans un bioréacteur de 1,8 litres (Bernard *et al.*, 2001).

Li et son équipe ont implémenté un filtre de Kalman étendu dans un photobioréacteur de 3 litres destiné à la culture de *Dunaliella salina*. Un filtre de Kalman étendu adaptatif a été également proposé. L'objectif était d'estimer la concentration en biomasse, la vitesse spécifique de croissance, le rendement photosynthétique et l'intensité lumineuse moyenne à partir d'un modèle dynamique tenant compte de la lumière et de la mesure de la concentration en oxygène dissous (Li *et al.*, 2003).

Wen Su et ses collaborateurs ont proposé à leur tour un filtre de Kalman étendu pour estimer la concentration en biomasse, la vitesse spécifique de croissance, l'oxygène dissous et la concentration en phosphore en se basant sur la mesure de l'intensité lumineuse incidente sur le photobioréacteur. Les algorithmes développés ont été également testés sur un photobioréacteur instrumenté de 3 litres sur la microalgue *Dunaliella salina* (Wen Su *et al.*, 2003).

A l'heure actuelle, l'application industrielle des capteurs logiciels relativement nouveaux, est encore limitée. Cela s'explique par certaines difficultés de mise en œuvre sur les sites de production industrielle. Cette situation devrait évoluer au vu de leur potentiel et de leurs performances.

L'axe principal du travail présenté dans ce qui suit est le développement d'un filtre de Kalman étendu (FKE) pour estimer la concentration en biomasse à partir du modèle dynamique du procédé et de la mesure de la concentration en carbone inorganique total. A l'aide des simulations numériques et des données expérimentales, nous nous attacherons à démontrer l'efficacité de l'approche proposée.

3.2. Représentation d'état

Un système peut être représenté à l'aide d'un vecteur de variables, appelé vecteur de variables d'état (noté $x(t)$). L'évolution du système est alors entièrement décrite via la dérivée de ce vecteur d'état et du vecteur des sorties mesurées (noté $y(t)$). Dans ce qui suit, la modélisation du système par représentation d'état en linéaire et non-linéaire est rappelée.

La représentation d'état linéaire est composée de deux équations représentées sous forme matricielle comme suit :

$$\begin{aligned}\dot{x}(t) &= Ax(t) + Bu(t) \\ y(t) &= Cx(t) + Du(t)\end{aligned}\tag{3.1}$$

où $A \in \mathbb{R}^{n \times n}$ est la matrice de dynamique, $B \in \mathbb{R}^{n \times m}$ est la matrice de commande, $C \in \mathbb{R}^{p \times n}$ est la matrice d'observation ou de mesure et $D \in \mathbb{R}^{p \times m}$ est la matrice de transmission directe

La représentation d'état d'un système à dynamique non-linéaire en continu est composée également de deux équations comme suit :

$$\begin{aligned}\dot{x}(t) &= f[x(t), u(t), t] \\ y(t) &= h[x(t), u(t), t]\end{aligned}\tag{3.2}$$

où $x(t) \in \mathbb{R}^n$ est le vecteur d'état, $u(t) \in \mathbb{R}^m$ est le vecteur de commande, $y(t) \in \mathbb{R}^p$ est le vecteur de sortie, $f(f_1, f_2, \dots, f_n)^T$ est un champ de vecteurs de $\mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^n$ et $h(h_1, h_2, \dots, h_p)^T$ est un vecteur non-linéaire sur \mathbb{R}^n . Les équations (3.2) représentent respectivement l'équation d'évolution et l'équation d'observation.

Le modèle de croissance de microalgues retenu et décrit dans le chapitre II (équation 2.16) est un modèle affine en la commande et il peut être représenté sous forme simplifiée comme suit :

$$\begin{aligned}\dot{x} &= f(x) + g(x)u & x(t_0) &= x_0 \\ y &= h(x)\end{aligned}\tag{3.3}$$

où $x \in \mathbb{R}^n$ est le vecteur d'état, $u \in \mathbb{R}^m$ est le vecteur de commande, $y \in \mathbb{R}^p$ est le vecteur de sortie ou d'observation.

3.3. Observabilité des systèmes

Avant d'élaborer un observateur d'état, une étape essentielle consiste à déterminer si la biomasse peut-être estimée à partir du modèle du procédé, des entrées de système et de certaines mesures physiques. La notion d'observabilité est alors invitée dans notre démarche.

Pour comprendre cette notion, nous allons voir par la suite sa définition et les critères à tenir en compte dans le cas des systèmes linéaires et non-linéaires.

3.3.1. Définition de l'observabilité

Un système d'ordre n est dit *observable* si pour chaque état initial inconnu x_0 , il existe un temps fini T tel que la connaissance de ses entrées et sorties sur l'intervalle $[0, T]$ suffit pour déterminer de manière unique l'état initial x_0 . Dans le cas contraire, le système est dit *non observable*.

3.3.2. Observabilité d'un système linéaire

Si on considère un système linéaire stationnaire de la forme :

$$\begin{aligned} \dot{x}(t) &= Ax(t) + Bu(t), & x(0) &= x_0 \\ y(t) &= Cx(t) \end{aligned} \quad (3.4)$$

Le critère de Kalman dit que le système, où $A \in \mathbb{R}^{n \times n}$, $C \in \mathbb{R}^{r \times n}$ est *observable* si la matrice d'observabilité \mathcal{O} est de rang n .

$$\text{rang}(\mathcal{O}) = \text{rang} \begin{pmatrix} C \\ C A \\ \vdots \\ C A^{n-1} \end{pmatrix} = n \quad (3.5)$$

3.3.3. Observabilité d'un système non-linéaire

On considère le système non-linéaire affine en la commande :

$$\begin{aligned} \dot{x} &= f(x) + g(x)u & x(t_0) &= x_0 \\ y &= h(x) \end{aligned} \quad (3.6)$$

où $x \in \mathbb{R}^n$ est l'état du système et $y \in \mathbb{R}^p$ est l'observation.

L'observabilité d'un système non-linéaire affine en la commande peut-être formulée de différentes façons. Nous avons choisi de faire appel à la notion de *distinguable* (Siguerdidjane, 2006). On considère que deux états sont distinguables si pour tout $(u(t))_{t \geq 0}$ deux points distincts $x(t_0) = x_1$ et $x(t_0) = x_2$ ne sont pas identiques.

Rappels

Avant de développer la notion de *distinguable*, quelques outils mathématiques sont rappelés dans ce qui suit :

Champs de vecteurs

Un champ de vecteurs est une fonction qui associe un vecteur à chaque point d'un espace euclidien ou plus généralement d'une variété différentielle. C'est une application de $R^n \rightarrow R^n$.

Crochet de Lie

Le crochet de Lie de deux champs de vecteurs :

$$f: R^n \rightarrow R^n$$

$$g: R^n \rightarrow R^n$$

est un nouveau champ de vecteurs, noté $[f, g]$ et défini par la relation :

$$[f, g] = \frac{\partial g(x)}{\partial x} f - \frac{\partial f(x)}{\partial x} g(x)$$

où $\frac{\partial f(x)}{\partial x}$ et $\frac{\partial g(x)}{\partial x}$ désignent respectivement les matrices Jacobiennes de f et g évaluées au point x .

Dérivée de Lie

La dérivée de Lie d'une fonction $\lambda(x)$ dans la direction d'un champ de vecteurs f , notée $L_f \lambda$ est définie par la relation :

$$L_f \lambda(x) = \sum_{i=1}^n \frac{\partial \lambda}{\partial x_i} f_i(x)$$

Lorsque l'opération est répétée k fois, elle est notée :

$$L_f^k \lambda(x) = \frac{\partial (L_f^{k-1} \lambda)}{\partial x} f(x) \quad \text{pour } k \geq 1$$

avec

$$L_f^0 \lambda(x) = \lambda(x)$$

Etant donné deux champs de vecteurs f et g :

$$L_g L_f \lambda(x) = \frac{\partial (L_f \lambda)}{\partial x} g(x)$$

$$L_{[f,g]} \lambda(x) = L_f(L_g \lambda) - L_g(L_f \lambda)$$

Définition 3.1. Un système est dit observable si et seulement si pour deux états initiaux x_1 et x_2 , $x_1 \neq x_2$, on peut trouver une commande valable $u \in U$ telle que les sorties correspondantes soient distinctes $\forall t \geq t_0$, i.e. si tous les états sont distinguables.

Lorsqu'il n'y a pas besoin de s'éloigner des conditions initiales pour distinguer les états, on dit que le système est *localement observable*.

Soit un système défini par un vecteur d'état de dimension n , m commandes et p mesures. L'espace d'observation $\mathcal{O}(f, g_1, \dots, g_m, h_1, \dots, h_p)$ est défini comme l'ensemble de toutes les combinaisons linéaires formées à partir des dérivées de Lie de la fonction $h(x)$:

$$\mathcal{O} = \{h_j, L_f h_j, L_{g_i} h_j, L_f^2 h_j, L_{g_i}^2 h_j, L_f(L_{g_i} h_j), L_{g_i}(L_f h_j), \dots\} \quad (3.7)$$

avec $i = 1, \dots, m$ et $j = 1, \dots, p$,

où $L_f h_j$ et $L_{g_i} h_j$ sont respectivement les dérivées de Lie de h_j dans la direction de f et dans la direction de g_i .

L'ensemble de différentielles des fonctions de \mathcal{O} s'exprime comme suit :

$$d\mathcal{O} = \left\{ dh_j, dL_f h_j, dL_{g_i} h_j, dL_f^2 h_j, dL_{g_i}^2 h_j, d\left(L_f(L_{g_i} h_j)\right), d\left(L_{g_i}(L_f h_j)\right), \dots \right\} \quad (3.8)$$

avec $i = 1, \dots, m$ et $j = 1, \dots, p$.

Le système (3.6) est *localement observable* au point x_0 si $\dim(d\mathcal{O}) = n$ qui spécifie la condition de rang.

Définition 3.2. Un système est dit *complètement observable* si la condition de rang est satisfaite en tout point de l'espace d'état et pour toute entrée valable.

3.4. Filtre de Kalman

Le filtre de Kalman est très utilisé dans le cas des systèmes linéaires. Le principe est de corriger la trajectoire du modèle en combinant les observations avec l'information donnée par le modèle de façon à minimiser l'erreur entre l'état vrai et l'état estimé. Il présente un gain variable au cours du temps ce qui permet de minimiser la variance de l'erreur d'estimation. C'est un filtre itératif qui utilise $\hat{x}(t)$ et $y(t)$ pour obtenir une estimation optimale $\hat{x}(t + \delta)$.

Si l'on considère le système observable :

$$\begin{aligned} \dot{x}(t) &= Ax(t) + Bu(t) + \omega(t), & x(t)|_{t=0} &= x_0 \\ y(t) &= Cx(t) + v(t) \end{aligned} \quad (3.9)$$

où $\omega(t)$ appelé bruit d'état et $v(t)$ appelé bruit de mesure, sont des bruits blancs gaussiens de covariances respectives $Q(t)$ et $R(t)$.

A $t = 0$ on suppose que la distribution initiale est gaussienne telle que :

$$E[x_0] = \hat{x}_0, \quad E[(x_0 - \hat{x}_0)(x_0 - \hat{x}_0)^T] = P_0 \quad (3.10)$$

où E représente l'espérance mathématique et P_0 est la matrice covariance de l'erreur d'estimation initiale.

L'estimation du vecteur d'état est obtenue par les équations suivantes :

$$\dot{\hat{x}}(t) = A\hat{x}(t) + K(t)[y(t) - C\hat{x}(t)], \quad \hat{x}(t_0) = \hat{x}_0 \quad (3.11)$$

avec :

$$K(t) = P(t)C^T R(t)^{-1} \quad (3.12)$$

où $K(t)$ est le gain de Kalman et $P(t)$ est la matrice de covariance de l'erreur d'estimation qui est calculée en utilisant l'équation de Riccati comme suit :

$$\dot{P}(t) = A P(t) + P(t) A^T - K(t) R(t) K(t)^T + Q(t) \quad (3.13)$$

3.5. Filtre de Kalman discret

Le filtre de Kalman discret est très utilisé pour estimer les états d'un système à partir d'une série de mesures disponibles à une cadence fixée. Cet estimateur est un filtre récurrent, c'est-à-dire que pour estimer l'état courant, seuls l'état précédent et les mesures actuelles sont nécessaires. L'historique des observations et des estimations n'est donc pas nécessaire.

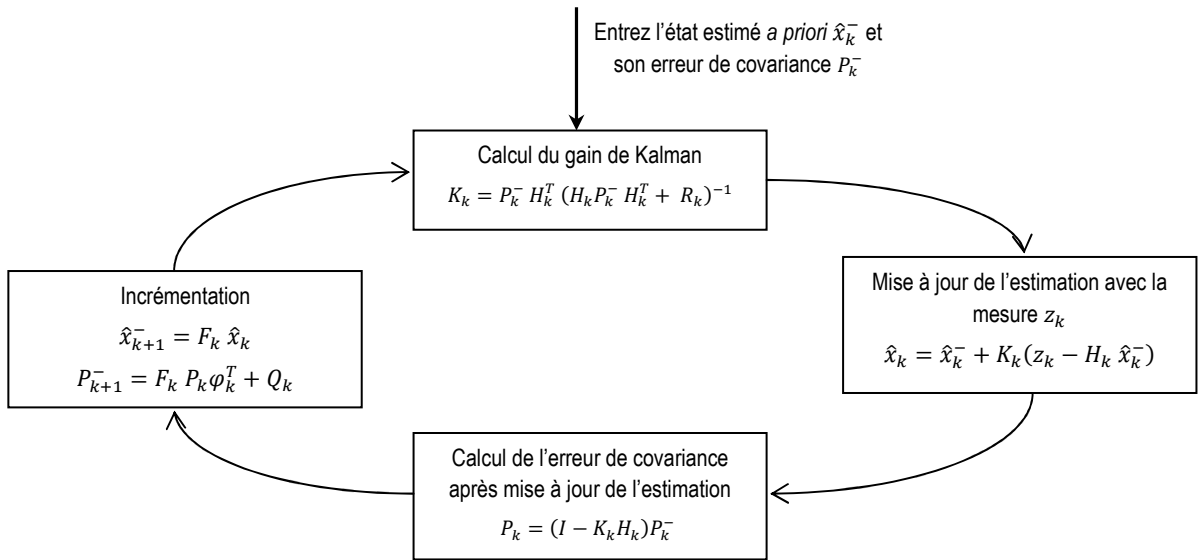


Figure 3.2: Algorithme du filtre de Kalman discret

Le filtre de Kalman discret comporte deux étapes distinctes :

- l'étape de prédiction : qui a lieu entre deux observations et dont l'état estimé de l'instant précédent est utilisé pour produire une estimation de l'état courant. L'incertitude dans l'estimation augmente avec le temps,
- l'étape de correction : pendant cette étape, les observations ont lieu et sont utilisées pour corriger l'état prédit afin d'obtenir une estimation plus précise.

Sur la figure 3.2, on récapitule les équations pertinentes et les différentes étapes du calcul du filtre de Kalman discret.

3.6. Filtre de Kalman étendu

Le filtre de Kalman étendu est utilisé dans le cas non-linéaire pour des systèmes de la forme :

$$\dot{x} = \varphi(x, u, t) + G(t)\omega \quad (3.14)$$

avec des mesures en temps discret t_k définies par :

$$z_k = h[x(t_k), k] + v_k \quad (3.15)$$

où :

$\varphi(x, u, t)$ est la matrice de dynamique, qui est fonction de l'état à être estimé et de la commande,

\dot{x} est le vecteur d'état,

$\omega(t)$ est le bruit d'état avec sa matrice de covariance Q

$G(t)$ est la matrice du bruit d'état qui est indépendante de $x(t)$

z_k est l'équation de mesure

$h[x(t_k), k]$ est la matrice de mesure non-linéaire

v_k est le bruit de mesure qui a comme matrice de covariance R

$\omega(t)$ et $v(t)$ sont des bruits blanc gaussiens non-corrélés

Quand la période d'échantillonnage des mesures correspond à celle du modèle d'état du système, un *filtre de Kalman étendu continu-continu* permet de discrétiser le système à la même cadence que les mesures. Cette méthode ne fonctionne pas lorsque la période d'échantillonnage présente un grand écart avec celle correspondant à l'échantillonnage du modèle. Dans ce cas, le *filtre de Kalman étendu continu-discret* permet d'estimer en ligne l'état non mesuré du procédé. Il est basé sur deux étapes similairement au cas du filtre de Kalman discret : une étape de prédiction suivi d'une étape de correction ou mise à jour. L'avantage du filtre de Kalman *continu-discret* réside dans le fait que l'estimation optimale est disponible tout le temps, même au moment où la mesure est effectuée.

Les différentes étapes du filtre de Kalman dans ses deux versions, sont détaillées dans les tableaux 3.1 et 3.2. Une entrée déterministe $u(t)$ est incluse dans les équations :

Tableau 3.1 : Filtre de Kalman étendu continu-continu

<i>Equations d'état et d'observation</i>	
$\dot{x} = \varphi(x, u, t) + \omega(t)$	(3.16)
$y_k = h(x, t) + v$	(3.17)
$x(0) \sim (\bar{x}_0, P_0), \quad \omega(t) \sim (0, Q), \quad v_k \sim (0, R)$	
<i>Initialisation de l'état du système et de sa matrice de covariance</i>	
$\hat{x}(0) = \bar{x}_0, \quad P(0) = P_0$	(3.18)
<i>Estimation du vecteur d'état</i>	
$\dot{\hat{x}} = \varphi(\hat{x}, u, t) + K[y - h(\hat{x})]$	(3.19)
<i>Propagation de la covariance de l'erreur</i>	
$\dot{P} = A(\hat{x}, t)P + P A^T(\hat{x}, t) - P H^T(\hat{x}, t) R^{-1} H(\hat{x}, t) P$	(3.20)
<i>Gain de Kalman</i>	
$K = P H^T(\hat{x}, t) R^{-1}$	(3.21)

<i>Jacobiennes</i>	
$A(x, t) = \frac{\partial \varphi[x, u, t]}{\partial x}$	(3.22)
$H(x, t) = \frac{\partial h[x, t]}{\partial x}$	(3.23)

Tableau 3.2 : Filtre de Kalman étendu continu-discret

<i>Equations d'état et d'observation</i>	
$\dot{x} = \varphi(x, u, t) + \omega(t)$	(3.24)
$y_k = h[x(t_k), k] + v_k$	(3.25)
$x(0) \sim (\bar{x}_0, P_0), \quad \omega(t) \sim (0, Q), \quad v_k \sim (0, R)$	
<i>Initialisation de l'état du système et de sa matrice de covariance</i>	
$\hat{x}(0) = \bar{x}_0, \quad P(0) = P_0$	(3.26)
<i>Prédiction</i>	
Estimation d'état	$\hat{\dot{x}} = \varphi(\hat{x}, u, t)$ (3.27)
Covariance de l'erreur	$\dot{P} = A(\hat{x}, t)P + PA^T(\hat{x}, t) + Q$ (3.28)
Jacobienne	$A(x, t) = \frac{\partial \varphi[x, u, t]}{\partial x}$ (3.29)
<i>Mise à jour de la mesure à t_k</i>	
Gain de Kalman	$K_k = P^-(t_k) H^T(x_k^-) [H(x_k^-) P^-(t_k) H^T(x_k^-) + R]^{-1}$ (3.30)
Covariance de l'erreur	$P(t_k) = P^-(t_k) - K_k H(x_k^-) P^{-1}(t_k)$ (3.31)
Réactualisation de l'estimation d'état à t_k	$\hat{x}_k = \hat{x}_k^- + K_k [y_k - h(\hat{x}_k^-, k)]$ (3.32)
Jacobienne	$H(x) = \frac{\partial h[x, k]}{\partial x}$ (3.33)

La propagation de l'état estimé \hat{x} et sa covariance P sont obtenues en résolvant les équations différentielles (3.27) et (3.28) respectivement. $P^-(t_k)$ est la matrice d'estimation *a priori* de la covariance de l'erreur et C_k est la matrice d'observation qui est définie comme étant la jacobienne $H(x)$. L'estimation de l'état à l'instant t_k se fait à partir de mesures disponibles et de la matrice *a posteriori* de la covariance de l'erreur $P(t_k)$.

Application à l'estimation de la culture de *Porphyridium purpureum* : Dans le cas de la culture de *Porphyridium purpureum* dans un photobioréacteur, les mesures et donc, les observations, ne se font pas en temps continu mais en temps discret avec un pas d'échantillonnage de l'ordre de quelques minutes (30 minutes environ pour un comptage cellulaire). Pour cela, nous avons eu recours à un filtre de Kalman étendu de type continu-discret. En effet, cette version du FKE est adaptée aux systèmes dont les mesures sont irrégulièrement espacées.

La dynamique de notre procédé peut être exprimée sous la forme générale donnée par les équations (3.24) et (3.25), dont la première équation, appelée équation d'état, définit le processus tandis que la seconde appelée équation d'observation, donne la mesure de l'état à travers une fonction non-linéaire h .

Le vecteur d'état dans notre cas est $x = (X, CIT)$.

Une étape de discrétisation est nécessaire pour mettre en œuvre l'algorithme dans un code informatique. Cette discrétisation se fera en utilisant les algorithmes de type Euler. L'observabilité du système est vérifiée en utilisant la notion de distinguabilité (cf. § 3.3.3) et est développée dans l'annexe B-1. Les matrices de covariance Q et R sont considérées constantes et sont définies en fonction des performances voulues pour l'estimateur.

Dans ce qui suit, le filtre de Kalman étendu est implémenté sur le processus étudié dans le cas batch et continu. Les résultats obtenus ainsi que les paramètres de réglage de cet observateur sont discutés.

3.7. Résultats en mode batch

Dans cette section quelques résultats de l'estimation de la biomasse de *Porphyridium purpureum* à partir de la mesure de la concentration en carbone

inorganique total CIT dans un photobioréacteur sont présentés. Les conditions opératoires initiales sont les suivantes :

$$X_0 = 2,44 \cdot 10^9 \text{ cell/l} , CIT_0 = 2,55 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$$

$$F_{in} = F_{out} = 0 , CIT_{in} = 0 , \text{ et } X_{in} = 0$$

L'introduction d'un bruit de mesure dans le modèle permet de prendre en considération la nature bruitée des variables mesurées. On supposera que la mesure du CIT présente un bruit avec une déviation standard égale à 5%.

Un bruit d'état quant à lui permet de prendre en compte l'erreur de modélisation de la dynamique du processus. En effet, le modèle d'évolution des variables d'état est bien évidemment un modèle approché (notamment la modélisation de la croissance de la biomasse), et de plus les paramètres du modèle sont déterminés par des procédures d'identification et de ce fait sont entachés d'erreur.

Dans le réglage du filtre on choisit :

x_0 comme étant une estimation de l'état initial,

P_0 comme dépendant de la confiance en la connaissance de l'état initial,

Q comme dépendant des imperfections de la modélisation et incertitudes sur les paramètres du modèle, comme mentionné ci-dessus

R comme dépendant du bruit du capteur.

Dans un premier temps, nous allons réaliser des essais en simulation en *mode batch* en considérant des erreurs dans les conditions initiales du filtre. Les erreurs sur la valeur initiale de X sont de l'ordre de 5% et 10% par rapport à la valeur utilisée pour la simulation du modèle (cf figure 3.2). Dans le premier cas, la convergence est assurée rapidement. Dans le deuxième cas, l'estimation est moins précise mais néanmoins satisfaisante. Une erreur beaucoup trop forte ne pourra pas être compensée par le filtre.

Les valeurs de matrices Q et R , déterminées empiriquement, sont les suivantes :

$$Q = \begin{bmatrix} 0,1 & 0 \\ 0 & 0,5 \end{bmatrix} \text{ et } R = 0,0001.$$

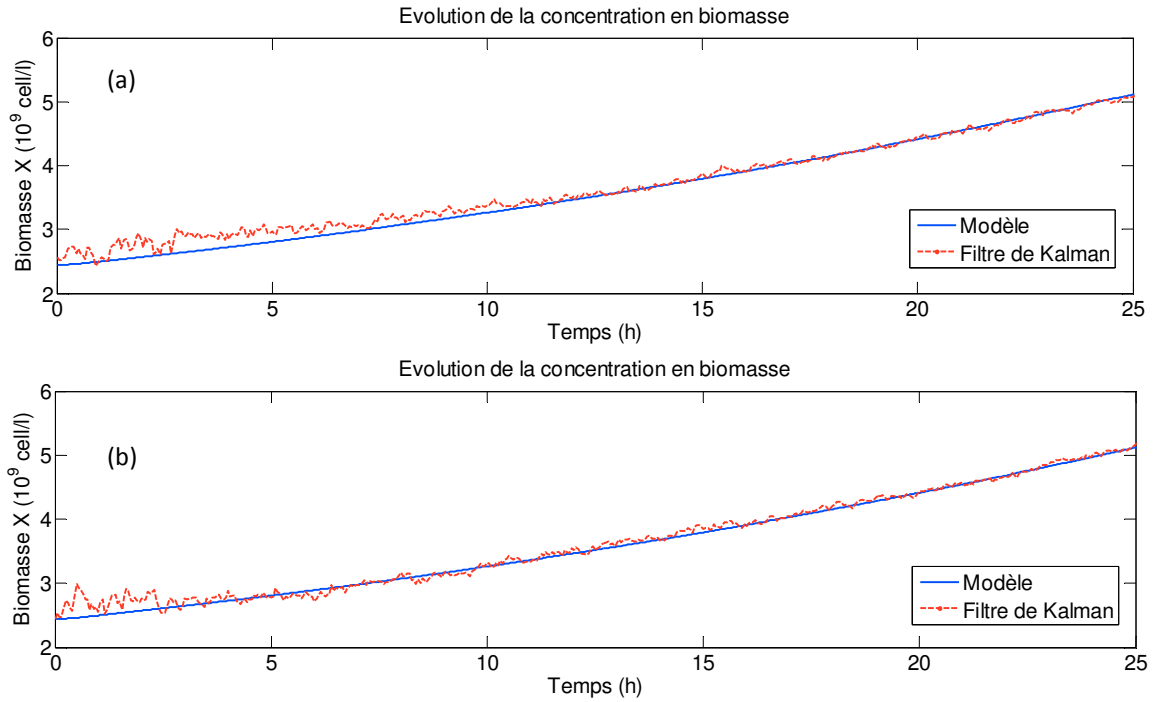


Figure 3.2 : Estimation de la concentration en biomasse. Erreur sur la valeur initiale de X : (a) 5% et (b) 10%

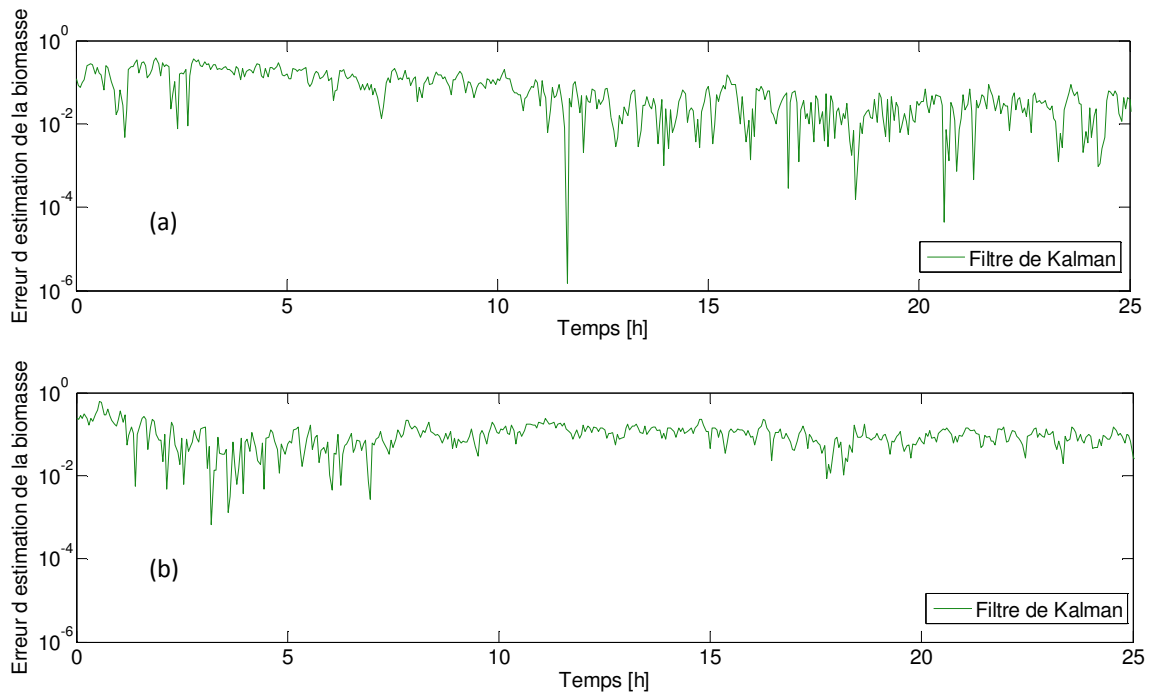


Figure 3.3 : Erreurs d'estimation de la concentration en biomasse pour des erreurs sur la valeur initiale de X : (a) 5% et (b) 10%

On considère également des erreurs sur la valeur initiale de CIT dans le filtre. Elles sont de l'ordre de 3% et 10% par rapport à la valeur utilisée pour la simulation du modèle (figures 3.4 et 3.5). Une erreur sur cette variable n'empêche pas la convergence rapide du filtre, puisque le filtre se base préférentiellement sur les mesures de cette variable pour corriger l'estimation. Ultérieurement, il sera mis en évidence que la prise en compte de la qualité de l'initialisation en CIT est réalisée à l'aide de R la matrice de covariance de bruit de mesure.

La mesure de la concentration en CIT , soit par chromatographie gazeuse, soit en utilisant des sondes à CO_2 et pH (cf. § 2.4.7.4), est supposée effectuée à des temps d'échantillonnage (T_s) équidistants .

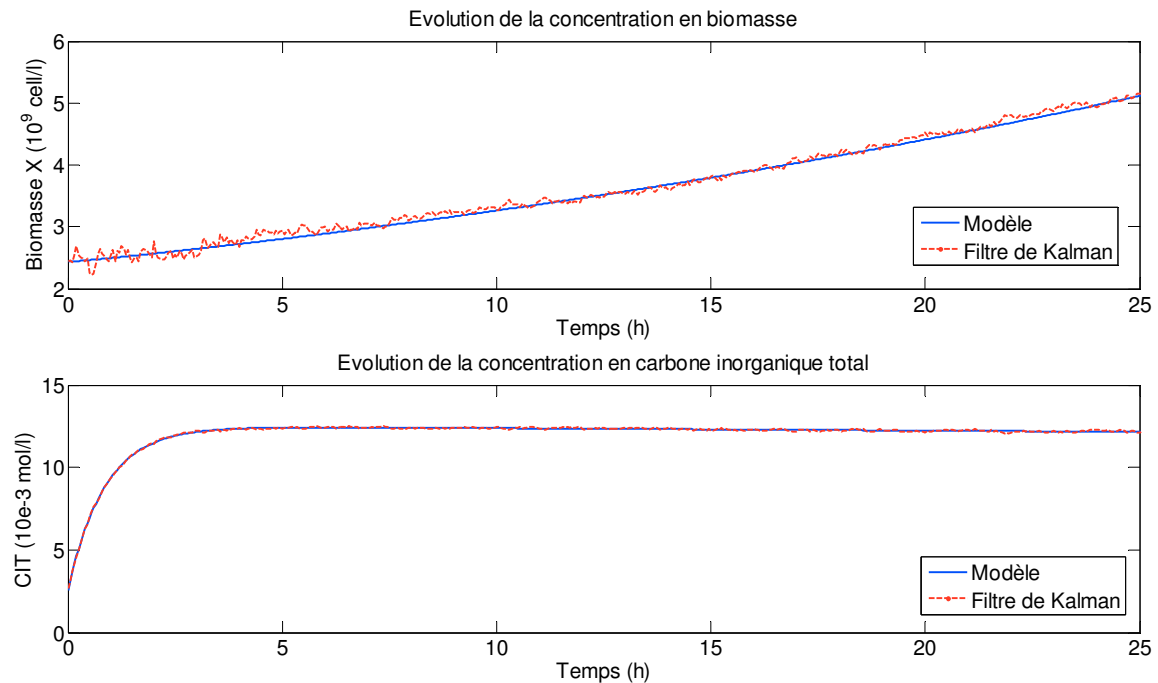


Figure 3.4 : Estimation de la concentration en biomasse et de la concentration en carbone inorganique total. Erreur de 3% sur la valeur initiale de CIT

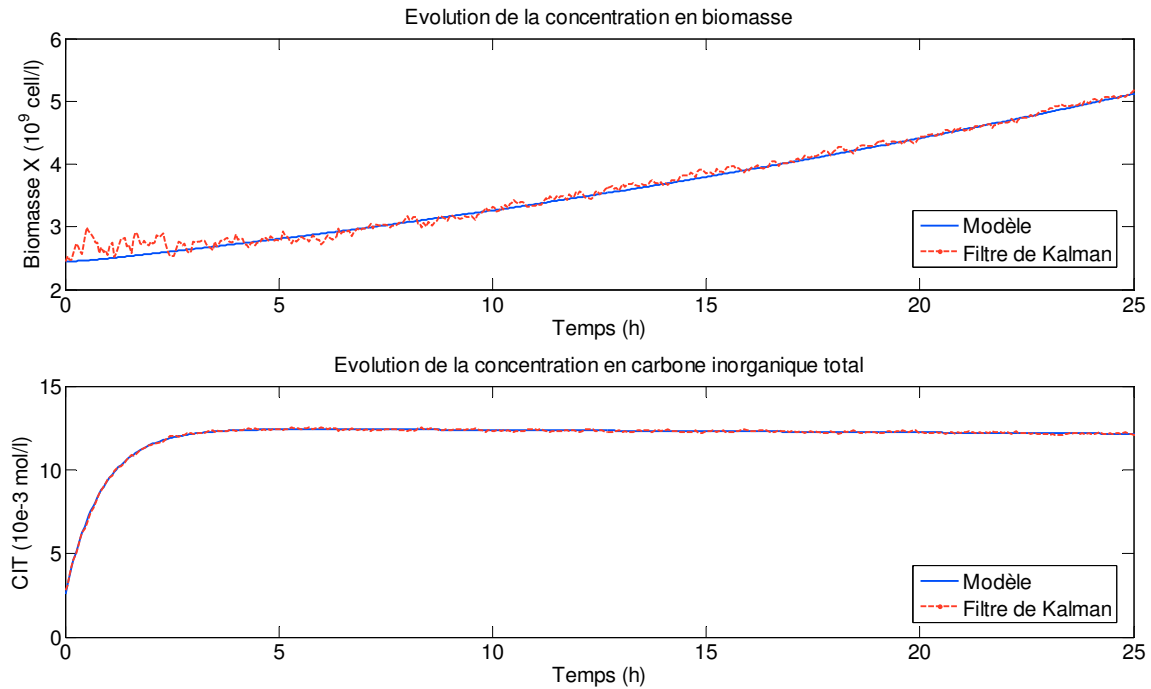


Figure 3.5 : Estimation de la concentration en biomasse et de la concentration en carbone inorganique total. Erreur de 10% sur la valeur initiale du CIT

Une étude de l'influence du temps d'échantillonnage a été réalisée. Les mesures sont obtenues par la simulation du modèle discret du procédé. Les tests effectués montrent l'importance du temps d'échantillonnage choisi. Une augmentation du temps d'échantillonnage est à l'origine d'une dégradation des performances de l'estimateur. En effet, la performance de l'estimateur dépend du niveau de bruit de mesure et de modélisation utilisés. La figure 3.6 montre ces résultats en simulation. Les erreurs d'estimation sont également montrées sur la figure 3.7.

Il en ressort donc que plus fréquemment le filtre de Kalman corrige l'estimation par des mesures, plus précises sont ces estimations. La qualité d'estimation du filtre de Kalman continu-discret est donc conditionnée par la cadence des observations.

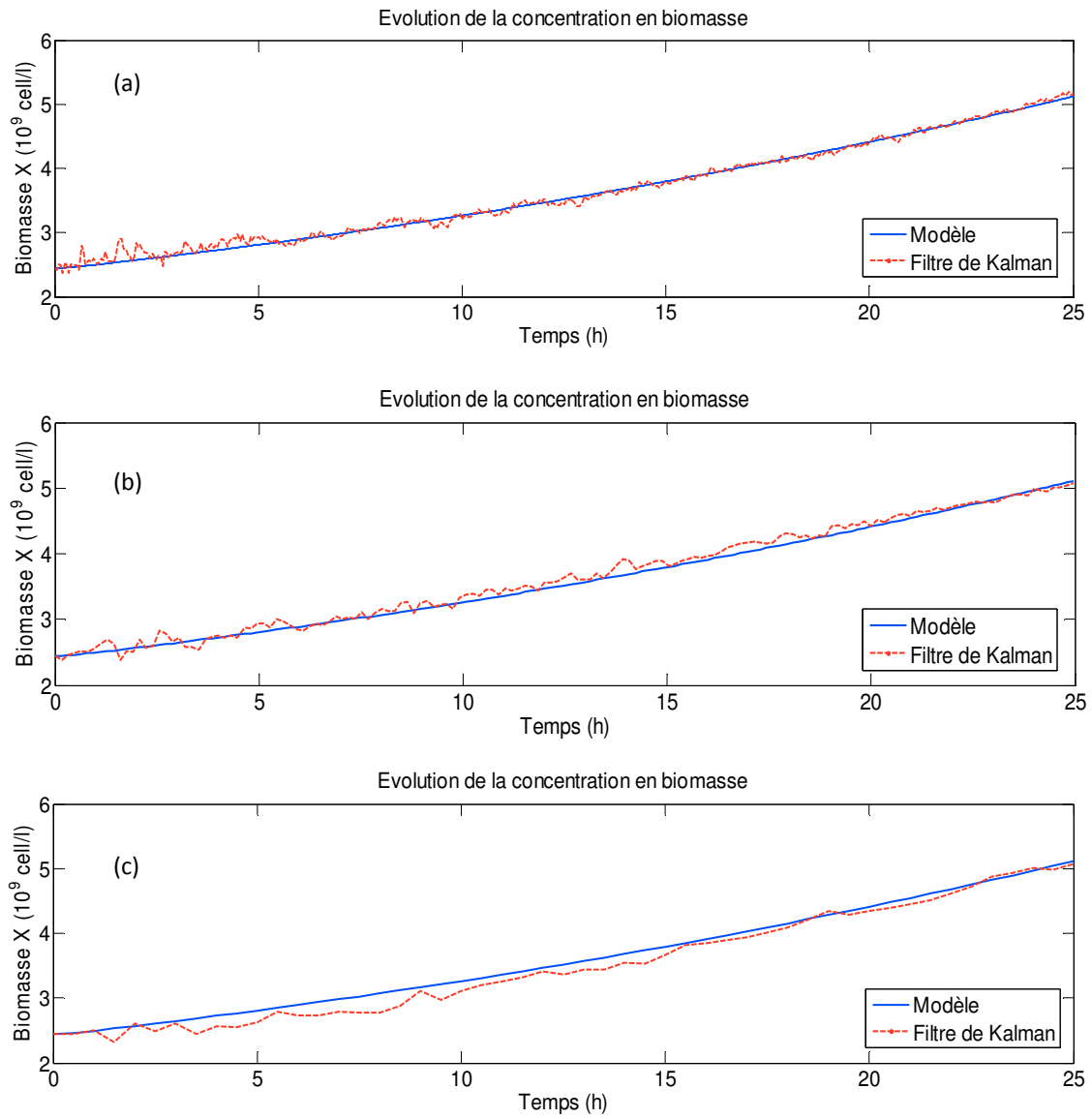


Figure 3.6 : Estimation de la concentration en biomasse à partir de la concentration en carbone inorganique total à différents temps d'échantillonnage : (a) 0,05h, (b) 0,16h et (c) 0,5h

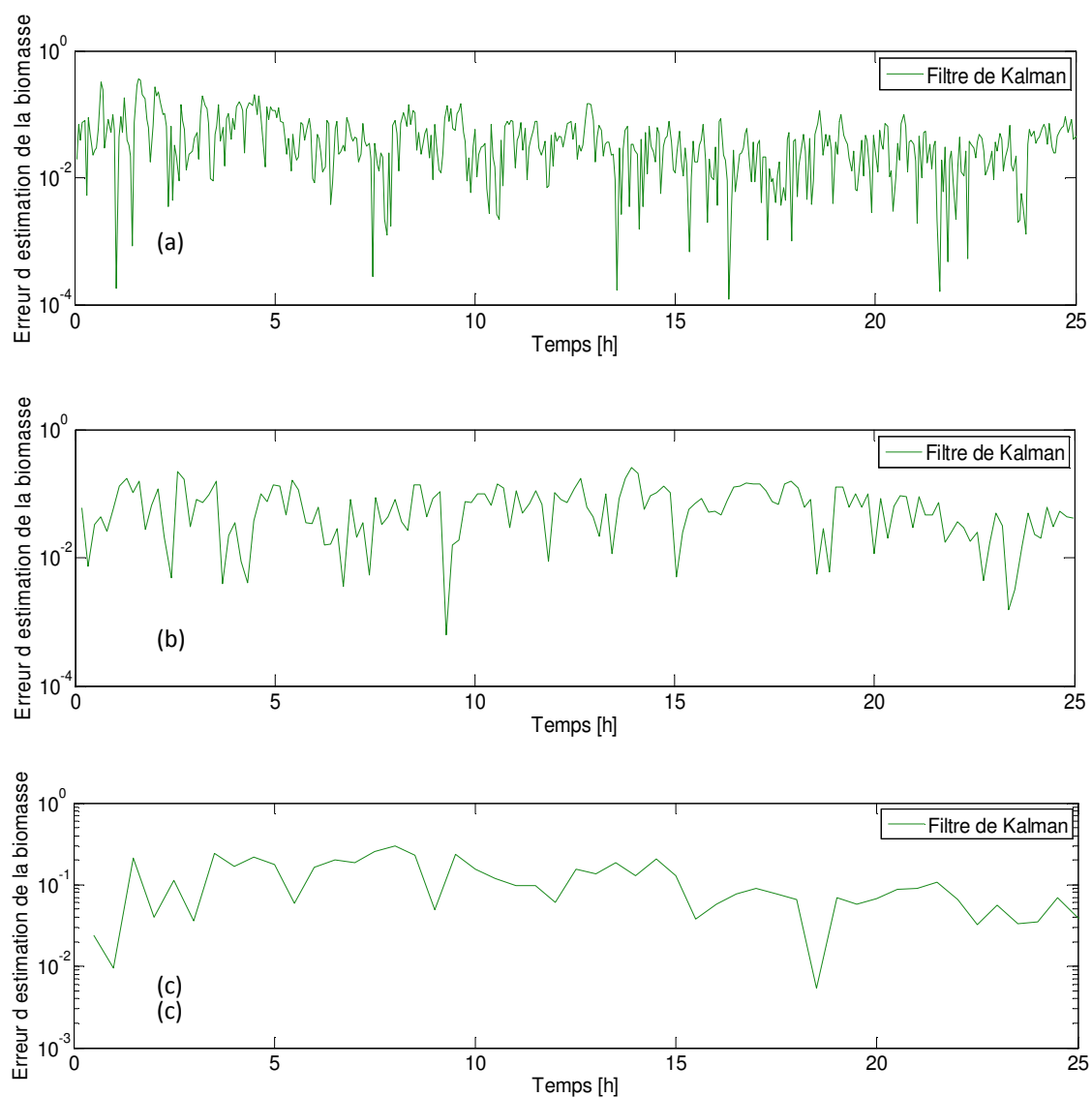


Figure 3.7 : Erreurs d'estimation de la concentration en biomasse pour l'étude de l'influence du temps d'échantillonnage : (a) 0,05h, (b) 0,16h et (c) 0,5h

Les performances de l'estimateur proposé sont également étudiées dans les cas des cultures batch de *Porphyridium purpureum* réalisées au laboratoire dans un photobioréacteur de 2,5 litres. Parmi les expériences effectuées pour l'identification et validation du modèle (cf. Ch. II) nous en avons choisi quatre pour montrer l'efficacité du filtre proposé. Ainsi, les performances de l'estimateur sont étudiées dans le cas des cultures à intensité lumineuse faible ($60 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et élevée ($160 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$), d'une culture à pourcentage faible (1%) de dioxyde de carbone dans le gaz d'alimentation et celui d'une culture à conditions optimales (cf. Ch. II, § 2.4.3).

Le choix des matrices de covariance est important pour l'estimation. Ici, la matrice de covariance du bruit d'état Q , la matrice de covariance du bruit de mesure R et la matrice de covariance de l'erreur initiale P_0 ont été choisies sous la forme diagonale de façon à ce que leurs éléments soient décorrélés. P_0 , Q et R ont été déterminées empiriquement. La matrice de covariance de l'erreur initiale est $P_0 = \begin{bmatrix} 0,25 & 0 \\ 0 & 0,01 \end{bmatrix}$. La matrice Q est égale à $Q = \begin{bmatrix} 0,1 & 0 \\ 0 & 0,5 \end{bmatrix}$. On considère que la matrice de covariance R est caractérisée par un bruit gaussien avec un écart-type de 5%. Les résultats sont présentés dans les figure 3.8–3.11. La biomasse estimée coïncide rapidement avec les valeurs obtenues expérimentalement. Nous observons une bonne performance dans le cas des cultures batch.

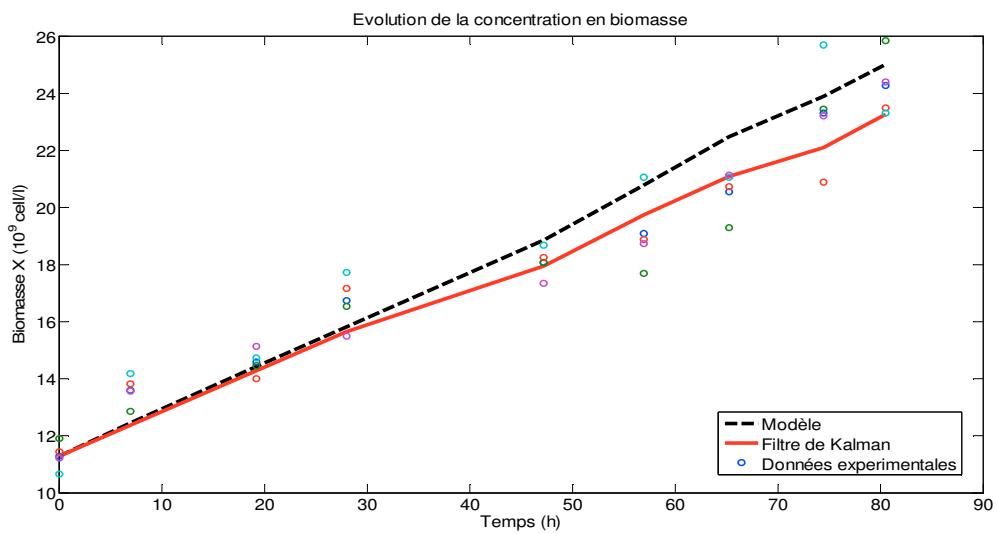


Figure 3.8 : Etude expérimentale : Estimation de la concentration en biomasse dans une culture batch de *Porphyridium purpureum* avec 1% de CO_2 dans le gaz d'alimentation.

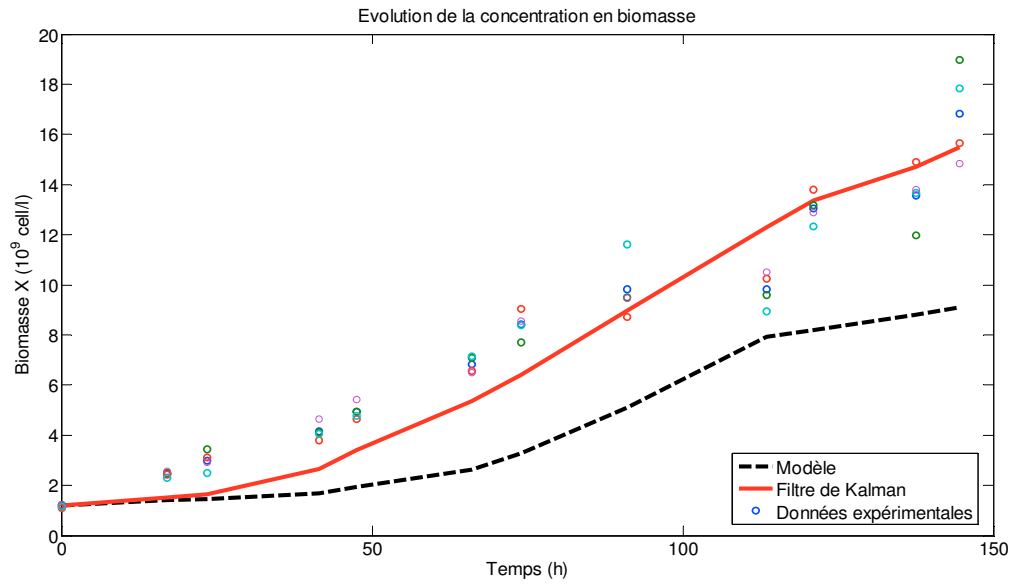


Figure 3.9 : Etude expérimentale : Estimation de la concentration en biomasse dans une culture batch de *Porphyridium purpureum* avec une intensité lumineuse faible.

