

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**ECOLE NATIONAL POLYTECHNIQUE**



**Département du Génie de l'Environnement**

Laboratoire de Biotechnologies Environnementales et de Génie des Procédés (*BIOGEP*)

# **Thèse de Doctorat**

**en Génie de L'Environnement**

**Présentée par :**

**Mr AINAS Mahfoud**

**Magister en Microbiologie Appliquée**

**Intitulée :**

## **VALORISATION D'UNE BIOMASSE ALGALE PAR UN PHOTOBIOREACTEUR POUR LA PRODUCTION D'HYDROGENE**

Présenté(e) et soutenue publiquement le 21./01./2018 devant le jury composé de

<b>Président</b>	<b>Mr Hocine</b>	<b>GRIB</b>	<b>Pr</b>	<b>ENP</b>
<b>Examineurs</b>	<b>Mr Rabah</b>	<b>BAKOUR</b>	<b>Pr</b>	<b>USTHB</b>
	<b>Mr Toudert</b>	<b>AHMED ZAID</b>	<b>Pr</b>	<b>USTHB</b>
<b>Directeurs de Thèse</b>	<b>Mr Djamel</b>	<b>ABDESSEMED</b>	<b>Pr</b>	<b>USTHB</b>
	<b>Mr Mouloud</b>	<b>BELLAL</b>	<b>Pr</b>	<b>ENSA</b>
	<b>Mr Rabah</b>	<b>BOUARAB</b>	<b>Pr</b>	<b>ENP</b>
	<b>Mr Nabil</b>	<b>MAMERI</b>	<b>Pr</b>	<b>ENP</b>

**ENP 2018**



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**ECOLE NATIONAL POLYTECHNIQUE**



**Département du Génie de l'Environnement**

Laboratoire de Biotechnologies Environnementales et de Génie des Procédés (*BIOGEP*)

# **Thèse de Doctorat**

**en Génie de L'Environnement**

**Présentée par :**

**Mr AINAS Mahfoud**

**Magister en Microbiologie Appliquée**

**Intitulée :**

## **VALORISATION D'UNE BIOMASSE ALGALE PAR UN PHOTOBIOREACTEUR POUR LA PRODUCTION D'HYDROGENE**

Présenté(e) et soutenue publiquement le 21./01./2018 devant le jury composé de

<b>Président</b>	<b>Mr Hocine</b>	<b>GRIB</b>	<b>Pr</b>	<b>ENP</b>
<b>Examineurs</b>	<b>Mr Rabah</b>	<b>BAKOUR</b>	<b>Pr</b>	<b>USTHB</b>
	<b>Mr Toudert</b>	<b>AHMED ZAID</b>	<b>Pr</b>	<b>USTHB</b>
	<b>Mr Djamel</b>	<b>ABDESSEMED</b>	<b>Pr</b>	<b>USTHB</b>
<b>Directeurs de Thèse</b>	<b>Mr Mouloud</b>	<b>BELLAL</b>	<b>Pr</b>	<b>ENSA</b>
	<b>Mr Rabah</b>	<b>BOUARAB</b>	<b>Pr</b>	<b>ENP</b>
	<b>Mr Nabil</b>	<b>MAMERI</b>	<b>Pr</b>	<b>ENP</b>

**ENP 2018**

## المخلص:

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم شدة الإضاءة، التركيز الأولي للسيرولينا وكذا المساحة الخاصة بالمفاعل الحيوي على إنتاج الكتلة الحيوية. تم تحديد البكتيريا الزرقاء *Arthrospira platensis* المستخدمة وتقييمها فيما يتعلق بمحتوى البروتين ومن ثم استنباتها في ثلاثة مفاعلات حيوية مختلفة النسبة (مساحة/ الحجم). محتوى المفاعلات الحيوية الثلاثة زرعت بالتركيز الأولية التالية : 0.25 و 1 و 3.5 غرام/التر للمفاعلات الحيوية الكلاسيكية والحلقية على التوالي تحت مختلف شدات الإضاءة والتي قدرت بـ 800 – 10000 لوكس. تم الحصول على أفضل إنتاجية للكتلة الحيوية في مساحة كبيرة (112 م<sup>-1</sup>) ورفيعة (1.5 سم) تحت شدة إضاءة عالية نسبيا (10000 لوكس). وتركيز أولي منخفض (1 غ/ل). ومن ناحية أخرى تم التوصل إلى أفضل إنتاجية لليخضور. (chlorophyll) لما عرضت الكتلة الحيوية للسيرولينا إلى شدة الإضاءة منخفضة قدرت بـ 800 لوكس. إنتاج غاز الهيدروجين قد تم في الثلاث المفاعلات الحيوية مع تغيرات في الحموضة (pH) وتركيز البكربونات وكلوريد الصوديوم (NaCl). النتائج تبين ان إنتاج غاز الهيدروجين هو الأفضل لدرجة حموضة pH=8.5 والتركيز المولي لكلوريد الصوديوم و البكربونات وهو 17 ميلي مول و 300 ميل مول على التوالي. وقد أدى تأثير سطح الإضاءة على إنتاج غاز الهيدروجين إلى نتائج واعدة للمفاعل الحيوي الحلقي المصمم في المختبر .

## الكلمات المفتاحية :

المفاعل الحيوي، *Arthrospira platensis*. شدة الإضاءة، نسبة السطح / الحجم، تركيز الكتلة الحيوية الأولية، صندوق بنكن، مفاعل حيوي حلقي

## Abstract

The objective of this study is to evaluate the influence of light intensity, the concentration of inoculum and the specific photo-bio-reactor surface area on biomass production. The cyanobacterium *Arthrospira platensis* used was identified, evaluated with respect to its protein content and then cultured in three photo-bioreactors of different surface / volume ratio. These PBRs were inoculated with concentrations of the starting inoculum varying between 0.125, 1 and 3.5 g / L for the conventional and annular PBR respectively under different incident light intensities 800- 10,000 lux. The best biomass productivity was obtained in the large-area (112 m<sup>-1</sup>) and thin (1.5 cm) PBR at a relatively high light intensity (10000 lux) and a low inoculum concentration (1g / L). On the other hand, the best productivity in photosynthetic pigment (chlorophyll) was reached when the *Spirulina* culture was subjected to low intensities estimated at 800 lux.

The production of hydrogen was carried out in the three photo-bio-reactors by operating on the pH of the medium, the concentration of bicarbonate and the concentration of NaCl. The results reveal that hydrogen production is optimized for: pH 8.5, 17 mM NaCl concentration and a 300 mM bicarbonate concentration. The effect of the lighting surface on hydrogen production has led to promising results in the case of laboratory-designed PBR.

**Keywords :** Photo-fermentation, *Arthrospira platensis*, Light Intensity, Ratio V/S, Concentration inoculum, RSM"Box-Bhenken, PBR annular.

## Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'influence de l'intensité lumineuse, de la concentration de l'inoculum de départ ainsi que de la surface spécifique d'un photo-bio-réacteur sur la production en biomasse. La cyanobactérie *Arthrospira platensis* utilisée a été identifiée, évaluée par rapport à sa teneur en protéines puis cultivée dans trois photo-bioréacteurs de rapport Surface/Volume différents. Ces PBR ont étéensemencés avec des concentrations de l'inoculum de départ variant entre 0.125, 1 et 3.5 g/L pour les PBR classique et annulaire respectivement sous différentes intensités lumineuses incidentes 800- 10000 lux. La meilleure productivité en biomasse a été obtenue dans le PBR de grande surface (112 m<sup>-1</sup>) et de mince épaisseur (1.5 cm) sous une intensité lumineuse assez élevée (10000 lux) et avec une concentration d'inoculum faible (1g/L). Par contre, la meilleure productivité en pigment photosynthétique (chlorophylle) a été atteinte lorsque la culture de *Spirulina* a été soumise à faibles intensités estimées à 800 lux.

La production d'hydrogène a été effectuée dans les trois photo-bio-réacteurs en opérant sur le pH du milieu, la concentration de bicarbonate et la concentration de NaCl. Les résultats révèlent que la production d'hydrogène est optimisée pour un pH de 8.5, une concentration de 17 mM de NaCl et une concentration de bicarbonate de 300 mM. L'effet de la surface d'éclairage sur la production d'hydrogène a conduit à des résultats prometteurs dans le cas du PBR conçu au laboratoire.

**Mots clés :** Photo-fermentation, *Arthrospira platensis*, Intensité lumineuse, Rapport surface volume, Concentration d'inoculum, RSM "Box-Bhenken, PBR annulaire.

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail à  
A ma très chère mère  
en témoignage de mon profond  
Amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous accueillir dans son  
vaste paradis*

*A Mon très cher père,  
Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour,  
L'estime, le dévouement et le respect que j'ai pour vous.  
Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et  
Nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*A ma très chère épouse et mes filles  
Lina, Sara, Aya et serine*

*A mes très chers frères  
Aziz, Khelifa, Arezki, Nabil et Ali*

*A mes très chère sœurs:  
Samia, Lynda, Zahra et Hakima  
et à toute la famille Ainas et Ourtemache et mes chères amies .  
Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection*

*A*

# Remerciements

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, Monsieur **R. BOUARAB** Professeur à l'ENP et monsieur **N. MAMERI** Professeur à l'ENP. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée, Merci pour votre nombreuse, minutieuse et précieuse relecture. Merci pour toutes les questions et toutes les discussions enrichissantes que nous avons eues pour faire avancer ce travail de recherche. Je les remercie infiniment pour leurs écoutes permanente et surtout leurs patience. Je les suis reconnaissant de leurs humours et de leurs disponibilités.

J'adresse mes plus vifs sincères remerciements à Monsieur **H. GHRIB** Professeur à l'ENP qui ma fait l'honneur de présider le jury.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur **R. BAKOUR** Professeur à l'USTHB; à Monsieur **D. ABDESSEMED** Professeur à l'USTHB, à Monsieur **M. BELLAL** Professeur à l'ENSA et à Monsieur **AHME ZAID** Professeur à l'ENP, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de on jury de soutenance.

Mes remerciements les plus sincères sont adressés a Monsieur **N. DROUCHE H.** et Madame **H ABDI** Professeur à l'ENP; pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et l'aide qu'ils ont apporté

Il n'y a pas de mot suffisamment fort pour exprimer ma gratitude à mon épouse **H. OURTEMACHE**, je dois lui exprimer toute ma reconnaissance pour le soutien moral, la compréhension forte, le temps qu'elle ma accordé et l'aide qu'elle ma apporté ainsi que pour la patience dont elle a fait preuve pendant les longues années de thèse.

Je tiens a remercies tous les membres de l'équipe de laboratoire de biotechnologie environnementale et génie des procédés de l'Ecole National Polytechnique(ENP).

Je tiens à remercier monsieur **M.HAMEDECHE**, et Monsieur **M. Tir**, maitre de conférence à l'université Yahia fares de Médéa pour leurs aides et leurs orientations; sans oublier Monsieur **M.BOURAHMOUNE** ingénieur de laboratoire de stérilité de complexe Antibiotecal de Médéa; je le remercie vivement pour sa disponibilité.

, **M. IGUEROIDA** Professeur à l'université Abderahmane Mira de Bejaia de tous les conseils et orientations qu'il m'a digués

Merci à tous, Merci à mon père et mes frères et sœurs et mes amies, pour avoir toujours été là, disponible tout le temps. Mille

mercis seraient trop peu, bien que je sache que pour vous ce n'est que du bonheur .

# Sommaire

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des abréviations**

**Introduction** ..... 15

## **Chapitre I : Généralités sur les cyanobactéries et la *Spiruline***

I.1. Les cyanobactéries..... 18

I.1.1. Approche historique des cyanobactéries ..... 18

I.1.2. Ecologie et biologie des cyanobactéries ..... 19

I.1.3. Reproduction des cyanobactéries ..... 20

I.1.4. Toxicité des cyanobactéries ..... 20

I.2. Généralités sur la *Spiruline* ..... 21

I.2.1. Historique sur la *Spiruline* ..... 21

I.2.2. Biologie et Morphologie de la *Spiruline* ..... 22

I.2.3. Le genre *Arthrospira platensis* ..... 23

I.2.3.1. Taxonomie ..... 24

I.2.3.2. Position taxonomique de la *Spiruline* dans le monde  
du vivant ..... 25

I.2.4. Toxicité de la *Spiruline*..... 25

I.2.5. Reproduction de la *Spiruline* ..... 26

I.2.6. Composition chimique de la *Spiruline* ..... 27

I.2.6.1. Les protéines ..... 27

I.2.6.2. Les glucides ..... 27

I.2.6.3. Les lipides..... 27

I.2.6.4. Les vitamines ..... 27

I.2.6.5. Les minéraux et Oligoéléments..... 27

I.2.6.6. Les pigments..... 27

I.2.7. Usages de la *Spiruline* ..... 27

I.2.7.1. Approche nutritionnelle..... 28

I.2.7.2. Approche thérapeutique ..... 29

I.2.7.3. Aquaculture et aquariophile ..... 29

I.2.8. Etude écologique..... 30

I.2.8.1. Culture de la *Spiruline* ..... 30

I.2.8.2. Distribution géographique ..... 30

I.2.8.3. Milieu et conditions de croissance ..... 30

**Chapitre II : Métabolisme de photosynthèse**

II.1. Les microorganismes photosynthétiques .....	32
II.2. Métabolisme de la photosynthèse des micro-algues .....	32
II.3. Organisation et fonction du complexe supramoléculaire .....	33
II.4. Membrane photosynthétique .....	33
II.5. Pigments photosynthétiques .....	35
II.5.1. La chlorophylle .....	35
II.5.2. Les caroténoïdes .....	35
II.5.3. Les phycocyanines .....	36
II.5.4. Photosystème II .....	36
II.6. Centre réactionnel et complexe LHC-II .....	37
II.7. La plasto-quinone .....	38
II.8. Cytochrome b6/f .....	39
II.9. Plastocyanine et Cyt c 553 .....	39
II.10. Photosystème PSI .....	40
II.11. ATP synthétase .....	41
II.12. Flux d'électrons photosynthétique .....	42
II.13. Régulation de la photosynthèse et de la respiration .....	43
II 14 Réaction en l'absence de lumière .....	44

**Chapitre III. Procédés de production de biomasse algale**

III.1. la production de biomasse algale .....	46
III.1.1. Systèmes ouverts (bassins ouverts) .....	46
III.1.2. Systèmes clos (photo-bio-réacteurs) .....	47
III.2. Formes géométriques des PBR les plus utilisés .....	48
A/ Critères de conception des photo-bio-réacteurs .....	48
A/1. Matériaux de construction .....	48
A/2. Orientation et Inclinaison .....	48
A/3. Rapport surface/volume.....	49
A/4. Changement d'échelle et de taille des photo-bio-réacteurs ....	49
A/5. Productivité des photo-bio-réacteurs .....	50
B/ Principaux facteurs influençant la croissance et la productivité....	50
B/1. Eclairage.....	50
B/2. Agitation et homogénéisation.....	51
B/3. Régulation des facteurs physiologiques .....	52
B/3.1. Contrôle du pH.....	52
B/3.2. Contrôle de la température .....	52
B/3.3. Concentration de biomasse .....	53
B/3.4. Échange de gaz.....	53

**Chapitre IV : Production d'hydrogène**

IV. Utilisation de l'énergie et voies de production .....	55
IV.1. La bioénergie .....	55

IV.2. Pourquoi l'hydrogène ?.....	55
IV.2.1. Le vapo-reformage .....	56
IV.2.2. L'oxydation partielle .....	56
IV.2.3. Le reformage auto-thermique .....	57
IV.2.4. La gazéification du charbon .....	57
IV.2.5. La décomposition de l'eau .....	57
A/ Electrolyse chimique .....	57
B/ Dissociation par cycle thermo-chimique .....	58
IV.3. La bio-production d'hydrogène .....	58
IV.3.1. L'hydrogénase.....	58
A/ Hydrogénase à fer .....	59
B/ Hydrogénase à nickel- fer ou nickel- fer- sélénium .....	59
IV.3.2. La nitrogénase.....	59
IV.3.3. Bio-photolyse directe .....	60
IV.3.4. Bio-photolyse indirecte.....	60
IV.3.5. Photo-fermentation. ....	61
IV.3.6. Fermentation à l'obscurité.....	62
IV.4. Pourquoi la Spiruline ? .....	63
IV.4.1. Physiologie de production d'hydrogène chez <i>Arthrospira platensis</i> .....	64
A/ Métabolisme biochimique .....	64
B/ Mécanisme de production d'hydrogène .....	64
C/ Facteurs influençant la production d'hydrogène.....	65
IV.5. Amélioration de la production d'hydrogène.....	66
IV.5.1. Amélioration génétique .....	66
IV.5.2. Effet de Micronutriments .....	67
IV.5.3. Les photo-bio-réacteurs .....	67
<b>Chapitre V : Matériels et Méthodes</b>	
V.1. Production de biomasse .....	69
V.1.1. La souche de <i>Spiruline</i> .....	69
V.1.2. Isolement de la <i>Spiruline</i> en cultures pures.....	69
V.1.3. Culture de la <i>Spiruline</i> au laboratoire.....	70
V.1.4. Préparation du milieu de culture .....	71
V.1.5. Caractérisation de la souche utilisée.....	73
V.1.5.1 Caractérisation morphologique .....	73
A/ Etat frais.....	73
B/ Coloration de Gram.....	74
V.1.5.2. Détermination du poids sec.....	75
V.1.5.3. Détermination du paramètre cinétique de croissance.....	76
V.1.6. Croissance de spiruline sur différentes formes de photo- bio-réacteurs.....	76
V.2. Configuration géométrique du photo-bio-réacteur classique.....	77

V.2.1. Le PBR cylindrique .....	78
V.2.2. La forme conique .....	78
V.2.3. Intensité lumineuse .....	79
V.2.4. Nouvelle conception de photo-bio-réacteur .....	79
V.3. Procédés expérimentaux d'optimisation de la culture .....	81
V.4. Bio-production d'hydrogène .....	84
V.4.1. Influence de la géométrie des photo-bio-réacteurs sur la production d'hydrogène .....	84
A/ Photo-bio-réacteur cylindrique .....	84
B/ Photo-bio-réacteur de type annulaire .....	84
V.4.2. Protocole expérimental de fermentation .....	84
V.4.3. Analyse d'hydrogène.....	86
V.4.4. Effet de la concentration de biomasse sur la bio-production d'hydrogène.....	86
V.4.5. Effet de l'âge de la souche.....	87
V.4.6. Effet de la concentration en NaCl .....	87
V.4.7. Effet de la température.....	87
V.4.8. Influence du pH .....	87
V.4.9. Effet de la concentration en bicarbonate de sodium.....	88
V.4.10. Effet de l'intensité lumineuse .....	88
V.5. Détermination des teneurs en chlorophylle .....	88
 <b>Chapitre VI : Résultats et discussions</b>	
VI. 1. Isolement de spiruline et production des cultures axéniques.....	89
VI.2. Caractérisation morphologique de la spiruline .....	89
VI.3. Détermination du poids sec de biomasse et courbe étalon .....	90
VI.4. Optimisation de la production de biomasse .....	91
VI.4.1. Effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de croissance.....	92
A/ Photo-bioréacteur conique .....	92
B/ PBR cylindrique.....	93
VI.4.2. Influence de l'intensité lumineuse sur le comportement de la souche.....	97
VI.4.3. Méthode d'optimisation en plan d'expérience.....	98
VI.4.3.1. Ajustement de l'équation polynomiale d'ordre 2 et analyse de variance (ANOVA).....	98
VI.4.3.2. Méthode surface de réponse, Effet des variables indépendantes sur la réponse.....	104
A/ Productivité volumétrique.....	105
B/ Taux de croissance .....	107
VI.5. Production d'hydrogène par la <i>Spiruline</i> .....	111
VI.5.1. Etalonnage du chromatographie.....	111

VI.5.2. Optimisation des paramètres du milieu de culture .....	112
A/ Effet de la concentration de la biomasse sur la production d'hydrogène.....	112
B/ Influence de l'âge de la souche sur la production d'hydrogène....	114
C/ Effet de la concentration en NaCl sur la production d'hydrogène...	115
D/ Influence de la température sur la production d'hydrogène.....	117
E/ Effet de pH sur la production d'hydrogène.....	117
F/ Influence de la concentration en $\text{NaHCO}_3$ sur la production d'hydrogène.....	118
G/ Effet de l'intensité lumineuse et de la concentration de biomasse Sur la production d'hydrogène.....	120
H/ Etude comparative sur la production d'hydrogène .....	121
H.1/ Effet de la géométrie de PBR.....	121
H.2/ Effet de la densité de culture.....	122
VI.6 Composition de <i>Spiruline</i> en chlorophylle.....	124
<b>Conclusions générales .....</b>	<b>126</b>
<b>Référence bibliographique.....</b>	<b>128</b>

## Liste des tableaux :

<b>Tableau I.1.</b> : Taxonomie récapitulative de la piruline .....	25
<b>Tableau II.1.</b> Capacité approximative et sources probables de limitation du taux de transfert d'électrons photosynthétique et respiratoire chez <i>Synochocystis</i> sp. 6903.....	44
<b>Tableau IV.1</b> : Avantages et inconvénients des différents processus biologiques d'obtention d'H <sub>2</sub> .....	63
<b>Tableau V.1</b> : Milieu de culture Zarrouk .....	72
<b>Tableau V.2</b> : Composition de la solution A5 .....	72
<b>Tableau V.3</b> : Composition de la solution B6 .....	73
<b>Tableau V.4</b> : Paramètres expérimentaux des deux photo-bio-réacteurs cylindrique et conique. ....	77
<b>Tableau V.5</b> : Performance des photo-bio-réacteurs conçus.....	80
<b>Tableau V.6</b> : Gammes et niveaux de variables expérimentales testés dans la conception CCD .....	82
<b>Tableau V.7</b> : Conception expérimentale pour l'optimisation de la production de biomasse et le taux de croissance.....	83
<b>Tableau VI.1</b> : Résultat de conception expérimentale pour l'optimisation de la production de biomasse et le taux de croissance.....	99
<b>Tableau VI.2</b> : Analyse de variance (ANOVA) pour le modèle de La productivité.....	100
<b>Tableau VI.3</b> : Analyse de variance (ANOVA) pour le modèle de taux de croissance.....	100
<b>Tableau VI.4</b> : Estimation des coefficients du modèle de productivité.....	100
<b>Tableau VI.5</b> : Estimation des coefficients du modèle de taux de croissance.	101
<b>Tableau VI.6.</b> Comparaison des productions de biomasse.....	110
<b>Tableau VI.7.</b> Comparaison de différents systèmes de culture .....	111
<b>Tableau VI.8.</b> Volume d'hydrogène produit sur les trois photo-bio-réacteurs.	122
<b>Tableau VI.9.</b> Taux de production d'H <sub>2</sub> rapporté dans la littérature pour différents systèmes de production phototrophique.....	124

**Liste des figures :**

<b>Figure I.1 :</b> Formation de chloroplaste .....	18
<b>Figure I.2. :</b> Observation au microscope optique des filaments de <i>Spiruline</i> ..	22
<b>Figure I.3.</b> Morphologies typiques des <i>Arthrospira</i> .....	23
<b>Figure I.4 :</b> Cycle biologique de la <i>Spiruline</i> .....	26
<b>Figure II.1 :</b> Principaux produits de réactions lumière et obscurité de la photosynthèse .....	33
<b>Figure II.2 :</b> a) Micrographie électronique d' <i>Arthrospira platensis</i> en coupe transversale., b) Présentation des membranes et des compartiments dans une cellule de cyanobactérie (t) thylakoïdes, (tf) zones exemptes de thylakoïdes, (r) ribosomes, (l) gouttelettes lipidiques, (cs) carboxysomes et (cb) corps cylindrique. Barre égale 0,5 µm .....	34
<b>Figure II.3 :</b> Vue simplifiée de la constitution de la membrane photosynthétique des plantes supérieures avec ses constituants principaux: PSI, PSII, cytochrome b6f et l'ATP synthétase par David Joly, UQTR.....	34
<b>Figure II.4 :</b> Structures des trois principaux groupes de pigments dans les algues et les cyanobactéries .....	35
<b>Figure II.5. :</b> Structure et assemblage des sous unités de photosystème PS II chez les cyanobactéries et les plantes .....	36
<b>Figure II.6. :</b> Structure générale et assemblage de PSI .....	40
<b>Figure II.7 :</b> Schéma du transport cyclique des électrons. P680 : PS II, PQ : plasto-quinone, PC : plasto-cyanine, Cyt b6/f : cytochrome b6/f , PS700 : PS I, Fd : ferrédoxine.....	41
<b>Figure II.8. :</b> Schéma 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 .....	45
<b>Figure III.1 :</b> Schéma d'un raceway et des flux associés à son fonctionnement .....	46
<b>Figure III.2</b> Orientation et inclination des photo-bio-réacteurs .....	48
<b>Figure III.3:</b> Représentation schématique de l'atténuation de la lumière en fonction de l'épaisseur de culture de micro-algues .....	51
<b>Figure IV.1:</b> Modes de production de l'hydrogène .....	56
<b>Figure IV.2 :</b> Procédé de vapo-reformage .....	57
<b>Figure IV .3 :</b> Représentation schématique de cycle soufre- iode .....	58
<b>Figure IV.4 :</b> Structure moléculaire d'enzymes à Fe (gauche) et à Ni-Fe(droite).....	59
<b>Figure IV.5 :</b> La bio-photolyse directe ..	60
<b>Figure IV.6 :</b> Bio-photolyse indirecte .....	61
<b>Figure IV.7 :</b> La photo-fermentation ..	62

<b>Figure IV 8</b> : Hydrogène produit par fermentation à l'obscurité .....	62
<b>Figure IV9</b> : Chemins de bio-production d'hydrogène chez cyanobactéries....	65
<b>Figure V.1</b> : Entretien de la souche et mise en route d'une culture .....	71
<b>Figure V.2</b> : Préparation de la lame à l'état frais.....	74
<b>Figure V.3</b> : Calcul des surfaces spécifiques des trois photo-bio-réacteurs.	77
<b>Figure V.4</b> :PBR cylindrique 18, 250 et 500ml.....	78
<b>Figure V.5</b> : photo bioréacteur coniques et tube a essai.....	79
<b>Figure V.6</b> : Schéma du PBR de conception nouvelle. ....	80
<b>Figure V.7</b> : Barbotage à l'azote. ....	85
<b>Figure V.8</b> : Schéma de récupération d'H <sub>2</sub> . ....	86
<b>Figure VI.1</b> : Image microscopique à l'état frais.....	89
<b>Figure VI.2</b> : Coloration de Gram. Grossissement × 400. ....	89
<b>Figure VI.3</b> : Courbe étalon des différentes cultures. ....	91
<b>Figure VI.4</b> : Optimisation à l'ancienne. ....	92
<b>Figure VI.5</b> : Cinétique de croissance de la <i>Spiruline</i> . PBR 250 mL .....	93
<b>Figure VI.6</b> : Cinétique de croissance de la <i>Spiruline</i> . PBR 500 mL.....	93
<b>Figure VI.7</b> : Cinétique de croissance de la <i>Spiruline</i> . Tube à essai de 18 mL.	94
<b>Figure VI.8</b> : Cinétique de croissance de la <i>Spiruline</i> . PBR 250 mL.....	94
<b>Figure VI.9</b> : Cinétique de croissance de la <i>Spiruline</i> . PBR 500 mL.....	95
<b>Figure VI.10</b> : Effet de l'intensité lumineuse sur la productivité et la vitesse de croissance.....	96
<b>Figure VI.11</b> : Comportement de la souche vis-à-vis de l'intensité lumineuse.....	97
<b>Figure VI.12</b> : Courbes de régression linéaires relatives aux modèles. (a) productivité, (b) taux de croissance.....	102
<b>Figure VI.13</b> : Courbe de probabilité normale des résidus, (a) Productivité et (b) taux de croissance.....	103
<b>Figure VI.14</b> : Représentation graphique des effets relatifs à la productivité et au taux de croissance selon l'analyse de Pareto. ....	104
<b>Figure VI.15</b> : Courbes d'iso-réponses de productivité. (a) X <sub>3</sub> = Constante, (b) X <sub>1</sub> = 0 et (c) X <sub>2</sub> = 0.....	106
<b>Figure VI.16</b> : Courbes d'iso-réponses du taux de croissance, (a) X <sub>3</sub> = Constante, (b) X <sub>1</sub> = 0 et (c) X <sub>2</sub> = 0. ....	108
<b>Figure VI.17</b> : Chromatogramme du mélange gazeux 25- 75 % H <sub>2</sub> - N <sub>2</sub> . t = 1,47 min, H <sub>2</sub> . ....	112
<b>Figure VI.18</b> : Hydrogène produit pour différentes concentrations de Biomasse.....	113
<b>Figure VI.19</b> : Effet de la concentration de biomasse sur le taux de production d'hydrogène.....	114
<b>Figure VI.20</b> : Production d'hydrogène en fonction de l'âge de la souche de <i>Spiruline</i> .....	115

<b>Figure VI.21</b> : Production d'hydrogène en fermentation et en photo-fermentation en fonction de la concentration du NaCl.....	116
<b>Figure VI.22</b> : Production d'hydrogène en photo-fermentation en fonction de la température.....	117
<b>Figure VI.23</b> : Effet du pH sur la production d'hydrogène en photo-fermentation.....	118
<b>Figure VI.24</b> : Les différentes espèces de carbone inorganique disponible en Fonction du pH du milieu.....	119
<b>Figure VI.25</b> : Production d'hydrogène en photo-fermentation en fonction de la concentration en NaHCO <sub>3</sub> .....	120
<b>Figure VI.26</b> : Optimums de production d'hydrogène. Effet de l'intensité lumineuse et de la concentration de biomasse.....	121
<b>Figure VI.27</b> : Taux de production d'H <sub>2</sub> . Effet de la géométrie des PBR.	122
<b>Figure VI.28</b> : Effet de la densité des cultures et de l'intensité lumineuse sur l'évolution d'H <sub>2</sub> .....	123
<b>Figure VI.29</b> : Effet de la densité des cultures et de l'intensité lumineuse sur la composition de <i>Spiruline</i> en chlorophylle .....	125

## Liste d'abréviations

ADN	:	Acide-Désoxyribo- Nucléique
Ala	:	Alanine
ATP	:	Adénosine Tri-Phosphate
ADP	:	Adénosine Di-phosphate
ARNt	:	Acide Ribonucléique de transport
Chl	:	Chlorophylle
Co	:	Cobalt
Cu	:	Cuivre
DCMU	:	34-Dichlorophénol- 1, & diMethyl Urée
DNID	:	Diabète Mono Insulino Dépendant
Fe	:	Fer
Fd	:	Ferrédoxine
g	:	Gramme
hV	:	Energie photonique
H <sub>2</sub> ase	:	Hydrogénase
I	:	Intensité lumineuse
KJ	:	Kilo joules
KW	:	Kilo watt
L	:	Litre
m	:	Mètre
mg	:	Milli Gramme
min	:	Minute
mL	:	Milli Litre
mM	:	Milli molaire
Mo	:	Molybdate
NADPH <sub>2</sub>	:	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
Ni	:	Nickel
PBR	:	Photo-Bio-Réacteur
PC	:	Plastocyanine
Pi	:	Phosphate inorganique
PSI	:	Photo-Système I
Pv	:	Productivité volumique
PQ	:	Plastoquinone
QA	:	Plastoquinone A
QB	:	Plastoquinone B
REP	:	Rapport d'efficacité protéique
S	:	Seconde
S/V	:	Rapport Surface sur Volume
X <sub>0</sub>	:	Inoculum de départ
Y	:	Rendement de culture
Zn	:	Zinc
μmol/L/J	:	Micro mole par litre par jour
φ	:	Diamètre

## Introduction

À l'heure actuelle, les combustibles fossiles sont considérés comme source majeure d'énergie. Cependant l'épuisement de leurs réserves et la pollution qu'ils génèrent font une priorité de recherche de ressources énergétiques alternatives. L'hydrogène moléculaire, vecteur énergétique alternatif et sans incidence sur l'environnement, pourrait les compléter voire même les remplacer dans un futur proche. Toutefois, à l'heure actuelle, une partie importante d'hydrogène est produite par transformation thermo-chimique de combustibles fossiles ou à partir de l'eau par voie électrochimique.

Il va sans dire que la photo-conversion de l'eau en hydrogène, à partir de micro-organismes photosynthétiques est considérée comme la solution préférable. Parmi les organismes photosynthétiques oxygénés, de nombreuses espèces de micro-algues et de cyanobactéries sont capables de produire de l'hydrogène grâce à l'activité d'une hydrogénase. De nombreuses recherches scientifiques ont été réalisées sur l'utilisation de l'énergie solaire pour la photo-production d'hydrogène par les voies photo-biologiques [1, 2]

*Arthrospira maxima* est un candidat intéressant pour la production d'hydrogène à grande échelle parce que : *i*) ces espèces conduisent à une production élevée de biomasse; *ii*) dans la nature, elles se propagent avec une contamination microbienne parasitaire minimale, en raison de sa niche écologique dans les milieux alcalins carbonatés concentrés et *iii*) ses longs filaments sont flottants et se prêtent facilement à la récolte et au transfert de milieux [3]

Par ailleurs, la production de *Spiruline* est un domaine de recherche important et très attractif pour de nombreuses industries, particulièrement: l'industrie alimentaire et pharmaceutique. *Arthrospira platensis*, algue bleu-verte contenant des quantités élevées de protéines équilibrées et un large éventail de nutraceutiques abondantes, est l'une des micro-algues les plus prometteuses sur le marché depuis le succès de sa production commerciale dans les étangs ouverts dans les années 1980.

Dans les cultures ouvertes et fermées, la croissance des micro-algues est considérablement influencée par les conditions de culture, y compris le pH, l'intensité lumineuse, la température, la présence d'ions bicarbonate, la source d'azote, le type de bioréacteur la concentration initiale de biomasse,... En outre, une limitation majeure de la croissance des micro-algues est la disponibilité de la lumière. Idéalement [4], la lumière doit être répartie de manière homogène sur tout le volume de l'unité de culture. En pratique, ceci n'est pas

toujours obtenu en raison de l'absorption de la lumière par les pigments de micro-algues et de la diffusion de la lumière due aux cellules et à d'autres particules dans la solution de culture. Ainsi, dans les systèmes de culture dense exposés à une forte illumination externe, le volume de culture est reparti en plusieurs zones : une zone de photo-inhibition, de photo-saturation, de photo-limitation de la lumière et d'obscurité[5].

Pour résoudre ce problème, le bioréacteur doit avoir une surface de transfert d'énergie lumineuse élevée, c'est-à-dire un rapport S/V important. Les systèmes de culture de micro-algues actuels comprennent des bassins ouverts peu profonds, les photo-bioréacteurs tubulaires [06,07], les photo-bioréacteurs à plaques plates [08,9], les photo-bioréacteurs à colonnes annulaires[10] et les réacteurs à cuves agités [11, 12].

La croissance en batch se termine le plus souvent par une phase limitante où les facteurs environnementaux influencent beaucoup le taux de croissance et la production de biomasse. Lorsque la concentration de biomasse atteint un seuil supérieur qui dépasse 1 g/L, la diffusion de la lumière est atténuée par l'épaisseur du photo-bioréacteur. Dans le cas des cultures de biomasse plus denses 1- 4 g/L, la distribution de la lumière présente une limite dans tous les types de photo-bioréacteur. Dans ce cas, quelles sont : les surfaces spécifiques, les épaisseurs de PBR et les intensités de lumière d'éclairage de PBR qui permettent de minimiser cette contrainte pratique ?

Donc les défis sont de trouver les conditions physiologiques et physicochimiques du milieu permettant d'améliorer l'efficacité des systèmes et d'optimiser la production de biomasse et d'hydrogène en batch. Les résultats obtenus peuvent servir par la suite aux applications sur des cultures en continu.

Et c'est dans cette optique que s'inscrit cette thèse de Doctorat qu'il s'agisse de l'optimisation par plan d'expériences où la production réelle sur le microorganisme photosynthétique sélectionné pour les besoins d'étude de l' *Arthrospira platensis*. La thèse se compose de six chapitres : le premier chapitre est dédié à une étude bibliographique présentant en premier lieu le microorganisme photosynthétique, la biologie des cyanobactéries et leur toxicité. Le deuxième chapitre est présenté sous forme de fiche signalétique de la *Spiruline* : position taxonomique, composition biochimique, intérêts nutritionnels et thérapeutiques ainsi que mécanismes intracellulaires de la photosynthèse.

**Le** troisième chapitre est consacré aux procédés de production de biomasse algale et les différents paramètres influençant les cultures. Cette partie se termine par un tableau récapitulatif des différents systèmes ainsi que leurs performances et leurs limites.

Dans **Le** chapitre quatre sont présentées les différentes voies de production de l'hydrogène. Une partie de ce chapitre est consacrée au mécanisme d'obtention de H<sub>2</sub> et les facteurs influençant cette production.

**Le** cinquième chapitre regroupe l'ensemble du matériel et méthodes utilisées dans ce travail. Il s'agit entre autre de la caractérisation morphologique, la méthode d'isolement et préparation de cultures, des systèmes de culture utilisés,... la méthodologie par plan d'expérience pour la production de biomasse y est également présenté.

**Le** sixième chapitre concerne l'identification de la souche étudiées, *Spirulina platensis*, la production et l'optimisation par la méthode d'un seul facteur de croissance de la *Spiruline* en plan multifactoriel et on parachève ce chapitre par la production d'hydrogène sur les trois géométries de PBR choisies.

En fin on termine la rédaction de la présente thèse par une conclusion générale où l'on retrouve les principaux résultats de ce modeste travail.

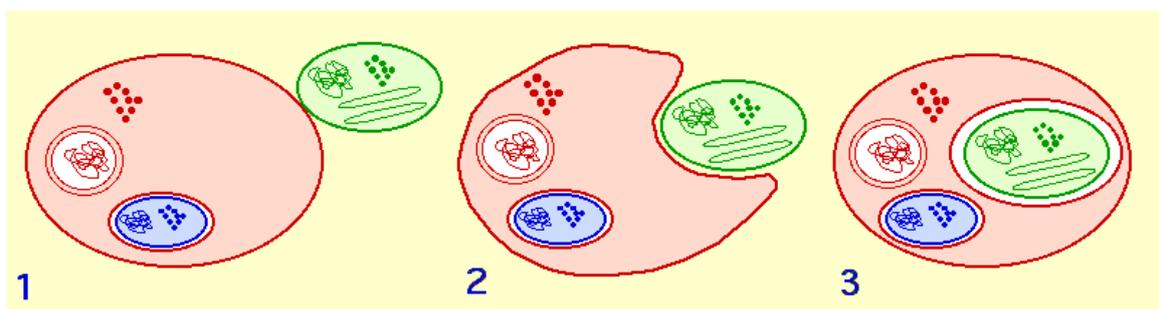
## I.1. Les cyanobactéries

### I.1.1. Approche historique des cyanobactéries

Les cyanobactéries, communément appelées algues bleu-vert, sont des bactéries à Gram négatif, autotrophes, réalisant de la photosynthèse oxydative. Elles sont apparues il y a environ 3.5 milliards d'années et sont, en grande partie, responsables de l'oxygénation de l'atmosphère terrestre [13]. Des traces de cyanobactérie ont déjà été détectées dans des stromatolithes restes des filaments d'algues pétrifiées dans du calcaire - datant de 3.7 milliards d'années, en Afrique du Sud [13]. Elles seraient à l'origine de la majorité des dépôts de calcaires sur la Terre[14]. Leur endo-symbiose par un hôte non photosynthétique est à l'origine du chloroplaste des cellules eucaryotes [15].

Selon la théorie de l'évolution, les endo-symbioses ont pu se réaliser à différents moments et de diverses façons, par absorption par une cellule Eucaryote primitive d'une autre cellule Procaryote. On parle alors d'endo-symbiose primaire [14].

Une cellule eucaryote hétérotrophe absorbe une bactérie photosynthétique, cette bactérie devient un chloroplaste, ses membranes internes ont une origine bactérienne. La membrane externe de l'enveloppe a pour origine la membrane plasmique de la cellule elle-même réalisant ainsi une cellule eucaryote autotrophe. On parle alors d'endo-symbiose secondaire [16]( figureI.1).



**Figure I.1 : Formation de chloroplaste [17].**

On a découvert, dans les années cinquante, que ces organites contenaient de l'ADN et des ribosomes. La ressemblance entre un chloroplaste de cellule eucaryote actuelle et d'une bactérie photosynthétique (Cyanobactérie) est confortée par plusieurs caractères [5].

- L'ADN du chloroplaste est circulaire et non associée à des histones comme chez les bactéries,
- Cet ADN code pour une partie des protéines chloroplastiques (organites semi autonomes),
- Une partie de la synthèse de protéines chloroplastiques s'effectue dans le chloroplaste, grâce à la présence de ribosomes qui présentent des analogies avec les ribosomes bactériens,
- La division des chloroplastes suit un rythme indépendant de la division du noyau.

### **I.1.2. Ecologie et biologie des cyanobactéries**

Les cyanobactéries vivent presque partout, y compris dans des conditions extrêmes, des glaces polaires, sous forme de tapis bactériens de plusieurs centimètres d'épaisseur, aux sables des déserts. Elles survivent dans les lacs très chauds et/ou acides des cratères volcaniques comme dans les geysers. Elles croissent tant en eau douce que salée, sous forme planctonique (vivant dans la masse d'eau), ou sous forme benthique (organismes fixés à un substrat immergé) [18].

Elles se développent particulièrement bien dans certains milieux pollués par les activités humaines (eutrophisation, dystrophisation). Ces proliférations forment des fleurs d'eau de couleur particulière qui apparaissent sur un plan d'eau en voie de pollution. On assiste à ces efflorescences algales quand l'eau contient de l'azote et/ou du phosphore en excès.

L'augmentation en fréquence et en sévérité des épisodes de floraisons d'eau à travers le monde a été associée à l'eutrophisation d'origine anthropique, qui va sans cesse en augmentant. Pour cette raison, lorsqu'on détecte qu'une étendue d'eau est envahie par les cyanobactéries, il ne faut pas considérer l'efflorescence elle-même comme la pollution, mais plutôt comme une réaction naturelle à une pollution déjà présente [19].

Certaines cyanobactéries sont mobiles, bien que dépourvues de flagelles et de cils vibratiles, notamment chez les *Nostocales*. Quand elles sont soumises à des stress, elles peuvent alors produire des akinètes, résistant à la déshydratation grâce à des parois épaissies.

On a observé des fragments de colonie s'en éloignant à une vitesse de 10  $\mu\text{m/s}$ . Certaines colonies emprisonnent des bulles qui les font flotter et leur permettent d'être emportées par le courant. Certaines cyanobactéries sont parfois animées de mouvements saccadés. D'autres sont mobiles en glissant ou en pivotant, semble-t-il au moyen d'ondes de contraction. Certaines espèces produisent des vésicules gazeuses leur permettant de monter ou de descendre dans la colonne d'eau, et de coloniser la surface de l'eau au détriment d'autres espèces quand les conditions leur sont favorables (eaux calmes, chaleur, ... etc.). C'est l'origine de certains *blooms* planctoniques [20].

Les cyanobactéries sont regroupés parmi les oxyphotobactéries qui réalisent la photosynthèse oxygénique et peuvent donc transformer l'énergie solaire en énergie chimique utilisable par la cellule et ce en fixant le dioxyde de carbone et en libérant du dioxygène. Certaines d'entre elles peuvent dans certaines conditions fixer le diazote. Elles sont capables de consommer le carbone organique présent dans leur environnement.

### **I.1.3. Reproduction des cyanobactéries**

La croissance des cyanobactéries est de type *slow growth*. Les temps de doublement des populations varient de quelques heures à plusieurs jours. Ils dépendent essentiellement des espèces et des conditions environnementales. La reproduction est végétative, c'est à dire asexuée et s'effectue par scission simple ou multiple, par bourgeonnement ou encore par fragmentation de filament. Chez certaines espèces, des cellules spécialisées (akinètes) peuvent résister à la dessiccation puis "germer" lorsque les conditions redeviennent favorables [21].

### **I.1.4. Toxicité des cyanobactéries**

De nombreuses cyanobactéries produisent des cyanotoxines qui agissent sur différents organes humains et animaux. Lorsque la période de floraison est en progression, on retrouve très peu de toxines extracellulaires alors que vers le déclin de celles-ci, les cellules meurent, libérant leurs toxines dans leur environnement. La concentration de toxines extracellulaires augmente énormément [22,23]. 50 % des efflorescences algales libèrent des endotoxines potentiellement toxiques. Elles affectent principalement la peau et les muqueuses, le foie et le système nerveux [24].

