

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

**ECOLE NATIONNALE POLYTECHNIQUE**

Département du Génie de l'Environnement

Laboratoire des Biotechnologie Environnement et de Génie des Procédés  
(BIOGEP)



THESE DE MAGISTER

Présenté par :

HASNAOUI Selma

THEME

**Effet de la composition du milieu des conditions opératoires et de la forme du photobioréacteur sur la production d'hydrogène par *Spirulina platensis***

Soutenu publiquement devant le membre de jury composé de :

Mr N.MAMERI	Professeur à ENP	Président
Mr R.BOUARAB	Professeur à ENP	promoteur
Mr M.AINAS	Maitre assistant A à Université de Médéa	promoteur
Mme N. ABDI	Professeur à ENP	Examinatrice
Mr H.GRIB	Professeur à ENP	Examineur
Mr H.LOUNICI	Professeur à ENP	Examineur

Année universitaire 2012

## Remerciement

*Tout d'abord, Je remercie DIEU tout Puissant, Gracieux et Généreux pour le courage et la force qui ma donné pour bien mener ce travail.*

*Je dédie ce modeste travail aux deux personnes qui me sont très chères, et sans lesquelles je n'aurais jamais pu être ce que je suis, ma perle précieuse et grande source d'amour MAMAN, et à mon exemple idéal mon cher PAPA. Ainsi qu'à toute la famille HASNAOUI surtout mes grands parents, pour leur aide et leur encouragement.*

*Je remercie sincèrement mon promoteur Mr R. BOUARAB (Professeur a l'Ecole Nationale Polytechnique) pour ces remarques et suggestions qui m'ont été inestimable. Je tiens également à remercier mon Co-promoteur Mr M. AMAS (Maitre assistant A à l'université de Médéa) pour sa gentillesse et pour m'avoir conseillé et orienter durant mon projet de Magister.*

*Je remercie vivement les membres de jury : Mme N. Abdi, Mr H. Grib et Mr H. Lounici et surtout le président de jury Mr N. Mameri, pour leur confiance, compréhension, et de bien voulu m'honorer avec leur présence en vu de juger mon travail.*

*Et enfin, un grand merci à tous mes collègues de l'école doctorale et mes collègues de travail, ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire de Biotechnologie Environnement et Génie des Procédés (BIOGEP) de l'Ecole Nationale Polytechnique.*

*Selma*

## ملخص

نطاق العمل المقدم في هذه الرسالة يتعلق بتطوير البكتيريا الزرقاء الغير مثبتة للأزوت سبيرولينا بلاتنسيس. عن طريق إحاطة هذه الأخيرة بأحسن ظروف نموها. تم إلتقاط السلالة على شكل مرهم من سبخة متواجدة في الجنوب الجزائري (تامنراست) و إعادة إحيائها في وسط الإنبات "زروق" لإنتاج الهيدروجين بفضل انزيمها "هيدروجيناز". تم اختبار هذه القدرة تحت مختلف الظروف التجريبية (تركيز البروتونات, عمر البكتيريا, الحضانة المسبقة في الوسط الخالي من اللازوت...), تكوين الوسط (تركيز كلورور الصوديوم, مصادر الكربون...), بالإضافة إلى شكل المفاعل الحيوي الضوئي. من خلال هذا العمل توصلنا إلى أنه في مرحلة النمو المتسارع معدل نمو هذه البكتيريا 0,0692 يوم<sup>-1</sup>, تركيز البروتونات الأمثل هو 8,5 و الشدة الضوئية المثلى هي 2000 لوكس لإنتاج الهيدروجين البيولوجي عند تركيز الكتلة الحيوية 1,5 غ/ل و هذا بالنسبة للمفاعل الحيوي الضوئي الأسطوانى و المخروطى. لكنها كانت 3000 لوكس بالنسبة للشكل المخروطى المسطح. مصادر الكربون الأخرى لم يكن لها تأثير كبير على إنتاج الهيدروجين, باستثناء الجلوكوز إذ أنها تضاعفت تقريبا. مرحلة ما قبل الحضانة تسبب تراكم قوي للجليكوجين داخل الخلايا البكتيرية, و لكنها غير مؤاتية إنتاج الهيدروجين.

المفتاح: الظروف التجريبية, الهيدروجين البيولوجي, شكل المفاعل الحيوي الضوئي, مصادر الكربون.