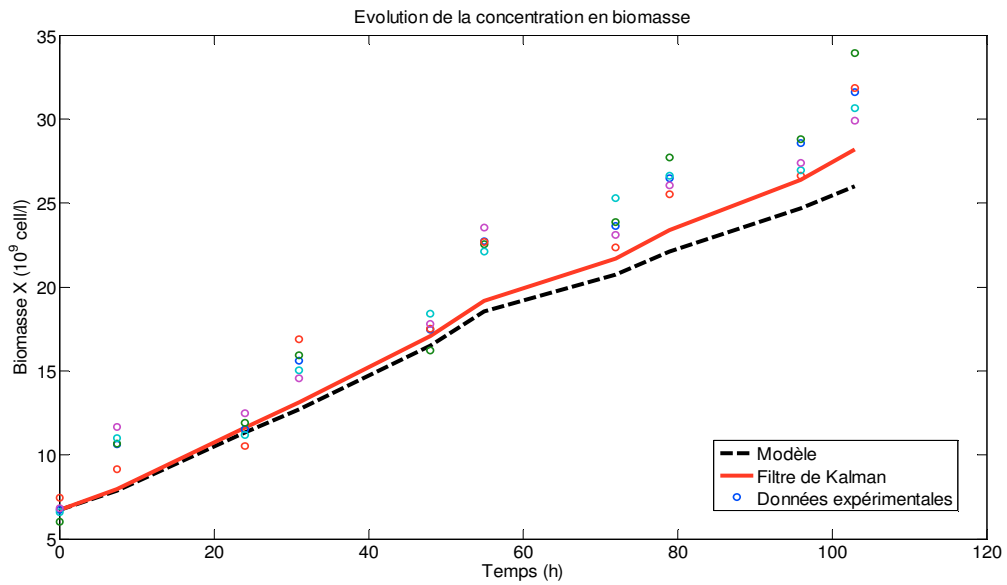


Figure 3.10 : Etude expérimentale : Estimation de la concentration en biomasse dans une culture batch de *Porphyridium purpureum* avec une intensité lumineuse élevée.

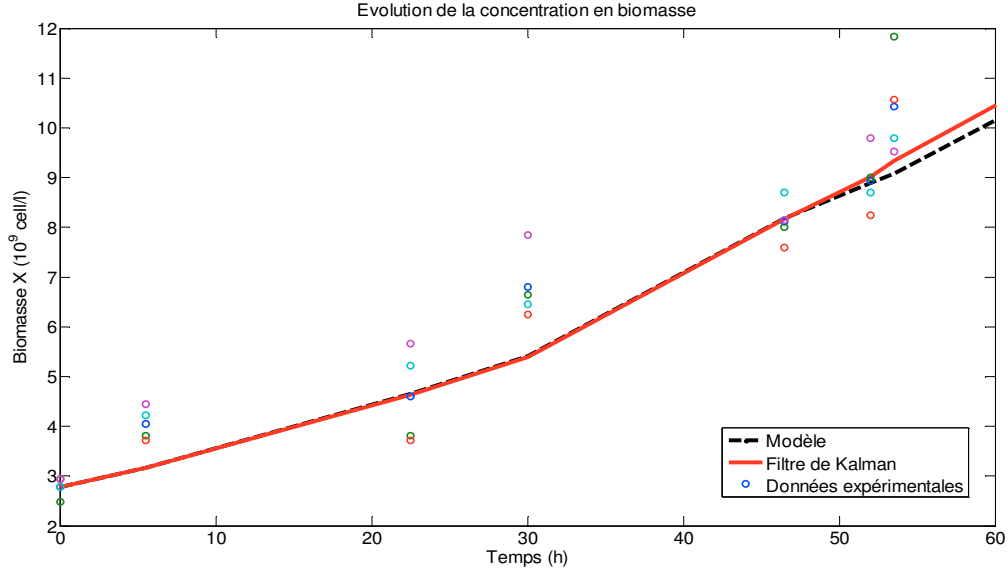


Figure 3.11 : Etude expérimentale : Estimation de la concentration en biomasse dans une culture batch de *Porphyridium purpureum* à conditions optimales.

Une étude de l'effet de P_0 a également été effectuée. Les résultats sont montrés dans la figure 3.12. A titre de rappel, pour notre système, la matrice de covariance est : $P_0 = \text{diag}[P_{X_0}, P_{CIT_0}]$. Les figures ci-dessus 3.8 – 3.11 montrent que le modèle seul peut, dans la plupart des cas (à l'exception montrée en figure 3-9), estimer la concentration en biomasse pour différentes valeurs d'intensité lumineuse incidente (I_{in}) et pour diverses durées de culture. Plus la durée de la culture augmente, plus les erreurs de modélisation sont visibles. A noter qu'avec l'application du filtre de Kalman étendu les erreurs peuvent être corrigées.

La figure 3.12 montre que quand il existe une erreur d'estimation initiale important en X (soit une matrice P_{X_0} élevée), le filtre de Kalman étendu peut corriger rapidement l'erreur d'estimation initiale, à condition que la valeur de P_{X_0} soit choisie correctement. Cet avantage particulier du filtre est principalement dû au fait que le FKE est capable d'utiliser la totalité des valeurs mesurées du carbone inorganique total (CIT), même si la mesure est bruitée.

L'effet de Q à été également étudié. Pour notre système, la matrice de covariance Q est égale à : $Q = \text{diag}[Cov. Q_X, Cov. Q_{CIT}]$. Les résultats de l'estimation de la

concentration cellulaire (X) sous différentes valeurs de $Cov.Q_X$ sont présentés sur la figure 3.13. Les tests ont été réalisés sur trois cultures batch de *Porphyridium purpureum* menées sous différentes conditions : 1% de CO_2 dans le gaz d'alimentation, intensité lumineuse faible ($60 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et intensité lumineuse élevée ($160 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Quand la valeur de $Cov.Q_X$ est trop élevée (≥ 10), le filtre aboutit à une surestimation significative de X . Au contraire, quand la valeur de $Cov.Q_X$ est faible ($\leq 10^{-3}$), l'estimation de X se rapproche des résultats fournis par le modèle (cf. figure 3.13). Ce comportement est prévisible. En effet, si la matrice de covariance de l'erreur de modélisation est grande, cela traduit un manque de confiance au modèle utilisé, et de ce fait, le filtre de Kalman se base principalement sur les mesures pour estimer la biomasse. Inversement, si la covariance de l'erreur de mesure est élevée, le filtre fait plus confiance au modèle d'évolution, et ne tient pas compte (ou peu) des mesures réalisées. Dans ce cas, le filtre de Kalman est équivalent à une simple simulation des équations de la dynamique.

Les résultats de l'estimation de X sont également sensibles à la variation de $Cov.Q_{CT}$ mais dans une moindre mesure.

La figure 3.14 nous permet de voir l'effet de R sur l'estimation d'état. En effet, quand la valeur de R est trop élevée (≥ 10), le filtre va sous-estimer la concentration en X . A l'inverse, des valeurs faibles pour R ($\leq 10^{-2}$), conduisent à une bonne estimation de la concentration cellulaire.

Les simulations montrées dans les figures 3.12 - 3.14 permettent de montrer la sensibilité de l'estimateur aux changements des matrices de covariance P_0 , Q et R et représentent une piste d'amélioration du réglage du filtre de Kalman étendu.

Nous avons également observé dans les simulations réalisées que si la matrice de covariance de l'erreur initiale d'estimation P_0 , la matrice de covariance du bruit d'état Q et la matrice de covariance du bruit de mesure R sont ajustées proportionnellement, les résultats de l'estimations d'état restent inchangés.

Les matrices Q et R ont été déterminées empiriquement. Les valeurs finalement retenues sont les suivantes : $Q = \begin{bmatrix} 0,01 & 0 \\ 0 & 10 \end{bmatrix}$ et $R = 0,01$. La matrice P_0 est égale à :

$P_0 = \begin{bmatrix} 0,25 & 0 \\ 0 & 0,01 \end{bmatrix}$. Cette dernière matrice est déterminée à partir de la connaissance de la précision des mesures de la biomasse et du *CIT*.

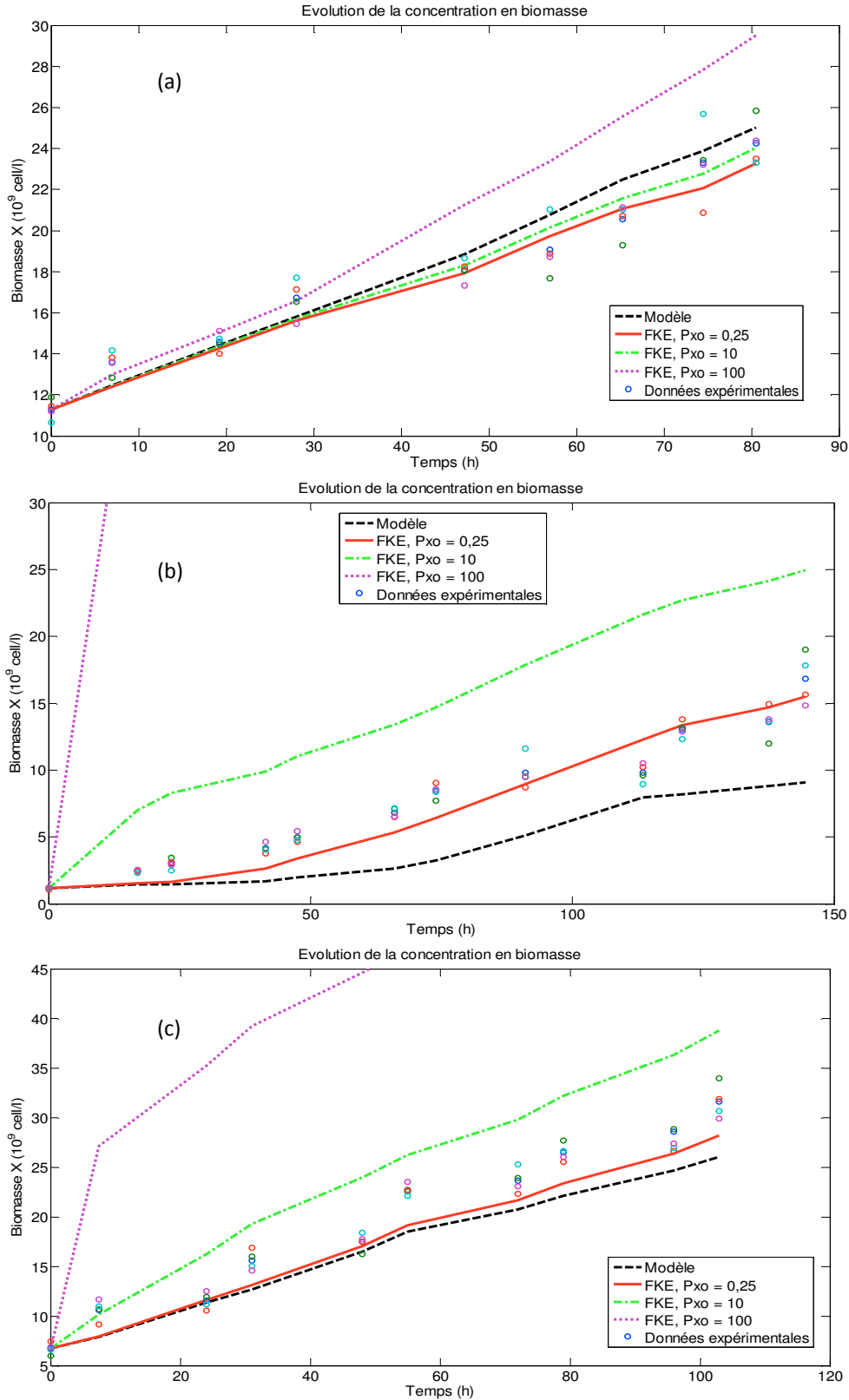


Figure 3.12 : Etude de l'effet de la covariance de l'erreur initiale du système (P_{x0}) sur l'estimation de la concentration en biomasse dans des cultures batch de *Porphyridium purpureum* à (a) 1% de CO_2 dans le gaz d'alimentation, (b) intensité lumineuse faible et (c) intensité lumineuse élevée.

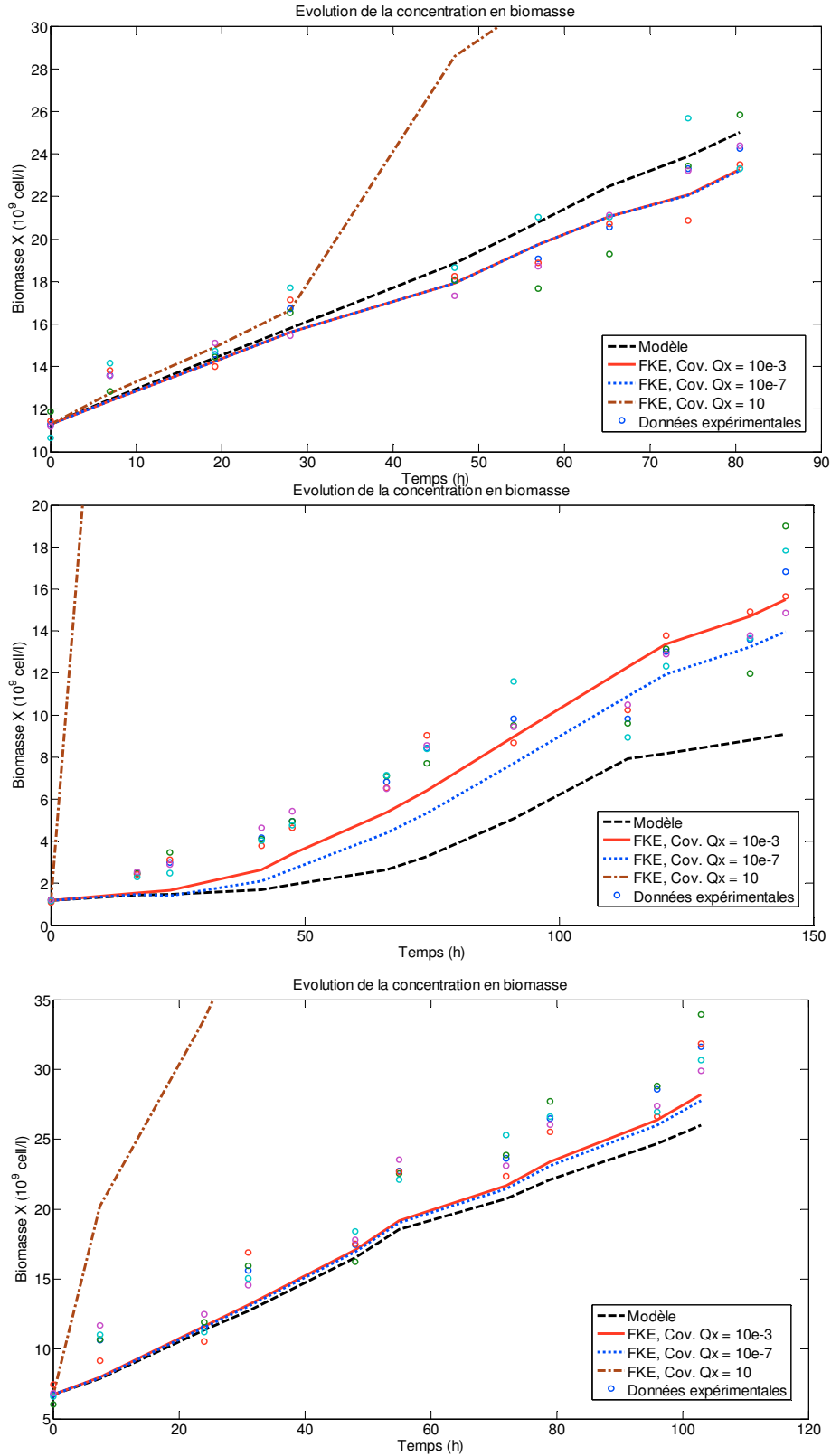


Figure 3.13 : Etude de l'effet de la matrice de covariance Q sur l'estimation de la concentration en biomasse dans des cultures batch de *Porphyridium purpureum* à (a) 1% de CO_2 dans le gaz d'alimentation, (b) intensité lumineuse faible et (c) intensité lumineuse élevée.

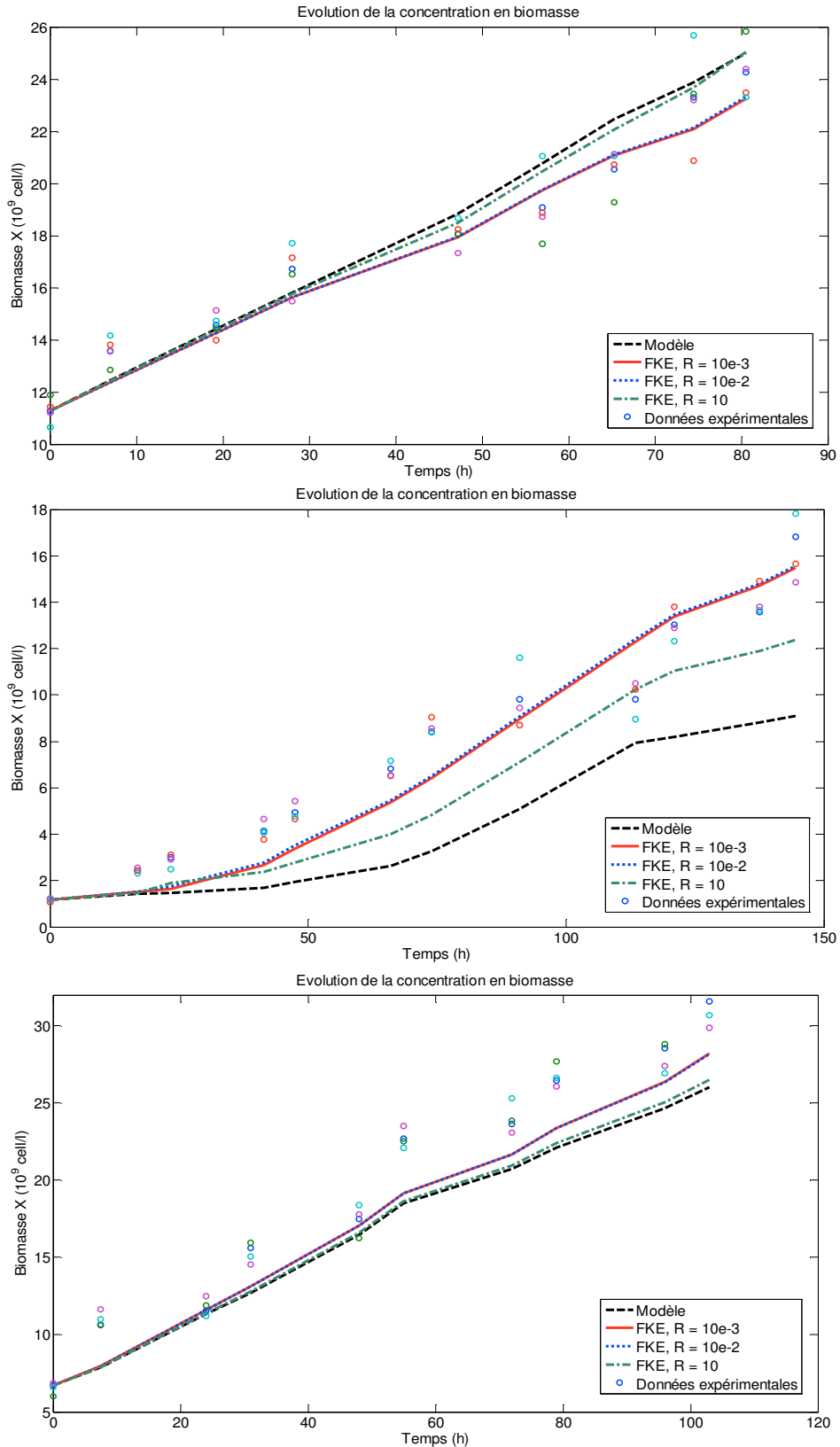


Figure 3.14 : Etude de l'effet de la matrice de covariance R sur l'estimation de la concentration en biomasse dans des cultures batch de *Porphyridium purpureum* à (a) 1% de CO_2 dans le gaz d'alimentation, (b) intensité lumineuse faible et (c) intensité lumineuse élevée.

3.8. Résultats en mode continu

Par la suite, nous allons tester le filtre de Kalman étendu en mode continu ($F_{in} = F_{out} \neq 0$) en simulation et sur des données expérimentales. Ces dernières ont été obtenues par Baquerisse (1999). Il s'agit de la culture de *Porphyridium purpureum* en conditions optimales de croissance dans un photobioréacteur de 2,5 litres. Ce dispositif est similaire à celui utilisé dans nos expériences et décrit dans le chapitre II (cf. § 2.4.2).

Les conditions initiales sont les suivantes :

$$X_0 = 2,0 \cdot 10^9 \text{ cell/l et } CIT_0 = 4,51 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$$

Des paliers successifs ont été appliqués sur le débit d'alimentation de la phase liquide. L'évolution de la concentration cellulaire est suivie au cours du temps. La figure 3.15 montre le profil du débit d'alimentation en milieu de culture lors de cette expérience.

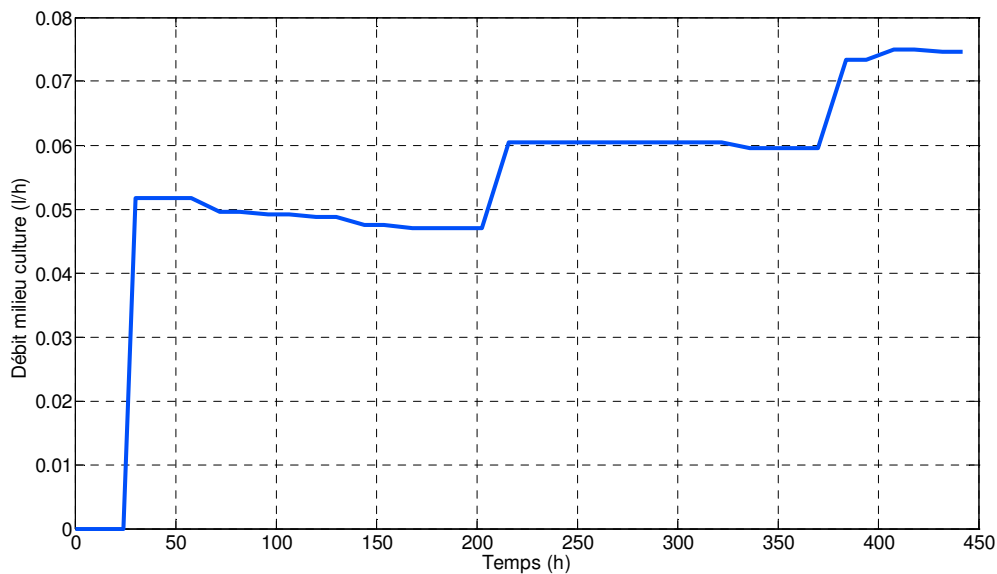


Figure 3.15 : Profil d'évolution du débit d'alimentation dans le photobioréacteur.

Les tests en simulation sont montrés dans les figures 3.16 et 3.17. Nous avons considéré une petite erreur sur les conditions initiales du filtre : $X_0 = 2,25 \cdot 10^9 \text{ cell/l}$. Le temps d'échantillonnage est égal à $T_s = 0,1h$

Les matrices Q et R ont été déterminées empiriquement. Les valeurs sont les suivantes : $Q = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}$ et $R = 0,01$.

Les figures 3.16 et 3.17 indiquent que l'estimateur proposé présente de bonnes performances dans le cas d'une culture de *Porphyridium purpureum* en mode continu. Dans la figure 3.17 nous comparons les mesures réelles avec les valeurs estimées correspondantes. Dans ce cas-là, l'estimation de la biomasse en utilisant le filtre de Kalman est plus précise que les résultats donnés par le modèle (figure 3.17). Ainsi, les possibles erreurs de modélisation sont compensées par le filtre de Kalman.

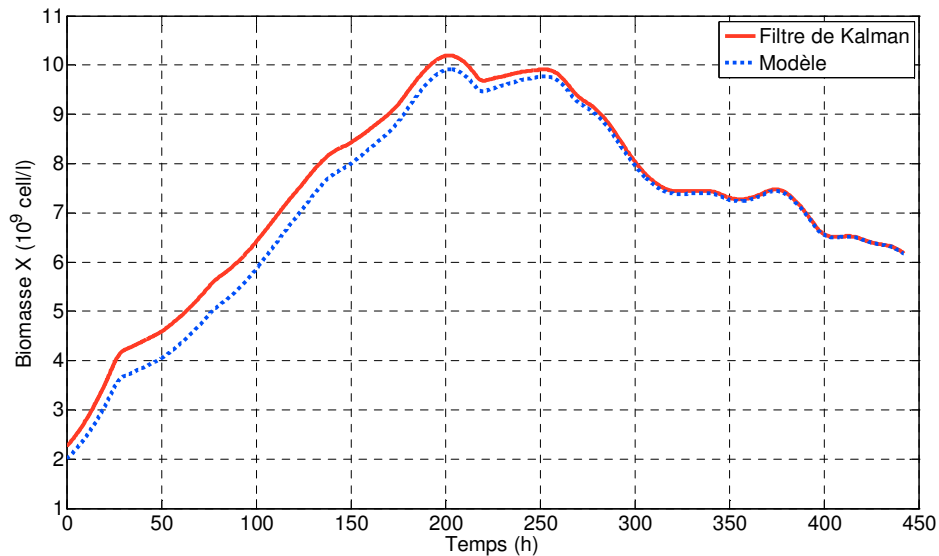


Figure 3.13 : Performance de l'estimateur en simulation pour une culture de *Porphyridium purpureum* en mode continu

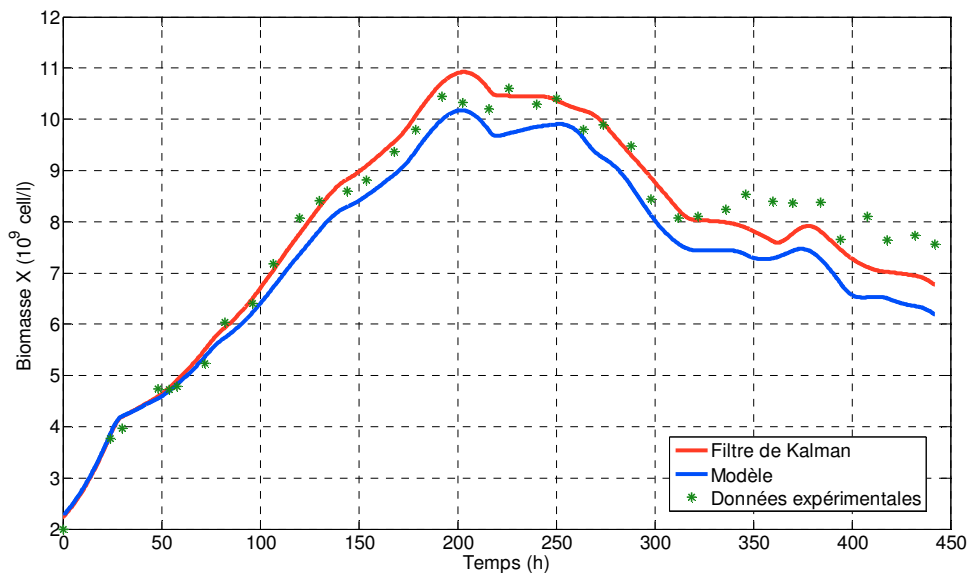


Figure 3.14 : Comparaison de l'estimation de la biomasse avec des données expérimentales pour une culture de *Porphyridium purpureum* en mode continu.

3.9. Conclusion

Dans ce chapitre, un capteur logiciel a été proposé pour estimer la concentration en biomasse à partir de la mesure de la concentration en carbone inorganique total et d'un modèle du procédé. Plusieurs approches ont été testées en parallèle avant de choisir celle qui présente les meilleurs résultats. Il s'agit d'un filtre de Kalman étendu qui travaille en temps continu aussi bien qu'en temps discret. La convergence de chacune de ces versions est clairement établie. Les simulations numériques et les données expérimentales montrent une performance satisfaisante de la méthodologie proposée. Il est à noter ceci dit que la performance de ce filtre dépend essentiellement de ses paramètres de réglage. La difficulté pour ce type de filtre est qu'il peut être instable, et de ce fait il faut choisir avec précaution les matrices de covariance des erreurs de modélisation et de mesure. De plus, l'estimation du filtre dépend de la qualité du modèle mais surtout de la qualité des mesures. Aussi, ce filtre ne peut être utilisé que si les mesures sont de bonnes qualités (avec bruit limité), et sont représentatives de la dynamique du système (d'où la nécessité de vérifier l'observabilité du système avant toute implémentation de filtre de Kalman).

L'estimateur d'état développé permet d'obtenir la concentration de la biomasse dans un photobioréacteur microalgal, sous réserve que les conditions d'utilisation soient bonnes comme indiqué ci-dessus. Une autre étude considérera la validation du capteur en ligne et en temps réel dans un photobioréacteur de 9,6 litres complètement instrumenté qui sera décrit dans le chapitre V.

Chapitre IV

Table de matières

4.1.	Introduction	123
4.2.	Stratégie de commande	125
4.3.	Modèle retenu	125
4.4.	Commande non-linéaire	126
4.5.	Commande linéaire	128
4.6.	Régulation par <i>PID</i> Ziegler-Nichols	131
4.7.	Commande par retour d'état linéarisant	133
4.7.1.	Linéarisation par retour d'état	133
4.7.2.	Commande du système linéarisé	135
4.7.3.	Mise en œuvre de la commande du photobioréacteur	136
4.7.3.1.	Premier cas : $y = X$	136
4.7.3.2.	Second cas : $y = CITX$	137
4.7.4.	Remarque : Platitude	139
4.8.	Régulation par modèle Générique (<i>GMC</i>)	140
4.9.	Commande prédictive non linéaire (<i>CPNL</i>)	142
4.9.1.	Application à la culture de <i>Porphyridium purpureum</i>	142
4.9.2.	Problème d'optimisation	143
4.9.3.	Prise en compte des erreurs du modèle	144
4.9.4.	Résolution du problème d'optimisation : approche séquentielle <i>CVP</i>	145
4.10.	Validation par simulation	148
4.11.	Conclusion	158

Définition de la stratégie de commande et synthèse des lois de commande

4.1. Introduction

Comme nous l'avons mentionné dans les chapitres précédents, l'industrialisation de la culture de microalgues est loin d'être achevée. En effet, la problématique est la même que celle rencontrée dans la plupart des procédés industriels. Les besoins en systèmes de commande et surveillance afin d'optimiser le fonctionnement du procédé sont de plus en plus nombreux. La nature non-linéaire des modèles dynamiques des bioprocédés et la difficulté de mesurer en ligne les variables clés du procédé sont des obstacles à franchir avant de pouvoir utiliser des systèmes de commande sophistiqués et fiables.

L'automatique appliquée aux bioprocédés n'est pas récente. Pendant les trois dernières décennies plusieurs ouvrages de référence et articles ont été publiés. Les techniques de commande proposées étaient appliquées à différents procédés biologiques tels que la croissance microbienne, les fermentations éthanoliques et lactiques, la digestion anaérobie, la production intracellulaire de poly (3 - hydroxybutyrate) (PHB), la production de levures, la production de pénicilline, le traitement des eaux résiduelles

entre autres (Bastin & Dochain, 1990 ; Pons, 1992 ; Hilgert *et al.*, 2000 ; Mailleret *et al.*, 2004 ; Marcos *et al.*, 2004 ; Ramaswamy *et al.*, 2005 ; Jenzsch *et al.*, 2006 ; Velut *et al.*, 2007).

Dans le cas de la culture de microalgues dans un photobioréacteur, très peu de travaux ont été répertoriés dans la littérature. Baquerisse a proposé un régulateur par modèle générique *GMC* adaptatif pour réguler la concentration cellulaire et celle en carbone inorganique total (Baquerisse, 1999). Berenguel et ses collaborateurs ont utilisé la commande prédictive pour contrôler le pH et minimiser les pertes en CO₂ dans une culture en continu de *Phaeodactylum tricornutum* dans un photobioréacteur tubulaire de 200 litres. (Berenguel *et al.*, 2004).

Sandnes et ses collaborateurs ont proposé un système de régulation de la concentration en biomasse de *Nannochloropsis oceanica* cultivée dans un photobioréacteur tubulaire de 200 litres. La régulation se fait à partir de la mesure de la densité optique de la culture. Pour maintenir constante la concentration en biomasse, l'ajout de milieu de culture est nécessaire. Il est introduit à la culture si la valeur de la densité optique mesurée dépasse la valeur de la consigne. Le système de régulation proposé ne permet pas de corriger les perturbations des conditions de culture (lumière, température,...) (Sandnes *et al.*, 2006).

Un système de régulation de la biomasse pour la culture de *Pavlova lutheri* dans un photobioréacteur de 2 litres a été mis en œuvre par Meireles et son équipe. Un système de monitoring de la biomasse est couplé à un dispositif de contrôle des lampes fluorescentes qui permet d'augmenter ou diminuer la quantité de lumière incidente sur le photobioréacteur. La mesure de la biomasse est périodiquement réalisée. La vitesse spécifique de croissance μ est calculée pour chaque paire de mesures de biomasse et comparée avec la valeur précédente. S'il y a une variation de la biomasse le système de commande se met en marche et la lumière va changer en fonction de cette variation (Meireles *et al.*, 2008).

Ce chapitre est consacré à définir une stratégie pour la synthèse des lois de commande pour la culture de microalgues dans un photobioréacteur continu. Dans un premier temps nous allons donner une introduction synthétique des certains concepts de base de l'automatique. Ensuite, nous aborderons la conception des différentes lois de

commande adaptées à notre bioprocédé. Finalement et à l'aide des simulations numériques, nous nous attacherons à comparer et démontrer l'efficacité des différentes approches proposées.

4.2. Stratégie de commande

Commander signifie « amener et maintenir la valeur d'une variable sur une valeur cible ». Celle-ci peut être constante : par exemple quand on veut ramener le comportement du photobioréacteur à sa position d'équilibre.

Les différents éléments de notre système de contrôle sont :

- Le photobioréacteur, représenté par son modèle d'évolution : c'est l'objet que l'on souhaite commander,
- Les variables de sortie ou mesurées, qui sont, dans notre cas, les variables X (concentration en biomasse) et CIT (concentration en carbone inorganique total),
- La variable d'entrée ou de commande, qui est le débit d'alimentation F dont la manipulation affecte les variables de sortie et rend donc possible la commande.

L'objectif du système de commande sera de réguler grâce au débit d'alimentation du milieu de culture F , la concentration en cellules X et la concentration en carbone inorganique total CIT à des valeurs consignes et de rejeter l'effet des perturbations qui agissent sur le système.

4.3. Modèle retenu

Nous rappelons les équations du modèle dynamique du système présenté dans le chapitre II :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X + \frac{F_{in}}{V} X_{in} - \frac{F_{out}}{V} X_{out} \quad (4.1)$$

$$\frac{dCIT}{dt} = -\mu \frac{X}{Y_{X/CIT}} - m X_C + \frac{F_{in}}{V} CIT_{in} - \frac{F_{out}}{V} CIT_{out} + k_L a ([CO_2^*] - [CO_2]) \quad (4.2)$$

Dans ce qui suit, le volume utile du photobioréacteur est supposé constant (i.e. culture en mode continu) et le terme de maintenance est supprimé. Aussi, les débits

de milieu d'alimentation et de milieu soutiré sont égaux. Ainsi, le système dispose d'une seule commande, notée F avec : $F_{in} = F_{out} = F$. De plus, on suppose qu'aucune biomasse ni carbone inorganique total ne sont ajoutés dans le milieu d'alimentation. Dans ce cas, le modèle dynamique du système donné par les équations (4.1) et (4.2) se simplifie et devient :

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= \mu X - \frac{F}{V} X \\ \frac{dCIT}{dt} &= -\mu \frac{X}{Y_{X/CIT}} - \frac{F}{V} CIT + k_L a([CO_2^*] - [CO_2]) \end{aligned} \quad (4.3)$$

Il est à noter que ce système est non-linéaire en les états mais linéaire en la commande F .

En effet, le modèle dynamique (4.3) est de la forme suivante :

$$\begin{aligned} \dot{x}(t) &= f(x) + g(x)u \\ y(t) &= h(x) \end{aligned} \quad (4.4)$$

Où x est le vecteur d'état de taille n (ici $n = 2$), f et g sont des fonctions non-linéaires qui décrivent la dynamique du système, u est la commande ($u = F$) et y est le vecteur de sortie obtenu à partir de h qui est une fonction non-linéaire.

4.4. Commande non-linéaire

Lors de la culture de microalgues en mode continu, nous cherchons à réguler la concentration en biomasse autour d'une consigne constante tout au long de la période de culture. En l'occurrence, les microalgues sont maintenues dans la phase de croissance exponentielle, en jouant notamment sur le débit d'alimentation en milieu de culture.

Dans ce paragraphe, nous proposons une stratégie de commande simple qui est une commande non-linéaire. Celle-ci est constituée de deux boucles de commande imbriquées comme illustré par la figure 4.1.

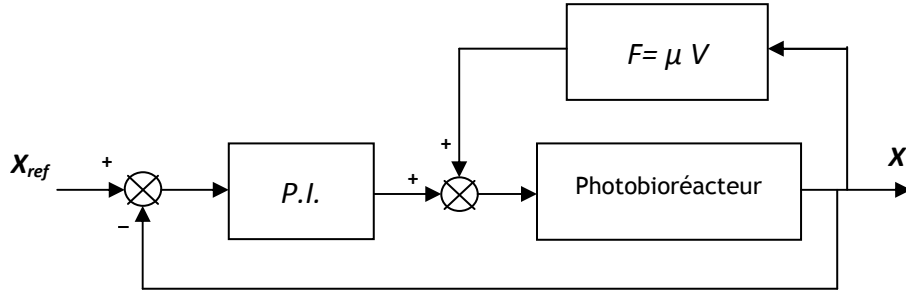


Figure 4.1 : Architecture de commande proposée

Ainsi la commande proposée est constituée :

- d'une commande intuitive placée dans la boucle interne. Cette commande permet d'annuler la dérivée de la variable X pour maintenir sa valeur à une constante, Considérons l'équation différentielle qui décrit la dynamique de la biomasse :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F}{V} X \quad (4.5)$$

Si l'on souhaite annuler la variation de la biomasse, soit $dX/dt = 0$, la commande du système $u = F$ est alors donnée par :

$$F = \mu V \quad (4.6)$$

- d'un correcteur proportionnel intégral ajouté dans la boucle externe. Son but est de garantir la précision du suivi de consigne et de rejeter les effets des éventuelles perturbations pouvant agir sur le système (grâce à l'action intégrale). Les paramètres de ce correcteur ont été choisis en utilisant la méthode fréquentielle de Ziegler-Nichols qui sera décrite dans le paragraphe 4.6. Ils ont été également calculés à l'aide de la *Control System Toolbox* de *MatlabTM*.

4.5. Commande linéaire

Dans cette étude, seul le régime continu est étudié. Dans ce cas, le photobioréacteur fonctionne autour d'un point de fonctionnement (concentrations en biomasse et en CIT constantes). Ainsi, une possibilité est de modéliser le système par un modèle linéaire et d'utiliser la théorie de la commande linéaire.

Le modèle (4.3) peut être représenté sous la forme d'un modèle d'état comme suit :

$$\begin{aligned}\dot{x} &= \mathbf{f}(x, F) \\ y &= \mathbf{h}(x, F)\end{aligned}\tag{4.7}$$

où x est le vecteur d'état qui est égal à $x = (X, CIT)$

Le système va donc être linéarisé autour d'un point d'équilibre caractérisé par le triplet $(X_{eq}, CIT_{eq}, F_{eq})$. Les équations dynamiques du modèle sont annulées pour ce vecteur des trois variables, soit :

$$\mu X_{eq} - \frac{F_{eq}}{V} X_{eq} = 0\tag{4.8}$$

$$-\mu \frac{X_{eq}}{Y_{X/CIT}} - \frac{F_{eq}}{V} CIT_{eq} + k_L a ([CO_2^*] - [CO_2]) = 0\tag{4.9}$$

On peut constater qu'il existe deux relations d'égalité pour déterminer trois variables. Aussi, il existe un degré de liberté. En effet, pour une valeur donnée d'une des variables (typiquement la concentration en biomasse X_{eq}), il est possible de déterminer les valeurs associées des autres variables CIT_{eq} et F_{eq} .

En linéarisant autour du point d'équilibre $(X_{eq}, CIT_{eq}, F_{eq})$, le modèle linéaire obtenu aura la forme suivante :

$$\begin{aligned}\tilde{\mathbf{x}}(t) &= \mathbf{A}_{lin} \tilde{\mathbf{x}}(t) + \mathbf{B}_{lin} \tilde{\mathbf{u}}(t) \\ \tilde{\mathbf{y}}(t) &= \mathbf{C} \tilde{\mathbf{x}}(t) + \mathbf{D} \tilde{\mathbf{u}}(t)\end{aligned}\tag{4.10}$$

où $\tilde{\mathbf{x}}$ est le vecteur d'état linéarisé autour de la position d'équilibre (X_{eq}, CIT_{eq}) , $\tilde{\mathbf{u}}$ est le vecteur de commande linéarisé autour de F_{eq} , $\tilde{\mathbf{y}}$ est le vecteur de sortie qui est égal au vecteur d'état, \mathbf{C} est une matrice unité et \mathbf{D} une matrice nulle. Les matrices \mathbf{A}_{lin} et

B_{lin} sont obtenues par les formules de linéarisation suivantes (autour des positions d'équilibre noté ci-après (\bar{x}, \bar{u})) :

$$A_{lin} = \frac{\partial f}{\partial x}(\bar{x}, \bar{u}) = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1}(\bar{x}, \bar{u}) & \frac{\partial f_1}{\partial x_2}(\bar{x}, \bar{u}) \dots & \frac{\partial f_1}{\partial x_n}(\bar{x}, \bar{u}) \\ \frac{\partial f_2}{\partial x_1}(\bar{x}, \bar{u}) & \frac{\partial f_2}{\partial x_2}(\bar{x}, \bar{u}) \dots & \frac{\partial f_2}{\partial x_n}(\bar{x}, \bar{u}) \\ \frac{\partial f_n}{\partial x_1}(\bar{x}, \bar{u}) & \frac{\partial f_n}{\partial x_2}(\bar{x}, \bar{u}) \dots & \frac{\partial f_n}{\partial x_n}(\bar{x}, \bar{u}) \end{bmatrix} \quad (4.11)$$

$$B_{lin} = \frac{\partial f}{\partial u}(\bar{x}, \bar{u}) = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial u_1}(\bar{x}, \bar{u}) & \frac{\partial f_1}{\partial u_2}(\bar{x}, \bar{u}) \dots & \frac{\partial f_1}{\partial u_r}(\bar{x}, \bar{u}) \\ \frac{\partial f_2}{\partial u_1}(\bar{x}, \bar{u}) & \frac{\partial f_2}{\partial u_2}(\bar{x}, \bar{u}) \dots & \frac{\partial f_2}{\partial u_r}(\bar{x}, \bar{u}) \\ \frac{\partial f_n}{\partial u_1}(\bar{x}, \bar{u}) & \frac{\partial f_n}{\partial u_2}(\bar{x}, \bar{u}) \dots & \frac{\partial f_n}{\partial u_r}(\bar{x}, \bar{u}) \end{bmatrix} \quad (4.12)$$

Pour notre système, les matrices A_{lin} et B_{lin} sont

$$A_{lin} = \begin{bmatrix} \frac{\partial \dot{X}}{\partial X} & \frac{\partial \dot{X}}{\partial CIT} \\ \frac{\partial \dot{CIT}}{\partial X} & \frac{\partial \dot{CIT}}{\partial CIT} \end{bmatrix}_{X_{eq}, CIT_{eq}, F_{eq}} \quad (4.13)$$

$$A_{lin} = \begin{bmatrix} \mu - \frac{F_{eq}}{V} + X_{eq} \frac{d\mu}{dX} & X_{eq} \frac{d\mu}{dCIT} \\ -3,31 \cdot 10^{-6} \mu - 3,31 \cdot 10^{-6} X_{eq} \frac{d\mu}{dX} - 1,61 \cdot 10^{-5} & -\frac{F_{eq}}{V} - 3,31 \cdot 10^{-6} X_{eq} \frac{d\mu}{dCIT} - \sigma \end{bmatrix} \quad (4.14)$$

avec:

$$\sigma = \frac{k_L a}{1 + 10^{pH} K_1 + 10^{2pH} K_1 K_2} \quad (4.15)$$

$$\frac{d\mu}{dX} = - \frac{A CIT_{eq} e^{\left[2 - \frac{CIT_{eq}}{CIT_{opt}} + \frac{\theta_1}{E_{opt} V X_{eq}}\right]} \mu_{max} I_{in} \theta_2 (E_{opt} V X_{eq} + \theta_1)}{CIT_{opt} E_{opt}^2 V^2 X_{eq}^3} \quad (4.16)$$

où

$$\theta_1 = A I_{in} (C_1 X_{eq}^{c_2} - 1) \quad \text{et} \quad \theta_2 = 1 + (C_2 - 1) C_1 X_{eq}^{c_2} \quad (4.17)$$

et

$$\frac{d\mu}{dCIT} = \frac{A (CIT_{eq} - CIT_{opt}) e^{\left[2 - \frac{CIT_{eq}}{CIT_{opt}} + \frac{\theta_1}{E_{opt} V X_{eq}}\right]} \mu_{max} I_{in} (C_1 X_{eq}^{C_2} - 1)}{CIT_{opt}^2 E_{opt} V X_{eq}} \quad (4.18)$$

$$B_{lin} = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial F} \\ \frac{\partial f_2}{\partial F} \end{bmatrix}_{X_{eq}, CIT_{eq}, F_{eq}} \quad (4.19)$$

$$\text{soit : } B_{lin} = \begin{bmatrix} -\frac{X_{eq}}{V} \\ -\frac{CIT_{eq}}{V} \end{bmatrix}_{X_{eq}, CIT_{eq}, F_{eq}} \quad (4.20)$$

Stabilité du système :

De nombreuses définitions de stabilité, qui dépendent des modèles disponibles pour le système considéré, ont été développées (Willems, 1970). Si nous définissons les points d'équilibre d'un système dynamique nous pouvons, en utilisant la notion de Lyapunov, définir la stabilité ou l'instabilité du système. Cette notion consiste à dire que si tous les points d'un système sont initialisés autour d'un point x et que tous ces points restent autour de ce point x , alors x est stable au sens de Lyapunov. Si tous ces points convergent vers x alors x est asymptotiquement stable.

L'analyse de stabilité de notre système se fait en utilisant l'environnement *MatlabTM*. L'approximation linéaire du modèle nous permet d'analyser la stabilité du point d'équilibre choisi. Celle-ci est déterminé par les valeurs propres de A_{lin} . Le système sera stable si toutes les valeurs propres de cette matrice sont à parties réelles négatives et instable si au moins une valeur propre est à partie réelle positive.

Dans le cas du système considéré et pour le point de fonctionnement retenu, la stabilité de la matrice est assurée par des techniques de placement de pôles (commande modale ou commande linéaire quadratique).

4.6. Régulation par *PID* Ziegler-Nichols

La synthèse des commandes avancées a connu un grand développement dans les dernières décennies. Ces commandes ont été appliquées avec succès à de nombreuses applications pour améliorer les performances et la robustesse des systèmes étudiés. Malgré cela, le régulateur *PID* reste encore prédominant dans les boucles d'asservissement industrielles. Il permet de régler les performances d'un système de deuxième ordre et de certains systèmes complexes qui ont un comportement voisin de celui d'un deuxième ordre dans une certaine échelle de temps. Il présente une certaine robustesse par rapport aux variations des paramètres du procédé (Tan *et al.*, 1999).

La commande $u(t)$ donnée par le régulateur *PID* est définie par :

$$u(t) = K_p \left[e(t) + \frac{1}{T_i} \int_0^t e(\tau) d\tau + T_d \frac{de(t)}{dt} \right] \quad (4.21)$$

Elle est composée par trois termes :

- le terme proportionnel $P = K_p e(t)$ qui est proportionnel à l'erreur $e(t)$;
- le terme intégral $I = K_p \frac{1}{T_i} \int_0^t e(\tau) d\tau$ qui est proportionnel à l'intégrale de l'erreur ;
- le terme dérivatif $D = K_p T_d \frac{de(t)}{dt}$ qui est proportionnel à la dérivée de l'erreur.

Les paramètres du régulateur sont le gain proportionnel K_p , le temps intégral T_i et le temps dérivatif T_d .

Pour la synthèse du régulateur (détermination de ses paramètres) nous avons utilisé la méthode fréquentielle de Ziegler-Nichols. L'idée est d'amener le système à des oscillations limites en boucle fermée, pour déterminer son point critique (le gain et la pulsation critique notée ω_c), c'est-à-dire le point d'intersection de la courbe de Nyquist avec l'axe réel négatif (Besançon-Voda *et al.*, 1995) (cf. figure 4.2).

Les paramètres du régulateur *PID* figurent dans le tableau 4.1 où K_0 est le gain proportionnel qui a amené le système en oscillation et T_0 est la période des oscillations à la sortie du système.

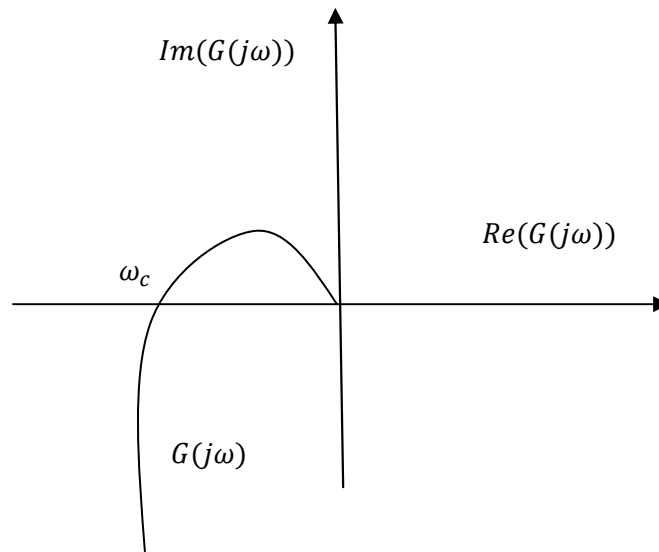


Figure 4.2 : Diagramme de Nyquist du procédé $G(j\omega)$ et la condition d'oscillation (intersection avec l'axe des réels)

Le critère de synthèse est d'obtenir un rapport de décroissance $d = 1/4$ ce qui représente un coefficient d'amortissement $\xi = 0,22$. Ces valeurs sont satisfaisantes pour un bon rejet des perturbations, mais elles sont trop faibles pour les réponses aux changements de consigne.

