



N° d'ordre :  
N° de série :

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE D'EL-OUED**  
**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE**

## **MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

En vue de l'obtention du diplôme de Licence Académique

Filière : Biochimie

Spécialité : Biochimie

### **THEME**

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA PRODUCTION DE BIOGAZ  
(BIOHYDROGENE) PAR DES MICROALGUES PHOTOSYNTHETIQUES  
(ETUDE THEORIQUE)**

Dirigé par :

Mr. KIRAM Abderrazak

Présenté par :

- Hassani Asma
- Meftah Asma
- Rehouma Fouzia
- Tercha Safia

Année universitaire 2013/2014

## REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire nous remerciant **ALLAH** qui nous a aidé et nous a donné la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Nous souhaitant adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire ;

### **A Mr. KIRAM Abderrazak**

Nous tenant à vous remercier sincèrement d'avoir accepté de nous présider dans ce travail et d'être toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps que vous avez bien voulu nous consacrer et sans vous ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

### **Au corps professoral et administratif du Département de Biologie**

Pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

On n'oublie pas nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

# SOMMAIRE

Remerciements	
Liste de figure	
Liste de tableau	
Liste des Abréviations	
Sommaire	
Introduction	

## Chapitre I: Les microalgues

I-1-Définition du microalgues.....	03
I-2-Morphologie des microalgues.....	03
I-2-1-Les formes unicellulaires.....	03
I-2-1-1-Type rhizopodiat.....	03
I-2-1-2-Type coccoïde.....	03
I-2-1-3-Type flagellé ou monadoïde.....	04
I-2-2-L es formes coloniales.....	05
I-2-2-1-Les colonies mucilagineuses.....	05
I-2-2-2-Les cénobes.....	05
I-2-3-Les formes filamenteuses .....	06
I-2-4-Les formes a structure parenchymateus.....	06
I-3-Caractères générale du microalgues .....	06
I-4- Composition biochimique des microalgues .....	07
I-5-Les facteurs environnementaux déterminants.....	08
a) La lumière.....	09
b) La température.....	09
c) Le pH.....	09
d) Les nutriments.....	10
I-6-Réproduction des microalgues.....	10
I-6-1-Reproduction asexuée.....	10
I-6-2-Reproduction sexuée.....	11
a-La phase de latence ou d'induction .....	11
b-La phase exponentielle .....	11
c-La phase stationnaire.....	11
d-La phase de déclin.....	12

I-7-Milieu de vie.....	12
I-8- La photosynthésique des microalgues.....	13
I-8-1-La photosynthèse.....	13
I-8-2-Rendement photosynthétique des microalgues.....	14
I-9-Classification des microalgue.....	14
I-9-1- Les Cyanophycées (algues bleues-vertes) .....	14
I-9-2- Les Chrysophycées (algues dorées) .....	15
I-9-2-1- Les Chrysophycées.....	15
I-9-2-2- Les Xanthophycées.....	15
I-9-2-3- Les Diatomées ou Diatomophycées (ou Bacillariophycées).....	15
I-9-2-4-Les Phéophycées.....	15
I-9-2-5- Les Raphidophycées (ou Chloromonadophycées) .....	15
I-9-3 Les Rhodophycées (algues rouges) .....	15
I-9-4 Les Euglenophycées.....	16
I-9-5- Les chlorophycées (algues vertes) .....	16
I-9-6 Les bacillariophycées (diatomées) .....	16
I-9-6-1- Les Cryptophycées.....	17
I-9-6-2- Les Dinophycées.....	17
I-10-Mode du nutrition des microalgues.....	17
I-10-1. Autotrophie.....	17
I-10-2. Hétérotrophie.....	17
I-10-3. Mixotrophes.....	17
I-11-La nutrition des microalgues de métabolisme hétérotrophe -mixotrophe .....	18
I-12-La biodiversité des microalgues.....	18
I-13-Les application des microalgues.....	19
I-13-1. Alimentation humaine.....	19
I-13-2. Alimentation animale.....	19
I-13-3. Agriculture.....	20
I-13-4. Chimie.....	20
I-13-5. Cosmétique.....	20
I-13-6. Santé humaine.....	20
I-13-7. Santé animale.....	20
I-13-8. Epuration.....	21
I-13-9 .Energie.....	21

## **Chapitre II : Généralité sur d'enzyme hydrogénase**

II-1-Les enzymes.....	22
II-1-1-Historique.....	22
II-1-2- Définition d'enzymes.....	22
II-1-3- Structure d' enzymes.....	23
II-1-4-Classification des enzymes.....	23
II-1-4- 1- Les oxydoréductases.....	23
II-1-4-2- Les transférases.....	23
II-1-4- 3- Les hydrolases.....	24
II-1-4- 4- Les lyases.....	24
II-1-4- 5- Les isomérases.....	24
II-1-4- 6- Les ligases.....	24
II-2-Enzymes hydrogénase.....	24
II-2-1-Historique d' enzymes hydrogénases.....	24
II-2-2-Définition d'enzyme hydrogénase.....	25
II-2-3-Structure d'enzyme hydrogénase.....	25
II-2-4 -Caractère d'enzyme hydrogénase.....	25
II-2-5- La rôles des hydrogénases.....	26
II-2-6- localication des hydrogénases.....	26
II-2-7-Métabolisme d'enzyme hydrogénase.....	27
II-2-8-Déférent types d'enzyme hydrogénase.....	27
II-2-8-1 - les hydrogénases à fer.....	27
a-Définition.....	27
b-Structure.....	27
c- Localisation.....	28
d-Caractérisation biochimique.....	28
II-2-8-2- Les hydrogénases (NiFe) et ( NiFeSe).....	29
II-2-8-2-1- Les hydrogénases (NiFe).....	29
a- Définition.....	29
b-Structure de l'enzyme.....	29
c-Localisation.....	30
d- Activité de l'hydrogénase NiFe.....	30
II-2-8-2-2- les hydrogénases [NiFeSe].....	30
a- Structure.....	30
II-2-8-3- les hydrogénases sons cluster[Fe-S].....	31
II-2-9- Mécanisme des enzymes hydrogénases.....	32

## Chapitre III: Production de biohydrogène

III-1-Biogaz.....	33
III-1-1-Historique de biogaz.....	33
III-1-2-Définition de Biogaz.....	33
III-1-3-Composition de Biogaz .....	34
III-1-4- Different type de Biogas.....	34
III-1-4-1-Bio méthane .....	34
III-1-4-2- Bio hydrogène.....	35
III-1-5-Utilisation de biogaz .....	35
III-2- Le développement de production de biogaz.....	36
III-2-1- le biocarburant première génération.....	37
III-2-2- le biocarburant deuxième génération .....	37
III-2-3 - le biocarburant troisième génération.....	38
III-3- Bio hydrogène des micro algues.....	39
III-3-1-Définition de bio hydrogène .....	39
III-3-2- Les voies biochimique de production du hydrogène.....	39
III-3-2-1. Par la photosynthèse.....	39
a. Réaction photochimique.....	40
b. Fixation du CO <sub>2</sub> : le cycle de Calvin.....	42
III -4-Les microalgues productrices du hydrogène .....	43

## Chapitre IV: Technique d'isolement et Technique de identification

IV-1- L'isolement et l'identification .....	45
IV-1-1- Le chois de l'espèce microalguale productant de H <sub>2</sub> .....	45
IV-1-2-Le prélèvement des microalgues.....	45
IV-1-3- Isolement de microalgues .....	45
IV-1-3-1-Milieu de culture.....	45
IV.1.3.2. Isolement et repiquages .....	45
IV.1.3.3. Conditions de culture .....	46
IV.1.3.4.Dosage des microalgues des microalgues .....	47
IV.1.3.4.1.Massesèche.....	48
IV.1.3.4.2.Turbidité .....	48
IV.2.Mesure de production d'hydrogène .....	48

IV.2.1.Milieu de culture d'enrichissement des microalgues .....	48
---	----

## **Chapitre V: Culture des microalgues**

V-1-Milieu de culture.....	51
V-1-1-Définition.....	51
V-1-2-Types des milieux de culture.....	51
V-1-2-1-La	
consistance.....	51
V-1-2-2-La composition.....	52
V-1-2-2-1- Les milieux	
complexes.....	52
V-1-2-2.2- Les milieux synthétiques ou définis.....	52
V-1-2-3-L' utilisation.....	52
V-1-2-3-1- Des milieux usuels ou milieux de base.....	52
V-1-2-3-2- Des milieux d' isolement.....	53
V-1-2-3.2.1- Des milieux d' enrichissement.....	53
V-1-2-3.2.2- Des milieux	
sélectifs.....	53
V-1-2-3.2.3- Des milieux différentiels.....	53
V-1-2-3.2.4- Des milieux électifs.....	53
V-1-2-3.3- Des milieux d' identification.....	53
V-1-2-3.4- Des milieux de conservation.....	53
V-1-3-Les milieux de culture spécifique des microalgues.....	54
V-1-3-1-Mode discontinu ou batch .....	54
V-1-3-2-Mode semi-continu ou fedbatch.....	54
V-1-3-3-Mode continu.....	54
V-2-Les types de culture des microalgues.....	55
V-2-1-En condition phototrophes.....	55
V-2-1-1-Gestion des intrans.....	55
V-2-1-2-Les modes de culture.....	57
V-2-1-2-1-Système ouverts-les bassins ouverts.....	57
V-2-1-2-2-Systèmes fermés – les	
photobioréacteurs.....	59
V-2-1-2-2-1.Les PBRs plats.....	59
V-2-1-2-2-2.Les PBR tubulaires.....	60
V-2-1-2-2-3.Les PBRs à colonne verticale.....	62

V-2-1-2-3.Systèmes mixtes.....	63
V-2-1-3.Comparaison des caractéristiques des PRBs plats, tubulaires et cylindrique.....	63
V-2-2-En condition hétérotrophe.....	64
V-2-2-1-Gestion intrants.....	64
V-2-2-2-La fermentation.....	64
V-2-2-3-Comparaison des modes de cultures.....	65
V-2-2-4- Avantages et inconvénients.....	67
Conclusion .....	69
Résumé.....	70
Références Bibliographiques.....	71

## Liste de figure

### Liste de figure

Numéro	Titre	Page
<b>Figure 1</b>	Type rhizopodiat: <i>Rhizochrysis dofleinii</i> et <i>Stephanoporos regularis</i> .	03
<b>Figure 2</b>	Type coccoide: <i>Synechocystis agualilis</i> et <i>cosmarium granalum</i> .	04
<b>Figure 3</b>	Type flagelle: <i>Trachelomonas hipidauar</i> . <i>Coromata</i> et <i>Mallomonas mirabilis</i> .	04
<b>Figure 4</b>	colonies mucilagineuses: <i>Kirchneriella obesa</i> , <i>chroococcus limneticus</i> et <i>Pandorina morum</i> (colonie entière et détail de deux cellules).	05
<b>Figure 5</b>	Cénobes: <i>Tetrastrum hetracanthum</i> , <i>Scenedesmus acuminatus</i> et <i>Pediastrum clathratum</i> .	06
<b>Figure 6</b>	courbe de croissance des microalgues.	12
<b>Figure 7</b>	photo du globe vu par image satellite montrant les zones riches en phytoplancton (en vert)	13
<b>Figure 8</b>	Structure supposé du site actif des hydrogénase à fer ( cluster H ).	28
<b>Figure 9</b>	Structure de site actif des hydrogénases [ NiFe].	30
<b>Figure 10</b>	Structure de site actif des hydrogénases [ NiFeSe].	31
<b>Figure 11</b>	Structure du cofacteur inactivé de l' hydrogénase sans cluster	31
<b>Figure 12</b>	le biocarburant première génération	37
<b>Figure 13</b>	le biocarburant deuxième génération	38
<b>Figure 14</b>	le biocarburant troisième génération	38
<b>Figure 15</b>	Complexes macromoléculaires et transferts d'électrons et de protons au niveau de la membrane du thylakoïde.	42
<b>Figure 16</b>	du Cycle de Calvin. Les nombreux intermédiaires entre le glycéraldéhyde 3-phosphate et le Ribulose 5-phosphate ne sont pas indiqués pour plus de clarté.	43
<b>Figure 17</b>	Souches d'algues et de cyanobactéries.	47
<b>Figure 18</b>	Système complet (sans la source de lumière) utilisé au laboratoire GEPEA pour effectuer des cultures de microalgues en conditions contrôlées .	50
<b>Figure 19</b>	Montage du photobioréacteur pour la culture de <i>Chlorella vulgaris</i> en modeBatch.	54

## Liste de figure

---

<b>Figure 20</b>	: Schéma d'une culture en photobioréacteur en mode continu.	55
<b>Figure 21</b>	système de culture de type raceway	58
<b>Figure 22</b>	photo d'une culture en bassin circulaire en Thaïlande.	58
<b>Figure 23</b>	Photo de culture en cuve.	59
<b>Figure 24</b>	Schéma d'un PBR plat.	60
<b>Figure 25</b>	Différentes organisations de PBR tubulaires.	61
<b>Figure 26</b>	PBR tubulaires horizontaux immergés dans de l'eau, Solix's Lumian™ Algae Growth System	62
<b>Figure 27</b>	Trois exemples de configuration de PBRs à colonne verticale associés avec un système de distribution de gaz, dimensions en mm .	62

## Liste de tableau

---

### Liste de tableau

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1</b>	Composition biochimique des microalgues	07
<b>Tableau 2</b>	irradiance au sol en fonction de la latitude	09
<b>Tableau 3</b>	Les différents types nutritionnels des microalgues.	17
<b>Tableau 4</b>	Les principaux composés des biogaz.	34
<b>Tableau 5</b>	présente les différents taux de substitution entre le biogaz et les autres formes d'énergie.	36
<b>Tableau 6</b>	principales espèces productrices d'hydrogène.	44
<b>Tableau 7</b>	Composition des solutions mères du milieu Bold de base.	46
<b>Tableau 8</b>	Composition chimique du milieu bb (pH=6.6).	49
<b>Tableau 9</b>	Comparaison des caractéristiques des différents designs de PBR.	63
<b>Tableau 10</b>	Comparaison des systèmes de culture de microalgues.	65
<b>Tableau 11</b>	Comparaison des systèmes et modes de culture de micro-algues.	67

## Liste des abréviations

---

### Liste des abréviations

AA	Acide ascorbique :
B <sub>1</sub>	Thiamine
B <sub>12</sub>	Riboflavine
B <sub>6</sub>	Pyridoxine
CID	Carbone inorganique dissou
CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Carbonate
DHA	Acide Docosahexaénoïque
FAD	Flavine adenine dinucléotide .
FMN	Flavine mononucléotide.
GNV	Gaz Naturel pour Véhicule
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Le bicarbonate, ou hydrogénocarbonate
HiPIP	High potential iron-sulfur protein
HMD H <sub>2</sub>	Forming Methyenetetrahydromethanopterin Dehydrogenase .
HRAP	High Rate Algal Pond
IR	Infra Ronge .
N <sub>1</sub> et N <sub>2</sub>	Biomasse au temps 1 et temps 2
N <sub>2</sub>	Le diazote
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NAD(P)H	Hydruce de Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate)
NADP <sup>+</sup>	Nicotine-amide dinucléotide NDH NAD PH-déshydrogénase
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	L'ion ammonium
NO <sub>x</sub>	Oxyde d'Azote
NO <sub>x</sub>	Oxydes d'azote
OEC	Complexe d'oxydation de l'eau
PC	Plastocyanine, Cyt b6
PPF	Photosynthetic Photon Flux
PQ	Plastoquinone
PSI – II	Photo système I -II
RPE	Résonance paramagnétique
S	Soufre
SO <sub>x</sub>	Souffre d'ouxyde

## Liste des abréviations

---

# **INTRODUCTION GENERALE**

## Introduction

Les récentes préoccupations de plusieurs spécialistes au niveau des ressources et des réserves disponibles en pétrole ont soulevé plusieurs inquiétudes au niveau de l'approvisionnement à plus long terme. La dépendance de la société face à l'énergie combustibles d'origine fossile, et ce, principalement dans le secteur des transports, en relation avec l'épuisement des ressources et le réchauffement climatique ont eu pour conséquences des avancées considérables dans le domaine de la recherche en énergies renouvelables. Ces recherches visent une substitution ou un remplacement des combustibles fossiles par diverses énergies renouvelables telles que le biogaz et biohydrogène .

La production de biocarburant a évolué en trois générations, le biogaz de 1<sup>ère</sup> génération, dont il est produit à partir d'huile végétale ; le biogaz de 2<sup>ème</sup> génération , dont il est produit à partir des déchets animale et végétale lignocellulosique et le biogaz (et biohydrogène) de troisième génération dont il est produit principalement par des microalgues .

Les microalgues sont des organismes microscopiques photosynthétique qui peuvent être autotrophes ou hétérotrophes, ils sont représentés aujourd'hui une grande voie de recherche à approfondir. 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 matières organiques et de l'hydrogène biologique utilisés pour la production de biocarburant.

Cette étude est une contribution bibliographique à la production de biohydrogène par des microalgues. Ce mémoire s'articule en cinq parties, **Au chapitre I**, nous présenterons les microalgues et leur taxonomies le mode de nutrition chez les microalgues , leur écologie et leur croissances et les différents domaines d'utilisation.

Le **deuxième chapitre** , présente l'enzyme hydrogénase jouant rôle central dans le métabolisme énergétique de la plupart des micro- organisme producteur de l'hydrogène .

Dans **le troisième chapitre** , les différentes voies de production de biohydrogène de première , de deuxième et de troisième génération.

Le **quatrième chapitre**, présente les techniques d'isolement et d'identification de microalgues producteur de biohydrogène .

Enfin, **le cinquième chapitre** , présente les différents modes de culture des microalgues, ils se présentent dans les systèmes ouverts sont des technologies simples et présentant peu d'investissement initial, le système photobioréacteur sont différents types de réservoirs ou de systèmes fermés dans lesquels les algues sont cultivées, le système

## Introduction

---

photobioréacteur. Et présente les systèmes de culture spécifique des microalgues, ils se présentent dans les modes discontinu ou batch, ce mode est recommandé lorsque l'on cherche à travailler dans des conditions axéniques, semi-continu ou fedbatch et continu c'est le mode de fonctionnement qui permet d'appliquer les techniques de contrôle en toute liberté pour l'étude approfondie des phénomènes de transformation de cellules lors de leur croissance.

CHAPITRE I :

# **LES MICROALGUES**

### I-1- Définition des microalgues

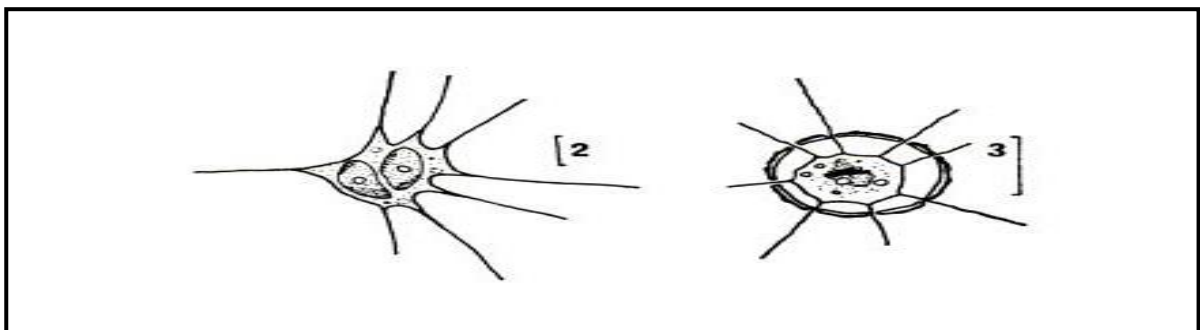
Les micro algues sont des organismes microscopiques eucaryotes photosynthétique qui peuvent être autotrophes ou hétérotrophes (François P.A.,2012),(Sadi M.,2012) .ils sont des végétaux chlorophylliens qui se développent dans l'eau ou dans le milieu très humides comme les marais (Diadié D.,2009). Taille microscopique (1-10 µm), dépourvus de racines, de tige (absence de tissus vasculaires) et de feuilles, mais possédant de la chlorophylle ainsi que d'autres pigments accessoires pour réaliser la photosynthèse productrice d'oxygène. des organismes capables de synthétiser, à partir de gaz carbonique, d'eau et de sels minéraux, les sucres, protéines et autres substances organiques essentiels à leur croissance. (Dehenould G., 2012).

### I-2-Morphologie des microalgues

Les algues se présentent sous un nombre de formes très variées, depuis le type unicellulaire jusqu'aux filaments ramifiés. On peut ainsi distinguer :

#### I-2-1-Les formes unicellulaires

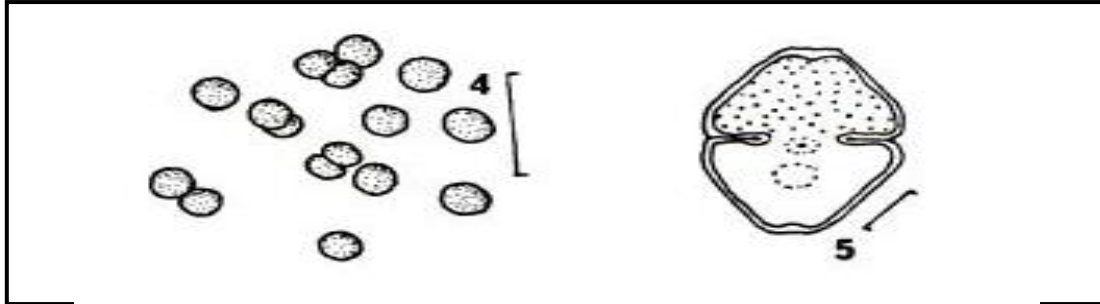
**I-2-1-1-Type rhizopodiat:** Les formes rhizopodiques n'ont pas de parois cellulaires rigides et émettent des pseudopodes comme les amibes ce sont en général des cellules isolées, nues ou contenues dans une thèque d'où sortent les pseudopodes ceux-ci peuvent être courts ou effilés ou ramifiés, ou présentent un axe différencié(Figure 1).(Durand J.R.,1980).



**Figure 1:** Type rhizopodiat: *Rhizochrysis dofleinii* et *Stephanoporos regularis*.  
(Durand J.R.,1980)

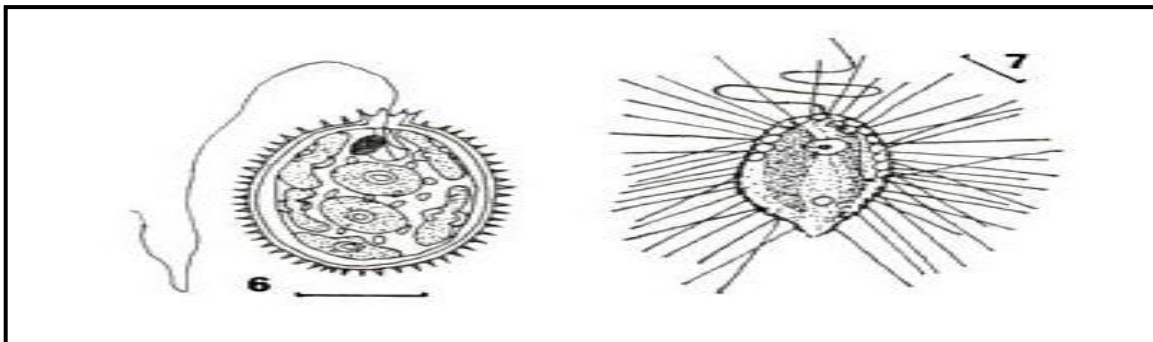
**I-2-1-2-Type coccöide:** Les cellules immobiles sont entourées d'une membrane ferme et bien définie : on trouve des formes simples sphériques ou subsphériques D'autres formes sont

moins simple pour aboutir à des cellules beaucoup plus compliquées ainsi les Diatomées sont constituées par une cellule circulaire ou allongée entourée d'une thèque ornementée deux valves s'emboîtant l'une dans l'autre et les Desmidiacée de deux demi-cellules identiques reliées entre elles par un isthme, parfois très étroit, la paroi de la cellule étant ornementée d'épines, côtes, appendices brachiaux, ect(Figure 2).(Durand J.R.,1980).



**Figure 2:**Type coccoïde: *Synechocystis agualilis* et *cosmarium granalum*.(Durand J.R.,1980)

**I-2-1-3-Type flagellé ou monadoïde:**Les cellules en général solitaires et mobiles possèdent 1, 2, rarement 3 (2 fouets égaux et un appendice flagelliforme) ou 4 fouets. Certaines Euglé nophyte ont un long flagelle qui traverse par un pore surmonté d'un col une thèque le plus souvent ornementée d'épines, de verrues, et de plis. Chez les Dinophycidés, les flagelles sont placées dans deux sillons placés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre ; la paroi de la cellule est soit formée d'une simple membrane périplastique, soit d'une thèque formée de plaques celluloses agencées en deux régions : épïcône et hypocône de part et d'autre du sillon flagellaire transversal. Chez certaines Chrysophycées enfin; la cellule flagellée à deux fouets très Ce type morphologique n'existe pas comme forme végétative chez les Cyanophytes, les Rhodophytes et les Phéophytes(Fig 3).(Durand J.R.,1980).