Le classement de la toxicité aiguë des cyanotoxines, établi d'après les valeurs de DL50, place les microcystines parmi les substances biologiques très toxiques, mais on a récemment constaté que certaines des toxines produites sont très stables, s'accumulent dans le cerveau et peuvent conduire à la mort par neurotoxicité après des décennies d'exposition chronique [25].

## **I.2. Généralités sur la Spiruline**

### **I.2.1. Historique sur la Spiruline**

Les cyanobactéries, cyanobiontes ou encore cyanophycées selon les préférences, sont la famille d'algues bleue-vertes à laquelle appartient la Spiruline, laquelle elle-même peut être indifféremment appelée *Arthrospira sp.*, *Spirulina sp.*, *Spirulina platensis* ou *Arthrospira platensis*. C'est une cyanobactérie filamenteuse plus connue sous le nom de Spiruline. Elle a été utilisée traditionnellement depuis plusieurs centaines d'années par des populations primitives d'Afrique et du Mexique [14]. Depuis, on a su par les archives mexicaines que la Spiruline était consommée du temps des Aztèques bien avant l'arrivée des Espagnols, sous le nom de Tecuitlatl [26].

La spiruline, bien que déjà décrite par Wittrock et Nordstedt (1844)[27] ne fut vraiment découverte qu'en 1940 au Tchad par un botaniste français du nom de Dangeard. Les Kanembous, tribu du Tchad, la consomment encore de nos jours sous le nom de Dihé. Depuis la mise en place de la culture en masse des micro-algues à la fin des années 50, elle connaît un regain de popularité pour l'alimentation humaine [22].

La première exploitation industrielle a été réalisée par la société *Sosa Texcoco* basée au Mexique en 1976. Depuis, plusieurs entreprises se sont implantées partout, à l'instar de *Siam Algae Company* à Bangkok en 1979, le plus gros producteur actuel *Earthrise farm* aux Etats-Unis en 1983, *Cyanotech Corporation* à Hawaï, etc. Le conseil supérieur d'hygiène publique en France a donné en 1984, un avis favorable pour la consommation humaine de toutes les algues spirulines [28]. Selon Fox(1999) le nombre d'exploitations industrielles, de part le monde, est au voisinage de la trentaine [22].

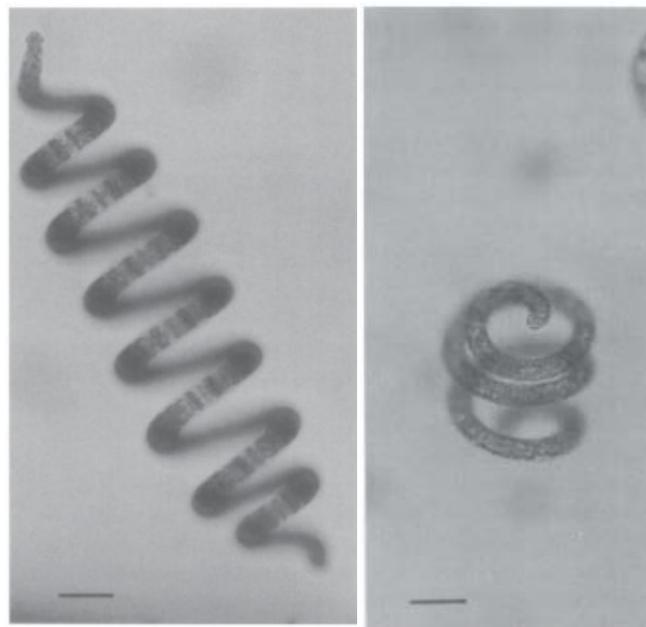
Depuis, les recherches ont beaucoup évolué et on a trouvé de nombreuses applications possibles de la spiruline : diététique, pharmaceutique, environnement et bioénergie [29, 4] .

### I.2.2. Biologie et Morphologie de la Spiruline

La Spiruline est une cyanobactérie, anciennement désignée par le terme « algue bleue » puis cyanophycée. Elle est classée parmi les bactéries Gram négatives. C'est une bactérie autotrophe [30, 31]

La spiruline se présente sous la forme d'un filament pluricellulaire bleu-vert, mobile, non ramifié et enroulé en spirale. Ce filament est appelé trichome, sa forme est hélicoïdale, observable uniquement en milieu liquide. Il est caractéristique du genre d'où la spiruline tient son nom. L'espèce mexicaine *Spirulina maxima* se caractérise par des trichomes de 7 à 9  $\mu$  de diamètre, de 70 à 80  $\mu$  de long, légèrement effilés aux extrémités, formant une spirale régulière de 3 à 8 tours et de 40 à 60  $\mu$  de diamètre [4]. Les cellules constituant les trichomes mesurent 5 à 7  $\mu$  de long et ne rétrécissent pas au niveau des articulations.

L'espèce du Tchad *Spirulina platensis* se compose de trichomes atteignant 350  $\mu$  de long, de 5 à 11  $\mu$  de diamètre, un peu rétrécis au niveau des articulations. Les tours de spire ont un diamètre de 20 à 50  $\mu$ , diminuant légèrement vers les extrémités [18].



a) *Spirulina maxima*

b) *Spirulina platensis*

**Figure I.2.** : Observation au microscope optique des filaments de spiruline [4].

Un caractère d'orientation permet de distinguer morphologiquement entre les deux espèces voisines (figure 2). L'observation microscopique de *Arthrospira platensis*, montre que les

spires sont orientées vers la droite. Cependant chez *Spirulina maxima*, elles sont orientées vers le coté gauche [4, 31].

*Arthrospira platensis* montre une grande plasticité dans la morphologie. Ceci est attribué aux facteurs exogènes comme la température et d'autres facteurs physiques et chimiques ainsi que fort génétiques [31].

On distingue différentes souches ou variétés d'*Arthrospira platensis* : les souches spiralées, ondulées, et droites (Figure 2). Les souches spiralées désignent les souches dont les filaments ont la forme d'une queue de cochon, telles la *Lonar* (Inde). Alors que les souches ondulées font partie des souches dont les filaments sont en spirale étirée, telles la *Paracas* (Pérou). Les souches droites représentent celles dont les filaments sont tellement étirés qu'ils donnent l'impression d'être presque rectilignes.

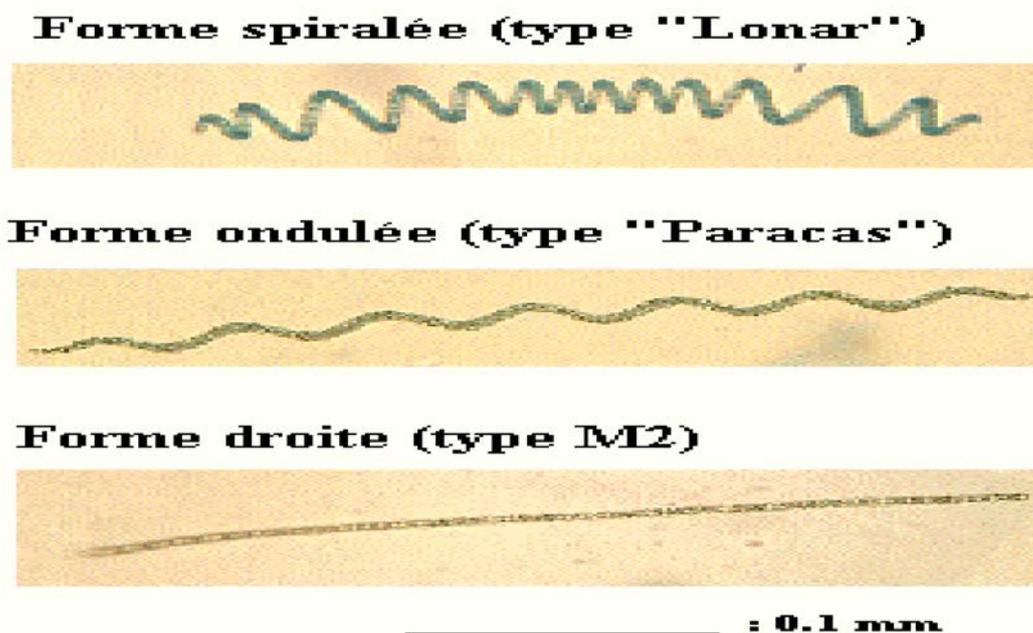


Figure I.3. Morphologies typiques des *Arthrospira*. [32]

### I.2.3. Le genre *Arthrospira platensis*

La spiruline était, à l'origine, considérée comme une algue. Cependant, en 1960, une claire distinction entre procaryote et eucaryote a été définie, basée sur la différence d'organisation cellulaire : les procaryotes regroupent les organismes dépourvus de compartiment cellulaire tandis que les eucaryotes regroupent ceux qui possèdent des organelles c'est à dire des nucléoles et des mitochondries (Durand-Chastel 1993) [33].

En 1962, Stanier et al (Stanier (1974) [34], Stanier, Van Niel C. B.(1962) [35]) constataient que cette algue bleu-verte était dépourvue de compartiments cellulaires, et donc faisait partie des procaryotes. Ils proposaient de désigner ce microorganisme «Cyanobactérie». Cette nouvelle désignation est finalement acceptée et figure pour la première fois au *Bergey manuel*.

Le terme Spiruline correspond au nom commercial d'une espèce de cyanobactérie alimentaire appartenant toujours au genre *Arthrospira*. Le mot *Spirulina* est le nom commercial anglophone de la spiruline, mais il désigne également un genre de cyanobactérie assez éloigné de *Arthrospira*, et surtout non comestible (*Spirulina major*, *Spirulina subtilissima*, *Spirulina princeps*, *Spirulina gigantea*, *Spirulina subsalsa*) [ 36, 37].

La Comparaison avec les séquences d'ARNr 16S connues pour d'autres cyanobactéries a révélé que *Arthrospira* n'est pas aussi étroitement lié à *Spirulina* comme on a souvent pensé dans le passé, mais appartient à un groupe constituant *Oscillatoria*, *Lyngbya* et *Microcoleus*, tandis que *Spirulina* présentait une similitude avec les cyanobactéries unicellulaires[38].

La souche *Spirulina* PCC 6313 appartient à une ramification contenant des cyanobactéries unicellulaires. Pour les deux souches d'*Arthrospira*, la région ITS séquentielle contient les gènes ARNt-Ile et ARNt-Ala, alors que la région d'espacement de la souche *Spirulina* PCC 6313 ne contient que le gène ARNt-Ile [38].

### **I.2.3.1. Taxonomie**

Le nom commun, spiruline, se réfère à la biomasse séchée de *A. platensis* [22] qui appartient à la bactérie photosynthétique oxygénée qui couvre les Cyanobactéries et les Prochlorales. Ces organismes photosynthétiques, ont d'abord été considérés comme des algues jusqu'en 1962. Stanier et coauteurs constataient que cette algue bleu-verte était dépourvue de compartiment cellulaire et l'appelaient, pour la première fois, cyanobactérie. Cette désignation a été acceptée et publiée en 1974 par le Manuel de *Bergey* [34]. Par ailleurs, il existe bien une distinction scientifique entre les genres : *Spirulina* et *Arthrospira*. Stizenberger (1852) [39 ], a donné le nom d'*Arthrospira* sur la base de la présence des septes, de la forme hélicoïdale et de la structure multicellulaire. Gomont, a confirmé la forme aseptate du genre *Spirulina*. Et finalement, c'est Geitler qui réunifia les deux membres et les désigna comme *Spirulina* sans considérer le septum. Il a précisé que toutes les recherches scientifiques sur les microalgues ont été effectuée au nom de la *Spiruline* alors que les 34 espèces originales exploitées comme aliments avec d'excellentes propriétés sanitaires appartiennent au genre *Arthrospira* [40].

### I.2.3.2. Position taxonomique de la Spiruline dans le monde du vivants

Sa position taxonomique a été décrite par Ripley Fox (1999) comme appartenant au règne Monera, groupe ou sous règne Procaryotes, à l'embranchement des Cyanophyta, à la Classe des Cyanophyceae, Ordre des Nostocales et la famille des Oscillatorriaceae[22].

Les Oscillatoriaceae se caractérisent par des trichomes cylindriques, unisériées, simples, atténués parfois à l'apex par une courbure ou par la présence d'une coiffe, mais jamais en poils articulés. Les trichomes sont nus ou pourvus d'une gaine. Il n'y a pas de ramification et pas d'hétérocyste[4].

Les trichomes sont libres, solitaires et dépourvus de gaine. Ils sont droits ou flexueux, parfois tordus en une hélice régulière et composés de deux sous genre (spirulina, arthrospira) sous le genre Arthrospira. Dans les observations au microscope, le trichome est de grande taille et les cloisons sont bien marquées chez les espèce arthrospira platensis [4].

**Tableau I.1.** : Taxonomie récapitulative de la Spiruline [22].

Règne	Monera ou Bacteria
Sous-règne	Prokaryota
Phylum ou Division	Cyanophyta ou Cyanobacteria
Classe	Cyanophyceae
Ordre	Oscillatoriales
Famille	Oscillatoriaceae
Genre	<i>Arthrospira</i>
Espèce	<i>A platensis</i>

### I.2.4. Toxicité de la Spiruline

La Spiruline n'est pas toxique car elle n'a pas les gènes qui assurent la synthèse des toxines de cyanobactéries[10]. Des tests d'alimentation indépendants en France, au Mexique et le au Japon n'ont pas montré de des résultats inattendus et aucun cas avéré d'intoxication par la Spiruline n'a été rapporté sur les humains, les rats, les porcs, les poulets, les poissons et les huîtres. [22]

Malgré que ce micro-organisme en termes généraux ne dépasse pas les limites de concentration en métaux recommandées par les organismes internationaux, le contrôle de la

qualité optimale de l'environnement et le suivi périodique de cette culture des cyanobactéries est nécessaire pour détecter les concentrations élevées de métaux en raison de l'utilisation d'engrais et de la possibilité de pollution de l'eau [41].

### I.2.5. Reproduction de la Spiruline

La reproduction est végétative, c'est à dire asexuée, et s'effectue par scission simple, par fragmentation de filament. Le cycle biologique de la Spiruline selon Ciferri [42] passe par les étapes suivantes (Figure I.4) : un filament en maturité forme des cellules spéciales appelées nécridies, au niveau de ces cellules le trichome se fragmente. Les cellules nécrologiques se distinguent par leur forme biconcavante et le manque de pigments. Après fragmentation de filament, les cellules ou les chaînes courtes de cellules environ 2-8 cellule, les cellules fragmentées deviennent par division successive ce que n' appelle une "hormogonie", [42, 43]. Ces dernières sont très mobiles et donnent naissance à un nouveau trichome par fission binaire. Elles croissent en longueur et prennent la forme typiquement des filaments non ramifiés. Dans les conditions expérimentales, le temps de génération maximal de la spiruline est voisin de 7 h dans le cas où les conditions sont favorables [28].

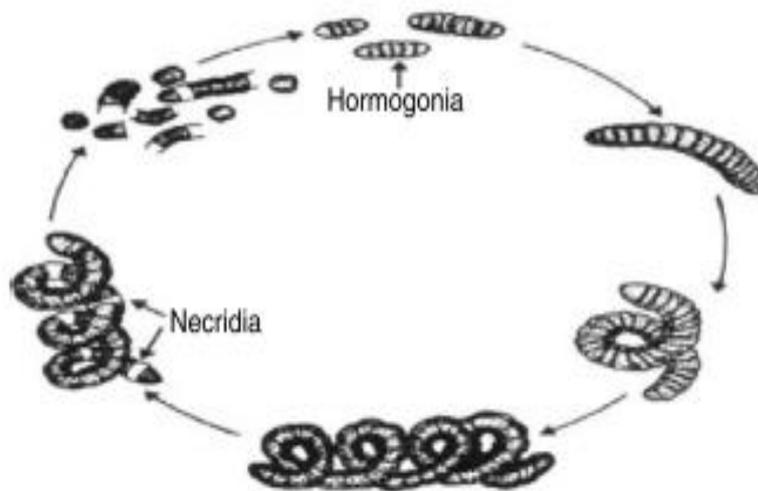


Figure I.4. : Cycle biologique de la Spiruline [42].

## **I.2.6. Composition chimique de la spiruline**

### **I.2.6.1. Les protéines**

La biomasse de la Spiruline contient une teneur en protéines élevée. Elle représente 10 à 11% de la masse humide, soit 60 à 70% de sa matière sèche [44].

### **I.2.6.2. Les glucides**

Les glucides constituent globalement 15 à 25% de la matière sèche des spirulines. L'essentiel des glucides assimilables est constitué de polymères tels que des glucosannes aminés (1.9% du poids sec) et des rhamnosannes aminés (9.7%) ou encore de glycogène (0.5%) [42].

### **I.2.6.3. Les lipides**

La composition en lipides totaux se caractérise par un bon équilibre entre acides gras saturés et acides gras polyinsaturés. La composition des principaux acides gras révèle la présence d'une forte concentration en acides gras essentiels, incluant des oméga-3 et des oméga-6 qui préviendraient l'accumulation de cholestérol dans l'organisme [45].

### **I.2.6.4. Les vitamines**

La Spiruline est une algue vitaminée. Elle est la deuxième source de vitamine B1 après la levure de bière. Elle contient aussi une concentration relativement élevée en provitamine A, vitamine B 12 et  $\beta$ -carotène [46].

### **I.2.6.5. Les minéraux et Oligoéléments**

Les minéraux les plus intéressants chez la Spiruline sont le calcium, le magnésium, le phosphore et le potassium. Les trois premiers minéraux cités sont présents dans la Spiruline à des teneurs comparables à celles trouvées dans le lait. Les oligo-éléments présentant le plus d'intérêts dans la Spiruline sont le fer, zinc et le sélénium [46].

### **I.2.6.6. Les pigments**

La spiruline est riche en pigments responsables de sa couleur, principalement la phycocyanine et la chlorophylle. La phycocyanine représente plus de 15 % du poids frais et plus de 20 % du poids sec de l'algue [47-48]. La chlorophylle est présente en proportion de 9-15 g/kg [47]

## **I.2.7. Usages de la Spiruline**

*Arthrospira* est le procaryote phototrophique le plus cultivé en tant que complément alimentaire, est également utilisé comme source d'aliments pour animaux et de produits

chimiques fins [49]. Il est aussi exploité comme agent thérapeutique selon Belay et ses coauteurs [50].

### **I.2.7.1. Approche nutritionnelle**

La Spiruline est connue pour sa richesse en protéines, qui constituent entre 50 et 70% de son poids sec. Ces protéines ont en plus l'avantage d'être facilement assimilable par l'organisme, ce qui évite l'emploi de la cuisson qui altère les nutriments et les vitamines. Les acides aminés essentiels représentent 47% du poids total des protéines [51].

La digestibilité de la Spiruline est en plus accrue par l'absence de paroi cellulosique dans la cellule, remplacée par une enveloppe de muréine fragile.

L'efficacité protéique, (REP), d'un aliment est déterminée par le rapport : gain de poids de l'animal ou de l'individu par rapport au poids des protéines ingérées. La protéine de référence est souvent le lactalbumine ou bien la caséine, laquelle présente un REP de 2.5. La Spiruline seule, au cours d'expériences menées sur le rat, a un REP de 1.9, tandis qu'accompagné de riz dans une proportion égale, cette valeur s'élève à 2.4 [21].

Les lipides totaux représentent 5.6 à 7% du poids sec de la spiruline, parfois jusqu'à 11% selon le système d'extraction utilisé. Ils se subdivisent en fraction saponifiable (83%) et en fraction insaponifiable (17%). Les acides gras font partie de la première fraction : l'acide  $\alpha$ -linoléique en constitue 10 à 20% chez *Spirulina maxima* et jusqu'à 40% chez *Spirulina platensis*, soit jusqu'à 1.6-3.5% de son poids sec total [52]. La Spiruline figure ainsi parmi les meilleures sources d'acide gras essentiel, avec quelques huiles végétales peu connues, telles que l'huile d'onagre, de bourrache, de cassis.

Rappelons que ces acides gras sont des précurseurs des prostaglandines qui jouent le rôle de médiateurs chimiques dans les réactions inflammatoires et immunitaires. Une déficience prolongée en ces acides gras peut être à l'origine de thrombose, d'arthrite, d'accidents vasculaires cardiaques et cérébraux [53]. Parmi les éléments minéraux contenus dans la Spiruline, le fer est sans doute le plus parlant. Les carences en fer à l'origine de l'anémie sont très répandues, surtout chez les femmes enceintes et les enfants, et lorsque les bonnes sources alimentaires de fer sont rares. Les céréales complètes, classées parmi les meilleures sources de fer, n'en contiennent que 150 à 250 mg par kg. En plus, elles sont riches en acides phytique et en polymères phosphatés qui limitent fortement la biodisponibilité de leur fer. D'autre part, les suppléments sous forme de sulfate ferreux deviennent toxiques à forte dose et causent quelquefois des diarrhées. Dans le cas de la spiruline, la biodisponibilité du fer a été démontrée tant chez le rat que chez l'homme [54,55].

### **I.2.7.2. Approche thérapeutique**

On serait tenté d'affecter à la spiruline une image de potion magique, tellement ses propriétés médicales sont variées. Ce n'est pas moins un remède contre de nombreuses pathologies. Nous ne citerons ici que quelques unes de ces propriétés. Après plusieurs années de recherche pour essayer de comprendre l'origine du cancer, il transparaît aujourd'hui comme étant le résultat d'un processus qui aboutit à la formation de radicaux libres dans l'organisme, suite à l'influence de différents facteurs tels que le stress physique et émotionnel, la pollution, ... etc. Ces radicaux libres peuvent endommager l'ADN, les protéines structurales, les enzymes et les membranes cellulaires et conduire à la formation de produits toxiques et à terme au cancer. Pour éliminer ces radicaux libres, notre organisme a besoin d'apports en vitamines anti-oxydantes, caroténoïdes et autres micro-nutriments. La carotène, présente en quantité très importante dans la spiruline, est l'un des principaux caroténoïdes impliqués dans ce système de défense de l'organisme [56]. Le diabète résulte de troubles au niveau des taux sanguins d'insuline, hormone pancréatique qui permet de transformer le sucre présent dans le sang en énergie. Le diabète de type 1 qui survient à un âge jeune résulte d'un manque d'insuline. Le diabète de type 2 dit non insulino-dépendant (DNID) survenant à l'âge adulte, résulte de l'incapacité de l'organisme à fabriquer l'hormone de manière efficace [57]. C'est le type le plus répandu. Il a été prouvé que la spiruline agit sur ce type de diabète en réduisant le taux sanguin de sucre et de cholestérol. L'ingestion quotidienne de spiruline est recommandée pour le contrôle du taux glyco-lipidique chez les diabétiques [58].

La phycocyanine de la spiruline sont connus pour leur effet immunostimulant, il est aussi utilisée en imagerie médicale comme traceur fluorescent. Une fois purifiée, elle coûte entre 8000 et 40 000 \$ le kilogramme. Ce prix est justifié par la netteté d'image obtenue même sans utiliser de marqueur radioactif [59].

### **I.2.7.3. Aquaculture et aquariophile**

La spiruline n'est pas exclusivement réservée à la consommation humaine. En aquaculture, elle sert notamment à enrichir les granulés pour poissons [60]. Sa présence dans l'alimentation des poissons a des effets que les éleveurs recherchent et apprécient. En aquariophilie, sa première application concerne la pigmentation qu'elle induit chez les poissons par sa richesse en caroténoïdes. Au Japon, ses qualités de pigmentation lui ont valu d'être employé pour la coloration des poissons servant à préparer le sushi, mais aussi des crustacés. D'autre part, sa richesse naturelle en nutriments en fait un complément alimentaire bénéfique pour les poissons tropicaux d'aquarium [61].

## **I.2.8. Etude écologique**

### **I.2.8.1. Culture de la spiruline**

Ce qui distingue le genre *Arthrospira* des autres cyanobactéries, c'est le milieu naturel où elles vivent. En effet, la Spiruline est un organisme ubiquiste et thermophile. Elle est trouvée dans des milieux ayant une concentration de 8,5 à 270 g/L de sel riches en carbonate de sodium, bicarbonate de sodium,... [33]. La Spiruline se développe préférentiellement dans des eaux chaudes tropicales du monde entier, principalement, dans les lacs alcalins d'Afrique autour du Tchad (*Arthrospira platensis*) et d'Amérique dans la vallée de Texcoco au Mexique (*Arthrospira geitleri* ou *Arthrospira maxima*). Elle a des conditions environnementales très contraignantes qui excluent la plupart des autres êtres vivants. De plus, le développement des spirulines dans ces milieux contribue encore à renforcer l'effet d'exclusion, par les trois phénomènes suivants [4,18] :

- Par consommation des carbonates et bicarbonates de son milieu, la spiruline tend à augmenter l'alcalinité de celui-ci ;
- Ses filaments pigmentés et flottants forment un écran qui prive de lumière solaire les rares algues qui pourraient s'accommoder du milieu de culture (exemple de la chlorelle, microalgue comestible pouvant proliférer dans des cultures de spirulines trop peu concentrées) ;
- En sécrétant des molécules qui s'avèrent actives contre une vaste gamme de bactéries.

### **I.2.8.2. Distribution géographique**

A l'état naturel, la spiruline est retrouvée dans des lacs de la ceinture intertropicale du globe terrestre. Ces lacs sont situés approximativement entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud. Ils sont peu profonds et agités par des vents légers. D'autres endroits sont possibles, notamment partout où vivent le flamant nain (*Phoeniconaias minor*) (Afrique et Asie) et le flamant de James (), *Phoenicoparrus jamesi* (Amérique du sud) [17, 22].

### **I.2.8.3. Milieu et conditions de croissance**

Pour développer une culture, la Spiruline a besoin de lumière, d'une eau alcaline, avec un pH allant de 8,5 à 11 (pH optimum de l'ordre de 9,5), riche en azote et en carbone, et d'une température comprise en 25 et 40°C. Elle est produite dans des bassins, dans une eau peu

profonde, brassée en permanence pour assurer une répartition régulière des éléments nutritifs. Une intensité lumineuse élevée sans agitation conduirait à la photolyse des microalgues. Une forte intensité lumineuse conjuguée avec une forte agitation donnera la croissance optimale. A l'inverse, en lumière et agitation faibles, la croissance sera lente, mais la pigmentation plus marquée, c'est-à-dire que la couleur sera d'un vert plus foncé et le bleu de la phycocyanine apparaîtra [4, 18].

### II.1. Les microorganismes photosynthétiques

Les microorganismes photosynthétiques sont des organismes photo-autotrophes. Ils utilisent une source de carbone inorganique et une source de lumière pour se développer. Ils proviennent d'un groupe polyphylétique non issu d'un ancêtre commun direct. Ce groupe comprend les bactéries photosynthétiques et les micro-algues. On en distingue quatre communautés : les algues vertes (eucaryotes), les cyanobactéries, les *chlorobactéries* et les *Rhodobactéries* [62,63].

Il existe plusieurs façons de cultiver des microorganismes photosynthétiques, selon les applications souhaitées. Premièrement, deux modes de cultures sont à distinguer : l'autotrophie et l'hétérotrophie. En présence de la lumière c'est l'autotrophie développée chez le microorganisme photosynthétique qui utilise une source de carbone inorganique tandis qu'à l'obscurité, l'hétérotrophie nécessite une source de carbone organique pour sa croissance. Lorsque les deux sources sont mélangées en présence de lumière, on parle alors de mixotrophie [48].

### II.2. Métabolisme de la photosynthèse des micro-algues

Pratiquement, toutes les formes de vie sur terre dépendent directement ou indirectement de la photosynthèse comme source d'énergie pour leur métabolisme et leur croissance. Les premiers organismes photo-autotrophes, les bactéries photosynthétiques anoxygènes, ont évolué il y'a 3,5 milliards d'années. Ils utilisent de l'énergie lumineuse pour extraire des protons et des électrons d'une variété de molécules donneuses, telles que H<sub>2</sub>O, pour réduire le CO<sub>2</sub> et pour former des molécules organiques. Le processus photosynthétique dans son ensemble peut être décrit par l'équation globale [64]:

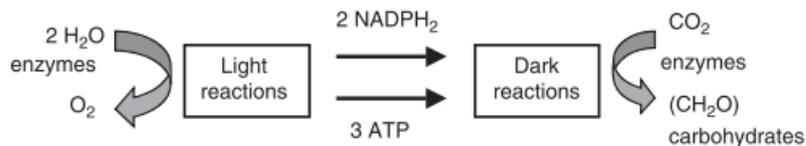


La cyanobactérie réalise la photosynthèse oxygénique identique à celle des plantes supérieures. L'organisation interne d'une cellule cyanobacter est procaryote, où une région centrale (nucléoplasme) est riche en ADN et une région périphérique (chromoplaste) contient

des membranes photosynthétiques. Les feuilles des membranes photosynthétiques sont habituellement disposées en parallèle, près de la surface de la cellule (figure II.2.(a)).

La photosynthèse oxygène peut être exprimée sous la forme d'une réaction redox entraînée par l'énergie lumineuse (récoltées par des molécules de chlorophylle), dans lesquelles le dioxyde de carbone et l'eau sont transformés en glucides et en oxygène. La conversion est traditionnellement divisée en deux étapes, les réactions dites éclairé et obscurité (figure II.1.).

Dans les réactions lumineuses liées aux membranes photosynthétiques, l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique fournissant un NADPH,  $H^+$  réducteur biochimique et un ATP à haute énergie. NADPH,  $H^+$  et ATP sont par la suite utilisés dans la réduction séquentielle biochimique du dioxyde de carbone en hydrate de carbone indépendamment de la lumière [65]



**Figure II.1. : Principaux produits de réactions lumière et obscurité de la photosynthèse [48].**

### II.3. Organisation et fonction du complexe supramoléculaire

Divers complexes supramoléculaires sont impliqués dans le transport d'électrons au niveau des thylakoïdes des cyanobactéries à savoir les deux photosystèmes PS II, PS I, le complexe cytochrome b6f, l'ATPase et les phycobélisomes. En plus de cela, deux porteurs d'électrons mobiles sont également présents, on cite la plastoquinone (PQ) et la plastocyanine(PC).[4]

### II.4. Membrane photosynthétique

La membrane cytoplasmique sépare le cytoplasme du Périplasma. Les membranes Thylakoidales contiennent de la chlorophylle, elles sont donc verts. Elles ont une forme de

vase et se produisent par paires. Une paire de membranes enveloppe une prochaine paire, tout comme un ensemble de poupées russes [65].

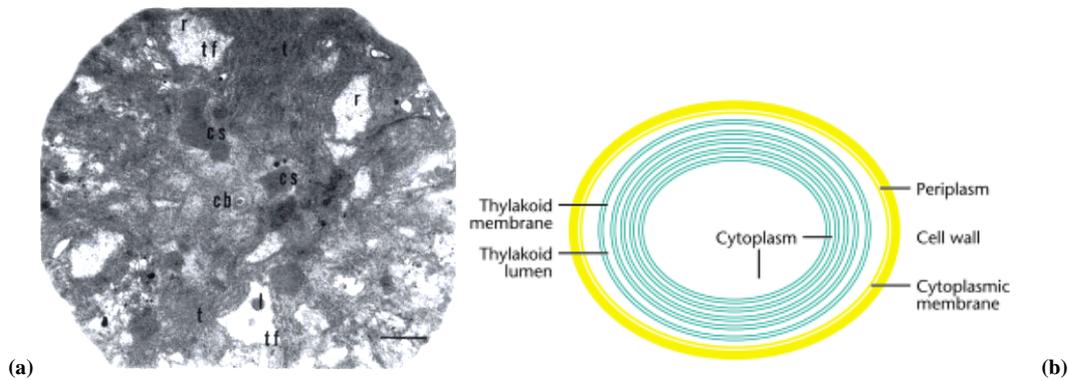


Figure II.2. : a) Micrographie électronique d'*Arthospira platensis* en coupe transversale [6], b) Présentation des membranes et des compartiments dans une cellule de cyanobactérie[66]. (t) thylakoïdes, (tf) zones exemptes de thylakoïdes, (r) ribosomes, (l) gouttelettes lipidiques, (cs) carboxysomes et (cb) corps cylindrique. Barre égale 0,5 µm

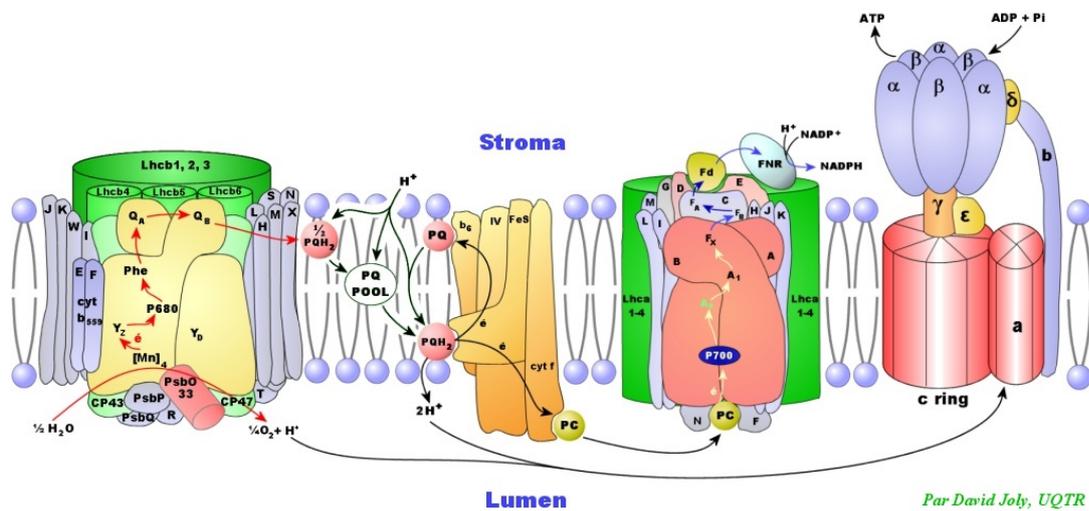


Figure II.3. : Vue simplifiée de la constitution de la membrane photosynthétique des plantes supérieures avec ses constituants principaux: PSI, PSII, cytochrome b6f et l'ATP synthétase par David Joly, UQTR.[67]

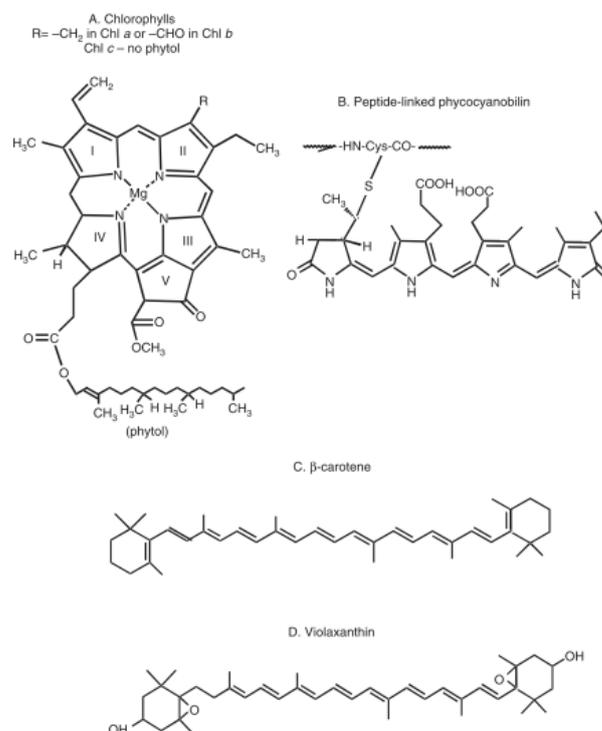
## II.5. Pigments photosynthétiques

### II.5.1. La chlorophylle

Tous les organismes photosynthétiques contiennent des pigments organiques pour la récolte de l'énergie lumineuse. Les chlorophylles contiennent un atome central de magnésium et absorbent dans l'entourage du bleu et du rouge 430-445 nm et 645- 660nm respectivement. Les tétra-pyrroles dont les atomes d'azote sont coordonnés autour d'un atome de Mg diffèrent par la nature du groupement R (figure II.4) [48].

### II.5.2. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes représentent un grand groupe de chromophores biologiques avec une plage d'absorption entre 400 et 550 nm. Ils sont des isoprènes conjugués à 6 carbones cycliques. Les caroténoïdes fonctionnent comme des pigments accessoires de récolte de lumière transférant l'excitation à la chlorophylle (Chl) et aux molécules requises dans la protection contre l'excès d'irradiation et les espèces réactives d'oxygène.[48]



**Figure II.4. : Structures des trois principaux groupes de pigments dans les algues et les cyanobactéries [48].**

### II.5.3. Les phycocyanines

Les cyanobactéries contiennent des phycobilisomes à la surface des thylacoïdes. Les phycobiliprotéines sont des tétra-pyrrols ouverts liés de manière covalente à une protéine. Les protéines du complexe de noyau comprenant les protéines extrinsèques du complexe en évolution de l'oxygène sont marquées selon la nomenclature des gènes (par exemple PsbA = A) avec des désignations communes donner pour les sous-unités majeures, (A = protéine D1); voire figure II.5.

Les protéines de récolte de lumière externe sont colorées en bleu-vert pour les systèmes cyanobactériens (phycobiliprotéines extrinsèques formant un phycobilisome où A, B et C sont des tiges allophycocyanines) et D, E, F et G sont des disques d'autres phycobiliprotéines (par exemple C-phycocyanine). [68]

### II.5.4. Photosystème II

Le noyau PSII est l'unité minimale capable de catalyser la fonction PSII complète commune à toutes les plantes supérieures, les algues et les cyanobactéries. Pour des raisons qui ne sont pas bien comprises, ce complexe existe comme un dimère dans la membrane thylakoïdale. Dans chaque monomère, la séparation de charge induite par la lumière se produit entre les côtés *lumenal* et *stromal*.

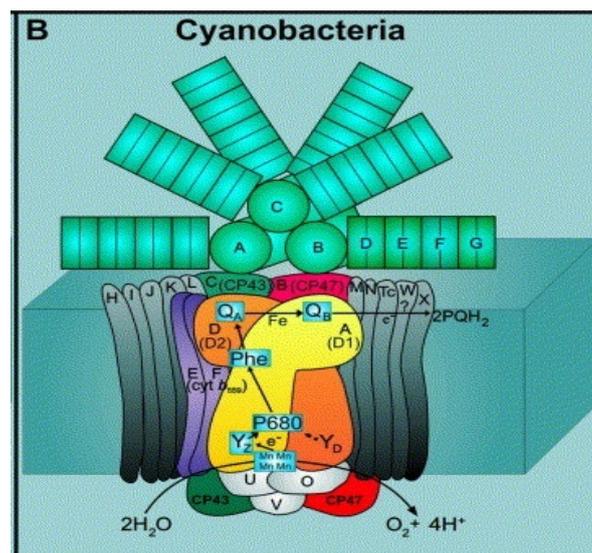


Figure II.5. : Structure et assemblage des sous unités de photosystème PSII chez les cyanobactéries et les plantes [68].

Le donneur d'électrons primaire, P680, est une molécule de chlorophylle a (Chl-a), qui donne un électron à l'accepteur d'électrons primaires, le pheophytin (Phe). Le flux d'électrons passe de Pheo à une molécule de plastoquinone QA, puis à une seconde molécule de plastoquinone QB. La plastoquinone QA est un accepteur à un électron et elle est fermement liée à la poche de liaison QA. En revanche, la QB plastoquinone est libérée de son site de liaison lors de la réception de deux électrons de QA et de deux protons du stroma.

Sur le côté *lumenal*, la forme oxydée de P680 est réduite par une tyrosine active rédox qui, à son tour, est réduite par un ion Mn contenu dans un groupe de quatre. Lorsque la grappe (Mn)<sub>4</sub> accumule quatre équivalents oxydants, deux molécules d'eau sont oxydées pour produire du dioxygène et quatre protons. Chez les cyanobactéries, un polypeptide de 33 kDa est impliqué dans la stabilisation des atomes de manganèse nécessaires au fractionnement photolyse de H<sub>2</sub>O et est ainsi appelé stabilisation au Polypeptide manganèse (MSP) [68].



## II.6. Centre réactionnel et complexe LHC-II

Le centre réactionnel est l'unité minimale capable d'une séparation de charge photo-induite stable. Il a été isolé par Nanba et Satoh(1987) [ 69] à partir d'épinards et par Barber et al. (1987)[ 70] à partir du pois. *Synechocystis* 6803 est la première cyanobactérie à partir de laquelle le centre réactionnel RC était isolé selon Gounaris et al.1989]. Il comprend un hétéro-dimère de polypeptides étroitement liés D1 et D2 en plus d'un cytochrome b559 Hem- fer, 8 molécules Chl a et une pheophytin.[71]

Les deux polypeptides D1 et D2 fournissent l'environnement protéique, dans leur cœur, de sorte que P680 puisse subir la photo-oxydation. D1 et D2 lient également d'autres cofacteurs comme la pheophytin, QA, QB, ... etc. Dans une orientation appropriée pour effectuer la stabilisation de l'état séparé par la charge. Beaucoup d'herbicides connus, tels que le DCMU, l'atrazine, etc. interfèrent avec QB [71].

Les molécules de Chl-a récoltent de l'énergie lumineuse et la transfèrent au centre réactionnel (RC). Elles sont également censées participer au transfert d'énergie du complexe de récolte

périphérique de lumière phycobelisome (PBsomes ou LHCP II) au RC. Des études récentes suggèrent le rôle de CP43 et CP47 dans l'assemblage de PSII [71].

La pheophytine est le premier intermédiaire d'électrons dans le centre de photo-réaction (RC P608) de PS II. Son implication dans ce système peut être divisée en plusieurs étapes de base. La première étape est l'excitation de la paire spéciale de chlorophylles (Chl)<sub>2</sub>. Cela peut être observé dans la réaction suivante [72] :



La deuxième étape implique le (Chl)<sub>2</sub> passant un électron au pheophytin, produisant ainsi un radical à charge négative et un radical à charge positive (la paire spéciale de chlorophylle), ce qui entraîne une séparation de charges :

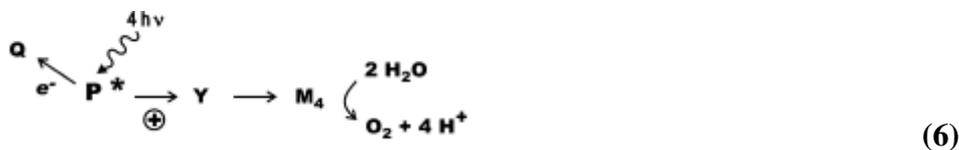


La troisième étape est le mouvement rapide de l'électron vers la mena-quinone étroitement liée, Q<sub>A</sub>, qui donne immédiatement les électrons à une seconde, la quinone légèrement liée (Q<sub>B</sub>). Deux d'électrons transferts convertissent Q<sub>B</sub> en sa forme réduite Q<sub>B</sub>H<sub>2</sub>.



La quatrième et dernière étape implique le remplissage du «trou» dans la paire spéciale par un électron d'un hème en cytochrome b. Cela régénère les substrats et complète le cycle, ce qui permet d'avoir des réactions ultérieures.

L'ordre des cofacteurs: complexe quinone-chlorophylle groupe tyrosine-manganèse, est un motif structurel unique de PSII :



## II.7. La plasto-quinone

La plasto-quinone est un transporteur d'électrons mobiles entre PS II et le Complexe Cyt b6/f . C'est une molécule relativement petite composée d'un anneau de quinone avec deux groupes méthyle et une chaîne isoprénoïde. Chaque molécule de quinone transfère deux électrons de

PS II au complexe Cyt b6/f lors d'une réaction d'oxydoréduction. Ceci s'accompagne de l'absorption de deux ions H<sup>+</sup> du stroma. [48]

Le flux d'électrons à travers le pool de PQ semble être l'étape de limitation de la vitesse dans le transport d'électrons photosynthétique. Dans les thylakoïdes cyanobactériens, le groupe PQ est également un élément du transport d'électron respiratoire [66].

### II.8. Cytochrome b6/f

Ce complexe fonctionne comme une plasto-quinone intégrée à la membrane plastocyanine oxydoréductase catalysant la réaction :



Le cytochrome f 556.5 a d'abord été purifié et caractérisé chez *Spirulina platensis* par Bohme et al. (1980)[14]. Le complexe cytochrome b6/f isolé de *Spirulina* sp a été signalé avoir quatre polypeptides: cytochrome f (29 kDa) avec un hème c, un cytochrome b6 (23 kDa) avec deux protohèmes, une protéine de soufre-fer (23 kDa) avec un centre de soufre-fer à fort potentiel et un polypeptide de 17 kDa [74].

Le complexe cytochrome b6/f des cyanobactéries relie la chaîne respiratoire à la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique [75 , 76]; L'aspect unique du réseau de transport d'électrons du complexe Cyt b6/f est la possibilité de boucles de rétroaction impliquant un don d'électrons à la ferredoxines pendant le flux d'électrons cycliques autour de PS [65].