## Résumé

Le travail présenté dans cette thèse concerne le développement de cultures d'une cyanobactérie non fixatrice d'azote appelée *Spirulina platensis* par optimisation des paramètres de croissance de cette dernière. La souche Spiruline recueillie sous forme de pommade d'un marais du sud Algérien (Tamanrasset) est revivifiée dans le milieu de culture Zarrouk afin de produire l'hydrogène grâce à son enzyme «hydrogénase». Cette capacité de production d'hydrogène est testée sous l'effet des différentes conditions opératoires (pH, âge de la culture, pré- incubation dans le milieu L-N...), de la composition du milieu (NaCl, sources de carbone,...) ainsi que l'effet de la forme du photobioréacteur. A travers ce travail, on a pu constater qu'au cours de la phase exponentielle de la croissance de notre souche, la vitesse spécifique de croissance ( $\mu$ ) est de 0,07 j<sup>-1</sup>, le pH optimal pour la production d'hydrogène est de 8,5 et l'intensité lumineuse de 2000 Lux à une concentration de biomasse de 1,5 g/L. Les meilleurs taux de production de H<sub>2</sub> sont obtenus pour les photobioréacteurs de forme conique- plat. La mixotrophie n'a pas un effet significatif sur la production d'hydrogène sauf dans le cas du D-glucose qui a presque doublé la productivité. La pré- incubation induit une forte accumulation du glycogène endogène chez notre souche mais elle est en défaveur à la production d'hydrogène.

**Mots-clés:** *Spirulina platensis*, conditions opératoires, bio-hydrogène, forme du photobioréacteur, mixotrophie, glycogène.

## Abstract

The scope of the work presented in this thesis concerns the development of cultures of a photosynthetic cyanobacterium named *Spirulina platensis* by optimizing its growth parameters. The strain Spirulina, picked as an ointment, from a marsh in southern Algeria (Tamanrasset) is revived in the Zarrouk culture medium in order to produce hydrogen thanks to their «Hydrogenase» enzyme. This ability is tested under different operating conditions (pH, culture age, pre-incubation in the medium L-N,...), the medium composition (NaCl, carbon sources,...) as well as the effect of the shape of the photobioreactor. Through this work, we could find that during the exponential phase of growth of our strain, the specific growth rate ( $\mu$ ) is 0,07 d<sup>-1</sup>. The optimal pH for the production of hydrogen is 8.5. The light intensity of 2000 Lux at a biomass concentration of 1.5 g/L gave the best rate of bio-hydrogen production for conical and cylindrical photobioreactors; however it is 3000 Lux for the photobioreactor conical-flat-shaped. Mixotrophy has not had a significant effect on hydrogen production except for the D-glucose that has almost doubled the hydrogen production. Pre-incubation induced a strong accumulation of endogenous glycogen in our strain but it is unfavorable for hydrogen production.

**Keywords:** *Spirulina platensis*, operating conditions, bio-hydrogen, shape of photobioreactor, mixotrophy, glycogen.

## **Abréviations :**

**PBR** : Photobioréacteurs.

**H<sub>2</sub>** : Hydrogène moléculaire.

**O<sub>2</sub>** : Oxygène moléculaire.

**L-N** : Low Nitrogen.

**ARN<sub>r</sub>** : Acide Ribonucléique Ribosomale.

**TW** : Térawatt équivalent a un trillion de watt.

**HICE** : Hydrogen Internal Combustion Engines.

**LDH** : Lactate déshydrogénase.

**PFL** : Pyruvate: Formate Lyase.

**ACK** : Acétate kinase.

**FHL** : Formate Hydrogène Lyase.

**PTA** : Phospho-transacétylase.

**ADH** : Alcool déshydrogénase.

**NFOR NADH**: Ferrédoxine oxydoréductase.

**TL** : Thiolase.

**BHBD** : Hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase.

**EH** : Enoyl-CoA hydratase.

**BDH** : Butyryl-CoA déshydrogénase.

**PFOR pyruvate**: Ferrédoxine oxydoréductase.

**NADP<sup>+</sup>** : Nicotinamide Adénine Di-nucléotide Phosphate.

**NAD<sup>+</sup>** : Nicotinamide Adénine Di-Nucléotide.

## Liste des figures

### II. L'hydrogène

- Figure II.1. Modèle schématique de la conversion ortho/para-H<sub>2</sub>
- Figure II.2. Structure de la molécule d'hydrogène
- Figure II.3. (a) Carburateur d'un moteur d'automobile alimenté par l'essence liquide  
(b) joint du collecteur d'un système de moteur modifié alimenté par l'hydrogène gazeux
- Figure II.4. Principe de fonctionnement de la pile à combustible à membrane échangeuse de protons
- Figure II.5. Schéma explicatif du processus de gazéification
- Figure II.6. Cellule d'électrolyse de l'eau
- Figure II.7. Production photo- électrochimique d'hydrogène