Tableau 4.1 : Paramètres du régulateur PID obtenus par la méthode de Ziegler-Nichols fréquentielle

Régulateur	K_p	T_i	T_d
P	$0,5 K_0$		
PI	$0,45 K_0$	$0,8 T_0$	
PID	$0,6 K_0$	$0,5 T_0$	$0,125 T_0$

De nombreux essais ont été effectués pour régler le régulateur PID qui servira à comparer les différentes stratégies de commande proposées. Les paramètres du régulateur ont été calculés par la méthode décrite ci-dessus et également à l'aide de la *Control System Toolbox* de *MatlabTM*.

4.7. Commande par retour d'état linéarisant

Cette stratégie de commande est constituée de deux boucles de commande imbriquées. Un algorithme de linéarisation par retour d'état (Isidori, 1989) dans une boucle interne est complété par un correcteur Proportionnel Intégral Dérivé comme schématisé par la figure 4.3. Le régulateur *PID* permet d'améliorer la stabilité du système linéarisé et d'éliminer les erreurs statiques. Une compensation du phénomène de windup est également prévue dans ce régulateur. Dans ce qui suit, chaque boucle de commande est détaillée.

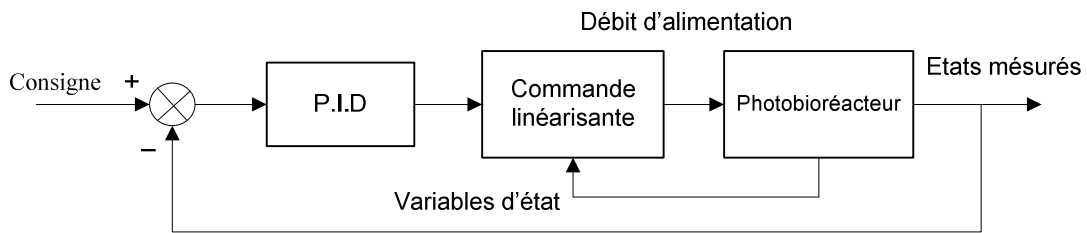


Figure 4.3 : Structure du système commandé

4.7.1. Linéarisation par retour d'état

Le modèle dynamique décrit par l'équation (4.3) appartient à une classe de systèmes de la forme :

$$\begin{aligned}\dot{x}(t) &= f(x) + g(x)u \\ y(t) &= h(x)\end{aligned}\tag{4.22}$$

où x est le vecteur d'état de taille n , f et g sont des fonctions non-linéaires qui décrivent la dynamique du système, u est la commande et h est une fonction non-linéaire qui permet d'obtenir le vecteur de sortie y .

Rappels

Afin de calculer la commande linéarisante par retour d'état du système (4.22), quelques définitions et outils mathématiques sont rappelés dans ce qui suit.

Dérivée de Lie

Considérons la dérivée de la sortie y par rapport au temps :

$$\dot{y} = \frac{\partial h}{\partial x} \dot{x} = \frac{\partial h}{\partial x} [f(x) + g(x)u] \quad (4.23)$$

On peut l'écrire sous la forme :

$$\dot{y} = L_f h(x) + L_g h(x) \quad (4.24)$$

avec

$$L_f h(x) = \frac{\partial h}{\partial x} f(x) \quad (4.25)$$

$$L_g h(x) = \frac{\partial h}{\partial x} g(x) \quad (4.26)$$

La fonction $L_f h(x)$ est appelée dérivée de Lie de $h(x)$ par rapport à $f(x)$, et correspond à la dérivée de la fonction $h(x)$ le long des trajectoires du système $\dot{x} = f(x)$. De même, $L_g h(x)$ est appelée dérivée de Lie de $h(x)$ par rapport à $g(x)$.

Degré relatif d'un système non-linéaire

Le degré relatif r du système (4.22) correspond au nombre de différentiations de la sortie $y = h(x)$, nécessaires pour que la commande u apparaisse de manière explicite dans l'équation.

Ainsi, le système a un degré relatif r , $1 \leq r \leq n$ si :

$$\begin{aligned} L_g L_f^{i-1} h(x) &= 0, \quad i = 1, 2, \dots, r-1 \\ L_g L_f^{r-1} h(x) &\neq 0 \end{aligned} \quad (4.27)$$

où

$$\begin{aligned} L_g L_f^i h(x) &= L_g [L_f^i h(x)] \\ L_f^i h(x) &= L_f [L_f^{i-1} h(x)], \quad i = 1, 2, \dots, r-1 \end{aligned} \quad (4.28)$$

et

$$L_f^0 h(x) \triangleq h(x) \quad (4.29)$$

Si le système non-linéaire (4.22) possède un degré relatif $r \leq n$, il peut être transformé en un système linéaire avec une entrée \hat{u} et une sortie y , composée de r intégrateurs grâce à un retour d'état qui compense les non-linéarités dans le comportement entrée-sortie.

Si $r < n$, le système est partiellement linéarisé. En revanche, si $r = n$, le système sera linéarisé complètement (Isidori, 1989).

La relation entre l'entrée du système u et l'entrée du système linéarisé, notée \hat{u} est la suivante (Isidori, 1989) :

$$u = \frac{\hat{u} - L_f^r h(x)}{L_g L_f^{r-1} h(x)} \quad (4.30)$$

4.7.2. Commande du système linéarisé

Le système linéarisé par retour d'état est équivalent à r intégrateurs. Une synthèse classique de commande basée sur l'étude de la réponse fréquentielle peut être menée. Dans ce cas, un régulateur de type *PID* est retenu. Ce choix s'explique par le fait que ce régulateur est assez simple à synthétiser et à mettre en œuvre. De plus, il répond aux spécifications du cahier des charges qui sont la stabilité et le rejet de perturbation.

Ce régulateur *PID* peut être réalisé à l'aide d'un correcteur par avance de phase suivi d'un régulateur *PI*. Ce choix simplifie la synthèse de la régulation, mais présente surtout l'avantage de proposer une régulation de complexité croissante et flexible selon le cahier des charges. Il est à noter que l'avance de phase permet de garantir les marges de stabilité et que le *PI* permet de rejeter les perturbations telles que des débits de fuite.

D'autre part, étant donné que la commande en débit est saturée ($0 \leq F \leq F_{max}$), le phénomène de saturation de l'action intégrale (*windup*) peut avoir lieu. Pour y remédier, un dispositif d'*anti-windup*, qui permet de prendre en compte la présence éventuelle de signaux saturés, est inclus dans le régulateur *PI* comme schématisé par la figure 4.4. L'introduction de ce dispositif consiste à faire dépendre la loi de commande nominale

d'un signal qui reste nul tant que le système est dans son domaine de fonctionnement linéaire, mais devient non nul dès qu'une saturation est active (Cao *et al.*, 2002 ; Gomes da Silva *et al.*, 2005). Ce terme est de la forme $K_s(\text{sat}(F) - F)$. Le gain K_s sera déterminé empiriquement pour avoir une réponse temporelle respectant les spécifications.

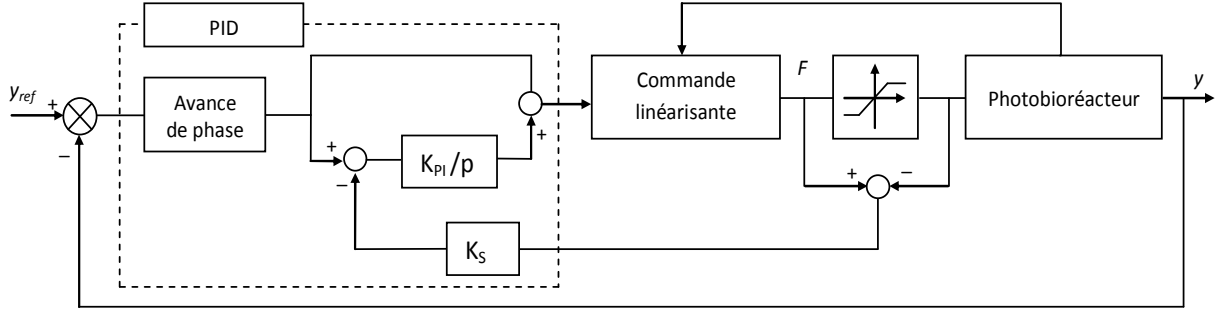


Figure 4.4 : Schéma du correcteur modifié avec un dispositif anti-windup

4.7.3. Mise en œuvre de la commande du photobioréacteur

La stratégie de commande proposée est appliquée au système décrit dans l'équation (4.3) dans deux cas de figure. D'abord, quand la sortie à asservir est la concentration en biomasse ($y = X$) qui est la sortie « classique » dans ce type de systèmes et ensuite, quand la sortie à asservir est choisie comme étant la quantité de carbone inorganique total disponible par cellule ($y = CIT/X$). Cette dernière est proposée comme une sortie alternative. La variable de commande est le débit d'alimentation en milieu de culture F .

4.7.3.1. Premier cas : $y = X$

Dans un premier temps, la commande par retour d'état linéarisant est appliquée sur notre bioprocédé en prenant la concentration en biomasse comme sortie du système. Après application de la notion de degré relatif sur le système décrit par les équations (4.3) nous trouvons que $r = 1$ et que par conséquent, le système est partiellement linéarisé pour la sortie considérée.

La commande du système F est calculée à partir de l'équation (4.30) et est donnée par l'équation suivante:

$$F = \frac{\hat{F} - \mu X}{X/V} \quad (4.31)$$

où \hat{F} est la commande du système linéarisé. Le système obtenu est donc équivalent à un simple intégrateur.

Dans un deuxième temps, un régulateur *PI* est ajouté dans la boucle externe, comme schématisé par la figure 4.5, pour assurer un bon rejet des perturbations et garantir une bonne poursuite de trajectoires. Un bon rejet de perturbation est synonyme d'un rapide retour du signal d'erreur à zéro, sans que ce signal n'atteigne de trop grandes valeurs.

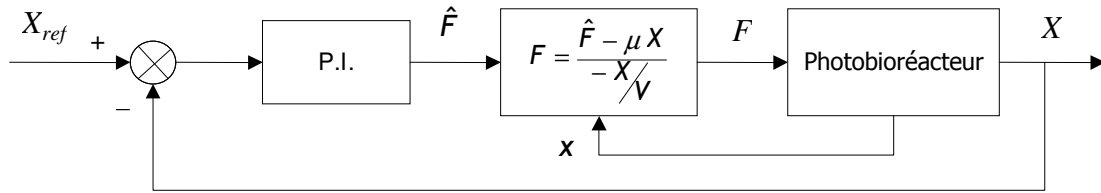


Figure 4.5 : Architecture de commande proposée pour la sortie $y = X$

4.7.3.2. Second cas : $y = CIT/X$

Dans ce cas, nous proposons une nouvelle sortie : la quantité de carbone inorganique total disponible par cellule. Le concept de carbone inorganique total disponible par cellule est introduit par Nouals (2000) pour des fins de modélisation. En effet, cette variable influence la vitesse spécifique de croissance et présente deux effets : un effet limitant lorsqu'elle est en quantité insuffisante et un effet inhibant *a contrario*.

Le choix de cette sortie se justifie par le fait que pour cette sortie, le degré relatif du système (4.3) est de 2 ($r = 2$ soit égal à la taille du vecteur d'état). Aussi, la stratégie proposée permet une linéarisation complète de l'ensemble des dynamiques du système. Ainsi, cette nouvelle variable à asservir comporte des avantages pour la régulation, ce qui motive notre choix.

Etant donné que l'objectif de la loi de commande est de maintenir X autour d'une valeur de consigne X_{ref} , cette spécification est traduite en terme CIT/X , puisqu'à l'équilibre, à une concentration de biomasse X correspond une concentration spécifique en carbone inorganique total CIT .

La commande du système F est également calculée à partir de l'équation 4.30 et est donnée par :

$$F = \frac{-\left(\hat{F} - (\mu X B_0 + \beta B_1)\right) V}{(X B_0 + CIT B_1)} \quad (4.32)$$

où:

$$B_0 = \left(-\alpha - \frac{CIT}{X}\right) \left(\frac{\partial \mu}{\partial X}\right) - \frac{k_L a (CO_2^* - CIT \gamma)}{X^2} + \frac{\mu CIT}{X^2} \quad (4.33)$$

$$B_1 = \left(-\alpha - \frac{CIT}{X}\right) \left(\frac{\partial \mu}{\partial CIT}\right) - \frac{\gamma k_L a}{X} - \frac{\mu}{X} \quad (4.34)$$

$$\alpha = \frac{0,0874}{133,18 Y_{X/CIT}} \quad (4.35)$$

$$\beta = -\alpha \mu X + k_L a (CO_2^* - CIT \gamma) \quad (4.36)$$

$$\gamma = 1 / \left[1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1 K_2}{[H^+]^2} \right] \quad (4.37)$$

et \hat{F} est la commande du système linéarisé.

Le système ainsi linéarisé est équivalent à un double intégrateur.

Dans un deuxième temps, un régulateur *PID* sera ajouté dans la boucle externe comme schématisé par la figure 4.6. L'objectif de ce correcteur est d'améliorer la marge de phase du système, autrement dit, d'augmenter la bande passante. On cherche à améliorer le temps de réponse du système tout en rejetant les perturbations.

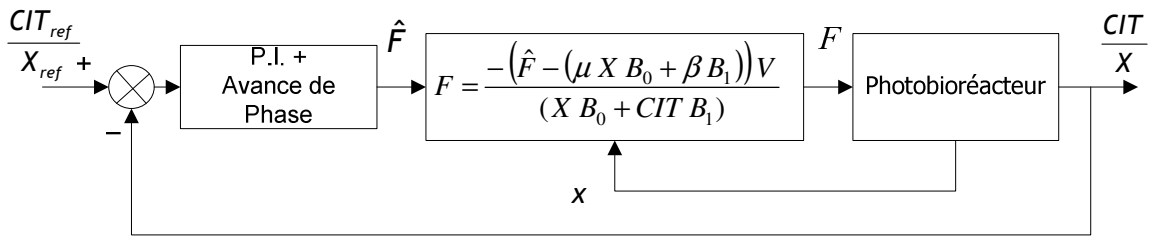


Figure 4.6 : Architecture de commande proposée pour la sortie $y = CIT/X$

Au lieu de mettre en œuvre un régulateur *PID*, nous avons choisi un correcteur à avance de phase en série avec un régulateur *PI*. Ainsi, plusieurs correcteurs pourraient être utilisés sur le système, selon la performance et la robustesse désirées. Ce régulateur comporte également un terme d'anti-windup (non illustré par la figure 4.6).

Dans le cas particulier de la sortie considérée, une perturbation en intensité lumineuse et en quantité de CO_2 dans le gaz d'alimentation se traduit par un changement de consigne. En effet, le couple (X, CIT) à l'équilibre dépend principalement de ces variables.

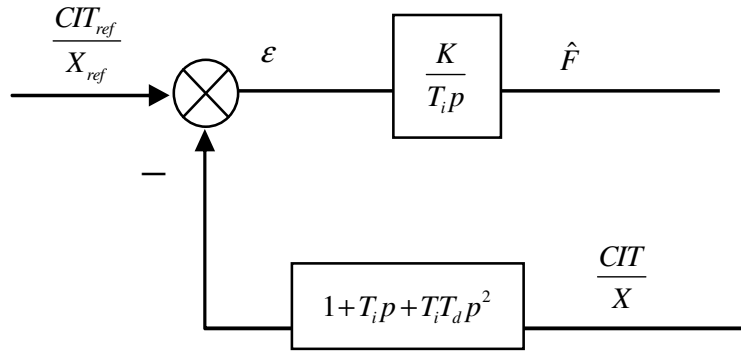


Figure 4.7 : Mise sous forme du régulateur *PID*.

Dans le but d'adoucir la réponse du système régulé à ce type de perturbation, la solution adoptée est celle de mettre le correcteur *PID* sous forme *RST* (Lequesne, 2006) (figure 4.7), où les actions dérivée et proportionnelle sont appliquées sur la mesure et non sur l'erreur. L'action dérivée peut être mise en place sous forme d'une action dérivée filtrée.

4.7.4. Remarque : Platitude

La sortie $y = CIT/X$ est une sortie plate (Baños *et al.*, 2001). Un système est dit plat si son comportement peut être complètement décrit par un ensemble de fonctions différentiellement indépendantes, dépendant des variables du système et de leurs dérivées. Ainsi, toute trajectoire du système peut s'obtenir à partir de cet ensemble de fonctions sans intégrer d'équations différentielles (Martin, 1992).

Schématiquement, on dira que le système décrit par les équations 4.22 est plat s'il est possible de trouver une application (équation 4.38) appelée *sortie plate*, dépendant de l'état x et d'un nombre fini de dérivées de la commande u et dont les composantes sont *différentiellement indépendantes* ; telle qu'on puisse exprimer x et u en fonction de y et d'un nombre fini de ses dérivées :

$$y = y(x, u, \dot{u}, \dots, u^{(p)}) \quad (4.38)$$

avec

$$x = x(y, \dot{y}, \dots, y^{(m)}) \quad (4.39)$$

$$u = u(y, \dot{y}, \dots, y^{(m)}) \quad (4.40)$$

Ce type de systèmes présente des propriétés intéressantes quant à la linéarisation, la stabilisation, la planification et le suivi de trajectoires, ce qui leur confère un rôle privilégié au plan des applications (Martin, 1992). Ainsi la sortie considérée est plate. Cette propriété n'est néanmoins pas exploitée dans ce travail.

4.8. Régulation par modèle Générique (*GMC*)

Le système considéré a fait l'objet d'une étude portant sur la régulation avec une commande de type *GMC* adaptative (Baquerisse, 1999). Dans cette section, le principe de cette commande est rappelé.

Cette stratégie de commande a été développée à la fin de la décennie 1980 (Lee and Sullivan, 1988). Elle consiste en l'élaboration d'une commande permettant de poursuivre une trajectoire de référence sur les dérivées des sorties à asservir, soit une trajectoire de référence de la forme $(dy/dt)_{ref}$.

L'application d'une commande *GMC* à la culture de microalgues a été proposée par Baquerisse (1999). La trajectoire de référence choisie pour la concentration en biomasse dans le régulateur *GMC* est de la forme :

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_{ref} = G_1(X_{ref} - X) + G_2 \int_0^t (X_{ref} - X)dt \quad (4.41)$$

Où X_{ref} est la consigne en biomasse, G_1 et G_2 sont des paramètres de réglage et $(dX/dt)_{ref}$ est la trajectoire de référence choisie sur la variation de la biomasse. On reconnaît dans cette forme une action proportionnelle et une action intégrale portant sur les erreurs de poursuite.

La commande par modèle générique permet d'imposer :

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_{ref} = \frac{dX}{dt} \quad (4.42)$$

Ainsi, pour le cas considéré et à partir des équations (4.3), (4.41) et (4.42), la commande *GMC* est donnée par :

$$F = -\frac{V}{X} \left[G_1 (X_{ref} - X) + G_2 \int_0^t (X_{ref} - X) dt - \mu X \right] \quad (4.43)$$

Les gains de réglage G_1 et G_2 sont donnés par :

$$\begin{cases} G_1 = 2\xi\omega_0 \\ G_2 = \omega_0^2 \end{cases} \quad (4.44)$$

où ξ et ω_0 sont respectivement l'amortissement et la pulsation propre de la réponse du système de second ordre équivalent au système en boucle fermée.

D'après (4.43), il est possible de constater que la structure de la commande *GMC* est équivalente à celle qu'on obtient en appliquant la stratégie de commande proposée au paragraphe 4.7, en considérant comme sortie $y = X$. En effet, en appliquant la relation (4.30) au système avec une sortie $y = X$, il vient :

$$F = -\frac{V}{X} [\hat{F} - \mu X] \quad (4.45)$$

Où \hat{F} est la commande issue du régulateur *PID*. La différence entre ces deux commandes réside dans le calcul des gains. Ils sont donnés par la relation (4.44) pour le cas de la *GMC* et ils sont déterminés par synthèse d'un *PID* dans le cas de la commande par retour d'état linéarisant. De plus, la commande linéarisante comporte un dispositif anti-windup non présent pour la commande *GMC*.

4.9. Commande prédictive non linéaire (CPNL)

La commande prédictive appartient à la famille de commandes avancées apparues récemment dans le domaine de l'Automatique. Elle cherche à répondre aux besoins des industriels en termes de performances élevées dans des systèmes industriels complexes.

Le principe de la commande prédictive consiste à créer pour le système asservi un effet anticipatif par rapport à une trajectoire à suivre connue à l'avance, en se basant sur la prédiction du comportement futur du système et en minimisant l'écart de ces prédictions à la trajectoire au sens d'une certaine fonction coût, tout en respectant des contraintes de fonctionnement (Boucher et Dumur, 1996).

La commande prédictive non-linéaire est appliquée aux systèmes non-linéaires sans linéarisation préalable. Elle repose sur la résolution d'un problème d'optimisation à chaque pas d'échantillonnage. L'optimisation consiste à minimiser une fonction coût sur un horizon de prédiction.

Le but de ce paragraphe est de considérer la mise en œuvre de la commande prédictive non-linéaire appliquée par Hafidi (2008) sur la croissance des *Escherischia coli*, sur la culture de *Porphyridium purpureum* dans un photobioréacteur.

4.9.1. Application à la culture de *Porphyridium purpureum*

Rappelons les équations du modèle : concentration en biomasse X et concentration en carbone inorganique total CIT :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F}{V} X \quad (4.46)$$

$$\frac{dCIT}{dt} = -\mu \frac{X}{Y_{X/CIT}} - \frac{F}{V} CIT + k_L a ([CO_2^*] - [CO_2]) \quad (4.47)$$

La structure du modèle ci-dessus rappelé peut s'écrire sous la forme suivante :

$$\begin{aligned} \dot{x} &= \mathcal{F}(x(t), F(t)) \\ X(t) &= \mathcal{H} x(t) \end{aligned} \quad (4.48)$$

où

$x = [X \ CIT]^T$ est le vecteur de variables d'état,

\mathcal{F} est une fonction non-linéaire incluant les équations (4.49) et (4.50),

$\mathcal{H} = [1 \ 0]$ est la matrice d'observation de la représentation d'état liant la grandeur de sortie à réguler (concentration en biomasse) au vecteur d'état.

L'objectif est de réguler la concentration de biomasse à une valeur de référence en forçant le débit d'alimentation F à suivre un profil d'alimentation de référence noté F_{ref} et défini par (similairement à la commande non-linéaire de la section 4.4) :

$$F_{ref} = \mu V \quad (4.49)$$

Le profil d'alimentation de référence F_{ref} est déduit de l'équation 4.46 et est obtenu en considérant que la valeur X_{ref} est constante, donc la dérivée dX/dt est nulle.

Pour la mise en œuvre de la commande prédictive il est aussi nécessaire de disposer d'un modèle pour la prédiction qui est obtenu à partir du modèle (4.48), par discrétisation à une période d'échantillonnage T_e . Le modèle discret est de la forme suivante :

$$\begin{aligned} x(k+1) &= \mathcal{F}_{dis}(x(k), F(k)) \\ X(k) &= \mathcal{H} x(k) \end{aligned} \quad (4.50)$$

4.9.2. Problème d'optimisation

L'objectif étant de suivre une valeur de concentration de biomasse spécifiée ainsi qu'un profil de commande de référence, on s'oriente donc vers un bouclage sur la sortie X plutôt que sur l'état tout entier, et l'on n'introduira pas de coût terminal ni de contraintes terminales. La fonction coût quadratique J est de la forme suivante :

$$J = \min_{\chi} \sum_{j=1}^N \left(X_{ref_{k+j}} - \tilde{X}_{k+j} \right)^2 + \lambda \sum_{j=1}^N \left(F_{ref_{k+j-1}} - F_{k+j-1} \right)^2 \quad (4.51)$$

où \tilde{X} représente la prédiction de la concentration en biomasse obtenue grâce au modèle (4.50), λ est un facteur de pondération sur la commande et N est l'horizon de prédiction qui est égal à l'horizon sur la commande et sur la sortie ($N = N_u = N_y$).

En considérant le critère ci-dessus mentionné et la théorie de la commande prédictive non-linéaire (Mayne *et al.*, 2000), le problème d'optimisation sous contraintes prend la forme suivante :

$$\min_{\chi} \sum_{j=1}^N \left(X_{ref_{k+j}} - \tilde{X}_{k+j} \right)^2 + \lambda \sum_{j=1}^N \left(F_{k+j-1} - F_{ref_{k+j-1}} \right)^2$$

sous les contraintes

$$\begin{cases} \tilde{X}_{mod_{k+1}} = \mathcal{H} \mathcal{F}_{dis}(\hat{x}_{mod_k}, F_k) \\ \vdots \\ \tilde{X}_{mod_{k+N}} = \mathcal{H} \mathcal{F}_{dis}(\hat{x}_{mod_{k+N-1}}, F_{k+N-1}) \\ F_k \geq 0, \quad \forall k \in N \\ x_k \geq 0, \quad \forall k \in N \\ \text{avec } \mathcal{H} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \end{bmatrix} \end{cases} \quad (4.52)$$

où $\chi = \{\tilde{X}_{k+1}, \dots, \tilde{X}_{k+N}, F_k, \dots, F_{k+N-1}\}$ est le vecteur d'optimisation, \tilde{X} est la concentration en biomasse estimée (en utilisant le filtre de Kalman étendu), X_{ref} est celle de référence et \tilde{X}_{mod} est la concentration en biomasse prédite par le modèle.

4.9.3. Prise en compte des erreurs du modèle

Sachant que la loi de commande déduite du problème d'optimisation n'inclut pas de loi d'action intégrale et pour prendre en compte toute désadaptation entre le modèle mathématique et le système réel (évolution différente des variables d'état), nous avons modifié la structure élaborée en nous appuyant sur l'approche *DMC* (Dynamic Matrix Control) développée par (Cutler et Ramaker, 1980) et sur le formalisme de Différence Objet-Modèle (*DOM*) proposé par (Richalet *et al.*, 1987).

La différence $\varepsilon_{s/m}$ entre la sortie du système X et celle du modèle X_{mod} restera constante sur l'horizon de prédiction. La sortie prédite du système \tilde{X} et la sortie prédite du modèle \tilde{X}_{mod} sont liées par l'équation suivante qui fait intervenir l'accumulation de l'erreur après les j intervalles de prédiction (Hafidi, 2008 ; Becerra-Celis *et al.* 2008):

$$\tilde{X}_{k+j} = \tilde{X}_{mod_{k+j}} + j \underbrace{(X_k - X_{mod_k})}_{\varepsilon_{s/m}(k)}, \quad j = \overline{1, N} \quad (4.53)$$

A chaque pas d'échantillonnage, une séquence optimale $\chi_{opt} = \{\tilde{X}_{opt_{k+1}}, \dots, \tilde{X}_{opt_{k+N}}, F_{opt_k}, \dots, F_{opt_{k+N-1}}\}$ au sens de la fonction coût quadratique J (équation 4.51) est obtenue comme solution du problème d'optimisation

(équation 4.52). De cette séquence, seule la première commande F_{opt_k} est utilisée comme entrée du système à l'instant k . Tous les autres éléments peuvent être oubliés car, à la période d'échantillonnage suivante, une nouvelle sortie est estimée et la procédure complète est répétée selon le principe de l'horizon fuyant.

La structure de commande proposée est montrée sur le schéma ci-dessous :

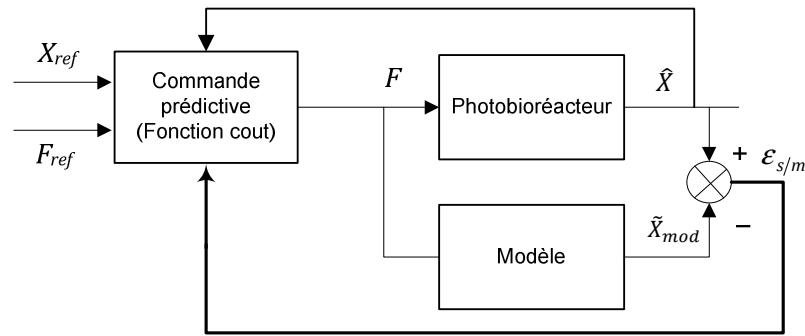


Figure 4.8 : Principe de la commande prédictive non-linéaire avec $\varepsilon_{s/m}$.

4.9.4. Résolution du problème d'optimisation : approche séquentielle CVP

La discrétisation du système (4.48) pour obtenir (4.50) et la présence de contraintes non-linéaires sont deux difficultés à contourner. En effet, la période d'échantillonnage doit être suffisamment faible pour que le modèle discret reste pertinent par rapport au modèle continu. Le temps de réponse de notre système, qui est de l'ordre de plusieurs heures, peut conduire à une augmentation du nombre de variables de décision du problème d'optimisation. D'autre part, la présence de contraintes non-linéaires est à l'origine d'une augmentation considérable du temps de calcul de la boucle en temps réel lors de la résolution du problème d'optimisation.

Pour contourner ces obstacles, il est possible de transformer le problème d'optimisation (4.52) en un problème de programmation non-linéaire (PNL) qui sera résolu en utilisant l'approche séquentielle CVP (*Control Vector Parameterization*) développée par Vassiliadis (1993) qui est utilisée pour les procédés chimiques et biochimiques (Schelgel *et al.*, 2006 ; Balsa-Canto *et al.*, 2001)

L'utilisation de l'approche CVP implique la seule discrétisation des variables de commande $F(t)$ sur l'horizon de prédiction en choisissant une période d'échantillonnage

nécessaire au critère prédictif et une séquence de commande approchée par une fonction constante par morceaux. Il n'est donc plus nécessaire de discrétiser le modèle continu (4.48) puisque les états prédits sont obtenus par simple intégration. Le choix d'une période d'échantillonnage beaucoup plus grande que lors d'une discrétisation classique est alors possible.

En utilisant cette approche et avec le changement de variable suivant :

$$F = \exp(v) \quad (4.54)$$

La formulation du problème d'optimisation de la CPNL devient un problème de minimisation non contraint ce qui facilitera son implémentation en temps réel :

$$\min \sum_{j=1}^N \left(X_{ref_{k+j}} - \tilde{X}_{k+j} \right)^2 + \lambda \sum_{j=1}^N \left(\exp(v_{k+j-1}) - F_{ref_{k+j-1}} \right)^2 \quad (4.55)$$

où $\chi' = \{v_k, v_{k+1}, \dots, v_{k+N-1}\}$ est le vecteur d'optimisation final.

Lors des simulations proposées dans les pages suivantes, la détermination de la séquence de commande optimale se fait en utilisant la fonction « *lsqnonlin* » de *Matlab*TM. Cette fonction permet de résoudre les problèmes de moindres carrés non-linéaires en utilisant la méthode de *Gauss-Newton*.

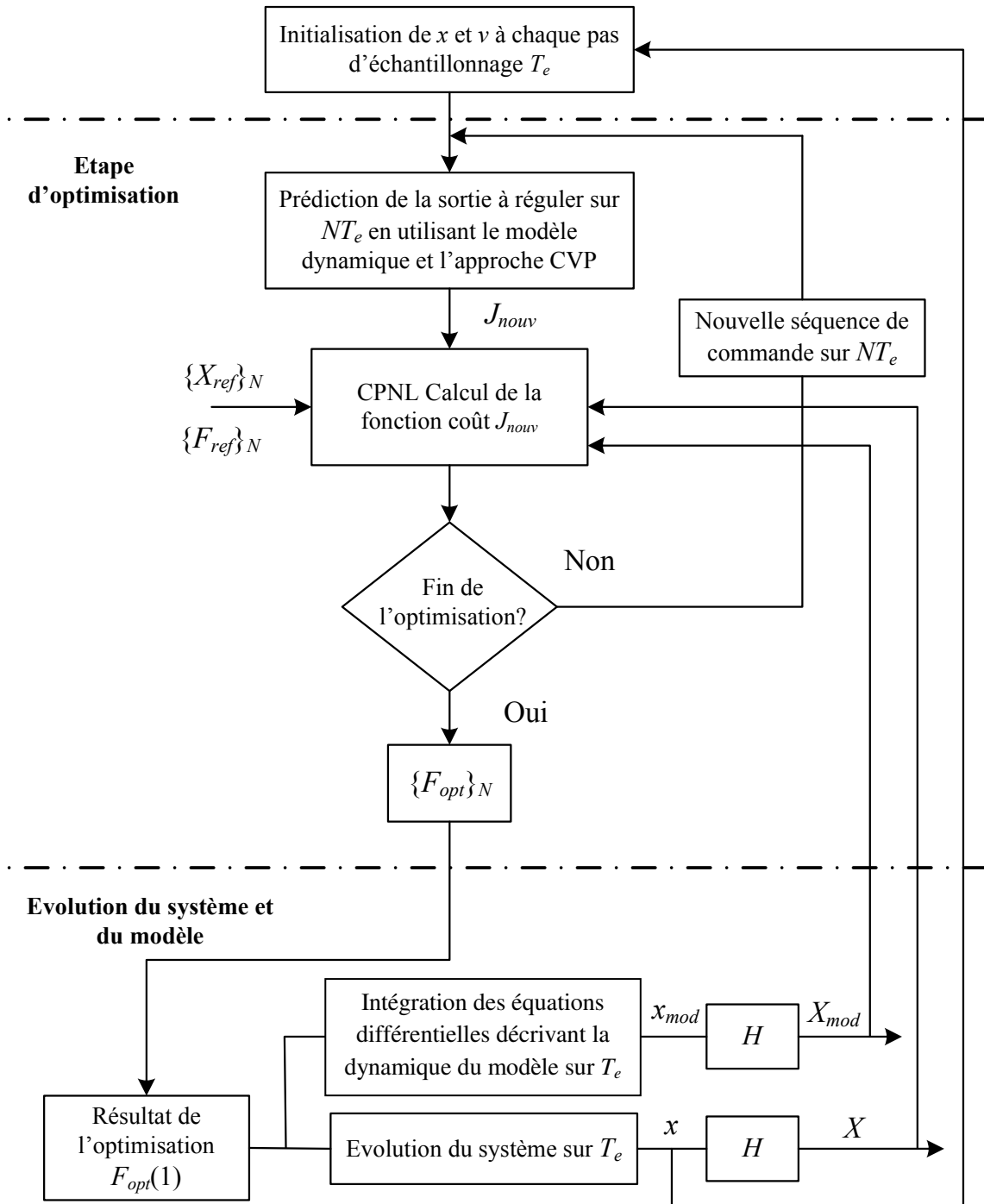


Figure 4.9 : Structure globale proposée : CPNL et CVP

4.10. Validation par simulation

Dans ce paragraphe quelques résultats de simulation de la culture de microalgues sont présentés. Les commandes décrites précédemment ont été mises en œuvre sous l'environnement *MatlabTM*. Rappelons que l'objectif de commande est de réguler la concentration en biomasse X à une valeur de référence X_{ref} .

Les sept méthodes de régulation proposées dans les pages précédentes ont été considérées : la commande non linéaire, la commande linéaire, un *PID* réglé par Ziegler-Nichols, la commande par modèle générique (*GMC*), la commande linéarisante dans les deux cas de sortie ($y = X$ et $y = CIT/X$) et la commande prédictive non-linéaire (CPNL).

Les paramètres du modèle utilisés pour la simulation ont été calculés précédemment et présentés dans le chapitre II (cf. §2.6.6). Les tests en simulation sont effectués en considérant un modèle désadapté, c'est-à-dire, avec une modification des paramètres du modèle. Les commandes linéaire et *GMC* sont néanmoins calculées à partir du modèle nominal. Pour la commande linéarisante, le régulateur *PID* de la boucle externe est dans un premier temps implémenté sous forme classique (sur l'erreur).

Pour la CPNL, la désadaptation des paramètres du modèle considérée est de 30% ce qui permettra de tester la robustesse de la loi de commande. Le période d'échantillonnage T_e choisie est égale à 5 minutes. Le facteur de pondération sur la commande est $\lambda = 0,1$ et l'horizon de prédiction est $N = 5$.

Pour la commande *GMC*, les paramètres du régulateur sont obtenus à partir du couple $(\xi, \omega_0) = (0,7, 3 \text{ rad/h})$.

La figure 4.10 donne la réponse du système régulé pour un échelon de consigne en biomasse (passage de 10 à $11 \cdot 10^9$ cellules/l à $t = 0$).

L'ensemble des commandes conduisent au même comportement : le système est placé en mode batch ($F = 0$) pour laisser la microalgue croître selon sa dynamique naturelle. A partir d'un certain seuil, la commande devient non nulle pour ramener et maintenir la concentration en biomasse à sa valeur consigne.

On peut noter que la commande prédictive non linéaire (CPNL) permet d'obtenir une réponse temporelle de meilleure qualité (plus rapide et avec moins de dépassement), en comparaison avec les autres régulateurs. En effet, la valeur de référence est atteinte avec précision (moins de 0,1%) et sans dépassement. La CPNL semble être très robuste vis-à-vis de la désadaptation du modèle et cela, grâce à l'incorporation du terme $\varepsilon_{s/m}$ qui prend en compte la différence entre la sortie du système X et celle du modèle X_{mod} .

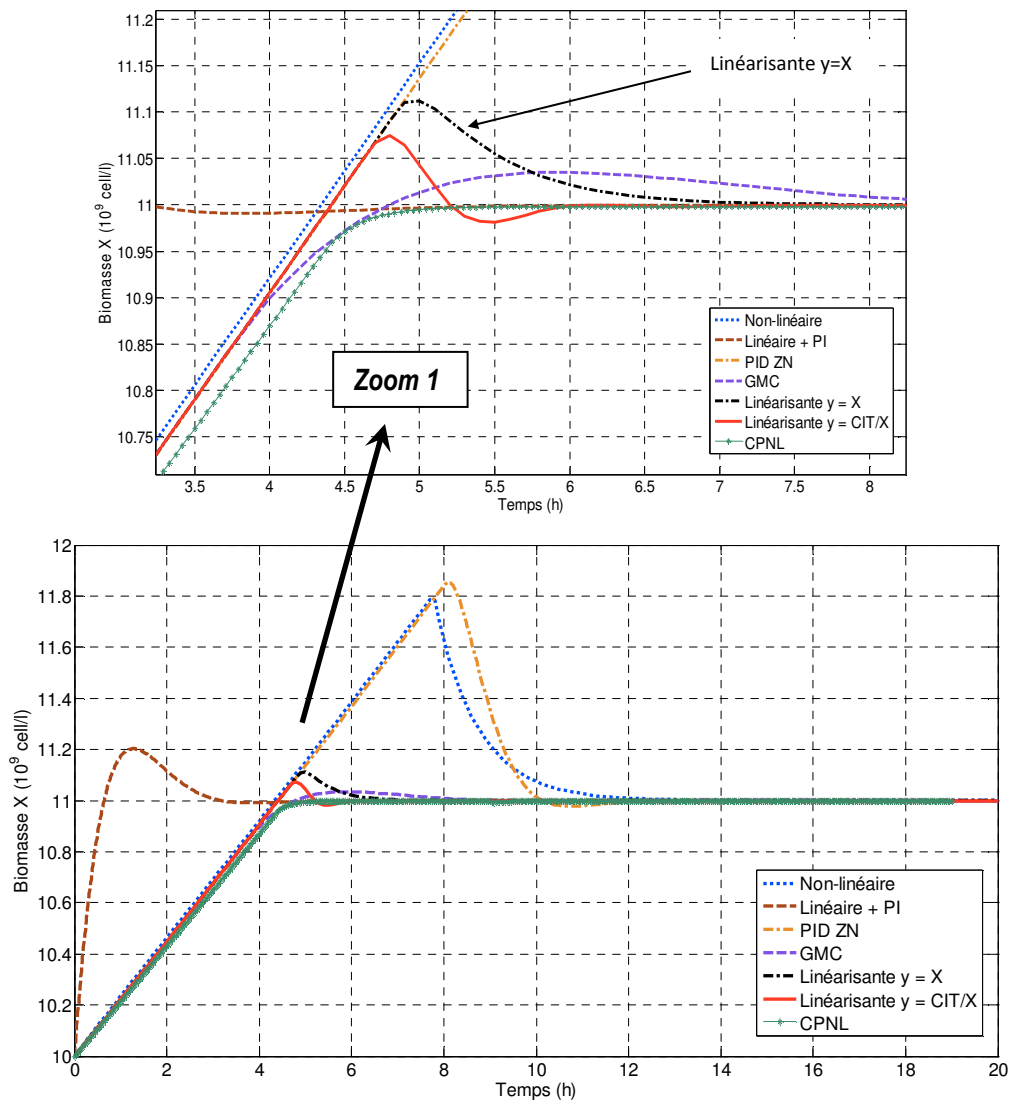


Figure 4.10 : Evolution de la concentration cellulaire pour un échelon sur la consigne (passage de 10 à 11. 10^9 cellules/l à $t = 0$) avec un zoom.

La commande linéarisante permet, dans ses deux versions, d'obtenir une réponse rapide avec un dépassement plus important en comparaison avec la CPNL et le régulateur *GMC*. Par rapport aux régulateurs *PID* et non-linéaire le dépassement obtenu est moins important. Ceci s'explique en partie par l'ajout d'une compensation de windup. En effet, comme illustré par la figure 4.11, la durée de la saturation de la commande est plus grande dans les cas des commandes non-linéaire et *PID*. De plus, les débits d'alimentation sont plus importants dans ce dernier cas.

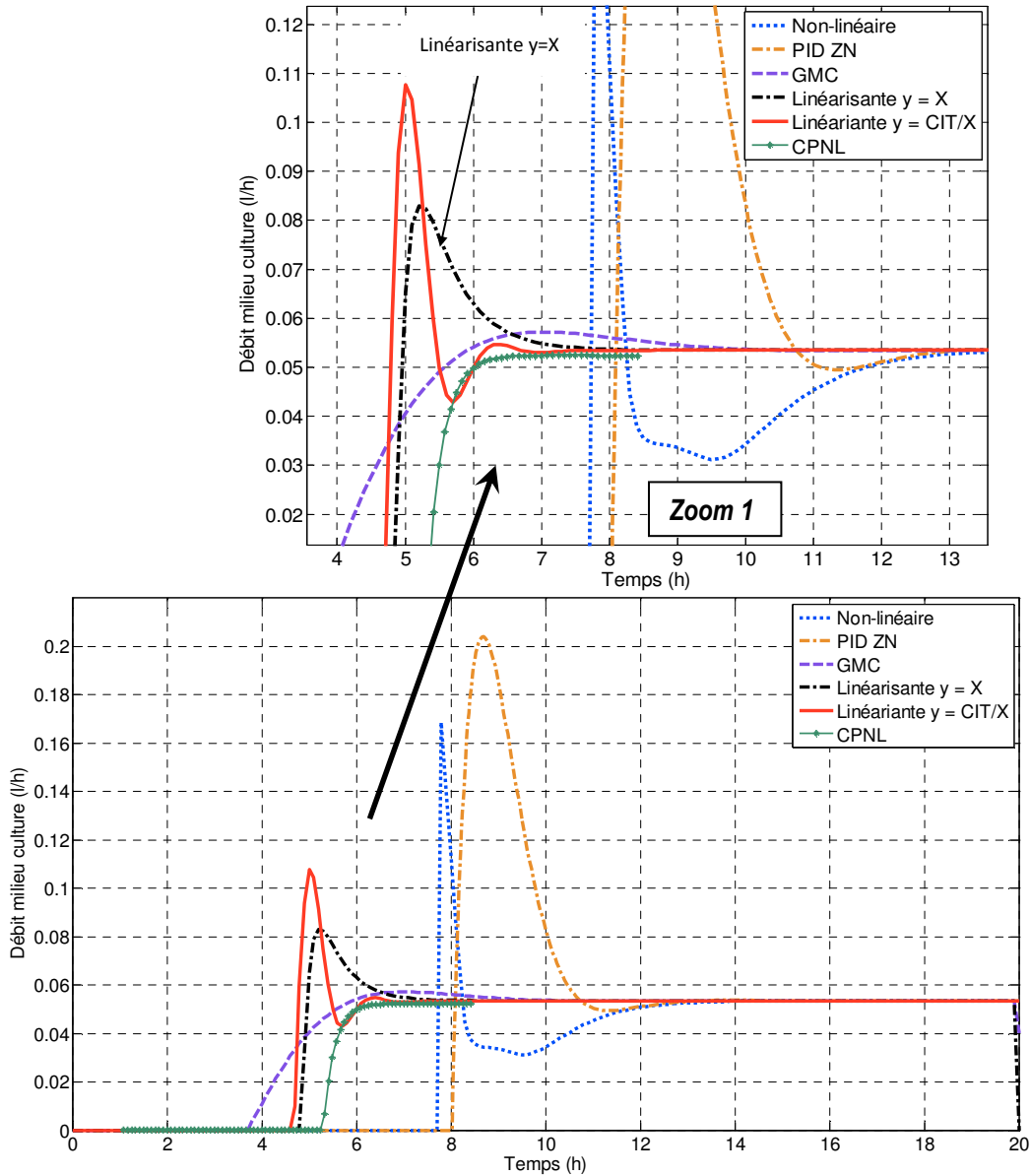


Figure 4.11 : Evolution des débits d'alimentation dans le photobioréacteur pour un échelon sur la consigne (passage de 10 à $11 \cdot 10^9$ cellules/l à $t = 0$) avec un zoom.

La réponse du régulateur *GMC* n'est pas mauvaise mais lente. La valeur de référence X_{ref} est atteinte au bout de 10 heures environ au lieu de 7 heures pour la commande linéarisante et 5 heures pour la CPNL.

La commande linéaire présente une réponse rapide (environ 3 heures) avec un dépassement de 20%. Cette rapidité vient du fait que le débit d'alimentation du milieu de culture est négatif (figure 4.12). Dans le système réel, cela signifie qu'il faudra soutirer du milieu de culture qui contient les microalgues. En toute logique, cela semble difficile à réaliser. Si l'on ajoute une saturation dans le régulateur, la consigne ne sera jamais atteinte.

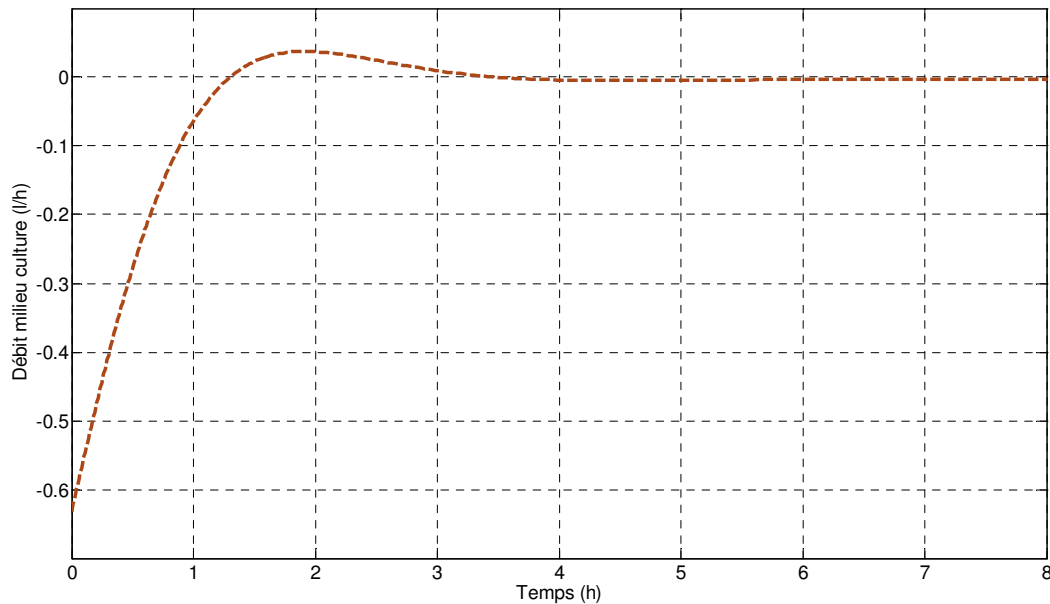


Figure 4.12 : Evolution du débit d'alimentation dans le photobioréacteur pour un échelon sur la consigne (passage de 10 à $11 \cdot 10^9$ cellules/l à $t = 0$) obtenu avec la commande linéaire.

Dans la figure 4.13 nous pouvons apprécier l'utilité de la mise en œuvre d'un régulateur *PID* avec un terme d'anti-windup sur la commande linéarisante $y = CIT/X$. Le terme d'anti-windup est plus facile à implémenter sur cette sortie que sur la sortie classique $y = X$. La réponse du système est nettement améliorée (moins de dépassement et temps de réponse plus court).