### II.9. Plastocyanine et Cyt c 553

La plastocyanine est une protéine de membrane périphérique contenant du cuivre (10,5 kDa) est localisée sur la surface luminale des thylakoïdes [18]; et sert de médiateur au transport d'électrons entre le complexe Cyt b6/f et PSI. Cependant, Dans de nombreuses

cyanobactéries, le rôle de la plastocyanine est pris en charge par Cyt c553 (10-12 kDa). Certaines cyanobactéries possèdent également la capacité de synthétiser à la fois la plastocyanine et Cyt c 553 et régulent leurs quantités selon la disponibilité du fer et du cuivre [4].



## II.10. Photosystème I

Le complexe de base PS I contient Chl P700 photo-oxydable, environ 100 molécules de Chl a comme antenne, 12 à 16 molécules de carotène, 2 molécules de phyloquinone et trois centres 4Fe-4S. Plus d'une douzaine de polypeptides sont impliqués dans le maintien de la structure et de la fonction de PSI. Deux d'entre eux, avec un poids moléculaire d'environ 70 kDa, comprennent un hétéro-dimère qui se lie à toute la chlorophylle présente dans le noyau complexe PSI avec tous les cofacteurs, c'est-à-dire P 700, A0, A1, 4Fe-4S clusters [4].

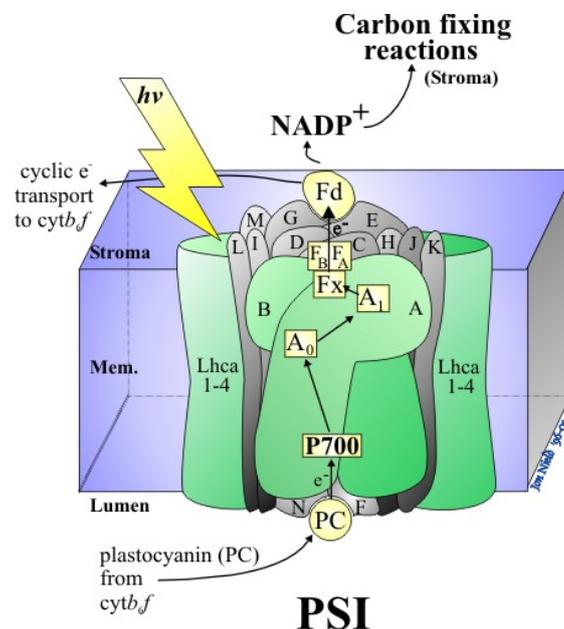
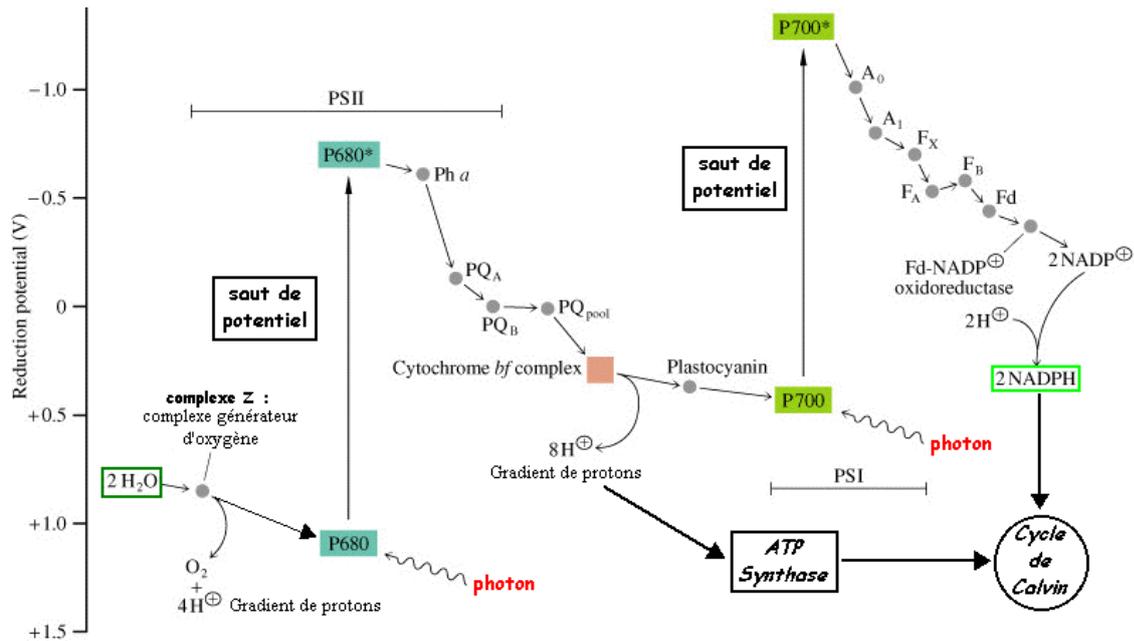


Figure II.6. : Structure générale et assemblage de PSI [78]

Dans le PSI, la séparation des charges commence par la photo-oxydation du pigment P700 qui est un dimère de Chl a. L'électron se déplace séquentiellement par A0, une molécule de Chl a et A1, une molécule de vitamine K, au premier cluster 4Fe-4S, Fx. De Fx, l'électron est transféré dans deux autres centres fer-soufre, 4Fe-4S. Enfin, la ferredoxine (Fd) reprend l'électron pour le transporter vers la NADP<sup>+</sup> réductase [4].



**Figure II.7. : Schéma du transport cyclique des électrons. P680 : PSII, PQ : plastoquinone, PC : plasto-cyanine, Cyt b6/f : cytochrome b6/f, PS700 : PSI, Fd : ferrédoxine**  
.[79]

La structure tridimensionnelle de PSI, isolée de *Synechococcus Sp.*, a été élucidée par Krauss et ses coauteurs, en 1993, par cristallographie aux rayons X. Comme dans le cas de la *Spiruline*, les cristaux PSI étaient sous la forme de trimères [80].

## II.11. ATP synthase

Le transport d'électrons de PSII vers PS I s'accompagne d'un transport vectoriel de H<sup>+</sup> du stroma à la lumière des thylakoïdes. De plus, les protons sont également libérés dans le lumen dû à l'oxydation de H<sub>2</sub>O par PSII. Le gradient électrochimique ainsi généré est utilisé par

l'ATP synthéase des thyracoïdes. L'ATP synthéase comprend deux parties morphologiquement et fonctionnellement distinctes. La partie hydrophile, F1, émerge de la membrane et abrite les sites catalytiques responsables de l'ATP synthèse et / ou hydrolyse. L'autre partie, F0, est intégrée dans la bicouche lipidique et agit comme une chaîne de protons; Il comprend 4 sous-unités [81].

Une caractéristique intéressante des ATPases des cyanobactéries est leur capacité à synthétiser l'ATP en raison de la force motrice du proton généré à la fois par la photosynthèse et par les voies transport d'électrons respiratoires [82].

### **II.12. Flux d'électrons photosynthétique**

La chaîne de transport d'électrons photosynthétique chez cyanobactérie est essentiellement identique à celui des plantes, même si certains des polypeptides qui font partie des enzymes dans le transport d'électrons semble être d'une évolution d'origine différente dans les deux systèmes. En effet, les chloroplastes dans les plantes sont censés provenir des ancêtres de cyanobactéries. La chaîne de transport des électrons photosynthétiques des organismes oxygéniques ont fait l'objet d'un examen approfondi [77, 83, 84].

l'énergie lumineuse utilisée par le photosystème II (PSII) pour diviser l'eau et réduire le pool de PQ. Les électrons sont transportés du pool PQ vers le Complexe cytochrome b6/f et de là un porteur d'électrons soluble sur le côté *luminal* de la membrane thylakoïde. Chez les cyanobactéries, ce support soluble peut être la plastocyanine ou le cytochrome c553, en fonction de l'espèce et sur la disponibilité du cuivre (la plastocyanine est un Enzyme contenant de cuivre). Ces transporteurs peuvent réduire le centre de réaction oxydé PS I Chlorophylle, P700 (figure 7).[66]

Cette forme oxydée de la chlorophylle du centre de réaction est formée par un transfert induit par la lumière d'un électron de PS I à ferredoxine (Fd) et finalement à NADP. Le NADPH<sub>2</sub> est utilisé pour la fixation de CO<sub>2</sub> [66].

Le transfert d'électrons photosynthétiques conduit à un gradient de proton à travers la membrane thylacoïdale. Dans PSII, les protons sont libérés lors de la photolyse de l'eau, et des protons formés sont libérés lors de l'oxydation du plastoquinol par le complexe cytochrome b6/f. Le gradient de protons à travers la membrane thylacoïdale est utilisé pour la synthèse de l'ATP par l'ATP-synthase dans le thylakoïde. Cet ATP peut être appliqué pour la fixation de CO<sub>2</sub> [7].

### **II.13. Régulation de la photosynthèse et de la respiration [66]**

Les cyanobactéries sont parmi les rares groupes qui peuvent effectuer une photosynthèse et une respiration oxygénique simultanément dans le même compartiment. Beaucoup d'espèces de cyanobactéries sont capables de fixer l'azote.

La membrane thylacoïdale est présente pratiquement chez toutes les cyanobactéries et contient à la fois la photosynthèse et les chaînes de transport d'électrons respiratoires. Ces dernières se croisent et en partie régulées utilisent les mêmes composants dans la membrane.

Une question centrale qui devra maintenant être abordée est de savoir comment la photosynthèse et la respiration sont régulées chez les cyanobactéries ? Pour la régulation, une question importante est la capacité et le taux des différentes étapes.

D'après le tableau II.1, il est clair que l'activité PSI est abondante par rapport à celle du complexe cytochrome b<sub>6</sub>/f et cela peut s'expliquer en partie par une cinétique de réduction lente de P700 (100-200 ms à demi-vie mi-temps) qui est généralement observée après une période lumineuse.

Si la lumière est abondante, la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques a une capacité beaucoup plus élevée de flux d'électrons que la chaîne respiratoire, mais à très faible intensité lumineuse ou dans l'obscurité les taux respiratoires sont plus élevés que ceux de la photosynthèse. Comme les capacités du cytochrome oxydase et la succinate déshydrogénase semblent comparables au flux électroniques respiratoires ne conduiront pas à des changements majeurs dans l'état redox du pool PQ laissant place à la régulation [66].

**Tableau II.1.** Capacité approximative et sources probables de limitation du taux de transfert d'électrons photosynthétique et respiratoire chez *Synochocystis* sp. 6903[66]

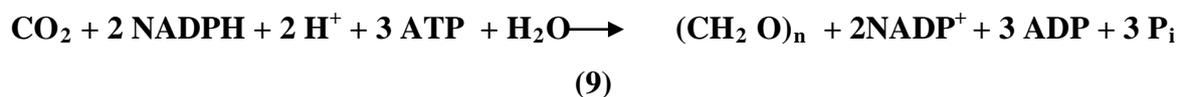
Complex	Capacity ( $\mu\text{mol electrons h}^{-1}$ per mg chlorophyll)	Source of rate limitation
Photosystem II	1000	Light intensity, availability of oxidized PQ
Succinate dehydrogenase	200	Succinate concentration, PQ pool redox state
NADPH dehydrogenase	20	NADPH availability, PQ pool redox state
Cytochrome <i>b<sub>6</sub>f</i> complex	1000	PQH <sub>2</sub> concentration
Photosystem I	3000	Light intensity, Fd/NADP availability, reduced cyt <i>c<sub>553</sub></i> /PC
Cytochrome- <i>c</i> oxidase	200	Reduced cyt <i>c<sub>553</sub></i> /PC availability

#### II.14. Réaction en l'absence de lumière

La photosynthèse est le processus par lequel les micro-algues transforment l'énergie lumineuse en énergie chimique et fixent le carbone inorganique dissous (CID).

La fixation du CO<sub>2</sub> ne nécessite pas directement de la lumière pour avoir lieu, c'est pourquoi elle est aussi appelée réaction obscurité. Cependant de par sa dépendance énergétique aux produits de la photosynthèse, elle reste intimement liée à celle-ci. Bien que 95% du carbone organique des micro-algues soit fixés par la Rubisco, il existe une autre voie de fixation du carbone appelée  $\beta$ -carboxylation donnant la forme oxydée du NADPH; H<sup>+</sup>, le NADP<sup>+</sup> et ATP de l'Adénosine Di-Phosphate (ADP)[84].

Dans les réactions à obscurité, le CO<sub>2</sub> va être intégré au cycle de Calvin:



C'est l'enzyme Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) qui va catalyser cette réaction de carboxylation. Le CO<sub>2</sub> réagit avec le Ribulose-1,5-biphosphate pour donner le glycéraldéhyde 3 phosphate. Cette réaction nécessite un apport d'énergie sous forme d'ATP et de NADPH. Le cycle de Calvin va consommer 95% du NADPH et plus de 60% de l'ATP générés lors de la phase photochimique [84]. Les 5/6 du glycéraldéhyde 3-phosphate vont être

utilisés pour fournir le cycle en Ribulose- 1,5-biphosphate et le 1/6 restant est exporté dans le cytoplasme de la cellule pour servir à la synthèse de molécules organiques. Ces molécules organiques sont essentiellement des glucides et en faible proportion des acides organiques et acides aminés. Ces différentes molécules seront utilisées par la cellule pour la synthèse de nouvelles molécules [84].

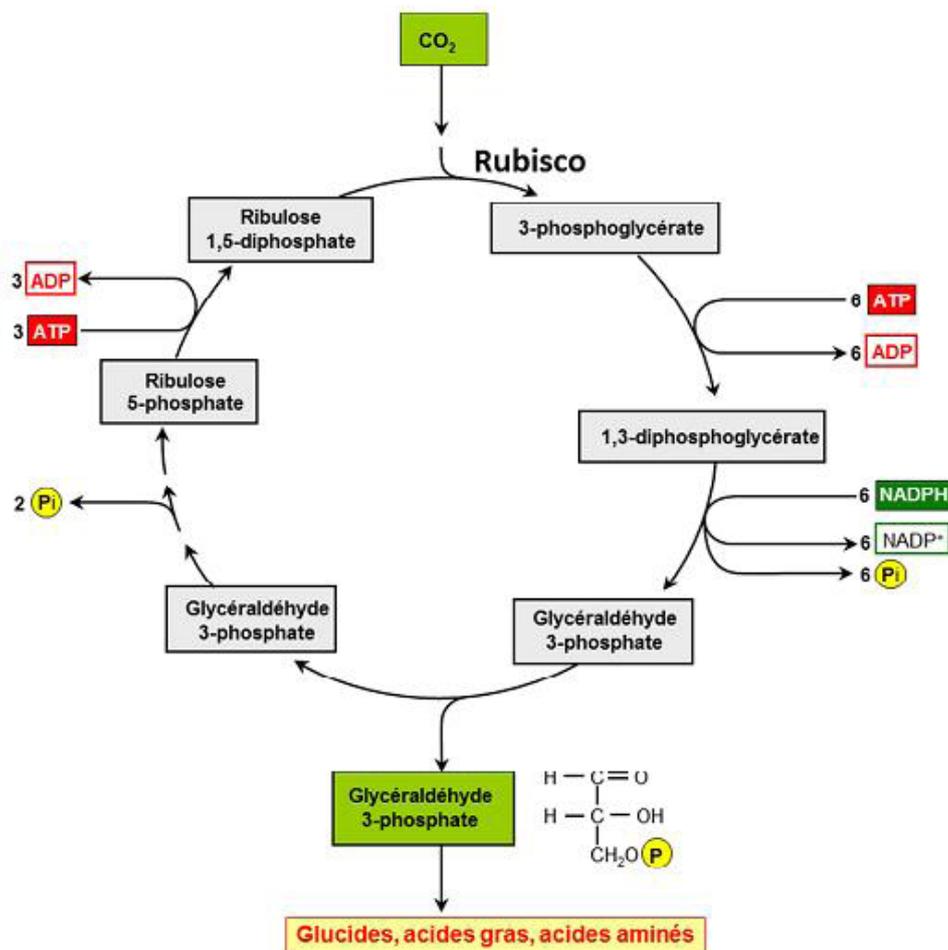


Figure II.8. : Schéma du Cycle de Calvin. Les nombreux intermédiaires entre le glycéraldéhyde 3- phosphate et le Ribulose 5-phosphate ne sont pas indiqués pour plus de clarté[16].

### III.1. La production de biomasse algale

La production de biomasse algale a une longue histoire en raison de son potentiel biotechnologique pour des applications commerciales telles que les produits pharmaceutiques de grande valeur ajoutée (pigments, vitamines,...), les nutriments humains et animaux, le traitement des eaux usées,... ect [85].

À l'heure actuelle, les technologies de culture utilisées à l'échelle industrielle sont des bassins ouverts. En dépit des inconvénients rencontrés, ils sont privilégiés pour leur faible coût capital d'investissement et opérationnels[86]. Pour les cultures de laboratoire, les systèmes indiqués sont, en toute évidence, les photo-bio-réacteurs. Ces derniers facilitent la maximisation de la capture et de la conversion de l'énergie solaire - à partir de la lumière, du CO<sub>2</sub> atmosphérique et de l'eau en énergie chimique[87].

#### III.1.1. Systèmes ouverts (bassins ouverts)

Ils sont de tailles et de formes variables :

- Bassins en boucle fermée (*raceways*) où le milieu de culture est mis en mouvement par des pales en rotation fig.10,
- Bassins circulaires où l'agitation est assurée par un bras rotatif. Les bassins inclinés où le flux est assuré par la gravité et un système de pompe [88-90].

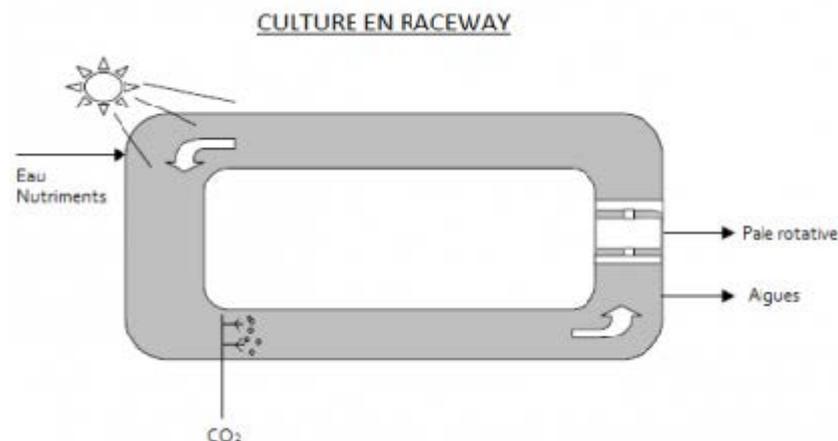


Figure III.1 : Schéma d'un raceway et des flux associés à son fonctionnement [91].

Ce type de système est de profondeur généralement comprise entre 15 et 50 cm doté de mixage et de circulation d'eau permettant de garder les cellules en suspension. Selon

Richmond, les matériaux de construction des parois latérales et du fond du bassin peuvent être très variés : du sable ou de la craie, du ciment ou des matériaux plus coûteux tels que des revêtements en PVC, ou en polyuréthane [48].

Les bassins sans revêtement sont moins coûteux mais connaissent des perturbations supplémentaires telles que la suspension de craie, la percolation, d'importantes contaminations et leur utilisation est restreinte à un nombre limité d'espèces ainsi qu'aux conditions pédologiques et environnementales particulières [48].

En fonctionnement continu, les nutriments sont introduits devant les pâles en rotation. L'apport en CO<sub>2</sub> se fait naturellement à l'interface air/eau mais peut être complété par des aérateurs immergés pour éviter les limitations en carbone (Figure III.1).

Les cultures en système ouvert se font souvent en milieu hautement sélectif tels que des milieux hypersalins et hyperalcalins afin de limiter naturellement les contaminations. Cela restreint, cependant, très fortement le choix des espèces cultivables.

En conditions favorables, les niveaux de production obtenue s'élèvent à 50g/m<sup>2</sup>/jour avec une moyenne annuelle d'environ 10 g/m<sup>2</sup>/jour [92, 93].

### **III.1.2. Systèmes clos (photo-bio-réacteurs)**

Un photo-bio-réacteur peut être défini comme un système de culture pour les phototrophes dans lequel une grande partie de la lumière (> 90%) doit traverser les parois du réacteur transparent pour atteindre les cellules cultivées[48].

C'est un système clos qui limite fortement les échanges directs de gaz et de contaminants à l'intérieur duquel se déroulent, en présence d'énergie lumineuse, des interactions biologiques que l'on cherche à contrôler en maîtrisant les conditions de culture[94].

Les premiers systèmes clos sont apparus à la fin des années 40, mais faute de moyens techniques leur développement a été interrompu et les cultures ont continué à être réalisées en bassins rudimentaires. Dans les années 80, les recherches les ont repris activement dans leurs différentes formes géométriques[95].

Les photo-bio-réacteurs diffèrent par de nombreux aspects portant notamment sur leur géométrie les conditions de culture, le mode de confinement, la lumière, l'agitation, le contrôle thermique, les transferts de gaz, et les conditions d'exploitation [96].

Le plus souvent, le contact des photo-bio-réacteurs clos avec l'environnement extérieur est contrôlé afin d'éviter les contaminations de cultures [10].

### III.2. Formes géométriques des PBR les plus utilisés

La géométrie du photo-bio-réacteur est l'un des critères dont dépend l'accès de la lumière au sein de la culture. D'après la littérature, deux familles de photo-bio-réacteurs se dégagent d'un point de vue géométrique :

- Les photo-bioréacteurs plats,
- Et les photo-bioréacteurs tubulaires.

#### A/ Critères de conception des photo-bio-réacteurs

Les critères de conception des PBR devraient viser à accroître la productivité volumétrique, l'efficacité photosynthétique et la rentabilité de la croissance des algues.

##### A/1. Matériaux de construction

Le choix des matériaux de construction de la partie exposée à la lumière est critique dans l'ingénierie de PBR. Les matériaux d'un PBR doivent être transparents, inertes vis à vis des produits chimiques utilisés, non toxiques pour les microorganismes cultivés, avoir une rigidité mécanique élevée ainsi que des faces internes faciles à nettoyer et stérilisables pour le cas des cultures axéniques [48].

##### A/2. Orientation et Inclinaison

Les photo-bio-réacteurs sont généralement orientés vers le soleil et inclinés de manière à intercepter le maximum de rayonnement de solaire (figure III.2) L'effet de l'inclinaison du PBR sur la productivité a été étudié par Lee et Hu[97-99] .

Il ressort de ces études que l'angle d'inclinaison exerce un effet significatif sur la productivité.

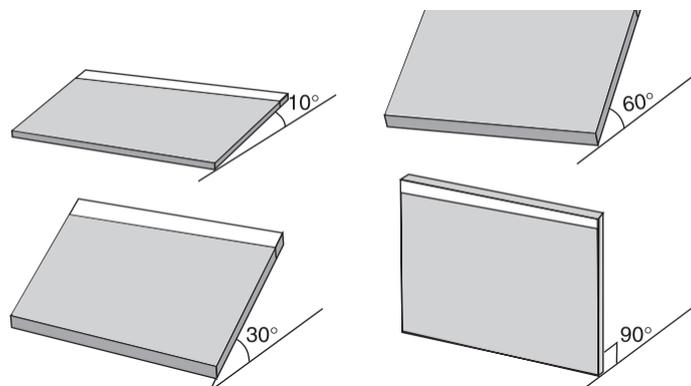


Figure III.2 : Orientation et inclinaison des photo-bio-réacteurs [97]

**A/3. Rapport surface/volume**

La surface spécifique  $S/V$ , est le rapport entre la surface éclairée et le volume de la culture. Cette grandeur est très importante car elle relie la captation (liée à la surface) et l'atténuation (liée au volume) de la lumière. L'augmentation de la surface spécifique conduira donc nécessairement à la réduction des épaisseurs de cultures [100].

En règle générale, les rapports  $S/V$  élevés conduisent à des concentrations cellulaires plus importantes et des productivités volumétriques plus intéressantes [48].

En revanche, une surface spécifique trop élevée entraînera une limitation dans les échanges gazeux excessifs de l'évolution de l'oxygène et l'absorption de  $CO_2$ .

L'appauvrissement en éléments nutritifs et l'excrétion de métabolites, ont des effets négatifs à long terme sur la culture [48, 100].

**A/4. Changement d'échelle et de taille des photo-bio-réacteurs**

Le degré de difficulté de la mise à l'échelle d'un PBR est proportionnel à la taille du récipient et aux tolérances du microorganisme [101]. Olaizola (2003a) a précisé dans son étude [20], que lors de la mise à l'échelle d'un PBR, l'éclairage, l'échange de gaz, le contrôle de température et le régime de mélange doivent être pris en considération [202]. Il faut noter qu'il n'existe pas de procédure d'extension systématique universelle pour les PBR [103].

Les PBR tubulaires, tels que les colonnes et les panneaux plats, sont généralement confrontés à de sérieuses limitations lorsque leur volume dépasse 50-100 L. Puisqu'au delà, l'énergie lumineuse est excessivement diluée et le transfert de gaz est limité [2]. Toutefois, la taille des PBR tubulaires peut être augmentée par multiplication des modules identiques ou par augmentation de la longueur et du diamètre des tubes [103].

Cependant, les simulations basées sur des modèles de transfert de masse avec des réacteurs tubulaires suggèrent que l'augmentation de la longueur du tube à un diamètre constant peut modifier de manière significative le pH de la culture, l'oxygène dissous et l'absorption de  $CO_2$  de manière significative en raison de gradients de concentration croissants le long de la longueur du tube [103]. Pour ces raisons, les PBR plats, les collecteurs et les PBR à colonne de transport aérien sont considérés comme des modèles attrayants [104].

Le principal inconvénient de ce genre de PBR est le coût en capital, qui vient du fait que de nombreux modules doivent être construits pour une production commerciale. A cet effet, Chisti et al. (1999) et Molina Grima et al. (2000) recommandent d'utiliser un diamètre de tuyau ne dépassant pas 0,1 m et une longueur de tube continu d'environ 80 m avec un débit

de l'ordre de 0,3 à 0,5 m.s<sup>-1</sup>. [103, 105] Les tubes parallèles, qui commencent et finissent par des entailles communes, sont probablement le meilleur moyen de s'adapter à des débits et à des volumes plus élevés [103].

#### **A/5. Productivité des photo-bio-réacteurs**

La productivité de la biomasse est influencée par quatre variables principales, à savoir : diamètre du tube, vitesse d'écoulement de la culture, intensité de la lumière reçue par la culture et le taux de dilution. Les deux premières variables ont un effet direct sur la fréquence du cycle lumière/obscurité parcourues par les cellules algales.

La comparaison entre les différents types de PBR et d'étangs ouverts n'est pas une tâche facile [104]. Les performances des cultures algales sont souvent illustrées par leur taux de croissance spécifique, mais ce qui est souvent ignoré, c'est que les taux de croissance spécifiques élevés ne signifient pas nécessairement des productivités élevées [106].

La productivité est calculée selon la relation :

$$P = \mu X = (dx/Xdt)X = dx/dt = (X_t - X_0)/(t - t_0) \quad (1)$$

P<sub>v</sub> : Productivité volumique

X<sub>t</sub> : concentration de biomasse à l'instant t,

X<sub>0</sub> concentration de biomasse à l'inoculation (t<sub>0</sub>).

μ : taux spécifique de croissance

### **B/ Principaux facteurs influençant la croissance et la productivité**

#### **B/1. Eclairage**

L'éclairage des photo-bio-réacteurs, situés à l'extérieur, peut simplement être naturel en utilisant la lumière solaire. Les PBR plans sont alors généralement installés horizontalement ou de façon inclinée pour améliorer l'utilisation de l'irradiation solaire [107, 108].

La croissance des micro-algues, et donc la production de biomasse, dépend de la quantité de lumière reçue par chaque micro-algue.

Deux aspects sont à distinguer :

- d'une part, la quantité et la qualité de la lumière émise par le dispositif d'éclairage : intensité, spectre d'émission des sources lumineuses et nombre de sources,...

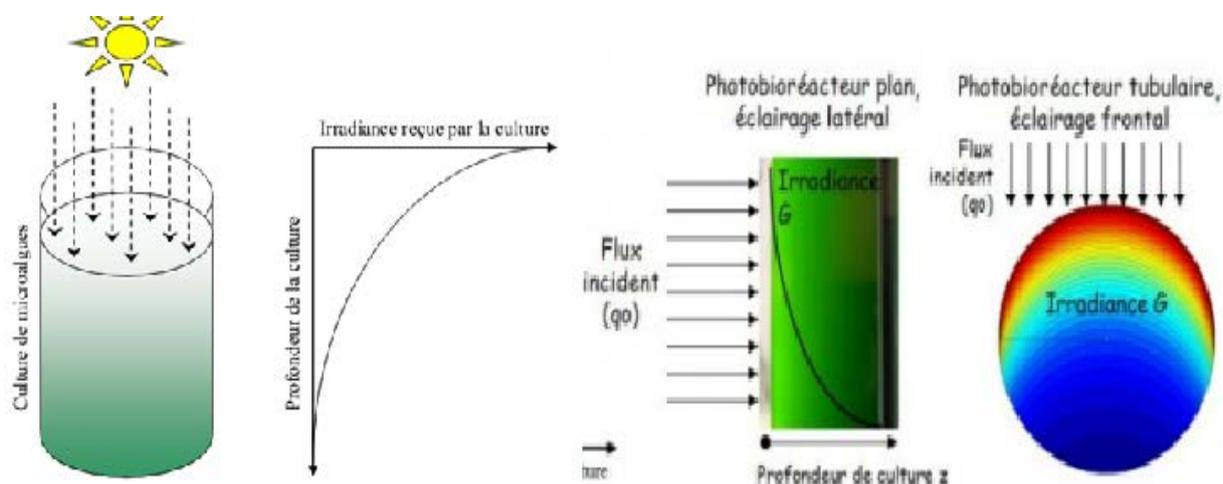
- d'autre part, la quantité et la qualité de la lumière réellement disponible au sein des micro-algues. Celle-ci étant différente du flux lumineux incident du fait des pertes par absorption et diffusion qui ont lieu en traversant la culture et les parois du réacteur [109].

La distribution hétérogène de l'irradiation selon l'épaisseur de la culture conduit à des cinétiques locales de croissance en surface, du fait d'une intensité lumineuse trop forte et une zone de photo-inhibition peut apparaître et entraîner la dégradation des photosystèmes I et II, des antennes collectrices de la chlorophylle et l'apparition de pigments accessoires. En profondeur, des effets d'auto-ombrage peuvent conduire à une atténuation de la lumière et un manque d'énergie ou même à un basculement vers un mécanisme respiratoire [4]

(figure III.3).

### B/2. Agitation et homogénéisation

Le mélange est nécessaire pour empêcher les cellules de s'installer, éviter la stratification thermique, décomposer les gradients de diffusion, distribuer les nutriments dans le milieu, fournir une alimentation adéquate en  $\text{CO}_2$  (élimination de l'oxygène) et assurer un éclairage approprié à toutes les cellules de la culture [110].



**Figure III.3: Représentation schématique de l'atténuation de la lumière en fonction de l'épaisseur de culture de micro-algues [111].**

En règle générale, les cultures de microorganismes fragiles ne peuvent pas être mélangées à l'aide d'agitateurs mécaniques, tels que ceux utilisés dans les bioréacteurs de type fermenteur, en raison de la forte contrainte de cisaillement hydrodynamique que l'agitateur applique aux cellules [112]. La contrainte de cisaillement hydrodynamique est liée à une certaine charge

hydrodynamique surcritique appliquée aux micro-organismes et à des dommages cellulaires [4]. C'est pour cela que les systèmes *airlift* sont préférés pour les microorganismes fragiles car ils causent une contrainte de cisaillement hydrodynamique plus faible aux cellules [48].

### **B/3. Régulation des facteurs physiologiques**

La régulation est mise en place afin d'assurer une optimisation des cultures. Le minimum requis pour un photo-bio-réacteur industriel est le contrôle des conditions de culture à savoir, pH, température,... En laboratoire la régulation peut s'avérer plus poussée et des périphériques sont alors ajoutés pour permettre un suivi expérimental.

#### **B/3.1. Contrôle du pH**

Le réajustement et la régulation du pH de la culture sont majoritairement obtenus à l'aide du CO<sub>2</sub> distribué conjointement à l'air, quel que soit le système d'agitation. A noter que l'aération et le mélange du milieu de culture photo-bioréacteur à colonne s'effectuent par un bullage simple d'air enrichi entre 2 et 5% de CO<sub>2</sub> [113].

Il en résulte que la production d'hydrogène est réalisable pour des valeurs de pH supérieures à 6, même pour des cultures non pures. En raison de conditions non stériles, une contamination par d'autres bactéries a été observée, qui est responsable de la transformation du lactose en lactate (meilleur substrat pour les bactéries pourpre). Modigell et al. ont précisé dans leur étude [114] qu'une évolution plus élevée du dioxyde de carbone de ces bactéries, probablement des entérobactéries, entraîne des puretés d'hydrogène plus faibles.

La micro-algue a besoin d'un pH relativement élevé dans la gamme de 9,5 à 9,8 qui inhibe la contamination de la plupart des algues dans la culture [115]. Des quantités élevées de bicarbonate de sodium doivent toujours être présentes dans le milieu pour maintenir un pH élevé et prévenir les fluctuations (Zarrouk 1966)[116].

#### **B/3.2. Contrôle de la température**

Toute forme de chaleurs conduit au chauffage du PBR qui dépasse rapidement la plage optimale de température de la croissance du microorganisme d'où la nécessité des systèmes de refroidissement de culture [48]. Les étangs ouverts sont limités par les basses températures le matin alors que les PBR exigent généralement le refroidissement à midi. La régulation

thermique peut se faire également en immergeant le photo-bioréacteur dans un bassin rempli d'eau ou encore en aménageant autour de lui un système d'ombrage [107].

L'ombrage, l'immersion dans un bain d'eau et la pulvérisation d'eau sont les méthodes les plus courantes pour éviter que les PBR extérieurs ne se surchauffent [104]. Le refroidissement par pulvérisation d'eau est plus rentable et plus fiable dans les climats secs car il nécessite une empreinte d'eau plus petite par rapport au refroidissement par immersion dans l'eau [104].

### **B/3.3. Concentration de biomasse**

L'effet de culture dense peut interférer avec d'autres facteurs tels que l'intensité de la lumière, la densité de la culture, le type de photo-bioréacteur et la concentration en dioxyde de carbone pouvant être des conditions limitantes de la photosynthèse et l'inhibition de la bio-fixation du dioxyde de carbone [117]. Dans des cultures denses de microorganismes photosynthétiques, des effets d'ombrage peuvent se produire réduisant ainsi le rayon de lumière au niveau des cellules individuelles. La fixation du dioxyde de carbone se trouve altérée bien que cela puisse être évité par l'élimination périodique des cellules[4].

### **B/3.4. Échange de gaz**

Dans une culture de micro-algues, l'équilibre  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  doit être ajusté pour les taux de photosynthèses élevés [4]. Le  $\text{CO}_2$  doit être suffisamment disponible pour répondre au besoin de micro-algue alors que l'oxygène libéré doit être éliminé avant d'atteindre les concentrations inhibitrices[86]. Cet ajustement s'effectue par l'élimination d' $\text{O}_2$  avec de l'air sortant de la culture.

Le contrôle du pH de la culture est effectué par l'injection de  $\text{CO}_2$  en fonction de la demande réelle.

Dans les PBR échelle grandeur nature, l'accumulation de l'oxygène généré par la photosynthèse est l'un des principaux facteurs inhibiteur, comme d'ailleurs dans le cas des tubulaires avec rapport  $S/V$  trop élevé. Cela génère un stress oxydative et inhibe sévèrement la croissance des algues[110].

Dans une étude réalisée en 2008 par Sierra et al [118], les systèmes de collecteurs colonnes verticales et panneaux plats agités par barbotage d'air présentent un chemin plus court d'oxygène pour le transfert de masse d' $\text{O}_2$  hors de la solution.

Les besoins en carbone sont généralement fournis avec du CO<sub>2</sub>, et ce suite à l'approvisionnement initial en bicarbonate de sodium 0,2 M [4]. La perte de dioxyde de carbone dissous due à l'absorption des algues est partiellement compensée par régénération à partir de carbonates et de bicarbonates, la prise de dioxyde est accompagnée d'une modification du pH [103].

#### **IV. Utilisation de l'énergie et voies de production**

L'énergie fossile est l'énergie produite à partir du pétrole, du charbon et du gaz naturel. La réserve de ces trois combustibles est fixée et elle s'épuise au fur et à mesure. Donc, elle est non-renouvelable, ou plus exactement, renouvelable mais pas à l'échelle humaine.

En 2007, les énergies non renouvelables assuraient plus de 90% des besoins mondiaux [119]. Elles sont tirées des minerais ou des puits. Le principal atout des énergies fossiles c'est qu'elles bénéficient d'une capacité de production d'énergie par unité de volume élevée [120]. Ces ressources sont épuisables et la demande mondiale ne cesse d'augmenter ces dernières décennies. Elles deviennent donc de plus en plus chères.

La problématique d'un point de vue géopolitique et environnemental est que la production de l'électricité à partir du charbon, fuel, gaz naturel,... génère de grande quantité de CO<sub>2</sub>, (32,1 milliards de tonnes en 205 [191, 121]).

##### **IV.1. La bioénergie**

La bioénergie constitue une alternative intéressante, car elle a le double avantage d'assurer une énergie à la fois renouvelable et durable en plus d'être pratiquement *carbo-neutre*. Son obtention ne nécessite que de l'eau, des terres et du CO<sub>2</sub>.

##### **IV.2. Pourquoi l'hydrogène ?**

L'hydrogène est le meilleur vecteur d'énergie. La molécule H<sub>2</sub> est la plus énergétique : 120 MJ.kg<sup>-1</sup> soit 2,4 fois plus que le gaz naturel. L'hydrogène a un pouvoir énergétique de 39,4 KWh.Kg<sup>-1</sup> tandis que le charbon, selon sa forme, oscille dans la fourchette de 7,8 à 8,7 KWh.Kg<sup>-1</sup>, soit environ 5 fois moins par unité de masse.

L'hydrogène n'est ni polluant, ni toxique et sa combustion dans l'air ne génère que de l'eau [122].

Il est produit à partir des combustibles fossiles, tels que le gaz naturel (49 %), le pétrole (29 %), le charbon (18 %). Seul 4 % de la production d'hydrogène est issue de la décomposition de l'eau par électrolyse (figure IV.1) [123 ,124]. La production annuelle est d'environ 55 Mt. Les voies d'obtention à partir d'hydrocarbures sont le vapo-reformage, l'oxydation partielle et le reformage auto-thermique [125].

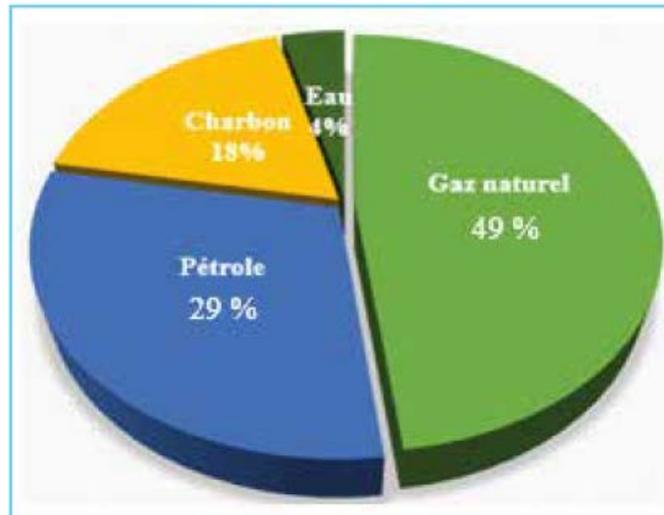


Figure IV.1: Modes de production de l'hydrogène [124].

#### IV.2.1. Le vapo-reformage

Le reformage à la vapeur d'eau consiste à transformer le gaz naturel (désulfuré) en gaz de synthèse ( $H_2$ ,  $CO$ ,...), le plus souvent, sur charge catalytique de type nickel modifié (Figure IV.2). Cette transformation a lieu entre 840- 950 °C et à des pressions allant de 20 à 30 bars [126] :

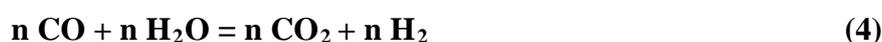


Cette réaction est accompagnée de la conversion du  $CO$  en  $CO_2$  (*Water gas shift reaction*) qui se déroule en deux étapes (voir figure 2) en présence de catalyseurs à base de fer et de cuivre à 150- 350°C, et ce dans le but de ramener la concentration du monoxyde de carbone à des ppm [127].



#### IV.2.2. L'oxydation partielle

Les deux principales réactions catalytiques sont la production de gaz de synthèse à des températures élevées 1300- 1400 °C et à des pressions allant jusqu'à 90 bars (Fig IV.2):



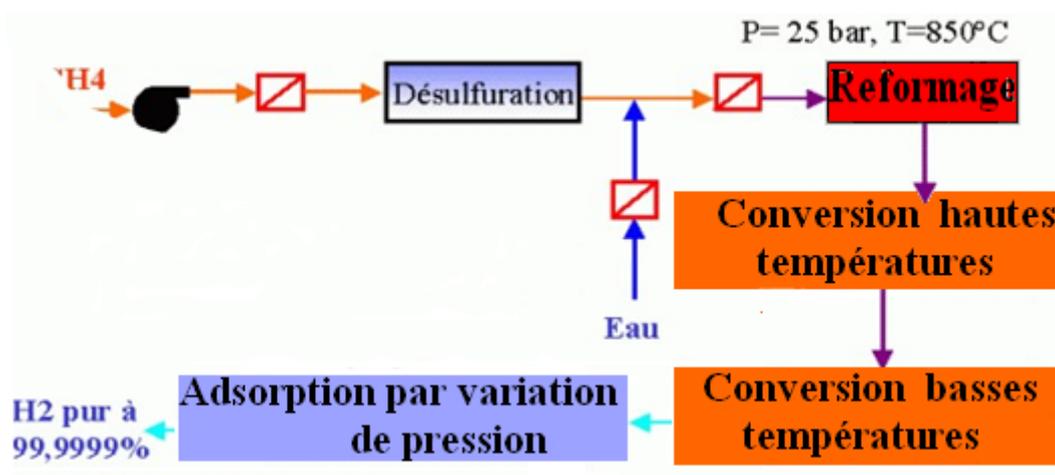


Figure IV.2 : Procédé de vapo-reformage [128].

### IV.2.3. Le reformage auto-thermique

Le procédé auto-thermique est une combinaison des deux procédés précédents. Il est probablement le plus intéressant des prochaines évolutions des procédés de production d'hydrogène à partir d'hydrocarbures. Son principal atout est de compenser, dans un même réacteur à lit fixe, les réactions endothermiques du vapo-reformage par les réactions exothermiques de l'oxydation partielle [128].

### IV.2.4. La gazéification du charbon

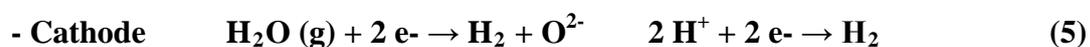
Cette technique n'est plus utilisée actuellement, sauf en Afrique du sud et en Chine. Elle permet de produire de l'électricité et des sous produits comme l'hydrogène par simple mélange de charbon avec de l'eau et de l'air à 1000°C et sous haute pression [129, 130].

### IV.2.5. La décomposition de l'eau

Cette solution est la plus intéressante en termes d'émissions de gaz à effet de serre si cette dissociation se fait à partir de sources d'énergies elles-mêmes non émettrices de CO<sub>2</sub>.

#### A/ Electrolyse chimique

L'électrolyse de l'eau est une réaction électrochimique qui vise à rompre les deux liens chimiques afin d'obtenir de l'hydrogène par passage de courant électrique (Electrolyse basse température et haute température) :



L'électrolyse à haute température possède de nombreux avantages par rapport à l'électrolyse à basse température, d'un point de vue énergétique. L'énergie totale à fournir pour décomposer l'eau est moindre, et ce grâce à la haute température qui améliore l'efficacité de la réaction par rapport à celle demandée pour l'électrolyse classique [131, 132].

### B/ Dissociation par cycle thermochimique

Le principe de ces cycles consiste à dissocier la molécule d'eau par des réactions chimiques successives en introduisant certains composés qui sont régénérés au cours des réactions pour être réutilisés en boucle dans le procédé. La succession de réactions aboutit à la formation d'hydrogène et d'oxygène. Parmi ceux qui semblent actuellement les plus prometteurs [133], on peut citer les cycles cérium-chlore, cuivre-chlore, et bien entendu iode-soufre (figure IV.3).