### III. Bio-hydrogène

- Figure III.1. Diagramme simplifié du procédé de pyrolyse de biomasse
- Figure III.2. Méthodes de production de H<sub>2</sub> par bio-photolyse directe chez les micro-algues
- Figure III.3. Méthodes de production de H<sub>2</sub> par bio-photolyse indirecte chez les micro-algues
- Figure III.4. Schéma d'un système de production photobiologique indirecte
- Figure III.5. Fermentation anaérobie chez *Clostridium butyricum*
- Figure III.6. Diagramme schématique d'un de réacteur à deux phases
- Figure III.7. Structure et fonction de l'Hydrogénase bidirectionnelle des cyanobactéries
- Figure III.8. Organisation des gènes hyp des l'hydrogénase bidirectionnelle chez quelques cyanobactéries

### IV. La Spiruline: *Spirulina platensis*

- Figure IV.1. Différentes formes prise par la Spiruline
- Figure IV.2. Cycle biologique de la Spiruline

### V. Photobioréacteur

- Figure V.1. Schéma d'un réacteur cylindrique à bulles et d'un réacteur tubulaire*
- Figure V.2. Vue de face et de profil d'un photobioréacteur plan*

### VI. Matériels et méthodes

- Figure VI.1. Schéma du dispositif de récupération d'hydrogène.
- Figure VI.2. Photo du photobioréacteur cylindrique et conique.
- Figure VI.3. Schéma du protocole d'extraction des sucres à partir de la spiruline.

## VII. Résultats et discussion

- Figure VII.1. Courbe étalon de la densité optique en fonction du poids sec de *Spirulina platensis*.
- Figure VII.2. Cinétique de croissance de *Spirulina platensis*
- Figure VII.3. Evolution du pH durant la croissance de *S. platensis*
- Figure VII.4. (A): *S. platensis* en culture jeune (phase exponentielle),  
(B): *S. platensis* en culture vieille (phase de déclin)
- Figure VII.5. Optimisation de la production d'hydrogène à 0,5 g/L de biomasse cellulaire en fonction de l'intensité lumineuse
- Figure VII.6. Optimisation de la production d'hydrogène à 1 g/L de biomasse cellulaire en fonction de l'intensité lumineuse
- Figure VII.7. Optimisation de la production d'hydrogène à 1,5 g/L de biomasse cellulaire en fonction de l'intensité lumineuse
- Figure VII.9. Optimum de production d'hydrogène en fonction de la concentration de biomasse
- Figure VII.10. Effet de  $[\text{NaHCO}_3]$  sur la production du bio-hydrogène
- Figure VII.11. Optimisation du pH de la production d'hydrogène
- Figure VII.12. Effet de la concentration du NaCl sur la production du biohydrogène
- Figure VII.13. Effet de l'âge de la culture sur la production d'hydrogène.
- Figure VII.14. Optimisation de l'intensité lumineuse pour le photobioréacteur cylindrique et conique
- Figure VII.15. Optimisation de l'intensité lumineuse pour le photobioréacteur conique- plat
- Figure VII.16. Schéma de dimensions d'un photobioréacteur conique et cylindrique
- Figure VII.17. Effet de la mélasse sur la production d'hydrogène.
- Figure VII.18. Effet des sources de carbone minérales sur la production d'hydrogène
- Figure VII.19. Effet du D-glucose sur la production d'hydrogène
- Figure VII.20. Taux de glycogène endogène de la spiruline sans pré-incubation de la dans le milieu L-N
- Figure VII.21. Taux de glycogène endogène après la pré-incubation de la spiruline 24h dans le milieu L-N
- Figure VII.22. Taux de glycogène endogène après la pré-incubation de la spiruline 48h dans le milieu L-N
- Figure VII.23. Effet de l'incubation de la spiruline dans le milieu L-N sur la production d'hydrogène
- Figure VII.24. Origine des équivalents réducteurs et leur contribution à la production d'hydrogène