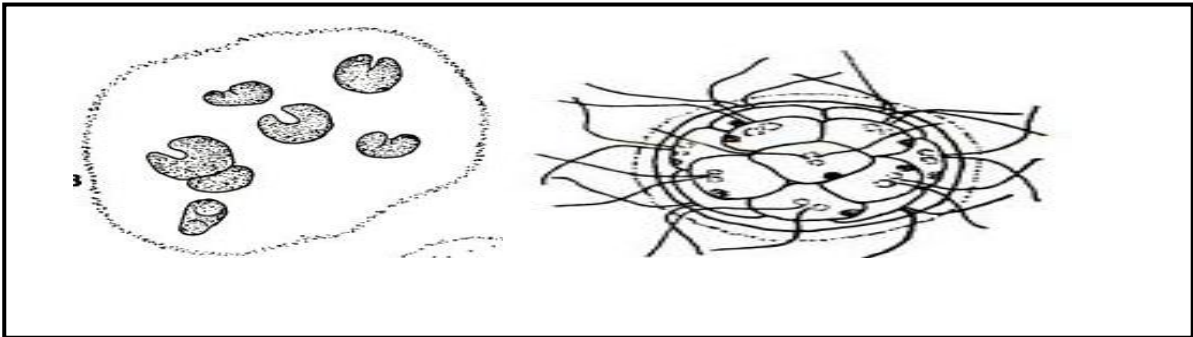


**Figure 3 :**Type flagelle: *Trachelomonas hipidauar*. *Coromata* et *Mallomonas mirabilis*.(Durand J.R.,1980)

### I-2-2-L es formes coloniales

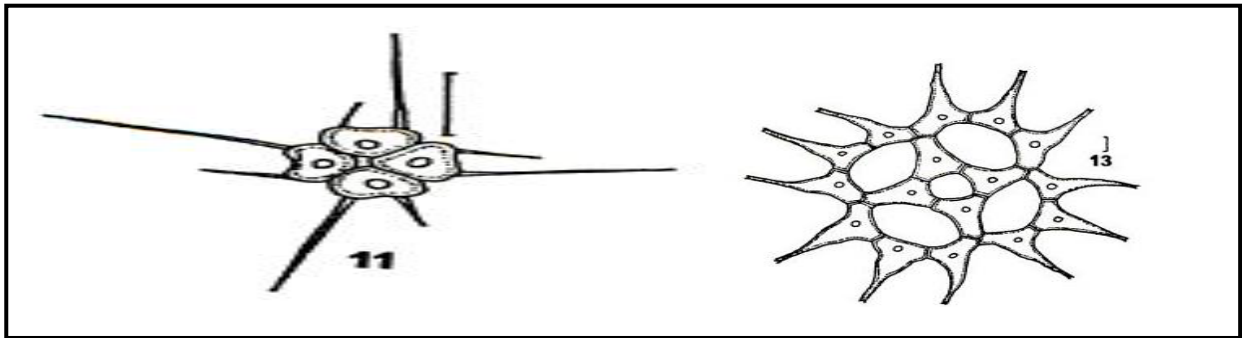
On peut distinguer deux sortes de colonies : les colonies mucilagineuses et les cénobes.

**I-2-2-1-Les colonies mucilagineuses:** Les colonies sont constituées de cellules groupées sans forme définie dans une gelée englobant l'ensemble ; ce type de groupement est assez fréquent chez les Cyanophytes et chez les Chlorophytes . Parfois chaque cellule de la colonie possède une gaine gélatineuse propre, homogène ou stratifiée, l'ensemble étant inclus dans un mucilage général homogène ou stratifiée, l'ensemble étant inclus dans un mucilage général . Il existe des colonies constituées de cellules flagellées et qui sont mobiles ; les cellules sont incluses dans une enveloppe gélatineuse traversée par les flagelles qui battent librement à l'extérieur (Figure 4). (Durand J.R., 1980).



**Figure 4 :** colonies mucilagineuses: *Kirchneriella obesa*, *chroococcus limneticus* et *Pandorina morum* (colonie entière et détail de deux cellules). (Durand J.R., 1980)

**I-2-2-2-Les cénobes:** Ce sont des colonies immobiles ayant toujours une structure régulière. Ce type de forme est fréquent chez les Chlorophytes, en particulier chez les Scenedesmacé. Parfois les cellules marginales n'ont pas le même aspect que celles de l'intérieur . Des méats peuvent exister entre les cellules (Figure 5). (Durand J.R., 1980).



**Figure 5** : Cénobes: *Tetrastrum hexacanthum*, *Scenedesmus acuminatus* et *Pediastrum clathratum*. (Durand J.R.,1980)

### I-2-3-Les formes filamenteuses

Des filaments simples non branchus existent chez un grand nombre d'espèces d'algues d'eau douce. Ils peuvent être libres ou agrégés en colonie ou même attachés du moins au début de leur développement. Des filaments ramifiés, formes les plus évoluées. (Durand J.R.,1980).

### I-2-4-Les formes a structure parenchymateus

La multiplication d'une cellule ou d'un filament dans deux ou trois plan aboutit B la formation d'un parenchyme ou d'un pseudoparenchyme constitué d'une assise de cellules (thalle monostomatique) ou de plusieurs (thalles pluristomatiques). Les formes parenchymateuses sont fréquentes chez les algues marines mais plus rares chez les algues d'eau douce (Chaetophoracées). (Durand J.R.,1980).

### I-3- Caractères générale du microalgues

La majorité des microalgues sont dites photo-autotrophes ou autotrophes. Elles tirent leur énergie de la lumière par photosynthèse et leur principale source nutritive est le CO<sub>2</sub> en solution dans l'eau. Leur relative simplicité et la petitesse de leur taille permettent d'effectuer une photosynthèse très efficace. Elles convertissent ainsi l'énergie lumineuse en lipides et en hydrates de carbone, des formes plus condensées et stables d'énergie. (François D.,2009).

Certaines espèces peuvent aussi être chémo-hétérotrophes ou hétérotrophes. Ainsi, au besoin, elles sont capables de puiser de l'énergie et des nutriments directement des matières organiques présentes dans le milieu aquatique . Par exemple, l'espèce *Agmenellum quadruplicatum* devient hétérotrophe en conditions de faible luminosité . On note que l'espèce hétérotrophe *Cryptocodinium cohnii* est exploitée pour produire de l'huile DHA, l'acide gras

oméga-3 dont l'importance est de plus en plus reconnue pour le maintien d'une bonne santé .(François D.,2009).

#### I-4-Composition biochimique des microalgues

Les micro-algues présentent une très grande diversité de molécules au sein de leurs cellules. Cette biomasse se différencie principalement des autres végétaux par sa richesse en lipides, en protéines, en vitamines, en pigments et en antioxydants.

Elles représentent une source importante de quasi toutes les vitamines essentielles : B1, B6, B12,C, E, K1, et possèdent un large panel de pigments, fluorescents ou non, pouvant aussi avoir un rôle d'antioxydants. En plus de la chlorophylle (0,5 à 1% de la matière sèche) 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 matière sèche) et phycobiliprotéines (phycoérythrine et phycocyanine). Les pigments principalement exploités sont la phycocyanine de la spiruline (colorant bleu), la phycoérythrine (couleur rouge) de *Porphyridium purpureum*, l'astaxanthine d'*Haematococcus pluvialis* ou le bêta-carotène de *Dunaliella salina*. (Julie P.,2010). Tableau 1

**Tableau 1:** Composition biochimique des microalgues (Dabbadie L.,1992)

	<i>Scenedesmus sp.</i>	<i>Spirulina sp.</i>	<i>Chlorella sp.</i>
<b>Composition en % du poids sec:</b>			
Protéines brutes	50-56	50-62	55,5
Eau	4-8	4-10	7
Lipides	12-14	2-7	7.5
Glucides	10-17	16-18	17.8
Fibres brutes	3-10	0.1-0.9	3.1
Cendres	6-10	6,4-9,0	8.25

<b>Acides aminés (en g/16 g N):</b>			
Valine	6,2-7,2	6,5	5,1
Leucine	6,6-9,3	8,5	4
Isoleucine	3,2-4,4	6	3,4
Thréonine	4,8-5,8	4,6	3,2
Méthionine	1,4-1,5	1,4	1,8
Phénylalanine	3,6-4,6	5	4,5
Tryptophane	1,2-1,4	1,4	1,4
Lysine	5,0-5,7	4,6	7,8
<b>Vitamines et autres (en mg/100 g MS):</b>			
MS):	40	-	1,5
Acide ascorbique (C)	50	150	50,2
βcarotène	1,2	360	1,12
Acide panthoténique	-	3	0,3
Pyridoxine (B6)	-	0,1	7
Thiamine (B1)	0,42	4	-
Riboflavine (B2)			

### I-5-Les facteurs environnementaux déterminants

Les facteurs environnementaux vont être déterminants pour la croissance des microalgues. La photosynthèse est une réaction complexe qui se divise en deux étapes : une phase lumineuse et une phase sombre. La phase lumineuse sera très dépendante de la lumière car elle correspond à une étape de transfert d'électrons et la phase sombre qui est une phase de synthèse chimique sera plus dépendante de la température. Les microalgues ont besoin d'un apport de nutriments pour pouvoir croître et se diviser. Une optimisation de tous ces facteurs étroitement corrélés permettra d'atteindre les meilleurs rendements. (Salomez M., 2009).

Chaque espèce de microalgues possède des conditions optimales de culture. L'espèce la plus étudiée est la spiruline car celle-ci est cultivée depuis longtemps. Des méthodes de calculs prenant en compte l'influence des paramètres environnementaux sur la croissance de la microalgue sont disponibles sur le site d'Antenna technologies. (Salomez M., 2009).

Il existe trois facteurs déterminants pour la culture de microalgues : la température, la lumière et le pH. Les microalgues sont sensibles à toute variation brutale des paramètres de

culture. D'autres facteurs moins importants seront aussi à prendre en compte comme l'agitation du milieu par exemple. (Salomez M., 2009).

**a) La lumière:** La lumière est la source d'énergie primaire des organismes réalisant la photosynthèse. Celle-ci est indispensable. Pour les microalgues les durées et les périodes d'ensoleillement seront déterminantes. Selon les régions du monde plus ou moins de lumière est disponible. Les régions les plus ensoleillées seront les plus favorisées pour la culture de microalgues.

La quantité d'énergie arrivant au dessus de la couche atmosphérique correspond à 1370 W / m<sup>2</sup>. A la surface de la terre cette quantité d'énergie est de 1 000 W / m<sup>2</sup> à midi par jour ensoleillé. La quantité d'énergie disponible peut varier en fonction de la latitude, de l'altitude et principalement des conditions météorologiques relatives à la saison. (Salomez M., 2009).

**Tableau 2 :** irradiance au sol en fonction de la latitude (Salomez M., 2009).

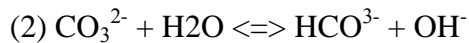
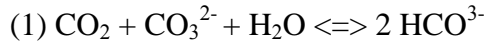
Latitude	Irradiance au sol	
	Kwh/m <sup>2</sup> /an	Gj/m <sup>2</sup> /an
0°	1990	7.18
20°	1885	6.82
Athènes (37°)	1566	5.65
Amsterdam(52°)	998	3.6
Ostersund (suède) (63°)	859	3.1

**b) La température:** La température est un des principaux facteurs influant sur le taux de croissance des microalgues. Chaque espèce de microalgues a son optimum de température. Sachant qu'à l'état naturel les microalgues se retrouvent autant sur les calottes glaciaires qu'au niveau d'un volcan, cet optimum peut varier de -20°C à + 50°C. Les souches des milieux tempérés poussent à des températures de 20-22°C (espèces : *tetrasemis*, *dunaliella*, *chlorella*, *monochrysis*, ...). Pour des espèces tropicales (*T. isochrysis galbana*, *platymonas*), les températures de cultures seront plus proches de 25-26°C. La température est le paramètre qui va contrôler la vitesse des réactions. Celle-ci a tendance à fortement augmenter sous serre ou en plein soleil et crée des problèmes d'évaporation du milieu de culture. Il faudra penser à réguler ce paramètre. (Salomez M., 2009).

**c) Le pH:** Chaque espèce de microalgues possède un pH optimal. La spiruline par

exemple vit en milieu alcalin avec un pH de 8,3 à 11. Cette algue supporte des changements de PH progressifs mais non abrupts.(Salomez M.,2009).

Naturellement, les microalgues ont tendance à alcaliniser le milieu. En effet le CO<sub>2</sub> dissous dans l'eau, une fois mobilisé par les microalgues, libèrent des ions carbonates (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) qui en s'hydrolysant vont libérer des ions OH<sup>-</sup> :



En combinant les équations (1) et (2), on obtient:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}^+$

L'ajout de CO<sub>2</sub> entraîne une acidification du milieu tandis que les microalgues en consommant le CO<sub>2</sub>, augmente le pH (alcalinisation). Cette 'augmentation du pH se répercute sur l'ionisation de certains ions. Ainsi, la forme toxique NH<sub>3</sub> de l'ammoniac devient de plus en plus abondante lorsque le pH s'élève.(Salomez M.,2009).

Afin de contrôler le pH, un système d'injection de CO<sub>2</sub> est utilisé pour les cultures de microalgues en photobioréacteur.

Certaines microalgues préfèrent l'ammoniac comme source d'azote, mais alors le milieu va avoir tendance au contraire à s'acidifier et le contrôle du pH devient plus difficile. De plus l'ammoniac peut devenir pour certaines concentrations toxiques.(Salomez M.,2009).

**d) Les nutriments:** Les eaux douces et de mer sont généralement trop pauvres en sel minéraux pour permettre d'obtenir un bon rendement de production des microalgues. C'est pourquoi, pour des installations de petite échelle, un milieu d'enrichissement correspondant aux besoins nutritifs des microalgues est utilisé, le milieu CONWAY . L'intérêt de ce milieu est qu'il peut être utilisé pour la culture de toutes les espèces de microalgues. Par contre il existe pour chaque espèce un milieu mieux adapté que le milieu CONWAY. Ce dernier est carencé en azote et surdosé au niveau des autres nutriments. Pour la spiruline, le milieu Zarouk est utilisé car il s'agit d'un milieu alcalin.(Salomez M.,2009).

## I-6-Réproduction des microalgues

**I-6-1-Reproduction asexuée :** Elle peut être de 3 types : fragmentation le thalle se sépare en deux parties qui redonneront chacune un nouveau thalle. sporulation des spores peuvent être formées dans les cellules végétatives ordinaires ou dans des structures spécialisées appelées sporanges. scission binaire division du noyau puis du cytoplasme.(Cavalla M.,2000).

**I-6-2-Reproduction sexuée :** Dans la reproduction sexuée, il y a fusion de gamètes mâle et femelle pour produire un zygote diploïde. Des oeufs se forment dans les cellules réceptrices

identiques aux cellules somatiques (Spirogyra) ou dans des cellules végétatives femelles peu modifiées nommées oogones (Fucus). Les spermatozoïdes sont produits dans des structures mâles spécialisées appelées anthéridies. (Cavalla M., 2000).

La croissance algale a été étudiée par différents auteurs. Ainsi, la courbe de croissance des microalgues est caractérisée par quatre phases que sont la phase de latence ou d'induction (1), la phase exponentielle (2), la phase stationnaire (3) et la phase de déclin (4). (Dehenould G., 2012).

**a-La phase de latence ou d'induction:** C'est la phase d'adaptation aux conditions du milieu et caractérisée par une croissance lente des cellules algales. Pendant cette phase, la biomasse algale synthétise les enzymes adaptées au nouveau substrat. Cependant si le repiquage se fait à partir d'un milieu identique au précédent cette phase est réduite. (Dehenould G., 2012).

**b-La Phase exponentielle:** Le taux de croissance d'une population de microalgues est une mesure de l'augmentation de la biomasse dans le temps et il est déterminé à partir de la phase exponentielle. Durant cette seconde phase, la croissance des cellules algales est constante et maximum. Le taux de croissance qui aussi appelé vitesse de croissance spécifique est calculé comme suit : (Dehenould G., 2012).

$$K = \ln(N_2 / N_1) / (t_2 - t_1), \text{ Avec } N_1 \text{ et } N_2 = \text{biomasse au temps } 1 (t_1) \text{ et temps } 2 (t_2).$$

Le nombre de Divisions par jour ou temps de dédoublement est le rapport entre la vitesse de croissance spécifique et le logarithme népérien de 2

$$\text{Div. J}^{-1} = K / \ln 2 = K / 0,69$$

Durée d'une génération; (Gen't) correspond à l'inverse du nombre de divisions par jour.  $\text{Gen't} = 1 / \text{Div. J}^{-1}$  (Dehenould G., 2012).

**c-La Phase stationnaire:** Au cours de cette phase, l'on assiste à une stabilisation de la croissance des algues. Le taux de croissance de celles-ci est alors en équilibre avec les facteurs limitants. Cette phase peut être déclenchée par un certain nombre d'éléments: (Dehenould G., 2012).

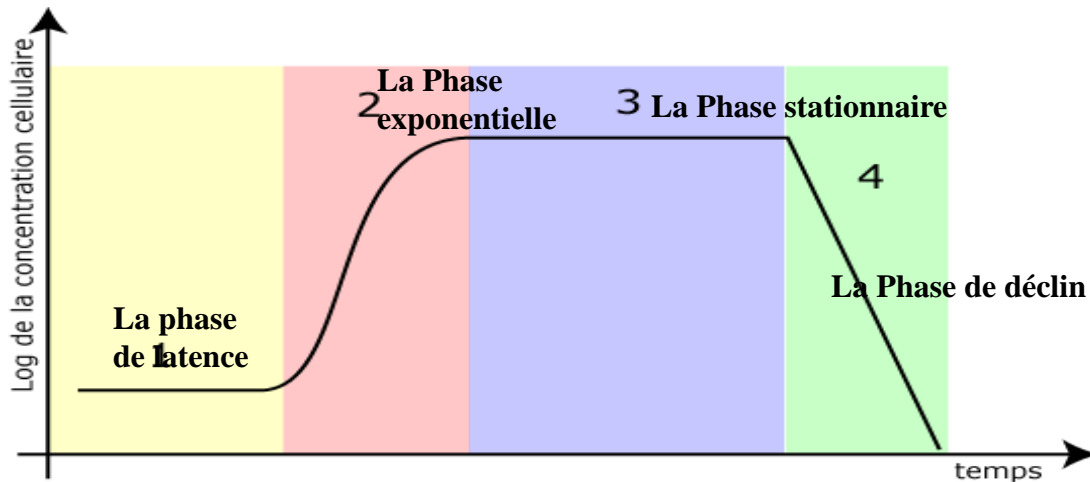
- ✧ épuisement des éléments nutritifs essentiels.
- ✧ excrétion de produits inhibiteurs de croissance.
- ✧ phénomène de compétition intra et inter spécifique.
- ✧ augmentation de la densité algale, il ya une limitation de la lumière suite au phénomène d'ombrage des cellules algales l'une envers l'autre (Self-shading).

Ces processus peuvent être intégrés dans un modèle mathématique du CAHR qui calcule une cinétique de croissance tenant compte de la température, de la lumière, des stoechiométries.

(Dehenould G.,2012).

**d-La Phase de déclin:** Durant cette phase finale, la quantité des nutriments est très basse et incapable pour soutenir la croissance algale. La densité des cellules diminue rapidement.

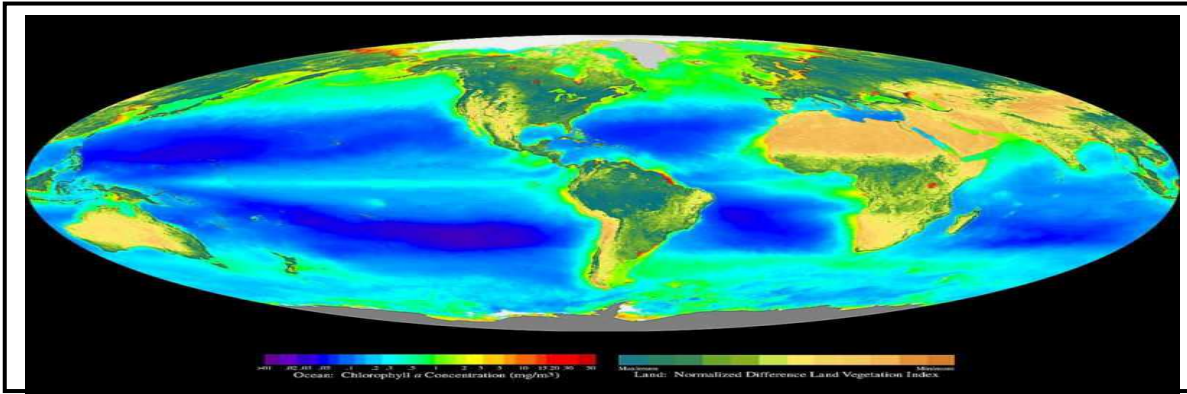
(Dehenould G.,2012).



**Figure 6 : courbe de croissance des microalgues.**(Salomez M.,2009),(Giulina P.,Becerra C.,2009).

### I-7-Millieu de vie

La production primaire en phytoplancton à la surface du globe est localisée dans les eaux riches en nutriments. (Figure 7) Les microalgues peuvent aussi bien vivre en eau salée, saumâtre ou douce. On les retrouve sur les continents et dans les océans. En plein océan, celles-ci se trouvent au niveau des remontées d'eaux froides profondes, appelées aussi upwelling, au niveau des estuaires et des littoraux.(Salomez M.,2009).



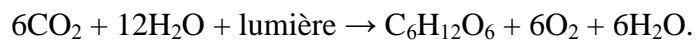
**Figure 7:** photo du globe vu par image satellite montrant les zones riches en phytoplancton (en vert) (Salomez M.,2009).

Les microalgues sont présentes dans de nombreux écosystèmes. Elles peuvent résister à des conditions extrêmes. Elles peuvent vivre autant au niveau des volcans que des glaciers.(Salomez M.,2009).

Un phénomène naturel survenant au large des côtes est celui de bloom phytoplanctonique . Dès lors qu'un apport de nutriment important apparaît dans une région par déversement d'engrais azotés par exemple, une croissance rapide de microalgues apparaît. Il s'agit d'une efflorescence algale localisée.(Salomez M.,2009) .

### **I-8- La photosynthésique des microalgues**

Les microalgues sont des végétaux. Elles vont donc réaliser la hotosynthèse .Il s'agit d'une conversion photochimique qui va permettre à une plante à partir d'énergie lumineuse de produire des molécules chimiques. La réaction de la photosynthèse est pour la production d'une molécule de glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ) :(Salomez M.,2009).



**I-8-1-La photosynthèse:** La photosynthèse est dépendante de l'irradiance (intensité de la lumière), de la qualité de la lumière (type de longueur d'onde), de la température et de la concentration en  $CO_2$  dans l'air.(Salomez M.,2009).

La réponse photosynthétique est plus corrélée aux nombres de photons qu'à l'énergie reçue. Il faut environ 10 moles de photons pour fixer une mole de  $CO_2$ . C'est pourquoi, il est devenu d'usage courant, pour les personnes se préoccupant de photosynthèse, de s'exprimer en fonction du nombre de photons utilisés pour la photosynthèse (PPF = Photosynthetic Photon Flux =  $\mu\text{mol phot m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ou en Einstein) plutôt qu'en énergie globale (Footcandle ou Lux) .

(Salomez M.,2009).

**I-8-2-Rendement photosynthétique des microalgues:** Le rendement photosynthétique des microalgues est théoriquement au mieux de 9% alors qu'il est de 6,6 % pour les plantes en C3 et de 13,4 % pour les plantes en C4 . Les plantes en C4 sont les plantes tropicales, subtropicales et les crassulacées. La canne à sucre est une plante en C4. Dans la réalité ce rendement photosynthétique approche plus les 3 % pour les microalgues et moins de 1 % pour les plantes en C3. Chez les plantes terrestres une grande partie de cette énergie est allouée pour la production de lignine permettant le port des végétaux supérieurs.(Salomez M.,2009).

Chez les microalgues, comme elles baignent dans un milieu liquide, elles n'ont pas besoin de produire cette lignine et toute l'énergie est allouée vers la production d'autres molécules valorisables.(Salomez M.,2009).

### **I-9-Classification des microalgues**

Les microalgues sont très rarement regroupées en fonction de leur métabolisme énergétique ou encore en fonction de leur habileté à synthétiser les métabolites nécessaires, mais plutôt en fonction de leurs propriétés morphologiques . Il existe donc différentes classes taxonomiques de microalgues dont les principales sont les cyanophycées, les chrysophycées, les rhodophycées, les euglenophycées, les chlorophycées et les bacillariophycées.( Cantin I.,2010).