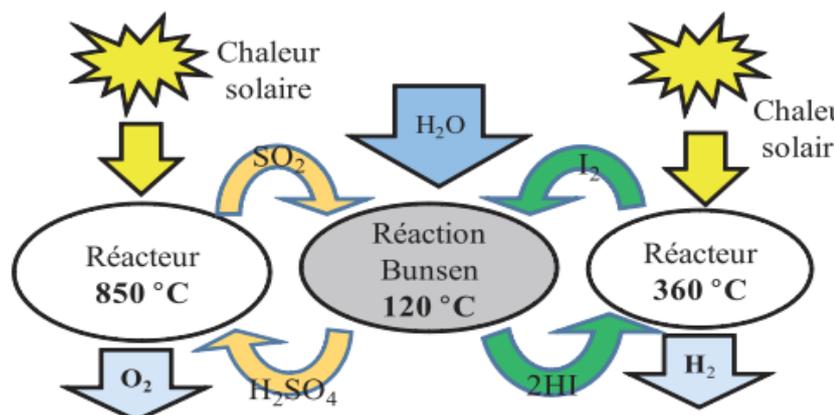


Figure IV.3 : Représentation schématique de cycle soufre- iode [134].

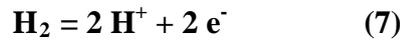
### IV.3. La bio-production d'hydrogène

La production biologique de l'hydrogène est définie comme le résultat du métabolisme d'un organisme vivant qui dans des conditions données : milieu pauvre en azote, ou en soufre, produit de l'hydrogène gazeux comme métabolite secondaire. Deux principaux types d'enzymes biologiques sont impliqués dans la réaction de formation de H<sub>2</sub>, *i*) l'hydrogénase et *ii*) la nitrogénase [130].

#### IV.3.1. L'hydrogénase

Le terme hydrogénase a été proposé en 1931 par Stephenson et Stickland [136] pour désigner l'enzyme qui, chez *E. Coli*, pouvait produire de l'hydrogène et l'utiliser pour réduire des substrats.

Les hydrogénases qui catalysent l'oxydation de l'hydrogène sont dites consommatrices ou hydrogénase de prise» :



Les hydrogénases capable réduire l'hydrogène sont dites réversibles ou bidirectionnelles :



#### A/ Hydrogénases à fer

Elles possèdent exclusivement des centres fer-soufre comme groupement prosthétique, et dont le site actif est constitué d'un centre fer-soufre de composition indéterminée. Ces enzymes catalysent la production d'hydrogène [122] et sont présents chez les bactéries anaérobies strictes comme *Clostridium pasteurianum*.

#### B/ Hydrogénases à nickel- fer ou nickel- fer- sélénium

Il s'agit d'enzymes les plus répandues et les mieux caractérisées. Ces enzymes possèdent, en plus des centres fer- soufre, un atome de nickel ou un atome de nickel et un atome de sélénium au niveau du site actif (Figure IV.4).

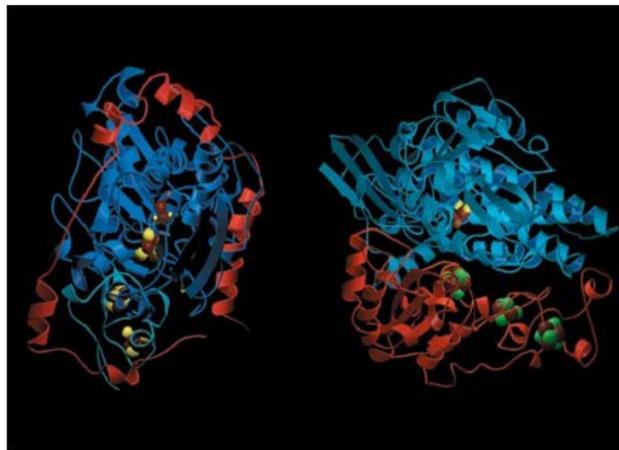


Figure IV.4 : Structure moléculaire d'enzymes à Fe (gauche) et à Ni- Fe (droite) [137].

#### IV.3.2. La nitrogénase

Les nitrogénases sont les principales enzymes productrices d'hydrogène. On les trouve chez les cyanobactéries à hétérocystes et les bactéries pourpres. Les nitrogénase fixent l'azote atmosphérique et le réduisent en ammoniacque et génèrent ainsi de l'hydrogène. La réduction de l'azote en ammoniacque exige de l'énergie métabolique sous forme d'ATP [130 , 139].



### IV.3.3. Bio-photolyse directe

Cette méthode est utilisée par l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* qui possède une hydrogénase à fer qui est très sensible à l'oxygène [140]. Elle implique l'absorption de la lumière par les deux photosystèmes (PSI, PSII) pour dissocier deux molécules d'eau et libérer de l'oxygène et des électrons, qui seront utilisés soit pour réduire le  $\text{CO}_2$ , soit sont eux même transportés via des porteurs (Ferrédoxine) jusqu'à une hydrogénase pour les réduire en hydrogène gazeux (Figure IV.5).

Des études de carences en soufre ont montré qu'il diminue l'activité du PSII et donc la libération d'oxygène par photolyse de l'eau. L'oxygène résiduel est alors consommé par la respiration et le milieu devient anoxique, ce qui permet la production d'hydrogène. Ainsi que la présence d'acétate qui augmente le taux de la respiration [140].

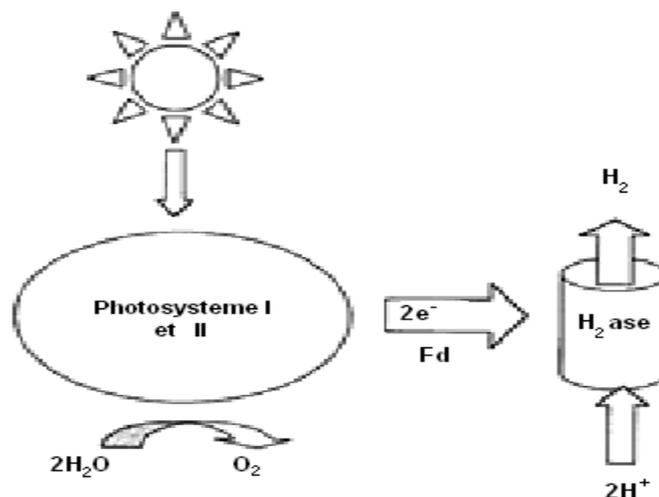


Figure IV.5 : La bio-photolyse directe [130].

### IV.3.4. Bio-photolyse indirecte

Cette méthode est utilisée par les cyanobactéries et repose sur le fait de la séparation temporelle et/ou spatiale entre la production de l'oxygène et la production de l'hydrogène [30]. Dans la première phase, les conditions sont favorables à la photosynthèse pour permettre ainsi la croissance et l'accumulation des réserves. Dans une deuxième phase, il se produit une

fermentation pour le déplacement de l'oxygène produit. Enfin, dans une dernière phase à l'obscurité et en limitation d'azote, lors que l'anaérobiose est bien établie, il y aura production sous l'activité d'hydrogénase. Le processus se poursuit en présence de lumière, si l'anaérobiose est maintenue [130] (Figure IV.6).

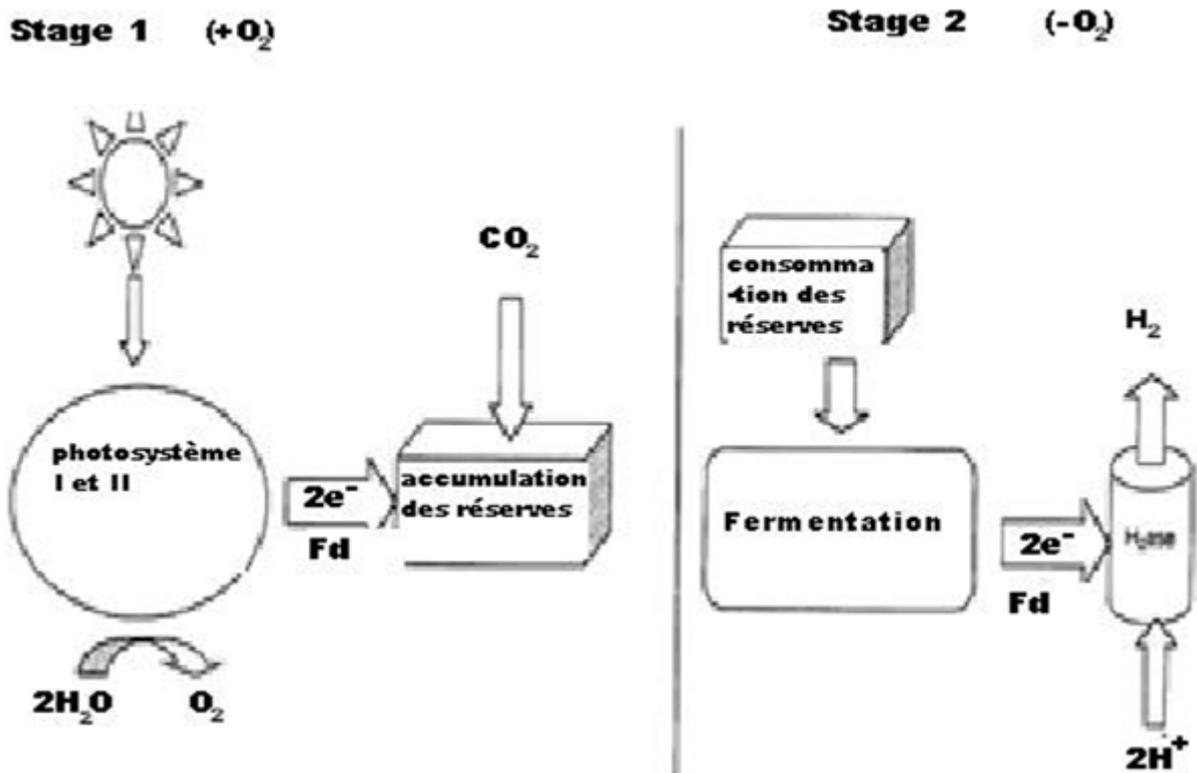


Figure IV.6 : Bio-photolyse indirecte [130].

#### IV.3.5. Photo-fermentation

Cette méthode (Figure IV.7) est utilisée, particulièrement, par les bactéries pourpres comme *Redosperillum*. Parmi ses avantages, on cite le fait que plusieurs substrats peuvent être utilisés tels que les acides organiques [141] et le manque du photosystème II responsable de la production d'oxygène qui inhibe la production d'hydrogène [130, 139].

Ici, la production d'hydrogène est associée à l'action de la nitrogénase, qui en absence d'azote, en condition d'anaérobiose et en présence de lumière, catalyse la réduction des protons en hydrogène [141].

Cependant, l'inconvénient majeur de ce type de production est que les micro-organismes utilisent généralement la nitrogénase pour produire de l'hydrogène. Cette enzyme nécessite plus de l'énergie (16 ATP) pour produire de l'hydrogène et de plus elle est lente comparée à l'hydrogénase NI-Fe [130, 139].

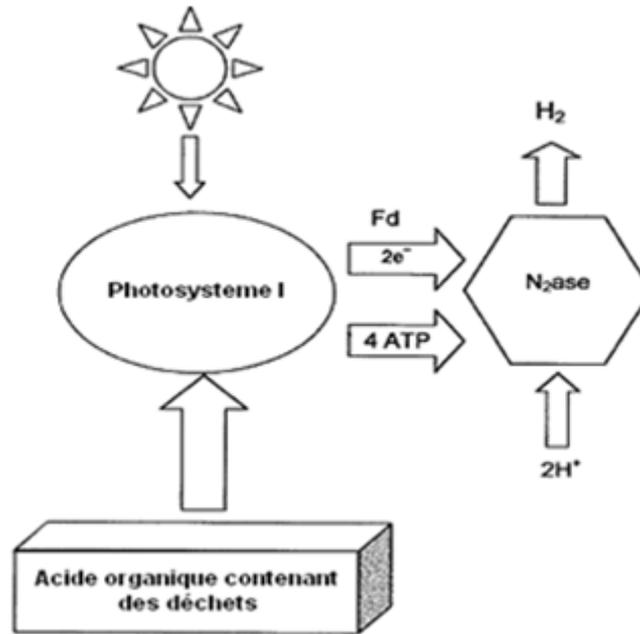


Figure IV.7 : La photo-fermentation [139]

#### IV.3.6. Fermentation à l'obscurité

Elle se déroule en absence de lumière et en anaérobie strict sur *Clostridium*. Théoriquement la valeur maximal d'hydrogène produite est de 4 moles par mole de glucose [132, 142] Ceci est une conséquence naturelle du fait que les fermentations ont été optimisées par l'évolution pour produire la biomasse cellulaire et pas l'hydrogène (voir Figure IV.8):

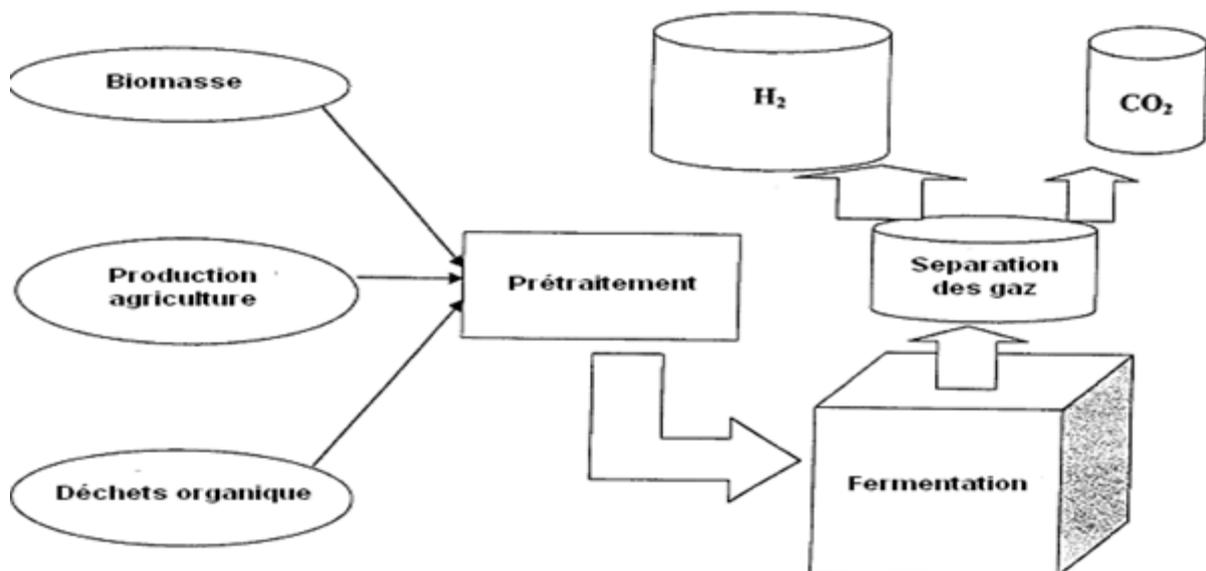


Figure IV.8 : Hydrogène produit par fermentation à l'obscurité [139].

L'utilisation de chacun des procédés de production d'hydrogène précèdent a ses avantages et ses inconvénients (Tableau IV.1).

**Tableau IV. 1 : Avantages et inconvénients des différents processus biologiques d'obtention d'H<sub>2</sub> [143]**

Processus	Avantages	Inconvénients
Bio-photolyse directe	A partir de H <sub>2</sub> O, Fermentation à l'obscurité, Pas de production de CO <sub>2</sub> .	Présence de lumière, production d'inhibiteur O <sub>2</sub> , Hydrogénase consommatrice d'H <sub>2</sub> .
Bio-photolyse indirecte	A partir de H <sub>2</sub> O, Nitrogénase.	Présence de lumière, production d'inhibiteur O <sub>2</sub> .
Photo-fermentation	Présence de plusieurs substrats carbonés. Pas de production d'oxygène.	Nitrogénase consommatrice d'ATP, Réaction lente.
Fermentation à l'obscurité	Production sans lumière, Production d' H <sub>2</sub> avec plusieurs substrats carbonés. Pas de production d'oxygène.	Produits de fermentation doivent subir un traitement pour éviter les risques de pollution d'eau. Etape de séparation des gaz produit (CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> )

#### IV.4. Pourquoi la *Spiruline* ?

La *Spiruline* a fait preuve de ses effets thérapeutiques et sanitaires. On devrait promouvoir l'application de cet organisme dans le domaine pharmaceutique et les industries nutraceutique. Il est prévu que *Arthrospira* continuera à agir en tant qu'espèces des plus importantes de l'industrie de la biotechnologie des cyanobactéries au cours de la prochaine décennie ou même pour plus longtemps [48]. Les bioprocédés de production des biomasses de la culture de *Spiruline* sont de plus en plus maîtrisées et sont caractérisées par :

- Résistante à la contamination, culture dans un milieu riche en bicarbonate (> 15 g/L) avec pH optimal de croissance de 8,5 [144],
- Différentes voies métaboliques du carbone : photo-trophie, hétéro-trophie et mixo-trophie. Cela conduit à des perfectionnements en productivité de biomasse. [48],
- Pas de production de composés indésirables comme les toxines fréquentes trouvées chez les bactéries hétérotrophes, de fermentation à obscurité [22],

- Hydrogénase bidirectionnelle et absence de nitrogénase [145]. L'hydrogénase bidirectionnelle nécessite beaucoup moins d'énergie métabolique, mais est extrêmement sensible à l'oxygène [146],
- Biophotolyse indirecte Pas d'hydrogénase de prise, consommatrice d'H<sub>2</sub> [147,148].

#### **IV.4.1. Physiologie de production d'hydrogène chez *Arthrospira platensis***

##### **A/ Métabolisme biochimique**

La *Spiruline* est une bactérie photosynthétique productrice de bio-hydrogène possédant la capacité d'utiliser plusieurs voies métaboliques. L'enzyme clé de cette production est une hydrogénase dite bidirectionnelle ou réversible trouvée dans certaines cyanobactéries [149].

De plus, l'hydrogénase réversible est une enzyme multi-métrique composée soit de quatre ou cinq sous-unités différentes selon les espèces [48,144]. Il s'agit d'une [Ni-Fe] hydrogénase de type NAD(P) composée d'un dimère d'hydrogénase de gène *hoxYH*.

La maturation des hydrogénases bidirectionnelles nécessite l'action de plusieurs protéines auxiliaires appelées collectivement protéines *hyp* (gènes: *hypF*, *hypC*, *hypD*, *hypE*, *hypA*, et *hypB*)[150].

L'évolution de l'hydrogène auto-fermentatif a été signalée pour *Spirulina platensis* [151, 152]. *Spirulina platensis* produit de l'hydrogène, de l'éthanol et des acides organiques de faible poids moléculaire de manière auto-fermentative en anaérobie et dans l'obscurité [153].

##### **B/ Mécanisme de production d'hydrogène**

L'énergie solaire capturée est utilisée pour cliver l'eau, libérer de l'oxygène et réduire la ferredoxine [154]. La ferredoxine réduite peut participer à un certain nombre de réactions métaboliques telles que la réduction de la plastoquinone et conduisant ainsi à la photophosphorylation cyclique à travers le photosystème I [154].

En outre, la ferredoxine réduite peut à son tour réduire le NADP en NADPH par l'action de la ferredoxine-NADP<sup>+</sup> réductase (figure IV.9). NADPH sert de donneur d'électrons à l'hydrogénase et conduit à la production d'hydrogène par système *Hox* Bidirectionnel (réversible) ou peut conduire à la fixation de CO<sub>2</sub> par le cycle de Calvin.

Vanderoost et al (1983) suggèrent que la fonction physiologique de l'hydrogénase est principalement destinée à fournir des protons comme accepteur d'électrons alternatif afin d'éliminer les équivalents réducteurs en excès dans des conditions anoxiques pour *A. maxima*[155].

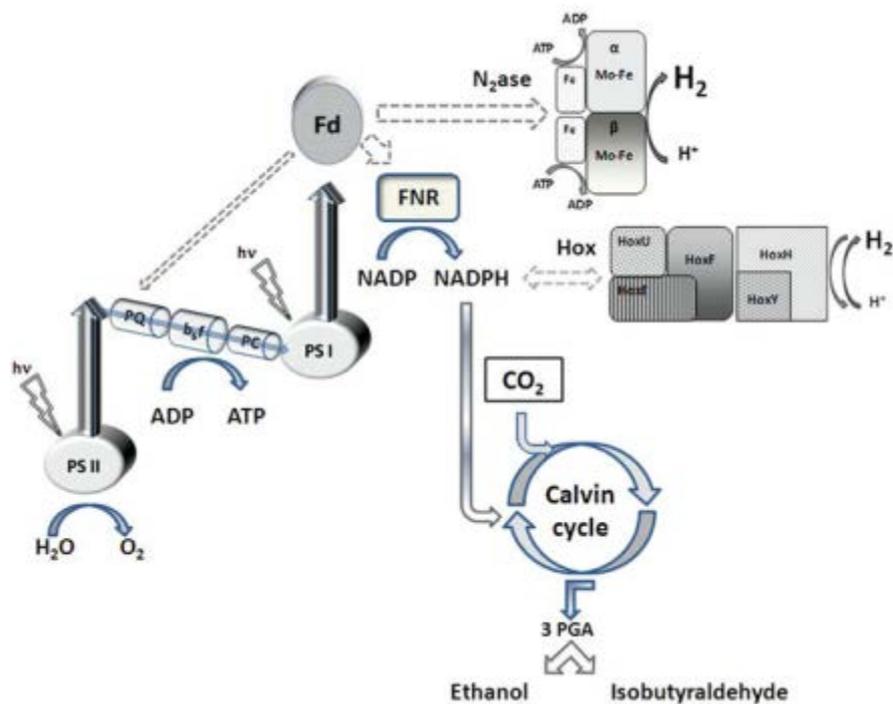


Figure IV.9 : Chemins de bio-production d'hydrogène chez cyanobactéries. [48].

### C/ Facteurs influençant la production d'hydrogène

#### La salinité

L'augmentation de la salinité réduit la production d'hydrogène. Cela se produit probablement en raison du détournement d'énergie et des réducteurs pour l'extrusion d'ions  $\text{Na}^+$  à partir des cellules [146, 156].

#### La lumière

Certaines cyanobactéries produisent de l'hydrogène en présence de lumière alors que d'autres le produisent dans les conditions lumière-obscurité. Les cellules fixant l'azote de *A. variabilis* SPU 003 ont la capacité de produire de l'hydrogène principalement dans l'obscurité. Il a été démontré qu'*Arthrospira* est capable d'accumuler du glycogène, sous une lumière élevée et la limitation de l'azote.

*Spirulina platensis* produit de l'hydrogène de façon optimale à 32 °C en anaérobie et à l'obscurité totale. Alors que *Spirulina Arthrospira* le fait en anaérobie et à la fois dans l'obscurité et dans la lumière [151].

### **La Température**

Il existe une variation de l'exigence de température optimale de production d'hydrogène selon les espèces de cyanobactéries. La gamme optimale commence à partir de 30 °C [146]. La *Spiruline* produit de l'hydrogène dans la plage de températures 30- 34 °C et de façon optimale à 32 °C en anaérobiose et dans l'obscurité totale. [146].

### **Les micronutriments**

De nombreux oligo-éléments comme Cu, Co, Mo, Zn et Ni montrent une amélioration prononcée de la production d'hydrogène en raison de leur implication dans l'enzyme. L'adaptation au nickel permet une accumulation normale de biomasse tout en augmentant de manière significative le taux de production d'hydrogène fermentatif chez *Arthrospira maxima* [157].

## **IV.5. Amélioration de la production d'hydrogène**

### **IV.5.1. Amélioration génétique**

Des modifications génétiques obtenues par sélection de souches présentant une amélioration dans l'évolution d'hydrogène sont proposées par Willson et al. (1984) dans leur étude sur mutants de *Rhodobacter capsulatus* (*IR4*) incapables de dégager par voie photo-autotrophique H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. Certains de ces mutants se sont révélés produire des quantités accrues de d'hydrogène à partir de divers substrats organiques.[158]. Cette surproduction d'H<sub>2</sub> n'a pas été liée à des défauts spécifiques dans les enzymes du métabolisme autotrophe, mais elle est plutôt due à un métabolisme du carbone altéré qui affecte le flux d'équivalents réducteurs des substrats organiques à la nitrogénase. Le taux de production d'H<sub>2</sub> par la souche mutante *IR4* dans le milieu D-malate/glutamate est de 32,8  $\mu\text{L}/\text{mgPS.h}$  alors que celui obtenu sur un type sauvage est de 14,6  $\mu\text{L}/\text{mgPS.h}$ .

L'effet inhibiteur de l'oxygène généré durant la photosynthèse a été étudié par Cournac et al. (2004) sur une cyanobactérie non fixatrice d'azote *Syncehocystis PCC 6803 (M55)* [158]. Il est démontré que certaines mutants manquant de NADPH-déshydrogénase produisent seulement de faibles quantités d'oxygène dans la phase lumineuse et se distinguent par une faible capacité de fixation de CO<sub>2</sub>. Par conséquent NADPH s'accumule dans les cellules mutantes M55 qui pourraient redirigé le flux d'électrons vers [Ni-Fe] hydrogénase bidirectionnelle NAD (P)-dépendante. ) [158].

### IV.5.2. Effet de Micronutriments

Des oligo-éléments tels que le cobalt, le cuivre, le molybdène, le zinc et le nickel sont engagés dans les voies métaboliques de l'hydrogène [160]. Beaucoup de ces métaux ont montré une augmentation prononcée de production d'hydrogène. *Anabaena variabilis SPU003* est très sensible aux ions Co, Cu, Mn, Zn, Ni, Fe et ne montre pas de production d'hydrogène à des concentrations inférieures à 10 mM de ces ions [161]. Une culture d'*Anabaena cylindrica* cultivée avec 5,0 mg d'ions ferriques par litre produit de l'hydrogène à un taux d'environ deux fois celui de la culture développée avec 0,5 mg d'ions ferriques par litre [161].

Dans leurs travaux, Damian Carrieri et al (2008) ont constaté une amélioration de l'activité hydrogénase chez *Arthrospira maxima* dans des extraits cellulaires (in vitro) et des cellules entières (in vivo) est en corrélation avec la quantité de  $Ni^{2+}$  dans le milieu de croissance. L'adaptation permet l'accumulation normale de la biomasse tout en augmentant sensiblement le taux de production d'hydrogène fermentaire. Par rapport au milieu sans nickel, l'activité moyenne de l'hydrogénase dans les extraits cellulaires (in vitro) augmente de 18 fois plus, tandis que le taux moyen de production de  $H_2$  intracellulaire dans les cellules intactes augmente de 6 fois avec un taux de 0,74623 mmol  $H_2$ /h,L de culture. Cette augmentation peut être liée à la supplémentation en nickel qui peut augmenter l'expression des gènes de structure et/ou de maturation de protéine hox qui donne lieu à des niveaux accrus de sous-unités d'hydrogénase [157].

### IV.5.3. Les photo-bio-réacteurs

L'utilisation de réacteurs tubulaires verticaux pour la production d'hydrogène est compromise par le type de système d'agitation, dans lequel le bullage d'un gaz inerte dilue le courant d'hydrogène. Avec une circulation continue d'argon, une efficacité de conversion légère de 1,1 % a été atteinte en semi-continu [162]. Bien que la recirculation de l'hydrogène produit soit une solution suggérée [163] mais ces procédés engendrent une dilution importante de gaz produit et nécessitent une étape de séparation de gaz inerte de l'hydrogène qui se répercute sur l'efficacité de système.

Les tubes en boucle et les réacteurs tubulaires presque horizontaux ont été remarquables pour la production d'hydrogène. Cependant, le problème majeur de ce type de réacteur reste le maintien du point optimal de la température [164], en raison d'un sur-chauffage probable. A cet effet, différentes solutions ont été proposées pour maintenir la température à un niveau bas

dans le PBR telles que : le refroidissement par évaporation, la pulvérisation d'eau à la surface du tube, l'immersion des tubes dans un bassin d'eau où la température est contrôlée [165]. L'autre problème à régler est l'exposition des cultures au stress dû à l'oxygène engendré durant la photosynthèse pouvant dépasser les concentrations critiques supérieures dans le cas des grandes capacités volumiques.

Dans les bioréacteurs hélicoïdaux ( $S/V = 200 \text{ m}^{-1}$ ) la production de  $\text{H}_2$  a lieu en deux étapes chez *Anabaena azollae* et où il est suggéré l'utilisation de boules de mousse de polyuréthane pour empêcher le dépôt de la culture sur les parois internes du PBR [166]. Par ailleurs, de nombreuses modifications du cadre hélicoïdal ont été proposées afin d'améliorer la distribution de lumière dans le photo-bio-réacteur [167].

Néanmoins, afin d'améliorer le problème de pénétration de la lumière dans les profondeurs de la culture, Ogonna et Tanaka (2000) [5] proposent l'acheminement de la lumière à l'aide de fibres optiques et de capteurs lumineux intégrés dans le PBR. Cette technique assure un supplément de lumière au système séquentiel photo-autotrophe/hétérotrophe permettant de développer les cultures en mixo-trophie et à des concentrations élevées.

Qiang et al. (1998) [168] sont arrivés à des résultats très concluants en agissant sur le débit de sortie du PBR par combinaison des trois paramètres : intensité lumineuse, trajet optique et densité de culture. Ils améliorent, de la sorte, le taux de croissance spécifique de 20 % et arrivent à doubler le débit de sortie.

Hsieh et Wu (2009) ont conçu un PBR à chambre rectangulaire transparente à différentes épaisseurs. Les chambres, fabriquées en acrylique transparent, guident la lumière dans les profondeurs du photo-bio-réacteur et conduisent à la production de biomasse totale 56 % supérieure à celle des systèmes de cultures similaires sans chambres. [169]

## V. Matériels et Méthodes

La première partie de ce chapitre a été consacrée à la caractérisation morphologique et physiologique de la souche *Arthrospira platensis*, à la recherche des conditions qui permettent l'optimisation des facteurs du milieu et l'amélioration de la productivité de culture sur différents PBR, y compris le bioréacteur conçu au Laboratoire.

La deuxième étape a porté, quant à elle, sur le développement de la production d'hydrogène par la *Spiruline* sur différentes formes de PBR, et sur le repérage de meilleures conditions physiologiques permettant d'augmenter la bio-production d'hydrogène. Il s'agit, entre autres, de l'influence de l'intensité lumineuse et de la concentration initiale de culture,...

### V.1. Production de biomasse

#### V.1.1. La souche de *Spiruline*

Au cours de ce travail, nous avons utilisé une souche de spiruline «*Spirulina platensis* » en provenance du sud de l'Algérie connue sous le nom spiruline *BEHATAM* (Boileau, Etienne, Hiri Abdelkader, Tamanrasset). La souche a été entretenue au niveau du Laboratoire de Biotechnologies Environnementales et de Génie des Procédés (*BIOGEP*) de l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger. La souche de *Spiruline* est une cyanobactérie, photosynthétique, mésophile et aérobie, vis à vis de la source de carbone. Elle est autotrophe, mais elle peut développer d'autres voies métaboliques telles que la mixotrophie et l'hétérotrophie [170]. La souche de *Spiruline* est utilisée conjointement pour l'optimisation du réacteur et la production d'hydrogène.

#### V.1.2. Isolement de la *Spiruline* en cultures pures

L'obtention d'une culture axénique et l'isolement de *Spiruline* sur des boîtes gélosées constituent l'étape de départ permettant l'élimination des flores bactériennes qui restent attachées aux parois des cyanobactéries. Au fait, Séparer les algues des bactéries est particulièrement difficile avec les algues bleu-vert capsules de muco-protéine sur lesquelles les bactéries adhèrent tenacement. Les contaminants viablesensemencés en boîte gélosée avec la *Spiruline* prolifèrent rapidement et dominent le milieu.

De nombreux traitements sont utilisés pour séparer les algues des contaminants, soit par lavage en centrifugation et filtration, soit en utilisant divers Antibiotiques, soit par dilution, soit par irradiation ultraviolette des cultures ou par des combinaisons de ces procédures [171].

Quant à l'isolement de la *Spiruline*, [172] suggèrent le protocole suivant :

- A partir de 50 mL d'une culture centrifugée, à 6000 g, environ 0,8 mL de culot (cellules) est mélangés avec 2 gouttes de détergent *ARKO*, plus agitation

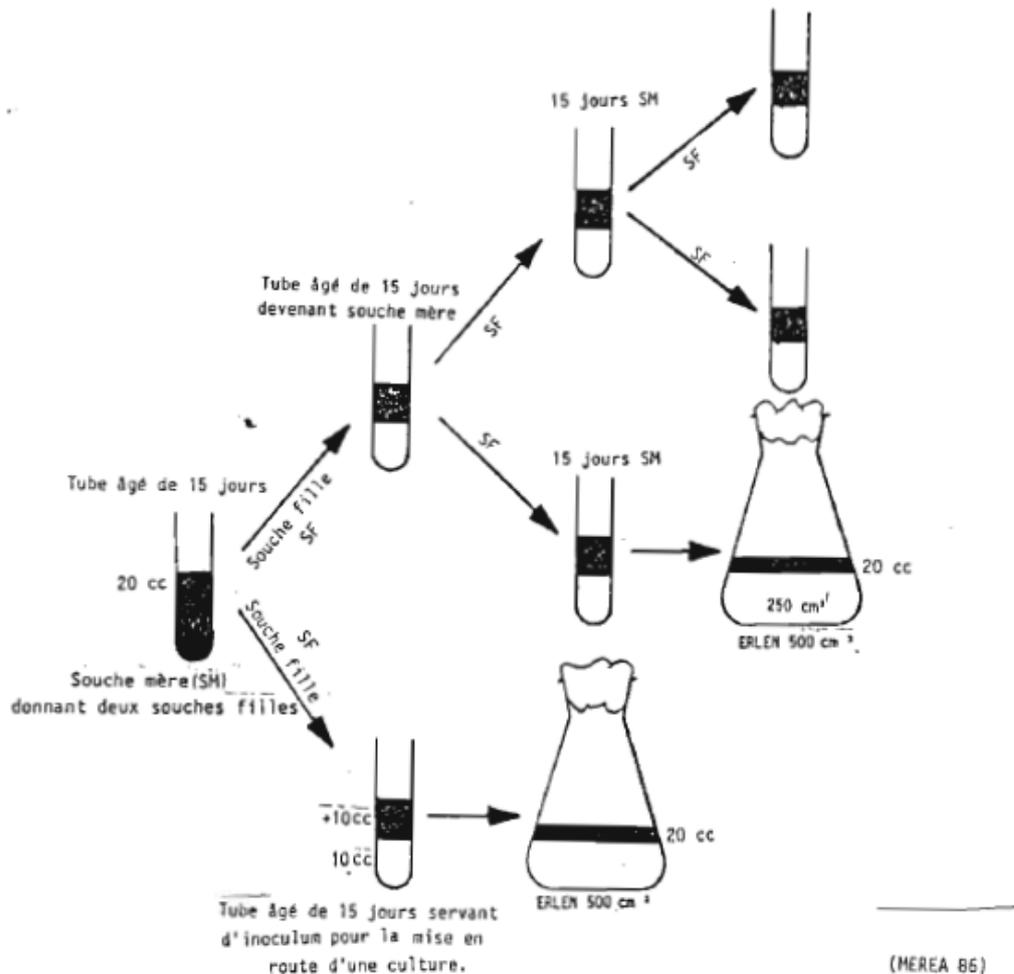
- Ajout de 8 mL de solution de phénol à 1% à 2 mL du mélange précédent et agitation pendant 20 min se puis centrifugation pendant 5 min,
- Ajout de 10 mL d'eau distillée aux cellules (surnageant jeté) puis agitation vigoureuse au vortex laboratoire pour disperser les cellules,
- Après une autre centrifugation de 5 min, le résidu du culot est utilisé pour ensemencement. Les boites ont été préparées à partir du milieu de culture Zarrouk à plus 2% d'agar - 0,5% de dextrose et un minimum d'humidité. L'étape de séchage à la surface de la boite gélosée est importante pour la croissance distincte des colonies,
- De petites quantités de culot ont étéensemencées par stries en surface. Les boites sont scellées avec du ruban adhésif,
- Incubation à la température 25-30°C sur une table lumineuse. Les bactéries, encore viables, se développeront en 24 h. Les colonies d'algues seront visibles après 2 à 4 jours,
- Les boites pures sont sélectionnées pour pré-culture. L'élimination des contaminants bactériens sera vérifiée à l'examen des frottis colorés au gram.

### **V.1.3. Culture de la *Spiruline* au laboratoire**

La quantité de *Spiruline*, nécessaire à l'étude, est obtenue par ajout quotidien de petite quantité de culture pure de 100 mL. C'est ainsi que de petits volumes de milieu de culture sont additionné, chaque jour, les uns aux autres jusqu'à obtention d'un volume suffisant pour réaliser les étapes expérimentales. Les étapes de préparation des cultures et pré-cultures sont schématisées sur la figure V.1

Afin de maintenir les souches en bonne condition, elles doivent être repiquées tous les quinze jours. En effet, cette durée du repiquage est idéale pour conserver la culture jeune avec un bon potentiel de multiplication. Le repiquage sert à dédoubler une souche mère pour obtenir deux souches filles : une souche fera, au bout de quinze jours, offre de souche mère, l'autre souche fille permettra une éventuelle mise en route d'une culture [173].

La phase de latence est due à l'adaptation des cultures avant une reprise de la multiplication. Plus la culture est âgée, plus la phase de latence est longue d'où l'intérêt de repiquer la souche pendant la phase exponentielle.



**Figure V.1 : Entretien de la souche et mise en route d'une culture [173].**

#### V.1.4. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture doit contenir tous les éléments nécessaires à la croissance de la *Spiruline*. Généralement, le milieu utilisé est basé sur le milieu original de ZARROUK (1966)[116] qui est typiquement composé d'eau, du carbonate/bicarbonate de sodium, d'une source d'azote, du phosphore, du fer et d'autres minéraux de [174]. Il doit comporter, tout au moins, les éléments suivants [175] [manuele jourdane] Tableau V.1:

- Le bicarbonate de sodium, source d'alcalinité ;
- Le phosphore, indispensable à la photosynthèse ;
- L'azote, constituant important des acides aminés, apporté principalement par l'azote minéral  $\text{NaNO}_3$  atmosphérique et aussi par l'urée ;
- Le carbone, nourriture principale de la *Spiruline*, apportée principalement par le gaz carbonique, bicarbonate et aussi par le sucre ;
- Les métaux : essentiellement le fer, le bore et le magnésium

**Tableau V.1 : Milieu de culture Zarrouk [22]**

<i>Elément</i>	<i>Quantité (en g/l de solution aqueuse)</i>
NaHCO <sub>3</sub>	16,8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
NaCl	1
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,04
FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,01
EDTA	0.08

A chaque litre de cette composition, on a ajouté 1 mL de chacune des solutions d'oligo-éléments A5 et B6 (Tableaux V.2 et V.3).

**Tableau V.2 : Composition de la solution A<sub>5</sub> [22].**

	Quantité en mg/L
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	22.9
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> , 24 H <sub>2</sub> O	96.0
NiSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	47.8
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	17.9
Ti <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	40.0
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	44.0

**Tableau V.3 : Composition de la solution B<sub>6</sub> [22].**

	Quantité en g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	0.08
MoO <sub>3</sub>	0.015

La quantité finale obtenue est répartie dans des flacons de 250 mL , stérilisés á 120°C pendant 15min et gardés à l'obscurité.

### **V.1.5. Caractérisation de la souche utilisée**

La caractérisation de la souche est suivie sur le plan morphologique et culturel en déterminant le poids sec et les paramètres cinétiques de croissance.

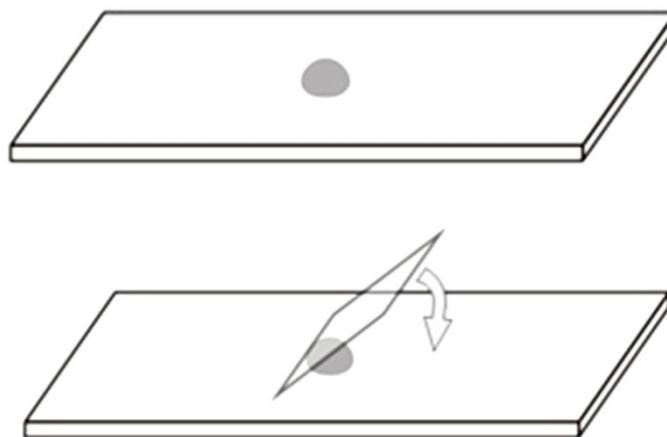
#### **V.1.5.1 Caractérisation morphologique**

La morphologie est un caractère bien développé chez la *Spiruline* et permet de distinguer entre la *Spiruline* et les espèces voisines. Elle constitue un caractère d'orientation et d'identification de la *Spiruline*. La morphologie est étudiée par des observations microscopiques réalisées à différents agrandissements à l'état frais et à l'état de frottis.

#### **A/ Etat frais**

Le test à l'état frais permet d'observer les bactéries vivantes[176]. Ce qui permet de mettre en évidence la mobilité, le mode de groupement et une approche sur la morphologie de la *Spiruline* à partir d'une culture jeune en milieu liquide (7 jours) : [ 22]

- Homogénéisation de la culture liquide à prélever.
- Prélèvement d'une goutte de culture liquide (à l'aide d'une pipette Pasteur ou à l'anse de platine) et dépôt sur une lame propre.
- Pose de la lamelle, en partant d'une position inclinée à 45°.



**Figure V.2 : Préparation de la lame à l'état frais**

Les observations sont obtenues au microscope optique de grossissement X40, X10, X 400, X1000 à l'aide d'une camera de marque SAMSUNG<sup>R</sup>.

### ***B/ Coloration de Gram***

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste Danois *Hans Christian Gram* 1884. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer.

A cet effet, il faut suivre le protocole :[177]

- Frottis et fixation ;
- Coloration au violet de gentiane des bactéries ;
- Rinçage à l'eau de robinet ;
- Ajout du réactif de Lugol (1 min) accentuant la coloration ;
- Rinçage à l'eau de robinet ;
- Epreuve alcool résistance : Plonger 3 ou 4 fois pendant une demi-seconde dans un pot d'alcool puis rincer à l'eau du robinet immédiatement. Pendant cette étape, les lipides de la paroi des Gram moins sont dissous et l'alcool peut donc pénétrer dans le corps bactérien et expulser le violet de gentiane. Les bactéries Gram moins sont alcool-sensibles et sont donc décolorées. La paroi des Gram plus ne laisse pas passer l'alcool et sont dites alcool-résistantes et restent colorées en violet ;

- Contre coloration : safranine pendant 1 min. Les bactéries « Gram négatives », recolorées par la fuschine, apparaissent roses ; Les « Gram positives » apparaissent garde la couleur de premier colorant donc apparaissent violettes,
- Rinçage à l'eau de robinet et séchage entre deux feuilles de papier absorbant ;
- Observation à l'objectif 10 ; 40 et 100 à immersion, à pleine lumière.

#### V.1.5.2. Détermination du poids sec

La concentration de biomasse est suivie par la mesure de la densité optique à  $\lambda_{\text{max}} = 618 \text{ nm}$  par spectrophotométrie (spectrophotomètre UV/visible mini 1240 SHIMATZU). Une courbe d'étalonnage est établie à partir des valeurs des densités optiques et les concentrations en poids sec de la culture. A partir d'une culture dense, on prépare une série de dilution de culture (en moyenne 5) et on détermine les densités optiques des différentes dilutions réalisées.

Le poids sec des cultures est déterminé selon la méthode de vanshak (1982), [178] :

- Les échantillons contenant 25- 50 mL de suspension d'algues sont filtrés à travers un filtre *Whatman* (n°4 - 47 mm de diamètre) séché, au préalable, dans un four pendant 24 h ou pendant une nuit à 70 °C et pesé avant la filtration ( $P_0$ ) ;
- Les filtres sont lavés avec 20 mL d'eau acidifiée (pH 4) ;
- Ils sont placés, ensuite, dans des boîtes de pétri en verre dans le four pour une durée de 24 h à 70 °C ;
- Après avoir refroidi le filtre dans un dessiccateur (20 min), il est pesé de nouveau ( $P_1$ ). Le poids sec est calculé selon l'équation ci-dessous :

$$Ps = (P_1 - P_0)/V \dots\dots\dots (1)$$

Où :

$P_s$  : poids sec de la biomasse,

$P_1$  : poids chargé de filtre,

$P_0$  : poids vide du filtre,

$V$  : volume filtré de culture.

#### V.1.5.4. Détermination du paramètre cinétique de croissance

La productivité volumique et le taux de croissance sont les deux paramètres cinétiques suivis durant la croissance de la *Spiruline*. Le calcul de la productivité permet d'apprécier la production de biomasse, de situer les performances de notre souche et des différents photo-bio-réacteurs. D'après Sierra et al. (2008) [118], la conception des photo-bio-réacteurs doit être optimisée pour chaque espèce de micro-algues, par rapport à ses caractéristiques physiologiques et à ses caractéristiques de croissance.