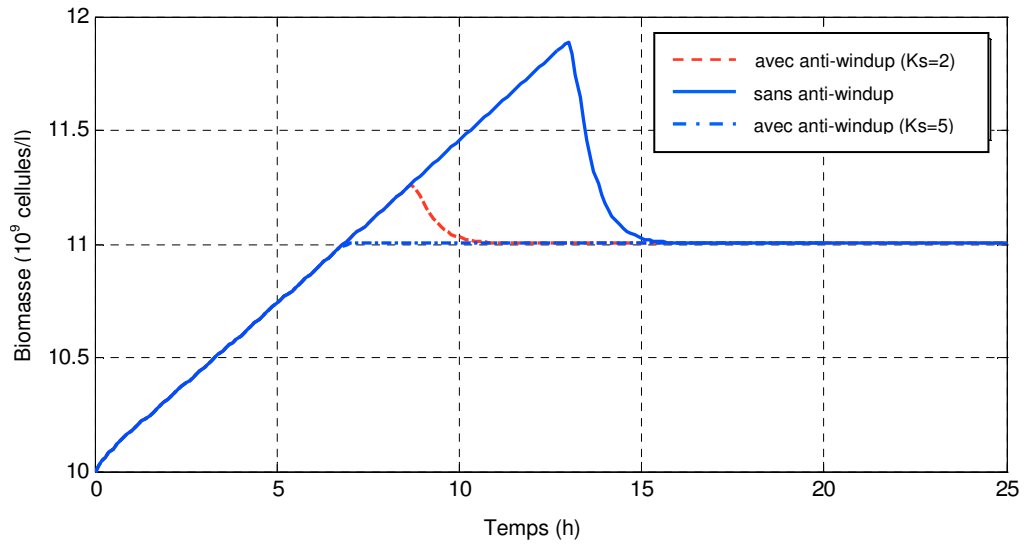


Figure 4.13 : Comparaison des performances du régulateur linéarisant $y = X$ avec un terme de anti-windup (ligne pointillée) et sans anti-windup (ligne entière).

Dans un deuxième temps, nous avons effectué des tests en simulation pour connaître la réponse du système régulé pour un échelon descendant de consigne (passage de 10 à $9 \cdot 10^9$ cellules/l à $t = 5$ h). Les résultats sont montrés dans la figure 4.14.

On peut noter que la CPNL est la plus performante. Elle permet d'obtenir une réponse de meilleure qualité (plus rapide et avec moins de dépassement) en comparaison avec les autres régulateurs. Il faudra une heure pour que le système converge vers la valeur désirée X_{ref} . Parmi les autres régulateurs proposés, nous notons que le régulateur non-linéaire et la commande linéarisante sur $y = X$ sont aussi performants mais leur temps de réponse est plus long (3h environ). La commande linéarisante $y = CIT/X$ ne donne pas de bons résultats dans le cas présenté. Le dépassement obtenu avec ce régulateur est d'environ 95% et le temps de réponse avoisine les 6 heures. Le régulateur *GMC* réagit dans le même ordre de délai avec un dépassement moins important.

Le régulateur linéaire proposé présente une performance moyenne. Son comportement est similaire à celui d'un simple *PID*. Il lui faudra 5 heures pour converger vers la valeur désirée.

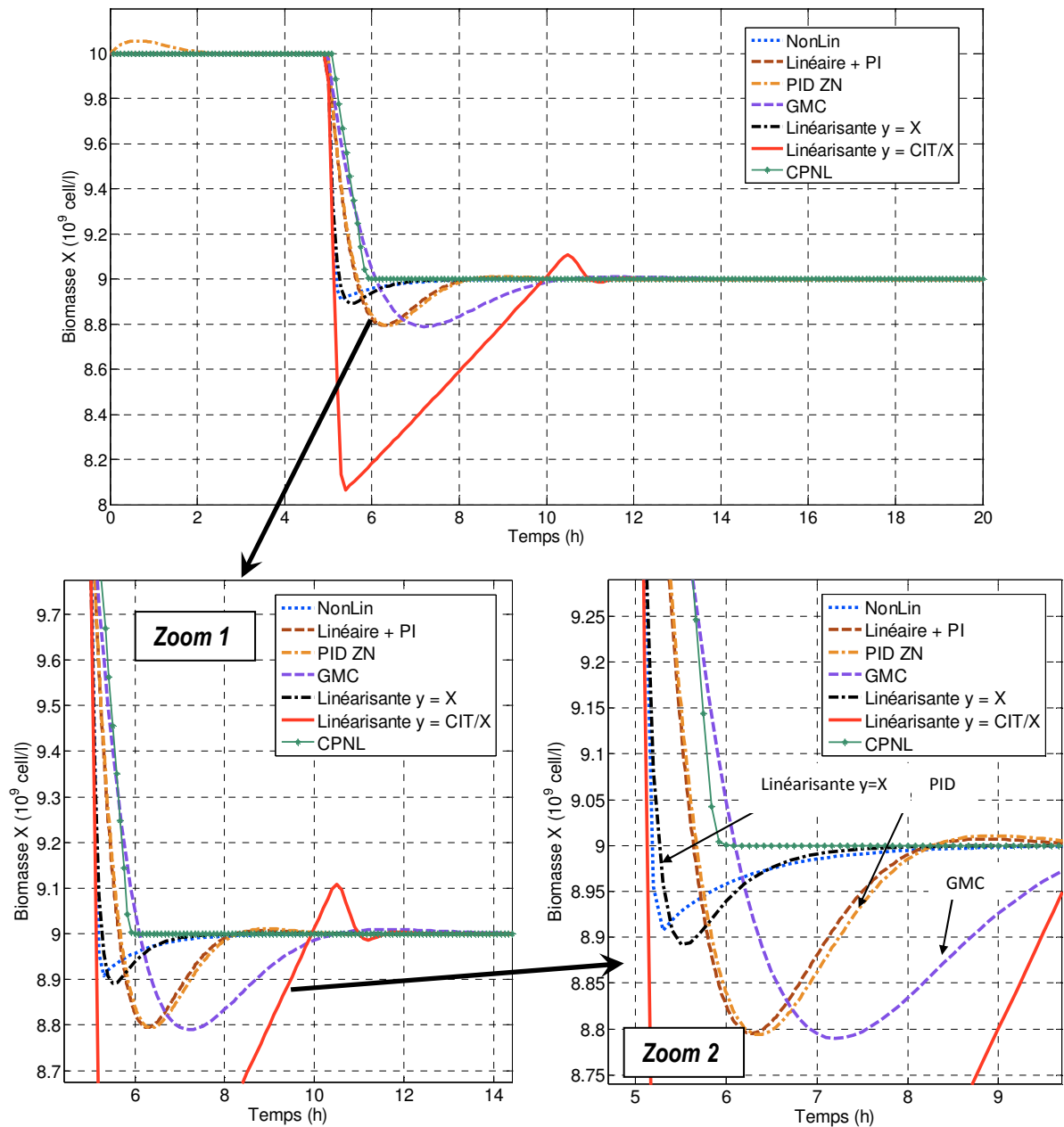


Figure 4.14 : Evolution de la concentration cellulaire pour un échelon sur la consigne (passage de 10 à $9 \cdot 10^9$ cellules/l à $t = 5$ h) avec deux zoom.

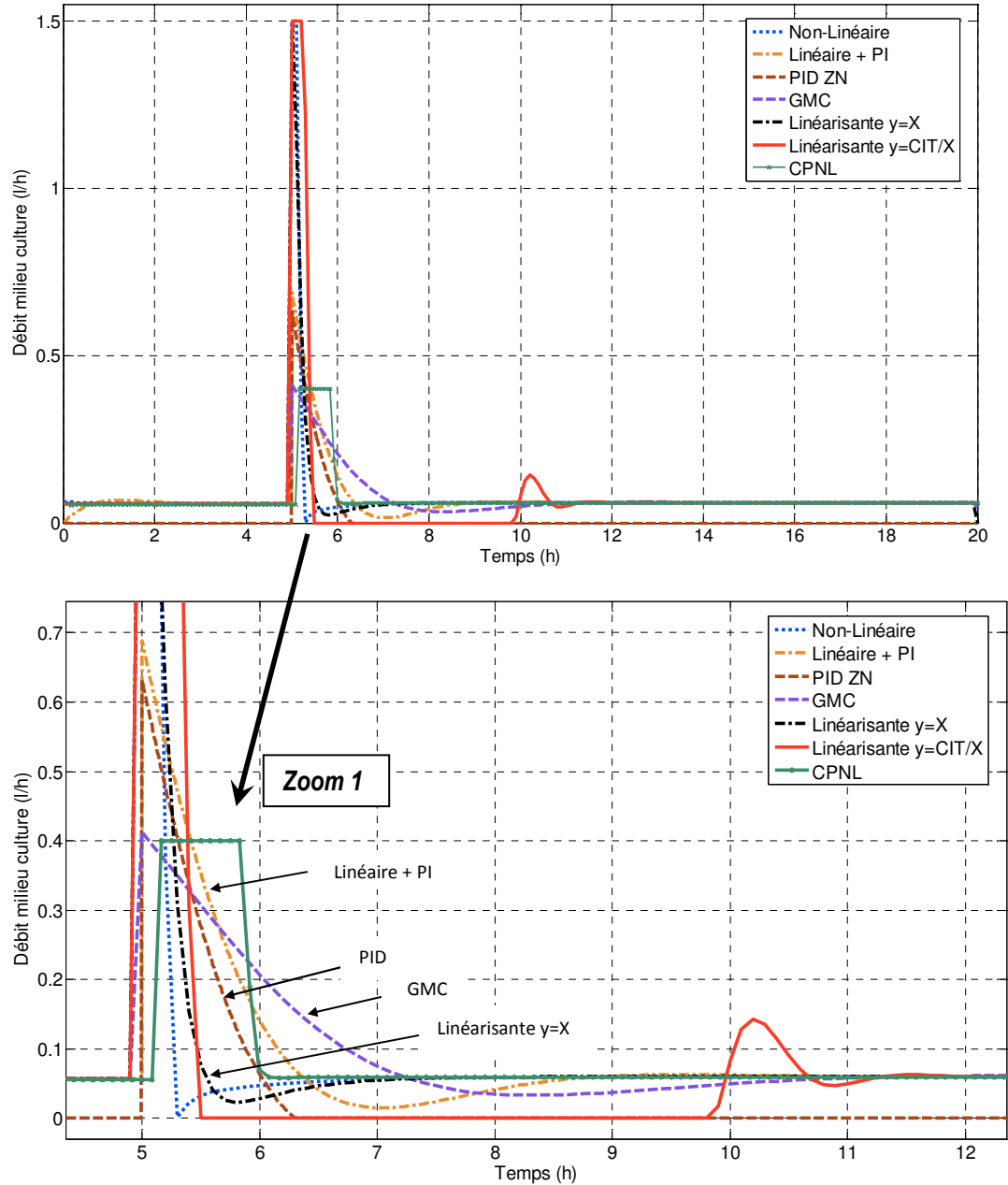


Figure 4.15 : Evolution des débits d'alimentation dans le photobioréacteur pour un échelon sur la consigne (passage de 10 à $9 \cdot 10^9$ cellules/l à $t = 5h$).

Les performances des régulateurs (non-linéaire, *GMC*, CPNL et la commande linéarisante $y = X$) en présence de perturbations sont étudiées dans le cas de variation de l'intensité lumineuse incidente (de $1,2$ à $0,8 \mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, appliqué à l'instant $t = 15h$), celui de la variation de la pression partielle en CO_2 ($0,0112$ à $0,0118$ atm, appliqué à l'instant $t = 25h$) et celui de la variation du pH ($7,4$ à 7 à $t = 45h$).

Le régulateur par linéarisation par retour d'état avec $y = X$ est très performant (figure 4.16). En effet, les perturbations ne dévient pas la consigne. Le régulateur non-linéaire rejette les trois perturbations au bout de 5 heures avec un dépassement relativement faible. Malgré la désadaptation du modèle de 30%, la CPNL apparaît comme un régulateur très performant et robuste vis-à-vis des perturbations. Le dépassement est inférieur à ceux des autres régulateurs (sauf pour la commande linéarisante $y = X$) et le temps de réponse est très court.

Le régulateur obtenu par linéarisation par retour d'état avec $y = CIT/X$ rejette les perturbations au bout de 6 heures approximativement, mais avec un dépassement plus important (figure 4.17). De plus cette régulation s'avère plus sensible aux erreurs sur le modèle, puisque la consigne est le rapport entre les concentrations en CIT et en biomasse X . De ce fait, une erreur de modèle induit une erreur sur cette consigne. Pour remédier à cet inconvénient, une structure du régulateur PID de la boucle externe est modifiée en une structure RST où les actions proportionnelle et dérivée sont appliquées sur la mesure et non plus sur l'erreur. En effet, une perturbation en intensité lumineuse, une variation dans la quantité de dioxyde de carbone injecté (traduite en pression partielle) ou une variation de pH se traduit par un changement de consigne dans le cas d'une sortie $y = CIT/X$. Cette structure permet aussi de limiter les variations dues à l'apparition de ces perturbations ainsi que d'obtenir des variations plus modérées. Sur la figure 4.18, nous montrons les profils de la concentration cellulaire pour un changement de consigne (passage de 10 à 11.10^9 cellules/h) et avec des perturbations (de 1,2 à 0,8 $\mu E.m^{-2}s^{-1}$, appliqué à l'instant $t = 20h$) et celui de la variation de la pression partielle en CO_2 (0,0112 à 0,0118 atm, appliqué à l'instant $t = 40h$). Nous pouvons comparer ces résultats à ceux obtenus dans les figures 4.10 et 4.17. Les performances obtenues avec le PID sous forme de structure RST sont nettement améliorées.

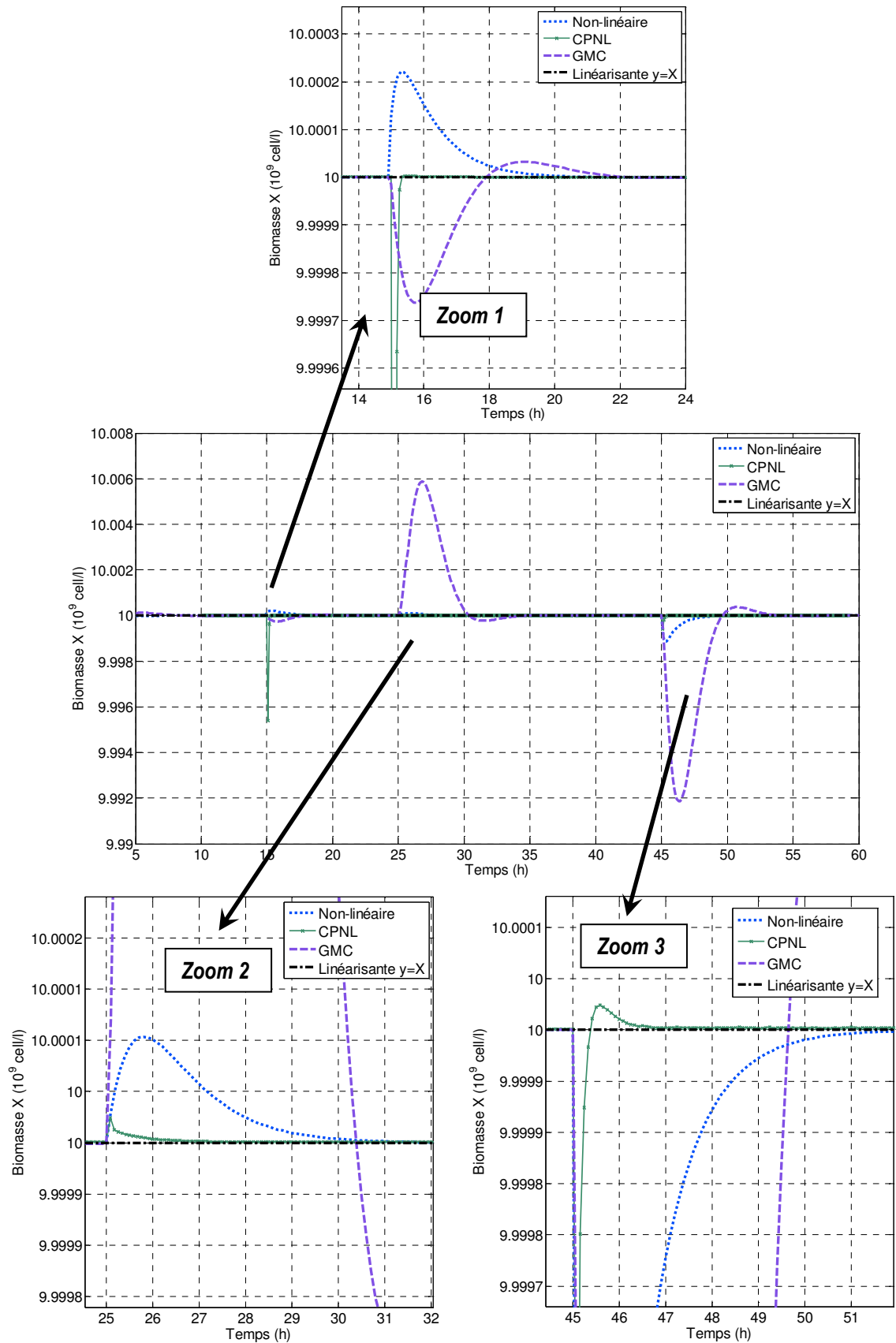


Figure 4.16 : Profil de la concentration cellulaire avec des perturbations pour les régulateurs non-linéaire, *GMC*, commande linéarisante $y = X$ et CPNL (avec trois zoom).

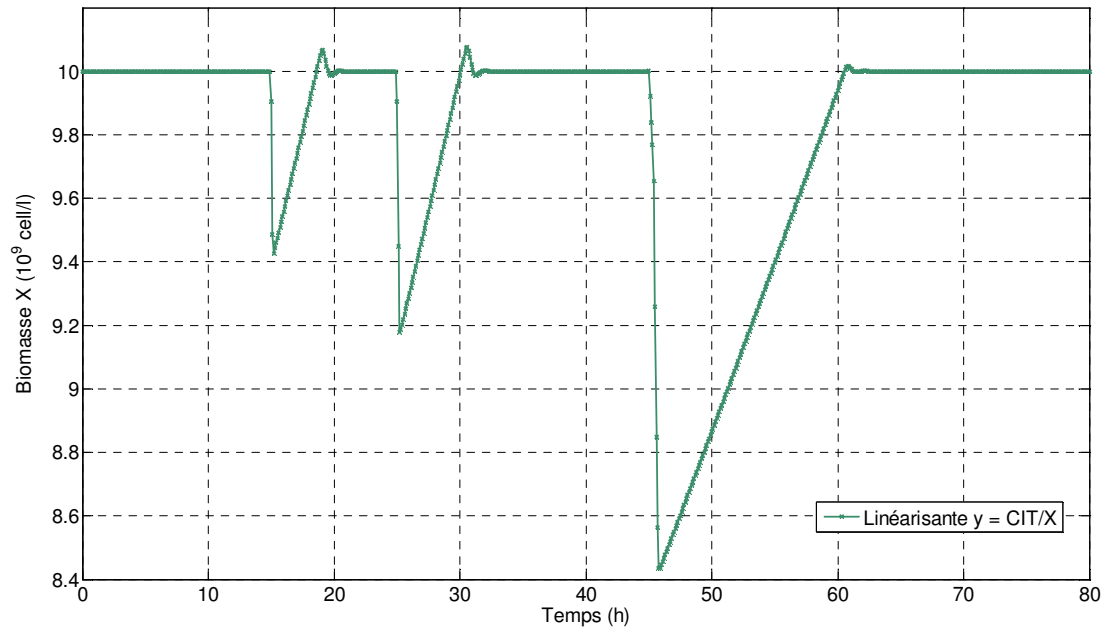


Figure 4.17 : Profil de la concentration cellulaire avec des perturbations pour la commande linéarisante $y = CIT/X$.

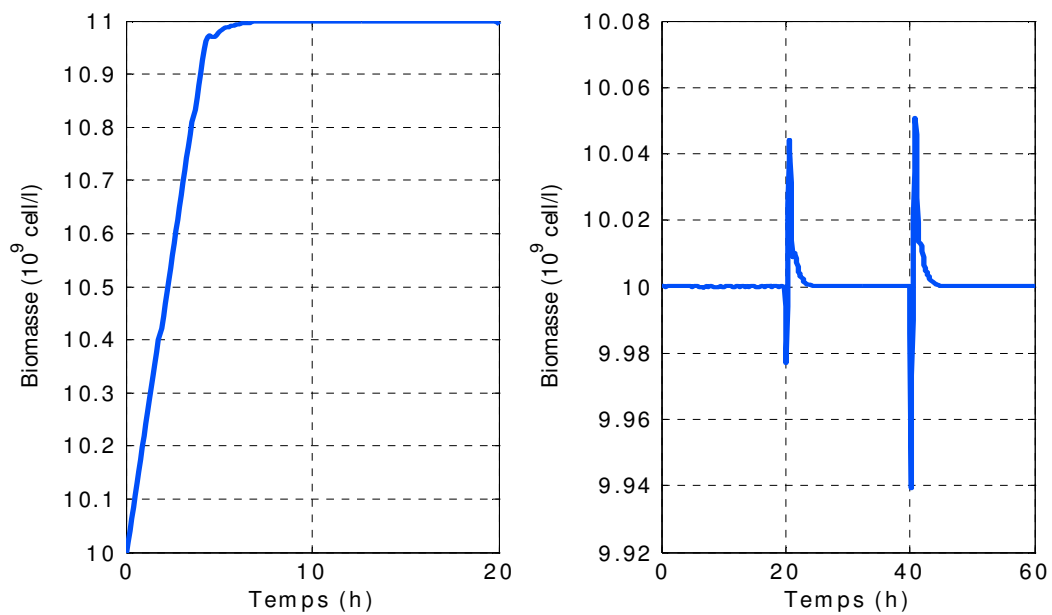


Figure 4.18 : Profil de la concentration en biomasse pour un changement de consigne (à gauche) et avec des perturbations (à droite), pour le régulateur linéarisant $y = CIT/X$ avec un PID avec actions proportionnelle et dérivée sur la mesure.

4.11. Conclusion

Ce chapitre propose plusieurs démarches pour la commande de la culture de microalgues dans un photobioréacteur continu : commande non-linéaire et linéaire, régulation par *PID*, commande par modèle générique GMC, commande linéarisante par retour d'état et commande prédictive non-linéaire CPNL. Nous retenons deux stratégies proposées : linéarisante par retour d'état et CPNL.

Ces commandes ont été appliquées en simulation à un modèle du photobioréacteur qui a été identifié par des campagnes expérimentales. Or, la commande linéarisante par retour d'état et la CPNL utilisent le modèle du système. Aussi, un modèle désadapté a été considéré pour tester l'efficacité des commandes et notamment leur robustesse vis-à-vis d'une erreur de modélisation. Les résultats numériques montrent l'efficacité des structures de commande proposées, en comparaison à d'autres approches développées.

Les études en simulation nous permettent de voir que la CPNL est la structure qui conduit à de meilleurs résultats en suivi de consigne. Elle présente de très bonnes performances dans le cas d'une désadaptation du modèle et en présence de perturbations dans le système. Ces très bonnes performances se traduisent en termes de robustesse, de convergence rapide et de dépassement faible. Cette structure inclut une trajectoire de référence pour le débit d'alimentation en milieu de culture et aussi, une évaluation de la différence entre le système et les sorties du modèle pendant la prédiction. L'optimisation du procédé est réalisée grâce à l'approche CVP qui permet de réduire le temps de calcul. Cette approche nécessite néanmoins un temps de développement et de mise en œuvre plus important que les autres méthodes présentées.

La deuxième stratégie proposée et retenue, comporte un algorithme de commande composé d'une linéarisation par retour d'état dans la boucle interne et d'un *PID* en boucle externe qui assure la stabilité du système et permet d'éliminer les erreurs statiques et de rejeter les perturbations. Cette technique très efficace, a été appliquée pour deux cas de figure : le cas où la sortie mesurée est la concentration en biomasse, et le cas où cette sortie est $y = CIT/X$. Cette deuxième sortie représente la quantité de carbone inorganique total disponible par cellule et est une sortie plate du système. La bonne performance de cette technique s'explique par la démarche constructive (régulation en cascade), et par la

diminution du phénomène de windup dû à la saturation. De plus, la mise sous forme *RST* du régulateur *PID* de la boucle externe permet d'avoir de meilleures performances.

En perspective, ces commandes seront implémentées sur le photobioréacteur instrumenté présenté dans le chapitre V, afin de valider ses performances, et d'étudier sa robustesse vis-à-vis des incertitudes sur le modèle et des erreurs d'estimation des états non mesurés.

Chapitre V

Table de matières

5.1.	Introduction	163
5.2.	Nouveau dispositif expérimental : photobioréacteur de 9,6 l.	164
5.3.	Préparation du photobioréacteur	170
5.3.1.	Mesure expérimentale du temps de mélange	171
5.3.2.	Détermination du $k_L aO_2$ et calcul du $k_L aCO_2$	174
5.4.	Précultures et premiers essais	176
5.5.	Résultats expérimentaux	180
5.5.1.	Filtre de Kalman étendu	181
5.5.2.	Lois de commande	188
5.6.	Conclusion	195

Validation expérimentale

5.1. Introduction

La problématique rencontrée dans les procédés de culture de microalgues est similaire à celle rencontrée dans la plupart de procédés industriels. Le manque de systèmes de commande et de surveillance est un obstacle à franchir avant d'industrialiser ce type de procédés. Un photobioréacteur classique est équipé d'une sonde de température, d'une sonde de pH et d'une sonde d'oxygène dissous. Ces capteurs fournissent très peu d'information concernant le métabolisme cellulaire.

La mesure en ligne des variables essentielles du procédé, telle la concentration cellulaire, est difficile. C'est cela qui nous a motivé à proposer un capteur logiciel (cf. Chap. III) capable d'estimer la concentration en biomasse de *Porphyridium purpureum* dans un photobioréacteur, à partir de la mesure de la concentration en carbone inorganique total. Cet estimateur d'état sera validé expérimentalement. A partir de la valeur estimée de la biomasse microalgale et des mesures réalisées en ligne, les lois de commande proposées (cf. Chap. IV) seront validées dans un photobioréacteur de laboratoire qui sera décrit dans ce chapitre.

Dans un premier temps nous allons présenter le dispositif expérimental conçu pour la validation. Ensuite, nous aborderons la préparation et la mise en route du photobioréacteur. Finalement, nous présenterons la validation en ligne, grâce aux essais

réalisés, des algorithmes proposés (commande linéarisante $y = X$ et commande *GMC*) dans ce travail de thèse.

5.2. Nouveau dispositif expérimental : photobioréacteur de 9,6 l.

Porphyridium purpureum sera cultivé en milieu Hemerick (1973) dans un photobioréacteur de 9,6 litres (volume utile) de type colonne à bulles, similaire à ceux de 2,5 litres utilisés dans le Chapitre II pour valider le modèle mathématique. Le photobioréacteur peut fonctionner en mode semi-continu et en mode continu.

Le corps du réacteur est construit en verre avec un rapport surface/volume égal à $32,24 \text{ m}^2/\text{m}^3$. La géométrie du réacteur est constituée à sa base d'un cylindre d'injection du mélange gazeux. Ce mélange gazeux est introduit par un verre fritté dans un cylindre sur lequel est prise la recirculation de la culture. Il est suivi par une forme conique qui permet d'augmenter le diamètre jusqu'au cylindre principal de 0,4 m de hauteur et de 0,17 m de diamètre intérieur. Le cône et le cylindre supérieures sont inclus dans une double enveloppe qui permet de maintenir la température à une valeur constante grâce à la circulation d'eau distillée thermostatée (cf. figure 5.2).

A sa partie supérieure, des rodages sont prévus pour supporter les sondes CO_2 (YSI 8500) et pH, la boucle de recirculation, l'alimentation en milieu de culture et l'entrée des solutions acide et base pour la régulation du pH. D'autre part, il supporte le dégagement gazeux équipé d'un filtre Millipore $0,2 \mu\text{m}$ qui permet d'assurer la stérilité du réacteur en cas de dépression. .

Un système d'aération par bullage assure l'apport de la source carbonée et l'agitation de la culture. Un mélange air/ CO_2 contenant 2% de CO_2 est injecté de façon continue dans le photobioréacteur avec un débit de 2,5 VVH (volume de gaz par volume de culture par heure). Ce mélange gazeux injecté par la partie inférieure de la cuve, est fractionné en utilisant un raccord contenant une pastille de verre fritté. Les débits gazeux d'entrée sont mesurés et régulés par deux débitmètres massiques avec vanne de régulation intégrée (Vögtlin Instruments, Red-y Smart Series). Leur précision est donnée par le constructeur pour être de 0,5 %.

Quatre tubes fluorescents blancs Osram BIOLUX[®] et quatre tubes Osram FLUORA[®] sont placés autour de la colonne. Le spectre lumineux des lampes FLUORA[®]

est particulièrement puissant dans la zone des bleus (450 nm) et dans la zone des rouges (650 nm). Cette combinaison de tubes fluorescents permet d'avoir un système d'éclairage approprié proche de la lumière solaire. L'utilisation de ballasts électroniques permet le réglage de l'intensité lumineuse en continu à l'aide d'un bouton poussoir. La cuve en verre présente une surface éclairée de 0,31 m². Pour augmenter la lumière accessible à la culture nous avons rajouté au système d'éclairage, un réflecteur en aluminium qui entoure le réacteur sur toute sa hauteur.

Le système de surveillance du CO₂ se compose du moniteur de CO₂ Biovision YSI 8500, du câble série YSI 8500, de la sonde série YSI 8500 et de la capsule du capteur YSI 8550. Il utilise la technologie Opto-chimique. La capsule du capteur de CO₂ se compose d'un petit réservoir de tampon de bicarbonate recouvert par une membrane de silicone perméable au gaz. Le tampon contient de l'HPTS (acide trisulfonique hydroxypyrene), un colorant fluorescent sensible au pH. L'étalonnage se fait en tenant compte de la pression atmosphérique et de celle du réacteur.

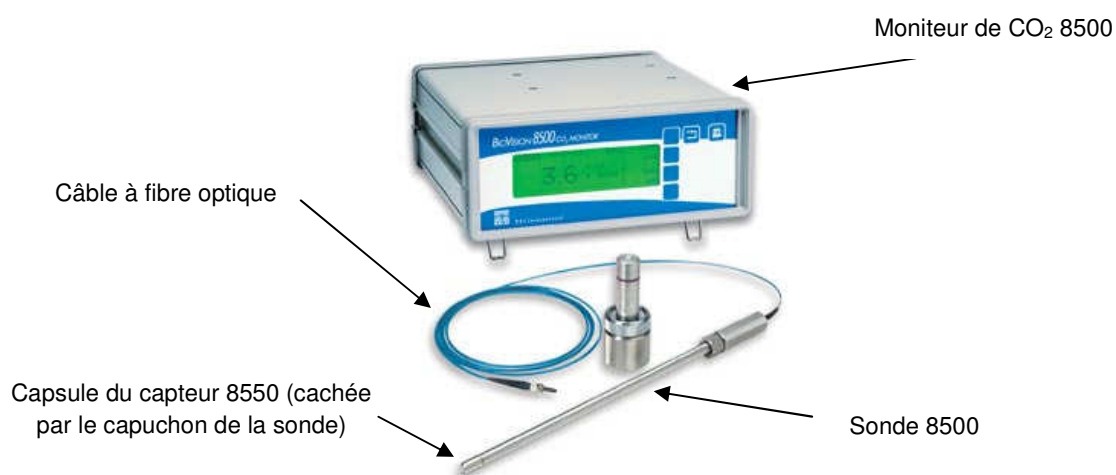
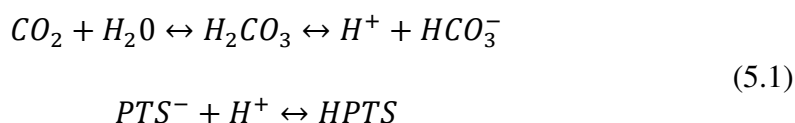


Figure 5.1 : Composants du système de surveillance YSI 8500 (documents YSI®).

Le CO₂ diffusé dans le tampon à travers la membrane modifie son pH. Cette modification entraîne celle de la fluorescence du colorant. Les réactions sont les suivantes :



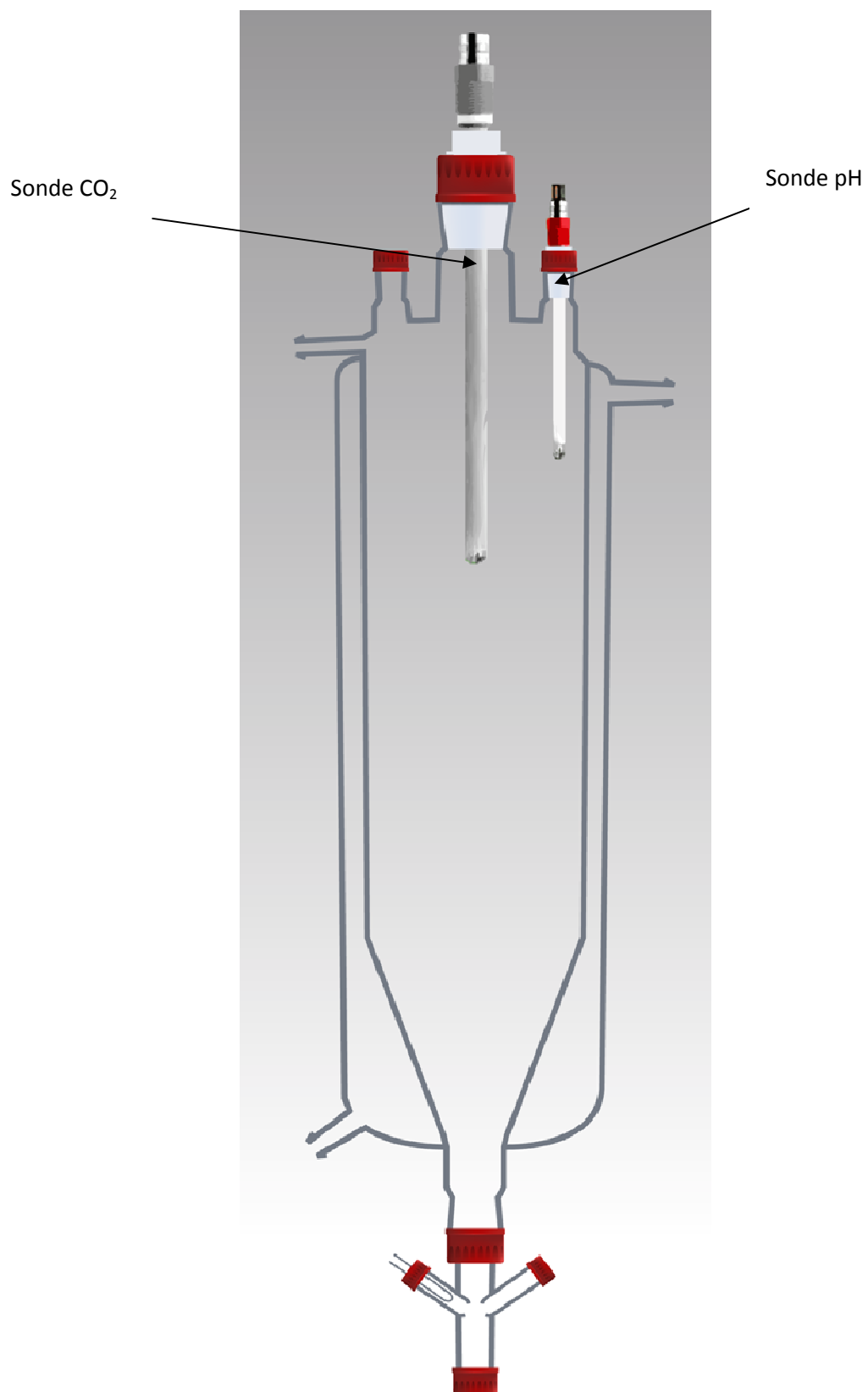


Figure 5.2 : Corps du réacteur.

Le moniteur Biovision 8500 détermine alors la concentration de CO_2 de l'échantillon en comparant la fluorescence du colorant à deux longueurs d'ondes différentes. Les résultats sont importés sur l'ordinateur à partir du moniteur YSI 8500 en utilisant le port série RS232. Le capteur mesure la pression partielle du CO_2 dissous qui, couplé à la mesure du pH, permet de connaître la concentration en carbone inorganique total dans le milieu (cf. Chapitre II, équation 2.15).

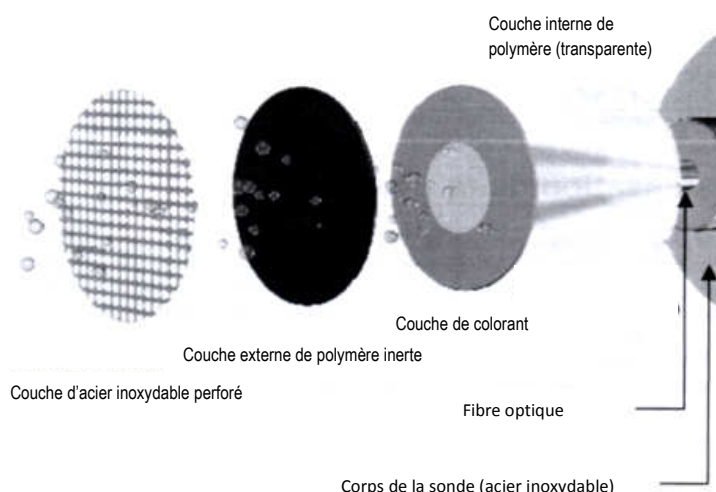


Figure 5.3 : Capsule du capteur YSI 8500 (documents YSI®).

Les sondes à pH (électrode combinée) et à oxygène dissous (sonde à ion spécifique et température) sont reliées à une centrale d'acquisition multi-paramètres Consort D130 qui permet l'exploitation des mesures directement sur l'ordinateur via interface et logiciel.

Les sondes de type électrochimique doivent être souvent étalonnées et plus particulièrement celle qui mesure l'oxygène dissous. Pour effectuer cette opération facilement, nous avons placé la sonde à O_2 dans une boucle externe de recirculation qui nous permet aussi, en isolant la sonde, d'une part, de l'étalonner, et d'autre part, de faire une prise d'échantillon. Cette recirculation est assurée par une pompe Watson Marlow 302 située sous le réacteur.

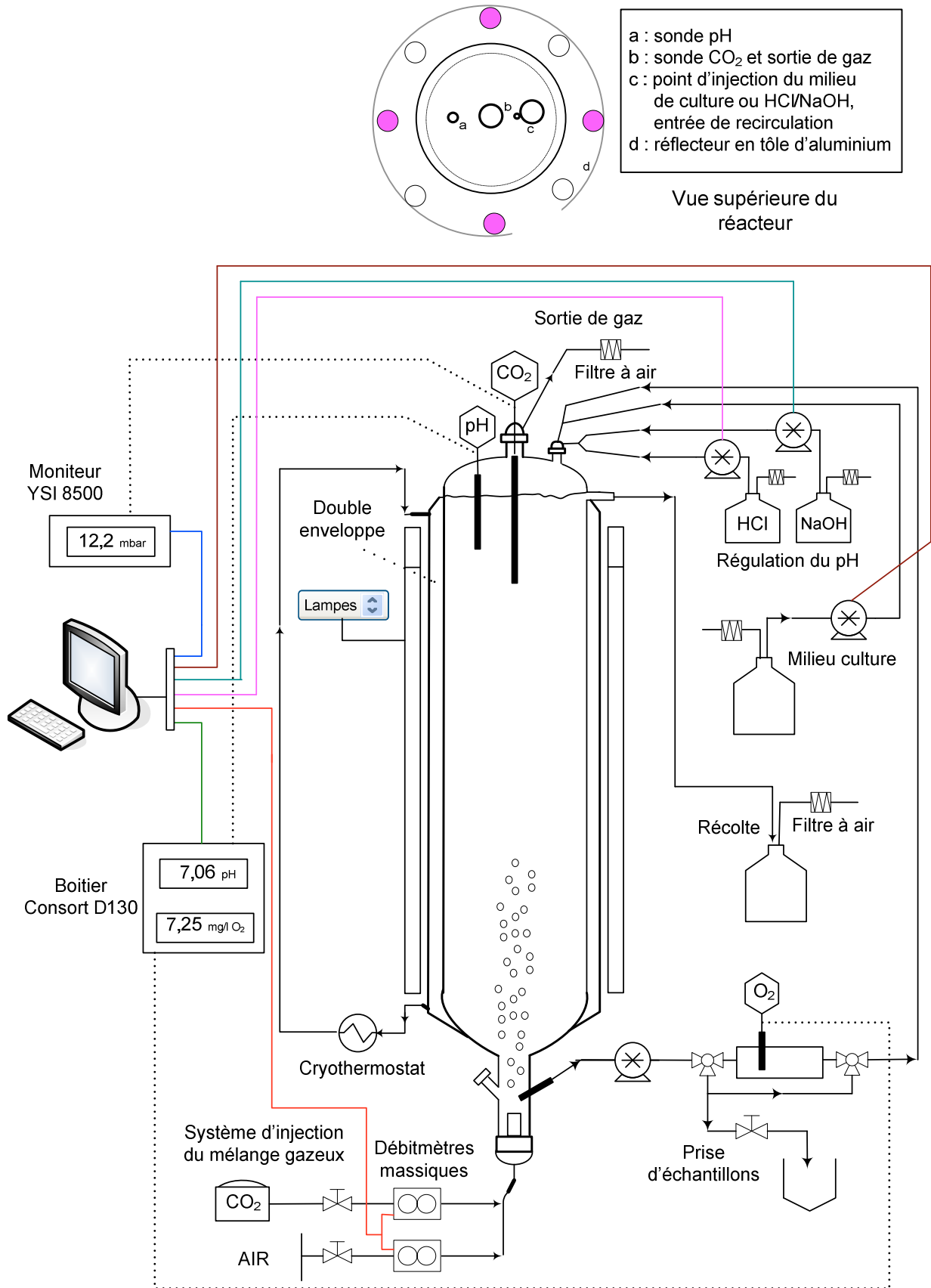


Figure 5.4 : Schéma du photobioréacteur de 9,6 litres et des équipements associés.

Pour le fonctionnement en mode continu, l'injection du milieu de culture dans le réacteur se fait en utilisant une pompe Watson Marlow 323*Du* que l'on peut piloter automatiquement en émettant des signaux analogiques compris entre 0 et 10 V. Elle est commandée au moyen d'une carte National Instruments PCI-6024E qui possède des sorties analogiques correspondant au voltage de commande de la pompe. Cette carte comprend 2 voies de conversion digital-analogiques, 16 entrées analogiques et 8 E/S digitales. La pompe péristaltique d'alimentation doit être étalonnée pour chaque changement de tuyau calibré qu'on utilise (tuyau en neoprène NORPRENE[®] 06404-14 de Masterflex[®] de 1,6mm de diamètre interne). Pour ce faire, nous mettons la bonbonne d'alimentation en milieu de culture sur une balance ce qui nous permet d'apprécier la quantité de liquide pompé par unité de temps. Les débits repérés sont les suivants :

Tableau 5.1 : Débits pour le tuyau NORPRENE[®] 06404-14

<i>Tours/mn</i>	<i>Débit (ml/mn)</i>	<i>Débit (l/h)</i>
5	1,5666	0,0940
10	3,1325	0,1800
20	6,2551	0,3753
50	15,6626	0,9398
100	31,323	1,8794

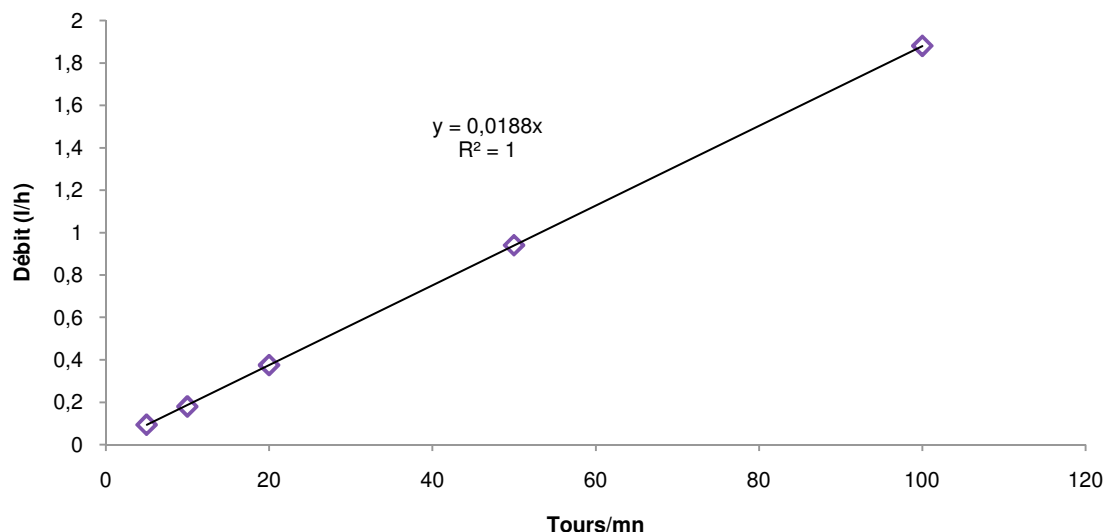


Figure 5.5 : Débit de la pompe d'alimentation en fonction du nombre de tours/mn.

Le pH peut-être régulé à l'aide de deux pompes péristaltiques, l'une introduisant de l'acide (HCl 0,5 N), l'autre introduisant une base (NaOH 0,5N). Chacune de ces pompes est commandée au moyen d'un signal tout ou rien (*TOR*) issu d'une carte Adlink PCI-7260 qui se compose de 8 relais électromagnétiques (250 V, 5 A) et de 8 entrées digitales isolées optiquement.

La récolte se fait au moyen d'une surverse située en partie haute du photobioréacteur. La bonbonne qui reçoit la récolte est équipée de deux filtres Millipore 0,20 μm de 4,5cm de diamètre qui assurent la respiration.

L'estimateur d'état et les lois de commande ont été implémentées sous l'environnement *Matlab*TM et *Simulink*.

5.3. Préparation du photobioréacteur

Il est nécessaire de préparer le réacteur avant les premiers essais en vérifiant que tous les équipements et systèmes associés au dispositif (pompes, sondes, débitmètres, système d'éclairage, filtrage secteur, alimentation électrique, système de régulation du pH acide/base, ordinateur, boucle externe de recirculation, surverse, bonbonne d'alimentation, etc...) fonctionnent correctement.

Les sondes (O_2 , CO_2 et pH) doivent être étalonnées avant leur stérilisation. La sonde à pH et celle à dioxyde de carbone peuvent être autoclavés. La sonde à oxygène dissous ne supporte pas les hautes températures et la stérilisation se fait en utilisant les UV pendant 30 minutes.

Le corps du réacteur doit être nettoyé soigneusement après chaque culture. En effet, les polysaccharides produits pour *Porphyridium purpureum* forment des dépôts fortement agglomérés à la surface du verre. Si en augmentant la température du réacteur (55°C) et en le chargeant à l'eau distillée on arrive à éliminer les dépôts les plus fins, il reste des dépôts épais que l'on ne peut éliminer qu'au moyen d'une action mécanique. L'ensemble de la tuyauterie est renouvelée dans la plupart des cas.

L'acide et la base utilisés pour la régulation éventuelle du pH sont stérilisés (passage à l'autoclave pendant 21 minutes à 121°C) au même moment que le sont le milieu de culture, la cuve en verre, la boucle de recirculation et toute la tuyauterie.

Entre deux manipulations, le réacteur est chargé par un mélange d'eau javellisée à chaud (55°C) et durant, si possible, 48 heures. Suivent plusieurs rinçages à l'eau distillée afin d'éliminer toute trace pouvant perturber la culture à venir.

Cette opération dure en moyenne trois à quatre jours si des problèmes ne surviennent pas au cours de cette manipulation.

5.3.1. *Mesure expérimentale du temps de mélange*

L'opération de mélange est fréquente dans l'industrie lorsqu'il est nécessaire d'obtenir un mélange homogène ou un contact intime entre plusieurs phases, soit pour les faire entrer en réaction, soit pour provoquer entre elles un transfert de matière ou un transfert thermique. On ne dispose pas de corrélations pour exprimer l'efficacité d'une opération de mélange. Les méthodes à disposition permettant de déterminer l'efficacité d'un procédé ou d'un dispositif de mélange dépendent des grandeurs mesurables offertes par le système (Koller, 2001).

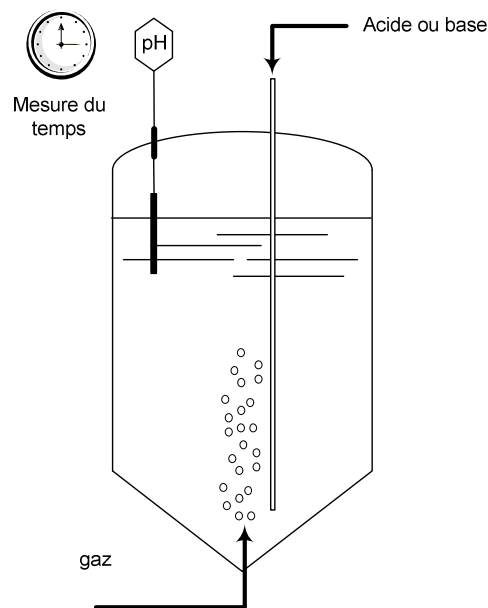


Figure 5.6 : Schéma du dispositif de mesure du temps de mélange.

La détermination du temps de mélange a été effectuée en utilisant le pH. L'injection d'un acide (HCl) ou d'une base ($NaOH$) nous a permis de caractériser la vitesse d'homogénéisation de notre photobioréacteur qui est agité par barbotage d'un mélange gazeux air- CO_2 . Nous avons mesuré le temps nécessaire pour que le pH atteigne

une valeur constante dans la masse de liquide (milieu de culture Hemerick). Le montage utilisé est montré dans la figure 5.6.

Sur la figure 5.7 nous observons l'évolution du pH au cours du temps compte tenu du temps de réponse du système et de la sonde. Le temps nécessaire à une stabilisation de la mesure du pH est de l'ordre de 20 secondes. On peut considérer que le temps de mélange reste faible eu égard au volume du réacteur (9,6 litres) et compte tenu du débit d'alimentation maximum que nous pouvons apporter (25 ml/min équivalent à 80 tours/min sur la pompe de milieu d'alimentation).

La stabilisation du pH pour des faibles variations de concentration présente une allure différente (cf. figure 5.8 et 5.9). Les temps de mélange apparaissent comme plus importants surtout pour NaOH.