**I-9-1- Les Cyanophycées (algues bleues-vertes):**dénommées aussi Algues bleues ou Schizophytes ou encore Myxophytes, ne possèdent pas de noyau à membrane définie (ce sont des Procaryotes, à l'inverse des autres groupes qui sont des Eucaryotes) ni de chromatophores. Les pigments présents dans la cellule sont nombreux : chlorophylle verte a et c, phycocyanine bleu-vert, phycoérythrine rouge et pigments d'accompagnement,  $\beta$  carotène et xanthophylles jaunes ou ochracés. Certaines espèces ne possèdent que de la chlorophylle. Ces pigments ne sont pas portés par des plastes mais sont diffus dans le cytoplasme et donnent aux cellules une coloration homogène. Le mélange de ces pigments dans le cytoplasme donne en général la teinte bleu-vert caractéristique des Cyanophycées mais on rencontre aussi des teintes vertnoirâtres, brunâtres, rouges, bleues ou même violettes. Les réserves cellulaires sont constituées par un corps très voisin du glycogène dispersé en particules très petites. Elles prennent une teinte acajou au contact d'une solution iodo-iodurée. Les Cyanophytes ne possèdent pas de formes flagellées.C'est un groupe d'algues très abondant dans les eaux douces africaines.(Durand J.R .,1980).

**I-9-2- Les Chrysophycées (algues dorées):** Sont caractérisées par des chromatophores bruns, jaunes ou vert-jaunâtres. Elles ne possèdent jamais d'amidon et ne se colorent pas au contact de l'iode. Il existe de nombreuses formes flagellées possédant pour la plupart deux axes inégaux. Ce groupe se divise en cinq classes :

**I-9-2-1- Les Chrysophycées:** à plastes jaunes ou bruns renfermant des chlorophylles a et c, du  $\beta$  carotène et diverses xanthophylles, sont des organismes unicellulaires ou coloniaux, rarement filamenteux. Elles forment souvent des logettes ou kystes siliceux plus ou moins sphériques, percés d'un pore fermé par un bouchon. (Durand J.R., 1980).

**I-9-2-2- Les Xanthophycées:** possèdent des plastes vert-jaune ou vert à peine jaunâtre où les chlorophylles a et c sont associées à plusieurs xanthophylles et du  $\beta$  carotène, les pigments bruns étant absents. Leur teinte est souvent très proche de celle des Chlorophytes mais l'absence d'amidon permet de séparer facilement les deux groupes. Plusieurs formes constituent des kystes siliceux, globuleux, formés de deux valves de taille égale ou inégale se séparant à la germination par une ligne équatoriale. (Durand J.R., 1980).

**I-9-2-3- Les Diatomées ou Diatomophycées (ou Bacillariophycées):** sont des algues unicellulaires ou coloniales, quelquefois filamenteuses, à plastes bruns ou jaunes contenant de la chlorophylle a et c et du  $\beta$  carotène et plusieurs xanthophylles. Elles sont caractérisées par leurs parois cellulaires imprégnées de silice formant une logette bivalve appelée frustule. Celui-ci a l'aspect d'une boîte surmontée d'un couvercle, les deux valves sont ornées de stries, pores, aiguillons, épines qui ont un grand rôle dans la systématique de ces organismes. Si Chrysophycées et Xanthophycées sont rares dans les eaux soudanaises, les Diatomées composent une part importante de la biomasse algale de ces milieux. (Durand J.R., 1980).

**I-9-2-4- Les Phéophycées:** sont des algues brunes toujours filamenteuses ou thalloïdes, jamais unicellulaires. Elles sont surtout marines et ne sont représentées en eaux douces que par cinq genres et cinq à six espèces fort rares. Elles possèdent des plastes bruns contenant des chlorophylles a et c, du  $\beta$  carotène et des xanthophylles (surtout de la fucoxanthine et de la diatoxanthine). Elles ne produisent jamais d'amidon et les matières de réserve consistent en laminarine et en mannitol. La reproduction se fait par des zoosporocystes uni ou pluriloculaires. Les Phéophycées n'ont pas été signalées jusqu'à présent dans les eaux soudanaises. (Durand J.R., 1980).

**I-9-2-5- Les Raphidophycées (ou Chloromonadophycées):** sont toujours des formes unicellulaires, solitaires, nageant à l'aide de deux flagelles de taille inégale. Leurs pigments sont

constitués par de la chlorophylle a, du  $\beta$  carotène et trois xanthophylles. Cette classe ne comprend qu'une vingtaine d'espèces d'eau douce dont aucune n'a jusqu'à présent été signalée, semble-t-il, dans les eaux soudaniennes. (Durand J.R., 1980).

**I-9-3 Les Rhodophycées (algues rouges):** Sont le plus souvent des algues marines et leur présence dans les eaux douces se limite à une trentaine de genres peu fréquents. Leurs pigments sont constitués par des chlorophylles a et d, des  $\alpha$  et  $\beta$  carotènes, des xanthophylles et des biliprotéines (Phycoérythrine et Phycocyanine). Les réserves sont constituées de rhodamylon ou " amidon floridéen", amidon particulier toujours extraplastidial prenant une teinte rougeâtre au contact de l'iode. En eau douce, la couleur des Rhodophytes est bleu-vert, rouge-violacé, très souvent vert sale ou vert noirâtre. Il n'existe pas de formes flagellées. Ce groupe n'existe qu'à l'état de rareté dans les eaux soudaniennes. (Durand J.R., 1980).

**I-9-4 Les Euglenophycées:** Sont des algues unicellulaires et flagellées, le plus souvent mobiles, avec des plastes verts contenant de la chlorophylle a et b associée à du  $\beta$  carotène et des xanthophylles. Certaines espèces emmagasinent de l'hématochrome (astaxanthine) et prennent une teinte rouge qui masque la teinte verte des plastes. Les réserves sont constituées de grains de paramylon, substance non colorable par la solution iodo-iodurée de lugol, mais présentant en lumière polarisée le phénomène de la croix noire tout comme l'amidon véritable. Ce paramylon est extraplastidial. Les fouets sortent d'une fossette apicale ou subapicale. Les Euglénophytes sont présentes dans les eaux soudaniennes plus particulièrement dans les milieux riches en substances organiques. (Durand J.R., 1980).

**I-9-5- Les chlorophycées (algues vertes):** Sont comme tous les groupes suivants des eucaryotes à noyau bien individualisé; elles possèdent des plastes d'un vert franc contenant de la chlorophylle a et b associée à du  $\alpha$  et  $\beta$  carotène et des xanthophylles identiques à celles des plantes supérieures. Les réserves sont constituées d'amidon intraplastidial colorable en bleu par la solution iodo-iodurée. Les formes nageuses possèdent en général deux ou quatre flagelles de même taille. Les Chlorophytes qui groupent environ six cents genres et plus de huit mille espèces dont les quatre cinquièmes environ vivent en eau douce, sont bien représentées dans les eaux soudaniennes. (Durand J.R., 1980).

**I-9-6 Les bacillariophycées (diatomées):** Sont des plastes bruns, plus rarement rouges ou bleu-vert contenant des chlorophylles a et c, du  $\beta$  carotène et parfois des biliprotéines. Les formes unicellulaires biflagellées sont très nombreuses. Les réserves sont constituées par de l'amidon extraplastidial. On distingue deux classes :

**I-9-6-1- Les Cryptophycées**, toutes unicellulaires, à fouets légèrement inégaux, à insertion latérale et dirigés dans le même sens, sortant d'un cytopharynx. (Durand J.R.,1980).

**I-9-6-2- Les Dinophycées**, ou Péridiniens à fouets dirigés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre, l'un longitudinal, l'autre transversal. Elles ont un très gros noyau à structure filamenteuse.(Durand J.R.,1980).

## **I-10-Mode du nutrition des microalgues**

### **I-10-1. Autotrophie**

C'est le mode de nutrition par lequel les algues élaborent, grâce à la photosynthèse, leur propre substance à partir des éléments minéraux dissous dans l'eau et du CO<sub>2</sub>. Parmi les formes minérales de l'azote (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), c'est l'ammoniac qui est utilisé préférentiellement par de nombreuses algues, le nitrate et le nitrite devant être réduits avant leur assimilation. Certaines *Haematococcus* et certaines *Pandorina* préfèrent cependant l'azote nitrique à l'azote ammoniacal. De nombreuses espèces de cyanobactéries sont aussi capables d'utiliser l'azote dissous d'origine atmosphérique (N<sub>2</sub>). (Dabbadie L.,1992).

### **I-10-2. Hétérotrophie**

C'est le mode de nutrition qui permet l'assimilation directe des substances organiques, de façon plus ou moins indépendante de la photosynthèse. Les algues sont en effet capables d'utiliser et d'assimiler des substances organiques dissoutes et même particulières par phagotrophie. (Dabbadie L.,1992).

### **I-10-3. Mixotrophes:**

Les algues mixotrophes sont les microorganismes susceptibles d'adopter soit l'autotrophie soit l'hétérotrophie comme mode de nutrition. (Dehenould G.,2012) (Tableau 3)

**Tableau 3** : Les différents types nutritionnels des microalgues.(Isabelle C.,2010).

<b>Mode de nutrition</b>	<b>Source d'énergie</b>	<b>Source de carbone</b>
Photoautotrophe	Radiation solaire	CO <sub>2</sub> seulement
Photohétérotrophe	Radiation solaire	CO <sub>2</sub> et carbone organique
Chemoautotrophe	Composé inorganique	CO <sub>2</sub>
Chemohétérotrophe	Composé organique	Carbone organique

### **I-11-La nutrition des microalgues de métabolisme hétérotrophe -mixotrophe**

Les microalgues de métabolisme hétérotrophe et mixotrophe doivent être en présence d'un substrat organique pour assurer leur croissance. Il serait possible de croire que celles-ci peuvent utiliser n'importe quelle source d'hydrates de carbone pour remplacer le rayonnement solaire en tant que source d'énergie pour leur métabolisme, alors que tel n'est pas le cas. En effet, certains substrats sont en mesure de supporter la croissance de certaines espèces alors que ces mêmes substrats sont inefficaces pour d'autres espèces. De plus, certains composés chimiquement similaires ne favorisent pas nécessairement la croissance d'une espèce microalgale donnée. (Cantin I.,2010).

De façon générale, les hydrates de carbone pouvant être assimilés par la plupart des microalgues sont principalement des monosaccharides tel le glucose. Certaines espèces sont aussi en mesure d'assurer leur croissance à partir de disaccharides, d'acétate, de glycérol et de certains acides intermédiaires du cycle de Krebs. Dans la littérature consultée, certaines espèces utiliseraient aussi pour leur croissance des polysaccharides comme l'amidon. Les microalgues, pour pouvoir assimiler les hydrates de carbone, doivent posséder un système de transport à haute affinité. Certains travaux réalisés à cet effet permettent de croire qu'il existe différents systèmes de transport :

- la diffusion passive qui n'exige aucune dépense énergétique.
- le transport actif via la présence d'un gradient de concentration à travers la membrane. Le transport ainsi que la fixation par une enzyme transmembranaire. (Cantin I.,2010).

### **I-12-La biodiversité des microalgues**

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques unicellulaires. Apparues il y a plus de trois milliards d'années et peuplant des milieux extrêmement variés, les microalgues présentent une diversité bien supérieure à celle des plantes terrestres. Les estimations du nombre d'espèces vont de 50 000 à un million d'espèces. Le terme de microalgue regroupe à la fois des procaryotes (les cyanobactéries ou algues bleues) et des eucaryotes (où l'on retrouve les algues vertes, rouges et brunes). Ces dénominations sont associées aux couleurs des pigments synthétisés par ces différents types d'algues. (Wolff A.,2010).

Les algues vertes et rouges appartiennent à la famille des Plantae, la même famille que celle des végétaux supérieurs (plantes terrestres) et sont les plus étudiées. *Chlorella*, *Dunaliella*,

*Haematococcus*, *Chlamydomonas reinhartii* et *Botryococcus braunii* sont des espèces classiques de ce groupe. Les algues brunes et les diatomées forment la famille des Chromalvéolates. Les cyanobactéries quant à elles forment un groupe bien distinct de ces algues précédemment citées ; la Spiruline est l'espèce la plus utilisée en culture algale du groupe des cyanobactéries.

Cette biodiversité est un atout à exploiter via une sélection rigoureuse des souches ayant des caractéristiques intéressantes pour la production de biocarburant.(Wolff A.,2010).

### **I-13-Les application des microalgues**

Nous en détaillons ici les débouchés potentiels dans les 9 domaines d'application suivants : l'alimentation humaine, la nutrition animale, l'agriculture, la chimie, la cosmétique, la santé humaine, la santé animale et l'épuration.(Kawéni Z.,2011).

**I-13-1. Alimentation humaine:** En alimentation humaine, les algues sont utilisées dans différents secteurs :

**(1) Consommation directe :** 75% de la production mondiale de macroalgues est destiné à la consommation directe. On parle aussi d' « algues légumes ». Cette consommation se concentre principalement dans les pays asiatiques. Plusieurs parties du monde sont également connues pour consommer les microalgues directement. Il s'agit de certains peuples autochtones d'Afrique, d'Amérique du Sud et du Mexique.(Kawéni Z.,2011).

**(2) Complément alimentaire et aliment 'santé' :** en raison de leurs nombreuses propriétés nutritionnelles, les algues sont également consommées en tant que complément alimentaire sur les secteurs de la minceur et de la santé. Elles sont une source de vitamines, de

minéraux mais aussi d'acides gras essentiels tels que les omégas et de composés bioactifs intéressants. Les macroalgues sont également une source intéressante de fibres.(Kawéni Z.,2011).

**(3) Ingrédient :** les algues sont une source de molécules naturelles qui rentrent dans les préparations alimentaires.(Kawéni Z.,2011).

**I-13-2. Alimentation animale:** Les macro- et microalgues sont également utilisées en alimentation animale. Autrefois, dans certaines régions côtières, le bétail était amené à paître sur les grèves. Aujourd'hui, les algues se retrouvent sous forme de farines dans la formulation des aliments pour animaux terrestres et aquacoles ou sous forme vivante, uniquement pour les microalgues, dans l'alimentation pour l'aquaculture. La fraction protéique des algues peut être utilisée dans l'alimentation des animaux terrestres et aquacoles comme substitut aux tourteaux oléagineux et aux farines de poisson.(Kawéni Z.,2011).

**I-13-3. Agriculture:** Historiquement et traditionnellement, les macro-algues sont utilisées comme engrais dans le monde entier au niveau des régions côtières. Les “laisses de mer” sont épandues sur les champs. Leur teneur en minéraux permet d’améliorer la composition minérale des sols appauvris et leur richesse en colloïdes d’accroître la capacité de rétention d’eau des sols, de fixer les limons et de réduire l’érosion des terres arables. Les macro-algues brunes entrent aussi dans la formulation de supports de culture (terreaux enrichis) et d’engrais sous forme de farines ou d’extraits liquides. Les algues sont particulièrement riches en éléments fertilisants majeurs N et K, ainsi qu’en éléments fertilisants secondaires S, Ca, Mg, et en oligoéléments. Elles contiennent également des composés qui favorisent la germination, la croissance des feuilles ou des tiges, la floraison. Elles peuvent même être utilisées comme agent de protection biologique contre les maladies des plantes en agissant comme éliciteurs, c'est-à-dire en stimulant les défenses naturelles des plantes. **(Kawéni Z .,2011).**

**I-13-4. Chimie:** L’industrie chimique est actuellement fortement dépendante du pétrole fossile, à partir duquel sont extraits des produits chimiques, les matières plastiques et les carburants de transport. Dans le cadre du Grenelle, l’industrie chimique française s’est engagée à passer d’une utilisation de 5 à 8% de matières premières d’origine végétale à 15% d’ici à 2017. Ce taux de substitution devrait atteindre 50% d’ici 2050, encourageant ainsi le développement de la chimie verte. Un certain nombre de produits chimiques pourrait être obtenus à partir des algues et plus particulièrement des microalgues. Les algues constituent d’autre part un réservoir intéressant pour le secteur des matériaux bio-sourcés. L’exemple le plus connu est le fil d’alginate de calcium qui permet de fabriquer les compresses hémostatiques que l’on retrouve dans les hôpitaux du monde entier. **(Kawéni Z .,2011).**

**I-13-5. Cosmétique:** Les algues sont un ingrédient clé de la réussite de la cosmétique marine française. Les extraits de microalgues et de macroalgues sont de nature très diverse (ex. antioxydant, hydratant, fraction lipidique) et sont utilisés dans une gamme très large de produits cosmétiques. Leur caractère « naturel » en fait leur principal atout, le potentiel de croissance du marché des cosmétiques naturels et bio étant important. Quelques exemples de produits commercialisés sont listés dans le tableau ci-dessous. **(Kawéni Z .,2011).**

**I-13-6. Santé humaine :** De nombreux métabolites d’origine algale montrant une activité biologique intéressante pour des applications en médecine et en pharmaceutique ont été isolés ces dernières années. **(Kawéni Z .,2011).**

**I-13-7. Santé animale:** Une utilisation des algues est également rapportée en santé

animale, notamment en aquaculture où la présence de microalgues dans les bassins permet d'améliorer la qualité sanitaire du milieu et d'observer de meilleurs résultats de production en terme de survie, croissance et qualité du produit .(**Kawéni Z .,2011**).

**I-13-8. Epuration:** Les macroalgues et microalgues peuvent être efficacement utilisées dans le traitement et l'épuration des eaux usées, des déchets solides ou semi-solides (ex. lisiers et fumiers d'origine agricole, déchets et co-produits de l'industrie agro-alimentaire) et des gaz industriels. Cet usage est connu sous le terme de biorémédiation ou plus précisément de phycorémédiation. Les algues jouent un rôle de dépolluant en absorbant les excès de nutriments, en captant les polluants et en fixant le CO<sub>2</sub> ou les oxydes d'azote NOx et de soufre SOx. Le lagunage est un exemple mis en pratique depuis des décennies de procédé de traitement des eaux faisant intervenir des microalgues. Des systèmes plus intensifs sont aujourd'hui à l'étude et certaines technologies sont disponibles commercialement. Les systèmes de bassins à haut rendement algal (HRAP = High Rate Algal Pond) semblent être les plus rentables avec des productivités envisagées de 50 tonnes de microalgues produites par hectare et par an .(**Kawéni Z .,2011**).

### **I-13-9:Énergétique**

**I-13-9-1- Production de biocarburant:**Considérant le contexte mondial actuel (hausse du prix du pétrole, raréfaction des ressources fossiles, production de gaz à effet de serre...), il est intéressant de considérer les microalgues comme source de production de différents types de biocarburant : le biohydrogène.(**Rayen F.,2012**).

## CHAPITRE II :

# **GENERALITE SUR DE L'ENZYME HYDROGENASE**

## II- 1 Les Enzymes

### II-1- 1 Historique

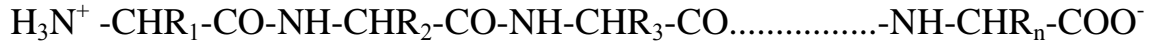
Les enzymes sont responsables des transformations biochimiques (catalyse) des molécules du vivant. De ce fait, cette méthode de catalyse possède un fort potentiel pour des applications industrielles diverses et variées. Lazzaro Spallanzani, moine et physiologiste italien, a été le premier à suggérer le phénomène de catalyse enzymatique à la fin du XVIIIe siècle. Il observa l'action des sucs gastriques de requin sur des aliments. En 1815, Louis Joseph Gay-Lussac décrivit la fermentation alcoolique par des micro-organismes. La première enzyme (la diastase) ne fut découverte qu'en 1833 par Anselme Payen et Jean-François Persoz. En traitant un extrait aqueux de malt avec de l'éthanol, ils firent précipiter une substance, sensible à la chaleur et capable d'hydrolyser l'amidon : la diastase. Enfin, en 1836, Theodor Schwann isolera la pepsine qu'il avait déjà décrite en 1834. C'est la première enzyme isolée à partir d'un tissu animal. Henri et Brown furent les premiers, en 1902, à proposer un modèle dans lequel il y a formation d'un complexe intermédiaire enzyme-substrat. L'uréase, capable de donner, à partir de l'urée, de l'ammoniaque et du CO<sub>2</sub>, fut la première enzyme à être cristallisée et ce en 1926. La pepsine, la trypsine et la chymotrypsine ont ensuite été cristallisées par Northrop et Coll. Ceux-ci démontrèrent de plus que les cristaux de protéines étaient des enzymes pures. Dans les années 30, Otto Warburg établit les bases de la purification des enzymes, ce qui permit d'explicitier un grand nombre de phénomènes physiologiques. En 1955, Sanger établit la séquence des 600 acides aminés qui compose l'insuline, avant qu'en 1966, Merrifield et Wang ne mettent au point une voie de synthèse. Progressivement, le champ d'application des enzymes s'est élargi, avec notamment des applications dans le domaine médical, en chimie analytique ou encore dans le domaine agro-alimentaire, pour devenir une science à part entière, l'enzymologie. (**Jarrar H., 2011**).

### II-1- 2 Définition de l'enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques capables de réaliser la plupart des réactions biochimiques avec une efficacité extraordinaire. Les réactions chimiques dans les systèmes biologiques se font rarement en l'absence d'enzymes. L'activité de ces enzymes est souvent régulée. D'autre part, une enzyme ne favorise pas seulement une réaction chimique donnée, elle empêche aussi la présence de réactions secondaires gênantes. (**Fabiano S., 2002**).

### II- 1- 3 Structure de l'enzymes

On a réussi jusqu'à maintenant à identifier plusieurs milliards d'enzymes, un grand nombre d'entre elles ont été cristallisées. Ce sont toutes des protéines. Les unités structurales de base sont donc des aminoacides. Ces aminoacides sont unis par des liaisons peptidiques pour former des chaînes polypeptidiques. (Fabiano S., 2002).



Les groupements R possèdent souvent des fonctions  $\text{NH}_2$  ou  $\text{COOH}$  permettant leur immobilisation par liaisons covalentes sur des supports insolubles. La spécificité de l'enzyme est souvent attribuée à sa structure tridimensionnelle très élaborée permettant la formation du site actif responsable de la catalyse enzymatique. (Fabiano S., 2002).

### II-1- 4 Classification des enzymes

On trouve encore, à l'heure actuelle la dénomination ancienne de certaines enzymes telle que trypsine. Cependant, dans la mesure où l'on s'intéresse moins à la nature qu'à la fonction de l'enzyme, on utilise plutôt la nomenclature suivante (Chabraoui L, et al., 2011-2012)

L'Union Internationale de Biochimie recommande l'utilisation du suffixe <ase> couplé par fois avec le substrat (uréase, phosphatase.....), mais généralement avec le type de réaction catalysée (hydrolase, oxydase, isomérase....) (Chabraoui L, et al., 2011-2012).

Chaque enzyme porte ainsi un numéro dont le premier chiffre correspond à un certain type de réaction catalysée: (Chabraoui L, et al., 2011-2012)

**II-1-4-1- Les oxydoréductases :** nécessitent un coenzyme (NAD, NADP, FAD ou FMN) :

- Hydroxylases: (=monooxygénases) catalysent la fixation d'un atome d'oxygène
- Déshydrogénases: comme lactate déshydrogénase
- Cytochromes: ont un coenzyme hémique avec un ion, qui présente 2 états d'oxydation, ce qui en fait un transporteur d'électrons (Chabraoui L, et al., 2011-2012)

**II-1-4-2- Les transférases:** catalysent le transfert de groupement autre que l'hydrogène entre deux substrats nécessitent un coenzyme (Chabraoui L, et al., 2011-2012)

- les transaminases: transfèrent les radicaux aminés  $-\text{NH}_2$  d'un AA à un acide cétonique accepteur. Le coenzyme est le phosphate de pyridoxal.
- les phosphokinases ou kinases: transfèrent un P sur une molécule d'ADP. L'ion  $\text{Mg}^{++}$  est indispensable

- Les transacétylases: transfèrent les radicaux acétyles(-CH<sub>2</sub>COOH), le coenzyme est CoA
- Les transméthylases: transfèrent les radicaux méthyles (-CH<sub>3</sub>), d'une molécule à une autre, le coenzyme est l'acide tétrahydrofolique ( **Chabraoui L , et al ., 2011-2012** )

**II-1-4-3 Les hydrolases:** Catalysent la rupture d'une liaison avec fixation des éléments d'une molécule d'eau.

- Les estérases: hydrolysent les esters en acides gras et en alcool
- Les lipases : hydrolysent les glycérides en glycérol et en acidesgras
- Les osidases: hydrolysent les osides ; glucosidase, galactosidase
- Les enzymes protéolytiques: hydrolysent les liaisons peptidiques (**Chabraoui L , et al ., 2011-2012** )

**II-1-4- 4 Les lyases:** catalysent la rupture des liaisons C-C, C-N, C-O, C-S (**Chabraoui L , et al ., 2011-2012** )

**II-1-4- 5 Les isoméras:** catalysent le déplacement de groupes à l'intérieur d'une molécule sans que la formule brute varie (**Chabraoui L , et al ., 2011-2012** )

**II-1-4- 6 Les ligases:** catalysent la condensation de 2 molécules (**Chabraoui L , et al ., 2011-2012** )

## **II- 2 Enzymes hydrogénase**

### **II-2-1 Historique de l' enzymes hydrogénases**

En 1887, Hoppe-Seyler, découvre que certaines bactéries sont capables de décomposer le formiate en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. Le nom « hydrogénase » est donné par Stevenson et Stickland en 1931 aux enzymes exprimées par des bactéries du colon, après avoir observé leur capacité à produire de l'hydrogène et à l'utiliser pour réduire des substrats (**Demuez M ., 2007**).