La variation de production de la biomasse algale est néanmoins liée à la structure des photo-bio-réacteurs utilisés, aux procédés d'agitation, ainsi qu'aux divers contrôles physico-chimiques et biologiques [179- 181] En outre, au-delà des considérations d'ordre technique liées à la conception et au suivi des systèmes de production en masse, la vitesse de croissance des micro-algues est en fonction des caractéristiques intrinsèques de chaque espèce et de l'influence des conditions héliothermiques et nutritionnelles [182].

La vitesse de croissance ou taux de croissance ( $\mu$  max) et la productivité volumique (Pv) sont calculés à partir des formules suivantes :

$$\mu \text{ max} = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1) \ln 2 \quad (2)$$

tel que;  $X_2$ ;  $X_1$  est la concentration de biomasse au temps  $t_2$  et  $t_1$  respectivement

$$Pv = (X_f - X_0) / (t_f - t_0) \quad (3)$$

tel que  $X_f$  : est la concentration récolté à temps  $t_f$

$X_0$  : la concentration de l'inoculum de départ

#### V.1.6. Croissance de *Spiruline* sur différentes formes de photo-bio-réacteurs

Les cultures en *Batch* de *Spiruline* sont réalisées au niveau de notre laboratoire dans des flacons de 500 mL. Les conditions d'éclairage, de température et de débit d'air sont fixées pour toutes les cultures. L'éclairage est assuré par une lumière blanche en utilisant deux tubes fluorescents de marque *Torch* pour assurer une intensité moyenne de 3000 lux, avec un cycle de photopériode/obscurité de 12 h. La température est maintenue à une valeur optimale de 32°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) à l'aide de thermostats réglables. L'agitation des cultures est assurée par barbotage d'air à l'aide de pompes à air stériles avec un débit de 18 L/h. L'intensité de la lumière projetée à la surface des photo-bio-réacteurs a été mesurée par un luxmètre de marque *Lutron*, initialement annoncée en lux, puis convertie en densité de flux photonique photosynthétique (PPFD). Elle est exprimée en  $\mu\text{moles}$

photons  $m^{-2}s^{-1}$ , en utilisant le facteur de conversion ( $12 \mu mol \text{ photons } m^{-1}s^{-1}$ ,  $Klux^{-1}$ ) proposé par McCree, 1981 [183].

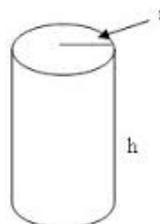
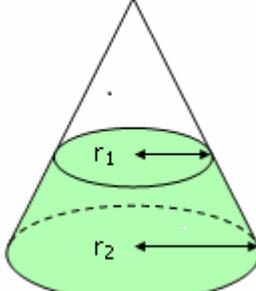
**V.2. Configuration géométrique du photo-bio-réacteur classique**

L'efficacité du photo-bio-réacteur dépendra principalement de sa géométrie et de l'accès à la lumière. Pour les besoins de cette étude, deux types de photo-bio-réacteur ont été envisagés : Un PBR de forme cylindrique et un autre de forme conique. Ils sont utilisés pour comparer les résultats de la production de biomasse et d'hydrogène obtenus.

Les cultures démarrent avec un inoculum  $X_0$  de 0.3 g/L. Le suivi de la cinétique de croissance de la micro-algue a lieu à différentes intensités lumineuses. Les conditions opératoires sont résumées dans le tableaux V.4 et la figure V.3:

**Tableau V.4 : Paramètres expérimentaux des deux photo-bio-réacteurs cylindrique et conique.**

la forme	Cylindrique			Conique	
Volume (ml)	18	250	500	250	500
Intensité Lumineuse (lux)	1000 ; 1200 ; 1500 ; 1800 ; 2000			1000 ; 1200 ; 1500 ; 1800 ; 2000	
Épaisseur en diamètre (cm)	1.5	4	8	D = 4.5 d = 2.5	D = 12 d = 4.5

Caractère	PBR cylindrique D = 5.8 cm	PBR conique
Forme		
S/V ( $m^{-1}$ )	$2/r$ (4)	$\pi \times (r_2 + r_1) \times a / (h \times \pi/3) \times (r_1^2 + r_2^2 + r_1 \times r_2) = 82 m^{-1}$ (5)

**Figure V.3 : Calcul des surfaces spécifiques des trois photo-bio-réacteurs.V.2.1. Le PBR cylindrique**

### V.2.1. Le PBR cylindrique

Les cultures sont développées en utilisant des flacons cylindriques de 500 mL avec une surface spécifique de  $50 \text{ m}^{-1}$ , des flacons cylindriques de 250 mL avec une surface spécifique de  $68 \text{ m}^{-1}$  (figure V.4) et des petits tubes à essai de 18 mL (fig V.5) de surface spécifique de  $225 \text{ m}^{-1}$ .



**Figure V.4 : PBR cylindrique 18, 250 et 500ml**

Ce type de PBR possède une surface d'exposition circulaire droite et permet une meilleure pénétration de la lumière dans la culture algale.

### V.2.2. La forme conique

Elle est assurée par adaptation de deux *Erlen-Meyer* 500 mL et 250 mL de surface spécifique de  $\dots 68.66$  et  $\dots 54.25 \text{ cm}^2$  respectivement. A cette forme géométrique correspondent deux rayons :  $r$  pour la partie supérieure de la culture et  $R$  pour la partie base du réacteur. La hauteur  $l$  forme la pente avec un angle de 60 degrés.

Ce photo-bio-réacteur offre ainsi une meilleure orientation de la surface d'exposition de la lumière (figure V.5)



**Figure V.5 : photo bioréacteur coniques et tube a essai**

### V.2.3. Intensité lumineuse

Dans cette étude, l'irradiation lumineuse est l'une des conditions environnementales à modifier au cours de l'étude. La limite inférieure et supérieure choisie pour l'irradiation lumineuse était entre 1000 Lux et 2000 Lux. Selon la loi inverse du carré pour la lumière, elle indique que l'irradiation lumineuse est inversement proportionnelle au carré de la distance de la source lumineuse [184].

$$I_1 = I_2 \cdot d_2^2 \cdot \frac{1}{d_1^2} \quad (6)$$

tel que  $d_1$  et  $d_2$  les distance qui sépare le PBR de la source lumineuse

Pour acquérir la valeur souhaitée de l'éclairement de la lumière, on ajuste la distance intercale entre la lampe fluorescente et la surface externe du photo-bioréacteur.

L'intensité lumineuse a été mesurée par un luxmètre compteur de lumière de type *TENMA 72-6693*.

### V.2.4. Nouvelle conception de photo-bio-réacteur

Le nouveau photo-bio-réacteur développé au Laboratoire est un réacteur annulaire en verre, constitué de deux structures coniques de diamètres différents placées l'une dans l'autre de manière à former une chambre de culture annulaire fermée au fond (figure V.6)

Ce photo-bio-réacteur est constitué d'une structure en verre, conique et annulaire avec une inclinaison de 83 degrés. Cette inclinaison permet une projection perpendiculaire des rayonnements lumineux à la surface du PBR.

La profondeur et l'épaisseur des cultures est le paramètre qui intervient dans la formule de calcul de la surface spécifique ( $S/V$ ) du PBR. Plus on augmente l'épaisseur ou le diamètre, plus le rapport  $S/V$  diminue.



**Figure V.6 : Schéma du PBR de conception nouvelle.**

De plus, l'épaisseur du PBR définit le trajet optique qui traverse la culture. Ainsi, la lumière s'atténue progressivement avec la profondeur de la culture, cela influe grandement sur la diffusion de la lumière et la disponibilité de la lumière au niveau cellulaire [5].

Et c'est dans ce but que les trois PBR de capacités différentes, nommés PBR1, PBR2 et PBR3, ont été construits pour quantifier les effets de l'intensité lumineuse ( $I$ ), de la concentration initiale de l'inoculum  $X_0$  et des rapports surface / volume ( $S / V$ ) sur le taux de croissance ( $\mu_{max}$ ) et de la productivité volumique ( $PV$ ). Les réservoirs des PBR ont une chambre annulaire d'épaisseur 1.25; 1.75 et 2.25 cm pour PBR1, PBR2 et PBR3 respectivement (Tableau V.5)

**Tableau V.5 : Performance des photo-bio-réacteurs conçus.**

Type	Capacité volumique (mL)	Profondeur de la culture (cm)	Rapport $S/V$ ( $m^{-1}$ ) Surface spécifique
PBR1	200	1.25	112
PBR2	500	1.75	103
PBR3	800	2.25	94

L'ouverture supérieure de la chambre de culture est coiffée d'une sortie pour limiter l'entrée de contaminants aériens. On impose une faible pression positive à l'intérieur du réacteur, ce qui réduit encore les risques de contamination. L'agitation des cultures est assurée par une pompe, avec un jet d'air filtré de débit de 20 L/h. Les trois PBR sont maintenus dans une pièce à température contrôlée de l'ordre de 32 ( $\pm 2$  ° C).

### **V.3. Procédés expérimentaux d'optimisation de la culture**

Dans cette étude, on a choisi la méthode de surface de réponse *RSM* qui est une technique efficace pour l'optimisation d'un système multi-variable. La *RSM* (méthodologie de surface de réponse) est une technique de modélisation statistique empirique utilisée pour l'analyse de régression multiple en utilisant des données quantitatives issues d'expériences correctement conçues [185].

La conception de l'expérience statistique, la conception composite centrale (CCD) et la *RSM* ont été utilisés pour étudier les effets des trois variables indépendantes sur les fonctions de réponse et pour déterminer les conditions optimales maximisant la productivité et le taux de croissance par des cultures en Batch. La procédure d'optimisation implique d'étudier la réponse des combinaisons statistiquement conçues, en estimant les coefficients et en fixant les données expérimentales aux fonctions de réponse, en prévision de la réponse du modèle équipé et en vérifiant l'adéquation du modèle. Les trois variables indépendantes choisies dans cette étude sont la concentration initiale de biomasse ( $X_1$ ), l'intensité lumineuse ( $X_2$ ) et l'épaisseur de PBR ( $X_3$ ). Les variables dépendantes (ou fonctions objectives) sont la productivité ( $Y_1$ ) et le taux de croissance ( $Y_2$ ). Les plages et les niveaux des variables indépendantes sont donnés dans le tableau V.6.

La conception composite centrale, qui est la forme la plus utilisée de *RSM*, a été utilisée pour évaluer l'influence des trois variables indépendantes dans 16 expériences. Une équation polynomiale de second ordre a été utilisée pour tenir compte des résultats expérimentaux de la conception du CCD (central composite design).

**Tableau V.6 : Gamme et niveaux de variables expérimentales testés dans la conception CCD**

Variables	Symbole		Niveau de variables		
	Actual	Coded	(-1)	(0)	(+1)
Concentration initiale de biomasse (g/l)	$X_1$	$x_1$	1	2.25	3.5
Intensité lumineuse ( $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ )	$X_2$	$x_2$	12	66	120
Rapport S/V ( $\text{m}^{-1}$ )	$X_3$	$x_3$	94	103	112

En développant l'équation de régression, la relation entre les valeurs codées et les valeurs réelles est décrite selon l'équation (3):

$$x_i = \frac{X_i - X_i^0}{\Delta X_i} \quad (7)$$

Où :

$x_i$ , valeur codée de la  $i^{\text{ème}}$  variable indépendante;

$X_i$ , valeur non codée de la  $i^{\text{ème}}$  variable indépendante;

$X_i^0$ , valeur non codée de la  $i^{\text{ème}}$  variable indépendante au point central

Et  $\Delta X_i$ , valeur de changement de pas entre le niveau bas (-1) et le niveau élevé (+1).

Les niveaux des variables et la conception expérimentale sont présentés dans le tableau V.7. Alors que l'équation polynomiale quadratique établie pour corréler la relation entre les variables indépendantes et les réponses est estimée selon:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (8)$$

Avec :

Y, réponse prédite,

$X_i$  et  $X_j$ , variables d'entrée,

$\beta_0$ , terme d'interception,

$\beta_i$ , coefficient d'effet linéaire,

$\beta_{ii}$  coefficient d'effet carré,

$\beta_{ij}$  est le coefficient d'effet d'interaction

Et  $\varepsilon$  est une erreur aléatoire.

L'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour analyser les données afin d'obtenir l'interaction entre les variables indépendantes et la variable dépendante (réponse). L'ANOVA est une méthode

statistique dans laquelle les moyens des groupes de traitement sont comparés entre eux, en tenant compte de l'ampleur des contributions à la variation globale des données [185].

Le traitement statistique des données expérimentales obtenues est réalisé par un logiciel de type Modde 6.

**Tableau V.7 : Conception expérimentale pour l'optimisation de la production de biomasse et le taux de croissance.**

Essai	Concentration initiale Inoculum, $X_1$	Intensité lumineuse, $X_2$	Rapport S/V, $X_3$
1	2.25	66	112
2	2.25	12	103
3	3.5	120	94
4	3.5	12	112
5	2.25	66	103
6	3.5	66	103
7	1	66	103
8	2.25	66	94
9	1	120	112
10	3.5	12	94
11	2.25	120	103
12	2.25	66	103
13	1	12	94
14	1	120	94
15	3.5	120	112
16	1	12	112

#### **V.4. Bio-production d'hydrogène**

La production d'hydrogène par la *Spiruline* est suivie qualitativement et quantitativement en utilisant plusieurs formes de photo-bio-réacteurs. L'analyse de l'hydrogène produit par la *Spiruline* est assurée par la méthode de chromatographie en phase gazeuse sur un appareil de type Shimatzu C8.

sur colonne 4 m carbon sieve B columns (1/8 inch, 100 to 200 meshes) à la température de 80°C.

La mesure des volumes d'hydrogène produit durant la fermentation sous l'influence de différents facteurs du milieu tel que l'intensité lumineuse (I), l'inoculum de départ  $X_0$ , la concentration de NaCl dans le milieu Zarrouk, le pH du milieu et la concentration de bicarbonate de sodium est effectué sur ...deux type de PBR classiques et nouvelle conception.

##### **V.4.1. Influence de la géométrie des photo-bio-réacteurs sur la production d'hydrogène**

Les photo-bio-réacteurs utilisés durant la production de biomasse sont repris pour la production d'hydrogène à partir de la *Spiruline*, il s'agit de :

###### **A/ Photo-bio-réacteur cylindrique**

Ce PBR est utilisé pour optimiser les paramètres physiologiques tels que la température, le pH, la concentration en bicarbonate, l'osmolarité du milieu,... permettant l'amélioration de la production de  $H_2$ . Pour ce faire, on utilise des flacons cylindriques de 500 mL avec une surface spécifique de  $50\text{ m}^{-1}$  et des flacons cylindriques de 250 mL avec une surface spécifique de  $68\text{ m}^{-1}$  (figure 4)

###### **B/ Photo-bio-réacteur de type annulaire**

Ce photo-bio-réacteur est d'une épaisseur de 1.5 cm, de surface spécifique de  $112\text{ m}^{-1}$  et d'une capacité de 200 mL de culture avec volume mort permettant le piégeage de  $H_2$ .

##### **V.4.2. Protocole expérimental de fermentation**

La *Spiruline* est une cyanobactérie filamenteuse non fixatrice d'azote, capable de produire l'hydrogène par voie photolyse indirecte en passant par une phase obscurité et une phase lumineuse. Le milieu de production est le milieu Zarrouk épuisé en azote de  $NaNO_3$ ) [21]. Les expériences ont été effectuées, en anaérobiose, sur deux types de bioréacteurs avec différents diamètres sur des cultures préparées à une densité optique de 1g/L [151].

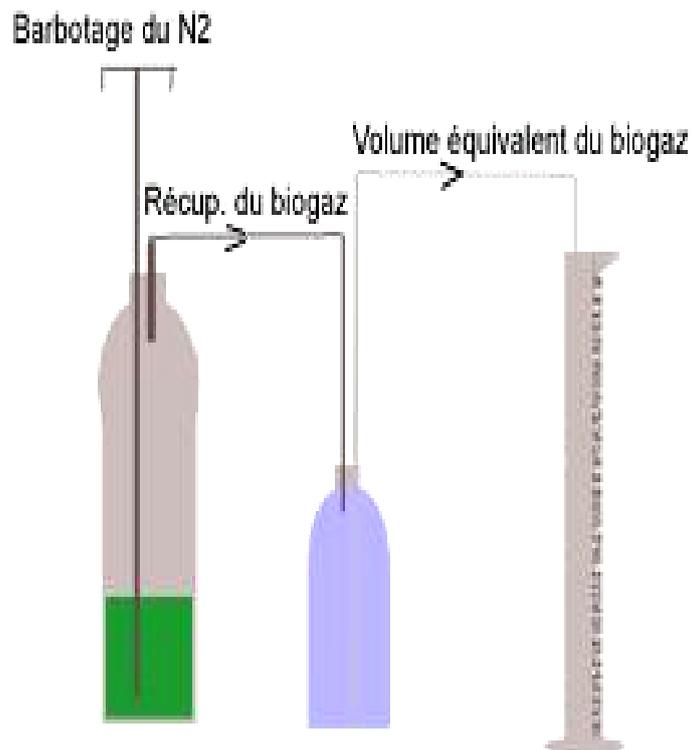
Pour éviter tout effet inhibiteur d'hydrogénase du à la présence de oxygène dans le volume mort de PBR; la culture est également barbotée dans de l'azote pendant 20 min (Figure V.7). Les éventuelles traces d'oxygène sont éliminées par introduction de 1 g/L de  $Na_2S_2O_4$  [151].

Les flacons sont ensuite incubés à l'obscurité et placés dans une étuve à une température de 32°C. Après une phase d'obscurité de 24 h, les photo-bio-réacteurs sont exposés à la lumière aux différentes intensités lumineuses : 1500, 3250 et 5000 Lux.

C'est ainsi que le bio-hydrogène est cueilli via un flacon rempli d'eau qui communique à la fois avec le flacon contenant la biomasse et une éprouvette. L'eau déplacée vers l'éprouvette correspond au volume de H<sub>2</sub> produit durant la fermentation (Figure V.8)



**Figure V.7 : Barbotage à l'azote.**



**Figure V.8 : Schéma de récupération du H<sub>2</sub>.**

#### V.4.3. Analyse d'hydrogène

L'étalonnage du chromatographe est mené par injection d'un mélange de gaz constitué de 25% H<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> à un débit de 1 L/h. Les surfaces des pics sont données par un intégrateur de type GC A8. Le facteur de réponse **K<sub>f</sub>** est calculé au moyen de l'équation :

$$X_{H_2} = K_f S_i \quad (9)$$

Où :

X<sub>H<sub>2</sub></sub> (%) : concentration massique ;

S<sub>i</sub> : aire du pic *i* ;

K<sub>f</sub> : facteur de réponse spécifique de l'hydrogène

#### V.4.4. Effet de la concentration de biomasse sur la bio-production d'hydrogène

Cette étude est menée dans le but de déterminer l'influence de la diffusion de la lumière dans la culture de biomasse. L'étude a été effectuée dans un PBR cylindrique de diamètre 8.5 cm avec trois

concentrations de biomasse, 0.4, 0.8, 1.5 et 2g/L. Les cultures ont été exposées à une intensité lumineuse de 1000 lux et une température de  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### **V.4.5. Effet de l'âge de la souche**

L'âge de la pré-culture a une grande influence sur l'accumulation des réserves sous forme d'hydrocarboné tel que le glycogène. Ce dernier servira comme source d'énergie supplémentaire d'ATP pour l'hydrogénase selon Jennady [3]. Une fois que l'âge de la culture est atteint, la biomasse préparée est filtrée de nouveau puis remise sur le milieu de production. L'étude a été faite sur quatre périodes d'âge suivante: 7 ; 12 ; 14 et 28 jours.

#### **V.4.6. Effet de la concentration en NaCl**

D'après la littérature, la souche étudiée révèle que la *Spiruline* utilisée est non halophile mais tolère un seuil de NaCl de 100 mM sans passer par une phase de préparation à l'halophilie d'adaptation [186,187].

Afin de déterminer la concentration en NaCl qui donne la meilleure production d'hydrogène et le meilleur mode de production, on a préparé 7 flacons aux concentrations suivantes : 17, 35, 50, 60, 70, 80 et 90 mM de NaCl.

#### **V.4.7. Effet de la température**

Il est connu que la température a un effet direct sur l'activité enzymatique de microorganismes fermentaires [188]. Le rendement de croissance et de production d'hydrogène est inhibé aux basses et hautes températures [189, 190]. Pour déterminer la température optimale, la production d'hydrogène est réalisée aux températures : 31, 34, 37, 39 et  $45^{\circ}\text{C}$ .

#### **V.4.8. Influence du pH**

L'étude est réalisée sur une gamme de pH voisine de la zone de neutralité et de basicité. Elle est étalée sur les valeurs du pH suivantes : 6,5 ; 7,5 ; 8 ; 8,5 ; 9 ou 9,5. Le pH optimal de production est déterminé par la meilleure production d'hydrogène obtenue [191].

#### V.4.9. Effet de la concentration en bicarbonate de sodium

La concentration en bicarbonate de sodium  $\text{NaHCO}_3$  est un paramètre important à optimiser, car il représente la source de carbone pour la biomasse [3]. Les concentrations de bicarbonate s'étalent sur une gamme de 200 à 350 mmol/L.

#### V.4.10. Effet de l'intensité lumineuse

La lumière est connue comme étant le facteur essentiel gouvernant l'efficacité des photo-bio-réacteurs. L'intensité incidente de diffusion et d'absorption de la lumière par les cellules en suspension engendre un champ de rayonnement hétérogène et par voie de conséquence différentes zones lumineuses dans les PBR [5].

On a utilisé les deux forme de PBR cylindrique et conique pour suivre l'évolution de taux d' $\text{H}_2$  sur une gamme de lumière allant de 1000 à 4000 lux et de concentration de biomasse suivante variant de : 0.5 ; 1 ; 1.5 et 2 g/L.

### V.5. Détermination des teneurs en chlorophylle

L'échantillon de 5 ml de suspension d'algues est centrifugé pendant 5 min à 3500rpm. Le culot est conservée (le surnageant est rejeté), est remis en suspension dans 5 ml de méthanol (absolu) et broyé dans un homogénéisateur. [4]

Les échantillons sont incubés dans un bain-marie, à 70 ° C pendant 2 min. Ensuite, l'échantillon est centrifugé à nouveau pendant 5min à 3500 rpm, et le surnageant transparent est utilisé pour la mesure. La densité optique est mesurée à 665 nm. on peut garder le culot pour la détermination des teneurs en protéine.

Calcule : la Densité optique mesurée à 665 nm X Facteur (dérivé du coefficient d'absorption) = C  
Concentration de chlorophylle en mg ml<sup>-1</sup> ou mg l<sup>-1</sup>, le facteur pour la *Spiruline* est 13,9.

pour exprime la teneur en chlorophylle (T) mg /g de biomasse en poids la concentration C est transformé comme suivant :

$$T \text{ (mg/g PS)} = \frac{C \cdot 1000}{X_f} \quad (10)$$

tel que  $X_f$  est la concentration de biomasse récolté au jour d'extraction de chlorophylle



D'après les figures ci-dessus, il apparaît clairement que la spiruline se présente sous sa forme filamenteuse bleu-vert. Elle est composée de cellules cylindriques formant des trichomes droits et hélicoïdales. Les filaments de la spiruline effectuent des mouvements par glissement et rotation autour de leurs axes dans le sens des aiguilles d'une montre (figure VI.1-b).

Au lancement de la culture, la spiruline présente 50 % de filaments, de forme spirale avec des extrémités arrondies. Après un mois, il est constaté que la forme longiligne devient dominante. Ce comportement est vraisemblablement dû aux conditions de croissance, qui évoluent en cours de croissance, telles que l'éclairage et la composition de milieu Zarrouk [4].

La figure (VI.2) illustre la coloration de *Gram* permettant à la fois le développement de contraste cellulaire et la détermination de la forme de microorganisme. La spiruline est suffisamment visible sous microscope optique à l'agrandissement X 400. Les trichomes apparaissent en rose foncé, *Gram négatif*, sous forme de filaments droits entrelacés avec des longueurs variables.

### VI.3. Détermination du poids sec de biomasse et courbe étalon

Le poids sec des différentes concentrations de spiruline est déterminé après séchage des cultures (figure VI.3).

Une relation directe est établie entre le poids sec des cultures et leurs densités optiques. Il ressort d'après cette figure que  $R^2$  est proche de l'unité ; ce qui reflète une bonne linéarité des points de la courbe étalon exprimée par l'équation :

$$DO = 1,148PS + 0,085 \quad , \quad R^2 = 0,967 \quad (1)$$

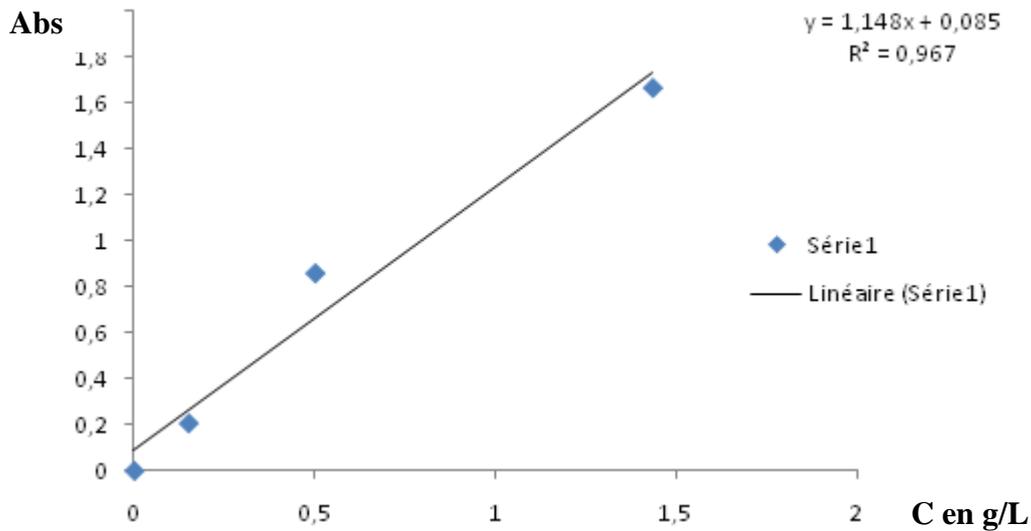


Figure VI.3 : Courbe étalon des différentes cultures.

#### VI.4. Optimisation de la production de biomasse

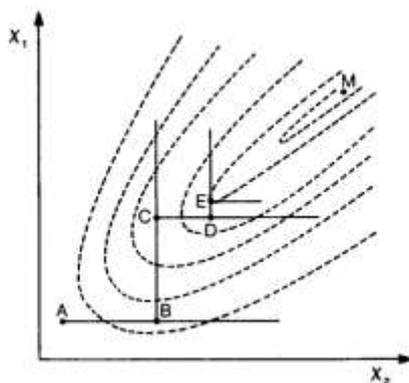
L'objectif de cette étude est d'arriver à un fonctionnement idéal du système souche- PBR tout en attachant une particularité aux possibles interactions du milieu sur les efficacités des cultures[192 , 7].

Un photo-bioréacteur assure un environnement contrôlé loin de toute éventuelle contamination. Par ailleurs, il est connu qu'une bonne exposition à la lumière permet de réduire l'effet d'ombre, cause principale de l'inhibition de la croissance des cultures. Cependant, la fragilité particulière de la souche sélectionnée pour les besoins de notre étude et sa morphologie filamenteuse imposent certaines contraintes dans la conception du photo-bioréacteur.

L'aspect clé lorsqu'il s'agit de photo-bioréacteur est l'optimisation de l'utilisation de la lumière. Une concentration de biomasse élevée affecte grandement la distribution et l'utilisation de la lumière dans le PBR. Pour une densité de biomasse trop élevée, l'intensité de lumière dans le photo-bioréacteur est fortement atténuée et conduirait à une faible croissance des micro-algues[193].

L'optimisation de tous ces paramètres peut être réalisée par deux procédés: la conception d'un facteur à un temps (conception mono-factoriel, dite classique) et le plan factoriel (conception multifactoriel, dite plan d'expérience)

La conception classique, méthode ancienne, consiste à faire varier un facteur à la fois et à le fixer à sa valeur optimale puis à faire progresser les autres. Le cheminement pour 2 facteurs est illustré par la figure VI.4.



**Figure VI.4.: Optimisation à l'ancienne.**

Le plan d'expériences est utilisé pour l'identification des facteurs influençant la production de biomasse et pour atteindre le fonctionnement optimal. Les plans factoriels permettent le calcul des interactions et sont utilisés pour l'étude d'au moins trois facteurs et de même des plans d'expériences qui fournissent des surfaces de réponses quadratiques et des valeurs de conditions opératoires optimales.

#### **VI.4.1. Effet de l'intensité lumineuse sur la cinétique de croissance**

La croissance de *spiruline* est réalisée sur deux formes de PBR conique et cylindrique. L'étude concerne le suivi de l'effet de la lumière et de la surface spécifique sur la production de spiruline.

##### **A/ Photo-bioréacteur conique**

Les cinétiques de croissance de la *spiruline* sont représentées dans les figures VI.5 et VI.6. Il vient de ces figures que la phase stationnaire est atteinte au bout de 18 et 25 jours pour les PBR 250 mL et 500 mL respectivement et que la meilleure production de biomasse est obtenue dans le PBR de faible diamètre, en l'occurrence le 250 mL.

Il est donc constaté que les concentrations de biomasse obtenues sont inversement proportionnelles à la taille du PBR. Ugwuet et ses collaborateurs (2005)[194] ont abouti aux mêmes résultats dans leur étude réalisée en 2005 et ont démontré qu'une surface d'exposition plus élevée par rapport au volume du réacteur permettait une bonne diffusion de la lumière et une bonne homogénéisation dans un PBR à faible diamètre [194].

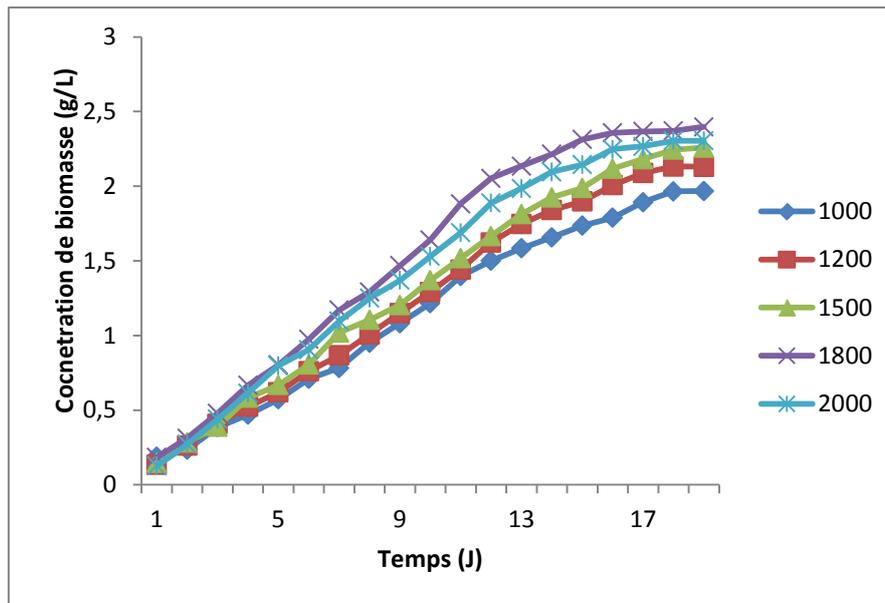


Figure VI.5 : Cinétique de croissance de la spiruline, PBR 250 mL

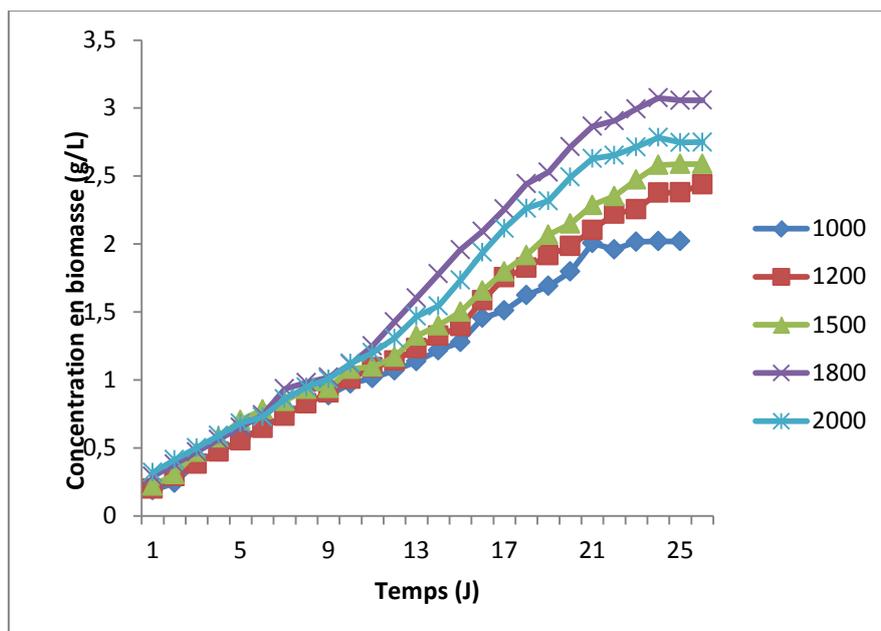


Figure VI.6 : Cinétique de croissance de la spiruline, PBR 500mL).

### B/ PBR cylindrique

L'effet de l'intensité lumineuse sur la croissance de la spiruline dans le photo-bio-réacteur cylindrique est présenté dans les figures (VI.7-VI.9).

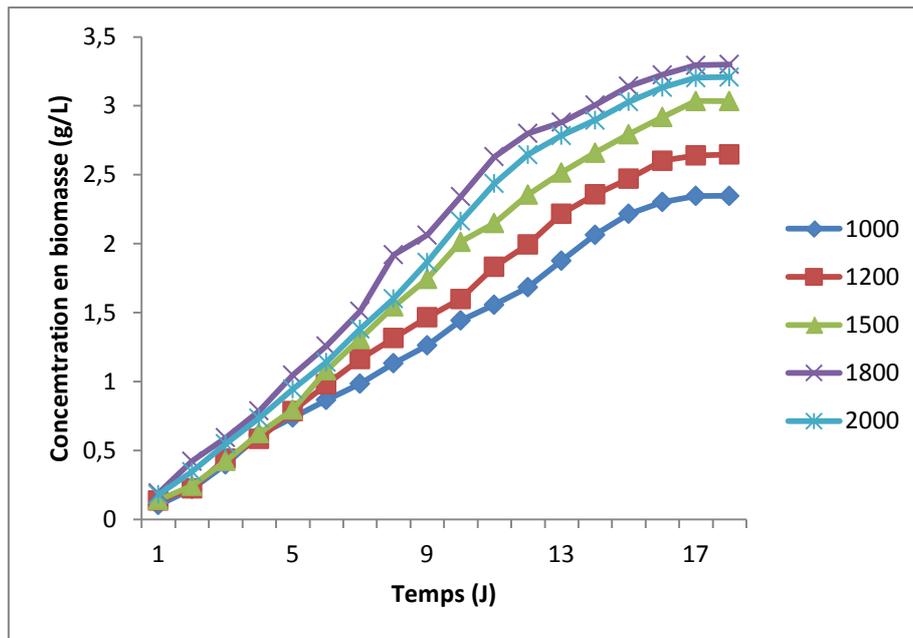


Figure VI.7: Cinétique de croissance de la spiruline. Tube à essai de 18 mL.

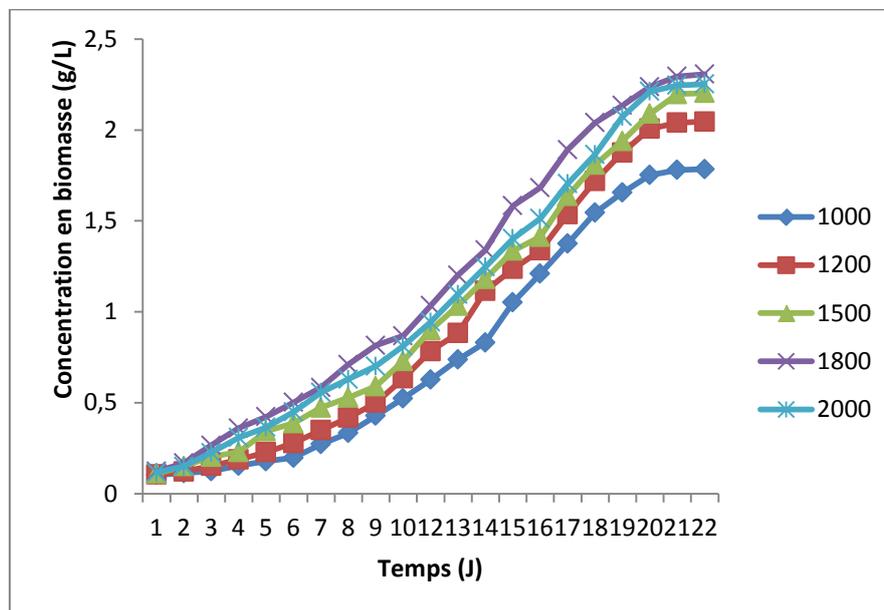
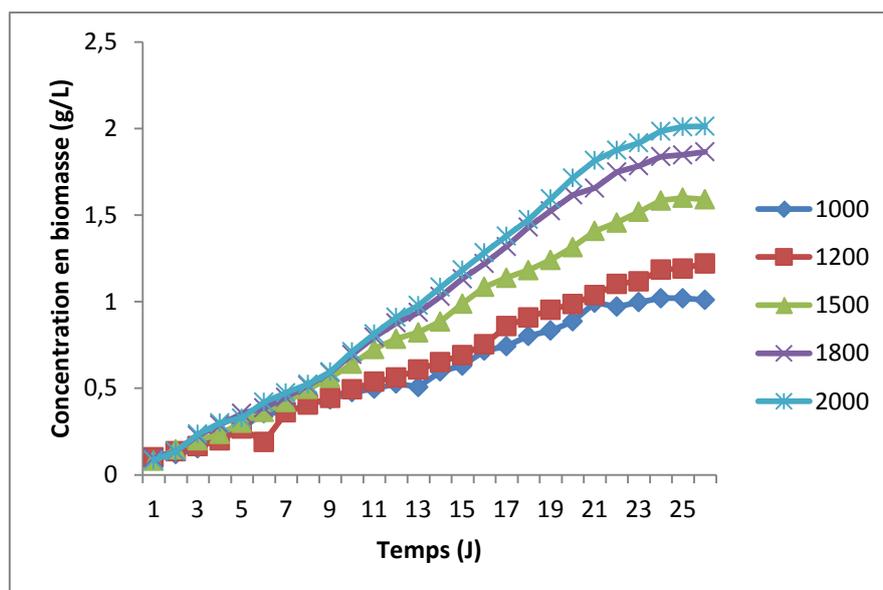


Figure VI.8: Cinétique de croissance de la spiruline; PBR 250 mL



C

**Figure VI.9: Cinétique de croissance de la spiruline PBR 500mL.**

La phase stationnaire est obtenue après 18, 21 et 27 jours dans les PBR 18 mL, 250 mL et 500 mL respectivement. Par ailleurs, les cinétiques de production de biomasse obtenues dans le PBR cylindrique présentent les mêmes évolutions que celles du PBR conique. La meilleure concentration de biomasse produite, de l'ordre de 3.209 g/L PS, est obtenue dans le PBR de faible diamètre (18mL).

Nous rappelons que le diamètre de PBR cylindrique a une relation directe avec sa surface spécifique :

$$S/V = 2\pi\left(\frac{D}{2}\right)H / \pi\left(\frac{D}{2}\right)^2 R^2 H \quad (2)$$

$$S/V = 2/D \quad (3)$$

Où

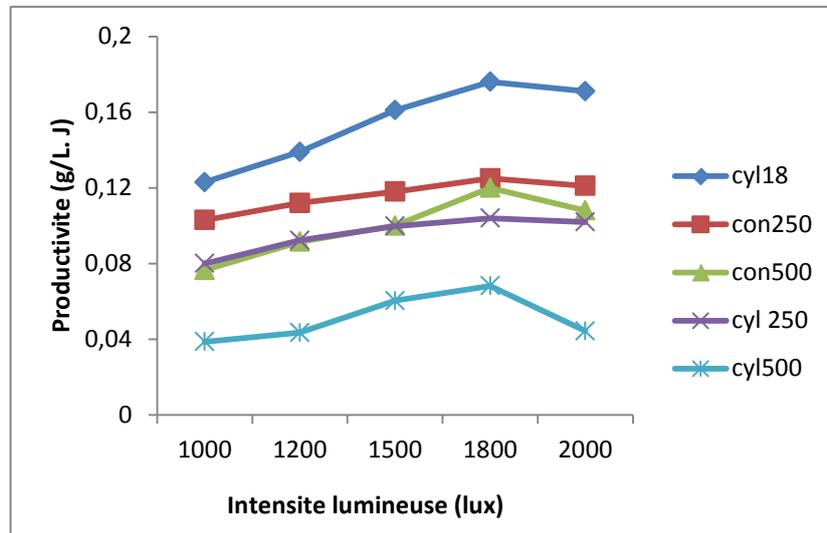
H : hauteur de culture dans PBR,

D : diamètre du PBR

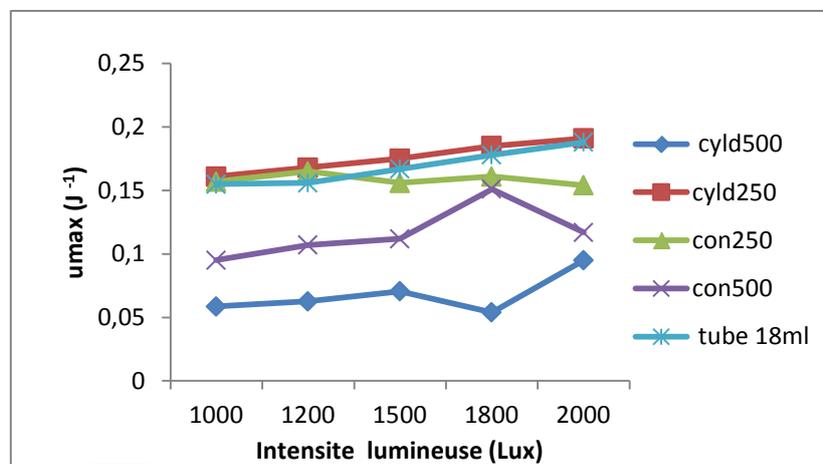
R : rayon de PBR

Ces cinétiques révèlent que la croissance des cultures est proportionnelle à l'intensité lumineuse (1800 lux). Le léger déclin de croissance vers 2000 lux est probablement dû au phénomène de photo-inhibition [4]

En outre, une comparaison de croissance mettant les photo-bio-réacteurs dans les mêmes capacités volumiques consiste à suivre la productivité volumique et le taux de croissance ( $\mu_{max}$ ) qui caractérisent la performance du système. Les résultats de l'étude sont consignés dans les figures VI.10 A et B.



**A- Productivité**



**B-  $\mu_{max}$**

**Figure VI.10 : Effet de l'intensité lumineuse sur la productivité et la vitesse de croissance ( $\mu_{max}$ )**

D'après les résultats obtenus sur les PBR de même capacité (250 mL et 500 mL), on remarque, en règle générale, que les valeurs de  $\mu_{max}$  et de la productivité obtenus augmentent

proportionnellement avec l'intensité lumineuse jusqu'à 1800 lux puis repartent en baisse légère à partir de 2000 lux.

Les meilleures valeurs de productivité sont réalisées sur le PBR de forme conique, et ce en rapport direct avec sa surface spécifique plus élevée que celle de la forme cylindrique.

De plus, on constate que la vitesse de croissance (Figure VI.10. B) est inversement proportionnelle au diamètre du photo-bio-réacteur avec, tout de même, une meilleure valeur de  $\mu_{max}$  aux alentours de 2000 lux. Ces variations de  $\mu_{max}$  sont à relier à la disponibilité de la lumière dans le PBR sous l'effet de l'intensité appliquée. Il s'agit ici des phénomènes de photo-limitation, photo-saturation ou de photo-inhibition .[5]

#### VI.4.2. Influence de l'intensité lumineuse sur le comportement de la souche

En se basant sur la méthode où le processus par le quel les cellules d'algues mobiles se concentrent spontanément en raison de leur mobilité et de leur tendance à nager vers la lumière (photo-taxis), on a procédé à des essais aux environs de 25°C dans les quels les cultures de spiruline ont été exposées à différentes intensités lumineuses [195 ] (Figure VI.11).