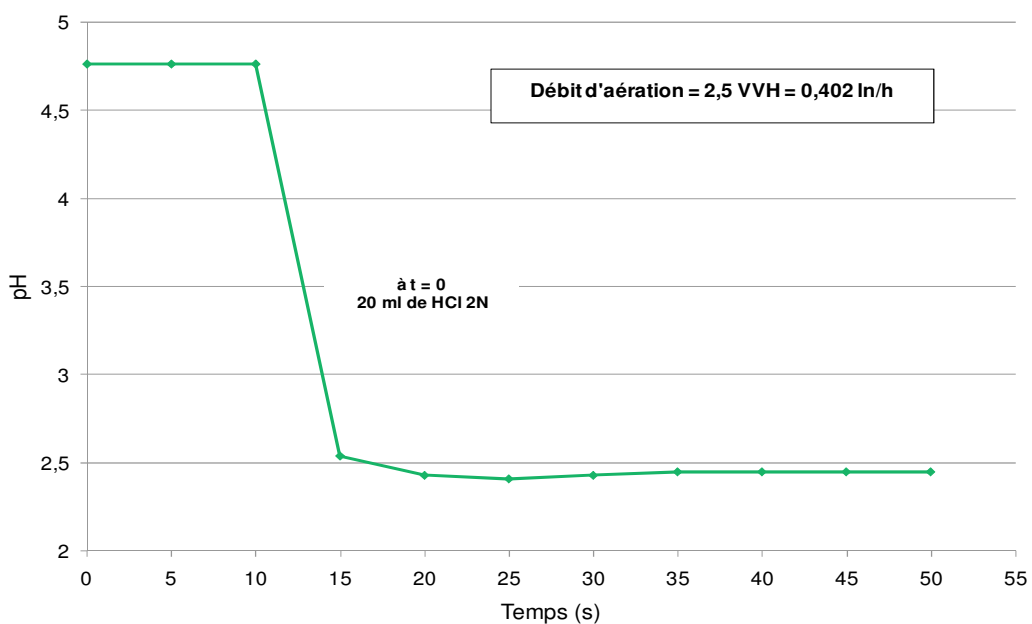


Figure 5.7 : Evolution du pH après injection de 20 ml. de HCl 2N.

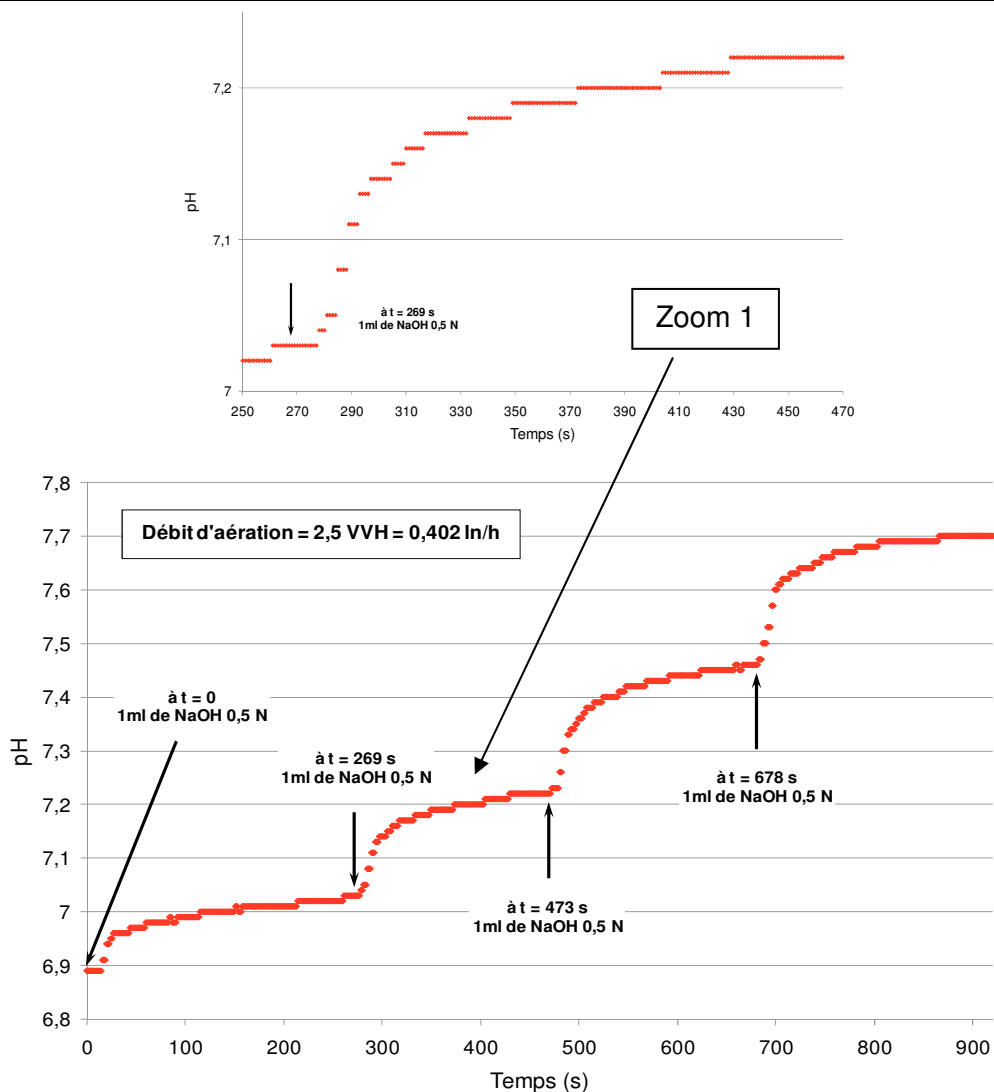


Figure 5.8 : Evolution du pH après injection successive de 4 fois 1 ml de NaOH 0,5N.

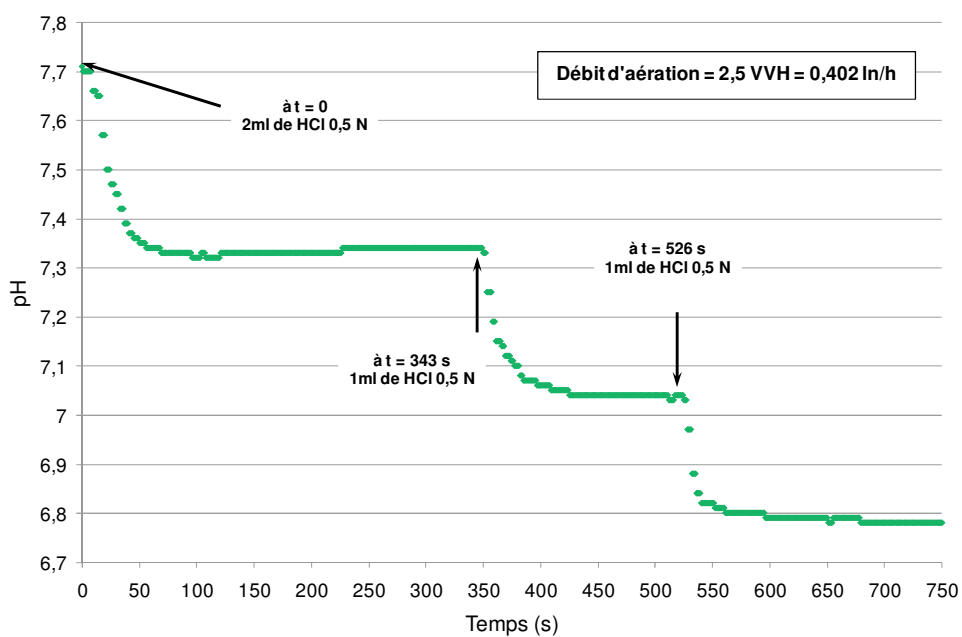


Figure 5.9 : Evolution du pH après injection successive de 4 fois 1 ml de HCl 0,5N.

5.3.2. Détermination du $k_L a(O_2)$ et calcul du $k_L a(CO_2)$

Le $k_L a(O_2)$ a été déterminé expérimentalement en utilisant la méthode décrite dans le Chapitre II (cf. § 2.6.5). Nous rappelons que le $k_L a(O_2)$ est normalement obtenu en traçant la courbe de variation de la concentration d'oxygène en fonction du temps dont $C_{O_2}^*$ (mol l⁻¹) est la concentration en oxygène dissous à saturation :

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = f(C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (5.2)$$

Les expériences ont été réalisées comme pour le précédent réacteur (2,5 litres). Cinq débits d'aération ont été étudiés. Les résultats expérimentaux sont montrés sur les figures 5.10 et 5.11.

La pente de la droite $\ln(\Delta C_{O_2}) = f(t)$ nous donne la valeur du $k_L a(O_2)$ (cf. figure 5.10). L'équation (5.3) nous permet de calculer la valeur du $k_L a(CO_2)$ qui est présentée dans le tableau 5.2.

$$k_L a(CO_2) = 0.885 k_L a(O_2) \quad (5.3)$$

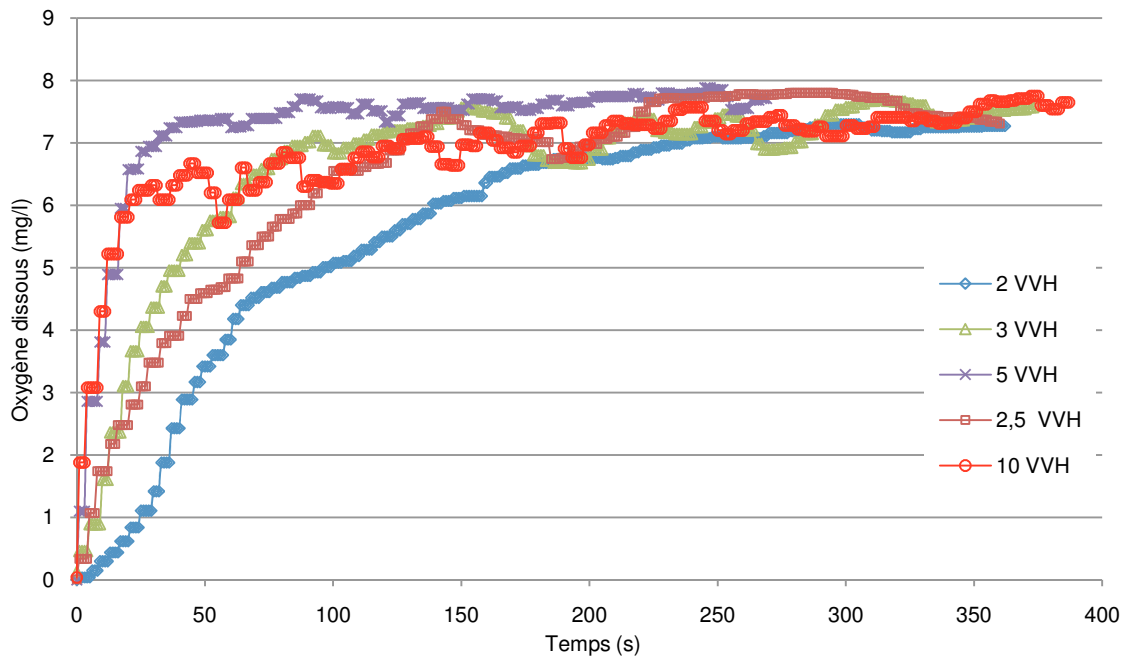


Figure 5.10 : Evolution de la concentration en oxygène dissous après désorption par l'azote pour cinq débits d'aération étudiés

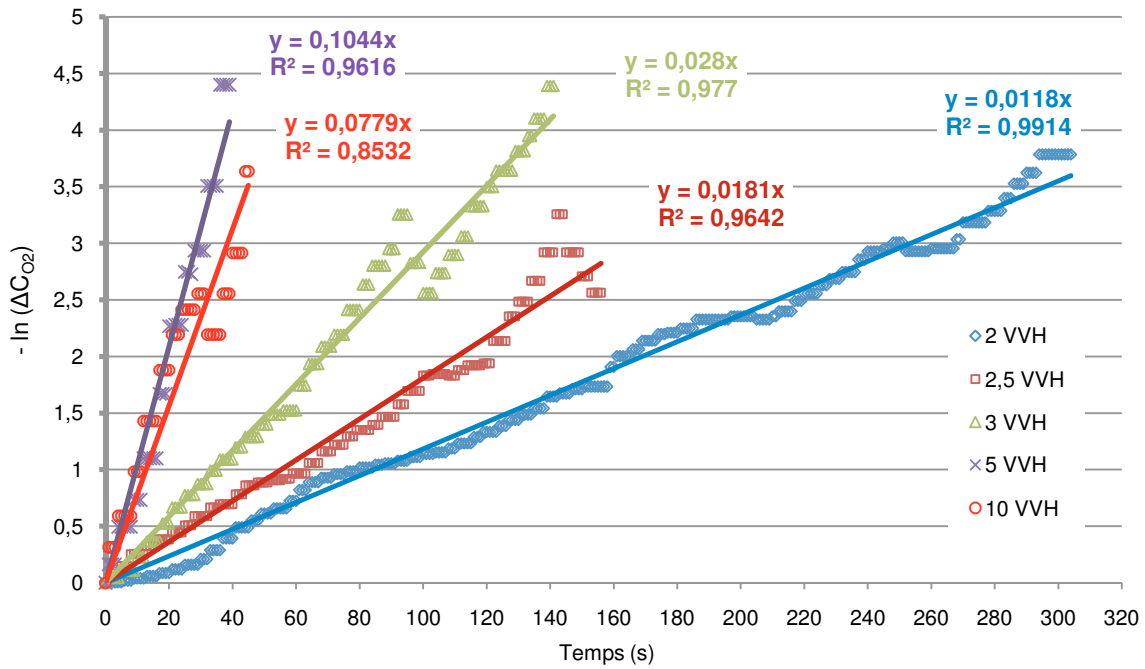


Figure 5.11 : Calcul du $k_L a(O_2)$ pour trois débits d'aération étudiés

Tableau 5.2 : Valeurs de $k_L a(O_2)$ et $k_L a(CO_2)$ pour cinq débits d'aération testés

Débit (VVH)	$k_L a(O_2)$ (s^{-1})	$k_L a(CO_2)$ (s^{-1})
2	0,0118	0,0104
2,5	0,0181	0,0159
3	0,0280	0,0246
5	0,1044	0,0919
10	0,0790	0,0686

Comme préconisé dans la thèse de Baquerisse (1999) et utilisé ensuite dans celle de Nouals (2000), et en raison de la forte production de polysaccharides à des débits d'aération supérieurs, nous reprenons les conditions optimales de culture et nous retiendrons $k_L a(CO_2) = 57,341 \text{ h}^{-1}$ pour une culture de *Porphyridium purpureum* (cf. figure 5.12).

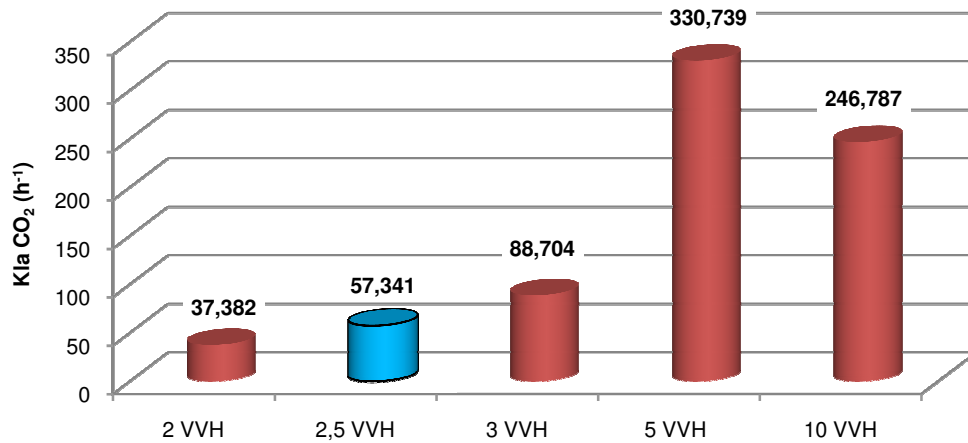


Figure 5.12 : Valeurs du $k_La(CO_2)$ pour cinq débits d'aération étudiés.

5.4. Précultures et premiers essais

Le démarrage et le suivi d'une culture de *Porphyridium purpureum* dans un réacteur de 9,6 litres se font de manière similaire à ceux d'un réacteur de 2,5 litres décrits dans le Chapitre II (cf. § 2.4).

Le volume de l'inoculum est proportionnel au volume du photobioréacteur, ce qui représente une quantité de 0,8 litres à une concentration cellulaire d'environ 10 millions de cellule par millilitre.

Nous avons fait plusieurs tentatives de culture avant de pouvoir valider les algorithmes proposés dans cette thèse. Ces cultures, nous ont permis, une à une, de résoudre un certain nombre de problèmes. Par rapport à la configuration finale décrite dans le paragraphe 5.2, la configuration originale ne comprenait pas la boucle de recirculation, les sondes CO_2 et O_2 étaient alors implantées dans la partie basse du réacteur. Elles étaient étalonnées une seule fois avant le début de la culture.

La sonde à CO_2 dissous utilisée initialement était une sonde électrochimique (Sonde Consort). Elle a été remplacée par la sonde YSI 8500 décrite dans le paragraphe 5.2, dont la linéarité était plus proche de la droite idéale (figure 5.13). Cette sonde est placée actuellement dans la partie supérieure du réacteur. La sonde à CO_2 Consort mesure la concentration de dioxyde de carbone dissous en mg/l et la sonde YSI mesure la

pression partielle de CO_2 dissous en mbar. Le calcul de la concentration en CIT se fait en utilisant la mesure de la pression partielle de CO_2 dissous (sonde YSI), la mesure du pH et l'équation 2.15.

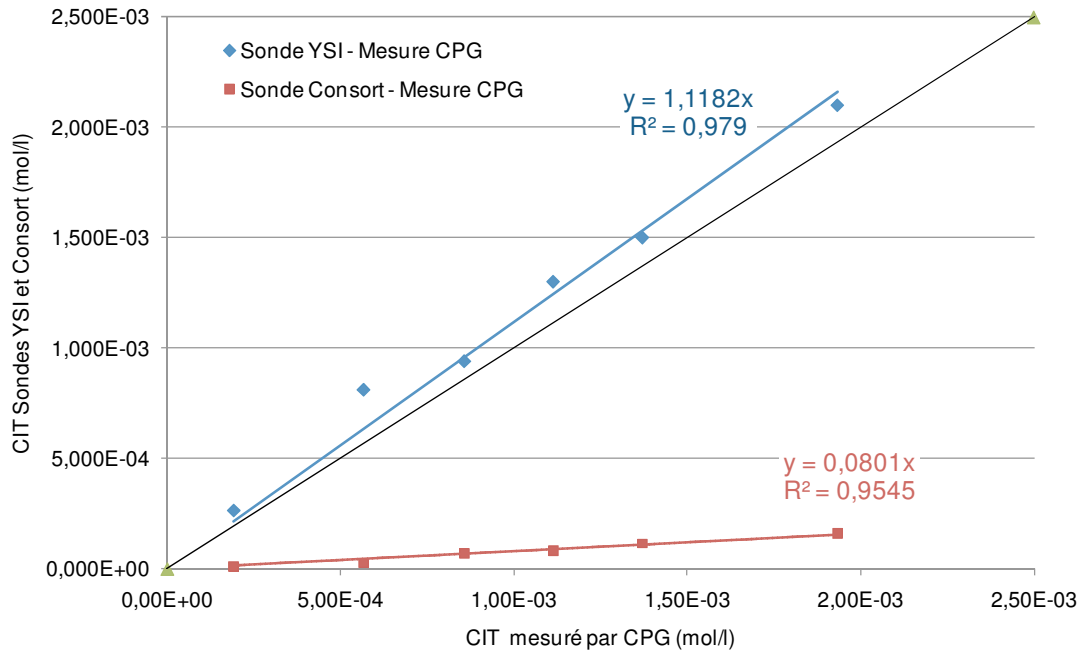


Fig. 5.13 : Comparaison entre deux sondes mesurant le CIT : sonde YSI (opto-chimique) et sonde Consort (à ion spécifique)

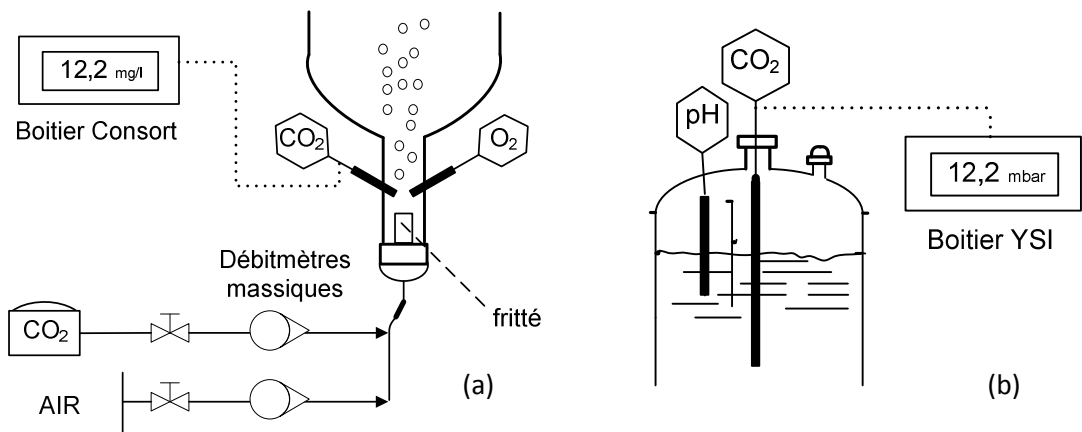


Fig. 5.14 : Configurations originale (a) et finale (b) de positionnement de la sonde à CO_2 sur le réacteur.

Quatre cultures (cultures *PP1*, *PP2*, *PP3* et *PP4*) ont été menées avec la sonde Consort. Les résultats, et notamment ceux de la sonde à CO_2 dissous, nous sont apparus difficilement exploitables et très différents du *CIT* mesuré par chromatographie en phase gazeuse (*CPG*). Toutefois, la fréquence de mesure du *CIT* par *CPG* est de l'ordre d'une heure par point, ce qui est trop long par rapport à la période d'échantillonnage du filtre de Kalman proposé. La sonde présentait également des dérives incontrôlables résultant de la création d'un biofilm à la surface de la membrane de la sonde. Ce phénomène a aussi été observé pour la sonde à oxygène dissous.

Après le remplacement de la sonde Consort par la sonde *YSI*, une cinquième culture (*PP5*) (figures 5.15 à 5.18) a été menée mais elle a été très vite arrêtée par la présence nombreuse d'amibes dans la culture (les amibes se nourrissent essentiellement de cellules microalgales). Cette contamination déclenche un phénomène d'auto-défense de microalgues qui s'agrègent entre elles et se déposent sur les parois du réacteur empêchant la lumière d'atteindre les cellules encore en suspension dans le milieu. D'autre part, une coloration anormale de la culture (virée à l'orange) nous laisse penser qu'une lyse cellulaire était amorcée et que les pigments des cellules étaient libérés. Une baisse très nette des valeurs mesurées par la sonde à oxygène dissous nous a convaincu de mettre un terme à cette culture (figure 5.18).

Une sixième culture (culture *PP6*) a été menée dans de bonnes conditions ce qui nous a permis d'implémenter dans le photobioréacteur l'estimateur d'état et les algorithmes de commande décrits dans les chapitres II et IV. Ces résultats sont montrés dans le paragraphe suivant.

Il faut remarquer que la durée minimale de chaque culture est d'environ trois semaines et qu'une semaine supplémentaire est nécessaire pour nettoyer et reconditionner le réacteur en vue d'une nouvelle culture.

Nous avons pris pour exemple la cinquième culture (culture *PP5*) parmi les six expériences réalisées qui est représentative d'une culture qui après avoir été en début de phase exponentielle, a subi une contamination par des amibes. La courbe de croissance (figure 5.15) montre le début tout à fait satisfaisant et l'effet de la contamination sur la population microalgale. La figure 5.16 montre l'influence de la composition du mélange gazeux à l'entrée du réacteur sur l'évolution du *CIT*. Une augmentation de la quantité de

CO_2 dans le gaz d'alimentation entraîne une diminution instantanée du CIT qui s'explique par une variation rapide du pH dans la culture (cf. figure 5.17). Sur la figure 5.18 nous présentons la variation de l'oxygène dissous au cours de cette culture et sa diminution qui correspond au début de la contamination.

Les résultats des expériences non utilisées pour la validation (cultures $PP1$, $PP2$, $PP3$ et $PP4$) sont montrés dans l'annexe C.

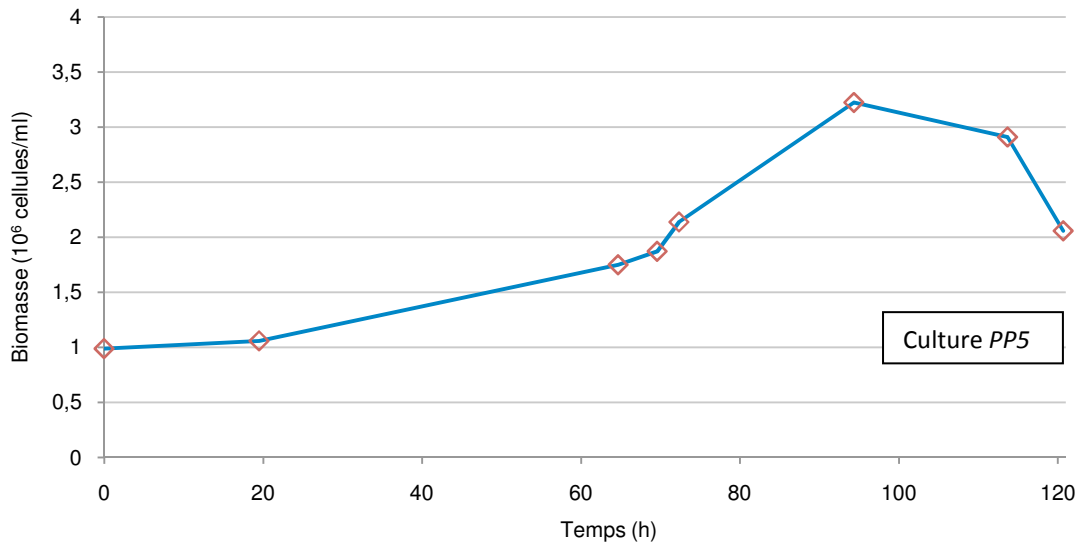


Figure 5.15 : Evolution de la concentration cellulaire en fonction du temps.

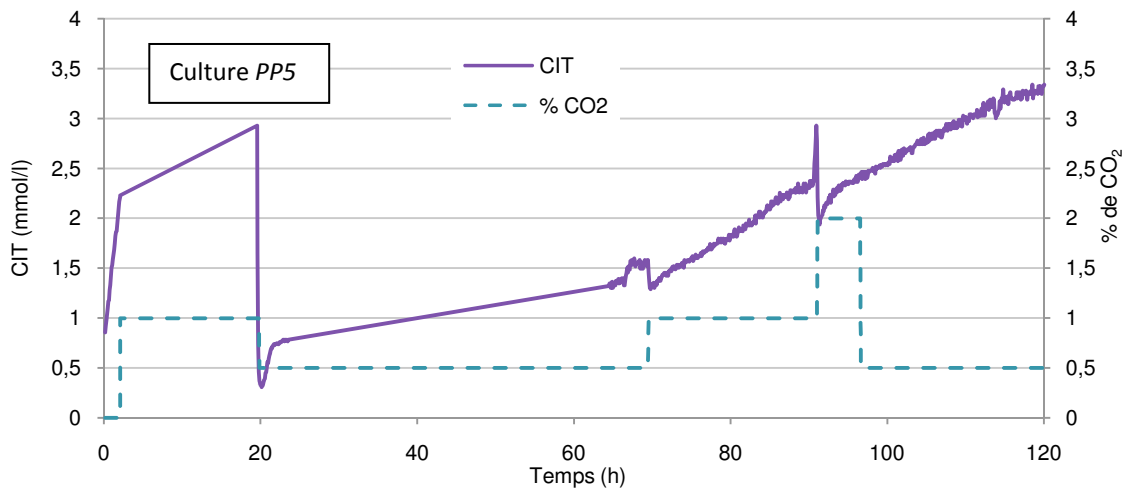


Figure 5.16 : Evolution temporelle des concentrations en CIT calculées à partir du pH et de la pression partielle en CO_2 mesurée par la sonde YSI.

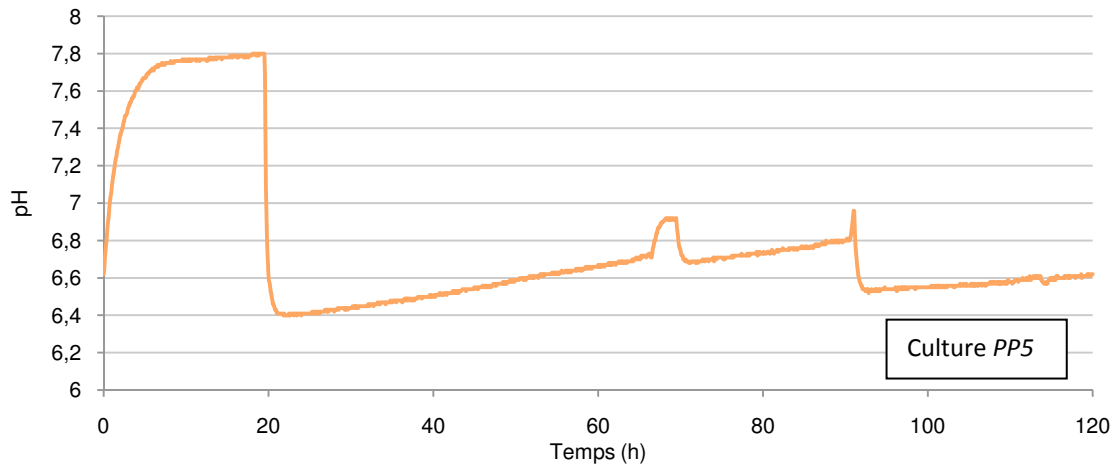


Figure 5.17 : Evolution temporelle du pH.

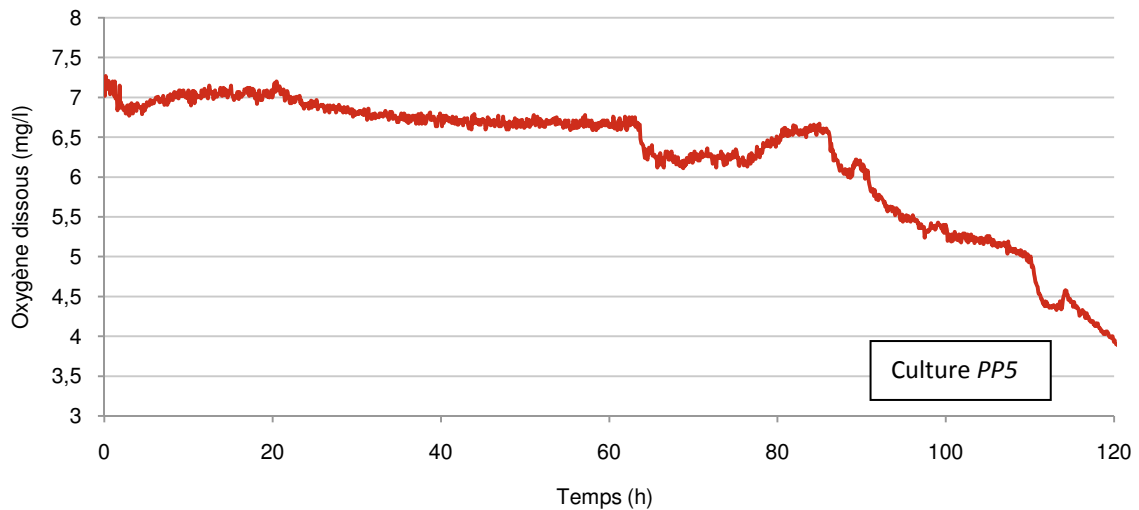


Figure 5.18 : Evolution temporelle de la concentration en oxygène dissous.

5.5. Résultats expérimentaux

Les algorithmes décrits dans les Chapitre III et IV ont été appliqués au photobioréacteur pilote de 9,6 litres. Une culture réalisée pendant 4 semaines nous a permis de tester le filtre de Kalman étendu et deux lois de commande. Cette culture a été réalisée dans des conditions optimales: intensité lumineuse incidente $I_{in} = 120 \mu\text{Einstein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, débit d'alimentation du mélange gazeux égal à 2,5 VVH avec 2% de CO_2 à 25°C de température (figure 5.19).

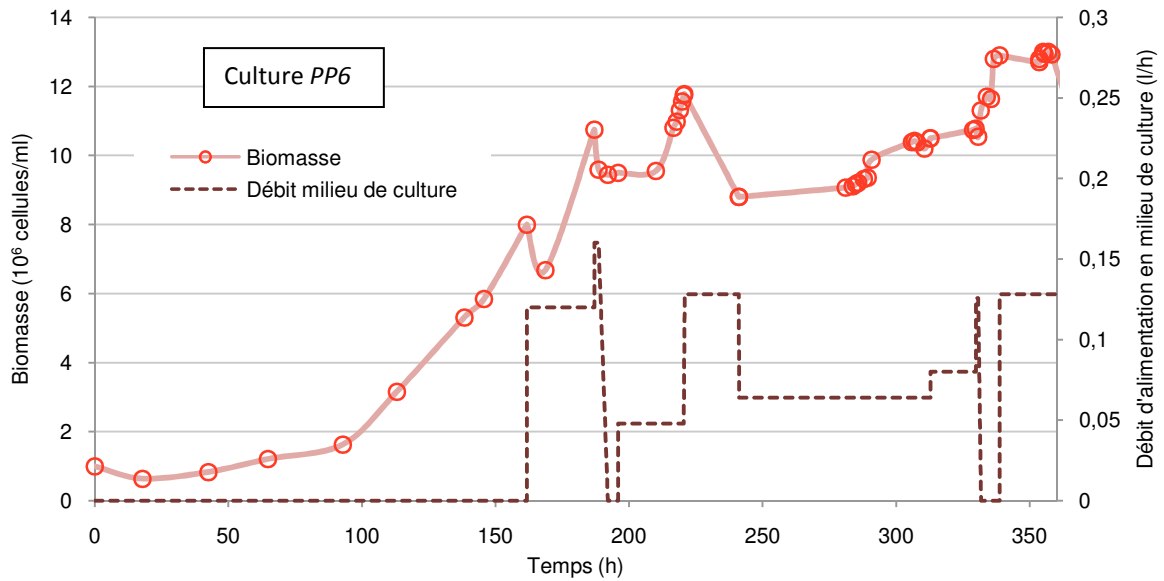


Figure 5.19 : Evolution temporelle de la concentration cellulaire et débit d'alimentation en milieu de culture.

5.5.1. Filtre de Kalman étendu

L'estimateur décrit dans le Chapitre III a été implémenté sous l'environnement *MatlabTM* et *SimulinkTM* et a été appliqué au photobioréacteur en temps réel. Il faut remarquer que la calibration du filtre est une étape délicate. La sensibilité dans la procédure de calibration peut varier en fonction de l'état de la culture. Une légère variation des valeurs de la vitesse maximale de croissance μ_{max} a été observée pendant nos essais. Une estimation en ligne de ce paramètre a été mise en place.

La présentation est identique pour les figures 5.20, 5.21, 5.22 et 5.23 : la figure (a) compare les données hors-ligne de biomasse (\diamond) et la biomasse calculée avec le modèle mathématique (--- trait discontinu) avec l'estimation X_{est} (— trait continu) de la biomasse basée sur les équations de bilan de matière du modèle et reconstruite à partir des valeurs estimées en ligne des vitesses spécifiques maximales de croissance μ_{max} (non représentées dans la figure) qui restent constantes sur de courtes périodes dans la majorité de cas ; la figure (b) présente les données mesurées en ligne du *CIT* comparées à l'estimation donnée par le filtre de Kalman étendu ; la figure (c) présente la validation de la relation linéaire liant X estimé et X mesuré.

Les valeurs de la concentration en biomasse (X modèle) sont obtenues avec le modèle du procédé (cf. Chapitre IV, § 4.3) à partir des valeurs mesurées en ligne du *CIT*

ainsi que du pH et en prenant en compte l'intensité lumineuse incidente et le débit d'alimentation en milieu de culture utilisés.

La figure 5.20 présente un premier jeu de résultats expérimentaux. La concentration en biomasse (figure 5.20a) est mesurée hors-ligne par granulométrie et la concentration en carbone inorganique total CIT est calculée en ligne grâce aux mesures d'une sonde à CO_2 dissous et une sonde à pH . La température et l'intensité lumineuse incidente sont maintenues à des valeurs constantes respectivement égales à $25^\circ C$ et $120 \mu Einstein. m^{-2}. s^{-1}$. Le débit d'alimentation en milieu de culture est $F = 0,048 l/h$.

Les conditions initiales sont les suivantes : $X_0 = 10,8 \cdot 10^6 cell/ml$ et $CIT_0 = 4,042 \cdot 10^{-3} mol/l$. Nous avons considéré une petite erreur sur les conditions initiales en CIT du filtre. L'estimateur a été initialisé comme suit : $X_0 = 10,8 \cdot 10^6 cell/ml$ et $CIT_0 = 3,80 \cdot 10^{-3} mol/l$. Le temps d'échantillonnage est égal à $T_s = 5 min$. Les matrices Q et R ont été déterminées empiriquement. Les valeurs sont les suivantes : $Q = \begin{bmatrix} 0,001 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}$ et $R = 0,01$. La matrice P_0 est égale à : $P_0 = \begin{bmatrix} 0,01 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}$. Cette dernière matrice est déterminée à partir de la connaissance de la précision des mesures de la biomasse et du CIT . Remarquons que dans les quatre cas présentés ci-dessous les mêmes paramètres de calibration ont été utilisés et ont donné des résultats satisfaisants.

La figure 5.21 présente un deuxième jeu de résultats expérimentaux. Les conditions de culture sont les mêmes que celles utilisées précédemment. Le débit d'alimentation en milieu de culture est $F = 0,06408 l/h$. Les conditions initiales sont les suivantes : $X_0 = 9,07 \cdot 10^6 cell/ml$ et $CIT_0 = 4,74 \cdot 10^{-3} mol/l$. Nous avons considéré une petite erreur sur les conditions initiales en CIT du filtre. L'estimateur a été initialisé comme suit : $X_0 = 9,07 \cdot 10^6 cell/ml$ et $CIT_0 = 4,00 \cdot 10^{-3} mol/l$.

Un troisième jeu de résultats expérimentaux est présenté sur la figure 5.22. Le débit d'alimentation en milieu de culture est $F = 0,06408 l/h$. Les conditions initiales sont les suivantes : $X_0 = 9,88 \cdot 10^6 cell/ml$ et $CIT_0 = 4,88 \cdot 10^{-3} mol/l$. Nous avons considéré une petite erreur sur les conditions initiales en CIT du filtre. L'estimateur a été initialisé comme suit : $X_0 = 9,88 \cdot 10^6 cell/ml$ et $CIT_0 = 4,94 \cdot 10^{-3} mol/l$.

La figure 5.23 présente un quatrième jeu de résultats expérimentaux. Le débit d'alimentation en milieu de culture est $F = 0,0801 l/h$. Les conditions initiales sont les

suivantes : $X_0 = 10,505 \cdot 10^6 \text{ cell/ml}$ et $CIT_0 = 4,94 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$. Nous avons considéré une petite erreur sur les conditions initiales du filtre. L'estimateur a été initialisé comme suit : $X_0 = 10,51 \cdot 10^6 \text{ cell/ml}$ et $CIT_0 = 4,95 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$.

Dans les deux derniers cas, les mesures ne sont pas très nombreuses car nous avons volontairement laissé fonctionner le filtre pendant toute la nuit.

Les quatre cas étudiés montrent que le modèle seul n'arrive pas à estimer la concentration en biomasse en ligne. Les erreurs de modélisation sont visibles. Il faut remarquer qu'avec le filtre de Kalman étendu ces erreurs sont corrigées.

Ces quatre jeux de paramètres indiquent que l'estimateur proposé présente de bonnes performances dans le cas d'une culture de *Porphyridium purpureum* en mode continu et qu'il peut nous indiquer de façon satisfaisante et en temps réel le nombre de cellules présentes dans la culture.

La validation de ce filtre ne se limite pas aux quatre jeux de données présentés dans ce paragraphe. Dans ce qui suit, le filtre de Kalman étendu sera couplé à la loi de commande choisie afin de valider celle-ci. Nous allons observer également le comportement du filtre en temps réel et dans différentes situations.

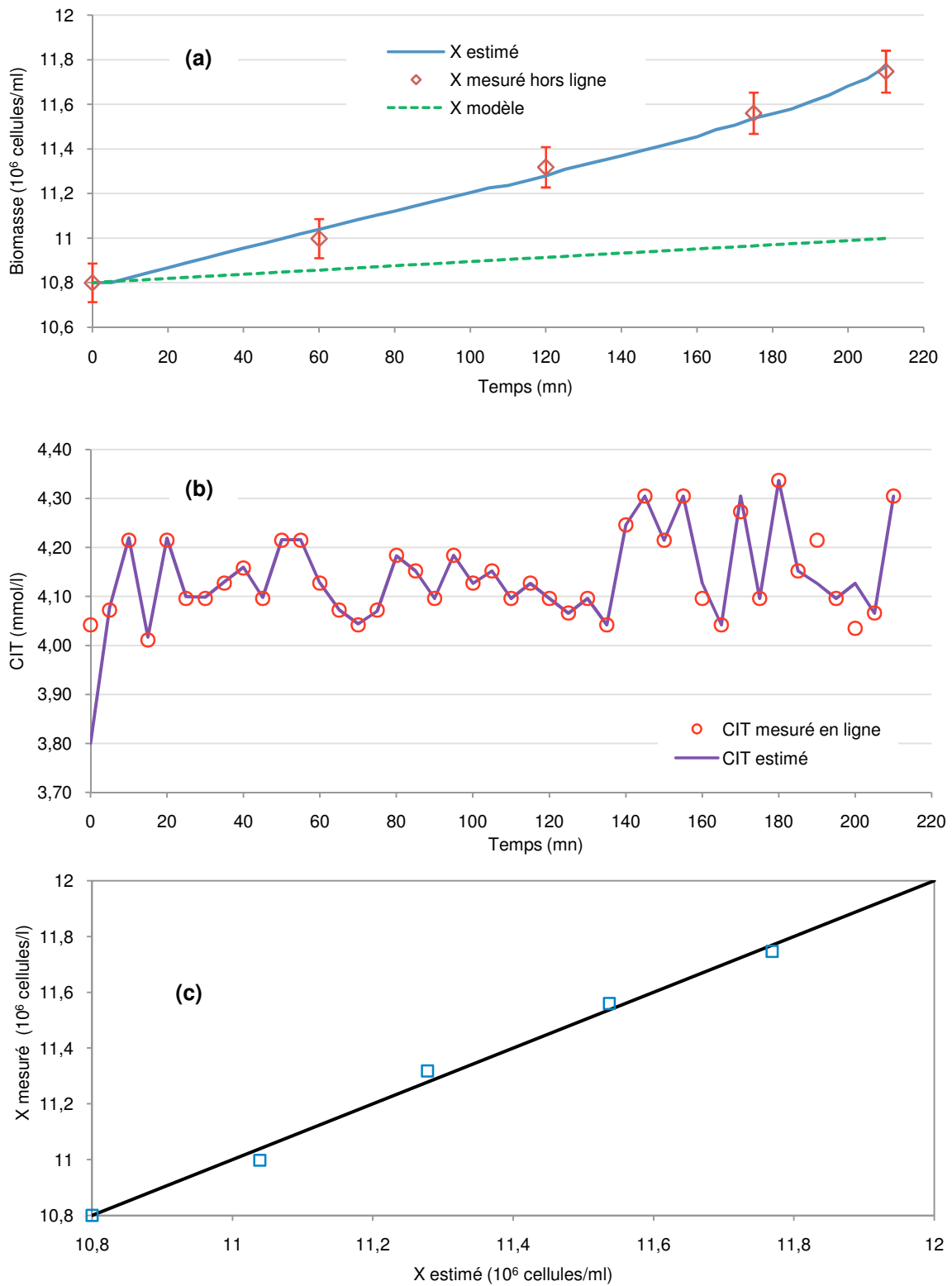


Figure 5.20 : Comparaison entre des mesures directes (\diamond , \circ) et les prédictions (—) du filtre de Kalman étendu reposant sur les mesures du *CIT* : (a) biomasse mesuré par granulométrie (b) concentration en carbone inorganique total, (c) validation de la relation linéaire liant X estimé et X mesuré.

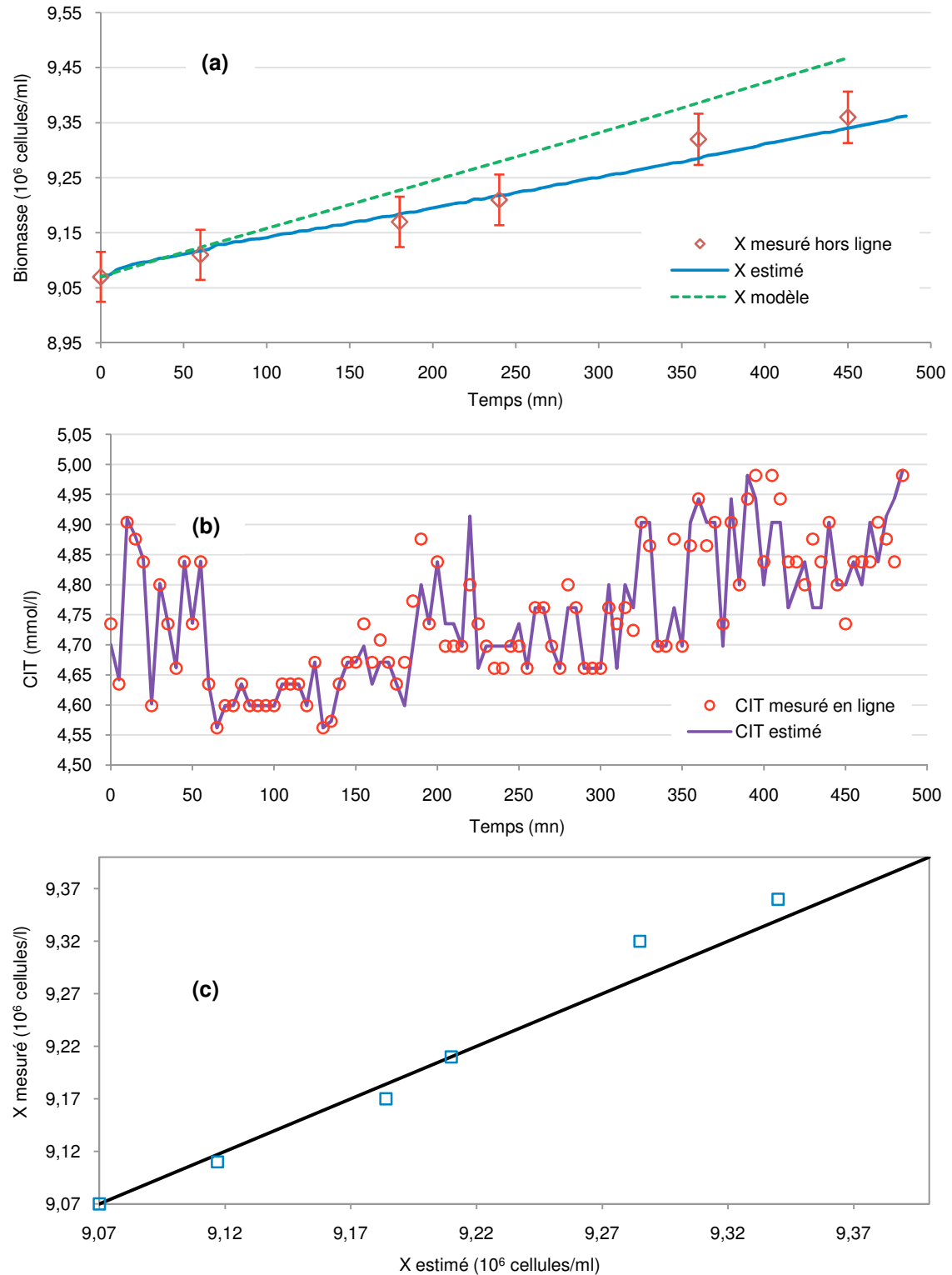


Figure 5.21 : Comparaison entre des mesures directes (\diamond , \circ) et les prédictions (—) du filtre de Kalman étendu reposant sur les mesures du CIT : (a) biomasse mesuré par granulométrie (b) concentration en carbone inorganique total, (c) validation de la relation linéaire liant X estimé et X mesuré.