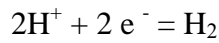
Si les hydrogénases sont donc connues depuis plus d'un siècle, la détermination de leurs structures et plus particulièrement de leurs sites actifs a suivi un long cheminement. En 1956, la présence de fer non hémique est confirmée. Au cours des années 1970, des expériences de RPE ont montré que les hydrogénases contenaient des clusters fer-soufre de type ferredoxine HiPIP (« high potential iron-sulfur protein »). En 1980, Thauer a détecté la présence de nickel dans certaines hydrogénases donnant lieu à de nombreuses spéculations sur la nature du site actif.

Aujourd'hui, les hydrogénases peuvent être classées en deux groupes selon le type de réaction qu'elles catalysent.

- les hydrogénases catalysant l'interconversion  $H^+/H_2$ . Selon le métal qu'elles renferment au sein de leur site actif, ces hydrogénases peuvent être distinguées en deux classes : les hydrogénases FeFe d'une part, et les hydrogénases NiFe et NiFeSe (dans lesquelles une des cystéines coordonnant le nickel est remplacée par une sélénocystéine) d'autre part.
- les hydrogénases dites « sans cluster Fe-S » ou HMD (pour  $H_2$ -forming Methylene tetrahydro - methanopterin Dehydrogenase) qui catalysent un transfert d'hydrure réversible de l'hydrogène au cofacteur méthényltétrahydropyriméthanoptérine ( **Demuez M ., 2007**).

### II-2-2 Définition de l'enzyme hydrogénase

Les hydrogénases sont les catalyseurs biologiques de la production et de l'oxydation du dihydrogène selon la réaction: ( **Saidi A. et al ., 2007** ) .



Il existe deux familles d'hydrogénases catalysant la production d'hydrogène ou son oxydation ( **Saidi A. et al ., 2007** ).

### II-2- 3 Structure de l'enzyme hydrogénase

Ce sont des métalloenzymes complexes, formées d'une seule protéine ou de l'assemblage de plusieurs protéines, et incorporant des éléments non protéiques (des cofacteurs inorganiques comportant des ions métalliques **Avavian P.(2011)** ). Il faudra attendre 1995 et 1998-1999 ( respectivement ) pour connaître les structures , étonnantes et imprévues des hydrogénases [NiFe ] et à fer . En effet la présence de sites organométalliques possédant des ligands cyanures et carbonyles est un fait unique en biologie . Cela est d'autant plus remarquable que ces molécules prosthétiques sont généralement considérées comme toxiques pour les organismes vivants ( **Yohan O., 2006** ) .

### II-2- 4 Caractère de l'enzyme hydrogénase

Les hydrogénases constituent un groupe d'enzymes assez hétérogène qui diffèrent dans leur composition moléculaire, la composition des cofacteurs, l'activité spécifique de production d'hydrogène ou d'oxydation, la spécificité des transporteurs d'électrons et la sensibilité à l'inactivation par l'oxygène ( **Saidi A . et al ., 2007** ).

Cependant ce sont toutes des protéines fer-soufre et la majorité d'entre-elles contient du nickel. Les hydrogénases qui catalysent l'oxydation de l'hydrogène sont dites consommatrices ou "uptake". Les hydrogénases capables soit d'oxyder l'hydrogène, soit de produire l'hydrogène sont dites réversibles.( **Saidi A . et al ., 2007** ).

Les hydrogénases "uptake" sont présentes chez les bactéries anaérobies strictes, anaérobies facultatives ou aérobies. L'oxydation de l'hydrogène est couplée à la réduction d'un accepteur terminal d'électron tel que l'oxygène, le nitrate, le sulfate, le dioxyde de carbone et le fumarate. Cette respiration permet la production d'énergie (**Saidi A . et al ., 2007**).

Les hydrogénases réversibles qui catalysent la production d'hydrogène sont présentes dans des bactéries anaérobies strictes ou facultatives, et dans les microorganismes photosynthétiques (**Saidi A . et al ., 2007**).

### **II-2- 5- Le rôles des hydrogénases**

L'hydrogénase joue un rôle central dans le métabolisme énergétique de la plupart des micro-organismes produisant de l'hydrogène. L'hydrogène produit par certains microorganismes peut être utilisé comme pouvoir réducteur par d'autres micro-organismes (**Demuez M ., 2007**).

Le rôle physiologique des hydrogénases peut être classé en trois fonctions différentes.

- Les bactéries utilisent les hydrogénases pour catalyser la production d'hydrogène, ou la réduction du proton, au cours d'un processus fermentatif couplé à l'oxydation de substrats carbonés.

- La réduction cytoplasmique des protons induit l'alcalinisation du cytoplasme et l'oxydation périplasmique de l'hydrogène cause l'acidification du périplasme.

- Chez de nombreuses bactéries aérobies ou anaérobies, l'oxydation de l'hydrogène est une source d'électrons et peut être couplée à des réactions productrices d'énergie telles que la phosphorylation oxydative de l'hydrogène au cours d'un processus respiratoire.

Ainsi, les hydrogénases peuvent interagir avec des systèmes de transport d'électrons, attachés à la membrane pour maintenir l'équilibre d'oxydo-réduction (chez les micro-organismes photosynthétiques comme les cyanobactéries). Les hydrogénases impliquées dans les processus fermentatifs jouent un rôle biologique important dans la conservation de l'énergie et dans la génération de la force motrice (**Demuez M ., 2007**).

### **II-2-6- Localisation des enzymes hydrogénases**

Ces différentes fonctions sont souvent associées à différentes localisations cellulaires. La production d'hydrogène est souvent cytosolique tandis que la consommation d'hydrogène est périplasmique ou associée aux membranes. Les hydrogénases bidirectionnelles sont localisées dans le cytoplasme. Certaines bactéries possèdent plusieurs hydrogénases différentes, qui sont situées dans des compartiments cellulaires différents. La multiplicité des hydrogénases dans

certaines organismes reflète l'importance de l'hydrogène dans leur métabolisme et assure une réponse rapide et efficace aux variations des besoins énergétiques lors de changements de conditions environnementales de croissance (**Demuez M ., 2007**).

### II-2-7 Métabolisme de l'enzyme hydrogénase

Certains organismes, bactéries ou micro-algues, possèdent naturellement la capacité de produire ou d'oxyder l'hydrogène. Par exemple, la bactérie *Ralstonia eutrophavit* grâce à un Métabolisme basé sur la réaction de l'hydrogène avec l'oxygène, le même processus que celui à l'œuvre dans une pile à combustible ! La microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*, à l'instar des plantes convertissant l'énergie lumineuse en énergie chimique (la biomasse) par réduction du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) atmosphérique, peut réaliser, quant à elle, une certaine forme de photosynthèse mais pour produire de l'hydrogène par photolyse de l'eau. Toutes ces activités sont possibles seulement parce que ces organismes expriment des métallo-enzymes fascinantes appelées hydrogénase (**Saidi A. et al ., 2007**).

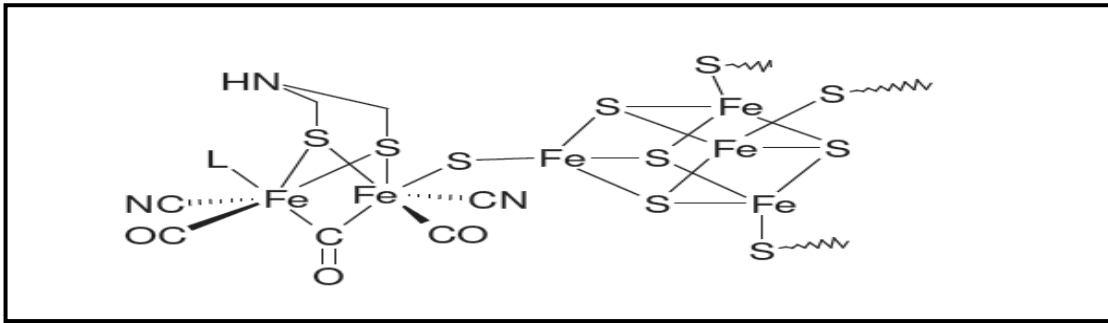
### II-2-8- Différents types d'enzyme hydrogénase

Les hydrogénases sont classées suivant la nature de leur site actif. On distingue ainsi les hydrogénases avec un site actif bi nucléaire composé uniquement de fer comme métallhydrogénases (FeFe), celles, apparentées aux hydrogénases même si fondamentalement elles ne catalysent pas l'interconversion de protons en dihydrogène, dont le site actif est composé d'un complexe mononucléaire de fer (hydrogénase sans cluster fer-soufre, Hmd, voire hydrogénase à fer mononucléaire) et enfin celles dont le site actif est composé d'un dinucléaire de nickel et de fer (les hydrogénases NiFe et une sous-classe : les hydrogénases NiFeSe) (**Bacchi M ., 2013**).

#### II-2- 8-1- les hydrogénases à fer

**a-Définition :** Elle ne sont présentés que ,chez les eubactéries et les eucaryotes dont peut être chez les mammifères. Elle sont surtout actives en production d'hydrogène (**Yohan O, 2006**).

**b-structure :** Les structures de ces enzymes sont assez différentes mais elles possèdent toutes deux des clusters [Fe-S] capables de drainer des électrons entre la surface et le site actif profondément en foui dans la protéine.(Figure 8) (**Yohan O., 2006**).



**Figure 8 :** Structure supposée du site actif des hydrogénases à fer ( cluster H ).

(Yohan O., 2006 ).

**c- Localisation :** Les [FeFe]-hydrogénases sont beaucoup moins répandues que les [NiFe]-hydrogénases. Les [FeFe]-hydrogénases ont été découvertes chez quelques bactéries anaérobies et eucaryotes mais aucune n'a été identifiée chez les archa (Demuez M., 2007) .

**d- Caractéristiques biochimiques:** Les hydrogénases à fer peuvent catalyser quatre types de réactions :

- la réaction de conversion du para-H<sub>2</sub> en ortho-H<sub>2</sub> qui fait seulement intervenir le clivage hétérolytique de l'H<sub>2</sub>.
- la réaction d'échange entre des isotopes de l'hydrogène : le protons et le deutérium qui fait intervenir le clivage hétérolytique de l'hydrogène, et le transfert de protons.
- la réaction d'oxydation de l'hydrogène couplée à la réduction d'un partenaire redox qui fait intervenir le transfert inter- et intra-moléculaire des électrons, le transfert de protons et le clivage hétérolytique de l'hydrogène.
- la réaction de réduction de protons (production d'hydrogène) couplée à l'oxydation d'un partenaire redox qui fait intervenir le transfert inter- et intra-moléculaire des électrons et le transfert de protons (Demuez M ., 2007) .

Les partenaires d'oxydo-réduction des [FeFe]-hydrogénases peuvent être des protéines (cytochromes, ferrédoxines, flavodoxines), des molécules chimiques (méthyl viologène, benzyl viologène), ou une électrode (graphite) (Demuez M ., 2007) .

Les [FeFe]-hydrogénases des algues vertes ont une activité spécifique de production de l'ordre de 800 µmole d'H<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>. Il est intéressant de remarquer que, malgré leur structure minimale, cette valeur n'est pas supérieure aux activités de production des [FeFe]-hydrogénases clostridiales ou du genre *Desulfovibrio* (Demuez M ., 2007) .

**II-2-8-2 Les hydrogénases (NiFe) et ( NiFeSe)**

Elles sont caractérisées par un site actif hétérobimétallique contenant un atome de fer et un atome de nickel . Des structures cristallographiques de ces enzymes sont connues pour cinq organismes et sont de trois types : les hydrogénases [NiFeSe], les hydrogénases [NiFe] à ligands carbonyles et les hydrogénases [NiFe] à ligands sulfoxydes . Les hydrogénases [NiFeSe] sont présentes chez les bactéries sulfato-réductrices et peuvent être péri- ou ctto-plasmique (**Yohan O., 2006** ).

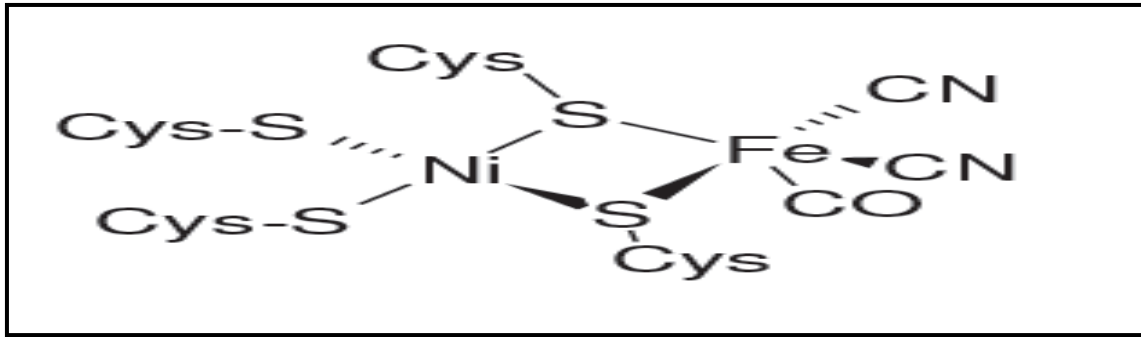
**II-2- 8-2-1- Les hydrogénases (NiFe)**

**a- Définition:**Les hydrogénases NiFe sont présentes chez certaines bactéries (dans le cytoplasme et dans le périplasma) et archées. On connaît une centaine d'hydrogénases NiFe réparties chez une quarantaine d'organismes. Elles sont les enzymes clés du métabolisme de l'hydrogène.

Plusieurs catégories peuvent être identifiées : celles possédant des ligands carbonyles, représentées par les hydrogénases de *Desulfovibrio (D.) gigas*<sup>10</sup>, de *D. fructosovorans* <sup>31</sup> et probablement de *D. vulgaris* Miyasaki F <sup>32,33</sup> (pour laquelle des ligands sulfoxides ont été proposés dans les deux structures cristallographiques initialement décrites), celles dont les cystéines ligands du site actifs seraient oxydées,<sup>34</sup> et les hydrogénases NiFeSe (**Demuez M., 2007**) .

**b-Structure de l'enzyme:** La première structure tridimensionnelle d'une hydrogénase NiFe a été résolue en 1995, à 2,85 Å , pour l'hydrogénase de *D. gigas* ; la résolution atteinte a permis l'identification d'un complexe hétérodinucléaire comprenant un atome de nickel et un autre métal non identifié. L'année suivante, l'obtention par la même équipe d'une nouvelle structure avec une résolution améliorée (2,54 Å),<sup>11</sup> complétée par des données de spectroscopie InfraRouge (IR) a permis une description précise et complète de l'enzyme. Les structures RX sont enregistrées à partir de cristaux qui sont des mélanges de formes oxydées de l'enzyme ( **Demuez M., 2007**) .

Les hydrogénases NiFe sont ainsi constituées de deux sous-unités de 28 et 60 kDa. Le site actif de l'enzyme se trouve enfoui au coeur de la plus grosse de ces deux sous-unités à 30 Å de la surface de l'enzyme : celui-ci est constitué d'un complexe hétérobimétallique à base de nickel et de fer, caractéristique de cette classe d'hydrogénase. L'atome de nickel est coordonné par 4 résidus cystéines.(Figure 9) (**Demuez M ., 2007**) .



**Figure 9:** Structure de site actif des hydrogénases [NiFe].( **Yohan O., 2006** ).

**c-Localisation** : Les [NiFe]-hydrogénases ont été isolées chez des procaryotes, c'est-à-dire des bactéries telles ue les protéobactéries et cyanobactéries, et des archa méthanogènes Les [NiFe]-hydrogénases existent sous forme cytoplasmique, périplasmique et /ou membranaire. Pour être exportées vers le périplasma ou importées dans un organelle (**Demuez M., 2007** ).

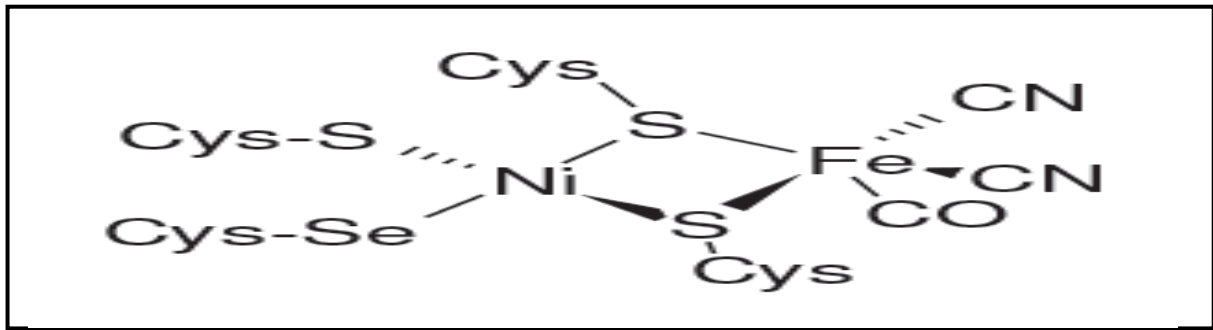
**d- Activité de l'hydrogénase NiFe:**La structure originale de l'enzyme décrite au paragraphe précédent lui confère une activité catalytique élevée (**Sigolène C ., 2009** ).

En effet, les hydrogénases NiFe catalysent de manière remarquablement efficace, dans des conditions biologiques (30°C, pH 7) et sous 0,1 bar H<sub>2</sub>, l'interconversion H<sup>+</sup> / H<sub>2</sub> ( **Sigolène C ., 2009** ).



### II-2- 8-2-2 les hydrogénases [NiFeSe]

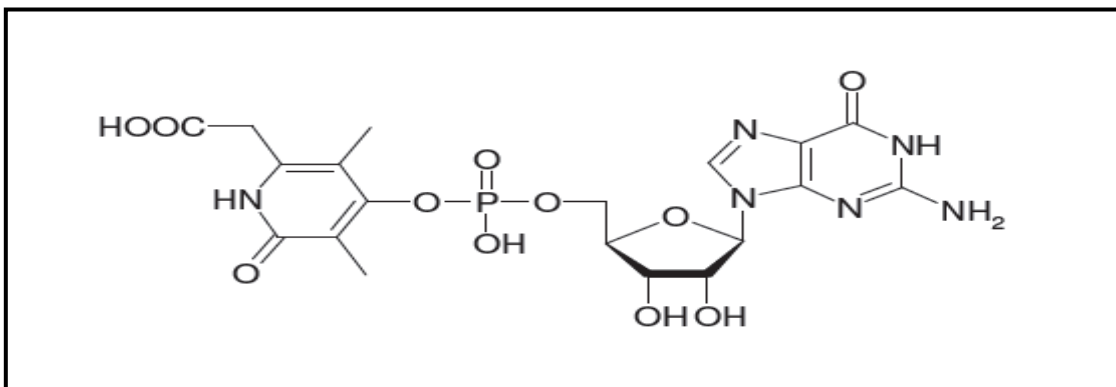
**a- Structure** :Les hydrogénases [NiFeSe] forment une sous-classe des hydrogénases [NiFe] . l' hydrogénases périplasmique de *D. baculatum* a été cristallisés . Il s' agit d' un hétérodimètre comprenant deux sous unités de 26 et 49kDa. (Figure 10). (**Yohan O., 2006** ).



**Figure10:** Structure de site actif des hydrogénases [ NiFeSe].( **Yohan O ., 2006** ).

### II-2-8-3- Les hydrogénases sans cluster[Fe-S]

Elles sont aussi connues sous le nom de Hmd pour H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin déshydrogénase . Seuls certaines archées méthanogènes en possèdent . Ces hydrogénases diffèrent largement des deux autres car celles ne contiennent pas de clusters [Fe-S] et ne possèdent pas la même réactivité . En effet , elle catalysent réversiblement la réaction de réduction du N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-méthényltétrahydréméthanoptérine en N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-méthényltétrahydréméthanoptérine en présence d'hydrogène . Cela correspond à un transfert d'hydrure sur le substrat et à la libération d'un proton en solution . Ces hydrogénases ne sont pas capables de catalyser la réduction du méthylviologène par H<sub>2</sub>, ni de catalyser l'échange de protons de H<sub>2</sub> avec le deutérium de l'eau lourde . C'est pour cela que ce ne sont pas des hydrogénases à proprement parler . Cependant , leur capacité à utiliser l'hydrogène leur vaut l'appellation " hydrogénase". (Figure 11). (**Yohan O., 2006** ).



**Figure 11 :** Structure du cofacteur inactivé de l'hydrogénase sans cluster [ Fe-S]( **Yohan O ., 2006** ).

**II-2-9 Mécanisme des enzymes hydrogénases**

Lorsque le dihydrogène est oxydé sur le platine dans une pile à combustible, la liaison H-H est coupée de façon symétrique pour former deux atomes d'hydrogène adsorbés. Dans les hydrogénases, le mécanisme est entièrement différent, l'oxydation du dihydrogène commence par sa fixation sur le site actif et la rupture asymétrique de la liaison H-H, pour former un hydrure.

Le proton est capté par une base voisine, il s'agit sans doute de l'azote du ligand dithiométhylamine dans le cas des hydrogénases FeFe, ou d'un soufre de cystéine dans le cas des hydrogénases NiFe. Le site actif est ensuite réoxydé en deux étapes, chaque électron étant transporté le long du chapelet d'agrégats FeS, et un deuxième proton est libéré du site actif. Une nouvelle molécule de dihydrogène peut alors s'en approcher, en diffusant le long du tunnel, et s'y lier, pour compléter le cycle catalytique. L'efficacité de certaines hydrogénases est telle que cette série complète d'événements se produit plusieurs milliers de fois par seconde, ce qui permet d'envisager l'utilisation de ces hydrogénases comme catalyseurs supportés de l'oxydation du dihydrogène dans des biophiles (**Avavian P.,2011**) .

La nature est donc une formidable source d'inspiration pour les chimistes. Une nouvelle approche permet d'ailleurs de synthétiser des composés chimiques mimant les sites actifs des hydrogénases. (**Avavian P., 2011**) .

CHAPITRE III :

**PRODUCTION DE BIOHYDROGENE**

### III-1-Biogaz

#### III -1-1 -Historique de biogaz

La découverte du pétrole synthétique par Jean Laigret. (1863-1966) Jean Laigret travaille sur la fabrication d'hydrocarbure à partir de bactéries anaérobies du sol, de type *perfringens*. Les bacilles anaérobies sont des microorganismes capables de vivre dans un milieu privé d'oxygène. Le *perfringens* possède déjà une certaine notoriété: c'est en effet l'un des microbes les plus importants de la grangrène gazeuse; d'autre part, son action de ferment destructeur de la matière organique aux dépens de laquelle il produit du gaz carbonique et de l'hydrogène. Un article de Jean Lagarde a été publié dans science et vie en Juillet 1949 intitulé « le pétrole de fermentation peut être produite partout».(Sarah B et al., 2009)

Depuis sa découverte, le biogaz a connu une importante répartition d'abord à travers des installations simples. Cet engouement est apparu surtout dans les pays asiatiques; c'est le cas de la Chine, de l'Inde et du Népal, où des millions de digesteurs sont en fonctionnement. Il faut dire que la Chine et l'Inde possédaient une culture technique de la méthanisation depuis les années 30, et que les recherches sur ce thème n'y ont jamais été interrompues Dans les pays occidentaux, l'Allemagne est le pionnier dans ce domaine.

Actuellement, cette technique est utilisée aux Etats-Unis, au Japon et en Suède dans la gestion de la plus part des décharges publiques.(Igoud S ., 2002)

#### III -1-2-Définition de Biogaz

Le Biogaz est une énergie renouvelable. (Igoud S ., 2002) (La formation du biogaz est un phénomène biologique naturel résultant de la fermentation bactérienne anaérobie(Sama H et al., 2012) de matières organiques animales ou végétales en l'absence d'oxygène. Cette fermentation est appelé aussi méthanisation. Celle-ci se produit naturellement (dans les marais) ou spontanément dans les décharges contenant des déchets organiques, mais elle peut être aussi provoquée artificiellement dans des digesteurs pour traiter des boues d'épuration, des déchets organiques industriels ou agricoles(Sarah B et al., 2009).Le biogaz est un mélange composé essentiellement:

- de méthane (typiquement 50 à 70%) .
- de gaz carbonique, avec des quantités variables d'eau, d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S).

Le biogaz carburant est du biogaz ou du bio méthane utilisé comme carburants verts pour véhicules. Sa partie énergétique est du méthane biologique, il s'agit donc tout simplement de GNV (Gaz Naturel pour Véhicule) renouvelable. (Sarah B et al ., 2009)

**III -1-3-Composition de Biogaz**

Le biogaz est un mélange contenant principalement du méthane (50 à 70%), du dioxyde de carbone, de l'eau, de l'azote, de l'hydrogène sulfuré et de l'oxygène. Du fait d'une forte concentration en méthane, le biogaz est un bon fournisseur d'énergie (1m<sup>3</sup> de biogaz a un pouvoir calorifique de 6 kWh soit l'équivalent de 0,6 l de fuel). Les principaux composés des biogaz sont fortement liés aux substrats dont ils sont issus. Dans le domaine de l'agriculture, les composés les plus présents au sein du biogaz sont généralement méthane (50 à 75% du volume du biogaz) et le gaz carbonique (25 à 45% du volume du biogaz) (Tableau 4) **Zdanevitch L et al.,2009**).