Pour chaque expérience, des observations sont prises sur l'aspect physique de la culture : flottation ou floculation correspondant respectivement selon l'état de l'éclairage à la photo-limitation ou la photo-inhibition. L'aspect homogène de la culture signifie une bonne distribution des cellules sur tout le volume de la culture reflétant ainsi l'état de saturation de culture en lumière.

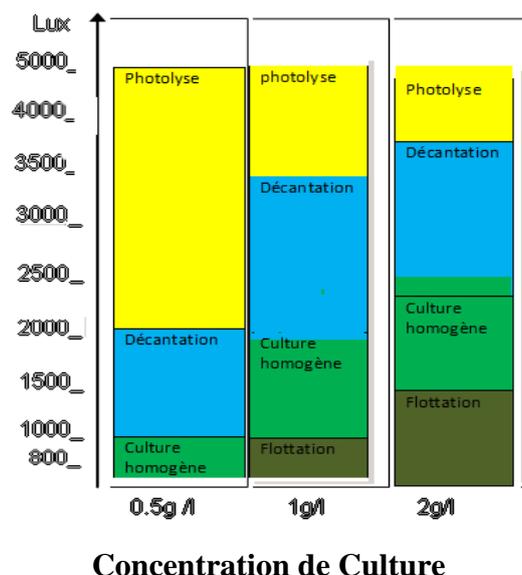


Figure VI.11 : Comportement de la souche vis-à-vis de l'intensité lumineuse.

On remarque aussi, d'après les résultats de la figure précédente, que pour une culture de 0.5 g/L, l'intensité lumineuse appropriée est de 1000 lux. Une culture de concentration de 1 g/L doit être exposée à une intensité allant de 1000 à 2000 lux et enfin pour une culture de 2 g/L l'intensité lumineuse doit être entre 1500 et 2500 lux. On peut interpréter ces observations par l'effet d'auto-ombrage qui augmente avec la concentration de biomasse. Cet effet d'ombrage est atténué par exposition des cellules à une forte intensité de la lumière pouvant attendre le sein de la culture tout en évitant la photolyse [4].

### VI.4.3. Méthode d'optimisation en plan d'expérience

Les résultats expérimentaux complets de production de biomasse par trois facteurs et la conception de l'expérience factorielle à trois niveaux sont résumés dans le tableau V1.1 Le point central (0, 0, 0) a été répété trois fois et les mêmes résultats ont été obtenus en indiquant la reproductibilité des données.

L'application de la méthode de surface de réponse (RSM) offre une relation empirique entre la fonction de réponse et les variables indépendantes. Les termes du modèle ont été évalués par la valeur P (probabilité) avec un niveau de confiance de 95%. Les parcelles de contours ont été obtenues selon les effets des trois facteurs (intensité lumineuse, concentration initiale de l'inoculum et rapports surface/volume) à trois niveaux. L'ANOVA a été utilisée pour l'analyse des données et la qualité d'ajustement du modèle polynomial a été exprimée par le coefficient de détermination  $R^2$ .

#### VI.4.3.1. Ajustement de l'équation polynomiale d'ordre 2. Analyse de variance (ANOVA)

Une relation empirique exprimée par une équation polynomiale de second ordre avec des termes d'interaction a été établie entre les résultats expérimentaux. Sur la base des résultats de la conception expérimentale (tableau 3), les équations de régression avec les variables codées obtenues pour décrire la productivité et le taux de croissance peuvent être présentées comme suit:

$$P_V = 0.1489 - 0.0195X_1 + 0.0626X_2 + 0.0751X_3 - 0.0287X_1^2 + 0.0248X_2^2 + 0.0276X_3^2 - 0.0004X_1X_2 - 0.0049X_1X_3 + 0.0247X_2X_3 \quad (4)$$

$$\mu_{\max} = 0.5572 - 0.1169X_1 + 0.1638X_2 + 0.2379X_3 - 0.1118X_1^2 - 0.0288X_2^2 + 0.0993X_3^2 - 0.0312X_1X_2 - 0.0481X_1X_3 + 0.0529X_2X_3 \quad (5)$$

L'analyse de la variance (ANOVA) des paramètres de régression du modèle quadratique de la surface de réponse prédite pour la productivité et le taux de croissance est présentée dans les tableaux VI.2 et VI.3

Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée pour tester la signification de la composition des équations polynomiales de second ordre aux données expérimentales. Le tableau VI.2 montre les résultats de l'analyse de la variance (ANOVA) pour le modèle de régression. La valeur  $F_{\text{Test}}$  de 17,618 ( $>F_{\text{Critique}} = 4,1$ ) obtenue pour cette analyse indique que le modèle est significatif, avec une  $p < 0.1\%$ . Les valeurs  $p$  sont la mesure de la signification statistique de chaque variable; Les faibles valeurs de  $p$  correspondent à une haute signification statistique des variables dans le modèle Liu JZ et al [196].

Dans cette étude, les valeurs  $p$  inférieures à 0,05 sont acceptées comme significatives. Le résultat de l'ANOVA pour le modèle de taux de croissance montre que la valeur  $F_{\text{Test}}$  est de 10,016  $>F_{\text{Critique}}$  a un effet significatif sur la réponse avec une  $p < 0,6\%$ .

Les résultats statistiques du modèle quadratique pour la productivité et le taux de croissance montrent une grande fiabilité dans l'estimation de la productivité volumique et du taux de croissance ( $R^2 = 0,964$  et  $R^2 = 0,938$ , respectivement).

Un coefficient élevé de  $R^2$  assure un ajustement satisfaisant du modèle quadratique aux données expérimentales.

**Tableau VI.1 : Résultat de conception expérimentale pour l'optimisation de la production de biomasse et le taux de croissance**

Essai	Concentration initiale Inoculum, $X_1$	Intensité lumineuse, $X_2$	Rapport S/V, $X_3$	Productivité, $Y_1$	Taux de croissance, $Y_2$
1	2.25	66	112	0.262	0.975
2	2.25	12	103	0.096	0.27
3	3.5	120	94	0.111	0.292
4	3.5	12	112	0.15	0.449
5	2.25	66	103	0.143	0.529
6	3.5	66	103	0.087	0.322
7	1	66	103	0.24	0.662
8	2.25	66	94	0.104	0.388
9	1	120	112	0.345	1.112
10	3.5	12	94	0.055	0.164
11	2.25	120	103	0.278	0.88
12	2.25	66	103	0.143	0.529
13	1	12	94	0.075	0.248
14	1	120	94	0.136	0.439
15	3.5	120	112	0.271	0.715
16	1	12	112	0.18	0.659

**Tableau VI.2 : Analyse de variance (ANOVA) pour le modèle de productivité.**

Source de variation	Degré de liberté	Somme des Carrées	Carrés moyens	F <sub>Test</sub>	Probabilité (P)
Modèle (Régression)	9	0,109389	0,012154	17,6184	0,001
Résidus	6	0,004139	0,000689	—	—
Total	15	0,113528		—	—

$$R^2 = 0.964, R^2_{\text{Adj}} = 0.909.$$

**Tableau VI.3 : Analyse de variance (ANOVA) pour le modèle de taux de croissance.**

Source de variation	Degré de Libert é	Somme des Carrées	Carrés moyens	F <sub>Test</sub>	Probabilité (P)
Modèle (Régression)	9	1,0708	0,118978	10,015 9	0,006
Résidus	6	0,071273	0,011878	—	—
Total	15	1,14207		—	—

$$R^2 = 0.938, R^2_{\text{Adj}} = 0.844.$$

**Tableau VI.4 : Estimation des coefficients du modèle de productivité.**

Coefficient	Valeur estimée	Erreur type	P	Signification
<b>Constant, <math>\beta_0</math></b>	0,148996	0,012494	2,1054e <sup>-005</sup>	S
$\beta_1$	-0,0195131	0,0083074	0,0571459	NS
$\beta_2$	0,0626669	0,0083074	0,000281476	S
$\beta_3$	0,0751	0,0083058	0,000102552	S
$\beta_1^2$	-0,0286896	0,0161763	0,126499	NS
$\beta_2^2$	0,0248103	0,0161763	0,175987	NS
$\beta_3^2$	0,0276074	0,0163181	0,141629	NS
$\beta_{12}$	-0,000375002	0,00928617	0,969097	NS
$\beta_{13}$	-0,00495703	0,00927904	0,612395	NS
$\beta_{23}$	0,0246986	0,00927904	0,0374358	S

**Tableau VI.5 : Estimation des coefficients du modèle de taux de croissance.**

Coefficient	Valeur estimée	Erreur type	P	Signification
<b>Constant, <math>\beta_0</math></b>	0,557239	0,0518451	3,83302e <sup>-005</sup>	S
$\beta_1$	-0,116957	0,0344723	0,0146254	S
$\beta_2$	0,163871	0,0344723	0,00314676	S
$\beta_3$	0,2379	0,0344657	0,00045692	S
$\beta_1^2$	-0,111793	0,0671251	0,146877	NS
$\beta_2^2$	-0,0287932	0,0671251	0,682935	NS
$\beta_3^2$	0,0993298	0,0677136	0,192767	NS
$\beta_{12}$	-0,03125	0,0385339	0,448345	NS
$\beta_{13}$	-0,0480703	0,0385043	0,258375	NS
$\beta_{23}$	0,0529917	0,0385043	0,217899	NS

L'équation mathématique finale obtenue en termes de facteurs codés après exclusion des coefficients insignifiants:

$$P_V = 0.1489 + 0.0626X_2 + 0.0751X_3 + 0.0247X_2X_3 \quad (6)$$

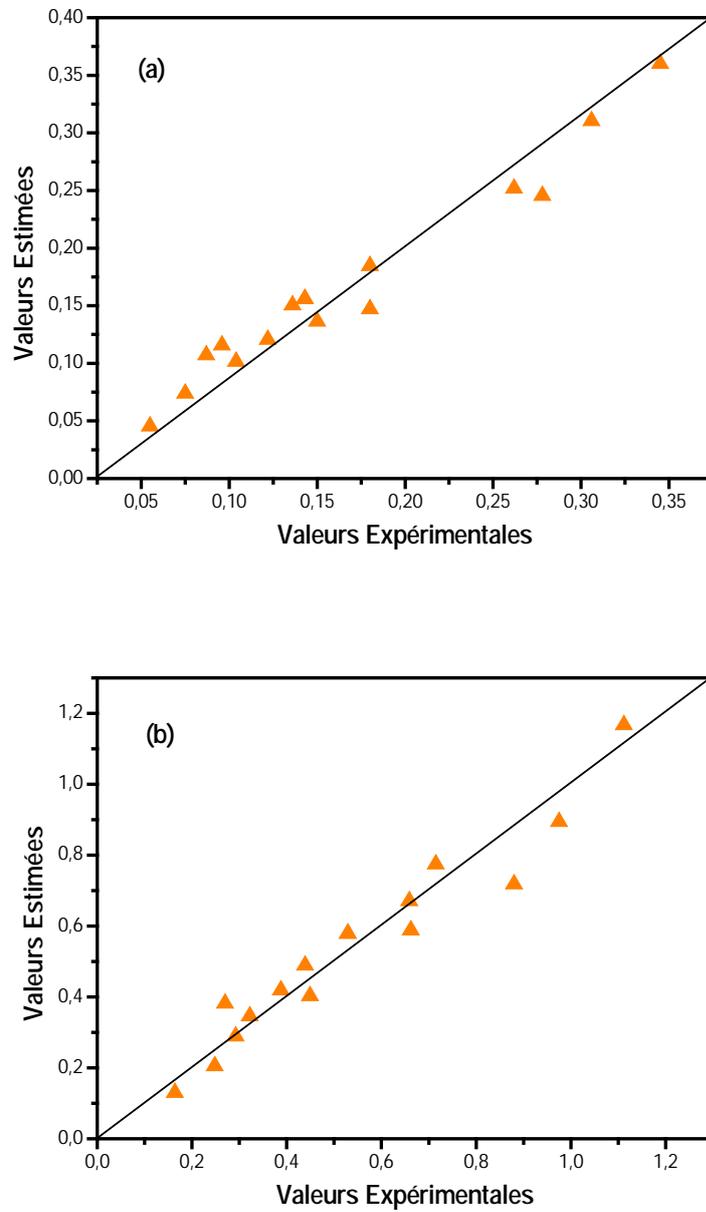
$$\mu_{\max} = 0.5572 - 0.1169X_1 + 0.1638X_2 + 0.2379X_3 \quad (7)$$

La pertinence du modèle sélectionné pour fournir une approximation adéquate du système réel est également confirmée par les parcelles diagnostiques telles que: la courbe des valeurs prédite par rapport aux valeurs réelles et les courbes de probabilité normales des résidus étudiés. Ces courbes sont utilisées pour juger l'adéquation d'un modèle.

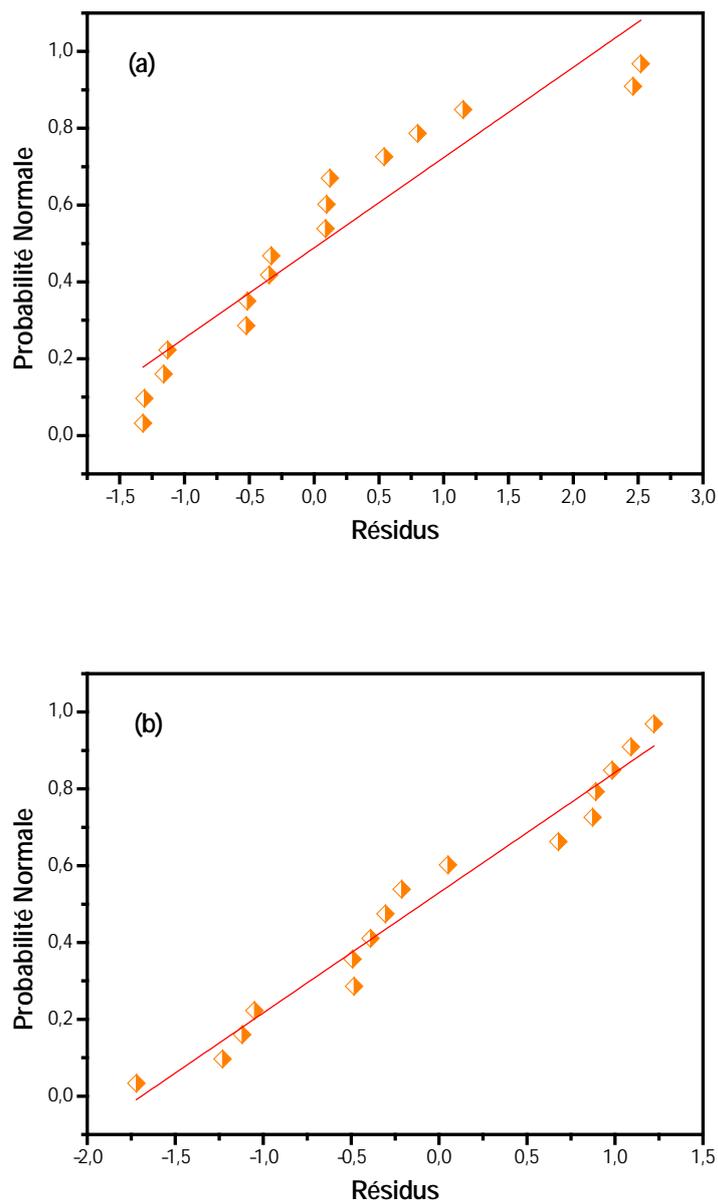
Les figures VI.12 (a) et (b) montrent que les valeurs prédites des réponses des modèles correspondaient bien aux valeurs observées. Les points de données sont répartis relativement près de la ligne droite ( $y = x$ ). Ces courbes indiquent un accord adéquat entre les données réelles et les données obtenues à partir des modèles.

Les données ont également été analysées pour vérifier la normalité des résidus. Un graphique de probabilité normal ou un diagramme de points de ces résidus est représenté sur la

figure VI.13 (a et b). Les points de données sur cette trame sont raisonnablement proches d'une ligne droite. On peut déduire que les données sont uniformément réparties.



**Figure VI.12 : Courbes de régression linéaires relatives aux modèles. (a) productivité, (b) taux de croissance.**

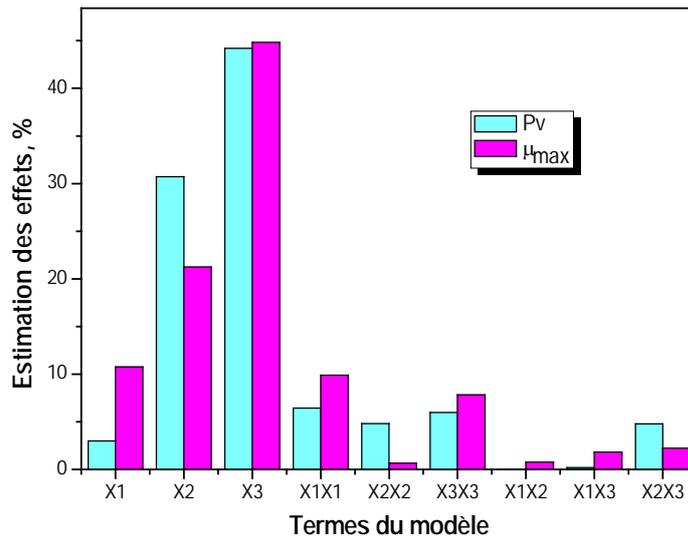


**Figure VI.13: Courbe de probabilité normale des résidus. (a), Productivité et (b), taux de croissance.**

En outre, la signification de chaque facteur pourrait être déterminée en calculant le pourcentage d'effet de chaque terme sur la réponse connue sous le nom d'analyse Pareto [196]. L'effet de pourcentage des facteurs ( $P_i$ ) pourrait être calculé en utilisant la formule suivante:

$$p_i = \left( \frac{b_i^2}{\sum_{i=1}^n b_i^2} \right) \times 100 \quad i \neq 0 \quad (8)$$

Tel que  $b_i^2$  sont les coefficients de différents variables de l'équation du modèle.



**Figure VI.14: Représentation graphique des effets relatifs à la productivité et au taux de croissance selon l'analyse de Pareto.**

Les résultats obtenus à partir de l'analyse de Pareto sont illustrés sur la figure VI.14. Selon cette figure, on observe que le rapport S/V ( $X_3$ ) est le paramètre qui présente l'effet le plus important (44,2%, 44,82%) sur la productivité volumique et le taux de croissance respectivement. D'autre part, l'intensité lumineuse ( $X_2$ ) a eu un effet important de 30,71% sur la productivité et de 21,25% sur le taux de croissance.

#### VI.4.3.2. Méthode surface de réponse, Effet des variables indépendantes sur la réponse

De nombreux graphiques sont disponibles pour restituer de manière interprétable l'équation du modèle empirique. Dans le contexte des plans d'expériences destinés à l'étude des surfaces de réponse, cette restitution s'effectue essentiellement sous deux formes différentes :

- Les courbes de surface de réponse matérialisent la surface de régression à partir d'un graphique dans un espace à trois dimensions,
- Les courbes iso-réponses, qui constituent une projection de la surface de réponse dans le plan horizontal. Elles s'interprètent comme les courbes de niveaux destinées sur une carte

topographique. Une courbe iso-réponse représente le résultat d'une coupe de la surface de réponse par un plan horizontal.

En utilisant RSM, l'effet combiné de 3 paramètres (variables) peut être prédit, ce qui est difficile à observer dans les méthodes classique. Les courbes de surface de réponse fournissent une méthode pour prédire l'efficacité pour différentes valeurs des variables testées et les courbes iso-réponses aident à identifier le type d'interactions entre ces variables [197]

Les courbes iso-réponses peuvent présenter les variations des réponses en fonction de seulement deux facteurs à la fois, les autres facteurs étant maintenus sur une valeur fixe.

Les figures (VI.15, VI.16) représentent les courbes iso-réponses associées aux modèles de productivité volumique et de taux de croissance en fonction des variables (concentration initiale d'inoculum, intensité lumineuse et rapports S/V (trajet lumineux de PBR)).

### **A/ Productivité volumétrique**

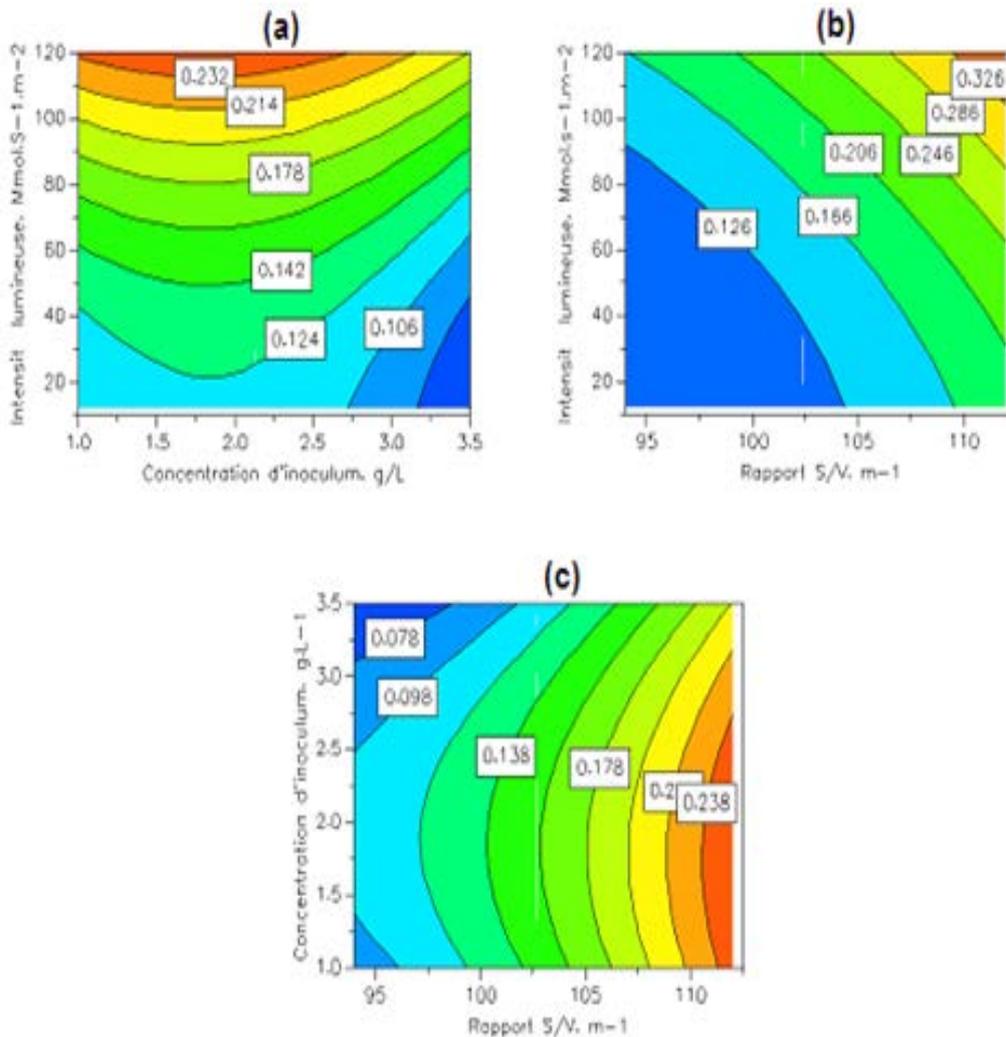
La figure VI.15 représente la courbe iso-réponse de la productivité volumétrique  $P_v$  en fonction de la concentration d'inoculum, de l'intensité lumineuse et des rapports S/V formulés par l'équation (196). Une courbe d'iso-réponse aide généralement à identifier le type d'interactions entre les variables. Un contour circulaire de la surface de réponse indique que l'interaction entre les variables correspondantes n'est pas négligeable, tandis qu'une elliptique indique que les interactions entre les variables correspondantes sont significatives [198].

A partir du graphique iso-réponse (figure VI.15 (b)), on peut observer que la variation de productivité ( $P_v$ ) en fonction de l'intensité lumineuse et le rapport S/V est proportionnelle.

À une intensité lumineuse ( $12 \mu\text{mol/m/s}$ ),  $P_v$  augmente légèrement avec l'intensité lumineuse croissante, la plupart des valeurs de  $P_v$  restant au-dessous de  $0.115 \text{ g / L / j}$ . A noter que les valeurs de  $P_v$  les plus élevées ont été observées pour une intensité lumineuse de  $120 \mu\text{mol/m/s}$  et de rapport S/V de  $112 \text{ m}^{-1}$ .

La figure VI.15 révèle également que la productivité volumique  $P_v$  était plus sensible au changement d'intensité lumineuse et rapport S/V car elle présentait une pente plus forte sur l'axe d'intensité lumineuse et sur l'axe rapport S/V. Dans la Figure VI.15 (b) les tracés de contour sont de nature circulaire, ce qui implique que les effets interlactifs ne sont pas négligeables. Ceci a été confirmé par les résultats d'ANOVA dans Table VI.2 dans lesquels la valeur p pour X2X3 était de 0,0374 inférieur de 0.05 donc son effet était significatif au modèle.

En utilisant logiciel Modde.6, la valeur prédite de  $P_v$  maximal est de  $0,365 \text{ g/L/J}$  a été donnée pour  $I = 999 \text{ lux}$  et rapport  $S./V$  de  $112 \text{ m}^{-1}$ . Pour tester la validité du maximum prédit, les expériences ont été réalisées en double dans des conditions optimales déterminées,  $999 \text{ lux}$  et  $112 \text{ m}^{-1}$ , ce qui a donné une productivité de valeur  $0.343 \text{ g/L/J}$  très proche de  $P_v$  prédictive (théorique) de  $0,365 \text{ g/L/j}$ , cela confirmant ainsi les estimations fournies par le logiciel Modde.6.



**Figure VI.15: Courbes d'iso-réponses de productivité. (a)  $X_3 = \text{Constante}$ , (b)  $X_1 = 0$  et (c)  $X_2 = 0$**

Les taux de croissance et la productivité de la biomasse se sont révélés dépendants des variations de S/V (trajet lumineux) et de l'intensité lumineuse.

Lorsqu'on fixe la concentration de l'inoculum à une valeur constante, on suit la réponse de productivité en fonction de l'intensité lumineuse et le rapport S/V (figure VI.15.b), les taux de croissance et la productivité de la biomasse se sont révélés dépendants des variations des deux facteurs appliqués. En effet, l'augmentation du rapport S/V et de l'intensité lumineuse permet une nette amélioration de la productivité volumétrique.

L'existence d'une telle réponse linéaire peut être interprétée par la probabilité élevée d'exposition des cellules à une intensité de lumière optimale de croissance [168].

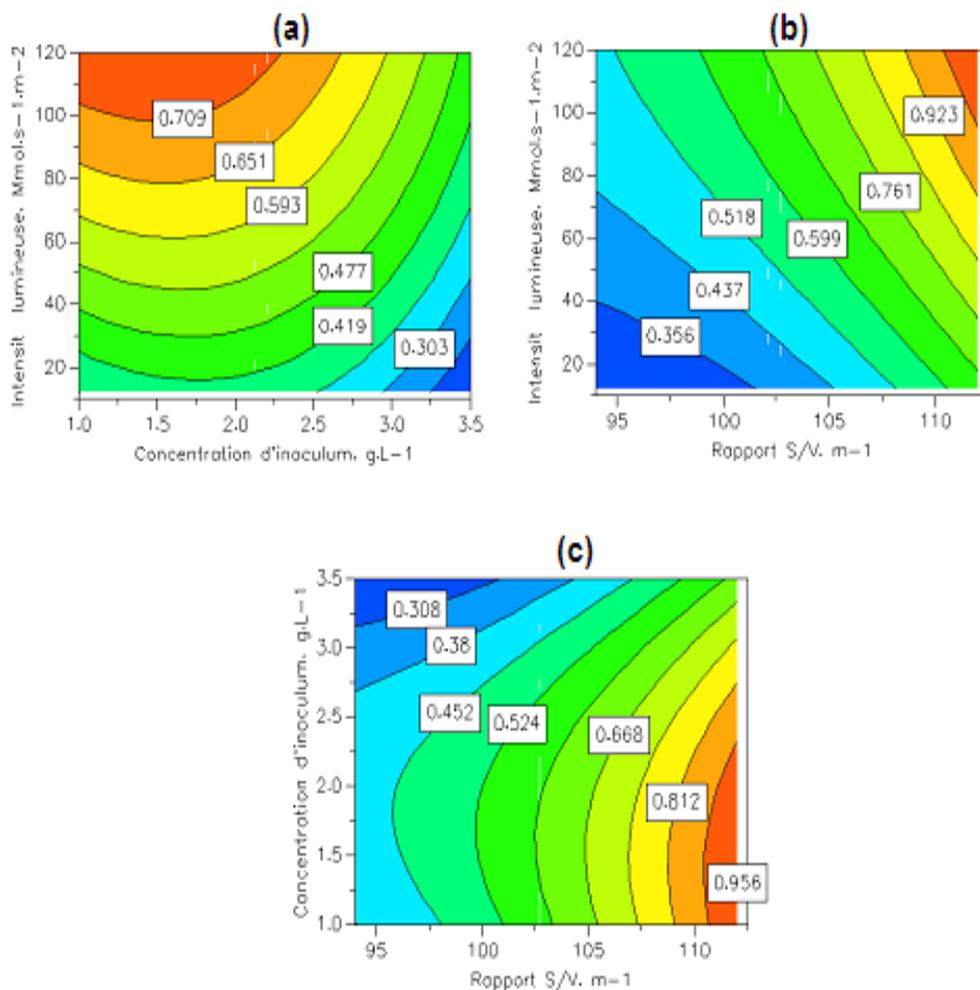
Hu & Richmond, 1996[199] ont indiqué que lorsqu'on utilise une densité de population optimale, il est possible d'approcher des valeurs théoriques substantielles de productivité photosynthétique et ce, par combinaison d'un trajet lumineux S/V court et un taux d'agitation vigoureux.

Lorsqu'on fixe la valeur de S/V et on fait varier l'intensité lumineuse et la concentration de l'inoculum (figure VI.15.a), on observe une interaction négative entre l'intensité et la concentration de l'inoculum. La chute de productivité peut s'expliquer par l'effet très important d'auto-ombrage dans les cultures de densité plus élevée. dans ces conditions on peut interpréter cet effet par le métabolisme cellulaire qui bascule de la photosynthèse vers l'hétérotrophie et la respiration cellulaire, lorsque la lumière devient limitante [48].

En fixant la valeur de l'intensité lumineuse à sa valeur centrale et en suivant la variation de la fonction  $P_v$  sous l'effet d'inoculum  $X_0$  et de la surface spécifique (figure VI.15.c), on note une interaction négative entre  $X_0$  et S/V. La meilleure valeur de  $P_v$  est d'environ 0,238 g/L/j obtenue sur le PBR de rapport S/V égal à 112 m<sup>-1</sup> et une culture moins dense (1g/L). Ces effets négatifs peuvent être expliqués par une mauvaise pénétration de la lumière dans les profondeurs du PBR ou le phénomène de photo-limitation [48].

### **B/ Taux de croissance**

La variation de la réponse taux de croissance ( $\mu_{max}$ ) sous l'effet de trois facteurs est donnée dans la figure V.10. Pour des valeurs de S/V allant de 94 à 112 m<sup>-1</sup> et d'intensité lumineuse variant de 12 à 120  $\mu\text{mol/m/s}$ , on observe une augmentation nette du taux de croissance Figure. VI.16.(b) avec une valeur maximale de 0,999 j<sup>-1</sup> obtenue à 120  $\mu\text{mol/m/s}$  et 112 m<sup>-1</sup>.



**Figure V.16 : Courbes d'iso-réponses du taux de croissance. (a) X3 = Constante, (b) X1 = 0 et (c) X2= 0.**

Le taux de croissance est, en règle générale, plus sensible aux variations de l'intensité lumineuse et au rapport S/V.

A une intensité lumineuse fixe (figure VI.16c), on constate que la production de biomasse et le taux de croissance augmentent crescendo avec le rapport S/V, atteignant un maximum de 1,345 J-1J<sup>-1</sup>. Ceci concorde avec les résultats de HU QIANG, 1998[168] qui trouvent un optimum sur un PBR de rapport S/V élevé (chemin optique étroit) et une intensité lumineuse

de 120-160  $\mu\text{mol/m/s}$ . Au-delà de cette limite, l'augmentation de l'intensité lumineuse n'entraîne aucune modification du taux de croissance, suggérant que le point de saturation de la photosynthèse est atteint [200].

La croissance photo-auto-trophique de biomasse des algues dépend principalement de l'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse. Ce comportement suggère donc que, à une intensité lumineuse relativement élevée (12  $\mu\text{mol/m/s}$ ), la croissance cellulaire est accélérée par la production rapide d'ATP et de NADPH photosynthétique. En revanche, lorsque la concentration de biomasse atteint 5800 mg/L, la croissance cesse probablement en raison de la photo-saturation de la culture [201, 202].

Vonshak et al. (1982) ont montré dans leur étude sur la même souche que le potentiel photosynthétique des cellules diminue pour des concentrations de biomasse comprises entre 0,4 et 1,0 g/L et que la plupart des cellules étaient privées de la lumière par les cellules voisines.[178] De même Reicnehr et Costa (2006) ont constatés que de faibles concentrations de biomasse (0,50 g / L) et de taux de renouvellement élevés (50% v / v) entraînaient un taux de croissance spécifique élevé ( $\mu_x = 0,111 \text{ jour}^{-1}$ ) et une productivité élevée ( $P_x = 42,3 \text{ mg / L / jour}$ ). Ces valeurs sont deux à quatre fois plus élevées que celles obtenues en simple culture[203].

Le tableau VI.6 fournit une comparaison de productivités et de taux de croissance obtenus sur différentes cultures de *Spiruline* ainsi que d'autre espèces où plusieurs paramètres ont été utilisés pour optimiser les conditions du milieu : il s'agit de la température, du pH, de l'osmolarité, de la composition du milieu en substrat carbone, azote et celles des conditions de culture : telles que l'intensité lumineuse, la concentration initiale.une comparaison sur la concentration maximale obtenue des différente systèmes de PBR, on remarque que notre système est positionné parmi les autres; tableaux (VI.6, VI.7).

**Table VI.6. Comparaison des productions de biomasse.**

Microorganisme	Méthode	Paramètres	Optimisation Conditions	Référence
A. platensis	Box- Behnken	Source of nitrogen Sources(KNO <sub>3</sub> ,urea Temperature, intensité lumineuse (I)	Pv:95mg/L/ J avec l'urée $\mu$ m: 0.82 I: 5000 lx Temperature: 30°C :	ElianeDalva Godoy Danesi 2011; [204]
Oocystissp.	RSM	NaNO <sub>3</sub> (mg/l) , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mg/l), Temperature (°C),	NaNO <sub>3</sub> (750 mg/l, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 0 mg/l, Température 30°C LipidePv: 7.0 mg/L/d), biomassePv 47.8 mg/L/d) , [lipid] : (109.5 mg/L),	Bala Kiran, 2016 [205]
Haematococcus uivial	RSM	Nitrate de sodium g/l, inoculum volume, intensité lumineuse (I)	$Y_{biomass}$ : 0.51g/l [NaNO <sub>3</sub> ] : 1.06 g/l, CO <sub>2</sub> /1.54%, Volume de l'inoculum: 24.94%, I : 2.420 lx	R. Sarada2002 [206]
A platensis	RSM	Température, Régimes d'azote Dioxyde de carbone	Pv:34mg /l/ day $\mu_{max}$ : 0.0735/ day température : 30°C	Luciane Maria Colla,[207]
A platensis	RMS	Zarrouk medium %  Concentration de mélange,  Taux de renouvellement	Pv: 0,046 g l- 1 jour1 $\mu_{max}$ : 0,138 jour- 1 milieu Zarrouk %Of 20% (v/v) , Concentration de mélange de 0,40 g / L Taux de renouvellement compris entre 40 et 60%	E.M. Radmann (2007) [208]
Arthrospira platensis	RMS Box Behnken	Inoculum (X <sub>0</sub> ) Intensité lumineuse (I <sub>0</sub> ) et épaisseur de PBR(S/V)	I : 999 lux S/V : 112 Biomasse Pv : de 0,343 g / L / j $\mu_{max}$ : 1,345 J-1.	Present travail

**Tableau VI.7 : Comparaison de production de différents systèmes de culture**

Système de production (g l-1)	Longueur du chemin optique en cm	Algue	Concentrations maximales	Productivité surfacique (gm/ m2j)	Référence
Plan incliné	1	<i>Chlorellasp</i>	2	25(1P)	Doucha & Livansky, 1995 [12]
Réacteur tubulaire	2,5 (Ø 4)	<i>Spirulina platensis</i>	27 (p)		Richmond et al., 1993 [209]
Réacteur tubulaire	6,0 (Ø)	<i>Porphyridium cruentum</i>	1	25 (p)	Chaumont et al., 1988[210]
Réacteur tubulaire	50 (Ø)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	0,4	13 (p )	Olaizola, 2000[101]
Bacs transparents <i>Tetralmis suecica</i>	50 (Ø)	<i>Chaetoceroscalcitrans</i>	0,1	3 (d\$)	Muller-Feuga et al 2003, [211]
PBR conique -annulaire	1.5	<i>Arthrospira platensis</i>	4.5	18.36	présent travail

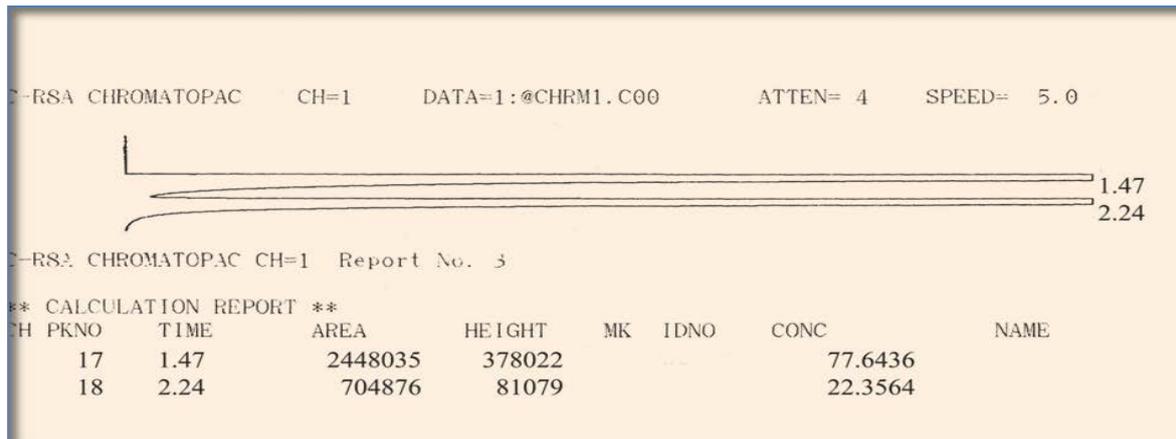
p) surface de l'emprise au sol ; (d) surface développée.

### VI..5. Production d'hydrogène par la *Spiruline*

Le but de cette partie de travail est de produire en batch de l'hydrogène par la souche *Spiruline* développée au sein de notre laboratoire BIOGEP. Cette souche produit l'hydrogène par voie de bio-photolyse indirecte. Pour ce faire, des pré-cultures de 12 jours ont été récoltées afin de réaliser la fermentation qui dure 30 h c.-à-d. 24 h d'obscurité et 6 h de lumières.

#### VI.5.1. Etalonnage du chromatographe

L'étalonnage consiste à acheminer un mélange de gaz contenant de l'hydrogène (25- 75 % H<sub>2</sub>- N<sub>2</sub>) vers le détecteur du chromatographe en phase gazeuse CPG. Les résultats de cette analyse sont illustrés par la figue VI.17 qui présente les pics des deux gaz injectés ainsi que leur temps de rétention.



**Figure VI.17 : Chromatogramme du mélange gazeux 25- 75 % H<sub>2</sub>- N<sub>2</sub>. t = 1,47 min, H<sub>2</sub>.**

La quantité d'hydrogène obtenue est calculée via la relation suivante :

$$X_{H_2} = K_f \cdot S_i \quad (9)$$

Où

$X_{H_2}$  : Concentration massique de H<sub>2</sub> en pourcentage,

$S_i$  : Aire du pic,

$K_f$  : Facteur de réponse de l'hydrogène ( $1,02 \cdot 10^{-5}$ ).

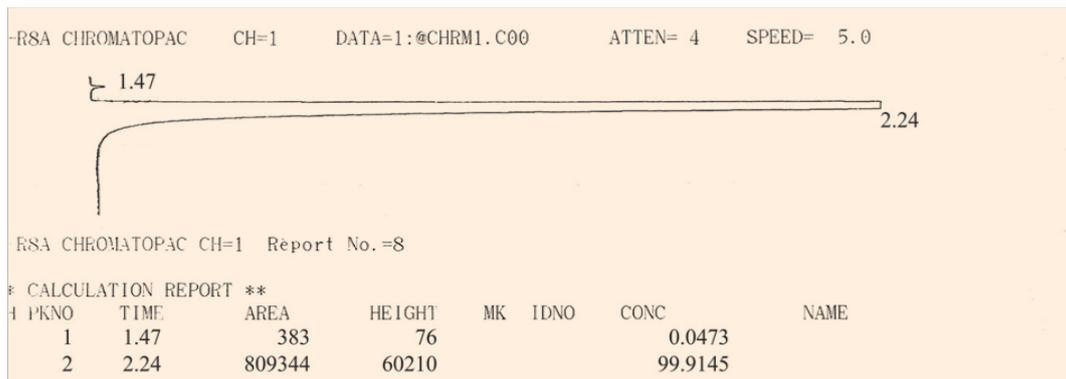
L'équation (12) devient donc égale à :

$$X_{H_2} = 1,02 \cdot 10^{-5} \cdot S_i \quad (10)$$

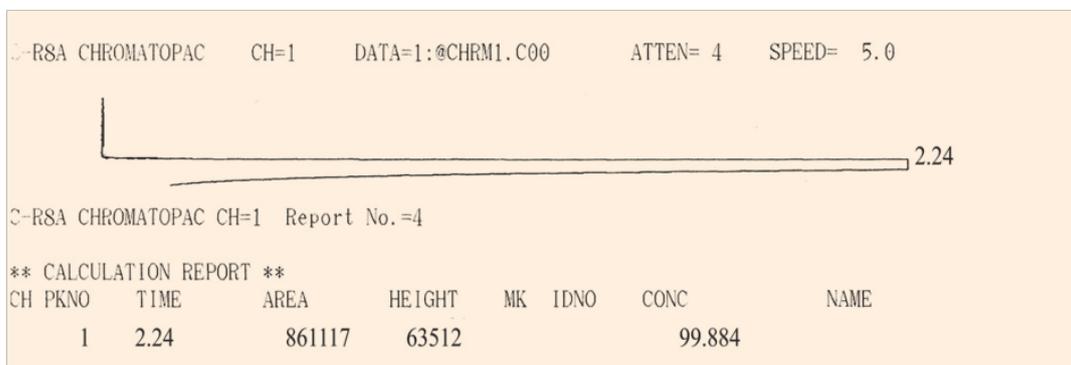
## VI.5.2. Optimisation des paramètres du milieu de culture

### A/ Effet de la concentration de biomasse sur la production d'hydrogène

L'analyse qualitative du biogaz recueilli est effectuée sur trois cultures de concentrations 1.5 g/L et 2 g/L exposées toutes à une intensité lumineuse de 1000 lux et les résultats ont donnés sous forme de chromatogrammes dans la figure VI.18.



**1.5 g/L**

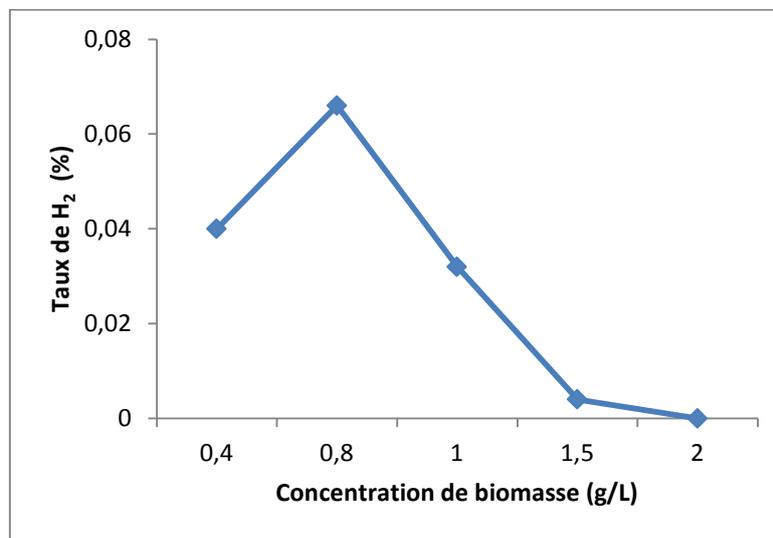


**2 g/L**

**Figure VI.18 : Hydrogène produit pour différentes concentrations de biomasse.**

D'après les pics obtenus, on confirme que le biogaz de fermentation est constitué uniquement d'hydrogène sans traces de méthane et de dioxyde de carbone.