## Liste des tableaux

### II. L'hydrogène

- Tableau II. 1: Principales méthode de production d'hydrogène
- Tableau II. 2: Compositions type des gaz à la sortie d'un vaporeformeur selon différentes charges hydrocarbonées
- Tableau II. 3: Composition type du gaz de synthèse d'un réacteur POX à 5.4 MPa.
- Tableau II.4: Composition type d'un gazéificateur Texaco

### III. Bio-hydrogène

- Tableau III.1: Différents types d'Hydrogénases

### IV. La Spiruline: *Spirulina platensis*

- Tableau IV.1. Classification de *Spirulina platensis*

### V. Photobioréacteur

- Tableau V.1 : Températures optimales pour la production de H<sub>2</sub> pour quelques espèces cyanobactériales

### VI. Matériels et méthodes

- Tableau VI.1. Composition chimique du milieu Zarrouk
- Tableau VI.2. Composition chimique de la solution A<sub>5</sub>
- Tableau VI.3. Composition chimique de la solution B<sub>6</sub>
- Tableau VI.4. Composition de deux milieux de production testés
- Tableau VI.5. Composition du réactif DNS

### VII. Résultats et discussion

- Tableau VII.1. Production d'hydrogène selon les milieux de production testés.
- Tableau VII.2. Volume d'hydrogène selon la forme du photobioréacteur
- Tableau VII.3. Tableau récapitulatif des taux de production d'hydrogène de *S. platensis* par apport aux cyanobactéries testées

## Sommaire

I.	Introduction	1
II.	L'hydrogène	3
II.1.	Propriétés de l'hydrogène	3
II.2.	Comportement chimique de l'hydrogène	4
II.3.	Propriétés du carburant d'hydrogène	5
II.4.	Méthodes de stockage de l'Hydrogène	6
II.5.	Différentes applications de l'hydrogène	7
II.6.	Avantages de l'hydrogène comme vecteur énergétique	9
II.7.	Désavantages de l'hydrogène comme vecteur énergétique	10
II.8.	Procédés de production de l'hydrogène	10
II.8.1	Techniques au stade industriel	11
8.1. 1.	Processus thermiques	12
8.1. 2.	Processus électrochimique	18
III.	Bio-hydrogène	21
III.1.	Définition	21
III.2.	Historique	22
III.3.	Mécanismes de production du bio-hydrogène	23
III.3.1.	Bio-hydrogène via les procédés thermo-chimiques (Pyrolyse)	23
III.3.2.	Production du bio-hydrogène via les processus biologiques	24
a/	La bio-photolyse chez les microorganismes photo-autotrophe	25
a.1/	La bio-photolyse directe chez les micro-algues et les cyanobactéries	25
a.2/	La bio-photolyse indirecte	27
b/	La photo-décomposition des matières organiques par les microorganismes photo-hétérotrophes	29
c/	Production d'hydrogène par voie fermentaire obscure par les microorganismes chimiotrophes	30
d/	Système hybrides de production d'hydrogène en continu	32
III.4.	Enzymes productrices d'hydrogène	33
III.4.1.	L'Hydrogénase	34
III.4.2.	La Nitrogénase	37
IV.	La Spiruline: <i>Spirulina platensis</i>	38
1.	Historique	39
2.	Habitat naturel	39
3.	Taxonomie	40
4.	Ultra-structure	41
5.	Le cycle de vie de la Spiruline	42
6.	Conditions physique et chimiques de croissance	43
7.	propriétés nutritionnelles et thérapeutiques de la Spiruline	43
7.1	Protéines et acides aminés	44
7.2	Lipides et acides gras	44
7.3	Glucides et polysaccharides	45
7.4	Vitamines	46
7.5	Sels minéraux et oligo-éléments	46