**Tableau 4:** Les principaux composés des biogaz. ..(**Zdanevitch L et al.,2009**).

Composés	Concentrations dans un biogaz (générique)	Concentration dans un biogaz agricole	
CH <sub>4</sub>	50-75 % du Vol	CH <sub>4</sub>	50-75 % du Vol.
CO <sub>2</sub>	25-45 % du Vol.	CO <sub>2</sub>	25-45 % du Vol.
H <sub>2</sub> O	2-7 % du Vol	H <sub>2</sub> O	2-7 % du Vol
H <sub>2</sub> S	20-20 000 ppmv	H <sub>2</sub> S	<1 % du Vol. ou 200-500ppm
N <sub>2</sub>	< 2 % du Vol	N <sub>2</sub>	< 2 % du Vol
O <sub>2</sub>	< 2 % du Vol	NH <sub>3</sub>	<500 ppm
H <sub>2</sub>	< 1 % du Vol.	H <sub>2</sub>	< 1 % du Vol.

**III -1-4- Different type de Biogas****III -1-4-1-Bio méthane:**

La production de méthane ( CH<sub>4</sub>) s'effectue par les bactéries méthanogènes . Des gaz ainsi qu' un résidu solide non dégradé sont les principaux produits de la méthanisation , le pouvoir calorifique du biogaz , est fonction de sa teneur , en méthane et varie de 20 à 30 Mj/nm<sup>3</sup>. Pour être utilisé comme biocarburant ou injecté dans le réseau de gaz naturel , le méthane doit être purifié des contaminants , poussières et autres particules qui doivent être éliminés . Il faut ensuite l' assécher , et le concentrer à plus de 95 % . Tout les types véhicules , conçus pour rouler au gaz naturel ou adaptés pour rouler au gaz et à l' essence , peuvent utiliser du bio méthane , les véhicules lourds ont également la possibilité d' être convertis en système combiné utilisant le diésel et le méthane . L' utilisation de ce gaz comme carburant routier peut réduire les émissions de CO<sub>2</sub> de 95à 99% par rapport aux carburant fossiles . Les émissions de particules et suies , de NO<sub>x</sub> et d' hydrates de carbone autres que le méthane sont

également fortement réduites . ( **Zdanevitch L et al.,2009**).

### **III -1-4-2- Bio hydrogène**

A l'heure actuelle, l'hydrogène (H<sub>2</sub>) est produit à partir d'hydrocarbures fossiles .Il est utilisé dans l'industrie chimique et la raffinerie des produits pétroliers. L'hydrogène pourrait tout fois servir dans les piles par sa transformation en électricité.

Différentes voies biochimiques permettent de produire de l'H<sub>2</sub>. Parmi celles-ci, on note la fermentation anaérobie de composés organiques par des micro-organismes (production hétérotrophe d'H<sub>2</sub>). Cette production par fermentation est réalisée par différents types de microorganismes .La production photobiologique consiste en la transformation de l'eau ou de composés organiques en hydrogène grâce à l'énergie lumineuse. Les micro-organismes impliqués sont des micro algues, des bactéries <pourpres> et des cyanobactéries.

De nombreuses recherches sont menées en laboratoire pour améliorer ces réactions biologiques de production d'H<sub>2</sub> . L'optimisation porte, entre autres, sur l'amélioration de la productivité et la levée de l'inhibition par différents intermédiaires de réaction et l'amélioration de la combinaison des mécanismes de fermentation et des réactions photobiologiques. (**Ouellet M ., 2013**).

### **III -1-5-Utilisation de biogaz**

Le biogaz est produit pour satisfaire les besoins énergétiques sous pratiquement toutes les formes utiles d'énergie, que ce soit la chaleur, l'électricité ou la force motrice. Il peut ainsi se substituer à de nombreuses formes d'énergie existantes. Toutefois, le biogaz domestique vise principalement les besoins énergétiques primaires liés à la cuisson, l'éclairage et dans une moindre mesure ,l'électricité. Le contenu énergétique du biogaz dépend principalement de son contenu en méthane. Ainsi, la présence de dioxyde de carbone, d'azote, de vapeur d'eau et autres gaz rend la combustion du biogaz moins exo-énergique que celle du butane (contenu énergétique environ deux fois plus élevé) ou du méthane pur (plus de deux fois plus élevé). Le tableau 5 présente les différents taux de substitution entre le biogaz et les autres formes d'énergie.**Sama H et al., 2012**)

**Tableau5:** présente les différents taux de substitution entre le biogaz et les autres formes d'énergie. (Sama H et al., 2012)

Combustible	Unité (U)	Pouvoir calorifique (primaire) (KWh/U)	Application principale	Rendement (%)	Production équivalente (KWh/U)	Quantité équivalente biogaz (U/m <sup>3</sup> biogaz)
Bouse de vache	Kg	2,5	Cuisson	12	0,3	11,0
Bois de chauffe	Kg	5	Cuisson	12	0,6	5,5
Charbon	Kg	8	Cuisson	25	2,0	1,7
Butane	Kg	13,6	Cuisson	60	8,2	0,4
Propane	Kg	12	Cuisson	60	7,2	0,5
Diesel	Kg	12	Moteur	30	3,6	0,9
Electricité	KWh	1	Moteur	80	0,8	4,1
Biogaz*	m <sup>3</sup>	6	Cuisson	55	3,3	1,0

Le méthane issu du biogaz est utilisé comme source énergétique dans de nombreuses applications. Certaines d'entre elles sont largement développées et l'offre industrielle et commerciale est solidement établie. Il s'agit notamment de :

- la production de chaleur sous forme d'eau chaude ou de vapeur.
- la production d'air chaud pour le séchage.
- la production d'électricité par moteur ou turbine à gaz.
- la production combinée d'électricité et de chaleur par cogénération.

### III-2- Le développement de production de biogaz

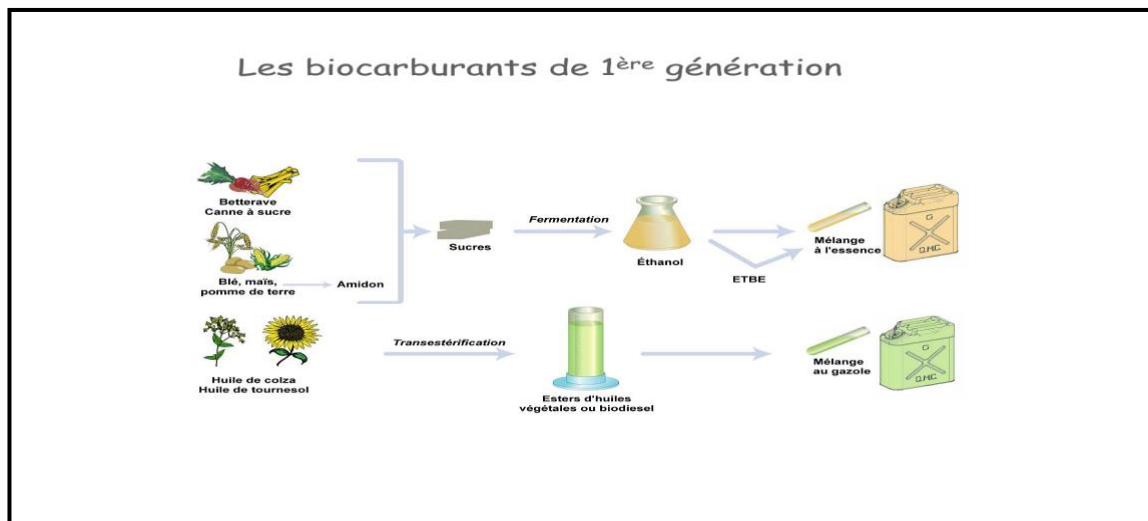
Les biocarburants produits à partir des algues, ou 'algoturants', sont considérés comme des biocarburants de troisième génération. Les micro algues servent à la fabrication de biodiesel, parmi les autres biocarburants de troisième génération figurent les alcools, comme le biopropanol, le bio butanol ou le bioéthanol, qui, compte tenu du manque d'expérience de leur production, ne devraient pas être présents sur le marché des carburants avant 2050.

Sachant que la biomasse micro algale 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 micro algue. (Patricia G et al., 2009).

### III -2-1- le biocarburant première génération

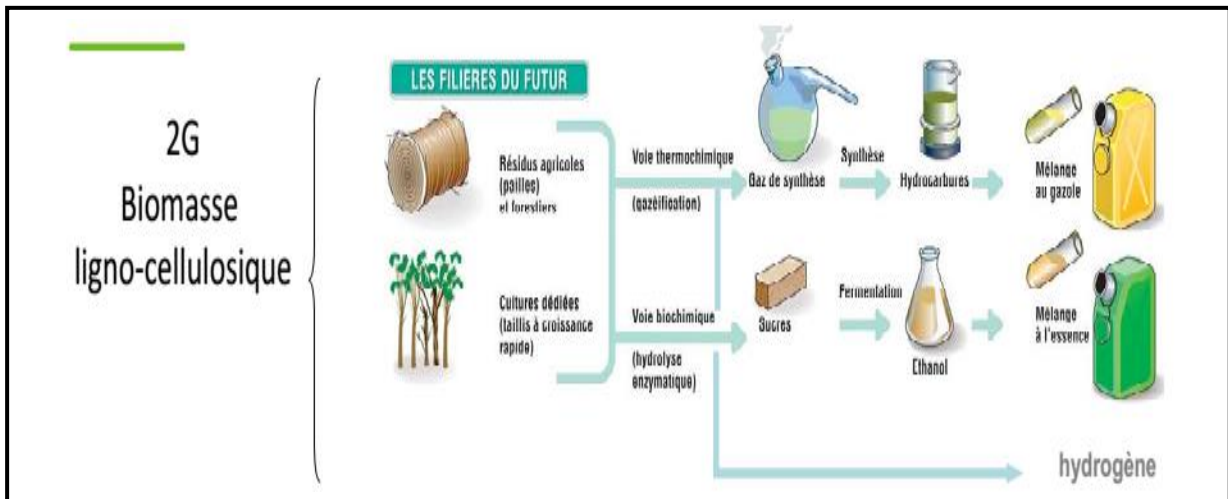
La production de bioéthanol à partir des microalgues est obtenue par un procédé de fermentation. Les microalgues contiennent de l'amidon qui peut être fermentés en bioéthanol. L'amidon peut être extrait par voie mécanique telle que les ultrasons et le cisaillement ou chimique, par dissolution des cellules en utilisant des enzymes. (Figure 12).((Doré-déschènes F., 2009)



**Figure12:**le biocarburant première génération.(Doré-déschènes F., 2009)

### III -2-2- le biocarburant deuxième génération

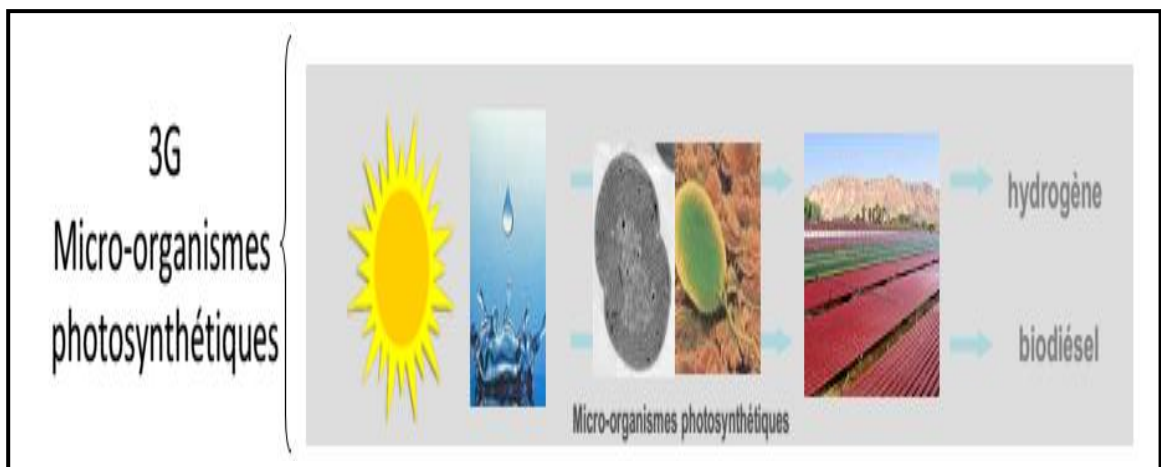
Le biodiesel est un carburant propre qui peut être mélangé au diesel fossile, du fait que leurs propriétés physiques sont similaires et compatibles..Le contenu lipidique dans les micro algues dépend des conditions de culture.(Figure 13).( Chader S et al.,2012)



**Figure13:**le biocarburant deuxième génération ( Chader S ., Touzi A.,2012)

**III 2-3 - le biocarburant troisième génération**

Les micro algues sont capables de produire de l’hydrogène à partir de l’énergie solaire en utilisant l’eau comme donneur d’électrons et de protons. Les électrons mobilisés par l’appareil photosynthétique sont utilisés par une hydrogénase, enzyme capable de réduire les protons et produire H<sub>2</sub>. La découverte est assez ancienne, mais la productivité est encore limitée. La micro algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* est souvent retenue comme modèle d’étude, car elle possède une hydrogénase à fer à forte activité couplée à la chaîne photosynthétique. Lorsqu’elle est placée à la lumière en conditions anaérobies, cette algue produit transitoirement H<sub>2</sub>. Cette réaction s’arrête rapidement du fait de la production d’O<sub>2</sub> par le photosystème II et de la forte sensibilité de l’hydrogénase à ce gaz . (Sadi M ., 2012)



**Figure14:**le biocarburant troisième génération ( Chader S et al.,2012)

### **III-3-Bio hydrogène des micro algues**

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. **(Guiliana P et al ., 2009)**

#### **III -3-1-Définition de bio hydrogène**

Biohydrogène est un des éléments les plus abondants de la planète, c'est un composant de l'eau (H<sub>2</sub>O).L'océan couvre 70% de la surface de la planète et contient 97% de ses réserves d'eau .La combustion de l'hydrogène avec l'air crée de l'eau. L'hydrogène est d'ores et déjà un produit industriel. La consommation mondiale s'élève à 50 Mt par an et représente près de 140 Mtep (2 % de la consommation mondiale d'énergie). 96 % de l'hydrogène est produit à partir d'énergie fossile, dont 48 % à partir de gaz naturel, 30 % des hydrocarbures liquides, 18 du charbon. 4 % seulement est produit à partir de l'électricité. Il s'agit presque exclusivement d'une production sur site dédiée à un usage particulier: la production d'ammoniac (51 %), le raffinage pétrolier (3 %) et le méthanol (8 %). L'hydrogène est aussi produit pour servir de combustible pour la motorisation dans le domaine aérospatial. C'est donc un produit habituel pour l'industrie pétrolière,l'industrie chimique et l'aérospatial. Les énergies renouvelables produisent de l'électricité, l'hydrogène produit par électrolyse est un moyen de la stocker. Le transport de l'électricité a beaucoup de perte, alors que le transport d'hydrogène par gazoduc en a très peu. De plus l'hydrogène a un des meilleurs rendements explosifs et sa combustion forme de l'eau. **(Sadi M ., 2012)**

#### **III -3-2- Les voies biochimique de production du hydrogène**

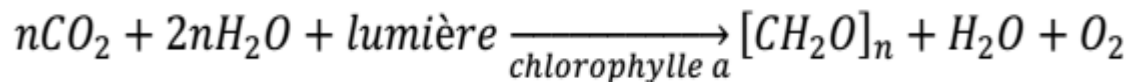
##### **III -3-1-2-Par la photosynthèse**

Près de la moitié de l'activité photosynthétique sur Terre est réalisée par des organismes aquatiques qui ne représentent pourtant que 1 % de la biomasse totale. Ces micro-organismes, les microalgues, constituent le phytoplancton et sont à l'origine de 90 % de la production primaire aquatique . **(Barbara C.L., 2012)**

La photosynthèse est le processus par lequel les microalgues transforment l'énergie lumineuse en énergie chimique et fixent le carbone inorganique dissous (CID). Il en résulte la synthèse de matière organique et la production d'oxygène. Ainsi l'activité photosynthétique est la fixation du CO<sub>2</sub> et la production d'O<sub>2</sub> via les mécanismes de la photosynthèse. Elle se compose de deux phases indépendantes chimiquement et physiquement, mais liées par des intermédiaires communs et des régulations enzymatiques

.Le processus photosynthétique dans son ensemble peut être décrit par l'équation suivante.

(Barbara C.L., 2012)



Certains micro-organismes à photosynthèse oxygénique, telle l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, ont la capacité de produire de l'hydrogène en utilisant l'eau comme donneur d'électrons et l'énergie solaire. Si cette propriété permet d'envisager le développement de procédés de production d'hydrogène par des énergies renouvelables, les applications biotechnologiques sont limitées car le phénomène de *photoproduction* d'hydrogène est transitoire. En effet, l'enzyme « hydrogénase », responsable de la production d'hydrogène est très sensible à la présence de l'oxygène produit par la photosynthèse. Il est possible de s'affranchir de cette limitation en recourant à une séparation temporelle, en alternant des phases de photosynthèse oxygénique et des phases anaérobies. Les réserves d'amidon constituées pendant la phase oxygénique sont ainsi mobilisées pendant la phase anaérobie et converties en hydrogène. Des recherches antérieures avaient montré que cette voie de conversion anaérobie est limitée par une étape réactionnelle impliquée dans la réduction des plastoquinones. Les chercheurs du LB<sub>3</sub>M ont identifié l'enzyme responsable de cette réaction chloroplastique, une NAD(P)H des hydrogénase monomérique de type II et ont montré le rôle de cette enzyme dans le processus de production d'hydrogène.

(Cournat et al., 2009).

Bien que les deux phases se déroulent toutes les deux dans le chloroplaste de la cellule, elles se localisent au niveau de sites distincts. L'oxydation de l'eau et la réaction photochimique ont lieu dans la membrane des thylakoïdes alors que la réduction de CO<sub>2</sub> se déroule dans le stroma des chloroplastes. Réaction photochimique et Fixation du CO<sub>2</sub> le cycle de Calvin. (Barbara C.L.; 2012)

#### a. Réaction photochimique

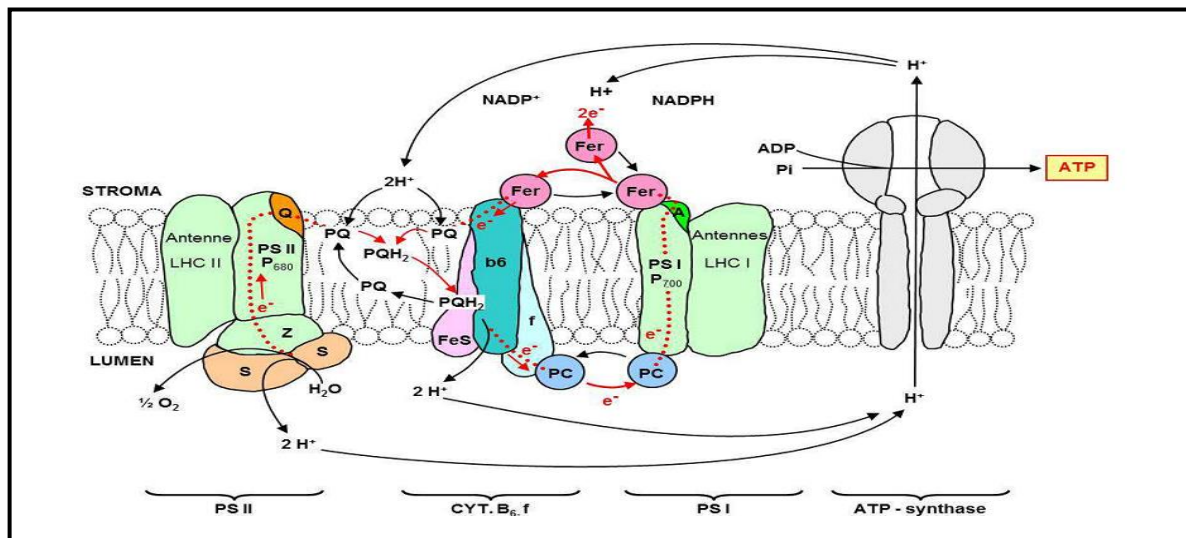
C'est au sein de la membrane des thylakoïdes que se trouve l'appareil photosynthétique. Il est composé de pigments photosynthétiques associés à des photosystèmes I et II (PSI et PSII), d'accepteurs et de donneurs d'électrons. Le PSI et PSII sont aussi appelés respectivement PS 700 et PS 680. Les photosystèmes sont des complexes au sein desquels sont associées des protéines et des pigments. Le PSII comporte trois domaines : une antenne, un centre réactionnel et un complexe d'oxydation de l'eau. Le PSI comporte une antenne et un centre réactionnel. (Barbara C.L., 2012)

**-Transport non cyclique des électrons**

Au sein du photosystème II, l'antenne collectrice de photon se compose de chlorophylle a et b, de caroténoïdes et de protéines. Elle capte les photons et les amènent jusqu'au centre réactionnel, qui contient une paire de molécule de chlorophylle a dont la longueur d'onde du pic d'absorption est 680 nm. Lorsque la molécule de chlorophylle a est excitée un électron est libéré. Cet électron est transporté dans un premier temps jusqu'à des plastoquinones. Elles le cèdent par la suite à un complexe appelé cytochrome b<sub>6</sub>f qui le transfère à une plastocyanine. Enfin, celle-ci cède l'électron au PSI.

En parallèle de cette réaction à lieu la scission d'une molécule d'eau, catalysée par le complexe d'oxydation de l'eau (OEC), lié au PSII (**Barbara C.L., 2012**):

Cette réaction permet la libération d'électron et de protons et la production d'oxygène. Les électrons formés par l'oxydation de l'eau, vont remplacer les électrons perdus au sein du PSII. L'antenne collectrice du PSI se compose de chlorophylle a et b, ainsi que de caroténoïdes. Elle transmet au centre réactionnel les photons. Le centre réactionnel contient une paire de molécule de chlorophylle a dont la longueur d'onde du pic d'absorption est 700 nm. L'électron libéré au sein du centre réactionnel est transporté jusqu'à la ferrédoxine. La ferrédoxine va donner cet électron à la ferrédoxine NADP-oxydoréductase. Il va alors y avoir la réduction de NADP<sup>+</sup> en Nicotinamide adénosine diphosphate (NADPH), aussi appelé pouvoir réducteur. Ce pouvoir réducteur joue un rôle important dans de nombreuses réactions métaboliques. L'électron perdu au sein du PSI va être remplacé par l'électron précédemment expulsés par le PSII. La Figure 15. représente le transport acyclique des électrons au sein de la membrane des thylakoïdes. Lorsque les photons atteignent les molécules de chlorophylles au sein des PS680 (PSII) et PS 700 (PSI), celles-ci passent d'un état stable à un état excité (flèches rouges) et libèrent des électrons qui vont permettre la synthèse d'ATP et NADPH. (**Clément-Larosièrè B., 2012**).



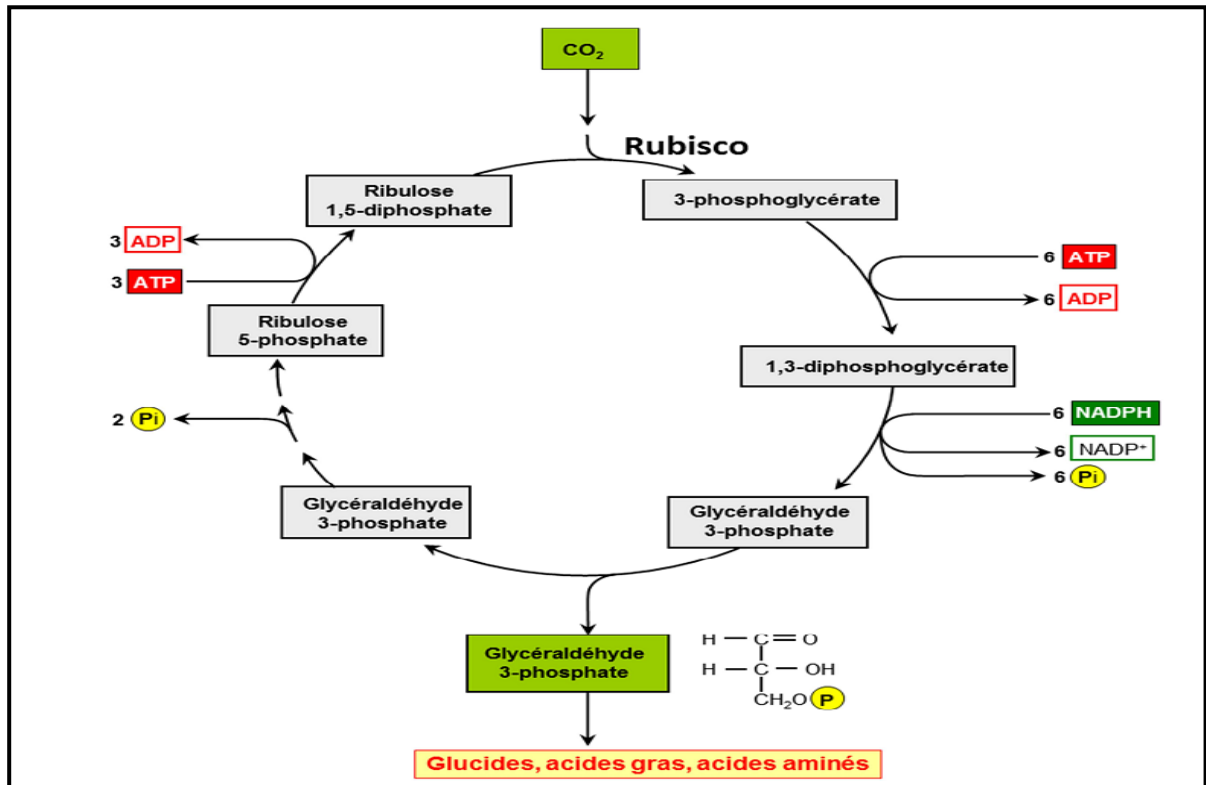
**Figure15 :**Complexes macromoléculaires et transferts d'électrons et de protons au niveau de la membrane du thylakoïde. PSII : photosystème II, PQ : plastoquinone, PC : plastocyanine, b6\_f: cytochrome b6\_f, PSI : photosystème I, Fer : ferrédoxine.