Par ailleurs, la figure VI.19 résume les taux de production de H<sub>2</sub> recueillis en fonction de la gamme de concentrations de biomasse étudiées durant la fermentation.

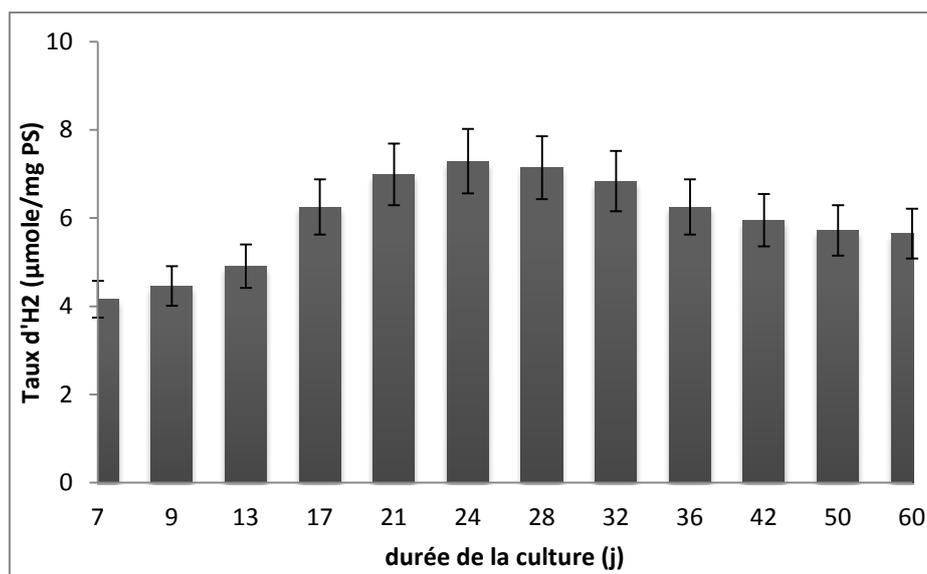


**Figure VI.19 : Effet de la concentration de biomasse sur le taux de production d'hydrogène.**

Cette figure révèle un taux de production d'hydrogène maximum pour une concentration de 0,8 g/L. Au delà de cette concentration la production d'hydrogène diminue jusqu'à atteindre une valeur nulle pour une concentration de biomasse de 2 g/L. Nos résultats sont proches de ceux rapportés par Kim et al. (2005) [212] qui ont suivi l'évolution de l'hydrogène et ont trouvé un maximum de production à 0,96 g /L. En revanche, ils sont différents de ceux trouvés par Vonshak [151] sur une souche provenant du Japon où l'optimum de production est aux alentours de 1,62 g/L

### **B/ Influence de l'âge de la souche sur la production d'hydrogène**

Afin d'optimiser la production d'hydrogène, des essais de fermentation à âges différents ont donné les résultats illustrés par la figure VI.20.

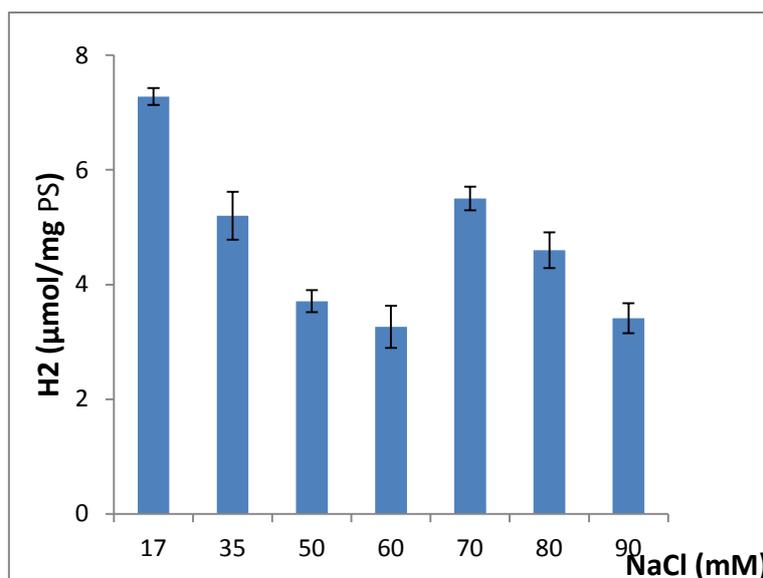


**Figure VI.20 : Production d'hydrogène en fonction de la durée de la souche de spiruline.**

Au regard des résultats obtenus, ce paramètre représente le facteur le plus reproductible pour la production d'hydrogène. La gamme optimale de production d'hydrogène est obtenue pour des cultures âgées de 20 à 32 j. Au-delà de 32 j, la bio-production baisse approximativement d'une dizaine de mL. Elle passe de 7,29 à 5,65 μmole d'H<sub>2</sub>/mg dePS pour une culture de 60 j. Cette diminution s'explique par le fait qu'au cours de la production d'hydrogène via le processus:  $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ , le milieu devient basique avec un pH avoisinant 11,5 et épuisé en éléments nutritifs. La micro-algue entre, alors, dans sa phase stationnaire et la biomasse récoltée devient moins active, ainsi le taux et l'activité maximale des gènes hox dépend de la durée de culture [213]

### **C/ Effet de la concentration en NaCl sur la production d'hydrogène**

L'évolution de la bio-production d'hydrogène en fonction de la concentration de NaCl est représentée la figure VI21 où l'on constate bien que la meilleure production d'hydrogène se situe à un milieu de production de 17 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl. En d'autres termes, sans ajout de quantité supplémentaire de sel. Le point 70 mM apparaît comme étant un point stimulant. Ce qui serait dû à la bio-accumulation de molécules osmo-protectrice telles que la bétaine et la proline. C'est pour cela l'on choisira que dans ce qui va suivre, la production à la concentration de 17 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl.



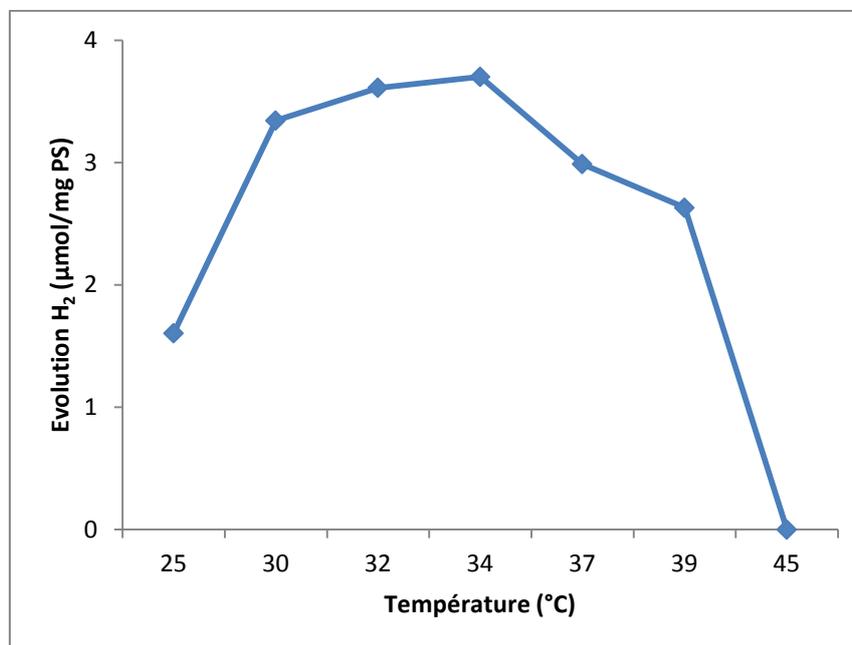
**Figure VI.21 : Production d'hydrogène en fermentation et en photo-fermentation en fonction de la concentration du NaCl.**

La diminution du taux de H<sub>2</sub> est due au stress salin imposé aux microorganismes en lien direct avec l'état d'équilibre physiologique établi contre l'élévation de l'osmolarité ou en d'autres termes l'accumulation des osmolytes à 4 fois plus de l'état normal [214]. Des dommages sur le côté réducteur de PSII et, en particulier, à une modification de la niche de plastoquinone QB ont été constatés par [187] chez *Arthrospira* sous l'effet du stress salin. Une augmentation du taux de respiration est la réponse décelée dans les cellules exposées au stress salin. Chez la souche M2 de *A. fusiformis*, cette augmentation est de deux à trois fois plus élevée lorsque la concentration de sel dans le milieu est augmentée de 0,5 à 0,75 mM, respectivement[215].

Il semble que de nombreuses cyanobactéries soient capables de compenser la réduction de l'approvisionnement en énergie provenant de la voie photosynthétique en augmentant significativement leur activité respiratoire, ce qui, en plus, peut fournir des squelettes de carbone pour la synthèse d'osmolytes organiques et pour l'extrusion de Na<sup>+</sup> dans les cellules afin de maintenir l'équilibre osmotique .[216]

**D/ Influence de la température sur la production d'hydrogène**

Les essais réalisés dans le domaine de températures allant de 25 à 45°C ont montré que la température a un effet très remarquable sur la production d'hydrogène (Figure VI.22).

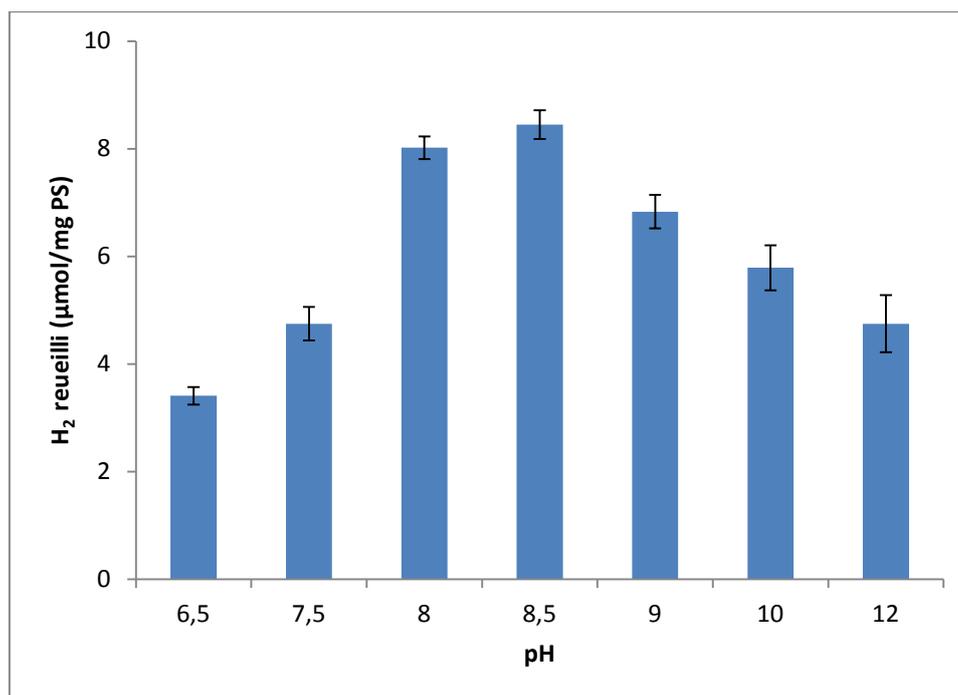


**Figure VI.22 : Production d'hydrogène en photo-fermentation en fonction de la température.**

L'élévation de la température de 25°C à 34°C implique un cumul de H<sub>2</sub> allant progressivement de 18 µmol/mg PS à 38 µmol/mg PS. Au-delà de 34°C, la production de H<sub>2</sub> chute remarquablement pour atteindre la valeur zéro à la température valant 45°C. Cette régression est à lier au phénomène d'inhibition thermique causant la déformation et/ou à la dégradation des structures natives d'enzymes responsables de la production d'hydrogène. Ces résultats concordent avec les travaux de [217 , 218] où la gamme optimale de l'activité d'hydrogénase se situe dans la région 30- 35°C.

**E/ Effet du pH sur la production d'hydrogène**

Des résultats présentés dans la figure VI.23 il ressort que la production d'hydrogène est fortement réduite à un pH initial acide (6,5). Le taux d'hydrogène augmente crescendo avec le pH dans le domaine 6,5 - 9,5 et atteint un maximum de 8,4 µmol/mg PS à un pH initial de 8,5. Toutefois, les pH dépassant 8,5 entraînent une diminution nette du taux de production d'hydrogène.



**Figure VI.23 : Effet du pH sur la production d'hydrogène en photo-fermentation.**

L'effet favorable d'un faible pH initial sur le rendement en hydrogène a été montré dans une culture mixte de *Clostridium sp.*, *Klebsiella sp.* et *Streptococcus sp.* [219], et même dans le cas des cultures axéniques de *Enterobacter cloacae IIT-BT 08* [220]

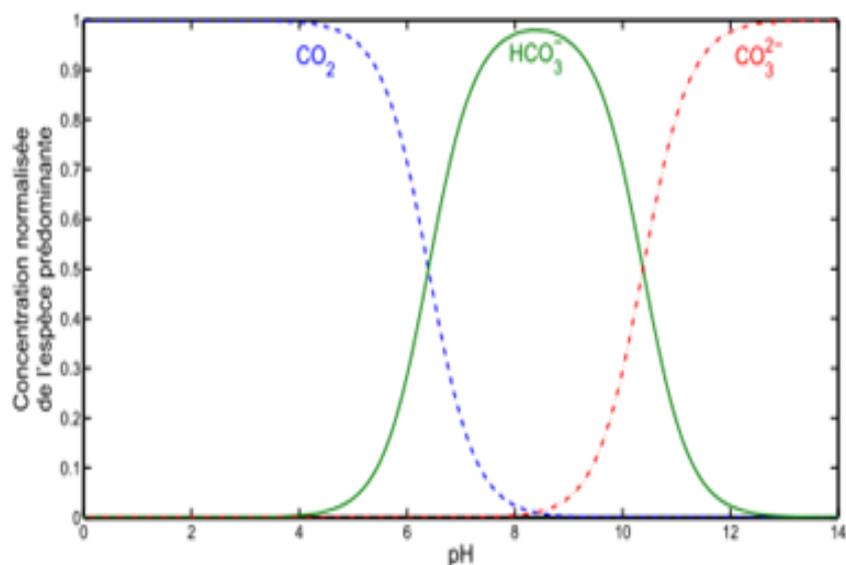
#### **F/ Influence de la concentration en NaHCO<sub>3</sub> sur la production d'hydrogène**

Le dioxyde de carbone, dissout dans l'eau, prend plusieurs formes en fonction du pH :



A un pH inférieur à 4,4, la forme du carbone très majoritaire est le dioxyde de carbone. A un pH de 6,4 il y a autant de dioxyde de carbone que d'ions bicarbonates et Pour un pH situé entre 8,3 et 9,5, les ions bicarbonates sont majoritaires à un pH de 10,4 il y a autant d'ions carbonates que d'ions de bicarbonates. A partir d'un pH de 12,3 les ions carbonates sont majoritaires.

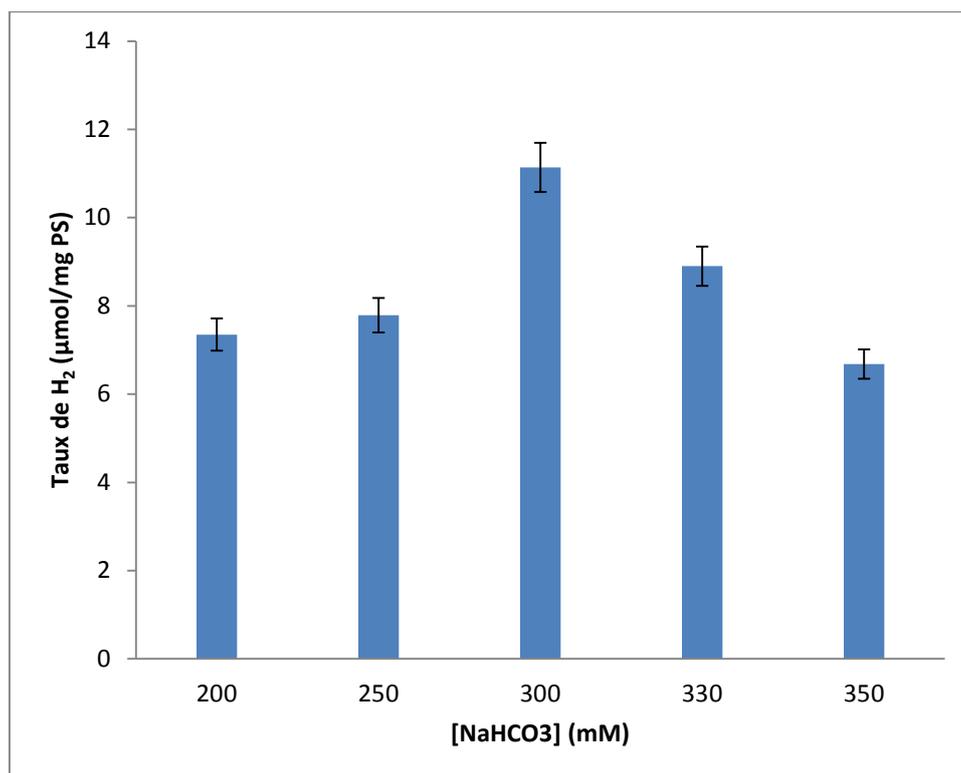
Le bicarbonate de sodium constitue la seule source de carbone de la souche de *Spirulina* étudiée dans ce travail dont on a voulu connaître l'incidence sur la bio-production d'hydrogène.



**Figure VI.24: Les différentes espèces de carbone inorganique disponible en fonction du pH du milieu.**

Comme le montre bien la figure VI.24., seul le CO<sub>2</sub> dissout, les ions bicarbonate HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, et carbonate CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> sont assimilables par le milieu. Le pH de la culture va donc avoir un impact sur les espèces carbonates disponibles. Nous rappelons que dans le cas de la *Spirulina*, le pH optimal de la culture est autour de la valeur 8 – 9 (Figure VI.23) où les espèces prédominantes dans le milieu de culture sont les ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (somme du dôme de la Figure VI.24) [221].

Dans la figure VI.25, sont données les productions de H<sub>2</sub> en fonction des différentes concentrations imposées de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> à la culture. Au vu de l'allure de la production de H<sub>2</sub>, il apparaît un sommet de 11,5 μmol/mg PS à la concentration en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 300 mM. Il est aussi remarqué que les cultures plus concentrées en bicarbonates ont un effet négatif sur la production d'hydrogène. [3] suppose que l'augmentation de la concentration des bicarbonates dans le milieu favorise la fixation du CO<sub>2</sub>, qui est une voie consommatrice du NADPH. Ce qui explique la diminution de la production d'hydrogène. Néanmoins, certains auteurs ont rapporté que des concentrations excédentaires en bicarbonates peuvent affecter l'acquisition du CO<sub>2</sub> par les cellules algales. Par voie de conséquence, le pH du milieu s'alcalinise alors et s'éloigne, de ce fait, du pH optimal [3, 222].

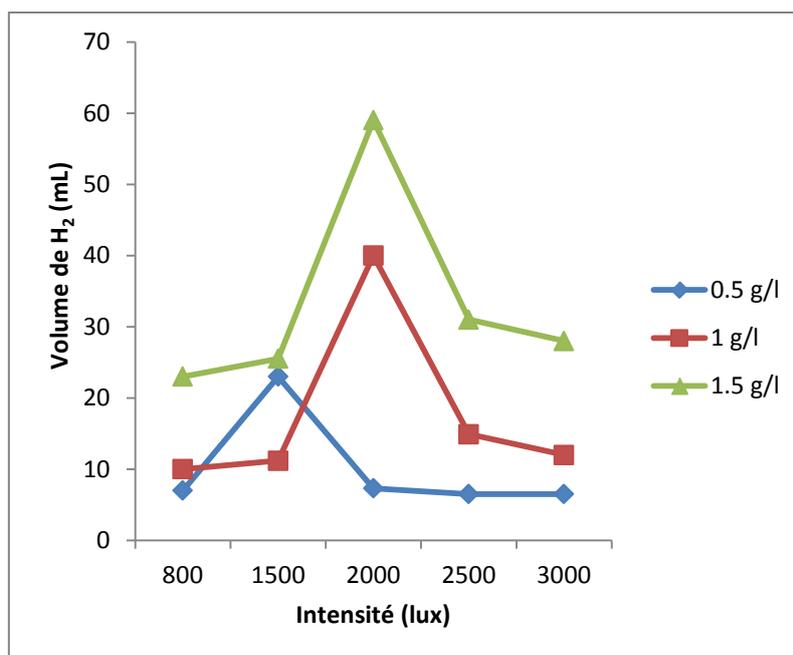


**Figure VI.25 : Production d'hydrogène en photo-fermentation en fonction de la concentration en NaHCO<sub>3</sub>.**

### **G/ Effet de l'intensité lumineuse et de la concentration de biomasse sur la production d'Hydrogène**

L'étude de l'effet de l'intensité lumineuse est effectuée sur le PBR cylindrique de volume 250 mL à différentes concentrations de biomasse (figure VI.26). Il ressort que les taux de production d'hydrogène augmentent pour atteindre un maximum de 1500 lux pour une concentration de 0,5 g/L et un autre de 2000 lux dans le cas des concentrations 1 g/L et 1,5 g/L. Ces résultats sont en parfait accord avec les résultats rapportés par Ogbonna et Tanaka (2000) [5]. Ces sommums de bio-génération d'hydrogène sont fort probablement dus à la bonne diffusion de lumière dans la culture de *Spiruline*.

La figure VI.26 montre aussi que l'exposition de cultures de faibles densités (0.5 g/L) aux intensités lumineuses élevées entraîne une chute de la production d'hydrogène. Il s'agit ici du phénomène de photo-inhibition survenant dans les cultures de *Spiruline* soumises au stress cellulaire et de destruction des éléments de photosystème II [187].



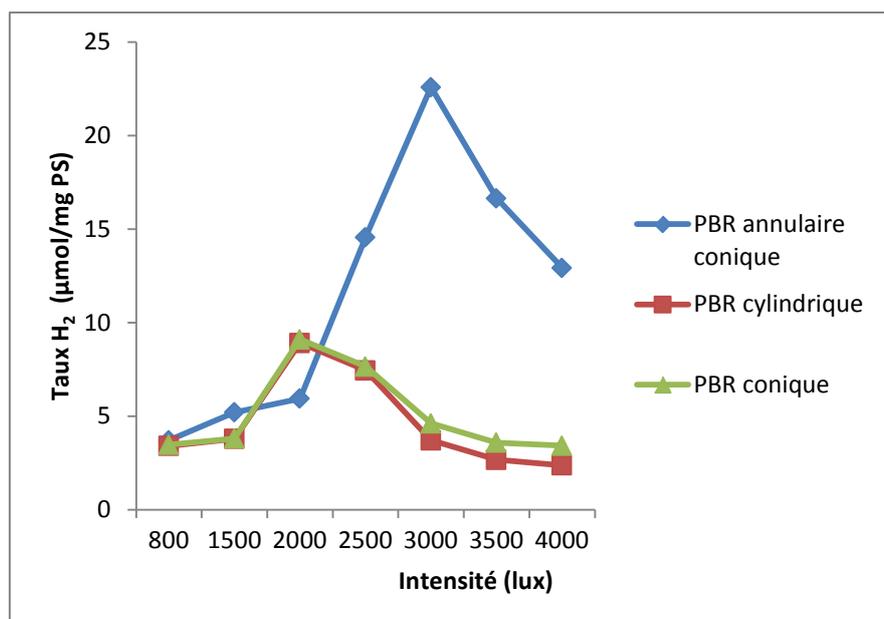
**Figure VI.26 : Optimums de production d'hydrogène. Effet de l'intensité lumineuse et de la concentration de biomasse.**

Bien au contraire, dans le cas de l'exposition à de faibles intensités lumineuses de cultures denses, nous assistons au phénomène de juxtaposition des filaments de spiruline empêchant ainsi l'accès des bactéries aux rayons lumineux. Ce phénomène est à l'origine de l'effet d'écran. Cette hypothèse peut expliquer les faibles taux de production d'hydrogène sous ces conditions [5, 223].

## H/ Etude comparative sur la production d'hydrogène.

### H.1/ Effet de la géométrie des PBR

L'étude est réalisée sur une culture de densité fixe 1,5 g/L dans trois photo-bio-réacteurs de forme géométrique différente. Elle consiste à faire varier l'intensité lumineuse de 800 à 4000 lux. Les résultats sont regroupés dans la figure VI.27 où les taux de production d'hydrogène passent par des valeurs maximales à 2000 lux pour les photo-bio-réacteurs conique ainsi que cylindrique et à 3000 lux dans le cas du photo-bio-réacteur annulaire (22,56  $\mu\text{mol}/\text{mg PS}$ ). Au delà de 3000 lux (PBR annulaire), les cellules de la culture se retrouvent dans une phase de déclin de bio-production de  $\text{H}_2$  (photo-inhibition de la lumière). Cependant les deux autres PBR classiques passent par la même phase mais avec une régression moins nette que celle du PBR annulaire. On considère que les intensités lumineuses supérieures à 3000 lux inhibent la photo-fermentation des cellules de la souche *Spiruline*.



**Figure VI.27 : Taux de production de H<sub>2</sub>. Effet de la géométrie des PBR.**

A la lecture de ces résultats, on confirme les performances uniques du photo-bio-réacteur annulaire, conçu à l'*Enava*, sur une culture de 1,5g/L et ce, en lien direct avec sa surface spécifique élevée S/V de 85 m<sup>-1</sup>, (Tableau VI.8). Elle est d'ailleurs 1,7 fois plus élevée que les surfaces spécifiques des photo-bio-réacteurs cylindrique (50 m<sup>-1</sup>) ou conique (49 m<sup>-1</sup>).

**Tableau VI.8 : Volume d'hydrogène produit sur les 3 photo-bio-réacteurs.**

Forme du PBR	Cylindrique	conique	Annulaire
Volume de H <sub>2</sub> (mL)	<b>60</b>	<b>61</b>	<b>189</b>
Surface d'exposition (cm <sup>2</sup> )	<b>100,53</b>	<b>98,96</b>	<b>245,04</b>
Surface spécifique (cm <sup>-1</sup> )	<b>0,50</b>	<b>0,49</b>	<b>0,85</b>

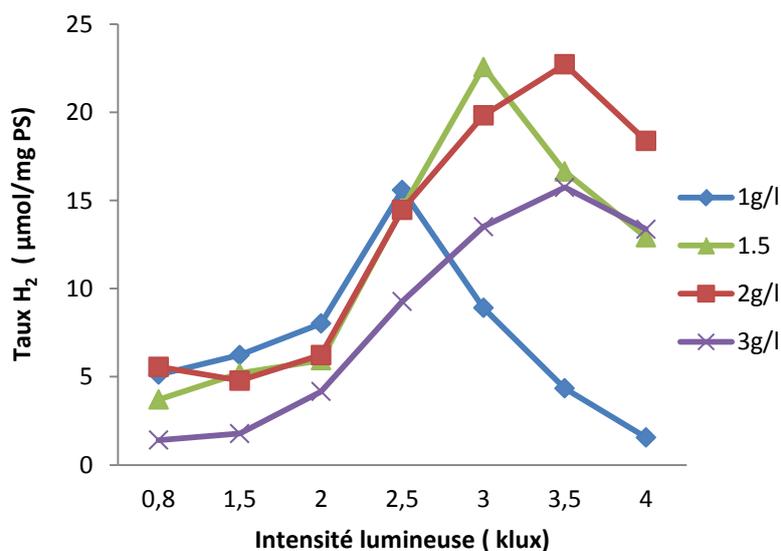
#### **H/ Effet de la densité de culture**

La deuxième étape consiste à améliorer la bio-production de H<sub>2</sub> en batch du PBR ayant donné le meilleur taux d'hydrogène en s'intéressant de près à l'effet de la lumière sur les différentes cultures (figure VI.28). La production de H<sub>2</sub> augmente proportionnellement avec les densités de culture, allant de 0,8 à 2 g/L, jusqu'à un optimum correspondant à 22,73 µmol/mg PS (biomasse de 2 g/L).

En général, la production de H<sub>2</sub> en fonction de l'intensité de la lumière peut être divisée en quatre phases: faible intervalle de production, intervalle de photo-limitation, intervalle photo-saturation contenant le point de production optimale et enfin l'intervalle de photo-inhibition.

En effet, la production d'hydrogène après l'incubation anaérobie dans l'obscurité pendant 24 h de milieu culture de production épuisé en azote varie dans l'ordre suivant:

1 g/L < 1,5 g/L < 2 = 3 g/L.



**Figure VI.28 : Effet de la densité des cultures et de l'intensité lumineuse sur l'évolution de H<sub>2</sub>.**

Les fortes intensités lumineuses affectent considérablement les taux de production d'H<sub>2</sub> dans le cas d'une faible concentration de biomasse (1 g/L) pouvant être expliqué par le stress cellulaire et l'inhibition des voies métaboliques de l'hydrogénase. Bien au contraire, lorsque les cultures plus denses (3 g/L) sont exposées à des intensités lumineuses faibles, une juxtaposition des filaments de *Spiruline* s'impose à l'effet auto-ombrage (effet d'écran) dans la culture. Ce qui conduit, par conséquent, à la baisse de production d'hydrogène. [5].

Notre production optimale d'H<sub>2</sub> correspondant à 0,75µmol/mg. h est comparée aux valeurs rapportées par la littérature.(tableau VI.09)

**Tableau VI.9 : Taux de production de H<sub>2</sub> rapportés dans la littérature pour différents systèmes de production photo-trophique.**

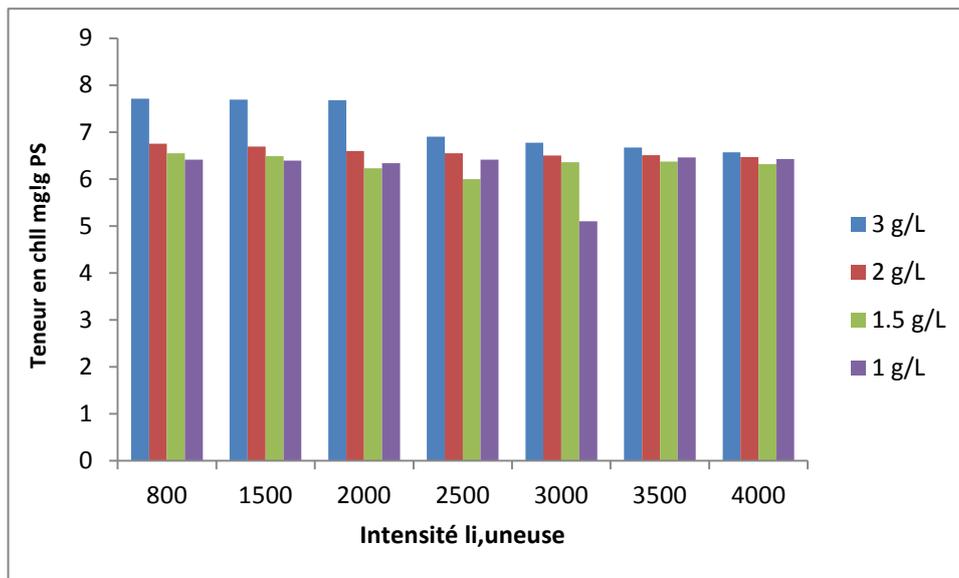
Micro-organisme souches	conditions physicochimiques Optimales	taux de production l'hydrogène		Référencés
		ml/L cult /h	µmol/mg PS/h	
	Illumination (I)			
<i>Spirulina platensis</i>	36 µ mol/m <sup>2</sup> s	6,8	0.75	Présent travail
<i>Spirulina platensis e</i>	8 W/m <sup>2</sup>	4.032	0.51	Oyamat K [151]
<i>Synechococcus PCC 602</i>	20 mE/m <sup>2</sup> /s C		0.66	Howarth DC[223]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		2.1		Laurinavichene TV[224]
<i>Chlamydomonas MGA 161</i>	25 W/m <sup>2</sup>	4.48		Ohta S [225]
<i>R. sphaeroides O. U.001 1 3</i>		6.5		Basak Net all et al [226]
<i>Anabaena variabilis ATCC 29413</i>	150 mE/m <sup>2</sup> /s		0.25	Berberoglu H [227]

### VII.6. Composition de spiruline en chlorophylle

Le stress environnemental affecte la fonction de PSII, directement ou indirectement, le contenu cellulaire en pigment représente un outil utile pour obtenir des preuves rapides des conditions de stress qui affectent l'activité photosynthétique de la culture et pour quantifier l'effet de stress sur le rendement des biomasses.

L'estimation quotidienne des teneurs en chlorophylle et phycocyanine dans une biomasse est exploitée dans les productions phototrophiques des cultures et servie comme des signaux d'avertissement, qui doivent être connus le plus tôt possible à fin d'éviter une réduction significative de la productivité, dans certaines cas peuvent aboutir à la perte de la culture dans quelques jours. [228]

Les résultats obtenus sur les taux en chlorophylle durant la fermentation de biohydrogène sont résumés dans la figure VI.29. A travers les résultats on constate que lorsque l'intensité lumineuse diminue, la teneur en chlorophylle de biomasse augmente. l'effet est bien remarqué avec la culture la plus dense 3 g/l, ce résultat concorde avec celle décrite par Vanshak et ses collaborateurs (1993, 1996) [229, 229].



**VI.29 Figure : Teneurs en chlorophylle. effet de l'intensité lumineuse et densité de culture**

### Interprétation des résultats

On peut interpréter la réduction de la teneur en chlorophylle de *Spiruline*, comme une réponse adaptative contre l'élévation de l'intensité lumineuse dans la culture, on réduisant le taux de chlorophylle pour éviter l'excès d'énergie lumineux véhiculé vers le centre de réaction de photosystème II, cela permettrait une diminution du transfert d'énergie entre les antennes collectrices telles que les phycobilisomes vers le PSII, et réduirait la portée de l'énergie d'excitation, cette dernière est la cause principale de destruction du photosystème II même si la radiation ne dépasse pas les seuils de saturation [48].

## Conclusions générales

L'hydrogène moléculaire est un vecteur d'énergie propre et écologique qui peut bien être une alternative aux ressources limitées en combustibles fossiles. Dans le cas de la production photo-biologique de H<sub>2</sub>, les cyanobactéries photosynthétiques sont parmi les candidates idéales. Elles ont des besoins nutritionnels rudimentaires ; elles peuvent croître dans l'air, l'eau et les sels minéraux avec la lumière comme seule source d'énergie.

Les cyanobactéries filamenteuses sont cultivées dans les bioréacteurs pour la conversion photo-biologique de l'eau en hydrogène. Cependant, les rendements de conversion restent faibles car la production nette de H<sub>2</sub> est le résultat de son évolution via une hydrogénase et une réaction inverse de l'hydrogénase bidirectionnelle consommatrice d'une partie l'hydrogène produit.

Le présent travail a pour objectif la production d'hydrogène via la valorisation d'une biomasse algale, de la région de Tamanrasset, de type *Spiruline* (*Arthrospira platensis*) dans un photo-bio-réacteur de nouvelle conception. Ce PBR permet de vérifier l'effet des cultures denses sur le taux de production de H<sub>2</sub> obtenu par photo-fermentation. Mais aussi d'optimiser la productivité volumique de biomasse et la croissance de la *Spiruline*.

Les résultats expérimentaux obtenus par le plan d'expériences multifactoriel ont permis de trouver un modèle mathématique de production de biomasse et de simuler les conditions de production d'hydrogène sur les différents PBR utilisés. Concernant la production de biomasse de la *Spiruline*, deux modes d'optimisation ont été étudiés : *i*) le mode classique pour l'effet facteur individuel sur la réponse et *ii*) le mode multifactoriel qui utilise la méthode de réponse en plan factoriel. Les résultats ont montré que la concentration initiale de biomasse, l'intensité de la lumière et la surface spécifique (S/V) ont une influence significative sur la productivité de biomasse et le taux de croissance de la *Spiruline*. En mode optimisation classique : les valeurs adéquates de l'intensité lumineuse, du volume de PBR sont de l'ordre de 2000 lux et 18 mL. Le mode RSM a révélé que la concentration initiale de biomasse, l'intensité lumineuse et le trajet lumineux (S/V) sont interdépendants : il s'agit d'une interaction positive entre le trajet lumineux du PBR et l'intensité lumineuse et aussi entre le trajet lumineux et la concentration de l'inoculum. En revanche, une interaction négative est constatée entre la concentration de l'inoculum et l'intensité lumineuse.

L'utilisation de la méthode ANOVA a montré que le modèle est hautement significatif. Les résultats statistiques du modèle quadratique pour la productivité et le taux de croissance montrent une grande fiabilité dans l'estimation des valeurs des deux réponses ( $R^2 = 0,964$  et  $R^2 = 0,938$ , respectivement). En outre, les valeurs de productivité et de taux de croissance de cette démarche expérimentale se situent au dessus de celles de la littérature ; ce qui indique que la *Spiruline* est développée efficacement dans le dispositif conçu au laboratoire.

La deuxième partie de notre étude a porté sur la bio-production concrète de  $H_2$  sur une souche algérienne en opérant sur les paramètres : âge de la souche, pH du milieu, température du milieu, concentration en NaCl, concentration en  $NaHCO_3$ ... avec optimums obtenus aux alentours de 24 et 32 jours, pH = 8.5, 34°C, 17 mmol. L<sup>-1</sup> de NaCl et 300 mmol. L<sup>-1</sup>  $NaHCO_3$  respectivement.

La production de  $H_2$  est suivie sur trois PBR de formes géométriques différentes aux intensités lumineuses allant de 800- 4000 lux. Les meilleures productions d'hydrogène (22  $\mu\text{mol}/\text{mg PS}$ ) ont été obtenues dans le photo-bio-réacteur conique annulaire qui offre une surface éclairée exceptionnelle (245  $\text{cm}^2$ ) et limite les phénomènes d'ombre et de photolyse dans des cultures denses.

**En perspective**, il serait intéressant de :

- Produire la biomasse de spiruline en continu, ou en semi-continu, par la nouvelle conception de PBR annulaire,
- Analyser la consommation d'énergie du PBR conçu au laboratoire et la comparer à celle des systèmes bassins ouverts (industrie),
- Faire une étude hydrodynamique sur cette nouvelle conception,
- Utiliser les sous produits industriels : lactosérum, mélasses, ... par voie mixo-trophie et hétérotrophie pour la production de l'hydrogène.

- [1] Zyper, J., Yoza, B.A., Benemann, J.R., Tredici, M.R. & Zaborsky, O.R., Internal gas exchange photobioreactor development and testing in Hawaii. 1998, p. 441–446, In: Biohydrogen (ed. O. Zaborsky), *London: Plenum Press*; 1998, p. 530.
- [2] Cammack. R, Frey. M. and Robson. R. Hydrogen as afuel. taylor and francis london, 2001. 288p.
- [3] Ananyev. G., Carrieri. D., and Dismukes. C.G. Optimization of Metabolic Capacity and Flux through Environmental Cues To Maximize Hydrogen Production by the Cyanobacterium “*Arthrospira (Spirulina) maxim*. Department *Applied and Environment Microbiology*, 2008, Vol. 74, n° 19, p. 6102–6113.
- [04] Vonshak, A. *Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology* London, edition *taylor et francis* 2002. P.252.
- [5] Ogbonna, J. C. and Tanaka, H. Light requirement and photosynthetic cell cultivation – Development of processes for efficient light utilization in *photobioreactors*. *Journal of Applied Phycology*, 2000, Vol. 12, n°3-5, p. 207–218.
- [06] Carlozzi, P. Closed Photobioreactor Assessments to Grow, Intensively, Light Dependent Microorganisms: A Twenty-Year Italian Outdoor Investigation. *The Open Biotechnology Journal*, 2008, Vol. 2, p.63-72.
- [7] Molina, E., Fernández, J., Acién, F.G. and Chisti, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, 2001, Vol. 92, n°2, p. 113–131.
- [08] Sforza, E., Gris, B., de Silva. F. C. E et Morosinotto, T. Effects of Light on Cultivation of *Scenedesmus Obliquus* in Batch and Continuous Flat Plate Photobioreactor. *Chemical Engineering*. 2014, Vol. 38, p. 211-216 .
- [09] Zhang, L., Chen, L., Wang, J. Chen, Y., Gao, X., Zhang, Z. Tianzhong Liu. Attached cultivation for improving the biomass productivity of *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*. 2015. Vol. 181, p. 136–142.
- [10] Zittelli, Chini G., Rodolfi L., Biondi, N. and Tredici, MR. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*. 2006, Vol. 26, n° 3, p. 932—943.
- [11] Fernandez, Sevilla, U J. M. and Molina, Grima, E. Photobioreactors for the production of microalgae *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* June 2013, Vol. 12, n° 2, p 131–151.
- [12] Doucha, J. and Livansky, K. Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: productivity and operational parameters. *Algological Studies*. 1995, Vol. 106, n° 76, p. 129–147.
- [13] Schopf, J. W. The Fossil Record: Tracing the Roots of the Cyanobacterial Lineage. in B. Whitton and M. Potts, editors. *The Ecology of Cyanobacteria. Springer Netherlands*, 2002, p. 13-35. [en ligne]. [consulté le 15 mars 2005]. Disponible sur <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F0-306-46855-7.pdf>
- [14] Pentecost, A. Calcification Processes in Algae and Cyanobacteria. in R. Riding, editor. *Calcareous Algae and Stromatolites. Springer Berlin Heidelberg*; 1991, p. 3-20.
- [15] Delwiche, C. and J. Palmer. The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. in D. Bhattacharya, editor. *Origins of Algae and their Plastids. Springer Vienna*. 1997, p. 53-86.

- [16] Bruce, Alberts., Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and Peter Walter Molecular Biology of the Cell, *Garland Science*, New York, 2002, P1616.
- [17] Prat, R. et Vonarx, V. La structure de chloroplaste : La théorie endosymbiotique [Enligne] consulté le 10 aout 2017 disponible sur le site  [<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/endosymbiose.htm>](http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/endosymbiose.htm)
- [18] Seckbach, Joseph. Algae and cyanobacteria in extreme environments. *Editeur Dordrecht*, Springer Verlag New York Inc 2007, p786.
- [19] Paerl, H. W. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia*. 1996, Vol. 35, n° 6S, p. 25-35.
- [20] Castenholz, R. W. Motility and tax, 1982, in Cyanobacteria Ecological Importance, biotechnological uses and risk management, by Nova science publisher, now York, 2014, p. 204 [Enligne] consulté le 20 janvier 2017 disponible sur le site:  [< http://pdfs.semanticscholar.org/4250/9a77f4a4a7e8afb630a5e79b3d4a34588baf.pdf>](http://pdfs.semanticscholar.org/4250/9a77f4a4a7e8afb630a5e79b3d4a34588baf.pdf)
- [21] Falquet, J. et Hurni, J-P. Spiruline : aspects nutritionnels. [Enligne] consulté le 20 janvier 2008 disponible sur le site: <  [www.antenna.ch/documents/ AspNutrpdf](http://www.antenna.ch/documents/AspNutrpdf)>
- [22] Fox, R-D. Spiruline, Technique pratique et promesse. Aix en Provence, 13090 AIX-EN-ROVENCE France.: *Edisud*, 1999, p. 246.
- [23] C. Svrcek, D. W. Smith, *Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review*, *Journal of Environmental Engineering and Science*. 2004, Vol. 3, n° 3, p. 155-184.
- [24] Ministère de la santé et des services sociaux et Santé Canada, Risque à la santé publique découlant de la présence de cyanobactéries et de microcystines dans trois bassins versants du Sud-ouest québécois tributaire du fleuve Saint-Laurent, décembre, 2001. [en ligne]. [date de consultation ouate 2017]. Disponible sur :  [<Disponiblesurhttp://meteopolitique.com/Fiches/eau/Cours-d-eau-acs/algues/documentation/cyanobacterie/a003.pdf>](http://meteopolitique.com/Fiches/eau/Cours-d-eau-acs/algues/documentation/cyanobacterie/a003.pdf)
- [25] Karamyan, VT. and Speth, RC., Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review ; *Life Science* . 2008, Vol. 82, n° 5-6, p. 233-246.
- [26] Farrar, W-V. and Techuitlatl, A. Glimpse of Aztec Food Technology. *Nature*, 1996; Vol. 21, p. 341-342.
- [27] *Wittrock & Nordstedt. Algae aquae ducia exsicc, fascicule XIV N° 679 of Descriptiones systematicae dispositae*, 1899, p. 59.
- [28] Sguer; S. 2008. Spirulina plaensis et ses constituants intérêts nutritionnels et activitésthérapeutiques.[en ligne].. Thèse Université Nancy1, 175p [Consultée mai 2017], disponible sur site <[http://docnum.univlorraine.fr/public/SCDPHA\\_T\\_2009\\_LAURENT-DARGENT\\_JONATHAN.pdf](http://docnum.univlorraine.fr/public/SCDPHA_T_2009_LAURENT-DARGENT_JONATHAN.pdf)>
- [29] Hayashi, K., Hayashi, T. and Kojima, I. - AIDS research and human.. A Natural Sulfated Polysaccharide, Calcium Spirulan, Isolated from *Spirulina platensis*: *In Vitro* and *ex Vivo* Evaluation of Anti-Herpes Simplex Virus and Anti-Human Immunodeficiency Virus Activities. *Aids Research and Human Retroviruses*, 1996, Vol. 12, n° 15, p. 1463-1471.
- [30] Salle, M., Dankoko, B., Badiane, M., Ehua, E. and Kuakuwi, N. La spiruline: une source d'alimentation à promouvoir. *Médecine d'Afrique Noire*. 1999, Vol. 46, n° 3, p. 87-92.