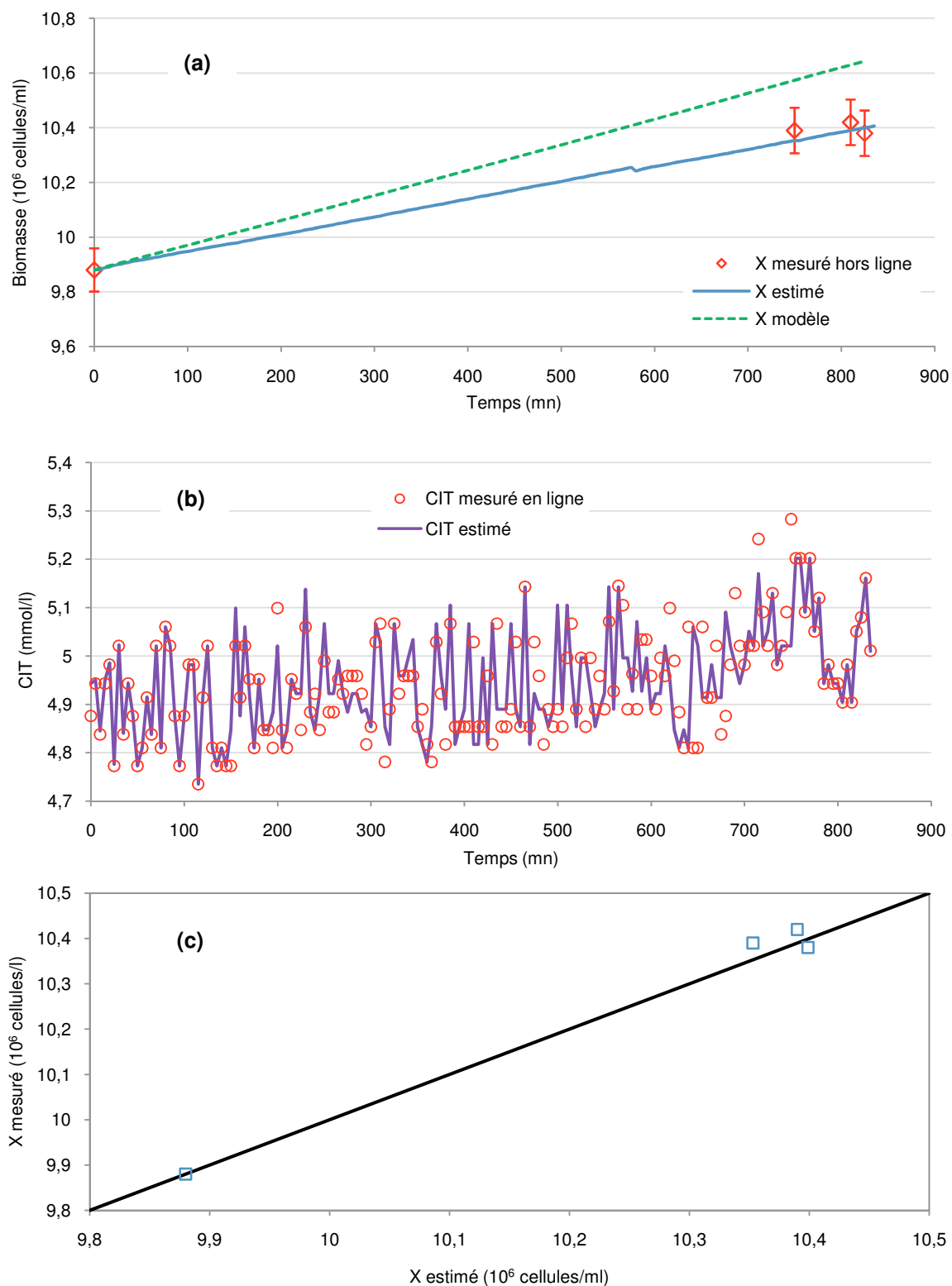


Figure 5.22 : Comparaison entre des mesures directes (\diamond , \circ) et les prédictions (\rightarrow) du filtre de Kalman étendu reposant sur les mesures du *CIT* : (a) biomasse mesuré par granulométrie (b) concentration en carbone inorganique total, (c) validation de la relation linéaire liant X estimé et X mesuré.

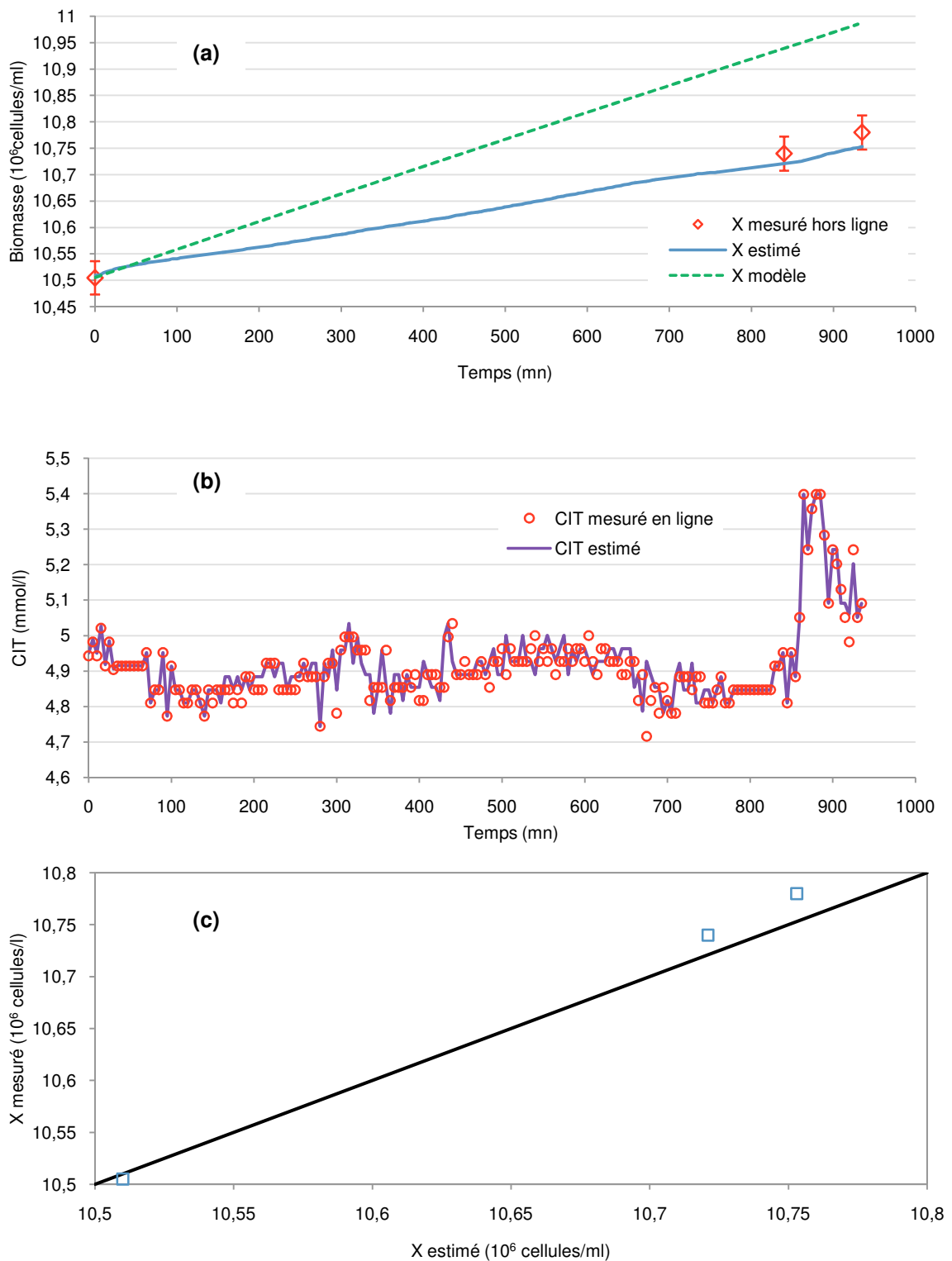


Figure 5.23: Comparaison entre des mesures directes (\diamond , \circ) et les prédictions (—) du filtre de Kalman étendu reposant sur les mesures du *CIT* : (a) biomasse mesuré par granulométrie (b) concentration en carbone inorganique total, (c) validation de la relation linéaire liant X estimé et X mesuré.

5.5.2. Lois de commande

Une contrainte de temps ne nous permettant pas de tester toutes les commandes proposées dans ce travail de thèse, nous avons choisi de ne pas traiter la commande prédictive, compte tenu du temps important nécessaire à son développement et à sa mise en œuvre.

Nous avons donc choisi de tester la commande linéarisante $y = X$ et la commande *GMC* qui a déjà été appliquée à la culture de *Porphyridium purpureum* dans un travail précédent sur un photobioréacteur de géométrie différente (Baquerisse, 1999). Ces algorithmes ont été implementés sous l'environnement *Matlab*TM et *Simulink*TM.

Le filtre de Kalman étendu, validé précédemment, a été couplé aux lois de commande pour leur validation. Le réglage du filtre est le même que celui utilisé pour sa validation (cf. § 5.5.1) et la période d'échantillonnage a été réduite à $T_s = 3 \text{ min}$.

La présentation des figures 5.24, 5.25, 5.26 et 5.27 est identique : la figure (a) montre le profil de la concentration cellulaire et compare les mesures hors ligne (◇) et la biomasse estimée (—) ; la figure (b) présente l'évolution des valeurs du *CIT* mesurées en ligne comparées à celles estimées par le filtre de Kalman étendu et la figure (c) présente l'évolution des débits d'alimentation en milieu de culture résultant de la régulation.

La figure 5.24 présente la commande *GMC* appliquée à la culture de *Porphyridium purpureum*. La réponse du système à un échelon descendant est étudiée. On veut passer de $16,7$ à $15,7 \cdot 10^6$ cellules/ml à $t = 0,5\text{h}$. Le temps nécessaire à l'établissement du régime stationnaire est d'environ 4,5 heures. Un dépassement de 36% est observé.

Les figures 5.25 et 5.26 présentent la commande linéarisante $y = X$ appliquée en temps réel à la culture de *Porphyridium purpureum* dans le photobioréacteur décrit précédemment. Nous pouvons apprécier l'utilité de la mise en œuvre du régulateur *PID* avec un terme d'anti-windup sur la commande proposée. Le gain de l'antiwindup a été choisi empiriquement.

La réponse du système à un échelon descendant (passage de $15,54$ à $14,54 \cdot 10^6$ cellules/ml à $t=0,5\text{h}$) est montrée sur la figure 5.25. Le gain de l'anti-windup utilisé est égal à $K_s = 0,0004$. Le temps nécessaire à l'établissement du régime stationnaire est comme dans le cas de la commande *GMC* (figure 5.24) d'environ 4,5 heures. Le

dépassement observé, qui est moins important que dans le cas où la commande *GMC* est appliquée, est de 28%.

La figure 5.26 présente également le comportement du système pour un échelon descendant (passage de 16,68 à 16,28. 10^6 cellules/ml à $t=0,25h$). Le gain de l'antiwindup utilisé est égal à $Ks = 0,5$. La réponse du système est nettement améliorée. Le dépassement est de l'ordre de 28% et le temps de réponse est d'environ 2 heures. La performance est satisfaisante.

La figure 5.27 donne la réponse du système régulé pour un échelon de consigne en biomasse (passage de 15 à 16. 10^9 cellules/l à $t = 0$). La valeur de consigne est atteinte au bout de 8 heures avec un dépassement de l'ordre de 20%. Toutefois le temps mis par le système pour rattraper la consigne ne doit pas être attribué à la commande mise en place, mais il est uniquement dû au temps nécessaire aux microalgues pour atteindre, par leur croissance propre, la nouvelle valeur de la consigne.

La performance de la commande linéarisante $y = X$ en présence de perturbations (figure 5.28) est étudiée dans le cas de la variation de l'intensité lumineuse (de 1,3 à 1,1 $\mu E\ m^{-2}s^{-1}$, appliquée à l'instant $t=15mn$ et de 1,1 à 1,5 $\mu E\ m^{-2}s^{-1}$, appliquée à l'instant $t=150mn$) et celui de la variation du *pH* (de 7,18 à 7,08, appliquée à l'instant $t=354mn$). L'ajout de 4 ml de *HCl* nous a permis d'obtenir cette variation du *pH*.

Le régulateur proposé est très performant (figure 5.28a). En effet, les perturbations ne dévient pas la valeur de la consigne. Ce comportement est similaire à celui obtenu en simulation (cf. Chapitre IV, figure 4.16). Les variations de *pH* suite aux variations de lumière et à l'ajout du *HCl* sont montrées dans la figure 5.28c. Le débit d'alimentation en milieu de culture (figure 5.28c) va changer en fonction des perturbations : il sera plus petit si le *pH* diminue et plus fort si le *pH* augmente.

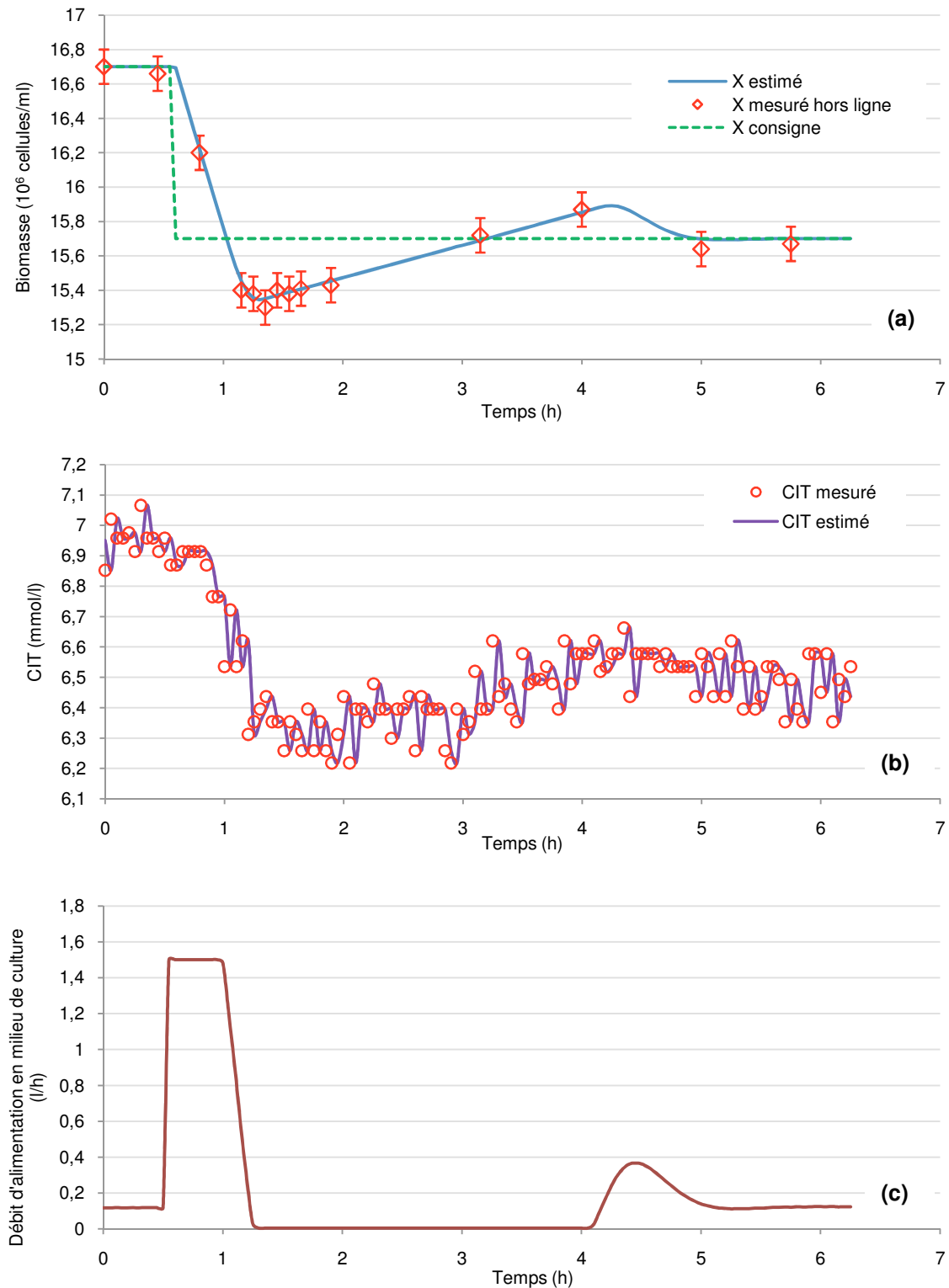


Figure 5.24: Commande *GMC*, comportement du système pour un échelon sur la consigne : passage de $16,7$ à $15,7 \cdot 10^6$ cellules/ml à $t=0,5$ h.

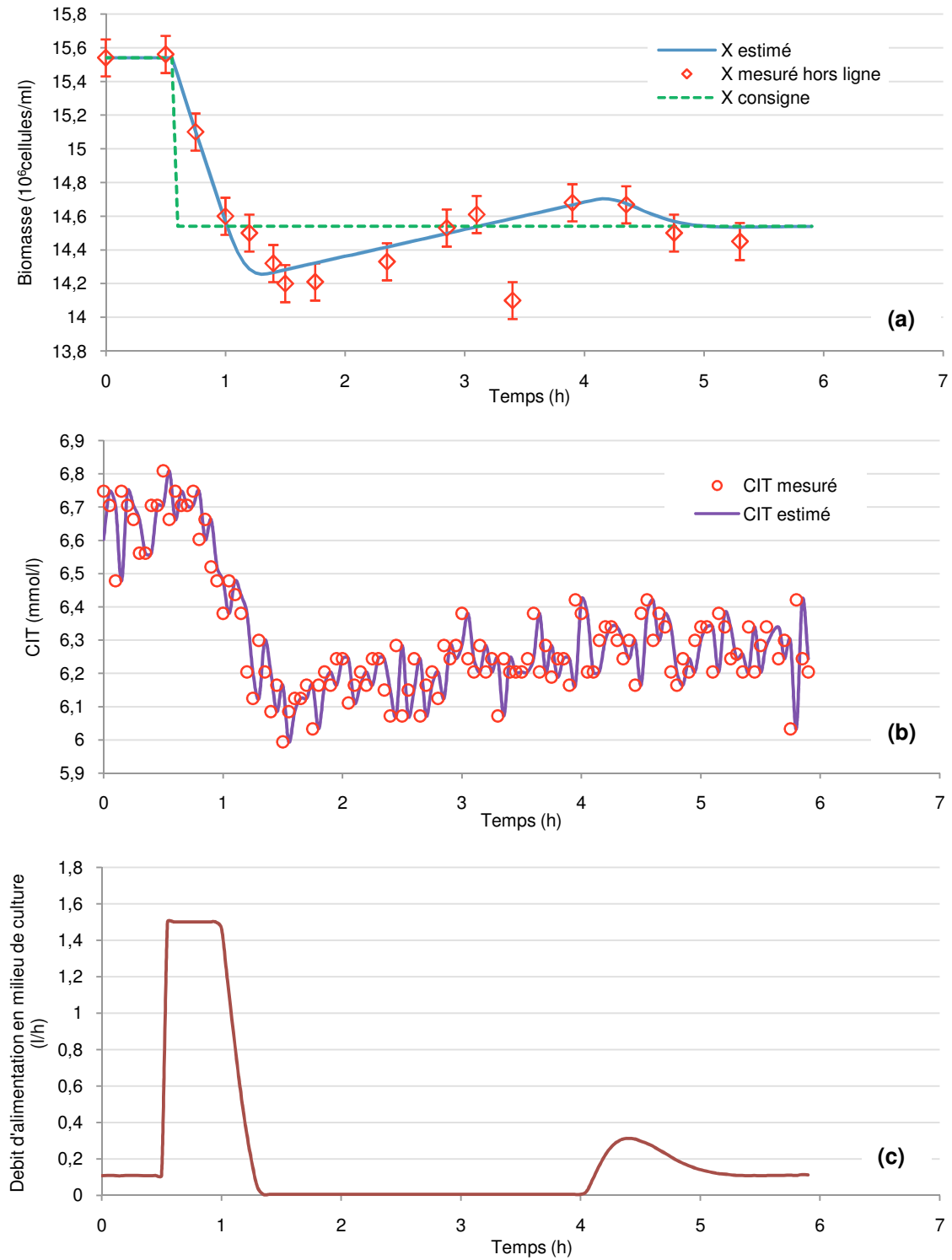


Figure 5.25: Commande linéarisante $y = X$ avec antiwindup ($K_s=0,0001$), comportement du système pour un échelon sur la consigne : passage de $15,54$ à $14,54 \cdot 10^6$ cellules/ml à $t=0,5$ h.

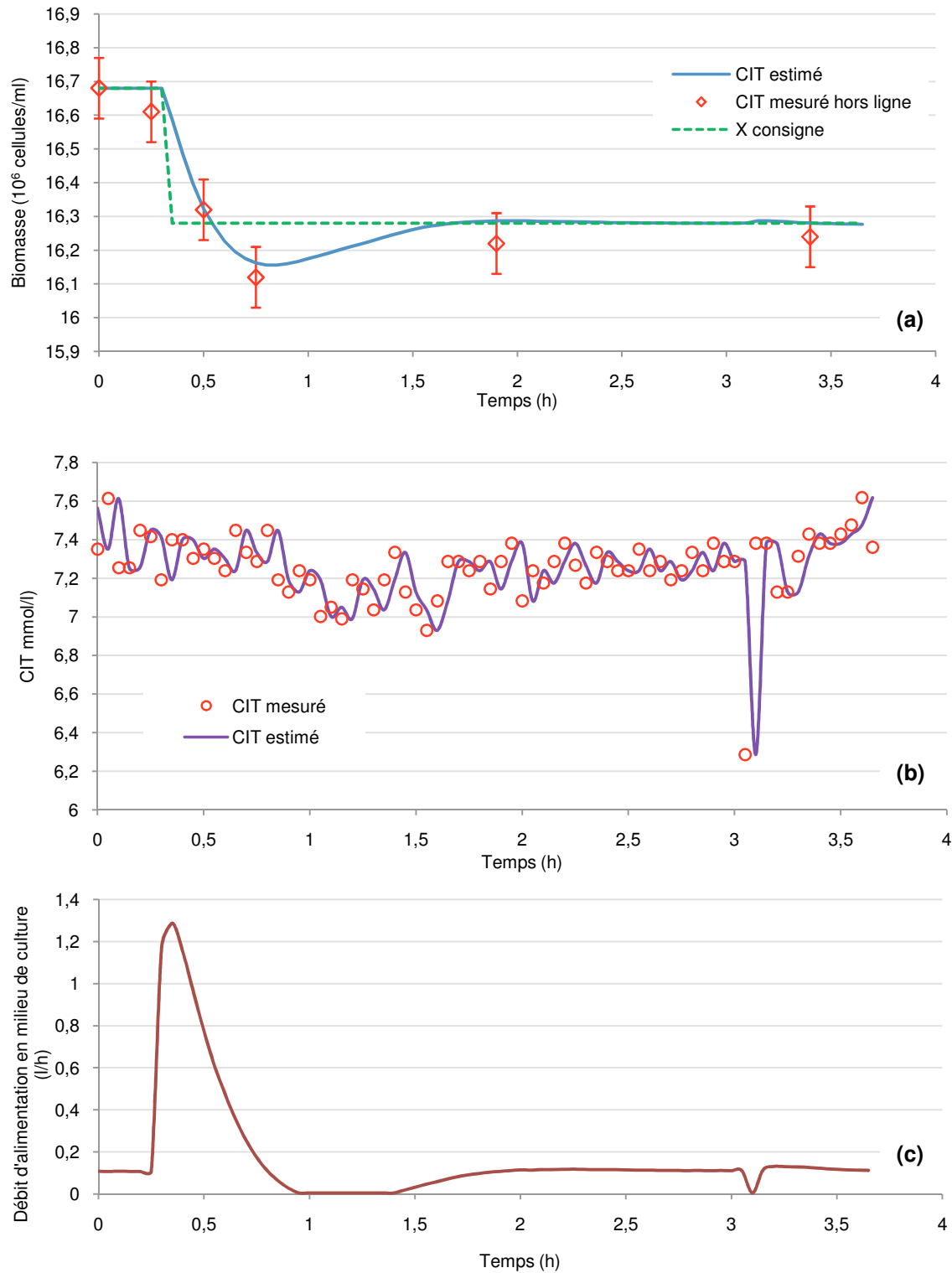


Figure 5.26 : Commande linéarisante $y = X$ avec antiwindup ($K_s=0,5$), comportement du système pour un échelon sur la consigne : passage de 16,68 à 16,28. 10^6 cellules/ml à $t=0,25$ h.

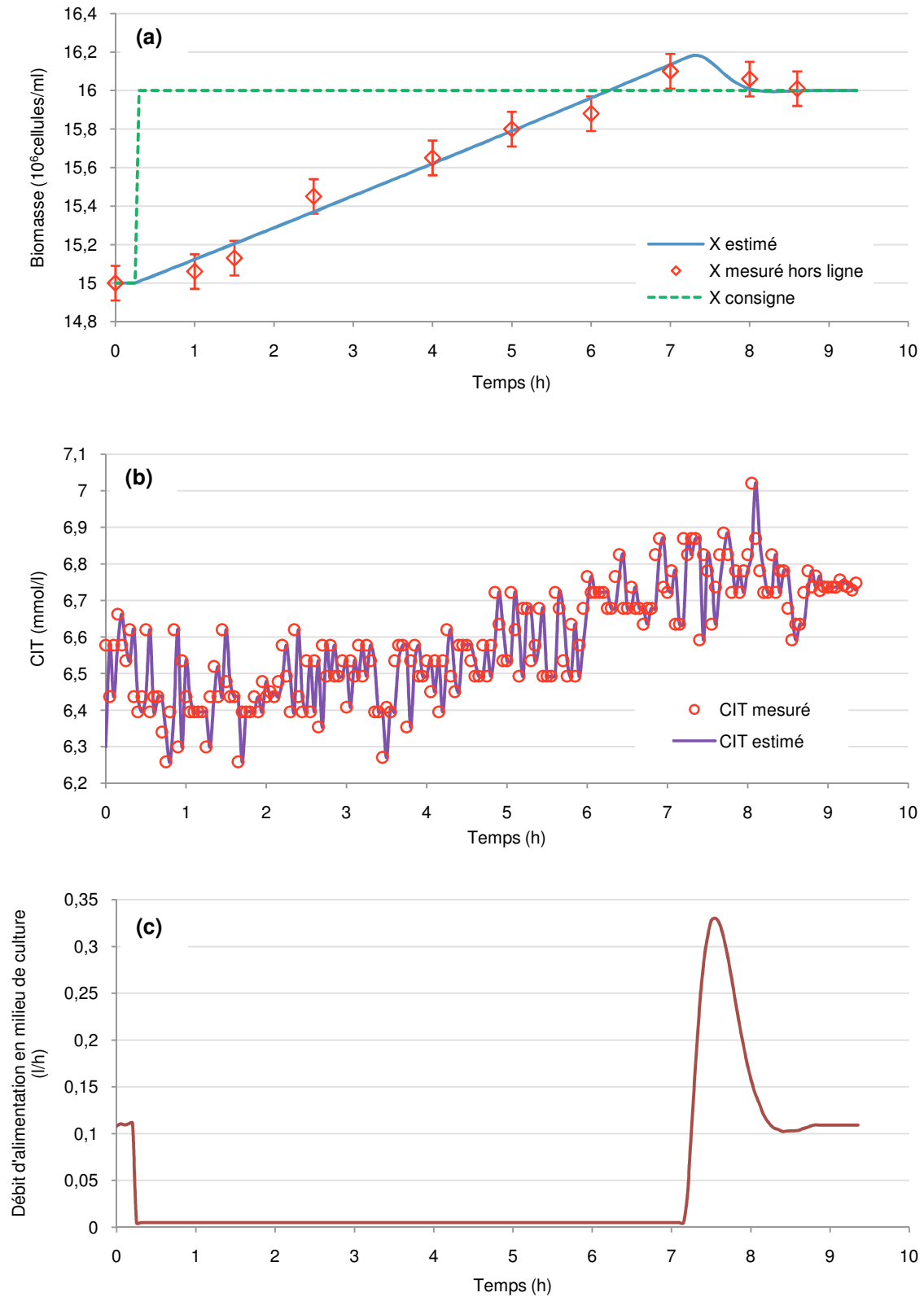


Figure 5.27 : Commande linéarisante $y = X$ avec antiwindup ($K_s=0,5$), comportement du système pour un échelon sur la consigne : passage de 15 à 16. 10^6 cellules/ml à $t=0,25$ h

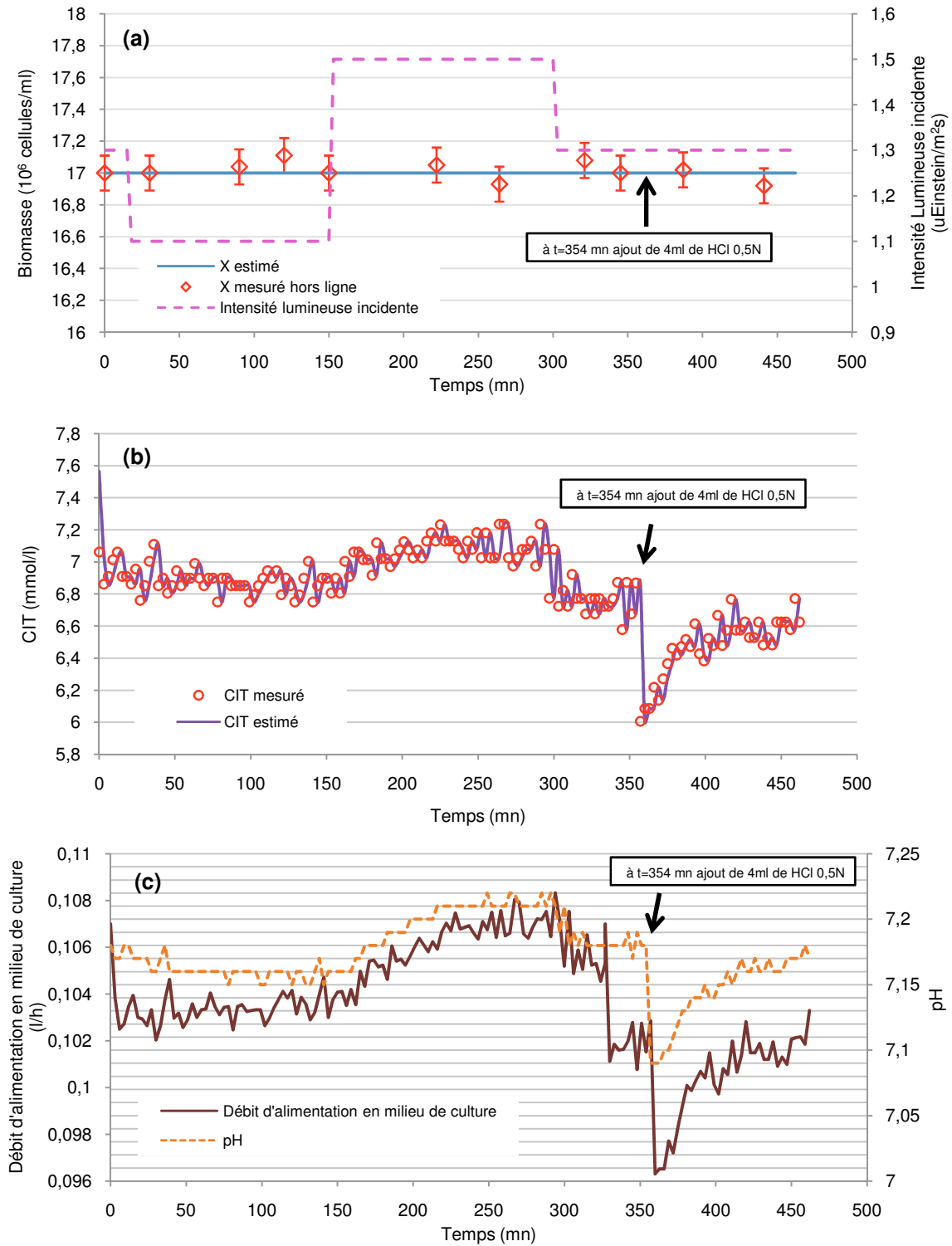


Figure 5.28 : Commande linéarisante $y = X$ avec antiwindup ($K_s=0,5$), comportement du système pour des perturbations en lumière et en pH

5.6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté le photobioréacteur conçu et construit pour valider le filtre de Kalman étendu et les lois de commande proposées dans cette thèse. Plusieurs tentatives de culture ont été réalisées avant de pouvoir valider ces algorithmes. Les premiers essais, qui n'ont pas été exploitables, nous ont permis de résoudre un certain nombre de problèmes et de trouver l'équipement nécessaire et la configuration optimale pour la culture de microalgues dans le photobioréacteur. Les mesures obtenues (notamment celle du *CIT*) sont réalisées en ligne et sont de bonne qualité. Grâce à cette mesure, le filtre de Kalman étendu a été calibré et validé. La performance est satisfaisante. Avec cet outil, la validation des lois de commande est réalisable.

Le temps nous manquant, nous n'avons pu tester toutes les lois de commande proposées dans ce travail de thèse et nous avons été limités à tester la commande linéarisante $y = X$ qui présentait de bonnes performances en simulation et la commande *GMC*.

Les mesures de la biomasse hors ligne nous permettent d'affirmer que le couplage filtre de Kalman étendu - loi de commande appliqué sur le système est très satisfaisant. Le filtre présente des bons résultats concernant le suivi de l'évolution de la biomasse dans le photobioréacteur.

Conclusions

Ce travail de thèse a permis de proposer un système de commande et de régulation de la production de la microalgue *Porphyridium purpureum* dans un photobioréacteur fonctionnant en mode continu. L'objectif étant de maintenir les microalgues dans leur phase de croissance exponentielle en agissant sur le débit d'alimentation en milieu de culture.

Cette thèse s'est déroulée en plusieurs étapes successives : choix de la microalgue à étudier, choix du modèle mathématique décrivant la croissance de la microalgue dans un photobioréacteur, identification des paramètres à partir des données expérimentales, validation du modèle, développement d'un capteur logiciel pour estimer la concentration en biomasse dans la culture, définition de la stratégie et synthèse des lois de commande, validation expérimentale du capteur logiciel et des lois de commande retenues.

1. *Choix de la microalgue* : La microalgue choisie est *Porphyridium purpureum*. Le grand nombre de travaux la concernant, la maîtrise et la connaissance des paramètres essentiels de la culture suite aux expériences menées par le Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux (LGPM) ont motivé notre choix.
2. *Choix du modèle mathématique décrivant la croissance de la microalgue dans un photobioréacteur* : Le modèle dynamique retenu est le résultat de la combinaison des bilans massiques de la biomasse et du carbone inorganique total, d'un modèle cinétique pour *Porphyridium purpureum* (Baquerisse, 1999), d'un terme de transfert du CO_2 et d'un modèle relatif à l'énergie lumineuse (Krystallidis, 1994). Ces modèles ont été développés au sein du laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux. La vitesse spécifique de croissance μ est principalement influencée par l'énergie lumineuse par cellule et par la concentration en carbone inorganique total.
3. *Identification des paramètres* : Le modèle contient cinq paramètres spécifiques à la microalgue étudiée (μ_{max} , CIT_{opt} , E_{opt} , C_1 et C_2). Ils ont été identifiés sur la base des

données expérimentales. Des expériences ont été planifiées en vue d'obtenir des paramètres fiables. Cette tâche a été particulièrement difficile vu le temps nécessaire pour réaliser les expériences (celles-ci s'étendent sur plusieurs semaines). Ainsi, quatre expériences ont été menées en prenant en compte les facteurs les plus importants pour la croissance de *Porphyridium purpureum* d'après l'étude bibliographique : l'intensité lumineuse incidente et le pourcentage de CO₂ dans le gaz d'alimentation. Deux expériences supplémentaires, servant à l'étude de répétabilité, ont été menées dans les conditions optimales de croissance connues. La régression de paramètres a été réalisée en utilisant le logiciel *Aspen Custom Modeler*® et la méthode des moindres carrés qui minimise l'erreur carrée absolue entre la valeur observée et la valeur prédite pour le modèle.

4. *Validation du modèle* : Une fois les données expérimentales disponibles, celles-ci ont été séparées en deux jeux de données distincts : le premier a été utilisé pour l'identification des paramètres et le second pour la validation. Cette validation nous a permis de vérifier que les paramètres identifiés permettent de bien reproduire la dynamique du procédé.
5. *Développement d'un capteur logiciel* : La mise en place du système de commande et de régulation de la production est passée par le développement d'un capteur logiciel qui a permis de fournir une estimation de la biomasse à partir des mesures réalisées en ligne. En effet, cette variable, qui n'est obtenue que par des mesures hors-ligne, rendait difficile la régulation de cette variable en temps réel. Plusieurs techniques ont été testées avant de choisir la plus appropriée. Le choix de l'observateur a reposé sur l'analyse de la fiabilité du modèle et des mesures disponibles. Il s'agit d'un filtre de Kalman étendu qui estime la concentration en biomasse à partir de la mesure en ligne de la concentration en carbone inorganique total. L'observateur proposé qui considère aussi bien un modèle continu que discret, suppose que les paramètres du modèle sont connus. Les simulations numériques et les données expérimentales témoignent d'une performance satisfaisante sous réserve que les conditions d'utilisation soient bonnes, comme indiqué dans le chapitre III.
6. *Définition de la stratégie et synthèse des lois de commande* : Notre système de commande comporte trois éléments : le photobioréacteur (c'est l'objet que l'on souhaite commander), les variables de sortie ou mesurées (concentration en biomasse estimée et concentration en carbone inorganique total mesurée en ligne) et la variable d'entrée ou de commande (débit d'alimentation en milieu de culture) dont la manipulation affecte les variables de sortie et rend possible la commande. Plusieurs stratégies ont été proposées : commande non-linéaire et linéaire, régulation par *PID*, commande par modèle générique

GMC, commande linéarisante par retour d'état et commande prédictive non-linéaire CPNL. Les résultats en simulation nous ont permis de retenir deux stratégies proposées : linéarisante par retour d'état et CPNL. Ces deux structures conduisent à de bons résultats en suivi de consigne et en présence des perturbations. Les bons résultats se traduisent en termes de robustesse, de rapidité et de dépassement faible.

7. *Validation expérimentale du capteur logiciel et des lois de commande retenues* : Le filtre de Kalman étendu et les commandes retenues ont été implémentées sur un nouveau photobioréacteur de 9,6 litres. La culture de *Porphyridium purpureum* en mode continu nous a permis de valider en temps réel le capteur logiciel et la commande linéarisante par retour d'état. Les performances sont satisfaisantes.

Les différentes étapes présentées dans ce manuscrit ont permis de proposer un système de régulation de la production de *Porphyridium purpureum* dans un photobioréacteur continu. Comme expliqué au chapitre V, l'implémentation initialement prévue de la commande prédictive non-linéaire sur le photobioréacteur n'a malheureusement pas pu être réalisée suite à une contrainte de temps.

Perspectives

Ce travail de thèse laisse apparaître de nombreuses perspectives au niveau théorique et au niveau expérimental.

Concernant le système de commande, quatre aspects peuvent constituer une suite à ce travail :

- Il serait intéressant de compléter la validation expérimentale par la mise en œuvre de la commande prédictive non-linéaire qui montre de bons résultats en simulation.
- Une autre piste à explorer concerne la prise en compte de l'intensité lumineuse incidente en tant que variable dans le système de régulation. Les expériences réalisées montrent l'importance de cette grandeur qui, jusqu'à maintenant, a été considérée comme constante faute de pouvoir la faire varier. Le démarrage d'une culture est un exercice délicat car la faible concentration algale est très sensible à la lumière qui, en excès, peut entraîner la non-viabilité des microalgues.
- Une troisième suite naturelle à cette étude serait d'appliquer le filtre de Kalman étendu et les lois de commande proposées à de nouvelles souches microalgales. Ceci passe évidemment par une nouvelle identification des paramètres du modèle inhérents à la nouvelle microalgue choisie.
- Nous avons participé dans la mise en œuvre d'un filtre de Kalman UKF (Unscented Kalman Filter) proposé par Marafioti (2009) qui a pour objectif d'estimer la concentration en biomasse et la vitesse maximale de croissance dans un photobioréacteur. L'implémentation de cet algorithme sur le photobioréacteur instrumenté est à prévoir.

Au niveau de la structure du photobioréacteur, plusieurs améliorations peuvent être envisagées. La première serait de modifier sa structure de façon à pouvoir le démonter et le

nettoyer facilement, élément par élément. Une deuxième amélioration possible consiste à installer un système de raclage des parois latérales qui empêcherait le dépôt d'algues gênant pour la propagation de la lumière à l'intérieur de la culture. Il est aussi possible de coupler le granulomètre utilisé pour le dénombrement microalgal au photobioréacteur par un simple système de recirculation. Il restera à résoudre le problème de transmission des données vers l'ordinateur qui centralise l'acquisition des principales variables mesurées et le nettoyage de la cellule de mesure après chaque série de mesures.

Un système de filtration tangentielle pourrait être associé à la boucle de recirculation du photobioréacteur de manière à pouvoir faire varier rapidement la concentration algale dans la culture. Cet appareillage aura pour tâche d'augmenter rapidement la concentration cellulaire en faisant varier le volume de la culture. Cela peut s'avérer utile dans le cas où la nouvelle consigne est supérieure à la concentration mesurée où la lenteur de la croissance des algues pénalise sensiblement les performances des lois de commande (cf. figure 5.27). Cette variation pourra être compensée par l'ajout du milieu de culture propre afin de limiter la présence des polysaccharides que l'on pourrait récupérer par des moyens physicochimiques appropriés.

Par ailleurs, le recyclage du milieu de culture pourrait être envisagé dans des études ultérieures. Dans ce cas, il faut compléter le matériel existant par des analyseurs permettant de caractériser et de mesurer les espèces chimiques présentes dans le milieu. La carence en certaines molécules devrait être ajustée à la valeur donnée dans le milieu original. Il est à noter qu'un excès de polysaccharides peut altérer le milieu et donc un traitement additionnel sera nécessaire.

Références Bibliographiques

Acién Fernández F.G., *Operación en continuo de fotobiorreactores tubulares externos con la microalga Phaedodactylum tricornutum*, Tesis Doctoral, Universidad de Almería, España, 1996.

Acién Fernández F.G., J.M. Fernández Sevilla, J.A. Sánchez Pérez, E. Molina Grima and Y. Chisti, « Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance », *Chemical Engineering Science*, 56, pp. 2721-2732, 2001.

Adda M., J.C. Merchuk and S. Arad, « Effect of nitrate on growth and production of cell wall polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium* », *Biomass*, 10, pp. 131-140, 1986.

Ahern T.J., S. Katoh and E. Sada, « Arachidonic acid production by the red alga *Porphyridium cruentum* », *Biotechnology and Bioengineering*, 25, pp. 1057-1070, 1983.

Aiba S., « Growth kinetics of photosynthetic microorganisms », *Advances in Biochemical Engineering*, 23, pp. 85-156, 1982.

Arad S., D.O. Friedman and A. Rotem, « Effect of nitrogen on polysaccharide production in *Porphyridium* sp. », *Applied and Environmental Microbiology*, 54, pp.2411-2414, 1988.

Arad S. and A. Richmond, « Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-species of high potential: *Porphyridium* sp. », In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 289-297, 2004.

Åström K. and T. Hägglund, *PID Controllers: Theory, Design and Tuning*, Research Triangle Park, NC, Instrument Society of America, 1995.

Bailey J.E; and D.F. Ollis, « Biochemical Engineering Fundamentals », McGraw Hill, New York, 1986.

Balsa-Canto E., J.R. Banga, A.A. Alonso and V.S. Vassiliadis, « Dynamic optimization of chemical and biochemical processes using restricted second-order information », *Computers and Chemical Engineering*, 25, pp. 539-546, 2001.

Baños A. and F. Lamnabhi-Lagarrigue, *Advances in the control of nonlinear systems, Lecture notes in Control and Information Sciences*, F.J. Montoya (ed.), Springer-Verlag London Ltd., 2001.

Baquerisse D., *Utilisation de la simulation dynamique des procédés pour la conduite et le contrôle commande des bioréacteurs*. Thèse Doctorale, Ecole Centrale Paris, France, 1999.

Bastin G. and D. Dochain, *On-line estimation and adaptive control of bioreactors*, Elsevier, Amsterdam, 1990.

Becerra-Celis G., G. Hafidi, S. Tebbani, D. Dumur and A. Isambert, « Non-linear predictive control for continuous microalgae cultivation process in a photobioreactor », *ICARCV 10th International Conference on Control, Automation, Robotics and Vision*, Hanoi, Vietnam, December 17-20, 2008.

Becker W. (a), « Microalgae in human and animal nutrition », In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 312-351, 2004.

Becker W. (b), « Microalgae for Aquaculture. The nutritional value of microalgae for aquaculture », In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 380-391, 2004.

Benemann J.R., « CO₂ mitigation with microalgae systems », *Energy Conversion and Management*, 38 (1), pp. 475-479, 1997.

Benemann J.R., « Hydrogen production by microalgae », *Journal of Applied Phycology*, 12 (3-5), pp. 291-300, 2000.

Berenguel M., F. Rodriguez, F.G. Acien, J.L. García, « Model predictive control of pH in tubular photobioreactors », *Journal of Process Control*, 14, pp. 377-387, 2004)

Bermejo R., J.M. Alvarez Pez, F.G. Acien Fernandez and E. Molina Grima, « Recovery of pure β -phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* », *Journal of Biotechnology*, 93, pp. 73-85, 2002.

Bernard O., A. Sciandra and G. Sallet, « A non-linear software sensor to monitor the internal nitrogen quota of phytoplanktonic cells », *Oceanologica Acta*, 24(05), pp.435-442, 2001.

Bernard O. and J.L. Gouzé, « Global qualitative description of a class of nonlinear dynamical systems », *Artificial Intelligence*, 136, pp. 29-59, 2002.

Besançon-Voda A. and S. Gentil, « *Régulateurs PID analogiques et numériques* », Techniques de l'Ingénieur, Paris, 1999.

Borowitzka M.A. and L.J. Borowitzka, « *Dunaliella* », In: *Microalgal Biotechnology*, Borowitzka M. and Borowitzka J. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1988.

Borowitzka M.A., « Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters », *Journal of Biotechnology*, 70 (1-3), pp. 313-321, 1999.

Boucher P. et D. Dumur, *La Commande Predictive*, editions Technip, Paris, 1996.

Boussiba S. and S. Leu, « Microalgal biotechnology for environmental remediation », *7th European Workshop « Biotechnology of Microalgae »*, Juin 11-13, Nuthetal, Germany, 2007.

Brown L., « Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae », *Energy Conversion Management*, 37, pp. 1363-1367, 1996.

Cañizares R.O., A.R. Domínguez, L. Rivas, M.C. Montes, L. Travieso and F. Benitez, « Free and immobilized cultures of *Spirulina maxima* for swine waste treatment », *Biotechnology Letters*, 15(3), pp. 321-326, 1993.

Camacho Rubio F., F. G. Acien Fernández, J.A. Sánchez Pérez, F. Garcia Camacho and E. Molina Grima, « Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture », *Biotechnology and Bioengineering*, 62(1), pp.71-86, 1999.

Cao Y.Y, Z. Lin and DG. Ward, « An antiwindup approach to enlarging domain of attraction for linear systems subject to actuator saturation », *IEEE Transactions on Automatic Control*, 47(1), pp. 140-145, 2002.

Carvalho A.P. and F.X. Malcata, « Kinetic modelling of the autotrophic growth of *Pavlova lutheri*: study of the combined influence of light and temperature », *Biotechnology Progress*, 19, pp. 1128-1135, 2003.

Certik M. and S. Shimizu, « Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production », *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87 (1), pp. 1-14, 1999)

Chisti Y. and M. Moo-Young, « Fermentation technology, bioprocessing, scale-up and manufacture », In: *Biotechnology: the Science and the Business*, D. Springham, V. Moses & R.E. Cape (eds.), Harwood Academic Publishers, New York, pp. 177-222, 1999.

- Chisti Y.**, « Biodiesel from microalgae », *Biotechnology Advances*, pp. 294-306, 2007.
- Chiu S.Y., C.Y. Kao, C.S. Chen, T.C. Kuan, S.C. Ong and C.S. Lin**, « Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor », *Bioresource Technology*, 99, pp. 3389-3396, 2008.
- Cifuentes A.S., M.A. Gonzales, I. Inostroza and A. Aguilera**, « Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment contents across a salinity gradient », *Journal of Phycology*, 37, pp. 334-344, 2001.
- Collier J.L. and A.R. Grossman**, « Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC7942: not all bleaching is the same », *The Journal of Bacteriology*, 174, pp. 4718-4726, 1992.
- Cornet J.F., C.G. Dussap, P. Cluzel and G. Dubertret**, « A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: Identification of kinetics parameters under light and mineral limitations », *Biotechnology and Bioengineering*, 40, pp. 826-834, 1992.
- Cornet J.-F., C.G. Dussap, J.-B. Gros**, « A simplified monodimensional approach for modelling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors », *Chemical Engineering Science*, 50 (9), pp. 1489-1500, 1995.
- Cornet J.-F., C.G. Dussap, J.-B. Gros**, « Kinetics and energetic of photosynthetic micro-organisms in photobioreactors: application to spirulina growth », *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 59, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 153-222, 1998.
- Cornet J.F.**, « Les photobioréacteurs », *Biofutur*, 176, pp. 2-10, 1998.
- Couté A.**, « Diversité chez les microalgues », *Techniques sciences méthodes, génie urbain génie rural*, 1, pp. 20-24, 1995.
- Coutteau P.**, « Micro-Algae », In: *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*, Patrick L. and Patrick S. (eds.), FAO Fisheries Technical Paper 361, 1996.
- Csögör Z., M. Herrenbauer, I. Perner, K. Schmidt and C. Posten**, « Design of photo-bioreactor for modeling purposes », *Chemical Engineering and Processing*, 38, pp. 517-523, 1999.
- Cutler C.R. and B.L. Ramaker**, « Dynamic matrix control: a computer control algorithm », *Joint Automatic Control Conference*, San Francisco, CA, 1980.
- Danxiang H., B. Yonghong and H. Zhengyu**, « Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products - Species of high potential: *Nostoc* », In: *Handbook of*

Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp.304-311, 2004.

Del Campo J.A., J. Moreno, H. Rodriguez, M.A. Vargas, J. Rivas and M.G. Guerrero, « Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta) », *Journal of Biotechnology*, 76(1), pp. 51-59, 2000.

Degrenne B., J. Pruvost, S. Fouchard and J. Legrand, « Development of a lab-scale photobioreactor for the investigation of hydrogen production by microalgae », *7th European Workshop « Biotechnology of Microalgae »*, Juin 11-13, Nuthetal, Germany, 2007.