IV.	Photobioréacteur	47
IV.1.	Présentation générale	47
IV.2.	Technologies existantes	48
IV.2.1.	Photobioréacteurs tubulaires et cylindriques	48
IV.2.2.	Photobioréacteurs plans	50
IV.2.3.	Photobioréacteurs solaires à éclairage interne	51
IV.2.4.	Photobioréacteurs à lumière artificielle	52
IV.3.	Photobioréacteurs et production d'Hydrogène par les cyanobactéries	52
IV.4.	Condition influençant la production d'hydrogène par Les cyanobactéries	51
VI.	Matériels et méthodes	57
VI.1.	Souche et mise en culture en discontinue	57
1.	Courbe étalon DO = f (PS)	57
2.	Contrôle de la contamination des cultures de <i>Spirulina platensis</i>	61
3.	Suivi de la cinétique de croissance	61
4.	Comparaison de l'aspect d'une culture jeune et âgée de <i>Spirulina platensis</i>	62
VI.2.	Fermentation production d'hydrogène et effet des différents paramètres expérimentaux	63
VI.2.1.	Procédure de production du bio-hydrogène par <i>Spirulina platensis</i>	64
VI.2.2.	Effet des différentes conditions expérimentales sur la production du bio-hydrogène par <i>Spirulina platensis</i>	65
2.2.1.	Effet de la concentration de biomasse en fonction de l'intensité lumineuse	66
2.2.2.	Influence de la concentration en bicarbonate de sodium dans le milieu de production (L-N)	66
2.2.3.	Effet du pH du milieu production (L-N)	67
2.2.4.	Influence de la concentration en NaCl dans le milieu de production (L-N)	67
2.2.5.	Effet de l'âge de la culture	67
2.2.6.	Effet de la forme du photobioréacteur en fonction de l'intensité lumineuse	67
2.2.7.	production d'hydrogène sous l'effet de la mixotrophie	68
2.2.8.	Effet de la pré- incubation de la souche dans le milieu de production (L-N)	69
VII.	Résultats et discussion	73
VII.1.	Souche et mise en culture	73
1.	Courbe étalon (DO = f (PS))	73
2.	Contrôle de la contamination de la souche	73
3.	Cinétique de croissance de la souche <i>Spirulina platensis</i>	74
4.	Suivi du pH durant la croissance de notre souche	76
5.	Comparaison de l'aspect d'une culture jeune et âgée de <i>Spirulina platensis</i>	78

<b>VII.2.Effet des conditions expérimentales du milieu sur la production de H<sub>2</sub> .....</b>	<b>79</b>
<b>VII.2.1.Effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène.....</b>	<b>79</b>
<b>VII.2.2.Influence de la concentration en bicarbonate de sodium dans le milieu de production (L-N).....</b>	<b>83</b>
<b>VII.2.3.Effet du pH du milieu production (L-N).....</b>	<b>84</b>
<b>VII.2.4.Influence de la concentration en NaCl dans le milieu de production (L-N).....</b>	<b>85</b>
<b>VII.2.5.Effet de l'âge de la culture.....</b>	<b>86</b>
<b>VII.2.6.Effet de la forme du photobioréacteur en fonction de l'intensité lumineuse.....</b>	<b>87</b>
<b>VII.2.7.production d'hydrogène sous l'effet de la mixotrophie.....</b>	<b>90</b>
<b>1. En présence de la mélasse de betterave sucrière.....</b>	<b>90</b>
<b>2. En présence du carbonate de sodium et du carbonate de calcium....</b>	<b>91</b>
<b>3. En présence du D-glucose.....</b>	<b>92</b>
<b>VII.2.8.Effet de la pré-incubation de la souche dans le milieu production (L-N).....</b>	<b>93</b>
<b>1. Cinétique du glycogène endogène.....</b>	<b>93</b>
<b>2. Influence de la pré-incubation de la souche dans le milieu de production (L-N) sur la bio-production d'hydrogène.....</b>	<b>96</b>
<b>VII.3. Le mécanisme de production d'hydrogène chez <i>Spirulina platensis</i>....</b>	<b>97</b>
<b>VII.4. Production d'hydrogène par <i>Spirulina platensis</i> sous les conditions optimales.....</b>	<b>99</b>
<b>Conclusions générales.....</b>	<b>102</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>105</b>

# *Introduction*

L'Homme est coupable d'avoir développé une civilisation technologique qui rejette dans l'atmosphère des quantités de dioxyde de carbone de plus en plus grandes. En conséquence de l'utilisation croissante des combustibles fossiles, tels que le charbon, le pétrole et le gaz naturel dont la combustion conduit à l'accroissement des taux du CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère. Ce gaz à effet de serre accentue le réchauffement climatique et altère le climat (**André L., 2009**) en causant des catastrophes naturelles à la surface du globe.