- [31] Ogbonda, Kemka. H., Rebecca, E. and Aminigo, Gideon. O. A. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina sp.* *Bioresource Technology*. 2007, Vol. 98, n° 1, p. 207–221.
- [32] Jarisoa T., Adaptation de spiruline du sud de Madagascar à la culture en eau de mer, Mise au point de structures de production à l'échelle villageoise. Thèse doctorat en Es Sciences en Océanologie Appliquée. Université de Toliara. 2005. p188. [en ligne]. [consulté le 15 mars 2016]. Disponible sur <https://www.docdeveloppementdurable.org/file/Culturepiruline/adaptation%20spiruline%20de%20Madagascar%20a%20culture%20en%20eau%20de%20mer.pdf>
- [33] Doumengue, F. and Durand-Chastel, H. La Spiruline, *algue de vie*. bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco, n° special 1993, Vol. 12, p, 222.
- [34] Stanier, R. Y. 1974. Division I. The Cyanobacteria, p. 22. In Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*. The Williams & Ins Co., Baltimore. Stanier R. Y. et Van Niel C. B. The concept of a bacterium. *Archives . Mikrobiology*. 1962, Vol. 42, p.17-35
- [35] Stanier, R. Y. et Van Niel, C. B. The concept of a bacterium. *Archives. Mikrobiology*. 1963. 42, p: 17-35
- [36] Giraldine, Andréani. C, Spiruline, système sanguine, système immunitaire et cancer. *Phytothérapie*: 2005, p. 158-161.
- [37] Rippka, R., Deruelles, J. B., Waterbury, M. Herdman, M. and Stanier, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 1979, Vol. 111, p. 1–6.
- [38] Bart, Nelissen., Annick. Wilmotte., Jean-Marc, Neefs. And Rupert, De Wachter. Phylogenetic Relationships Among Filamentous Helical Cyanobacteria Investigated on the Basis of 16S Ribosomal RNA Gene Sequence Analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 1994. Vol. 17, n° 2, p, 206-210.
- [39] Gomont, M. Monographie des Oscillariées (Nostocacées Homocystées). Deuxième partie. - Lyngbyées. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique*. . 1892. Serie 7; n° 16, p. 91-264.
- [40] Geitler, L. in Rabenhorst. L. (ed) *kryptogamenflora deutschland , osterreich und der schweitz*. Akad. Verlag, 1932; 14, p916.
- [41] Pier, lovisi, C. L'Homme et la Spiruline: Un avenir commun? Composition chimique, intérêts alimentaires et activités biologiques. Paris V- René Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris 2007. p162.
- [42] Ciferri, O. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* 1983 Vol. 47, n° 4, p. 551-578.
- [43] Balloni, I. W., Tomaselli, L., Giovannetti, L. and Margheri, M.C. (1980) *Biologia fondamentale del genere Spirulina*. In Materassi, R. (Ed.) *Prospettive della Coltura di Spirulina in Italia*, 1980. p. 49, Roma: CNR.
- [44] Clément, G. *Spirulina*, a protein-rich food alga, conférence du Caire avril 1975. Institut français du Pétrole, division Applications, 1975b; 1-18.
- [45] Hug, C et Von der, wied, D. La spiruline dans la lutte contre la malnutrition, Bilan et perspectives. Antenna Technologies, Genève, 2011. 30p.

- [46] Cruchot, H. La spiruline, bilan et perspectives, Thèse de doctorat, faculté de médecine et de pharmacie de BESANCON, Université de Franche-Comte, France, 2008. 249. [en ligne]. [consulté le 15 mars 2015]. Disponible sur <<http://www.theses.fr/05855968X>>
- [47] Romay C., Armesto J., Ramirez D., Gonzalez R., Ledon N. and Garcia I. *Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. Inflammation Research*, 1998, Vol. 47, n° 1, p. 36-41.
- [48] Richmond, Amos. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phyco. logy Edited by Editorial Offices: 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK 2004. [en ligne] 02/08/2017, Consulté sur le site <[sulonlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470995280.../pdf](http://sulonlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470995280.../pdf)>
- [49] Belay, A., Ota Y., Miyakawa, K. and Shimamatsu, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of Applied Phycology* 1993, Vol 5, n°2, p. 235-241.
- [50] Bujard, E., Braco, U., Mauron J., Mottu F., Nabholz, A., Wuhrmann J et Clement, G., Composition and nutritive value of blue-green algae (spirulina) and their possible use in food formulations. » 3rd International Congress of Food Science and Technology, Abstracts. Washington, 1970.
- [51] Anusuya, D.M. et Venkataraman, L.V. « Supplementary value of the proteins of the blue-green algae *Spirulina platensis* to rice and wheat proteins. » *Nutrition. Reports. International*, 1983, Vol. 28, p. 1029-1035.
- [52] Venkataraman, L.V. *Spirulina* by 2001AD. Cyanobacterial biotechnology : proceedings of the International Symposium Oxford & IBH Publishing CO.PVT.LTD september, 1998, 18-21.
- [53] Johnson; P. et Shubert E. Availability of iron to rats from *Spirulina*, a blue-green algae » *Nutrition Research*, 1986, Vo. 6, n°1, p. 85-94.
- [54] Fedkovik, Y., Astre C., Pinguet, F., Gerber, M., Ychou, M. et Pujol, H. Spiruline et cancer. Spiruline, algue de *océanographique* vie. Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco N° spécial 12 – Monaco, Musée. 1993, p. 117-119.
- [55] Belay, Amba,. The Potential Application of *Spirulina (Arthrospira)* as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *The Journal of the American Nutraceutical Association*. 2002, Vol. 5, n° 2, p. 27-48.
- [56] Cqpet, F., Debaille, R., Tafforeau, J. et Van Oyen H. Définitions et symptômes du diabète. »Diabète : situation actuelle et éléments pour le développement d'une politique de santé ; Centre de Recherche Opérationnelle en Santé Publique – Episérie, 1999, n° 19 ; p. 8-12.
- [57] Mani U.V., Sangeeta S., Iyer U.M. and Subramanian S.R. « Studies on the effect of spirulina supplementation in Control of Diabetes Mellitus » Cyanobacterial biotechnology : proceedings of the International Symposium, september 18-21 Oxford & IBH Publishing CO.PVT.LTD. 1996, 301-304,.
- [58] Henrikson R. Earth Food Spirulina (Ronore Enterprises, Inc.) 1999. [en ligne]. consulte le aout 2017. Disponible sur le site <<http://spirulinaresource.com>>.
- [59] Sironval, C. La spiruline, une arme contre la malnutrition, histoire et perspectives » Spiruline, algue de vie ; bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco N° spécial 12 – Monaco, Musée océanographique. 1993, p203-210,

- [60] Henson, R. Spirulina : Health food for the aquarium. *Freshwater and Marine Aquarium*, 1993, p. 70-72.
- [61] Iltis.A., Tolérance de salinité de *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl., (Cyanophyta) dans les mares natronées du Kanem (Tchad). *Cah. O.R.S.T.O.M., série. Hydrobiologie* ., 1968, Vol. 2, n° 34, p. 119-125,.
- [62] Mandalam, R. and B.O., P. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 1998, Vol 59, n°5, p. 605\_611.
- [63] Pratt, R. Studies on *Chlorella vulgaris* vii :Influence of the algae of the culture on the rates of photosynthesis and respiration. *American Journal of Botany*, 1943, vol. 30, p.404-408.
- [48]Amos Richmond .2004. Handbook of Microalgal Culture: *Biotechnology and Applied Phycology*. Edition :9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK, 2004, p577.
- [64] Whitton, B.A., Potts, M. The Ecology of Cyanobacteria, Their Diversity in Time and Space. edition , *Kluwer Academic Publishers* New York, Boston, 2002, p669.
- [65] Falkowski, P. G., and Raven, J. A. Aquatic photosynthesis .Second Edition.*Princeton University Press*, 2007, p384,.
- [66] Wim, F.J. Vermaas., John, Wiley. and Sons, Ltd. Photosynthesis and Respiration in *Cyanobacteria*. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES* © Arizona State University, Tempe, Arizona, USA. 2001, en ligne]. [consulté 02 aout 2017] sur le site <[www.els.net](http://www.els.net)>
- [67] Robert. Carpentier, *Laboratoire de biochimie du chloroplaste et photosynthèse* [en ligne]. [consulté 20 aout 2017]. Disponible sur : <[http://www.uqtr.ca/labcarpentier/fr/accueil\\_frames.htm](http://www.uqtr.ca/labcarpentier/fr/accueil_frames.htm)>.
- [68] Ben Hankamer, Ed Morris., JonNield, AlexCarne., and James, Barber. Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II. *FEBS Letters* (Federation of European Biochemical Societies) 2001, Vol. 504, n° 3, p. 142-151.
- [69] Nanba, O. et Satoh, K. Isolation of a photosystem II reaction center consisting of 0-1 and 0- 2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987, Vol. 84, n° 1, p. 109-112.
- [70] Barber, E.D., Astill, B.D., Moran, E.J., Schneider, B.F., Gray, T.J.B., Lake, B.G., Evans, J.G. Peroxisome induction studies on seven phthalate esters. *Toxic Ind. Health*, 1987, 3, 7-24,.
- [71] Kleoniki Gounaris David J.Chapman. JamesBarber 1989, Isolation and characterisation of a D1/D2/cytochrome b-559 complex from *Synechocystis* 6803. *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA) – *Bioenergetics*, 1989, Vol. 973, n° 2, p. 296-30&.
- [72] Photosystèmes I et II - Antenne, paire spéciale, séparation de charges [en ligne]. consulte le 15-08-2017.disponible sur: <[biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/.../5Photosystemes/1Photosystemes.html](http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/.../5Photosystemes/1Photosystemes.html)>
- [73] Böhme H , Pelzer B , Böger P. Purification and characterization of cytochrome f-556.5 from the blue-green alga *Spirulina platensis*.. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1980, Vol. 592n° 3, 528-535.

- [74] Yoshiko Minami Keishiro Wada Hiroshi Matsubara. The Isolation and Characterization of a Cytochrome b6f Complex from the Cyanobacterium *Spirulina* sp. *Plant and Cell Physiology*, 1989, Vol. 30, n° 1, p. 91–98.
- [75] Kallas. T and Bryant., in A. the cytochrome b6fComplex., chapter 9 pp. 259-317 in Bryant A. The Molecular Biology of Cyanobacteria. *Kluwer Academic Publishers*, 1994, p. 736, .
- [76] G. Sandmann S. SchererP. Böge (General Aspects of Location and Interaction of Respiratory and Photosynthetic Electron Transport in Blue-Green Algae. Compartments in Algal Cells and Their Interaction, *Berlin, Heidelberg*, 1984, p. 241.
- [77] Ort, D. R., and C. F. Yocum. 1996. Electron transfer and energy transduction in photosynthesis: an overview. Pages 1-9 in D. R. Ort and C. F. Yocum, eds. *Oxygenic photosynthesis; the light reactions*. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, 1996, p654.
- [78] Martin Doležal<sup>1</sup> and Katarína Kráľová<sup>2</sup>. Synthesis and Evaluation of Pyrazine Derivatives with Herbicidal Activity. [en ligne]. consulté le 11 août 2017. Disponible sur : <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/13156.pdf>
- [79] Le transport non cyclique et cyclique des électrons - Schéma en "Z", [en ligne]. consulté le 01 août 2017. Disponible sur : <https://www.google.dz/search?q=Sch%C3%A9ma+du+transport+cyclique&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwIjsIqCzZjaAhXDthQKHUIdDG8QsAQIQA>
- [80] Krauss, N., Hinrichs, W., Witt, I., Fronne E, P., Ppritzkow, W., Dauter, Z., Betzel, C., Wilson, K.S., Witt, H.T. and Saenger, W. Three dimensional structure of system I of photosynthesis at 6 Å resolution. *Nature*, 1993, Vol. 361, n° 6410, p. 326-331.
- [81] HICKS, D.B. and YOCUM, C.F. Properties of cyanobacterial coupling factor ATPase from *Spirulina platensis*. I. Electrophoretic characterization and reconstitution of photophosphorylation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*., 1986a, Vol. 245, n°1, p. 245, 220.
- [82] Bryant, D.A. The Molecular Biology of Cyanobacteria. **1994, p. 916.**
- [83] Whitmarsh, J. . Electron transport and energy transduction. *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise*. Editors, A. S. Raghavendra: Cambridge University Press, Cambridge, 1998, 87-107.
- [84] D. Robert, J.C. Roland). *Biologie végétale*, volume 1: organisation cellulaire. Organisation cellulaire *Doin Initiatives Santé*, Vélizy-Villacoublay, 1998, P 367.
- [85] Spoaloro, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *Kluwer Academic Publishers*, 2006, 101, 87–96.
- [86] Pulz, O. Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, Vol. 57, n° 3, p. 287–293.
- [87] Pulz, O. and Scheinbenbogen, K. Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1998, 59, 123–152.
- [88] Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*., 2010, 14, 217-232.

- [89] Xiaobin Wen, Kui Du, Zhongjie Wang, Xinan Peng, Liming Luo, Huanping Tao, Yan Xu, Dan Zhang, Yahong Geng, and Yeguang Li. Effective cultivation of microalgae for biofuel production: a pilot-scale evaluation of a novel oleaginous microalga *Graesiella sp.* *WBG-1. Biotechnology Biofuels*. 2016, 9: 123.  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4906892/>>
- [90] Luis C. Fernández Linares, Kevin Á. González Falfán and Citlally Ramírez-López. Chapter 13, Microalgal Biomass: A Biorefinery Approach in "Biomass Volume Estimation and Valorization for Energy", book edited by Jaya Shankar Tumuluru, ISBN 978-953-51-2938-7, Print ISBN 978-953-51-2937-0, Published: February 22, 2017 site : <<http://dx.doi.org/10.5772/65827>(date de consulte aoute2017)>
- [91] <http://micro-algues-tpe.eklablog.com/le-culture-des--algues-a43187583>
- [92] Weissman J. C, Tillett D. M. Aquatic Species Project Report; NREL/MP-232-4174, Brown LM, Sprague S (Eds.) *National renewable energy laboratory, Golden CO*, 1992 p., 41 – 58.
- [93] IEA. «Algal Biofuels Status and Prospects.» *IEA Bioenergy Annual Report*, 2010. [en ligne]. consulté le 01 aout 2017. Disponible sur : <[http://www.globalbioenergy.org/uploads/media/1008\\_IEA\\_Bioenergy\\_\\_Current\\_status\\_and\\_potential\\_for\\_algal\\_biofuels\\_production.pdf](http://www.globalbioenergy.org/uploads/media/1008_IEA_Bioenergy__Current_status_and_potential_for_algal_biofuels_production.pdf)>
- [94] Acien Fernandez, F. G., Sevilla, J. M. F., Perez, J. A. S., Grima, E. M. and Chisti, Y. "Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor ction of microalgae: assessment of design and performance." *Chemical Engineering Science* 2001, Vol. 56, n° 8, p. 2721-2732.
- [95] Richmond, A. "Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view." *Journal of Applied Phycology*, 2000, Vol. 12, n° 3-5, p. 441-45.
- [96] Tredicci, M.R. Bioreactors, photo. In M.C. Flickinger and S.W. Drew *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*, vol 1. *Wiley, New York, USA*, [eds.] 1999, pp. 395-419.
- [97] Lee, Y.K. & Low, C.S. Effect of photobioreactor inclination on the biomass production of an outdoor algal culture. *Biotechnology. Bioengineering* ., 1991, Vol. 38, n° 9, p. 995–1000.
- [98] Tredici, M.R. & Chini Zittelli, G. (1998) Efficiency of sunlight utilization: tubularversus flat photobioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, Vol. 57, n°2, p. 187–97.
- [99] Hu, Q., Faiman, D. & Richmond, A. () Optimal orientation and inclination of photobioreactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors. *Journal of Fermentation qnd Bioengineering* ., 1998a, Vol. 85, n° 2, 230–236.
- [100] Antoine, SOULIES. Contribution à l'étude hydrodynamique et à la modélisation des photobioréacteurs à haute productivité volumique. Thèse de Doctorat. École Doctorale SPIGA. *Sciences Pour l'Ingénieur, Géosciences, Architecture. Nante*, 2014, p 210.
- [101] Olaizola, M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *Journal Applied of Phycology*, 2000, Vol. 12, n° 3-5, p. 499–506.
- [101] Olaizola, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 2003, Vol. 20, n° 4-6, p. 459-466.

- [103] Chisti, Y., Camacho, F. G., Fernandez, F.G.A., & Grima, E.M. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, 1999, Vol. 70, 231-247. PII: S0168-1656(99)00078-4.
- [104] Tredici, M.R. Mass production of microalgae: Photobioreactors. In: Richmond A., editor. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004, p. 178–214.
- [105] Molina Grima, E., Acien Fernandez, F.G., Garcia Camacho, F., Camacho Rubio, F. & Chisti, Y. Scale-up of tubular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 2000, Vol. 12, n° 3-5, p. 355-368.
- [106] Zittelli, G.C., Biondi, N., Rodolfi, L., & Tredici, M.R. Photobioreactors for mass production of microalgae. In: Richmond, A. & Hu, Q., editors. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. Oxford: Blackwell Publishing, 2013, p. 225-266.
- [107] Michele Greque de Moraes, Jorge Alberto Vieira Costa. 2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina sp.* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 2007, Vol. 129, n° 3, p. 439–445.
- [108] Grobbelaar, J. U. and Kurano, N. "Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation." *Journal of Applied Phycology* 2003, Vol. 15, n° 2-3, p. 121-126.
- [109] Molina, Grima., E., García, Camacho., F., Sanchez, Perez., J. A., Acien ernández, F. G. and Fernandez Sevilla, J. M. "Growth yield determination in a chemostat culture of the marine microalga *Isochrysis galbana*." *Journal of Applied Ecology*, 1997b, Vol. 8, p. 529-534.
- [110] Weissman, J.C., Goebel, R.P. and Benemann, J.R. Photobioreactor design: mixing, carbon utilization and oxygen accumulation. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998; Vol. 31, n° 4, p. 336–344.
- [111] Aurore, Villay. Production en photobioréacteurs et caractérisation structurale d'un exopolysaccharide produit par une microalgue rouge : *Rhodella violacea*. Application à l'obtention d'actifs antiparasitaires. *thèse doctorat université Blaise Pasca auvegne*, p. 200. [en ligne]. consulté le 01 août 2017. Disponible sur : < <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01135135/document> >.
- [112] Carvalho, AP., Meireles; LA., Malcata, FX., Microalgal reactors: A review of enclosed system designs et performances. *Biotechnology Progress*, 2006, Vol. 22, n° 6, p. 1490- 1506.
- [113] Megerle, L. Scherholz., and Wayne R Curtis. Achieving pH control in microalgal cultures through fed-batch addition of stoichiometrically-balanced growth media. *BMC Biotechnology*, 2013, Vol. 13, n° 39, p. 1-16.
- [114] Modigell, M., and Holle, N. Reactor development for a biosolar hydrogen production. process. *abstract renewable energy*, 1998, Vol. 14. n° 1-4, p1. 421-426.
- [115] O. N. Tiwari, Thingujam Indrama, Gunapati Oinam, Avijeet Oinam Singh and Jerry J. Brand. Technology development for mass production of *Spirulina platensis* *IBSD-174* and ITS utilisation as nutrient rich formulation in Zarrouk 1966 *J. Indian bot. Soc.* 2014, Vol. 93, n° 1-2, p. 105-110.
- [116] Zarrouk Claude. Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et

- Gardner) Geitler. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Paris, 06/12/1966:[en ligne].consulte Mars 2017 .disponible sur :  
<<https://www.researchgate.net/publication/35008206>>
- [117] Zhang, K., Miyachi, S. and Kurano, N. Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: Effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001; Vol. 55; n° 4, p. 428–433.
- [118] Sierra, E., Acien, F.G., Fernandez, J.M., Garcia, J.L., Gonzales, C. & Molina, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemistry and Engenering. Journal*, 2008; Vol. 138, n° 1-3, p. 136–147.
- [119] Tamain, B. L'énergie où va-t-on ?. *Découverte*. 2007, n° 344-345, p. 13-23.
- [120] Energie fossile. [en ligne]. Consulté mai 2017, Disponible sur :  
<<http://www.vedura.fr/environnement/energie/energie-fossile>>
- [121] Rutherford, A. W. De l'hydrogène à partir du soleil et de l'eau !. *Clefs C.E.A.* 2005 ; n° 50-51, p. 49-51.
- [122] L'hydrogène carburant du futur. [en ligne]. Consulte ,mai 2016 sur :  
<<http://www.annso.freesurf.fr/ProdH2.html>>
- [123] Bicakova, O. and Straka, P. Production of hydrogen from re -newable resources and its effectiveness, *International Journal of Hydrogen and Energy*, 2012, Vol. 37, n° 16, p. 11563-11578.
- [124] Rutherford, A. W. De l'hydrogène à partir du soleil et de l'eau. *Clefs C.E.A.* 2005, n° 50-51, p. 31-33.
- [125] L'hydrogène carburant du futur? [en ligne]. Consulté sept 2016, Disponible sur  
<<http://www.annso.freesurf.fr/ProdH2.html>>
- [126] His, S. Manuscrit définitif remis. Diffusion des connaissances. *Panorama 2004*. 4 décembre 2003 Consulté sept 2016, Disponible sur :  
<[http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/37/040/37040646.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/37/040/37040646.pdf)>
- [127] S. His. L'hydrogène vecteur énergétique du future, (Institut Français du Pétrole IFP). décembre 2003, en ligne]. Consulté sept 2016, Disponible sur :  
<[http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/37/040/37040646.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/37/040/37040646.pdf)>
- [128] M. I. Hoffert, K. Caldeirat. Advenced technology paths to global climate stability: Energy for a greenhouse planet. *Science*. 2002, Vol. 298, n°. 5595, p. 981-987.
- [129] Kamel Halouani, K. Production d'hydrogène par gazéification du bois et du charbon de bois. *Bulletin des Energies Renouvelables*. 2005, Vol. 31, n°8, p. 8-9.
- [130] P. C. Hallenbeck, J. R. Benemann. Biological Hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002, Vol. 27, n° 11, p. 1185-1193.
- [131] Rivera-Tinoco, R. étude technico-économique de la production 'hydrogène a partir de l'électrolyse haute température pour différentes sources d'énergie thermique, Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieures Des Mines De Paris, 2009, p. 159. en ligne]. Consulté sept 2016, Disponible sur :<<https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00005346/document>>

- [132] K. L. Kovacs et Kornel L. Kovacs, Alkos T. Kovacs, Gergely Maroti, Zoltan Bagi, Gyula Csanadi, Katalin Perei, Balazs Balint, Judit Balogh, Andras Fülöp, Livia S. Meszaros, Andras Toth, Reka David, Dora Latinovics, Andras Varga & Gabor Rakhely, Improvement of biohydrogen production and intensification of biogas formation. *Environnemental Science & Bio / Technology*. 2004, Vol. 3, n° 4, p. 321-330.
- [133] J. R. Benemann. Feasibility Analysis of photobiological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1997, Vol. 22, n° 10-11, p. 979-987.
- [134] Ghosh, T. and Prelas, M. Prelas,.: Energy resources and systems.: *Renewable resources*, Springer, 2011, Vol. 2, p810.
- [130] P. C. Hallenbeck, J. R. Benemann. Biological Hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002, Vol. 27, n° 11, p. 1185-1193.
- [136] Stephenson . M and Stickland. H. L.: Hydrogenase, the bacterial formation of methane by the Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme *Biochem. Journal*, 1931; Vol. 25, n°1; p. 205-214.
- [137] Protein Film Voltammetry - Bioénergétique et Ingénierie des Protéines. Consulte juin 2017. [en ligne]. Disponible sur ,:  [<bip.cnrs-mrs.fr/bip06/protein-film-voltammetry.fr.html>](http://bip.cnrs-mrs.fr/bip06/protein-film-voltammetry.fr.html)
- [138] Hallenbeck, P. C. and Benemann, J. R. Biological Hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002, Vol. 27, n° 11, p. 1185-1193.
- [139] Kovács, K. L.; Kovács, Á. T., Maróti, G., Bagi, Z., Csanádi, G., Perei, K., Bálint, B.; Balogh, J., Fülöp, A., Mészáros, L. S., Tóth, A., Dávid, R., Latinovics, D., Varga, A. and Rákhely, G. Improvement of biohydrogen production and intensification of biogas formation. *Environnemental Science & Bio / Technology*. 2004, Vol. 3, n° 4, p. 321-330.
- [140] Anastasios Melis and Thomas Happe . Hydrogen Production. Green Algae as a Source of Energy. *Plant Physiology*, 2001, Vol. 127, n° 3, p. 740-748.
- [141] N. Basak and D. Das, “The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, Vol. 23, n° 1, p. 31–42.
- [142] Levin, D.B., Pitt, L., Love, M., Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen and Energy*, 2004, Vol. 29, n° 2, p. 173-185,.
- [143] Reith, R.H. Wijffels, H. Barten, Bio-methane & bio-hydrogen. Status and perspectives of biological methane and hydrogen production, Dutch biological hydrogen foundation, Wageningen, 2003. [en ligne]. Consulté sept 2016, Disponible sur  [<https://www.ircwash.org/sites/default/files/Reith-2003-Bio.pdf>](https://www.ircwash.org/sites/default/files/Reith-2003-Bio.pdf)
- [144] Tomaselli, G. Torzillo, L. Giovannetti, B. Pushparaj, F. Bocci, M. Tredici, T. Papuzzo, W. Balloni& R. Materassi.. Recent research on Spirulina in *ItalyHydrobiologia*, 1987, Vol. 151/152, n°1, p. 79-82.

- [145] Zhang, X., X. Zhang, Y. Shiraiwa, Y. Mao, Z. Sui, and J. Liu.. Cloning and characterization of hoxH genes from *Arthrospira* and *Spirulina* and application in phylogenetic study. *Marine Biotechnology*. 2005, Vol. 7 ,p. 287-296.
- [146] Debajyoti, Dutta., Debojyoti, De SurabhiChaudhuri., and Sanjoy, K Bhattacharya. Hydrogen production by Cyanobacteria.. *Microbial Cell Factories*, 2005, Vol. 4, n° 36 p. 1-36.
- [147] Houchins JP. The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *BiochimBiophys Acta*; 1984, Vol. 768, n° 3-4, p. 227-255.
- [148] Tamagnini P, Costa J-L, Almeida L, Oliveira M-J, Salema R, Lindblad P. Diversity of cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach. *Current Microbiogyl*; 2000, Vol. 40, n° 6, p. 356-361.
- [149] Boison, G., Schmitz, O., Mikheeva, L., Shestakov, S. and Bothe, H. (Cloning, molecular analysis and insertional mutagenesis of the bidirectional hydrogenase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett.*, 1996, Vol. 394, n° 2, p. 153–158.
- [150] Wunschiers R, Batur M, Lindblad P. Presence and expression of hydrogenase specific C-terminal endopeptidases, 1996 in cyanobacteria. *BMC Microbiology*, vol. 3, n°8, p. 1-12 . [en ligne]. Consulté sept 2016, Disponible sur <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/3/8, 2003>.
- [151] Aoyama K, Uemura I, Miyake J, Asada Y.. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Fermentation* ; 1997, Vol. 83, n° 1, p. 17-20.
- [152] Kumaza wa, S., and A. Mitsui.. Characterization and optimization of hydrogen photoproduction by a salt-water blue-green alga, *Oscillatoria* sp. Miami BG7. I. Enhancement through limiting the supply of nitrogen nutrients. *International Journal. Hydrogen Energy* 1981, Vol. 6, n°4, p. 339–348.
- [153] Vonshak, A., R. Guy, and M. Guy.. The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. *Archives of Microbiology*, 1988, Vol. 150, n° 5, p. 417– 420.
- [154] Hallenbeck. P.C. (ed.), *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*, DOI 2012, 10.1007/978-1-4614-1208-3\_2, © Springer Science+Business Media, LLC. [en ligne]. Consulté sept 2016, Disponible sur <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.469.2526&rep=rep1&type=pdf>
- [155] Vanderoost J, Bulthuis BA, Feitz S, Krab K, Kraayenhof R. Fermentation metabolism of the unicellular Cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7822. *Archives Microbiology*, 1989, Vol. 152, n° 5, p. 415–419.
- [156] Rai AK, Abraham G. Relationship of combined nitrogen sources to salt tolerance in freshwater cyanobacterium *Anabena doliolum*. *Journal Applied Bacteriology*; 1995, Vol. 78, p. 501-506.
- [157] Carrieri, Damian , Ananyev, Gennady , Dismukes, G. Charles. Renewable hydrogen production by cyanobacteria: Nickel requirements for optimal hydrogenase activity. *International. Journal of Hydrogen and Energy*. 2008, Vol. 33, n° 8, p. 2014-2022.
- [158] Willison JC, Madern D, Vignais PM. Increased photoproduction of hydrogen by non-autotrophic mutants of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochemistry Journal*; 1984, Vol. 219, n° 2, p. 593–600,.

- [159] Cournac L, Guedeney G, Peltier G, Vignais PM. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis sp. strain PCC 6803* deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. *Journal of Bacteriology*; 2004, Vol. 186, n° 6, p. 1737–46.
- [160] Ramchandran S, Mitsui A. Recycling of hydrogen photoproduction system using an immobilized marine blue green algae *Oscillatoria sp.* Miami BG7, solar energy and seawater: VII International Biotechnology Symposium, Faenza (Italy), September , 2010. [Droit et espace rural. 978-2-296-56192.2](#)
- [161] Jeffries TW, Timourien H, Ward RL: Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: Effect of varying ammonium and ferricions, pH and light. *Applied Environmental Microbiology*, 1978, Vol. 35, n° 4, p. 704-710.
- [162] Eroglu I, Aslan K, Gunduz U, Yucel M, Turker L. Continuous hydrogen production by *Rhodobactersphaeroides* O.U. 001. In: Zaborsky OR, editor. *Biohydrogen*. London: *Plenum Press*; 1998, p. 530.
- [163] Hoekema S, Bijmans M, Janssen M, Tramper J, Wijffels RH. A pneumatically agitated flat-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium. *International Journal of Hydrogen and Energy*, 2002, Vol. 27, n° 11-12, p. 1331-1338.
- [164] Richmond A. The challenge confronting industrial microagriculture: high photosynthetic efficiency in large- scale reactors. *Hydrobiology* 1987, Vol. 151-152, p. 117-21.
- [165] Miron AS, Gomez AC, Camacho FG, Molina GE, Chisti Y. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology*, 1999, Vol. 70, n° 1-3, p. 249-270.
- [166] Tsygankov AA, Hall DO, Liu J, Rao KK. An automated helical photobioreactor incorporating cyanobacteria for continuous hydrogen production. In: Zaborsky OR, editor. *Biohydrogen*. London: *Plenum Press*; 1998, p. 530.
- [167] Morita M, Watanabe Y, Saiki H. Investigation of photobioreactor design for enhancing the photosynthetic productivity of microalgae. *Biotechnology Bioengineering*, 2000, n° 69, p. 693-708.
- [168] Hu Qiang , Yair Zarmi & Amos Richmond. Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *European Journal of Phycology* , 1998, Vol. 33, p. 165–171,
- [169] Hsieh. H. C and Wu W. T. A novel photobioreactor with transparent rectangular chambers for cultivation of microalgae. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, vol. 46 , n° 3, p. 300-305,.
- [170] Martin Muhling1, Amha Belay and Brian A. Whitton1. Screening *Arthrospira (Spirulina)* strains for heterotrophy. *Journal of Applied Phycology* . 2005, n° 17, p, 129–130.
- [171] Vaidya, B. S. and Mehta, U. B. A method of getting bacteria free culture of blue green alga *Oscillatoria*. *Curr. Sci.*, 1975, Vol. 44, n° 15, p. 563.
- [172] . McDaniel. H. R Middlebrook J. B. and Bowman R. O. . Isolation of Pure Cultures of Algae from Contaminated Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 1962, vol. 10 n°3, P. 223.

- [173] Archive institutionnelle de l'ifremer, dans la base Archimer [en ligne]. Consulte aout 2017; disponible sur : <<http://www.ifremer.fr/docelec/>>
- [174] Gershuin ME et Belay A. *Spirulina* in *Human Nutrition and Health*. edition Taylor et francis. by CRC Press 2007, p 328, .
- [175] Jordan J P (1999). Cultivez votre spiruline : manuel de culture artisanal .Publication Antenna Technologies, [en ligne]. Consulte aout 2017; disponible sur : <<http://www.l-encre-de-mer.fr/wp-content/uploads/2012/05/Manuel-de-culture-artisanale-de-spiruline.pdf>>
- [176] EXAMENS MICROSCOPIQUES, [en ligne]. Consulte le 18mars 2017; disponible sur : <[www.microbiologie-medicale.fr/examensmicroscopiques.html](http://www.microbiologie-medicale.fr/examensmicroscopiques.html)>
- [177] EXAMENS MICROSCOPIQUES [en ligne]. Consulte le 18mars 2017; disponible sur : <[www.dmipfmv.ulg.ac.be/bacvet/m/cours3VMB/TP/observations.doc](http://www.dmipfmv.ulg.ac.be/bacvet/m/cours3VMB/TP/observations.doc)>
- [178] Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Arad, S., Richmond, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*. 1982, n°2, p. 175-185.
- [179] Richmond, A., 1986. Microalgae of economic potential. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, 2004, pp. 199-244.
- [180] Weissman, J.C., and R.P. Goebel. Design and Analysis of Microalgal. Open Pond Systems for the Purpose of Producing Fuels, *Final Report, SERIISTR Golden, CO: Solar Energy Research institute*, 1987, p. 231.
- [181]Becker, E.W. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1994, p. 295.
- [182] Reynolds C.S. *The ecology of freshwater phytoplankton*, Cambridge University Press, London : 1984384 p. 396.
- [183] McCree, K.J., Photosynthetically active radiation. In: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. (Eds.), *Physiological Plant Ecology. Encyclopedia of Plant Physiology*, 1981, *new Series*, vol. 12A., pp. 41-55.  
<[https://fr.wikipedia.org/wiki/Loi\\_en\\_carré\\_inverse](https://fr.wikipedia.org/wiki/Loi_en_carré_inverse), consulte juillet, 2017>
- [185] Rao, K.J., Kim, C.-H., Rhee, S.-K. Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *Process Biochem*. 2000, Vol.35 n°7 pp. 639-647.
- [186] Lindblad P, Incharoensakdi A. Response of H<sub>2</sub> production and Hoxhydrogenase activity to external factors in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp. strain PCC 6803*. *Int J Hydrogen Energy*; 2010, Vol. 35, n° 13, p. 6611-6616.
- [187] Gong, H., Tang, Y., Wang, J., Wen, X., Zhang, L. and Lu, C. Characterization of photosystem II in salt-stressed cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, Vol. 1777, n° 6 p. 488-495,
- [188] Mrudula. S, Murugammal. R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011, n°42, p. 1119-1127.

- [189] Yongfang Zhang; Jianquan Shen. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006 , Vol. 31, n° 4; p. 441-446.
- [190] Wang. J, and Wan. W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review ., *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, n°34, p. 799 – 811.
- [191] Kaushik Nath, Debabrata Das, Effect of light intensity and initial pH during hydrogen production by an integrated dark and photofermentation process. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2000, n°34, p. 799 – 811.
- [192] G. Torzillo, Tubular bioreactors, in: A. Vonshak (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, Cell. Biology and Biotechnology*, Taylor & Francis, London, 1997, pp. 101–115,
- [193] Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 2007, n°25, p. 294–306.
- [194] Ugwu, C.U., Ogbonna, J.C., Tanaka, H. Light/dark cyclic movement of algal culture (*Synechocystis aquatilis*) in outdoor inclined tubular photobioreactor equipped with static mixers for efficient production of biomass. *Biotechnol.Lett.* 2005, Vol. 27, n° 2, p. 75–78, [consulté le 11 décembre 2016]. p. 23-24. Disponible sur: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10529-004-6931-4>>
- [195] Miller. S. F and Wilker C. R. 1972. Utilization of algae from water purification and protein production. In second annotated bibliography on biological effect on metals. *Aquatic Environment* 1975, n°568-1292, 408p.
- [196] Liu JZ, Weng LP, Zhang QL. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology. *World J Microbiology and Biotechnology*, 2003, n°19, p. 317- 323.
- [197] Mu Y, Zheng XJ, Yu HQ. Determining optimum conditions for hydrogen production from glucose by an anaerobic culture using response surface methodology (RSM). *International Journal of Hydrogen and Energy* 2009, Vol. 34, n°19, p. 7959-7963.
- [198] Muralidhar RV, Chirumamila RR, Marchant R, Nigam P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, n°9, p. 17-23.
- [199] Hu Qiang , Yair Zarmi & Amos Richmond. Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *European Journal of Phycology* , 1998, Vol. 33, n°2, p. 165–171.
- [200] Hu , Q., Guterman , H. & Richmond , A.. Physiological characteristics of *Spirulina platensis* cultured at ultrahigh cell densities. *Journal of Phycology*., 1996b, n°32, p. 1066–1073,
- [201] Sforza E, Urbani S, Bertucco A. Evaluation of maintenance energy requirements in the cultivation of *Scenedesmus obliquus*: effect of light intensity and regime. *Journal Applied of Phycology*.; 2014b, n°27, p. 1453–1462,
- [201] Chojnacka, K., Noworyta, A., Evaluation de *Spirulina* sp. Croissance dans la culture photoautotrophique, hétérotrophe et mixotrophique. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, Vol.34, n°5, p. 461-465.

- [ 202] Vonshak, A., Cheung, S.M., Chen, F.,. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) cells to light. *Journal of . Phycology*. 2000, n° 36, p. 675–679.
- [203] Reichert C. C.; Reinehr C. O.; Costa J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2006, Vol. 23, n° 1, p. 23-28.
- [204] Danesi. E.D. G. , Rangel-Yagui C. O , Sunao Sato 2 , João Carlos Monteiro de Carvalho. 2011. Growth and content of *Spirulina platensis* chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen souces . *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011, Vol. 42, n° 1, p. 362-373.
- [ 205] Kiran, Bala , Pathak, Kratika, Kumar, Ritunesh, Deshmukh, Devendra . Statistical optimization using Central Composite Design for biomass and lipid productivity of microalga: A step towards enhanced biodiesel production. *Ecological engineering*, 2016, Vol. 92, p. 73-81.
- [ 206] Sarada. R, Bhattacharya. S and Ravishankar. G.A. Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002, n° 18, p. 517–521.
- [ 207] Luciane Maria Colla, Christian Oliveira Reinehr, Carolina Reichert, Jorge Alberto Vieira Costa. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology* Pages 1489-1493, 2007
- [ 208] Radmann E.M, , Reinehr C.O. and Costa . J.A.V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*, 2007, n° 265, p. 118 – 126.
- [ 209] Richmond, A., Boussiba, S., Vonshal, A., Kopel, R., A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoor. *Journal Applied of Phycology*, 1993, Vol. 5, n°3, p. 327-332.
- [ 210] Chaumont D, Thepenier C, Gudin C., Scaling up a tubular photoreactor orcontinuous culture of *Porphyridium cruentum* – From laboratory to pilot plant. In Stadler T, Morillon J, Verduis MC, Karamanos W, Morvan H, Christiane D (eds), *Algal Biotechnology. Elsevier Applied Science*, London, 1988, pp. 199- 208.
- [ 211] Muller-Feuga A., Kaas R., Moal J.,. The microalgae of aquaculture. In J. Stottrup& L. McEvoy (Eds), *Live feeds in marine aquaculture. Blackwell Science Publishers*, 2000, pp. 207-252.
- [ 212] Kim, Jun Pyo 1 , Chang Duk Kang , Sang Jun Sim Mi Sun Kim, Tai Hyun Park, Donghyun Lee, Dukjoon Kim, Ji-Heung Kkim , Young Kwan Lee, and Daewon Pak. Cell Age optimization for Hydrogen Production Induced by Sulfur Deprivation Using a Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 *Journql. Microbiology Biotechnology*; Vol. 15, n°1, p. 131–135.

- [ 213] Dawar. S., Masukawa. H. and Mohanty P., and Sakurai. H. Prospects of Biohydrogen Production Using Cyanobacteria – An Overview, *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 2000, Vol. 72 n°4 p. 213-223.
- [ 214] Wuttinun, Raksajit, KhomsonSatchasataporn, KirsiLehto, PirkkoMa`enpa`a`, AranIncharoensakdi. Enhancement of hydrogen production by the filamentous non-heterocystouscyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005. *International journal of hydrogen energy*, 2012, Vol. 37, n° 2, 18791-18797.
- [ 215] Zeng MT, Vonshak A Adaptation of *Spirulina* , to salinity-stress. *Composition Biochemical and physiology*, 1998, Part A 120:113–118.
- [ 216] Peschek GA, Obinger C, Fromwald S, Bergman B Correlation between immuno-gold labels and activities of cytochrome-c oxidase (aa-type). In membranes and salt stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiology letters*, 1994, Lett n°124, p. 431–438.
- [ 217] Tsygankov, A.A., Gogotov, I.N. . Influence of temperature and pH of the medium on the nitrogenase andhydrogenase activity of nitrogen-fixing *Rhodospseudomonascapsulata*. *Mikrobiologiya (Russ.)*, 1982, n° 51, 396-401.
- [218] Zurrer, H., Bachofen, R. (1982). Aspects of growth and hydrogen production of the photosynthetic bacterium *Rhodospirillumrubrum* in continuous culture. *Biomass*, 1982, Vol. 2, n° 3, p. 165-174.
- [ 219] Hung CH, Chen CH, Chung WT, Cheng LH. Effectsofinitialcultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose usingnatural mixed cultures. *Process Biochemistry*, 2006; Vol. 41, n° 6, p. 1383-1390.
- [ 220] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT.. *Process Biochemistry*, 2000, Vol. 35, n° 6, p. 589-593.
- [ 221] Lucchetti. A. Modelisation et conception d'un systeme de culture de microalgues.2017. thèse, l'École nationale supérieure des mines de Paris. [en ligne]. Consulte le &- juin 2017; disponible sur site. <[www.theses.fr/2014ENMP0048.pdf](http://www.theses.fr/2014ENMP0048.pdf)>
- [ 222] Kanhaiya Kumar, , Chitralkha Nag Dasgupta, , Bikram Nayak, Peter Lindblad and Debabrata Das. 2011. Development of suitable photobioreactors for CO 2 sequestration addressin global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 2011, Vol. 102, n° 8, p. 4945–4953.
- [ 223] Sp.Howarth DC, Codd GA. 1997The uptake and production of molecular hydrogen by unicellular cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* ; 1989, Vol. 131, n° 7; p: 1561-1 569.

- [ 224] Laurinavichene TV, Fedorov AS, Ghirardi ML, Seibert M, Tsygankov A. 2006. Demonstration of hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006, Vol. 31, n° 5, p. 659-667.
- [ 225] Ohta S, Miyamoto K, Miura Y. 1987. Hydrogen evolution as a consumption mode of reducing equivalents in green algal fermentation. *Plant Physiology*, Vol. 83, n° 4, 1022-1026.
- [ 226] Basak N, Das D. 2009. Photofermentative hydrogen production using purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in an annular photobioreactor: a case study. *Biomass Bioenergy*, 2009, Vol. 33, p.911-919.
- [ 227] Berberoglu H, Jenny J, Laurent P..Effect of nutrient media on photobiological hydrogen production by *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *International Journal of Hydrogen and Energy*. 2008; Vol. 33; n°4, p.1172-1184.
- [ 228] Jensen, K., and Knutsen, G., Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. *Journal of Phycology*, 1993, Vol. 5, n° 5, p. 495–504.
- [ 229] Onshak, A., Kancharaksa, N., Bunnag, B., Tanticharoen, M.,. 1996 Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacteria *Spirulina platensis* to salinity stress. *Journal of Applied Phycology*, 1996, Vol. 8, n° 2, p. 119–124.