Dermoun D., *Ecophysiologie de Porphyridium purpureum : validation expérimentale d'un modèle de croissance – étude de la production de polysaccharide*, Thèse Doctorale, Université de Technologie de Compiègne, France, 1987.

Dochain D., *Automatique des bioprocédés*, Hermes Science Europe Ltd, Paris, 2001

Droop M.R., « 25 years of algal growth kinetics », *Botanica Marina*, 26, pp. 99-112, 1983.

Dufossé L., P. Galaup, A. Yaron, S.M. Arad, P. Blanc, K.N.C. Murthy and G.A. Ravishankar, « Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? », *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), pp. 389-406, 2005.

Estrada Duran S.L., *Simulation dynamique des photobioréacteurs : Etude de l'influence de l'azote et du phosphore sur la croissance de Porphyridium purpureum*, Thèse Doctorale, Ecole Centrale Paris, France, 2007.

Farza M., H. Hammouri, S. Othman and K. Busawon, « Nonlinear observer for parameter estimation in bioprocesses », *Chemical Engineering Science*, 52 (23), pp. 4251-4267, 1997.

Fleck-Schneider P., F. Lehr and C. Posten, « Modelling of growth and product formation of *Porphyridium purpureum* », *Journal of Biotechnology*, 132, pp.134-141, 2007.

Fox R.D., *Spiruline, Technique, pratique et promesse*, Edisud, France, 1999.

Reboloso Fuentes M.M., F.G. Acién Fernández, J.A. Pérez Sánchez and J.L. Guil Guerrero, « Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum* », *Food Chemistry*, 70(3), 345-353, 2000.

García-González M., J. Moreno, J.C. Manzano, F.J. Florencio and M. Guerrero, « Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-*cis*- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor », *Journal of Biotechnology*, 115(1), pp. 81-90, 2005.

Ghirardi M.L., L. Zhang, J.W. Lee, T. Flynn, M. Seibert, E. Greenbaum and A. Melis, « Microalgae: a green source of renewable H₂ », *Trends in Biotechnology*, 18, pp. 506-511, 2000.

Girardin-Andréani C., « Spiruline: système sanguin, système immunitaire et cancer », *Phytothérapie*, 3(4), pp. 158-161, 2005.

Godia F., J. Albiol, J.L. Montesinos, J. Pérez, N. Creus, F. Cabello, X. Mengual, A. Montràs and Ch. Lasseur, « MELISSA: a loop of interconnected bioreactors to develop life support in Space », *Journal of Biotechnology*, 99, pp. 319-330, 2002.

Godia F., J. Albiol, J. Pérez, N. Creus, F. Cabello, A. Montràs, A. Masot and Ch. Lasseur, « MELISSA pilot plant facility as an integration test-bed for advanced life support systems », *Advances in Space Research*, 34 (7), pp.1483-1493, 2004.

Golueke C.G. and W.J. Oswald, « The mass culture of *Porphyridium purpureum* », *Applied and Environmental Microbiology*, 10(2), pp. 102-107, 1962.

Gomes da Silva J.M. and S. Tarbouriech, « Antiwindup design with guaranteed regions of stability: an LMI-based approach », *IEEE Transactions on Automatic Control*, 50 (1), pp. 106-111, 2005.

Gorecki M., Y. Beck, J.R. Hartman, M. Fischer, L. Weiss, Z. Tochner, S. Slavin and A. Nimrod, « Recombinant human superoxide dismutases: production and potential therapeutical uses », *Free Radical Research Communications*, 12-13, pp. 1401-1410, 1991.

Greque de Moraes M. and J.A. Vieira Costa (a), « Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor », *Journal of Biotechnology*, 129, pp 439-445, 2007.

Greque de Moraes M. and J.A. Vieira Costa (b), « Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flask and vertical tubular photobioreactor », *Biotechnology Letters*, 29, pp 1349-1352, 2007.

Grobbelar J.U. and C.J. Soeder, « Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds », *Journal of Plankton Research*, 7(4), pp. 497-506, 1985.

Grover J.P., « Non-steady state dynamics of algal population growth: experiments with two chlorophytes », *Journal of Phycology*, 27, pp. 70-79, 1991.

Guerin M, M.E. Huntley and M. Olaizola, « *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition », *Trends in Biotechnology*, 21 (5), pp. 210-216, 2003.

Hafidi, G., *Aplication de la commande prédictive non-linéaire à la commande de culture de bactéries Escherichia coli*. Thèse Doctorale, Supélec, Université Paris-Sud 11, France, 2008.

Hallenbeck P.C. and J.R. Benemann, « Biological hydrogen production: fundamentals and limiting processes », *International Journal of Hydrogen Energy*, 27 (11-12), pp. 1185-1193, 2002.

Hemerick G., « Culture methods and growth measurements », In: *Handbook of Phycological Methods*, Stein J.R. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 259-260, 1973.

Higbie, R., « The rate of absorption of a pure gas into a still liquid during short periods of exposure », *Transactions American Institute of Chemical Engineers*, 35, pp. 36-60. 1935.

Hilgert N., J. Harmand, J.P. Steyer and J.P. Vila, « Non parametric identification and adaptive control of an anaerobic fluidized bed digester », *Control Engineering Practice*, 8, pp. 367-376, 2000.

Hu Q., « Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products - Species of high potential: *Arthrospira* (Spirulina) *platensis* », In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 264-272, 2004.

Iqbal M., S.I. Zafar, G. Stefan-Sarkissian and M. W.Fowler, « Indoor mass cultivation of red alga *Porphyridium cruentum* in different types of bioreactors: effect of scale-up and vessel shape », *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75, pp. 76-78, 1993.

Isidori A., *Nonlinear control systems*, Springer-Verlag (ed.), Berlin, 1989.

Jenzsch M., Simutis R. and A. Luebbert, « Generic model control of the specific growth rate in recombinant *Escherichia coli* cultivations », *Journal of Biotechnology*, 122, pp. 483-493, 2006.

Hussenot J., S. Lefebvre and N. Brossard, « Open-air treatment of wastewater from land-based marine fish farms in extensive and intensive systems: current technology and future perspectives », *Aquatic Living Resources*, 11(4), pp. 297-304, 1998.

Iwamoto H. and S. Sato, « EPA production by freshwater algae », *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63, pp. 434, 1986.

Jørgensen J.B., M.R. Kristensen, P.G. Thomsen and H. Madsen, « A numerically Robust ESDIRK-based implementation of the continuous-discrete extended Kalman filter », *Proceedings of the European Control Conference*, July 2-5, Kos, Greece, 2007.

Kalman R.E., « A new approach to linear filtering and prediction problems », *Transactions of the ASME - Journal of Basic Engineering*, 82(1), pp. 35-45, 1960.

Keffer J.E and G.T. Kleinheinz, « Use of *Chlorella vulgaris* for CO₂ mitigation in a photobioreactor », *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29, pp. 275-280, 2002.

Khozin-Goldberg I., Z. Cohen, M. Pimenta-Leibowitz, J. Nechev, D. Zilberg, « Feeding with arachidonic acid-rich triacylglycerols from the microalga *Parietochloris incisa* improved recovery of guppies from infection with *Tetrahymena* sp. », *Aquaculture*, 255, pp. 142-150, 2006.

Krystallidis A., *Application du génie des procédés aux biotechnologies marines : étude de faisabilité, modélisation et simulation dynamique d'un procédé de culture de microalgues*, Thèse Doctorale, Ecole Centrale Paris, France, 1994.

Koller E., « Génie chimique », Dunod, Paris, 2001.

Kurth E., O; Pulz and H.R. Glatt, « Protective natural substances from algae as protection against mutagenic damages », *7th European Workshop « Biotechnology of Microalgae »*, June 11-13, Nuthetal, Germany, 2007.

Lee E.T.Y. and M.J. Bazin, « Environmental factors influencing photosynthetic efficiency of the micro red alga *Porphyridium cruentum* in light-limited cultures », *New Phytologist*, 118, pp. 513-519, 1991.

Lee Y-K. and H. Shen, « Basic culturing techniques », In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 40-56, 2004.

Lee P.L and G.R. Sullivan, « Generic model control (GMC), *Computers and Chemical Engineering*, 12, pp. 573-580, 1988.

Lequesne D., « Régulation P.I.D. : Analogique - numérique - floue », Hermès-Lavoisier, Paris, 2006.

Leveau J.Y. and M. Bouix, « Le transfert d'oxygène », In: *Biotechnology*, Scriban R. (ed.), Lavoisier Tec. Doc., Paris, pp. 243-245, 1988.

Li J., N.S. Xu and W. Wen Su, « Online estimation of stirred-tank microalgal photobioreactor cultures based on dissolved oxygen measurement », *Biochemical Engineering Journal*, 14, pp. 51-61, 2003.

Lucumi A. and C. Posten, « Establishment of long-term perfusion cultures of recombinant moss in a photobioreactor », *Process Biochemistry*, 41, pp.2180-2187, 2006.

Luenberger D.G., « Introduction to observers », *IEEE Transactions on Automatic Control*, 16(6), pp. 596-602, 1971.

Maillet L., O. Bernard and J.P. Steyer, « Nonlinear adaptive control for bioreactors with unknown kinetics », *Automatica*, 40, pp. 1379-1385, 2004.

Marafioti G., S. Tebbani, D. Beauvois, G. Becerra-Celis, A. Isambert and M. Hovd, « Unscented Kalman filter state and parameter estimation in a photobioreactor for microalgae production », *ADCHEM 2009, International Symposium on Advanced Control of Chemical Processes*, Istanbul, Turkey, July 12-15, 2009 (Envoyé).

Marcos N.I., M. Guay and D. Dochain, « Output feedback adaptive extremum seeking control of a continuous stirred tank bioreactor with Monod's kinetics », *Journal of Process Control*, 14, pp. 807-818, 2004.

Marschner H., *Mineral nutrition of higher plants*, Academic Press, 243 pp., 1995.

Martinez Sancho M.E., J.M. Jimenez Castillo and F. El Yousi, « Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus* », *Bioresource Technology*, 67, pp. 233-240, 1999.

Marty A., J.F. Cornet, G. Djelveh, C. Larroche and J.B. Gros, « A gas phase chromatography method for determination of low dissolved CO₂ concentration and/or CO₂ solubility in microbial culture media », *Biotechnology Techniques*, 9(11), pp. 787-792, 1995.

Masojídek J., M. Koblízek and G. Torzillo, « Photosynthesis in microalgae », In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 3-19, 2004.

Mayne D.Q., J.B. Rawlings, C.V. Rao and P.O. Scokaert, « Constrained model predictive control: stability and optimality », *Automatica*, 36, pp.789-814, 2000.

Meireles L.A., A.C. Guedes, C.R. Barbosa, J.L. Azevedo, J.P. Cunha and F.X. Malcata, « On-line control of light intensity in a microalgal bioreactor using a novel automatic system », *Enzyme and Microbial Technology*, 42, pp. 554-559, 2008.

Melis A., L. Zhang, M. Forestier, M.L. Ghirardi and M. Seibert, « Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* », *Plant Physiology*, 122, pp. 127-136, 2000.

Melis A. and T. Happe, « Hydrogen production: Green algae as a source of energy », *Plant Physiology*, 127, pp. 740-748, 2001.

Melis A. and T. Happe, « Trails of green alga hydrogen research – from Hans Gaffron to new frontiers », In : *Discoveries in Photosynthesis*, Springer Netherlands (ed.), pp. 681-689, 2006.

Merchuk J.C. and M. Gluz, « Bioreactors, air-lift reactors », In: *Encyclopaedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. John Wiley & Sons, Inc. (eds.), pp. 320-353, 1999.

Metting F.B., « Biodiversity and application of microalgae », *Journal of Industrial Microbiology*, 17, pp. 477-489, 1996.

Mojaat M., J. Pruvost, A. Foucault, J. Legrand, « Addition of Fe²⁺ ions and acetate in *Dunaliella salina* growth medium for continuous production of β -carotene enriched cells », *7th European Workshop « Biotechnology of Microalgae »*, Juin 11-13, Nuthetal, Germany, 2007.

Molina Grima E., J.M. Fernández Sevilla, J.A. Sánchez Pérez and F. García Camacho, « A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances », *Journal of Biotechnology*, 45, pp.59-69, 1996.

Moya M.J., M.L. Sanchez-Guardamino, A. Villavella and E. Barbera, « Growth of *Haematococcus lacustris*: A contribution to kinetics modeling », *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 68, pp. 303-309, 1997.

Muller-Feuga A., « Microalgues marines: Les enjeux de la recherche », Rapport IFREMER, 1997.

Muller-Feuga A., « Growth as a function of rationing: a model applicable to fish and microalgae », *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 236, pp. 1-13, 1999.

Muller-Feuga A., « The role of microalgae in aquaculture: situation and trends », *Journal of Applied Phycology*, 3-5 (12), pp. 527-534, 2000.

Mulyaldi A., *Etudes in vitro de la croissance et de la composition biochimique de Porphyridium cruentum et de Porphyridium aerugineum (Rhodophycées) – Implications sur la toxicité cutanée*, Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France, 1995.

Norgaard M., N. Poulsen and O. Ravn, « New developments in state estimation for nonlinear systems », *Automatica*, 36(11), pp. 1627-1638, 2000.

Nouals S., *Modélisation d'un photobioréacteur pour le pilotage de microalgues*, Thèse Doctorale, Ecole Centrale Paris, France, 2000.

Ogawa T. and S. Aiba, « Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* », *Biotechnology and Bioengineering*, 23, pp. 1121-1132, 1981.

Patnaik S., R.Sarkar and A. Mitra, « Alginate immobilization of *Spirulina platensis* for wastewater treatment », *Indian Journal of Experimental Biology*, 39, pp.824-826, 2001.

Pearson L. B.R.W Pinsent and F.J.W. Roughton, « The measurement of the rate of rapid reaction by a thermal method », *Discussions of the Faraday Society*, 17, pp. 141-145, 1954.

Pflug H.D., « Sur les premières traces géologiques de la vie », In: *Aux origines de la vie*, Fayard (ed.), Paris, pp. 51-103, 1987.

Pons M. N., Bioprocess monitoring and control, Hanser, Munich, 1992.

Pulz O. and K. Sheibenbogen, « Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input », *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 59, pp. 123-151, 1998.

Pulz O., « Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, pp. 287-293, 2001.

Ramaswamy S., T.J. Cutright and H.K. Qammar, « Control of a continuous bioreactor using model predictive control », *Process Biochemistry*, 40, pp. 2763-2770, 2005.

Ramesh N., « Factors affecting growth rates of *Scrippsiella* sp.: Light spectral quality, level and agitation », University of Rhode Island, pp. 35-40, 1997.

Ramus J.,B.E. Kenney and E.J. Shaughnessy, « Drag reducing properties of microalgal exopolymers », *Biotechnology and Bioengineering*, 33, pp. 550-556, 1989.

Rechter S., T.König, S. Auerochs, S. Thulke, H. Walter, H. Dörnenburg, C. Walter and M. Marschall, « Antiviral activity of Arthrospira-derived spirulan-like substances », *Antiviral Research*, 72, pp. 197-206, 2006.

Richalet J., S. Abu El Ata, C. Arber, M.B. Kuntze, A. Jacobasch and W. Schill, « Predictive functional control. Application to fast and accurate robots », Proceedings 10th IFAC World Congress, Munich, July 1987.

Richmond A., « Microalgal culture », CRC Critical Reviews. In : *Biotechnology*, pp. 369-438, 1987.

Ridley J.P., *Chemical Oceanography*, Vol. 1. Ridley (ed.), Academic Press, 1965.

Riley H., « Effects of algal fibre and perlite on physical properties of various soils and on potato nutrition and quality on a gravelly loam soil in southern Norway », *Acta Agriculturae Scandinavica*, 52, pp. 86-95, 2002.

Roizard, C., G. Wild et J-C. Charpentier, « Absorption avec réaction chimique », Techniques de l'Ingénieur, 1997.

Roger P., « N₂-fixing cyanobacteria as biofertilizers in rice fields », In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 392-402, 2004.

Sawayama S., S. Inoue, Y.D. Dote and S.Y. Yokoyama, « CO₂ fixation and oil production through microalga », *Energy Conversion Management*, 36, pp. 729-731, 1995.

Schlegel M., A. Hartwich and W. Marquardt, « Adaptive control vector parameterization for non-linear model-predictive control », *IFAC Workshop on NMPC for fast systems*, Grenoble, France, Oct. 2006.

Siguerdidjane H., « Systèmes non-linéaires » fascicule de cours École Supérieure d'Electricité SUPELEC, 2006.

Sheehan J., T. Dunahay, J. Benemann and P. Roessler, « A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from algae ». Prepared for : U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development, 1998.

Siaut M., C. Sahut, P. Carrier, S. Cuiné, C. Triantaphylides and G. Peltier, « Triacyl glycerol accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Neochloris oleoabundans* », *7th European Workshop « Biotechnology of Microalgae »*, Juin 11-13, Nuthetal, Germany, 2007.

Skjanes K., P. Lindblad and J. Muller, « BioCO₂ – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products », *Biomolecular Engineering*, 24, pp. 405-413, 2007.

Skulberg O.M., W.W. Carmichael, G.A. Codd and R. Skulberg, « Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria) », In. *Algal toxins in seafood and drinking water*, Falconer I. (ed.), Academic Press, London, pp. 145-164, 1993.

Soletto D., L. Binaghi, A. Lodi, J.C.M. Carvalho and A. Converti, « Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources », *Aquaculture*, 243, pp. 217-224, 2005.

Speer H.L., W. Dougherty and R.F. Jones, « Studies on the fine structure of the red alga *Porphyridium cruentum* », *Journal of Ultrastructure Research*, 11 (1-2), pp. 84-89, 1964.

Spolaore P., *Optimisation et modélisation de la croissance de microalgues en vue de la validation des performances d'un photobioréacteur pilote*, Thèse Doctorale, Ecole Centrale Paris, France, 2005.

Stewart C. and M.A. Hessami, « A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration—the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach », *Energy Conversion & Management*, 46, pp. 403-420, 2005.

Talbot P, M.P. Gortares, R.W. Lencki and J. de la Nouë, « Absorption of CO₂ in algal culture systems: a different characterization approach », *Biotechnology and Bioengineering*, 37, pp.834-842, 1991.

Tamiya H, E. Hase, K. Shibata, A. Iwamura and Y. Morimura, « Kinetics of growth of *Chlorella*, with special reference to its dependence on quantity of available light and temperature », In. *Algal culture: From Laboratory to Pilot Plant*, Burlew Carnegie Institute, Washington Publ., 600, pp. 76-84, 1953.

Tan K.K., Q.G. Wang and T. Hägglund, *Advances in PID Control*, London, Springer-Verlag, 1999.

Thurman H. V., *Introductory Oceanography*. New Jersey, USA: Prentice Hall College, 1997.

Tranchant J., *Manuel Pratique de Chromatographie en phase gazeuse*, Masson (ed.), Paris, 700 pp., 1995.

Tredici M.R. and G. Chini Zittelli, « Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors », *Biotechnology and Bioengineering*, 57, pp. 187-197, 1998.

Tomaselli L., « The microalgae cell », In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 3-19, 2004.

Ucko, M., E. Cohen, H. Gordin and S. Arad, « Relationship between the unicellular red alga *Porphyridium* sp. and its predator, the dinoflagellate *Gymnodinium* sp. », *Applied and Environmental Microbiology*, American Society of Microbiology, pp. 2990-2994, 1989.

Vassiliadis V.S., *Computational solution of dynamic optimization problems with general differential-algebraic constraints*, PhD Thesis, Imperial College, University of London London, UK, 1993.

Van Oorschot J.L.P. « Medelel Landbouwhogesschool te Wageningen », 55, pp. 225, 1955.

Velut S., L. de Maré and P. Hagander, « Bioreactor control using a probing feeding strategy and mid-ranging control », *Control Engineering Practice*, 15, pp. 135-137, 2007.

Villermaux J., *Génie de la réaction chimique : Conception et fonctionnement des réacteurs*, Technique et Documentation Lavoisier (ed.), Paris, 1995.

Vonshak A., Z. Cohen, and A. Richmond, « The feasibility of mass cultivation of *Porphyridium* », *Biomass*, 8 (01), pp. 13-25, 1985.

Vonshak A., « *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology », Taylor and Francis (eds.), 1987.

Vonshak A., « *Porphyridium* », In: *Microalgal Biotechnology*, Borowitzka M. and Borowitzka J. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1988.

Von Witsch H., « Mikro- und Makroalgen als Nahrungsmittel- Ein Überblick », *Ber. Dtsch. Bot. Bd.*, 83 (11), pp. 519-526, 1970.

Walter C., T. Steinau, N. Gerbsch, R. Buchholz, « Monoseptic cultivation of phototrophic microorganisms—development and scale-up of a photobioreactor system with thermal sterilization », *Biomolecular Engineering*, 20, pp. 261–271, 2003.

Wen Su W., J. Li and N.S. Xu, « State and parameter estimation of microalgal photobioreactor cultures based on local irradiance measurement », *Journal of Biotechnology*, 105, pp. 165-178, 2003.

Willems J.L., *Stability theory of dynamical systems*, Nelson (ed.), London, 1970.

Wu X. and J.C. Merchuk, « A model integrating fluid dynamics in photosynthesis and photoinhibition processes », *Chemical Engineering Science*, 56, pp. 3527-3538, 2001.

Yamaguchi, K., « Recent Advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: A review », *Journal of Applied Phycology*, 8, pp. 487-502, 1997.

You T. and S.M. Barnett, « Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum* », *Biochemical Engineering Journal*, 19, pp. 251-258, 2004.

Zarrouck C., *Contribution à l'étude d'une cyanophycée: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima*, Thèse de Doctorat, Université Paris XI, Orsay, France, 1966.

Sites Internet

<http://www.watertwinning.saglik.gov.tr> (Consulté le 19 juin 2008)

<http://protist.i.hosei.ac.jp> (Consulté le 20 juin 2008)

<http://www.microscopy-uk.org.uk> (Consulté le 20 juin 2008)

<http://www.checkbiotech.org> (Consulté le 23 juin 2008)

<http://www.erthrise.com> (Consulté le 25 juin 2008)

<http://juliemurphree.org> (Consulté le 25 juin 2008)

Annexe A

Matériels et méthodes (Complément)

A-1. Comptage cellulaire par microscopie

A-2. Comptage cellulaire par granulométrie laser

A-3. Différentes représentations d'une granulométrie

A-4. Protocole expérimental pour la réalisation d'une mesure granulométrique

A-5. Application de la granulométrie au comptage des microalgues

A-6. Droite d'étalonnage pour le dosage du CO₂ par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

A-7. Courbe d'étalonnage pour l'estimation de la concentration cellulaire à partir de la mesure de l'absorbance à 760 nm

A-1. Comptage cellulaire par microscopie

Le principe de la méthode consiste à effectuer un dénombrement des cellules microalgales présentes dans un volume connu et dans les limites des carrés de la cellule de comptage à l'aide d'un microscope optique. La cellule de Malassez comporte 25 carrés d'un volume de 10^{-5} ml.

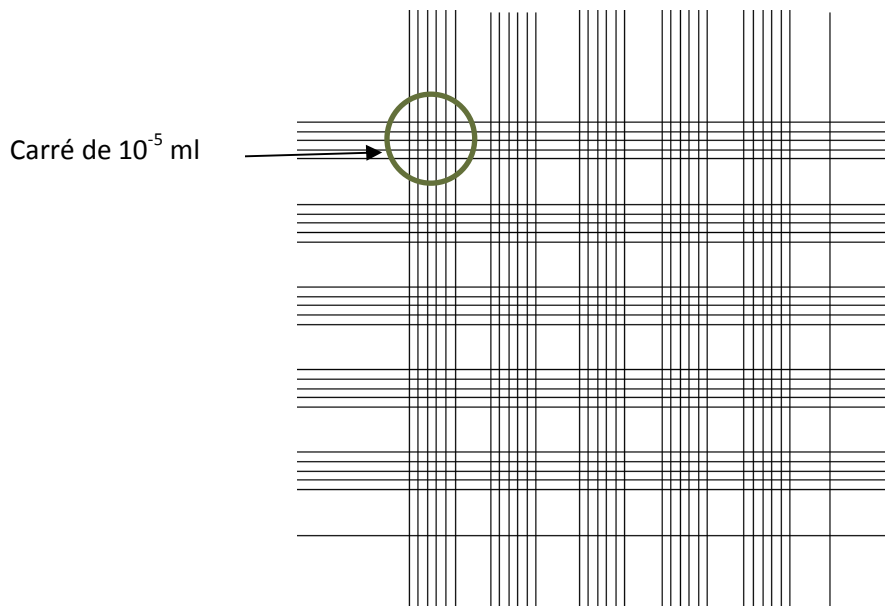


Fig. A.1. Cellule de Malassez

Quelques règles simples permettent d'effectuer un comptage de bonne qualité :

- Avant de réaliser le comptage, les cultures doivent être correctement homogénéisées. Une agitation de la culture, juste avant le prélèvement, doit permettre l'obtention d'une culture la plus homogène possible.
- Une dilution doit être réalisée si nécessaire : le nombre de cellules comptées doit être compris entre 100 et 300.
- Les carrés nécessaires au dénombrement doivent être choisis de façon aléatoire.
- Pour chaque carré il faut compter :
 - a. tous les éléments situés à l'intérieur des lignes délimitant le carré choisi,
 - b. tous les éléments situés sur les lignes, soit ceux qui sont sur la ligne de gauche et pas ceux qui sont sur la ligne de droite, soit l'inverse
 - c. et, soit ceux qui sont sur la ligne supérieure et pas ceux qui sont sur la ligne inférieure, soit l'inverse.

La concentration cellulaire (cellules/ml) est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$Nc = \frac{\text{nombre de cellules comptées}}{\text{nombres de carrés pris en compte} \times 10^{-5}}$$

A-2. Comptage cellulaire par granulométrie laser

A.2.1. Principe de la méthode

La méthode granulométrique résulte de l'interaction entre un ensemble de particules et le faisceau laser incident par l'analyse de la tache de diffraction du faisceau. En effet, les particules présentes sur le trajet d'un faisceau de rayons laser parallèles diffractent les rayons lumineux selon des angles qui sont fonction du diamètre de ces particules. Une lentille convergente forme l'image du faisceau diffracté en forme d'anneaux sur un détecteur situé dans le plan focal. La lumière non diffractée est focalisée dans le foyer image. Un traitement mathématique complexe donne un diamètre moyen et la distribution en taille des particules selon une distribution en volume.

La méthode d'analyse par granulométrie laser repose sur deux théories fondamentales : la théorie de Fraunhofer et la théorie de Mie.

La théorie de *Fraunhofer* suppose que les particules sont opaques, non poreuses, sphériques, suffisamment éloignées les unes des autres, de mouvement aléatoire et que leurs diamètres sont supérieurs à la longueur d'onde utilisée. Ces particules diffractent la lumière avec la même efficacité (cf. Fig. A.2)

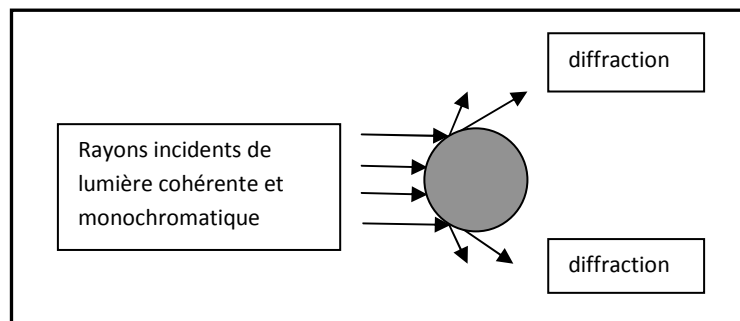


Fig. A.2 : Diffraction de la lumière par une particule d'après Fraunhofer

Chaque particule éclairée par un faisceau de lumière forme un motif de diffraction sous forme de franges concentriques alternativement claires et sombres (cf. Fig. A.3). Selon

cette théorie, l'intensité du rayonnement diffracté est une fonction du rayon des particules. Généralement, la limite de validité de cette théorie est atteinte pour des diamètres de particules de l'ordre de la longueur d'onde. Les particules de grandes tailles diffractent la lumière sous de petits angles. Par contre, la diffraction du faisceau dans le sens direct donne peu d'information sur les petites particules.

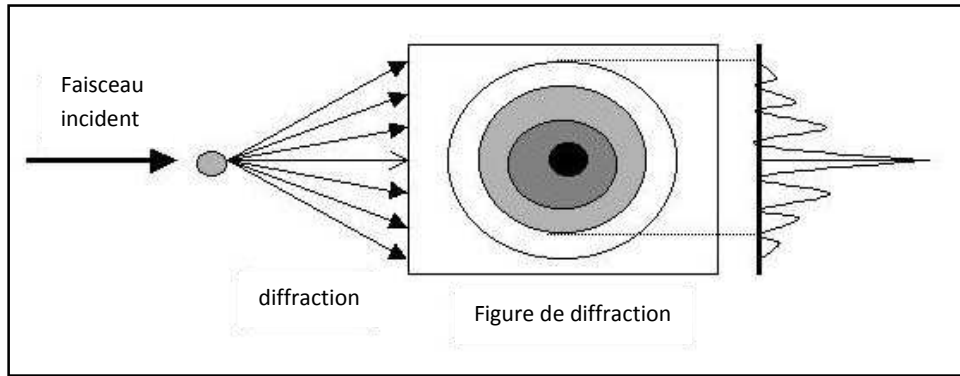


Fig. A.3 : Principe de la théorie de Fraunhofer

La théorie de *Mie* complète et remplace la théorie de *Fraunhofer* pour des particules de petites tailles (inférieures à 100 μm). Elle suppose que le diamètre des particules est inférieur ou égal à la longueur d'onde incidente. On tient compte ici des indices de réfraction et du coefficient d'absorption de l'échantillon et du milieu porteur. En effet, le faisceau laser qui traverse la cellule d'analyse va se propager sans déflexion jusqu'à ce qu'il rencontre une particule dont l'indice de réfraction est différent de l'indice de la phase continue. Ce changement d'indice va créer une réfraction du faisceau laser. Cette partie réfractée de lumière pénétrant dans la particule va ressortir en étant toujours soumise aux phénomènes de réflexion et réfraction dus à la différence des milieux (cf. Fig. A.4). Le faisceau lumineux va enfin arriver sur le détecteur en ayant subi plusieurs variations de son axe de propagation.

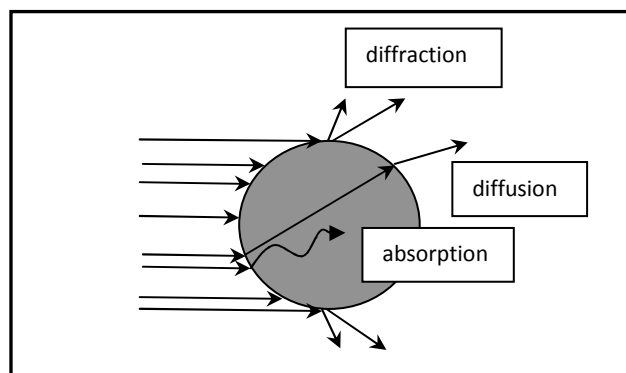


Fig. A.4 : Diffraction, absorption et diffusion de la lumière par une particule d'après Mie

A.2.2. Taille de particules

La taille d'une particule peut-être définie de différentes façons. Le tableau A.1 récapitule quelques définitions de diamètres de particules. Une particule non poreuse parfaitement sphérique peut-être caractérisée uniquement par son rayon r , ce qui permet par la suite de déterminer sa surface, son volume et d'autres caractéristiques. Néanmoins, la plupart des particules sont rarement sphériques et leur caractérisation nécessite de connaître un nombre considérable de paramètres et de dimensions (cf. Fig. A.5).

Tab. A.1 : Différents diamètres de particules

Diamètre	Symbole	Définition
Diamètre de Féret	d_F	Distance entre deux tangentes parallèles à des cotés opposés à la particule
Diamètre de Féret maximum	d_{Fmax}	Distance maximale entre deux tangentes parallèles sur des cotés opposés de la particule
Diamètre de Féret minimum	d_{Fmin}	Distance minimale entre deux tangentes parallèles sur des cotés opposés de la particule
Diamètre de Stokes	d_{st}	Diamètre d'une sphère chutant librement à la même vitesse que la particule dans un fluide donné
Diamètre en volume	d_V	Diamètre d'une sphère de même volume que la particule
Diamètre de l'aire projetée	d_A	Diamètre du cercle possédant la même surface projetée que la particule

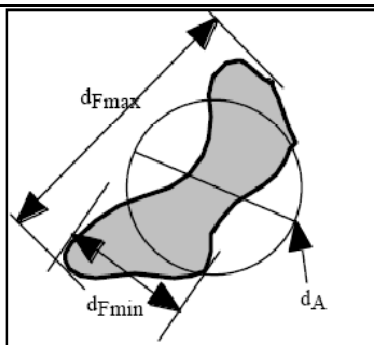


Fig. A.5 : Détermination des différents diamètres sur une particule non-sphérique

Chaque technique mesure un certain diamètre qui, pour une géométrie sphérique, devrait donner le même résultat.

A-3. Différentes représentations d'une granulométrie

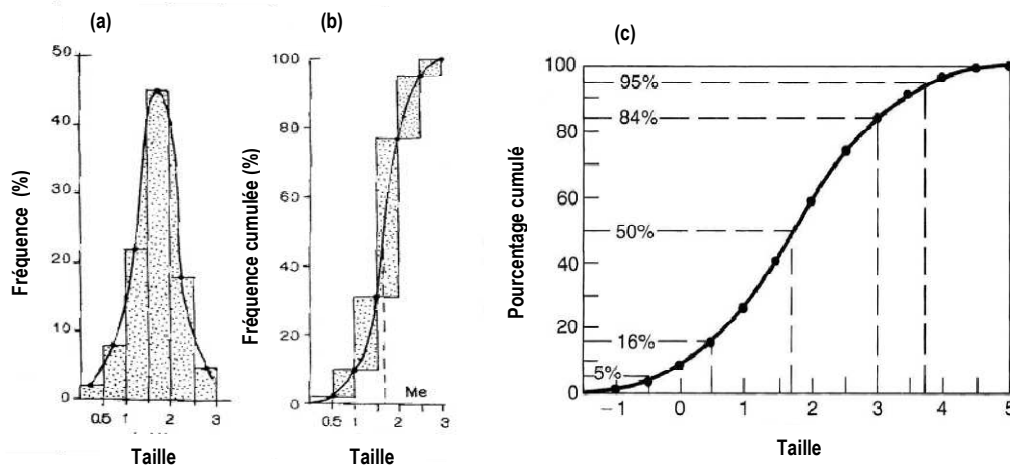


Fig. A.6 : (a) Histogramme et courbe lissée, (b) et (c) courbes cumulatives

A-4. Protocole expérimental pour la réalisation d'une mesure granulométrique

Un granulomètre laser QICPIC de Sympatec est utilisé pour le comptage cellulaire. Les analyses se font en voie liquide grâce au système de présentation d'échantillon LIXELL.

- On commencera tout d'abord par placer la cellule de 0,2 mm de type LIXELL qui permettra de détecter les cellules de *Porphyridium purpureum*. D'abord, on commence par ouvrir le compartiment central, puis visser d'un quart de tour les quatre vis de la cellule. S'assurer que cette cellule soit fixée à son support à l'aide de deux vis à l'arrière de celui-ci. Finalement, on place la cellule de façon verticale dans le compartiment central du granulomètre.
- On appuie ensuite sur le bouton de marche installé à l'arrière de l'appareil puis on tourne d'un demi-tour au moyen d'une petite clé à l'avant du granulomètre.
- On laisse l'appareil au repos pendant 1h30 puis on commence par enlever l'air emprisonné dans la cellule d'analyse d'image par un passage successif de l'eau soit directement au moyen d'une seringue soit au moyen d'une pompe péristaltique (cf. Fig. A.7).

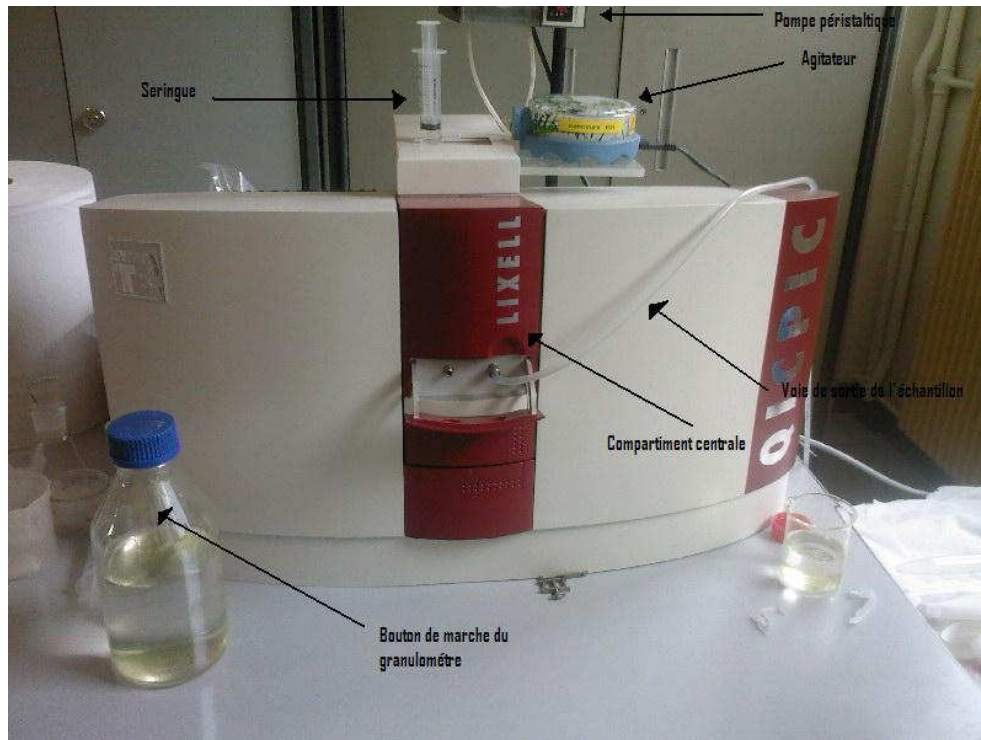


Fig. A.7 : Photo du granulomètre laser et de ses différents composants

- Une fois que l'on est certain de ne pas avoir laissé d'air emprisonné dans la cellule de mesure, on effectue le nettoyage de cette dernière par un passage d'eau distillée en utilisant une pompe péristaltique ayant un débit assez élevé.
- On passe ensuite à la préparation de l'échantillon. Dans le cas des cellules de *Porphyridium purpureum* ayant une forte tendance à s'agréger, deux techniques s'imposent :
 - Prétraitement de l'échantillon par potterisation de celui-ci en utilisant un broyeur de Potter (broyeur avec mortier et piston en verre borosilicaté dépoli) : l'objectif est de désagréger les cellules. Cette opération dure entre 5 à 7 minutes pour un échantillon de 15 ml (capacité maximale du Potter).
 - Prétraitement de l'échantillon par l'action de l'enzyme Trypsine : une petite quantité de trypsine (1 ml environ) est récupérée du congélateur et chauffée dans un thermostat (cf. Fig. A.8) avec une solution pure de microalgues. Après 15 minutes de chauffage à une température de 25°C, la réaction est stoppée par l'ajout d'eau distillée jusqu'à l'obtention de la dilution souhaitée.



Fig. A.8 : Thermostat utilisé pour chauffer la trypsine

- Ouvrir le système d'acquisition des données (l'ordinateur) et aller vers le logiciel approprié (Windox).
- Entrer les caractéristiques de la mesure (produit, gamme de mesure, délai d'acquisition, utilisateur, type de traitement, type de dispersion, type d'alimentation, taux de dilution, fréquence d'image, etc).
- Procéder au calibrage de la cellule avec de l'eau distillée en utilisant l'option *focalisation automatique*.
- Après calibrage, mettre en marche le système d'agitation de l'échantillon et la pompe péristaltique puis desserrer la pince placée au niveau de la voie de sortie de l'échantillon.
- Attention ! Le débit de la pompe doit être suffisant pour éviter d'obtenir des images similaires lors du passage de l'échantillon.
- Démarrer l'analyse de l'échantillon.
- Une fois, celle-ci terminée, serrer rapidement la voie de sortie (pince serrée) et arrêter le fonctionnement de la pompe.
- Après avoir effectué toutes les mesures nécessaires, nettoyer la cellule à l'aide d'un passage successif et suffisant d'eau en utilisant la pompe péristaltique. Ceci permettra d'enlever toute trace d'échantillon.
- Tourner la petite clé puis appuyer sur le bouton d'arrêt installé à l'arrière du granulomètre.

A-5. Application de la granulométrie au comptage des microalgues

A.5.1. Granulométrie en fonction du type de prétraitement de l'échantillon

Les mesures granulométriques ont été comparées à celles obtenues par le comptage cellulaire par microscopie. Les échantillons ont été obtenus à partir d'une pré-culture (400 ml) de *Porphyridium purpureum* entretenue dans un agitateur orbital à atmosphère contrôlée. L'influence du prétraitement de l'échantillon a été étudiée : trois possibilités ont été considérées :

- Sans pré-traitement (pour étudier la possibilité de faire la mesure en ligne).
- Pottérisation de l'échantillon.
- Action de la trypsine.

a. Résultats et discussion

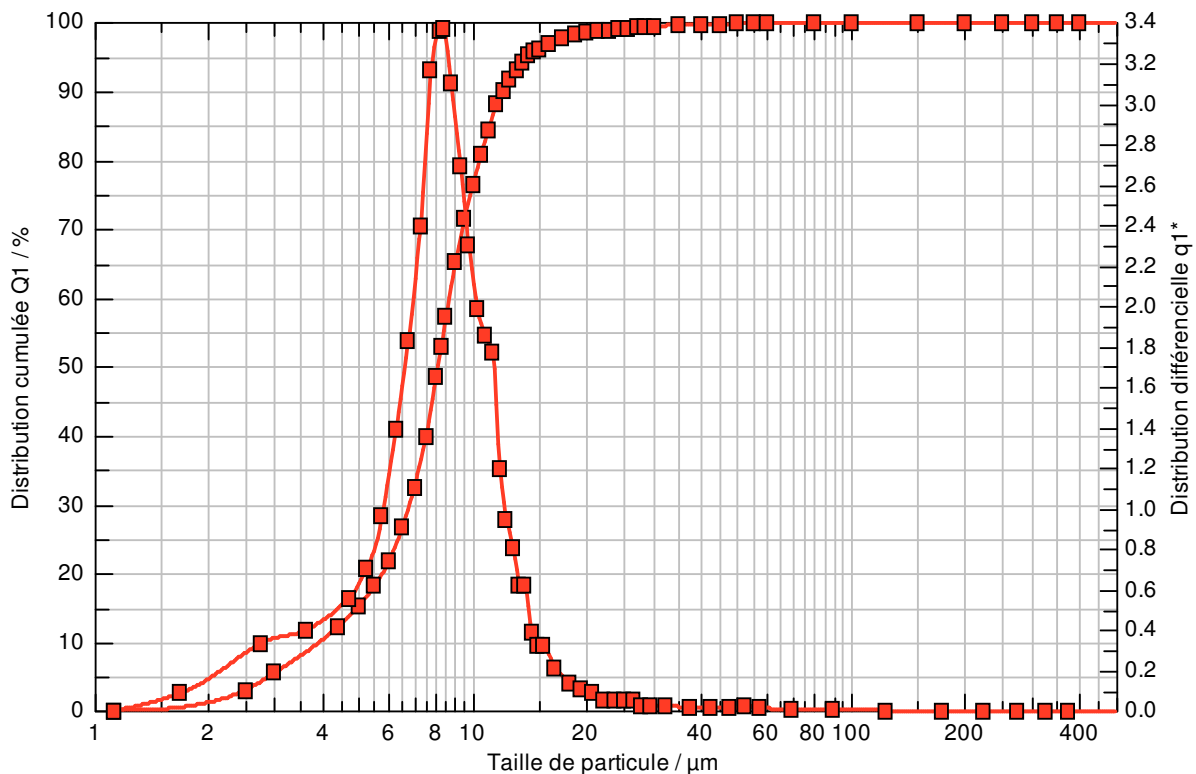


Fig. A.9 : Histogramme obtenu pour *Porphyridium purpureum*

La figure A.9 illustre la distribution granulométrique des cellules microalgales en fonction de leur taille. On remarque un pic principal traduisant la taille de particules à l'état individuel avec des diamètres compris entre 6 et 10 μm . Dans la plage des valeurs supérieures

à 10 μm , les cellules forment des agrégats provenant d'une part, de la réunion de cellules adultes entre elles, et d'autre part de la division cellulaire.

Le bilan statistique de la figure A.10 nous permet de mettre en évidence le caractère reproductible de la méthode granulométrique pour le comptage cellulaire microalgal avec un pic principal toujours de l'ordre de 6 à 1 μm .

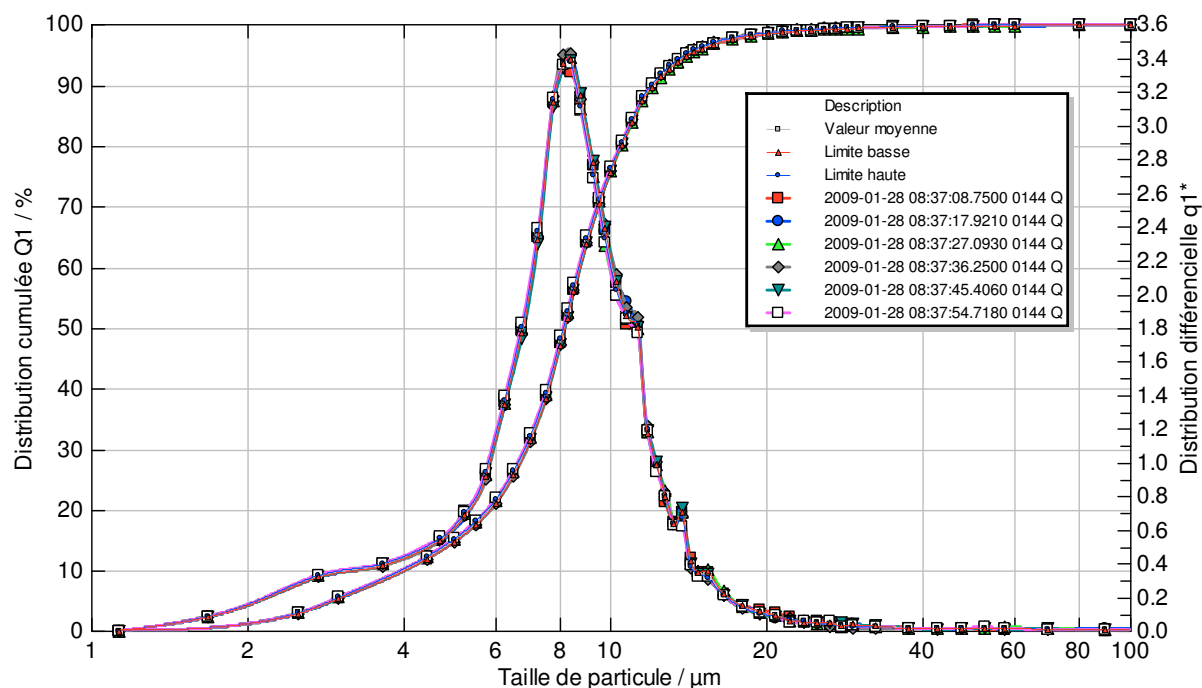


Fig. A.10 : Bilan statistique obtenu pour un échantillon de *Porphyridium purpureum* prétraité au Potter et dilué 20 fois.

Les résultats obtenus (cf. Fig A.11) nous permettent de déduire une quasi similarité des mesures effectuées par comptage microscopique ou bien par analyse granulométrique sous conditions de pottérisation ou sans prétraitement. Le nombre de cellules obtenues par ces méthodes est de l'ordre de 8,5 à 9,2 millions de cellules par millilitre. On remarque que la mesure granulométrique réalisée sous l'action de la trypsine donne des résultats très inférieurs par rapport à ceux obtenus avec pottérisation mais également par comptage microscopique. On peut émettre deux hypothèses :

- La trypsine n'a pas réussi à désagréger les cellules,
- L'action de la trypsine a été totale ce qui a conduit à la destruction des agrégats mais également d'une partie des cellules individuelles.

On peut déduire que la méthode microscopique de comptage cellulaire ainsi que la technique granulométrique permettent de mesurer le nombre de cellules de manière satisfaisante avec des résultats très proches. L'écart entre les deux valeurs peut être expliqué principalement par l'imprécision qui subsiste lors du comptage du nombre de cellules sur le microscope optique toutes les cellules présentes dans le volume emprisonné par la lame n'étant pas visibles dans le plan utilisé pour le comptage, mais également lors de la dispersion de l'échantillon au niveau de la lame de Malassez (Possibilité de dispersion des cellules au niveau de la périphérie de la lame lors de l'injection de l'échantillon sous la lamelle).