D'après Robert. (Clément-Larosièrè B., 2012)

macroalgues vertes et les cyanobactéries, peut réduire les protons en hydrogène gazeux sous certaines conditions. Ce phénomène a été rapporté pour la première fois par Gaffron et Rubin, puis repris par plusieurs chercheurs . Ces derniers expliquent que la bio décomposition directe de la molécule d'eau par l'énergie des PSI et PSII libèrent des électrons qui sont transportés via des porteurs (Ferredoxine: Fd) jusqu'à une hydrogénase qui va les réduire en gaz selon la réaction simplifiée suivante: (Chader S et al., 2007)

### b. Fixation du CO<sub>2</sub>: le cycle de Calvin

Dans la cellule CO<sub>2</sub> va être intégré au cycle de Calvin, au niveau du chloroplaste. De ce processus va résulter la synthèse de matière organique. Cette réaction peut s'écrire : (Clément-Larosièrè B., 2012).



**Figure16:** du Cycle de Calvin. Les nombreux intermédiaires entre le glycéraldéhyde 3-phosphate et le Ribulose 5-phosphate ne sont pas indiqués pour plus de clarté. (Clément-Larosiére B., 2012).

Cependant, le rendement de cette production est tributaire du taux d'oxygène dans le milieu. Des niveaux d'oxygène  $\geq 2\%$  inhibe l'activité de l'hydrogénase, ce qui diminue la production de l'hydrogène. Des conditions d'anaérobiose suivies d'une période d'éclairement suffisant, sont déterminantes pour une production soutenue. Les cyanobactéries appelées aussi bactéries fixatrices d'azote, sont capables de produire de l'hydrogène via la photosynthèse en impliquant un complexe enzymatique faisant intervenir en plus de l'hydrogénase, une nitrogénase en fonction du type de cyanobactérie (avec ou sans hétérocyste). (Figure 16). (Chader S et al., 2007)

#### IV-4-Les microalgues productrices du hydrogène

La production biologique de l'hydrogène est définie comme le résultat du métabolisme d'un organisme vivant qui libère, dans des conditions données, de l'hydrogène gazeux comme métabolite secondaire. Le (tableau: 6) donne les principales espèces ayant été déterminées comme étant des souches productrices d'hydrogène: (Chader S et al., 2007)

**Tableau 6:** principales espèces productrices d'hydrogène. ( Chader S et al., 2007).

<b>Taxons</b>	<b>Nom de l'organisme</b>
Microalgues Vertes (Chlorophyceae)	<i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlamydomonas moewusii</i>
Cyanobactérie Avec hétérocyste	<i>Anabaena azollae</i> <i>Anabaena CA</i> <i>Anabaena variabilis</i> <i>Anabaena cylindrica</i> <i>Nostoc muscorum</i> <i>N. spongiaeforme</i> <i>Westiellopsis prolifica</i>
Cyanobactérie Sans hétérocyste	<i>Plectonema boryanum</i> <i>Oscillatoria Miami BG7</i> <i>Synechococcus sp.</i> <i>Aphanothece halophytico</i> <i>Mastidocladus laminosus</i> <i>Phormidium valderianum</i>

CHAPITRE IV :

**TECHNIQUE D'ISOLEMENT ET IDENTIFICATION**

---

## IV-1- L'isolement et l'identification

### IV-1-1- Le choix de l'espèce microalgale productrice de H<sub>2</sub>

L'isolement et l'identification des microalgues productrices de l'hydrogène nécessite la détermination de la souche appropriée par une bonne recherche bibliographique par exemple *Chlorella sp.* Dans notre cas, on prend la souche *Chlorella sp.* comme exemple pour étudier l'isolement et l'identification des microalgues.

### IV-1-2- Le prélèvement des microalgues

Le prélèvement des microalgues s'effectue au niveau de milieu aquatique dans des conditions aseptiques pour éviter toute contamination, le transport des échantillons étant assuré d'une manière à éviter tout contact avec l'air extérieur dans des récipients stériles et à basse température (glacières). (Barberousse H., 2006).

### IV-1-3- Isolement des microalgues

#### IV-1-3-1- Milieu de culture

Pour plus de commodité, les souches d'algues et de cyanobactéries sont cultivées sur un milieu unique, le milieu Bold de base. La recette utilisée au laboratoire est simplifiée car elle nécessite uniquement la préparation de trois solutions mères (Tableau 7). Ces solutions, une fois stérilisées à 120 °C pendant 20 min, peuvent être conservées quelques mois à 4°C. Pour préparer 1 L de milieu de culture liquide, 10 mL de solutions A et B et 1 mL de solution trace sont ajoutés à 1 L d'eau désionisée. La solution est ensuite stérilisée en autoclave à 120 °C pendant 20 min. Pour préparer 1 L de milieu de culture "solide", 10 mL de solutions A et B, 1 mL de solution trace et 12 g d'agar (Agar washed, Sigma) sont ajoutés à 1 L d'eau désionisée. (Barberousse H., 2006).

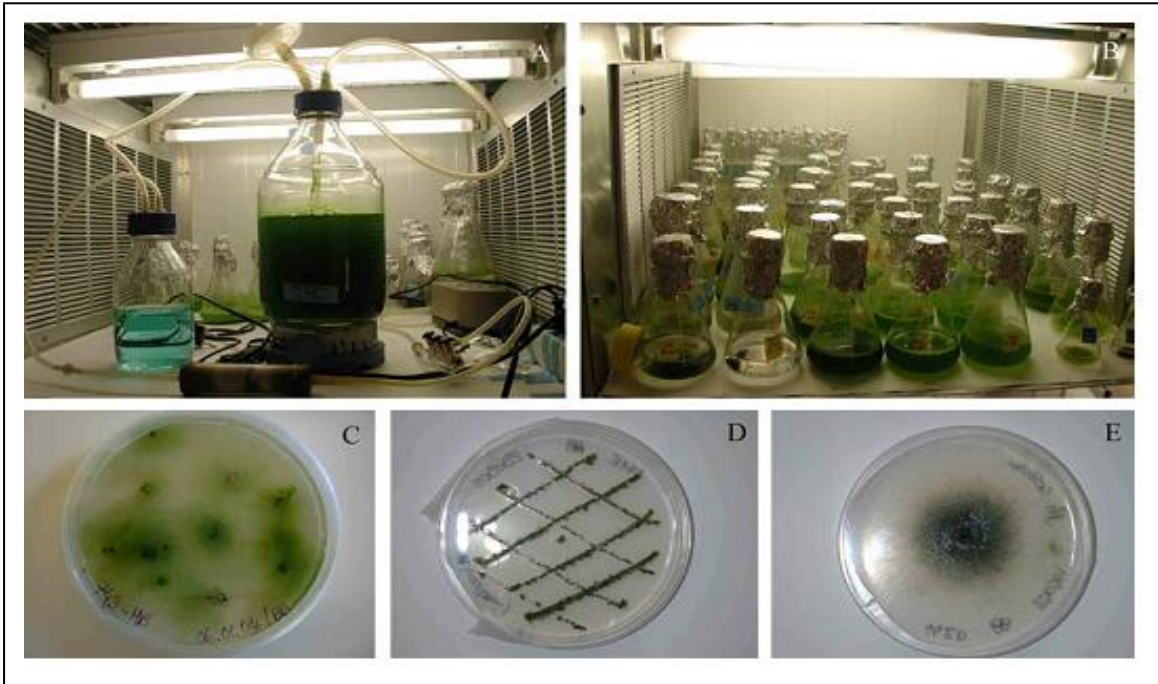
La solution est ensuite stérilisée à 120 °C pendant 20 min. Une fois refroidie, environ 20 mL de milieu encore liquide sont coulés dans des boîtes de Pétri, au voisinage immédiat de la flamme d'un bec Bunsen, afin de conserver un environnement stérile. Une fois la gélose refroidie, les boîtes peuvent être utilisées immédiatement ou entreposées pour une courte période afin d'éviter toute contamination. (Barberousse H., 2006).

**Tableau 7:** Composition des solutions mères du milieu Bold de base. (Barberousse H.,2006).

	<b>Produit</b>	<b>Concentration (g L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Solution A</b>	NaNO <sub>3</sub>	25
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.5
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7.5
	Fe EDTA	2
<b>Solution B</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.5
	NaCl	2
<b>Solution trace</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.4
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.8
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.02
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.22
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.08
	CoNO <sub>3</sub>	0.09
	VO <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.43

#### IV.1.3.2. Isolement et repiquages

Les isolements des algues et des cyanobactéries sont effectués à partir de fragments de prélèvement placés sur du milieu de culture "solide". Quand les micro-organismes commencent à se développer, ils sont isolés par la "méthode de la plaque striée" pour obtenir des cultures uni-algales, ou par prélèvement d'une portion de gélose et ensemencement d'une nouvelle boîte, dans le cas de cyanobactéries (Figure 17). L'ensemencement d'une souche en milieu liquide est réalisé par prélèvement d'un échantillon de micro-organismes à la pointe d'une öse d'inoculation, qui est ensuite plongée dans le milieu liquide. Toutes ces manipulations s'effectuent au voisinage immédiat d'une flamme de bec Bunsen afin d'éviter les risques de contamination. (Barberousse H.,2006).



**Figure 17** : Souches d'algues et de cyanobactéries. A : culture liquide de la souche *Klebsormidium flaccidum* 749B sous bullage d'air et agitation magnétique; B : cultures liquides en fioles d'Erlenmeyer; C : développement d'algues et de cyanobactéries à partir de fragments de revêtements; D et E : ensemencement d'une souche d'algue (D) et de cyanobactérie (E) sur milieu solide. (Barberousse H., 2006).

L'identification de souche s'effectue par un examen microscopie à l'aide d'un microscope optique

#### IV.1.3.3. Conditions de culture

Les souches d'algues et de cyanobactéries utilisées pour le fonctionnement du banc d'essai par ruissellement d'eau sont cultivées dans des flacons de 2 L soumis à un bullage d'air, sous agitation magnétique : l'air ambiant pompé circule dans une solution de  $\text{CuSO}_4$  afin d'en éliminer les spores éventuellement présentes, puis est injecté dans la culture via un fritté en verre. Les souches utilisées pour les autres analyses, conservées dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 mL munies de bouchons en coton cardé, sont agitées manuellement plusieurs fois par semaine. Ces cultures sont placées dans une chambre de culture (Setric Genie Industriel) climatisée à  $20.0 \pm 0.5$  °C où elles sont soumises à une intensité lumineuse (lumière blanche de qualité Cool White, tubes fluorescents OSRAM 18 W) de  $15 \pm 3$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF (Photosynthetic Photon Flux) selon une photopériode

---

de 16 h/8 h éclairage/obscurité. Les souches conservées sur du milieu "solide" sont entreposées dans l'algothèque, soumises à une intensité lumineuse d'environ  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPF selon une photopériode de 16 h/8 h éclairage/obscurité. Les intensités lumineuses sont évaluées à l'aide d'un quantamètre LI-250 (LI-COR) muni d'un capteur plat. (Barberousse H.,2006).

#### IV.1.3.4. Dosage des microalgues

La concentration des souches étudiées dans le banc d'essai par ruissellement d'eau est évaluée par mesure de la masse sèche et par turbidité, des corrélations étant ensuite effectuées entre ces deux méthodes. En routine, l'évaluation de la turbidité d'une culture permet ainsi aisément d'obtenir son équivalence en poids sec. (Barberousse H.,2006).

##### IV.1.3.4.1.Masse sèche

Un volume connu de culture d'algues ou de cyanobactéries est filtré sur des membranes en microfibre de verre de porosité  $1,2 \mu\text{m}$ . Ces filtres sont ensuite séchés à  $105^\circ\text{C}$  pendant 3 h, et la masse correspondant aux microorganismes secs est ensuite déterminée et rapportée au volume filtré. La masse sèche est exprimée en  $\text{mg mL}^{-1}$ . (Barberousse H.,2006).

##### IV.1.3.4.2.Turbidité

La turbidité d'une culture est évaluée en mesurant sa densité optique à  $\lambda = 750 \text{ nm}$ , au moyen d'un spectrophotomètre (Cary 50 Scan, Varian). (Barberousse H.,2006).

## IV.2.Mesure de production d'hydrogène

### IV.2.1.Milieu de culture d'enrichissement des microalgues

Deux cultures en batch de *Chlorella sp.* ont été réalisées dans le milieu Bold Basal (BB), composition tableau 8, initialement supplémenté de  $10 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose, avec éclairage continu.( Kord A.,2012).

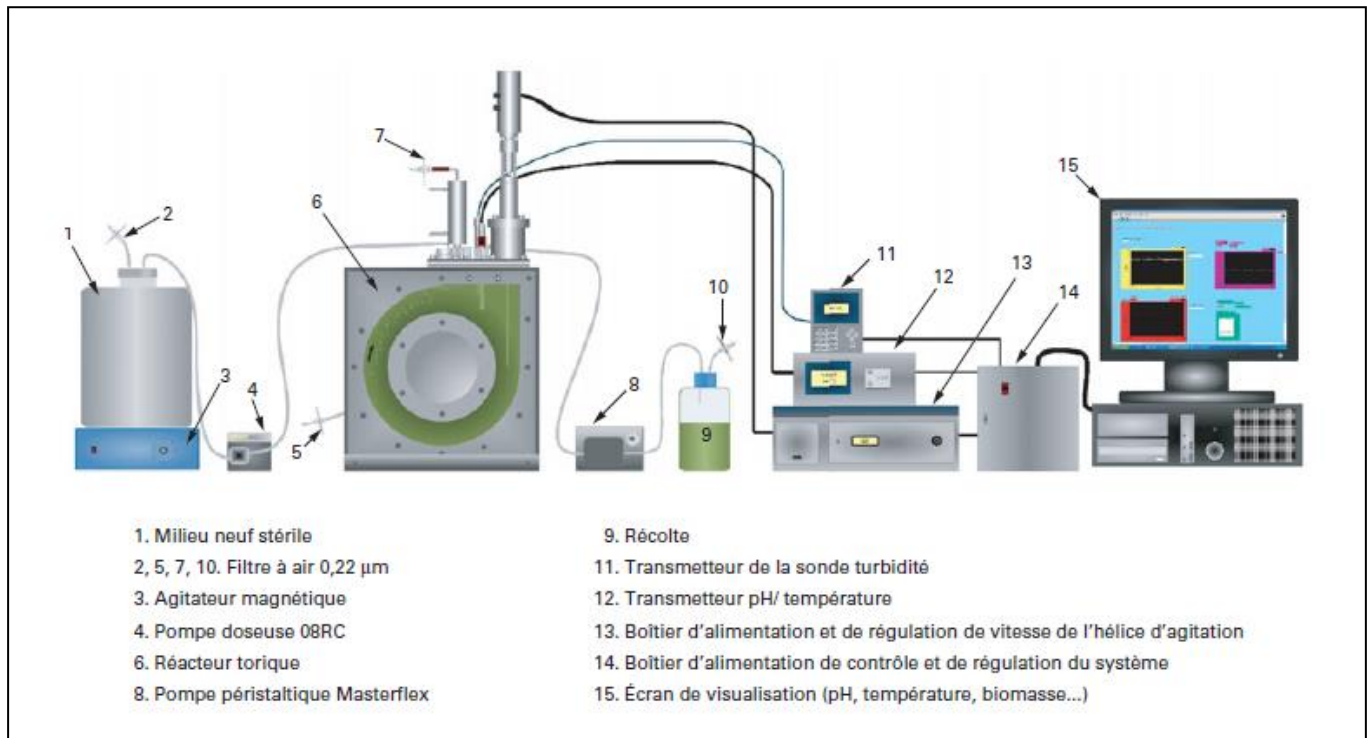
**Tableau 8:** Composition chimique du milieu bb (pH=6.6). (Kord A., 2012).

Elément	Concentration (g/l)
NaNO <sub>3</sub>	25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	17.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7.5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.5
NaCl	2.5
EDTA	50
KOH	31
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4.98
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1ml)	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.42
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.82
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.44
MoO <sub>3</sub>	0.71
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1.57
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.49

Les chercheurs utilisent des bouteilles (appelées photobioréacteurs), d'un volume de 1200 ml et d'une épaisseur de 50 mm. Ces bouteilles sont munies de diverses adaptations de connectiques permettant d'y fixer des sondes. Ces sondes servent à mesurer les paramètres physico-chimiques tels que le pH, la température, le potentiel rédox, la concentration en oxygène. Les données récoltées sont enregistrées en temps réel par un ordinateur. Le brassage du milieu de culture est assuré par des barreaux magnétiques placés au fond des bouteilles. Ces barreaux magnétiques sont mus à l'aide d'agitateurs rotatifs sur lesquels sont posées les bouteilles. La vitesse de rotation moyenne est comprise entre 400 et 500 rpm (révolution par minutes). L'éclairage permettant la photoproduction d'H<sub>2</sub> est assuré par des tubes néon fluorescents placés devant les bouteilles.

L'intensité lumineuse moyenne est de 300  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Les volumes (quantités) de gaz produits par les algues dans chaque photobioréacteur, sont mesurés par un déplacement d'eau

issu d'un système de conversion gaz-liquide. Le liquide déplacé est collecté dans une bouteille. Ce système permet une mesure de volume de production de gaz en temps réel et en continu grâce à l'enregistrement (pesage sur une balance numérique) de la variation de la quantité d'eau récoltée dans cette bouteille. Le système de conversion gaz-liquide dépend de la température et de la pression mais dans des conditions qui limitent les erreurs à moins de 3 %.(Figure 18).(Franck F., 2012).



**Figure 18 :** Système complet (sans la source de lumière) utilisé au laboratoire GEPEA pour effectuer des cultures de microalgues en conditions contrôlées .( **Pruvost J.,2012**).

CHAPITRE V :

# **CULTURE DES MICROALGUES**

## V-1-Milieu de culture

### V-1-1-Définition

Les milieux de culture sont des préparations stériles, solides, semi solides ou liquides, utilisées pour faire croître, repiquer ou conserver des micro-organismes. Ils offrent sous forme assimilable toutes les substances indispensables à leur nutrition dans des conditions physico-chimiques optimum. (Guezlane N.; kahlouche B.; Guemouri A., 2010).

### V-1-2-Types des milieux de culture

En laboratoire, les micro-organismes sont normalement cultivés dans un milieu liquide réparti en tubes à essai, dans des flacons, des bouteilles, ou dans des rands vaisseaux de culture appelés fermenteurs; ou bien dans un milieu solide coulé dans des boîtes de Petri, rondes généralement en en plastique stériles. (Guezlane N., kahlouche B., Athmani S., 2010).

L'introduction des germes microbiens dans ces milieux de culture est appelée inoculation ou ensemencement. (Guezlane N., kahlouche B., Athmani S., G., 2010).

On classe les milieux de culture selon:

#### V-1-2-1-La consistance

Elle peut être :

- Liquide : ne contenant pas d' agar ou gélose.
- Semi solide : contenant 0,5 à 0,75 % d' agar agar.
- Solide : renfermant 1,5 à 2% d'agar agar.

-Le milieu liquide par exemple le bouillon nutritif contenant soit des produits carnés ou protéiques , soit une solution riche en substances synthétiques . Dans les deux cas la gélose est totalement absente . La croissance est réalisée dans des tubes , des ballons , ou erlenmeyers et elle est suivie par turbidimétrie (spectrophométrie) . (Guezlane N., kahlouche B., Athmani S., 2010).

Sur milieu liquide , limpide au départ , les microbes se développent en formant un trouble uniforme ou encore des dépôts , des agglomérats , et des voiles superficiels. (Guezlane N., kahlouche B., Athmani S., 2010).

-Le milieu nutritif solide peut être identique au précédent mais il contient de l' agar agar ou gélose . S' il renferme une proportion comprise entre 0,5 et 0,75 % de gélose , on parle de milieu semi solide , s' il y en a plus le milieu est solide . Cette substance extraite d' algues rouges ( *Gelidium cartilagineum* ou *Gracilaria confervolde* ) a la propriété de solidifier les milieux liquides dans lesquels on l' incorpore ; chimiquement c' est un polygalactoside commercialisé sous forme de poudre ou de granulés .

(Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010).

-La culture sur milieu solide est utilisé pour l' isolement individuel des micro-organisme (en boîte de petri) et pour leur conservation( gélose incliné en tubes à essai ).(Guezlane N.T.kahlouche B. Athmani S.G.,2010).

**V-1-2-2-La composition:**Bien que tous les micro-organismes exigent une source d' énergie de carbone , d' azote , de phosphore , de soufre et de divers minéraux , la composition précise d' un bon milieu dépend de l' espèce à cultiver car les besoins en éléments nutritifs sont très spécifiques . On distingue des milieux complexes et des milieux définis .(Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010).

**V-1-2-2-1-Les milieux complexes :**Les milieux qui contiennent des ingrédients de composition chimique indéterminée sont appelés milieux complexes . Il sont très utiles car un seul milieu complexe peut être suffisamment riche et complet pour satisfaire les besoins nutritifs de nombreux germes microbiens différents . (Guezlane N.,kahlouche B. Athmani S.,2010).

**V-1-2-2-2- Les milieux synthétiques ou définis :**Un milieu synthétique ou définis peut être utilisé pour la culture de la plupart des micro- organisme .Certains germes , en particulier les autotrophes photolithotrophes se multiplient sur des milieux assez simples contenant du CO<sub>2</sub> comme source de carbone ( carbonate de soude ou bien bicarbonate ) , du nitrate ou de l' ammoniaque comme source d' azote , du sulfate , du connu , s' appelle un milieu défini ou synthétique .(Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010).

De nombreux hétérotrophes chimio-organotrophes sont aussi cultivés sur des milieux définis contenant du glucose comme source de carbone et un sel d' ammonium comme source d' azote .

Les milieux définis sont beaucoup utilisés en recherche afin de déterminer ce que le micro-organisme étudié est capable de établir . Ils ne sont pas aussi simples , ils peuvent être constitués de dizaines de composants ( voir composition ) .(Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010).

**V-1-2-3-L' utilisation:**On peut classer les milieux de culture en quatre catégories :

Les milieux usuels dits de base , les milieux d' isolement , les milieux d'identification et les milieux de conservation .(Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010).

**V-1-2-3-1- Des milieux usuels ou milieux de base:**Ce sont des milieux d' un emploi aussi général que possible . Il n' existe cependant pas de milieux de conservation . (Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010).

**V-1-2-3-2- Des milieux d' isolement**

Milieux solides de composition simple sur lesquels de nombreuses colonies microbiennes peuvent se développer ; lorsqu' elles sont séparées , ces colonies permettent de préparer des cultures pures qui sont le point de départ d' une étude systématique aboutissant à l' identification .(Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010).

Les milieux d'isolement peuvent être :

**V-1-2-3-2-1- Des milieux d' enrichissement:** Milieux liquide, enrichis d' une substance biologique ( sang total frais, sérum , œuf , liquide d' ascite ) , ou de suppléments polyvitaminiques , favorisant la croissance de certains germes que l' on désire isoler .(Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010) .

**V-1-2-3-2-2- Des milieux sélectifs :** Ils sont également utilisés pour l' isolement des espèces microbiennes ; ces milieux solides ont pour but de permettre une dominance absolue et une croissance d' un seul germe microbien aux dépens d' un mélange de micro-organismes.(Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010).

Il est possible de favoriser artificiellement la croissance d' une espèce lorsqu' on connaît ses exigences nutritionnelles ou lorsqu' on incorpore un inhibiteur chimique ; celui – ci entrave le développement de la plupart des germes , excepté celui de l' espèce recherchée .(Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010).

**V-1-2-3.2.3- Des milieux différentiels:** Fréquemment utilisés dans les laboratoires hospitaliers , ce sont des milieux permettant de distinguer ou de sélectionner un groupe particulier de microbes et même d' identifier deux espèces de micro-organismes sur base de leurs caractéristiques biologiques .(Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010).

**V-1-2-3-2-4-Des milieux électifs :** Milieux de culture permettant un développement particulièrement abondant et rapide de certains germes alors que d' autres micro-organismes se multiplient peu et très lentement . (Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010).

**V-1-2-3-3-Des milieux d' identification**

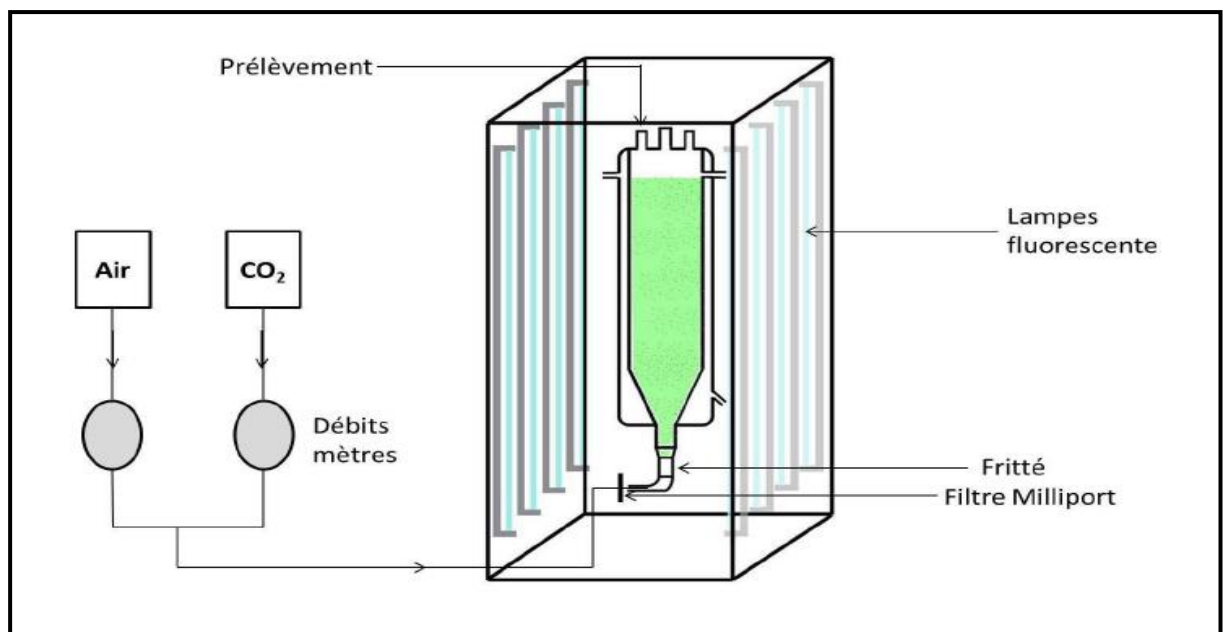
Milieux servant à mettre en évidence un ou plusieurs caractères chez une souche microbienne précédemment isolée .Ils permettent de rechercher la fermentation d' un sucre , la production de gaz comme l' hydrogène sulfuré , ou bien de démontrer la présence d' une nitratase , d' une désaminase , d' une gélatinase etc .(Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.G.,2010) .

**V-1-2-3-4- Des milieux de conservation**

Ce sont des milieux pauvres qui maintiennent les micro – organismes dans un état de vie ralentie.(Guezlane N.,kahlouche B., Athmani S.,2010).

### V-1-3-Les milieux de culture spécifique des microalgues

**V-1-3-1-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.(Figure 19).(Patricia G .,Becera C.,2009).



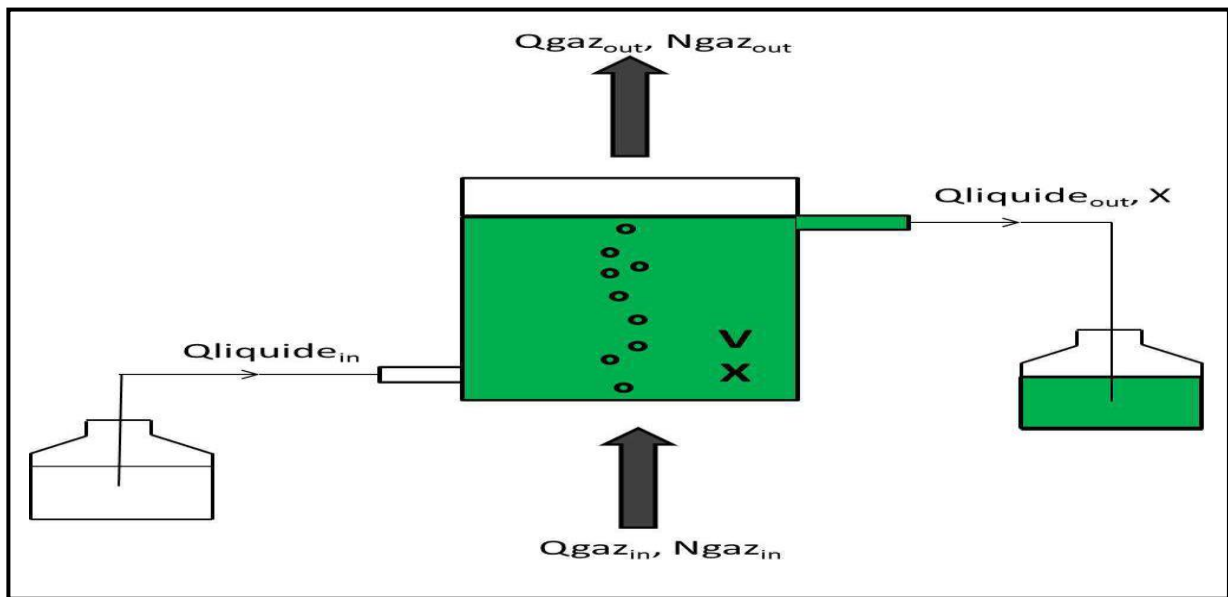
**Figure 19:**Montage du photobioréacteur pour la culture de *Chlorella vulgaris* en mode Batch.( Clément-Larosiere B.,2012).

**V-1-3-2-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.

( Clément-Larosiere B.,2009).

**V-1-3-3-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.(Figure 20).( Clément-Larosiere B.,2009).



**Figure 20:** Schéma d'une culture en photobioréacteur en mode continu.  $Q_{gaz_{in}}$  : débit volumique de gaz entrant dans le réacteur,  $Q_{gaz_{out}}$  : débit volumique de gaz sortant du réacteur,  $N_{gaz_{in}}$  : débit molaire de gaz entrant dans le réacteur,  $N_{gaz_{out}}$  : débit molaire sortant du réacteur,  $V$  : volume de culture,  $X$  : concentration cellulaire,  $Q_{liquide_{in}}$  : débit volumique de milieu de culture entrant dans le réacteur,  $Q_{liquide_{out}}$  : débit de milieu de culture contenant des algues sortant du réacteur. (Barbara C.L.,2012).

## V-2-Les types de culture des microalgues

### V-2-1-En condition phototrophes

#### V-2-1-1-Gestion des intrants

**V-2-1-1-1-L'approvisionnement en nutriments:** L'apport minimal en nutriment peut être estimé en se référant à la composition moléculaire approchée des microalgues :  $CO_{0,48} H_{1,83} N_{0,11} P_{0,01}$ . Cependant, la plupart des nutriments doivent être fournis en excès puisque les capacités d'assimilation des microalgues sont limitées. (Wolff A.,2010).

**a-Le carbone** représente environ 50% en masse de la matière sèche des microalgues. Chez les organismes autotrophes, la totalité de ce carbone est issue du  $CO_2$ . La production de 100 tonnes de biomasse algale permet donc la fixation d'environ 180t de  $CO_2$ . L'approvisionnement en  $CO_2$  doit être continu durant les périodes de photosynthèse, c'est-à-dire pendant les heures d'ensoleillement. Les sources de  $CO_2$  envisagées sont principalement les infrastructures industrielles émettrices de  $CO_2$  telles que des cimenteries, des centrales à charbon... Ce  $CO_2$  serait a priori gratuit, voire rémunérateur, mais il faut tout de même tenir compte du coût de l'infrastructure d'acheminement. (Wolff A.,2010).

**b-L'azote** est classiquement apporté sous 3 formes possibles : ammoniacque, nitrate

ou urée. La forme « idéale » de l'azote est fonction de la biologie des souches cultivées et des coûts. Comme la fixation industrielle de l'azote nécessite l'utilisation d'énergie fossile, les coûts de l'azote sont dépendants des coûts des énergies fossiles et cette étape énergivore doit être prise en compte dans les analyses de cycle de vie. L'azote peut aussi être d'origine biologique (il peut être fixé par certaines bactéries) ou anthropique, via le recyclage des eaux usées (municipales, agricoles...) ou des effluents gazeux industriels contenant des oxydes d'azote. ( **Wolff A.,2010**).

**c-Le phosphore** doit être apporté en fort excès car il tend à former des complexes avec les ions métalliques qui ne sont pas assimilables. Il est important de noter que l'approvisionnement en phosphore pourrait devenir problématique à plus ou moins long terme car les réserves mondiales en phosphore tendent à s'épuiser. Les eaux usées sont potentiellement des sources durables peu coûteuses.( **Wolff A.,2010**).

-D'autres **éléments, dits « traces »**, sont utilisés en très faibles quantités mais jouent pour autant des fonctions clés. Par exemple, la chlorophylle présente un atome de magnésium en son centre. Un déficit de magnésium dans l'eau affectera donc directement la biosynthèse des chlorophylles et donc potentiellement l'efficacité de la photosynthèse. ( **Wolff A.,2010**).

L'origine des nutriments et le contrôle de leur concentration dans le milieu de culture sont donc des facteurs clé sur le plan de l'économie, de la productivité et de la durabilité des cultures.( **Wolff A.,2010**)

**V-2-1-1-2-Les paramètres physico-chimiques à contrôler** : En plus de l'approvisionnement en nutriments, de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer la croissance des microalgues : des facteurs abiotiques tels que la lumière, la température, la salinité, le pH, la teneur en O<sub>2</sub> et des facteurs biotiques tels que des pathogènes (bactéries, champignons, virus), des compétiteurs pour les ressources (algues exogènes) ou des prédateurs (hydres, copépodes). Le contrôle des facteurs biotiques, assez ardu et controversé excepté en milieux de culture extrêmes (forte salinité ou alcalinité), n'est pas traité ici.( **Wolff A.,2010**)

**a-La lumière**, qui constitue la source d'énergie primaire des microalgues en conditions photoautotrophes, est bien évidemment un facteur déterminant de la productivité du système. La qualité (spectre adéquat avec la photosynthèse) et la quantité de lumière reçue peuvent être maximisées par le choix du site de culture, le mode de culture et l'intensité du mixage pour éviter la création de zones d'ombres stériles.( **Wolff A.,2010**)

**b-Si les températures** optimales sont bien caractérisées en laboratoire pour les différentes souches, l'impact des variations de la température, au cours de la journée et des

saisons en extérieur, sur leur productivité n'est pas bien connu. De nombreuses microalgues tolèrent bien des températures inférieures de 15°C de leur optimum mais ne survivent pas à 2-4°C d'excès par rapport à leur température optimale ). D'autre part, des températures nocturnes basses limitent la perte de biomasse par respiration (qui peut représenter 25% de la biomasse accumulée au cours de la journée) mais en même temps limitent la reprise de la photosynthèse le matin . ( **Wolff A.,2010**)

**c-Le pH** est principalement déterminé par la concentration en CO<sub>2</sub>. Au fur et à mesure qu'il est consommé le pH augmente. La mesure du pH sert donc d'indicateur pour modérer les flux entrants de CO<sub>2</sub>. ( **Wolff A.,2010**)

**d-Le mixage** est un paramètre très important puisqu'un mixage efficace est le garant de hautes concentrations cellulaires, qu'il maintient les cellules en suspension, élimine les stratifications thermiques, améliore la distribution en nutriments et les échanges gazeux et réduit les zones d'ombre ainsi que les risques de photoinhibition .( **Wolff A.,2010**).

### **V-2-1-2-Les modes de culture**

La culture des micro algues utilisant la lumière du soleil peut être effectuée soit dans des bassins à ciel ouvert ou des photo bioréacteurs en forme de tube, rectangle, réacteur à agitation continue ou autre forme . Concernant la nutrition, la plupart des micro algues sont photo autotrophes, c'est-à-dire elles utilisent le CO<sub>2</sub> et qu'elles tirent leur énergie de la photosynthèse. Or, il existe aussi des micro algues hétérotrophes qui sont capables de se développer sans utiliser l'énergie solaire, mais une source de carbone organique , c'est le cas de *Chlorella vulgaris* et *Chlorella protothecoides*.(**Sadi M.,2012**).

#### **V-2-1-2-1-Système ouverts-les bassins ouverts**

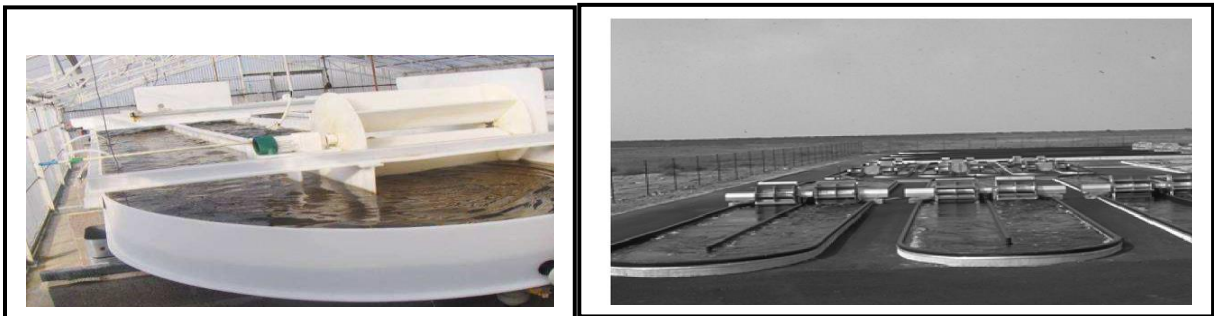
Les systèmes de culture en milieu ouvert sont des technologies simples et présentant peu d'investissement initial. Toutefois peu d'espèces de microalgues peuvent être cultivés en milieu ouvert de manière monospécifique.(**Salomez M .,2009**).

Pour toute culture en milieu ouvert la principale contrainte est le risque de contamination. C'est pourquoi les cultures actuelles se faisant à ciel ouvert concernent des espèces de microalgues poussant dans des milieux très sélectifs. Trois microalgues sont cultivées actuellement avec succès en milieu ouvert : la spiruline (fort pH), la chlorelle (très riche en nutriment) ou la *dunaliella salina* (milieu hypersalin). Le milieu de culture peut être contaminé par d'autres espèces de microalgues ou d'autres microorganismes comme des bactéries ou des protozoaires.(**Salomez M .,2009**).

Les rendements atteints avec ces systèmes ne sont pas optimaux à cause de l'impossibilité de contrôler les facteurs environnementaux. La variable sur laquelle il est

possible de jouer, est la hauteur de la lame d'eau. Celle-ci ne devra pas être trop importante pour permettre un bon accès à la lumière mais d'un côté un minimum est requis pour permettre un bon brassage de l'eau et pour limiter l'échauffement du bassin et les phénomènes d'évaporation.(Salomez M .,2009).

La qualité de l'air est à prendre en compte pour les cultures en système ouvert surtout si le produit final sera valorisé en alimentation humaine ou animale. En effet les microalgues vont capter toutes pollutions de l'air ou de l'eau.(Salomez M .,2009).



**Figure 21:** système de culture de type raceway(Salomez M .,2009).

Il existe différents types de culture en milieu ouvert. Le premier et le plus simple est le système de bassin, où seul le terrain est aménagé pour créer un bassin. L'eau est stagnante. D'autres bassins sont construits hors sol comme les raceways ou hippodromes ( figure 21) Ces bassins sont agités par une roue à aube afin de faire circuler l'eau. Il existe également des bassins circulaires qui sont très utilisés au Japon, à Taiwan et en Indonésie ( Figure 22).

La culture peut également se faire dans de simple cuve. ( Figure 23). Ce système est plutôt utilisé en aquaculture.(Salomez M .,2009).



**Figure 22:** photo d'une culture en bassin circulaire en Thaïlande.(Salomez M .,2009).



**Figure 23** : Photo de culture en cuve.(Salomez M .,2009).

Les bassins doivent être agités en permanence et également la nuit pour éviter toute stratification du milieu en oxygène, ce qui favoriserait le développement d'autres microorganismes. Cette agitation demande une certaine quantité d'énergie.(Salomez M .,2009).

#### **V-2-1-2-2-Systèmes fermés – les photobioréacteurs**

Les photobioréacteurs (PBR) sont différents types de réservoirs ou de systèmes fermés dans lesquels les algues sont cultivées. Ce sont des systèmes particulièrement bien adaptés pour les micro-algues sensibles aux contaminations, ils permettent également la culture des algues extrêmophiles. La culture d'algues consiste, alors, en une seule ou plusieurs souches spécifiques optimisées pour la production du produit désiré. Pouvant fonctionner de manière continue ou discontinue, la productivité en biomasse est meilleure dans le cadre d'une culture continue.( Person J.,2010).

Il existe des géométries très variées de PBR. On peut cependant distinguer trois grands types :

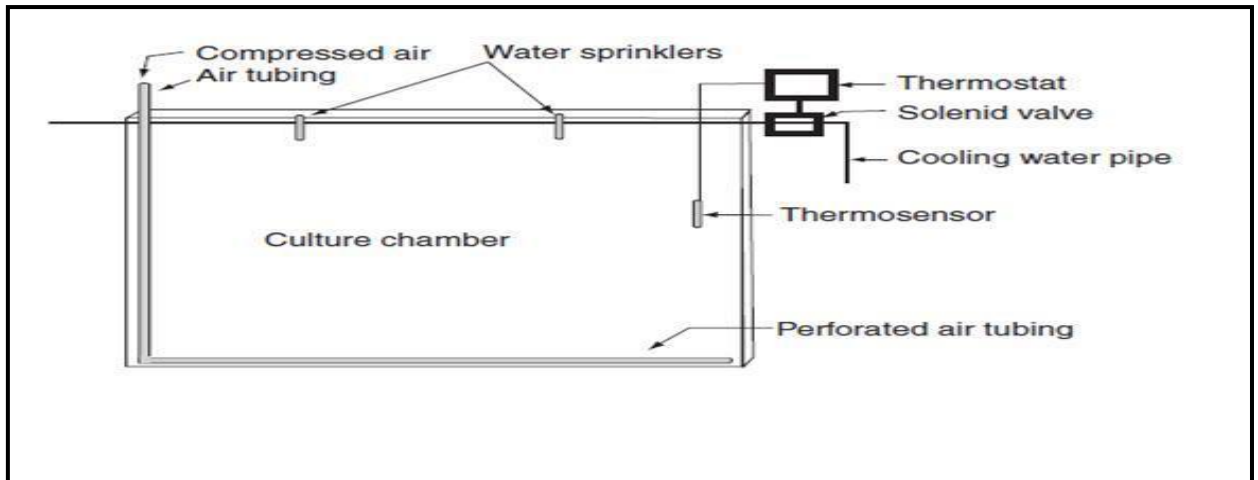
- les PBRs plats.
- les PBR tubulaires .
- les PBRs à colonne verticale.( Wolff A.,2010)

##### **V-2-1-2-2-1-Les PBRs plats**

**a-Principe:** PBR plats sont des structures fines (moins de 10cm) et verticales qui offrent de larges surfaces éclairées.( Wolff A.,2010).

**b-Description:**Le mixage est réalisé par un barbotage de l'air injecté à la base. Du fait de l'importante surface éclairée et un mixage efficace, les densités cellulaires obtenues sont généralement élevées, c'est-à-dire plus de 80g/l . Des PBR plats de plus de 1000l ont été testé

avec succès ce qui présuppose que cette technique pourrait être intéressante à plus grande échelle (Figure 24). (Wolff A.,2010).



**Figure 24:** Schéma d'un PBR plat.( Wolff A.,2010)

**c-Les paramètres importants:** Le contrôle de la température est particulièrement ardu du fait de faible ratio entre surface de refroidissement et surface exposée au soleil.( Wolff A.,2010)

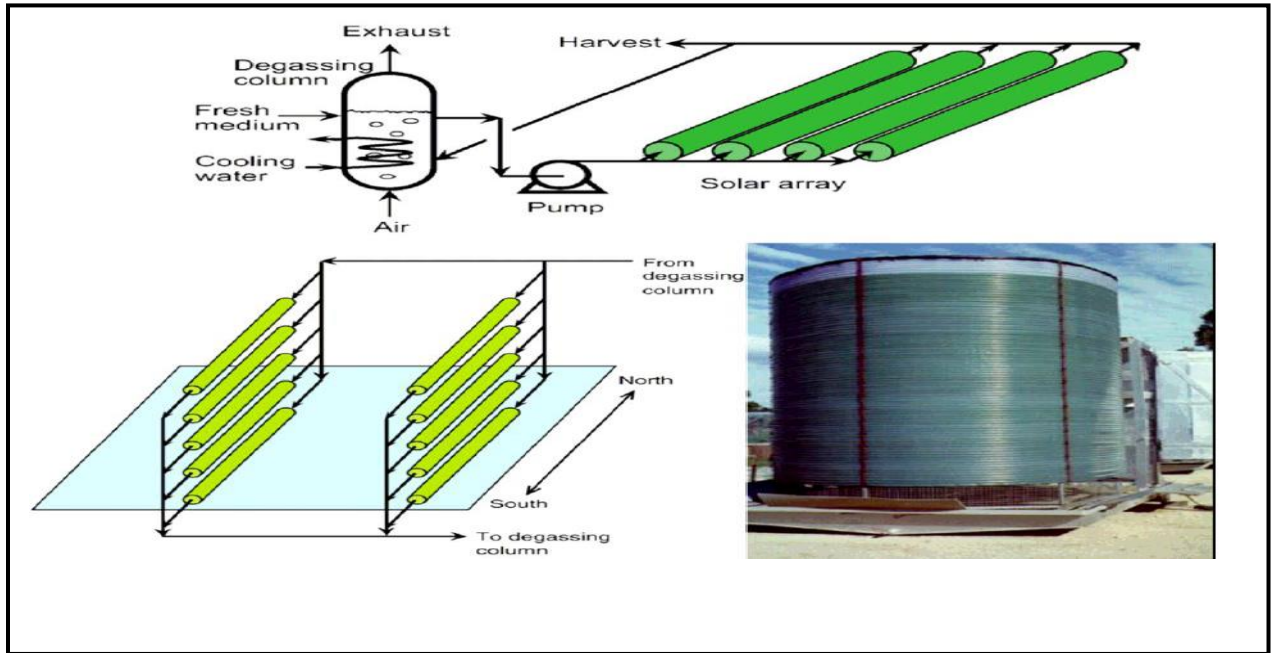
#### V-2-1-2-2-2-Les PBR tubulaires

**a-Principe:** La culture de microalgues circule cycliquement entre un réseau de tubes transparents et une colonne de dégazage.( Wolff A.,2010) .

**b-Description:**Ces PBRs forment un réseau de tubes, organisés de façon horizontale, verticale, oblique ou en hélice (Figure25). Les tubes font généralement 10cm de diamètre ou moins afin de maximiser la pénétration lumineuse .

Les PBRs sont classiquement composés de trois éléments majeurs : une structure transparente de collecte lumineuse, une colonne de dégazage et une pompe. Les parois transparentes sont classiquement constituées de plastique ou de verre et forment la structure de collecte de l'énergie lumineuse.

Les tubes sont orientés de façon à maximiser la capture de la lumière : les tubes sont arrangés parallèlement les uns par rapport aux autres, souvent en palissade, et sont toujours orientés nord-sud. Les surfaces environnantes sont souvent peintes en blanc afin d'augmenter la réflectance . ( Wolff A.,2010).



**Figure 25:** Différentes organisations de PBR tubulaires. En haut, illustration du système complet comprenant, un réseau tubulaire horizontal, une colonne à dégazage et un système de pompe. A gauche, PBR tubulaire verticale organisé en palissade avec une orientation nord-sud. A droite, un PBR tubulaire hélicoïdal. ( **Wolff A.,2010**)

**c-Les paramètres importants:** L'oxygène tend à s'accumuler à des concentrations qui inhibent la photosynthèse et provoquent des dommages photo-oxydatifs . Il ne peut pas être évacué au sein des tubes et forme donc des gradients croissants au fur et à mesure que le milieu de culture avance dans le tube. La longueur des tubes est donc limitée (de l'ordre de 80m, mais cette longueur dépend de nombreux facteurs) et la culture doit régulièrement retourner à la colonne de dégazage. ( **Wolff A.,2010**).

De la même façon, le pH augmente le long des tubes à cause de la consommation du  $\text{CO}_2$  par la photosynthèse. Le carbone est apporté principalement avant l'entrée du fluide dans les tubes mais des points d'injection supplémentaires peuvent être nécessaires le long des tubes pour limiter les variations de pH . ( **Wolff A.,2010**).

Pour contrôler la température, un échangeur de chaleur peut être installé au niveau de la colonne de dégazage ou le long des tubes . Des systèmes d'immersion des tubes dans l'eau afin de tamponner l'augmentation de température par l'évaporation ont aussi été développés (notamment par la compagnie américaine Solix).(Figure 26).( **Wolff A.,2010**).