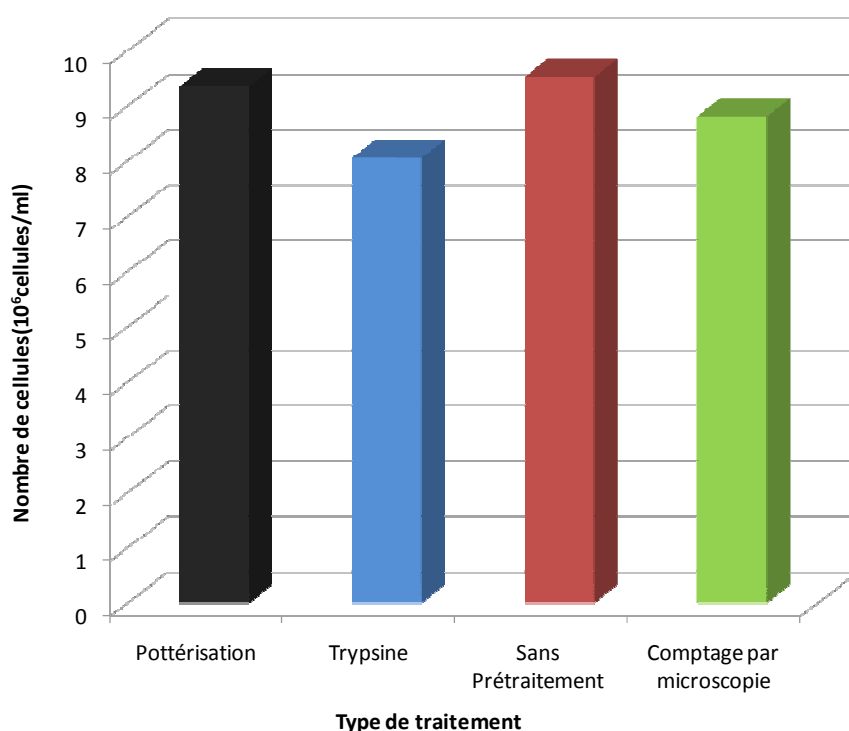


Fig. A.11 : Comparaison des résultats obtenus par la méthode granulométrique sous différents prétraitements et le comptage cellulaire par microscopie (dilution 20 fois).

Les résultats montrés sur la figure A.12 nous permettent de confirmer la deuxième hypothèse émise précédemment. En effet, on remarque que la trypsine permet de diminuer aussi bien les nombre de di ou tri particules (Diamètre entre 12 à 32 μ m), que ceux des agrégats cellulaires (diamètre > 32 μ m) mais également ceux des cellules uniques (diamètre entre 6 et 12 μ m). Cette réduction du nombre de cellules à l'état individuelle est très conséquente par rapport à celle obtenue sous potter et sans prétraitement. Le mécanisme de réaction de la trypsine en présence de la microalgue reste inconnu pour l'instant, on peut

supposer que cette enzyme permet aussi bien la destruction de la paroi cellulaire mais également la dispersion de celle-ci en plusieurs fragments de petites tailles.

Cette figure permet également de constater un effet similaire mais moins conséquent de l'action du potter par rapport à l'action de la trypsine sur la réduction des mono-particules. Ainsi, l'effet du potter permet de réduire la taille des agrégats mais, en parallèle, permet de diminuer le nombre de cellules individuelles par rapport à une simple mesure sans prétraitement. On obtient ainsi une perte de mono-cellules de l'ordre de 11,3%. Ces pertes peuvent être la conséquence des différents frottements de l'échantillon contre la paroi du potter suite aux mouvements de translations et rotations successifs. La réduction du nombre de bi ou tri-cellules est de l'ordre de 7,3% et celle des agrégats cellulaires est de l'ordre de 0,12% par rapport à une mesure sans prétraitement. Ainsi, l'efficacité de ce traitement n'est pas significative. On peut s'orienter vers une analyse granulométrique en utilisant un système de recirculation de l'échantillon permettant ainsi une agitation continue de celui-ci.

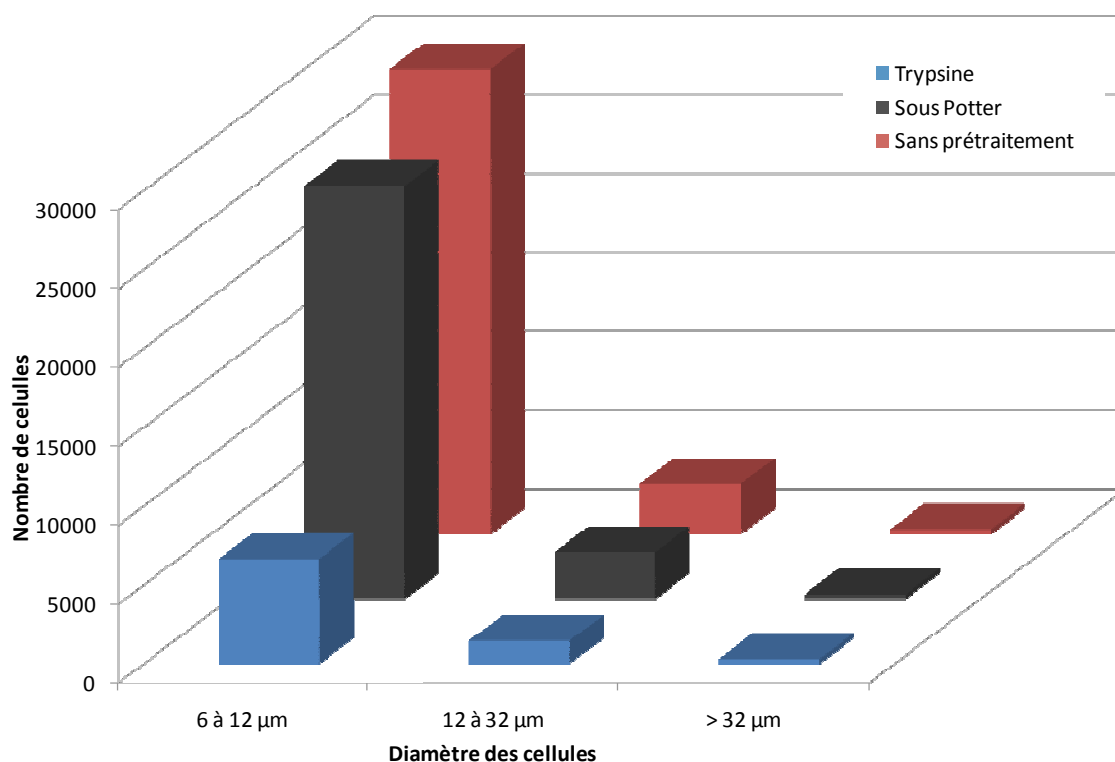


Fig. A.12 : Répartition du nombre de cellules en fonction de leur diamètre et du prétraitement subi par l'échantillon.

A.5.2. Granulométrie en fonction du taux de dilution de l'échantillon

Les mesures granulométriques ont été comparées à celles obtenues par le comptage cellulaire par microscopie. Comme dans l'étude précédente, les échantillons ont été obtenus à partir d'une pré-culture (400ml) de *Porphyridium purpureum*. L'influence du taux de dilution de l'échantillon a été étudiée : quatre possibilités ont été considérées :

- Dilution 5 fois
- Dilution 10 fois
- Dilution 15 fois
- Dilution 20 fois

Nous allons étudier l'effet de la dilution sur les deux méthodes de comptage (comptage par microscopie et granulométrie) mais également étudier la possibilité d'application de la méthode granulométrique au comptage des microalgues et, en quelque sorte, sa reproductibilité et sa cohérence par rapport à la méthode microscopique.

a. Résultats et discussion

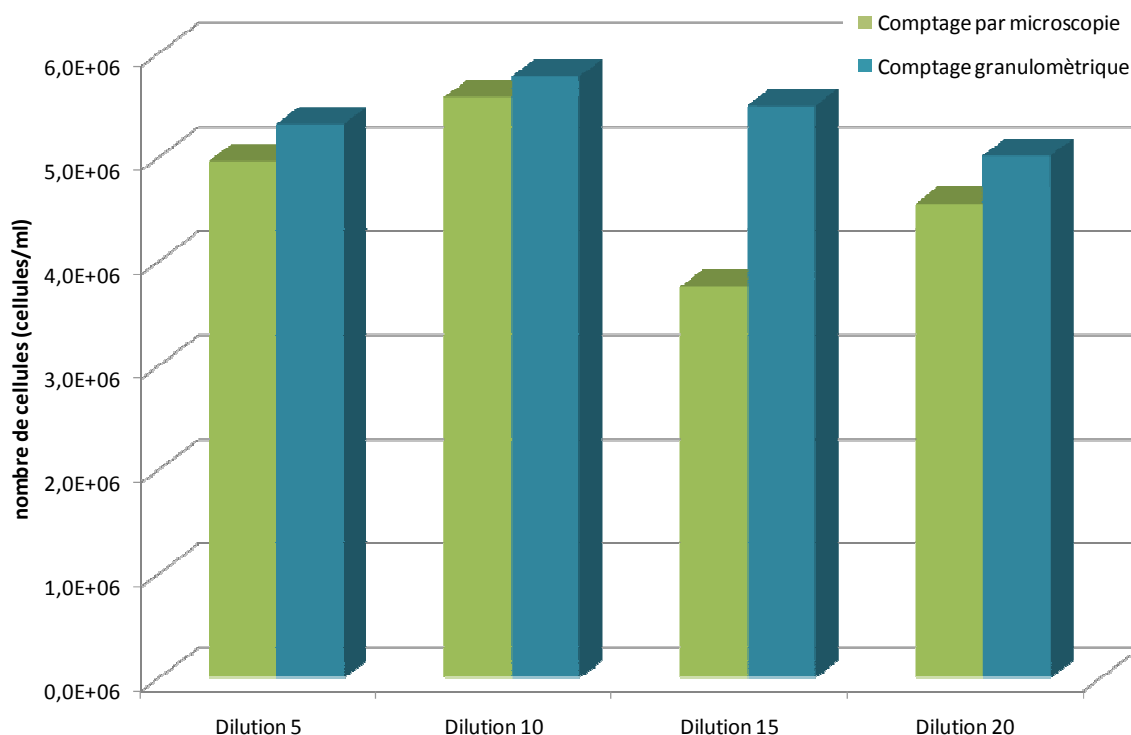


Fig. A.13 : Nombre de cellules en fonction du type de technique et taux de dilution utilisés

Le comptage cellulaire de *Porphyridium purpureum* a été fait par granulométrie et par microscopie. La mesure de la turbidité (densité optique) de l'échantillon nous permet, avec une courbe d'étalonnage préalablement établie, de calculer le nombre de cellules. Ces mesures ont été effectuées à différentes dilutions. Les résultats obtenus (cf. Fig. A.13) nous permettent de confirmer d'une part le caractère reproductible de la mesure granulométrique avec un écart-type de 0,27 pour les quatre mesures réalisées avec cette méthode. D'autre part, nous observons une similarité des résultats obtenus par granulométrie et par microscopie. On remarque cependant que pour une dilution 15, l'écart est considérable entre l'analyse granulométrique et celle par microscopie.

En effet, la figure A.14 nous permet de constater qu'il existe un écart d'environ 32% entre les deux valeurs obtenues. On peut supposer que cet écart est dû essentiellement à des erreurs de manipulation lors de la préparation de l'échantillon ou bien, une mauvaise dispersion de celui-ci sur la surface de la lame de Malassez pendant le comptage par microscopie. Quant aux autres mesures, nous observons que cet écart ne dépasse pas 10%.

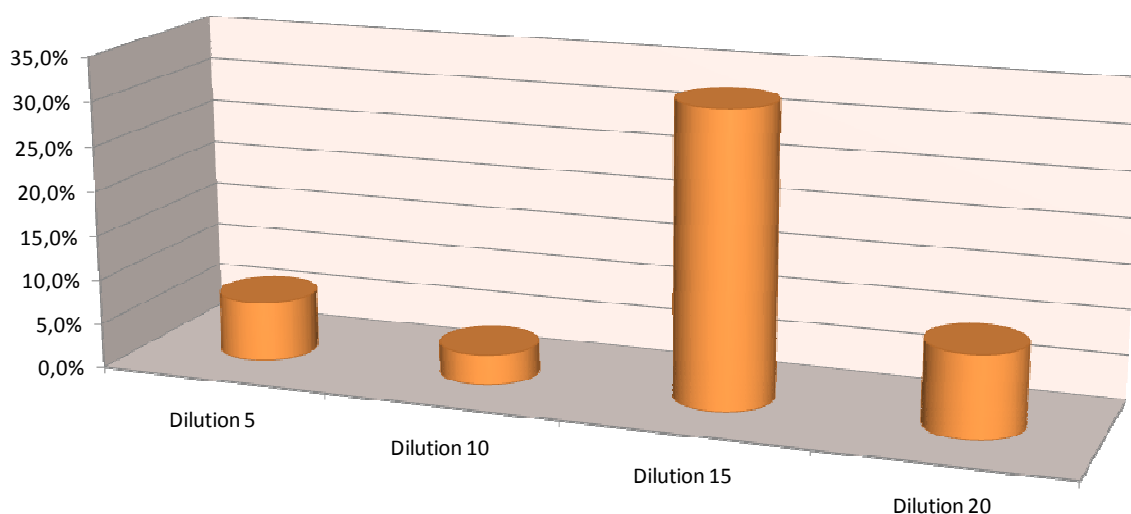


Fig. A.14 : Pourcentage d'écart entre les deux méthodes utilisées

La reproductibilité de la méthode granulométrique est mise en évidence lors de l'étude de la répartition en pourcentage du nombre de cellules en fonction de leurs diamètres (cf. Fig. A.15). En effet, on remarque que le facteur dilution n'entraîne pas de résultats incohérents comme lors du comptage cellulaire par microscope électronique d'un échantillon dilué 15 fois (cf. Fig. A-14). On observe que le pourcentage de cellules à l'état unique (6 à 12 μm) est presque similaire et de l'ordre de 73 à 78 % pour les différents taux de dilution. De même pour les autres catégories de cellules (bicellulaire, tri cellulaire et agrégats) avec des

pourcentages quasi identiques aux alentours de 22 à 25 % pour les cellules regroupée en deux ou trois unités et 1,8 à 2,8 % pour les gros agrégats cellulaires. Ces résultats confirment la reproductibilité ainsi que l'efficacité de cette méthode de comptage cellulaire.

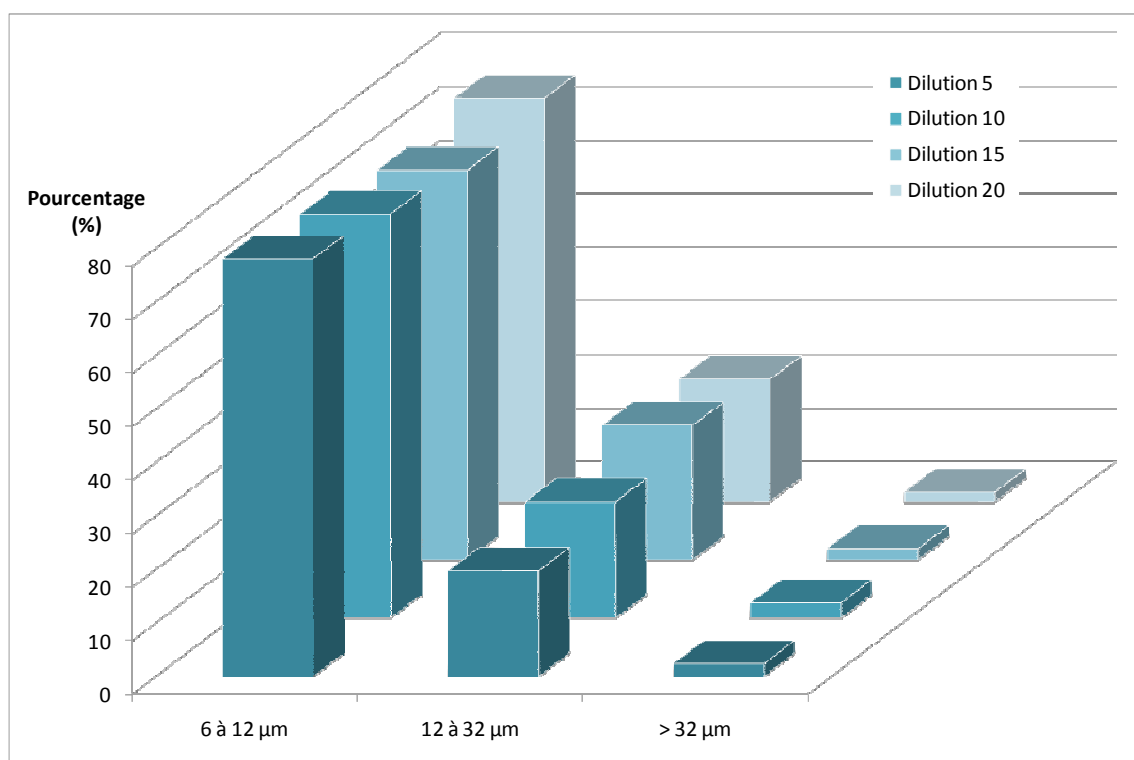
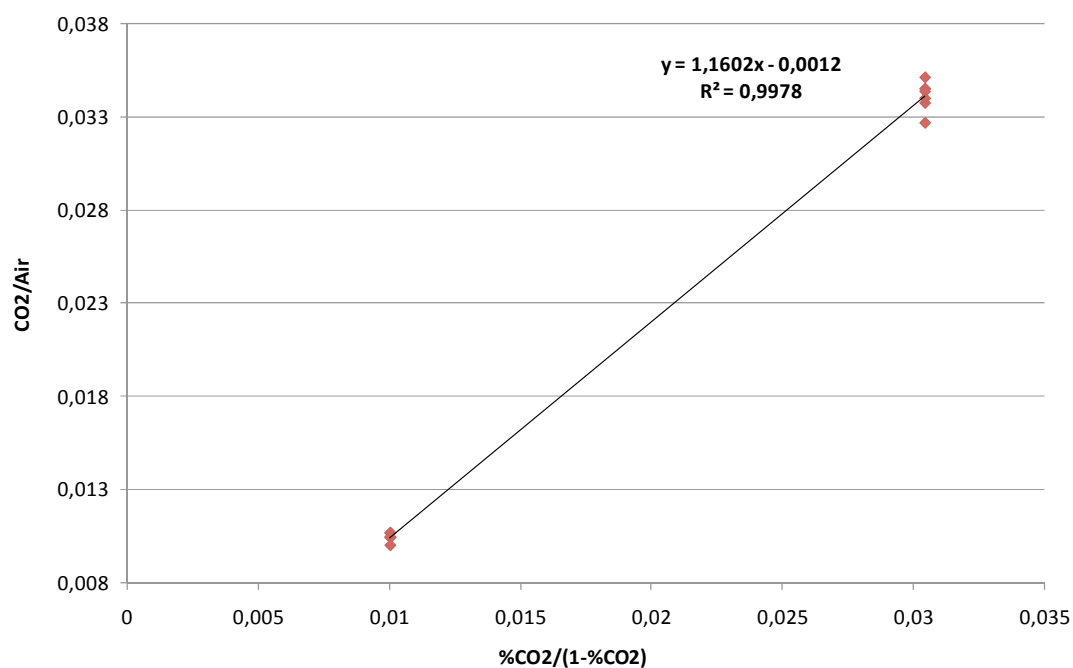


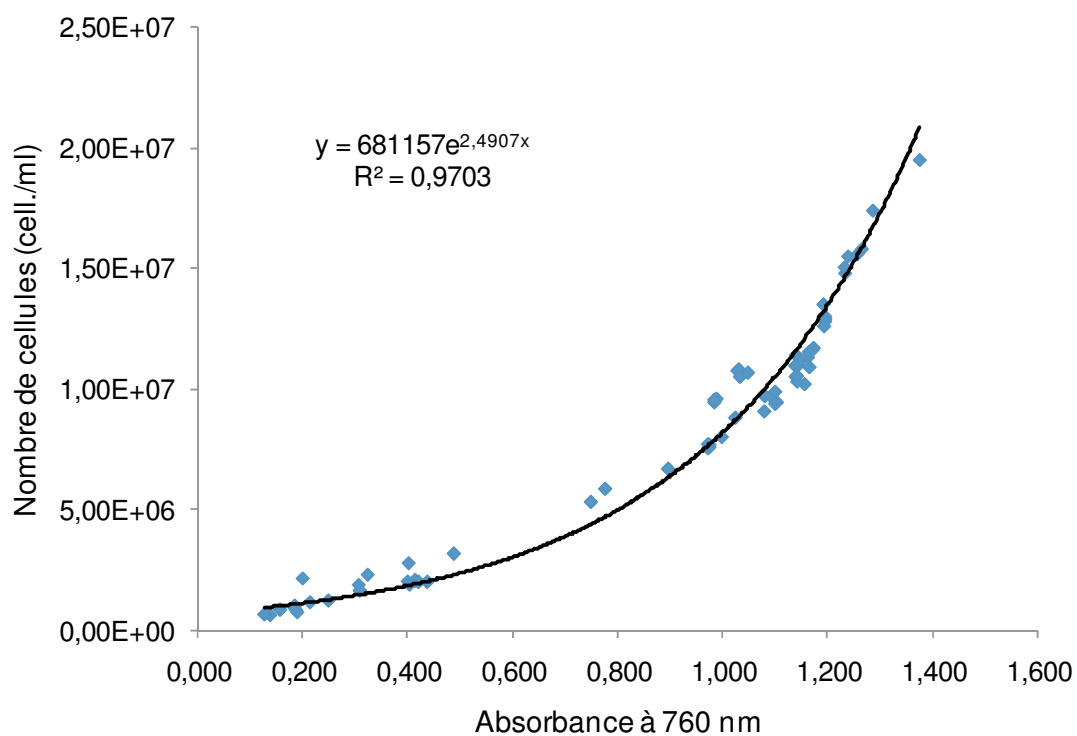
Fig. A.15 : Répartition en pourcentage du nombre de cellules en fonction de leurs diamètres et du taux de dilution pour une mesure granulométrique

L'étude réalisée confirme que les deux méthodes permettent d'obtenir des valeurs de concentration cellulaire assez proches et que la méthode granulométrique peut être utilisée dorénavant pour obtenir le nombre de cellules dans une culture de microalgues. D'ailleurs, elle permet de minimiser les imprécisions dues à des erreurs de manipulation ou une mauvaise dispersion de l'échantillon au sein de la cellule de Malassez utilisé pour le comptage par microscopie.

A-6. Droite d'étalonnage pour le dosage du CO₂ par chromatographie en phase gazeuse (CPG)



A-7. Courbe d'étalonnage pour l'estimation de la concentration cellulaire à partir de la mesure de l'absorbance à 760 nm



Annexe B

Observabilité du système

B.1. Démonstration de l'observabilité du système

Le vecteur d'état de notre système est $x = (X, CIT)$. Si on prend les équations du modèle (cf. Ch. II, § 2.5) nous avons :

$$\begin{cases} \dot{X} = f_1 = \mu X \\ \dot{C} = f_2 = -\frac{1}{Y} \mu X + k_L a([CO_2^*] - [CO_2]) \\ y = C \end{cases}$$

L'espace d'observation est :

$$\mathcal{O} = (C, f_2)$$

La dérivée de Lie de h dans la direction de f est :

$$L_f h = -\frac{1}{Y} \mu X + k_L a([CO_2^*] - [CO_2])$$

L'ensemble de différentielles des fonctions de \mathcal{O} s'exprime comme suit :

$$d\mathcal{O} = \begin{bmatrix} 0 & -\frac{1}{Y} \frac{\partial}{\partial X} (\mu X) \\ 1 & -\frac{1}{Y} \frac{\partial}{\partial C} (\mu X) - k_L a \ h(pH) \end{bmatrix}$$

rang = 2 sauf si :

$$\frac{\partial}{\partial X} (\mu X) = 0$$

$$\frac{\partial}{\partial X} (\mu X) = \mu + X \frac{\partial \mu}{\partial X} \quad (c1)$$

où

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{E}{E_{opt}} \right) e^{\left(1 - \frac{E}{E_{opt}} \right)} \quad (c2)$$

$$E = \frac{(I_{in} - I_{out}) A_r}{V X} \quad avec \quad I_{out} = C_1 I_{in} X^{C_2}$$

$$E = I_{in} \left[\frac{A_r}{V} \frac{1 - C_1 X^{C_2}}{X} \right] \quad (c3)$$

donc

$$\frac{\partial \mu}{\partial X} = \mu_{max} \frac{\partial E}{\partial X} \frac{1}{E_{opt}} e^{\left(1 - \frac{E}{E_{opt}} \right)} \left(1 - \frac{E}{E_{opt}} \right) \quad (c4)$$

avec

$$\begin{aligned} \frac{\partial E}{\partial X} &= \frac{A_r}{V} \frac{-C_1 C_2 X^{C_2} - (1 - C_1 X^{C_2})}{X^2} \\ \frac{\partial E}{\partial X} &= \frac{A_r}{V} \frac{-1 + C_1 (1 - C_2) X^{C_2}}{X^2} \end{aligned} \quad (c5)$$

La dérivée de (c1) est

$$\frac{\partial}{\partial X} (\mu X) = \mu + X \frac{\partial \mu}{\partial X}$$

$$\begin{aligned}\frac{\partial}{\partial X}(\mu X) &= \mu_{max} \left(\frac{E}{E_{opt}} \right) e^{\left(1 - \frac{E}{E_{opt}}\right)} + X \mu_{max} \frac{\partial E}{\partial X} \frac{1}{E_{opt}} e^{\left(1 - \frac{E}{E_{opt}}\right)} \left(1 - \frac{E}{E_{opt}} \right) \\ \frac{\partial}{\partial X}(\mu X) &= \mu_{max} X \frac{1}{E_{opt}} e^{\left(1 - \frac{E}{E_{opt}}\right)} \left[E + \frac{\partial E}{\partial X} \left(1 - \frac{E}{E_{opt}} \right) \right] \quad (c6)\end{aligned}$$

Si l'on remplace (c3) dans (c6) , on vérifie que pour une valeur de $I_{in} = 1,2$, $\frac{\partial}{\partial X}(\mu X) \neq 0$ et on peut dire que le système est **observable**.

Annexe C

Résultats expérimentaux (Complément)

C.1. Expériences réalisées (à conditions optimales) dans le photobioréacteur de 9,6 litres non utilisées pour la validation des lois de commande

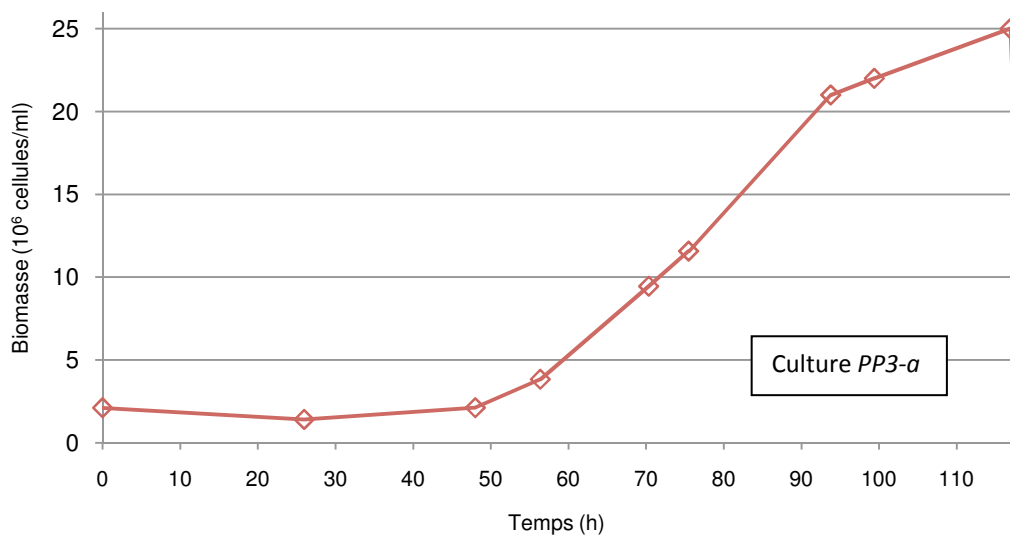


Figure C.1 : Evolution de la concentration cellulaire en fonction du temps. Première étape de la culture *PP3* réalisée en mode semi-batch.

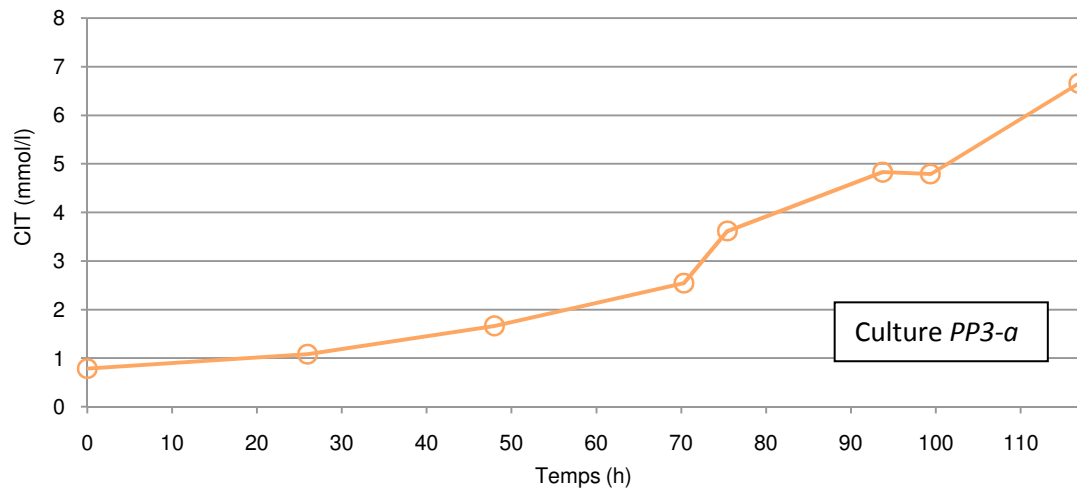


Figure C.2 : Evolution temporelle des concentrations en carbone inorganique total *CIT* mesurés par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

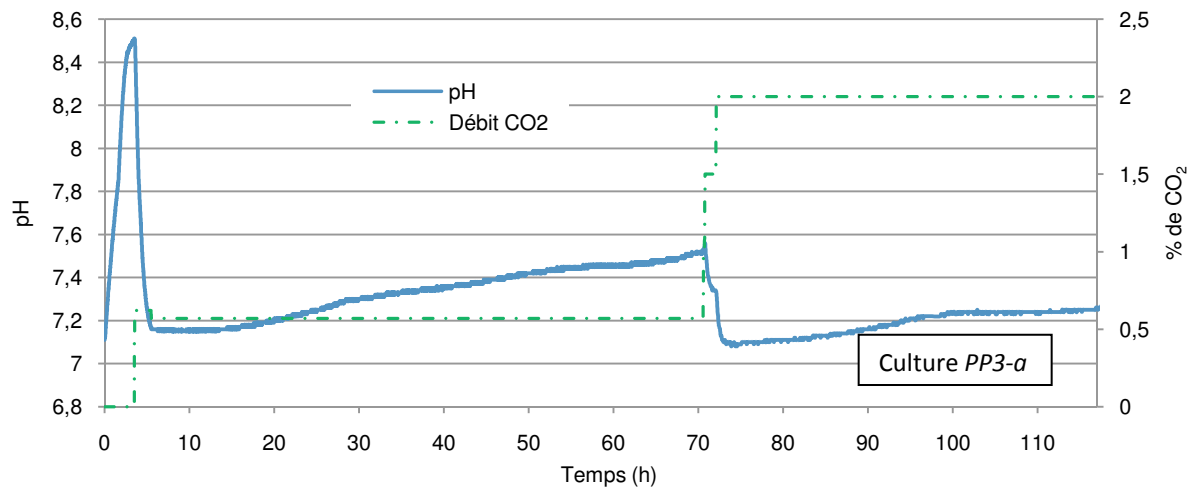


Figure C.3 : Evolution temporelle du pH et changement de la quantité injectée de CO₂ dans le gaz d'alimentation.

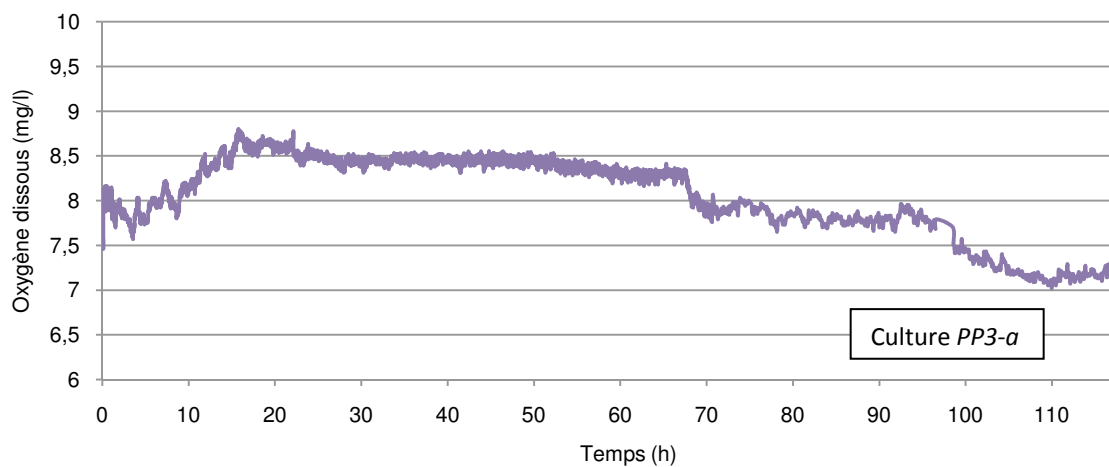


Figure C.4 : Evolution temporelle de la concentration en oxygène dissous.

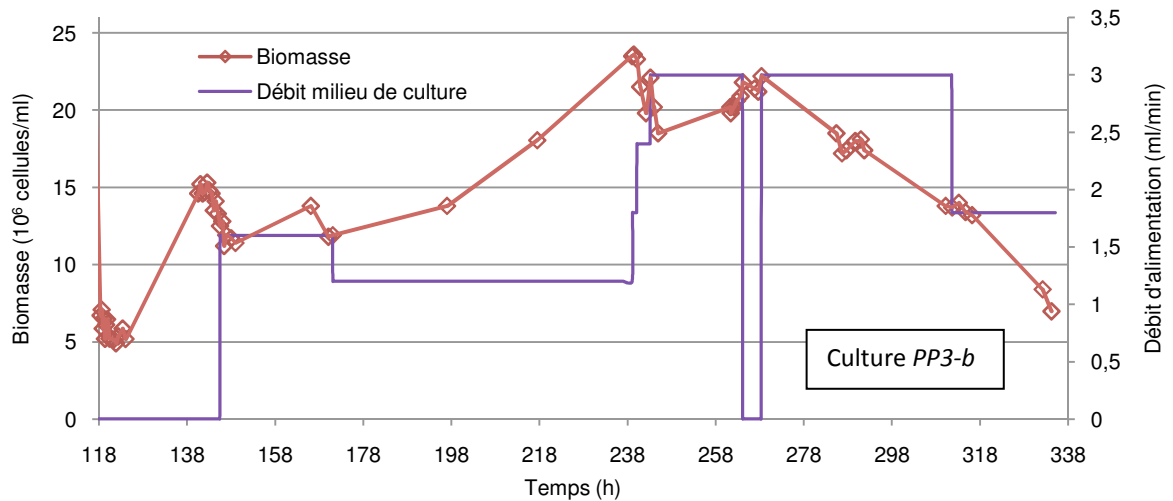


Figure C.5 : Evolution de la concentration cellulaire en fonction du temps. Deuxième étape de la culture *PP3* réalisée en mode continu.

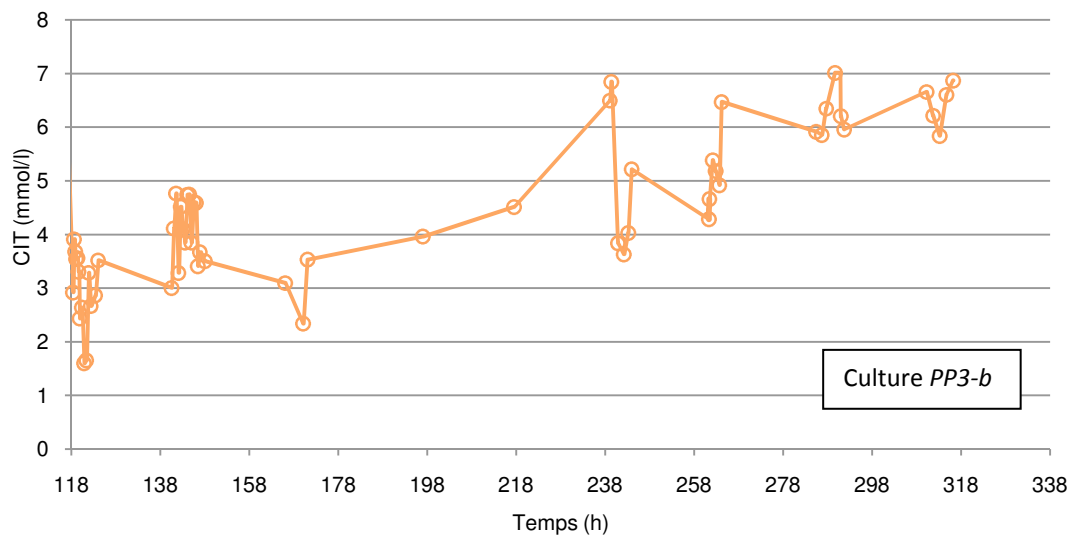


Figure C.6 : Evolution temporelle des concentrations en *CIT* mesurés par CPG.

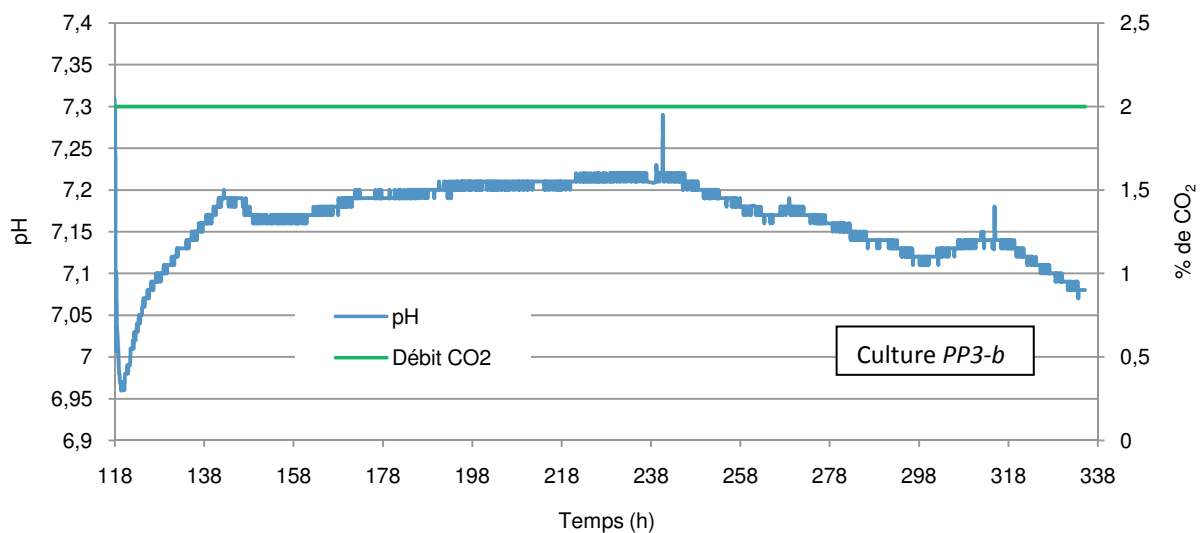


Figure C.7 : Evolution temporelle du pH et quantité injectée de CO_2 dans le gaz d'alimentation.

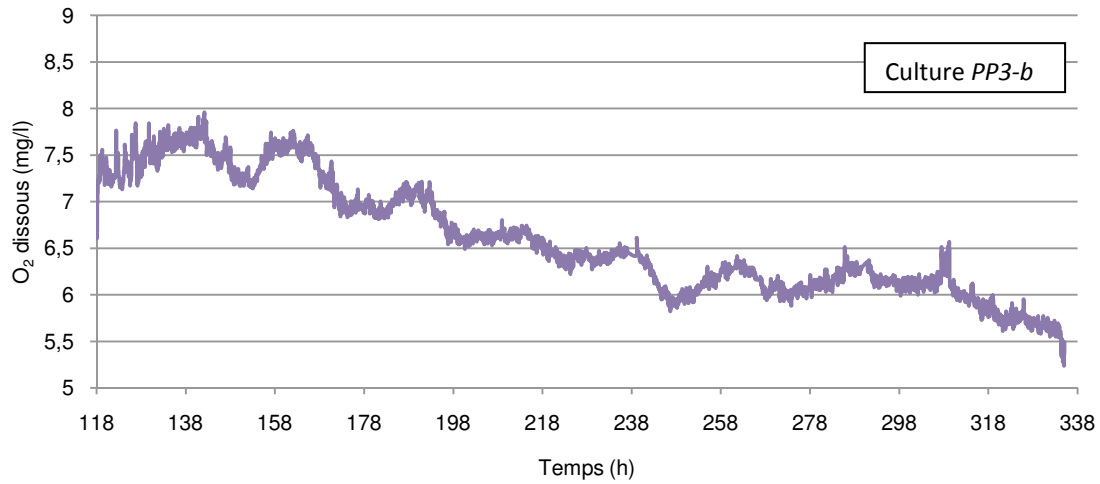


Figure C.8 : Evolution temporelle de la concentration en oxygène dissous.

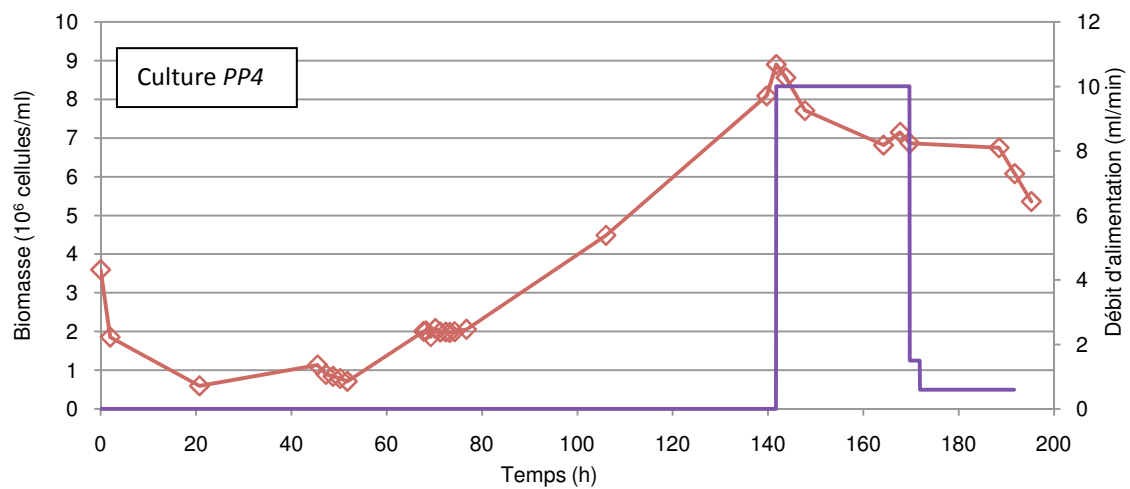


Figure C.9 : Evolution de la concentration cellulaire en fonction du temps.

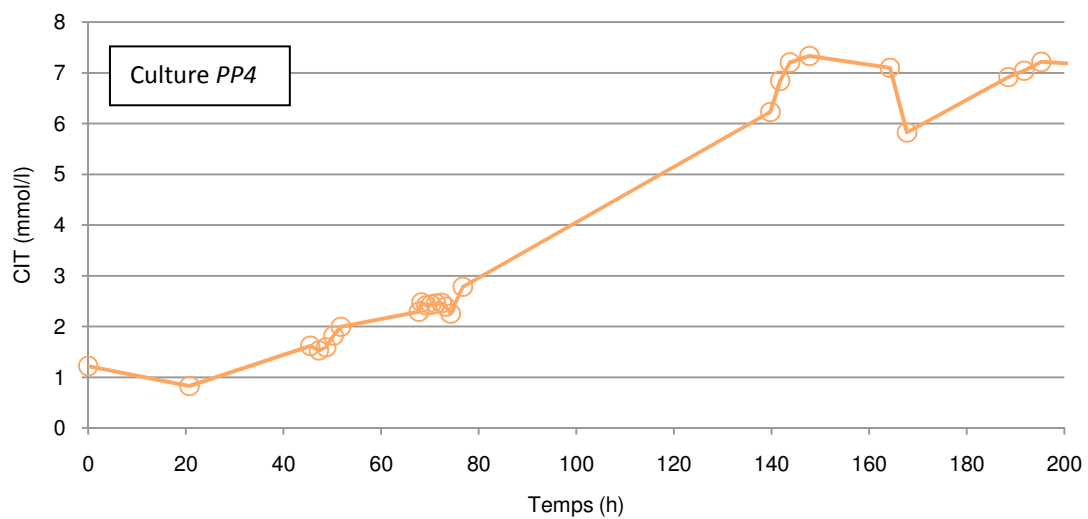


Figure C.10 : Evolution temporelle des concentrations en CIT mesurés par CPG.

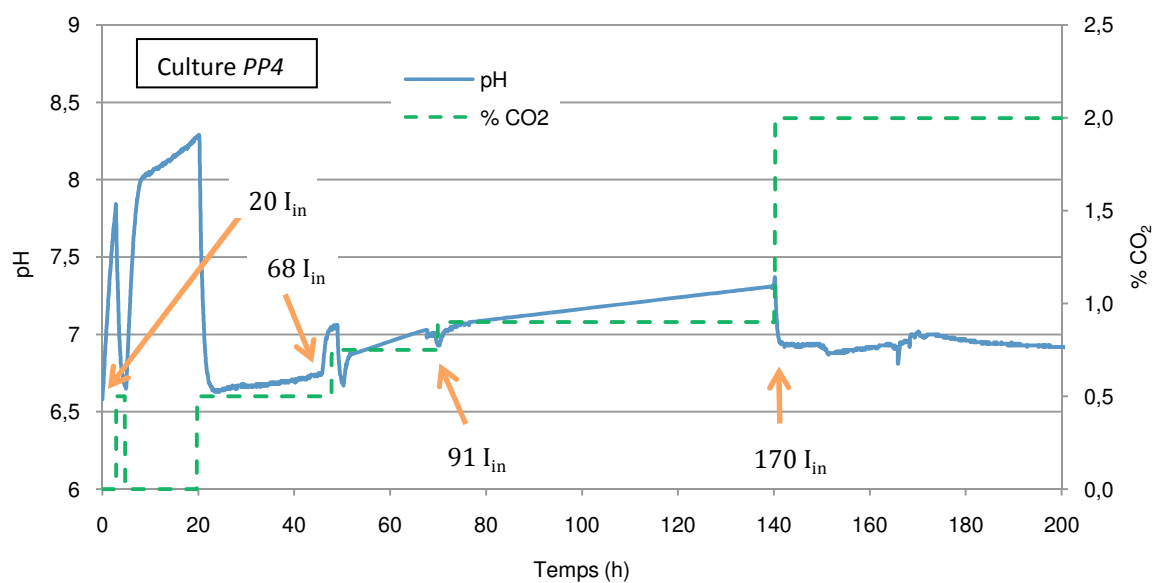


Figure C.11 : Evolution temporelle du pH et quantité injectée de CO₂ dans le gaz d'alimentation.

Résumé de Thèse

Cette thèse porte sur la commande d'un photobioréacteur continu pour la culture des microalgues. La modélisation du système et l'identification des paramètres du modèle ont été particulièrement abordées. Les paramètres cinétiques et de transfert de l'énergie lumineuse ont été obtenus à partir des données acquises le long de la phase exponentielle de la culture de *Porphyridium purpureum* en mode batch sous différentes conditions expérimentales dans un photobioréacteur de 2,5 litres.

La concentration en biomasse est la quantité physique la plus importante à réguler. Puisque elle n'est pas toujours facile à mesurer en ligne, un capteur logiciel permettant d'estimer la quantité de biomasse produite à partir des mesures en ligne est proposé. Il s'agit d'un filtre de Kalman étendu (EKF) qui combine le modèle du système avec la mesure de la concentration du carbone inorganique total et d'autres variables physiques (pH, intensité lumineuse,...) afin d'estimer en ligne la concentration de la biomasse. Ce capteur logiciel a été validé expérimentalement en utilisant un nouveau photobioréacteur de 9,6 litres de type colonne à bulles, équipé de plusieurs dispositifs destinés à mettre en place un système de commande et de régulation, et de techniques de mesure permettant d'accéder à l'évolution des principales variables.

Plusieurs démarches pour la commande de la culture de microalgues ont été également proposées : commande non-linéaire et linéaire, régulation par *PID*, commande par modèle générique *GMC*, commande linéarisante par retour d'état et commande prédictive non-linéaire. Ces différentes commandes ont été mises œuvre en simulation ce qui nous a permis de choisir les stratégies les plus performantes et de les valider sur le photobioréacteur instrumenté.

Mots-clés : Systèmes biologiques, microalgues, biomasse, photobioréacteur, estimation d'état, filtre de Kalman étendu, commande non-linéaire, commande linéarisante, commande prédictive.

Thesis Abstract

This thesis deals with the control of closed microalgal photobioreactor. Mathematical modeling and model parameters identification are particularly approached. The kinetics and light transfer model parameters were obtained by fitting the experimental data acquired along the exponential phase of batch cultivation of *Porphyridium purpureum* under different conditions in the photobioreactor (2.5 liters).

Biomass is one of the most valuable variables to control. Because biomass concentration is very difficult to measure on-line, a software sensor for its estimation is proposed. An extended Kalman filter (EKF) is developed, based on a dynamic process model in combination with total inorganic carbon measurement within an algorithm of state observation. This software sensor leads to good results and was experimentally validated in a new bubble column photobioreactor (9.6 liters) which carried different probes and sensors necessary to implement a control system.

Several control strategies for microalgae culture were also proposed: non-linear and linear controllers, PID controller, generic model controller (GMC), input-output linearizing controller and non-linear predictive controller. We illustrated our approaches with numerical simulations which allowed us to choose the most successful strategies and to validate them on the instrumented photobioreactor.

Keywords : Biological systems, microalgae, biomass, photobioreactor, state estimation, extended Kalman filter, software sensor, non-linear control, linearizing control approach, non-linear predictive control.