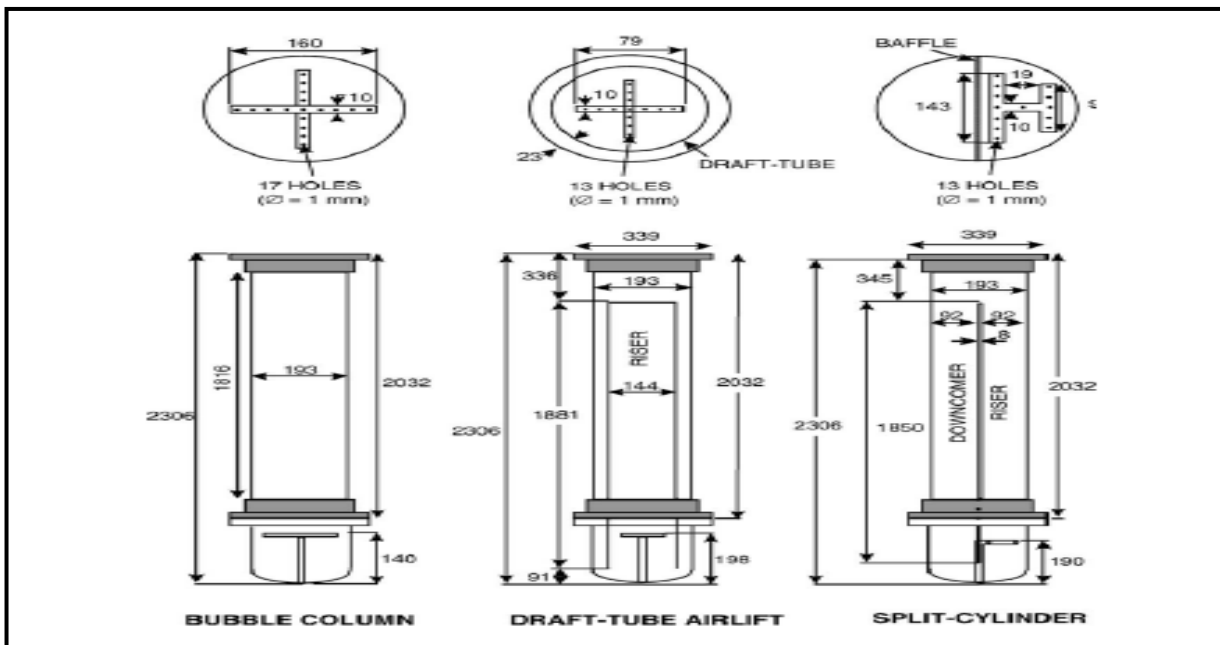


**Figure 26:** PBR tubulaires horizontaux immergés dans de l’eau, Solix’s Lumian™ Algae Growth System .( Wolff A.,2010).

**V-2-1-2-2-3-Les PBRs à colonne verticale**

**a-Principe :** Les microalgues sont cultivées dans un cylindre vertical où le brassage est assuré par l’injection de gaz.( Wolff A.,2010) .

**b-Description :** Les PBRs en colonne permettent un mixage très efficace et offrent un maximum de contrôle des conditions de culture . Les cultures tendent à moins souffrir de photo-inhibition avec ce système qu’avec les autres types de photobioréacteurs.(Figure 27).(Wolff A.,2010) .(Franck F.,2012).



**Figure 27:**Trois exemples de configuration de PBRs à colonne verticale associés avec un système de distribution de gaz, dimensions en mm . ( Wolff A.,2010).

**c-Les paramètres importants:** Du fait de leur faible ratio surface sur volume, donc une faible surface photosynthétique, un mixage efficace est nécessaire pour optimiser les cycles entre zones éclairées et zones d'ombre.

Le diamètre et la hauteur du système sont limités à environ 20 cm de large et 2 m de haut, sous peine de perdre en efficacité photosynthétique et en contrôle des conditions de culture. Ceci implique qu'un nombre important d'unités est requis pour le passage à l'échelle commerciale.( **Wolff A.,2010**).(Franck F.,2012).

#### **V-2-1-2-3-Systèmes mixtes**

Le terme de système mixte/hybride (en conditions de photoautotrophie) est un terme que l'on retrouve dans la littérature qui peut correspondre à deux types d'approches bien distincts : un système de culture couplant photobioréacteur et bassin ouvert, ou des bassins pouvant être alternativement ouverts ou recouverts d'une bâche transparente (passage à un mode de culture fermé) selon les conditions extérieures.( **Wolff A.,2010**).

Dans le premier cas, les photobioréacteurs sont utilisés pour booster la croissance des microalgues en conditions contrôlées jusqu'à d'importantes concentrations cellulaires. Ces microalgues servent alors d'inoculum, exempt de contamination, aux bassins où les cellules sont alors généralement exposées à un stress nutritif (carence en azote notamment) et à d'autres stress environnementaux qui stimulent l'accumulation de lipides .( **Wolff A.,2010**) .

Dans le second cas, la bâche offre une flexibilité d'adaptation aux conditions extérieures. Lorsque le bassin est ouvert, l'évaporation permet une régulation de la température de l'eau. Lorsqu'il est fermé, le bassin est protégé des contaminations.( **Wolff A.,2010**) .

#### **V-2-1-3-Comparaison des caractéristiques des PRBs plats, tubulaires et cylindrique**

**Tableau 9:** Comparaison des caractéristiques des différents designs de PBR.( **Wolff A.,2010**).

<b>PBR</b>	<b>Plat</b>	<b>Tubulaire</b>	<b>Cylindrique</b>
Surface illuminée	+	+	-
Efficacité du mixage	+	-	+
Concentrations en O <sub>2</sub> inhibitrices	+	-	+
Variations de PH	+	-	+
Zones d'ombres	+	-	NA
<b>PBR</b>	<b>Plat</b>	<b>Tubulaire</b>	<b>Cylindrique</b>
Photo-inhibition/photo-oxydation (cycle zone)	NA	-	+

éclairée/zone d'ombre adéquat)			
Controle de la température	-	-	+
Consommation d'énergie	NA	NA	+
Cout d'investissement	+	+	- +
Productivité volumique	+	+	+
Scale-up	- +/-	NA	+

**Nomenclature:**

NA: pas de données,+ Avantageux, 0 Moyen ou fortement dépendant d'autres facteurs.

- Mauvais

**V-2-2-En condition hétérotrophe****V-2-2-1-Gestion intrants**

La source de carbone utilisée pour nourrir les microalgues peut être de nature variée. On peut notamment utiliser du glucose ou des glucides lignocellulosiques. Le coût et les quantités disponibles des matières premières sont cependant des facteurs limitants. ( **Wolff A.,2010**).

**V-2-2-2-La fermentation**

Cette méthode de culture tire avantage de technologies déjà matures de la fermentation développées notamment dans l'agroalimentaire. Le maintien de conditions de culture optimales se fait relativement aisément et les risques de contamination sont faibles. La croissance des microalgues est indépendante de facteurs météorologiques tels que l'ensoleillement, la température extérieure, ce qui facilite le processus. Les concentrations cellulaires sont généralement très élevées ce qui limite la taille et les coûts relatifs des infrastructures de culture ainsi que les coûts de concentration . Cependant, ce système nécessite des souches capables de réaliser la fermentation et les sources de carbone externes, stérilisées, doivent être fournies en quantités équivalentes aux produits générés.

Parmi les acteurs de la fermentation, on peut notamment citer Solazyme où les teneurs lipidiques atteindraient 80% et Roquette en France, plus orienté sur la nutrition. Ces deux entreprises ont signé fin 2010 un accord pour la création d'une joint-venture dans le domaine de la nutrition.( **Wolff A.,2010**).

## V-2-2-3-Comparaison des modes de cultures

Tableau 10: Comparaison des systèmes de culture de microalgues. (Wolff A., 2010)

		Culture photoautotrophe		Culture hétérotrophe
		Bassin ouvert	PBR fermé	
<b>Maintien des paramètres biologiques</b>	Limitation du risque de contamination	-	+	+
	Concentration de la biomasse	-	+	++
<b>Maintien des paramètres physico-chimiques</b>	Contrôle du process en général	-	+	+
	Efficacité d'utilisation du CO <sub>2</sub>	0	0	X
	Efficacité d'utilisation de la source d'énergie	-	+	NA
	Evacuation du O <sub>2</sub>	0	-	X
	Stabilité du PH	NA	-	NA
	Maintien de la température	+ (fluctuations tramponnées) - (mais contrôlées)	+ (contrôle possible) - (nécessite système de refroidissement)	
	Efficacité du mixage	-	+	NA
<b>Coûts</b>	Coûts	+	-	+

	d'investissement			
	Coûts de maintenance	+	-	NA
	Coûts des intrants	NA	NA	-
	Consommation énergétique	+	-	NA
<b>Durabilité</b>	Origine et gestion des intrants	NA	NA	-
	Limitation des pertes en eau	-	+ -	X
	Limitation des risques de contamination du milieu extérieur	-	+	+
<b>Développement</b>	Scale-up	+ -	-	+
	Indépendance vis-à-vis des conditions extérieures - contraintes sur sites	-	NA	+

**Nomenclature:**

NA: pas de données, + Avantageux, 0 Moyen ou fortement dépendant d'autres facteurs.

- Mauvais, X: information non pertinente pour le mode de culture

Le contrôle des paramètres biologiques et physico-chimiques est, a priori, plus aisé en système fermé, qu'il s'agisse de conditions photoautotrophes ou hétérotrophes. Cependant, certains paramètres physico-chimiques tels que la teneur en O<sub>2</sub> ou la température peuvent être naturellement régulés en système ouvert ce qui limite les dépenses énergétiques et les coûts. (

**Wolff A.,2010).**

Bien que l'évaluation des coûts soit extrêmement complexe et facilement discutables du fait de l'hétérogénéité des méthodes de calcul et de la sensibilité à l'échelle, les coûts d'investissement et de maintenance semblent clairement plus élevés pour les systèmes fermés qu'en bassin ouvert. On peut signaler qu'un colloque international sur l'aquaculture des microalgues avait classé, en 1991, les coûts associés à la production selon l'ordre d'importance suivant : la main d'oeuvre > les approvisionnements en eau et produits chimiques > les installations > l'énergie. ( **Wolff A.,2010).**

Les coûts et la disponibilité des matières premières organiques utilisées en conditions hétérotrophes ainsi que la rivalité d'autres technologies de production de biocarburant utilisant ces mêmes matières premières posent des questions de durabilité concernant la voie fermentaire.

De façon générale, il ressort que les données sur les coûts et les potentiels de production sont plutôt disparates. Des analyses technico-économiques sont nécessaires sur des infrastructures à l'échelle de la démonstration.( **Wolff A.,2010).**

#### **V-2-2-4- Avantages et inconvénients**

**Tableau 11** : Comparaison des systèmes et modes de culture de micro-algues.  
( **Person J ,2010).**

		<b>AVANTAGES</b>	<b>INCONVÉNIENTS</b>
Culture Photoautotrophe	PBR fermés	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Moins de pertes d'eau qu'en open ponds</li> <li>· Maintien des cultures sur le long-terme supérieur</li> <li>· Plus grand rapport surface sur volume permettant de supporter des concentrations volumiques de cellules plus importantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coût élevé et procédés complexes</li> <li>· Problèmes d'échelles</li> <li>· Nécessitent un maintien de la température puisqu'ils ne possèdent pas de refroidissement par évaporation</li> <li>· Peut demander un nettoyage régulier dû à la formation de bio-film</li> </ul>
	Open ponds	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Maintien de la température grâce au</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Sujet aux changements de</li> </ul>

		<p>refroidissement par évaporation</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· Coûts d'investissements moins onéreux</li> <li>· Culture de masse sur des surfaces importantes</li> </ul>	<p>température quotidiens et saisonniers</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· Difficile de conserver des monocultures de par sa nature</li> <li>· Faibles concentrations en matière sèche</li> </ul>
Culture Hétérotrophe		<ul style="list-style-type: none"> <li>· Plus facile de maintenir les conditions de production optimales et la prévention de contamination</li> <li>· Possibilité d'utiliser pour la croissance des substrats tels que le glycérol ou des acides organiques (acétiques...)</li> <li>· Atteint des concentrations élevées en biomasse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Coût et disponibilité des matières premières telles que les sucres</li> <li>· Rivalité des matières premières et des organismes avec d'autres technologies de biocarburants (issus de levures ou de bactéries)</li> </ul>

**CONCLUSION GENERALE**

## Conclusion

---

### Conclusion

Le biohydrogène ( $H_2$ ) est un carburant issu de certain phénomène biologique comme la photosynthèse et la fermentation. c'est un produit essentiel pour la production de bioélectricité, utilisable en transport et comme source puissante de chaleur.

Dans notre d'étude de la production de biohydrogène par les micro algues , elles sont des microorganismes eucaryotes photosynthétique qui peuvent être autotrophes ou hétérophes se présentent sous un nombre de formes très variées selon les espèces . Elle peuvent être riche en protéines , en lipides , ou en minéraux . les micro algue est présent en plusieurs application par exemple : l'alimentation humaine et animal, les cosmétique ...

Pour la production d'hydrogène, ils présentent un enzyme responsable à la production d' $H_2$  . on appelé l'hydrogénase , elles sont classées en trois classe : l'hydrogénase FeFe , NiFe et NiFeSe .

L'isolement et l'identification des microalgues s'effectue par des différentes étapes dont il commence par le prélèvement des eaux phytoplanctoniques puis l'isolement dans des milieux de culture d'isolement spécifique pour isoler les microalgues productrice d' $H_2$  et enfin l'identification de gaz sorti ( $H_2$ ) par CPG.

La culture des microalgues s'effectue en trois types de système de culture: le système ouverts, les système mixte et le système fermés (photobioréacteurs) c'est le système le plus utilisé pour la culture des microalgues photosynthétique.

## Résumé

Les microalgues, sont des microorganismes photosynthétique ayant des différents applications dans les différents domaines de l'environnements et de l'énergie.

Notre mémoire d'étude theorique s'interesse à la production de biohydrogène ( biocarburant de 3ème génération) par les microalgues à l'aide par l'enzyme d'hydrogénase pour catalyser la production d'hydrogène, ou la réduction du proton selon la réaction :  $H[2] \leftrightarrow 2H [ + ] + 2e [ - ]$ .

L'isolement des microalgues productrice l'hydrogène ( $H_2$ ) nécessité des milieux de culture d'isolement spécifiques. Et après on peut mesurer de la teneur d' $H_2$ . La culture des microalgues s'effectue par des différents modes : le photobioréacteur, le système ouvert et le système fermer ...ect.

**Mots clé** : microalgue , photobioréacteur , biohydrogène , enzyme hydrogénase , photosynthétique ,

# **REFERENCE BIBLIOGRAPHIA**

### Référence Bibliographie

- Avavian P. 2011** . chimie pour les énergies alternative. Chimie pour énergies alternatives . vol . 60.29-30 p.
- Bacchi M . 2013** . hydrogénases artificielles : nouveaux catalyseurs biosynthétiques pour la production d'hydrogène , chimie inorganique et bio-inorganique.l'universitédegrenoble.250p.
- Barberousse H.2006** . Etude de la diversité des algues et des cyanobactéries colonisant les revêtements de façade en france et recherche des facteurs favorisant leur implantation .these de doctora .186p.
- Canaguier S . 2009** . nouveaux catalyseurs inspirés du site actif des hydrogénases nife : électro-production d' hydrogénases et mécanisme catalytique , chimie bio-inorganique; université joseph fourier . 228p.
- Cantin I. 2010.**La production de biodiesel à partir des microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe..Centre Universitaire de Formation en Environnement Université de Sherbrooke,Québec, Canada ;87p .
- Cavalla M . 2000.** Les Algues- Les Microalgues;17 p.
- Chabraoui L .,Kabbaj W . 2011-2012** . enzymologie , rabat ; 88p .9
- Chader S ., Hacene H., Belhamel M., Agathos S. 2007.** Etudes des procédés de production biologiques de l'hydrogène. des Energies Renouvelables Vol. 10 N°4 :497 – 505p.
- Chader S ., Touzi A . 2001** .Biomasse Algale : Source Energétique et Alimentaire .Rev. Energ. Ren Production et Valorisation – Biomasse;47-50.
- Charpy L. 2009.** Clipperton, environnement et biodiversité d'un microcosme océanique.Muséum national d'Histoirenaturelle, Paris ; IRD, Marseille, 420 p.
- Charrier C. 2003.**Les Micro-algues, une alternative écologique incontournable.Université de Nantes;10 p.
- Clément-Larosiere B. 2012.**Etude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO<sub>2</sub>.These.Ecole Centrale des Arts et Manufactures (Ecole Centrale Paris);212p.
- Cornish – bowden A ., Jamin M ., Saks V . 2004.**cinetique enzymatique; isbn ; portland press, ltd. london 456 p.
- Courna L ., Peltier G. 2009.** Service de Biochimie et Toxicologie Nucléaire (SBTN). Service de Biologie Végétale et de Microbiologie Environnementales (SBVME) Institut de Biologie Environnementale et Biotechnologie, N°1:1-5p.

## Référence Bibliographie

---

- Cournac L., Pruvost J., Legrand J.** 2012 . Production d'hydrogène par les micro
- Dabbadie L. 1992.** Cultures intensives de microalgues sur lisier de porc: performances, contraintes, utilisation des biomasses. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, France ; 125 p.
- Dehenould G. 2012.** Étude de l'autofloculation dans un chenalalgal à haut rendement. mémoire de doctorat. Faculté des Sciences Unité Assainissement et Environnement, l'Université de Liège; 230 p.
- Demicroalgues pour les besoins aquacoles. Mémoire. Université du Québec à Rimouski; 123p.
- Demuez M .2007 .** etude des relations structure-fonctions de l'hydrogenase a fer de *clostridium acetobutylicum* avec ses partenaires d'oxydo-reduction , microbiologie et biocatalyse industrielles ; l'université de toulouse . France .886p.
- Diadié D. 2009.** Production d'aliments enrichis en acides gras polyinsaturés à partir
- Doré-déschènes F. 2009.** Utilisation des microalgues comme source d'énergie durable. These .Centre Universitaire de Formation en Environnement Université de Sherbrooke. juin ; 101p.
- Doumandji A., Boutekrabt L., Saidi Nabil A., Doumandji S., Hamerouch D., Durand J.R. 1980.** C. Lévêque. Flore et faune aquatiques de l'Afrique. Éditeurs scientifiques; hydrobiologistes O.R.S.T.O.M; 388 p.
- Fabiano S. 2002 .** immobilisation d'enzyme dans des films de polymère conducteur : le peut application à la réalisation de biocapteur ampérométriques pour le dosage du glucose et des composés phénoliques . doctorat . en chimie- biochimie , université Claude Bernard – Lyon; 54-20002.
- Franck F., 2011-2012.** Conception et réalisation d'un photobioréacteur adapté à l'étude de la production d'hydrogène chez les micro-algues. these: université de Liège. 338p.
- François P.A. 2012.** Les algues comme biocarburant. Université de Rennes 1.; 32 p.
- Guezlane N.; kahlouche B.; Guemouri A. 2010.** Microbiologie (Travaux pratiques). 3<sup>ème</sup> éd. Office des publications Universitaires; 139 p .
- Haouaris S. 2011.** Etude de l'impact de l'incorporation de la spiruline sur les propriétés nutritionnelles, technologiques et organoleptiques du couscous artisanal these: Université Saâd DAHLAB, Blida, Algérie; 50p.
- Hess J. 2007.** Modalisation de la qualité de biogaz production par un fermenteur méthanisation et stratégie de régulation en vue de sa valorisation. these: l'Université de Nice - Sophia Antipolis, 211p.
- Igoud S . 2002 .** Le biogaz : une solution énergétique viable . Bulletin des énergies renouvelables - N° 2; 1-15p.

## Référence Bibliographie

---

- Jaquet S. 2003.** Microalgues et cyanobactéries lacustres UMR carrel-Station d'hydrobiologie Lacustre Equipe de Microbiologie Aquatique;47 p.
- Jarrar H . 2011 .** bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles ; école nationale supérieure de chimie de Montpellier ; 165p.
- Kawéni Z. 2011.** La biodiversité algale au service du développement économique de Mayotte. Mémoire.Centre D'etude et de Valorisation des Algues, France;125 p.
- Kord A., Debbari Z., Ghobrini M., Chader S. 2012.** Caractérisation des Acides Gras de la Chlorelle en Vue d'une Application Bioénergétique.Thèse. Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables,Ghardaïa – Algérie;4p.
- Mariana S . 2012.** Les photobioréacteurs Valorisation énergétique des micro-organismes; Thèse :Site universitaire de Gavy/ CRTT, GEPEA, Bd de l'Université;37p.
- Ouellet M . 2013 .** De la réduction des gaz à effet de serre à l'interdépendance énergétiques du Québec .Thèse: Sur les enjeux énergétiques du Québec ; 13p.
- Patricia G .,Becera C. 2009.** Production de stratégies de commande pour la culture de microalgues dans un photobioréacteur continu.thèse. Ecole Centrale des Arts et Manufactures (Ecole Centrale Paris); 243p.
- Person J. 2010.** Algues, filières du futur. AdebioTech, Romainville ;163 p.
- Rayen F. 2012.**Estimation et commande robustes de culture de microalgues pour la valorisation biologique de CO<sub>2</sub>.Thèse de Doctorat .Ecole Doctorale « Sciences et Technologies de l'Information des Télécommunications et des Systèmes »;226 p.
- Sadi M. 2012.** Les micro algues: un défi prometteur pour des biocarburants propres. Centre de Développement des Energies Renouvelables. des Energies Renouvelables SIENR'12 Ghardaïa (2012) 195 –202p.
- Saidi A., Chaouchi A., Chergui-bouafia S . 2007 .** produire de l'hydrogène à partir d'eau et de lumière grâce aux microorganismes . division bioénergies et environnement centre de développement des énergies renouvelables cder / 62 route de l'observatoire village céleste bouzaréah, alger . 8p .
- Salomez M . 2009.** Opportunités de développement de la filière microalgues à l'île de la Réunion .L'Agence Régionale Energie Réunion (ARER);91 p.
- Sama H.; Tiabri Thiombiano S. 2012 .** Le biogaz à des fins domestiques . Édition et réalisation graphique :Code Jaune, design et créativité.N°6:1-8p.
- Sarah B . Diane L. Elodie S.; 2009 .** Fabrication de Biogaz :Synthèse de pétrole par fermentation à partir de déchets organiques ; 41p.
- Wolff A. 2010.** L'utilisation des microalgues pour la fabrication de biocarburants: analyse de

## Référence Bibliographique

---

la chaîne de valeur-contexte français et international. Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie ;59 p.

**Yohan O. 2006** . modèles structuraux et fonctionnels du site actif des hydrogénases [ nife] : de nouveaux catalyseurs bio-inspirés pour la production d' hydrogène . université joseph fourier . France ; 268p.

**Zdanevitch L., Masselot G., Collet S., Bour O . 2009** . Étude de la composition du biogaz de méthanisation agricole et des émissions en sortie de moteur de valorisation ; INERIS ; 37p.

**Zubia M ., Turquet J . 2003**.La phytobank : un outil indispensable pour la valorisation des microalgues à la Réunion.8p.

## Résumé:

Les microalgues, sont des microorganismes photosynthétique ayant des différents applications dans les différents domaines de l'environnements et de l'énergie.

Notre mémoire étude theorique s'interesse à la production de biohydrogène ( biocarburant de 3éme génération ) par les micro algues à l'aide par l'enzyme d'hydrogénase pour catalyser la production d'hydrogène, ou la réduction du proton selon la réaction :  $H [2] \leftrightarrow 2H [+ ] + 2e [-]$ .

L'isolement des microalgues productrice l'hydrogène ( $H_2$ ) nécessité des milieux de culture d'isolement spécifiques. Et après on peut mesurer de la teneur d' $H_2$ . La culture de le micro algues s'effectue par des différents modes : le photobioréacteur, le système ouvert et le système fermer ...ect.

**Mots clé :** microalgue , photobioréacteur , biohydrogène , enzyme hydrogénase ,

## ملخص:

تمتلك الطحالب المجهرية ذات التركيب الضوئي تطبيقات مختلفة في مجالات مختلفة للبيئة و الطاقة. في هذه الدراسة قمنا بدراسة كيفية انتاج الهيدروجين الحيوي من الطحالب المجهرية باستخدام انزيم نازعات الهيدروجين لتحفيز انتاج الهيدروجين او ارجاع بروتون حسب تفاعل التالي.  $H [2] \leftrightarrow 2H [+ ] + 2e [-]$ . يتطلب عزل الطحالب المجهرية المنتجة لهيدروجين اوساط زرع للعزل خاصة , و بعدها يمكن قياس الهيدروجين المنتج يتم زراعة الطحالب المجهرية بطرق مختلفة: مفاعل الحيوي ضوئي و نظام فتح و نظام غلق.....

**الكلمات المفتاحية :** الطحالب المجهرية، مفاعل الحيوي ضوئي، الهيدروجين الحيوي، انزيم نازعات الهيدروجين، التركيب الضوئي.