Le développement des énergies renouvelables devient donc une priorité grâce à leur origine d'irrépressible disponibilité: les ressources naturelles. Ces énergies n'entraînent pas (ou que peu) d'émission de gaz à effet de serre. Par conséquent, elles constituent des ressources d'énergie inépuisables et moins polluantes en particulier dans le cadre du protocole de Kyoto. En plus des ressources renouvelables déjà bien implantées tels que le solaire, l'éolien, l'hydraulique, la géothermie, etc), l'hydrogène est en train de devenir l'alternative énergétique préférée aux combustibles fossiles. En effet, l'hydrogène est le carburant vert du futur (**Nitai B., 2007; Ayhan D., 2009**). Bien plus, l'hydrogène peut produire l'électricité dans une pile à combustible en ne dégageant que de l'eau. Ce qui en fait une ressource totalement propre (**Pierre M., 2006; Farida D., 2006**).

L'hydrogène généré à partir des ressources renouvelables comme l'eau et les déchets organiques est appelé "bio-hydrogène". Mais la biomasse apparaît comme une source prometteuse dans laquelle s'inscrit la production du bio-hydrogène par les microorganismes photosynthétiques (**Claude L., 2001; Lemasson C., 2011**). Le bio-hydrogène est un biocarburant de 3<sup>e</sup> génération (**Lemasson C., 2011**) et les procédés de sa production se caractérisent par rapport aux processus classiques par leur demande énergétique faible.

La production d'hydrogène par les micro-algues est un phénomène particulier car elle n'est possible que dans un milieu dépourvu d'oxygène. L'enzyme responsable de la réduction des protons en dihydrogène étant inhibée par celui-ci. Ceci demande donc des conditions expérimentales bien spécifiques.

La portée du travail présenté dans cette thèse est dédiée à l'étude de l'effet de la composition du milieu (NaCl, sources carbonées,...), des conditions opératoires (pH, température, âge de culture,...) ainsi que la forme du photobioréacteur sur le taux de production d'hydrogène par *Spirulina platensis*. Cette étude a été mise en place au sein du Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et de Génie des Procédés (BIOGEP) du Département de Génie de l'Environnement.

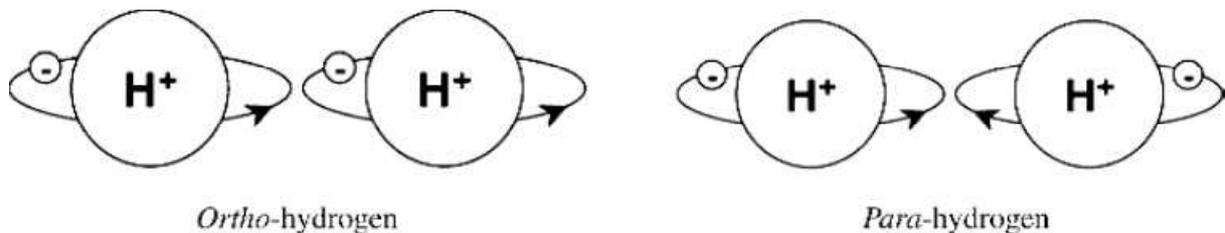
*Partie*  
*Bibliographique*

## II. L'HYDROGENE

### II.1. Propriétés de l'hydrogène

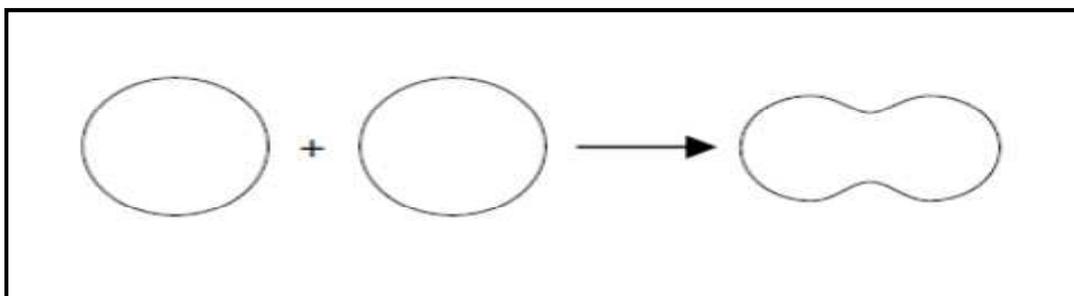
L'hydrogène est l'atome le plus petit et le plus répandu dans l'univers. Il représente la substance chimique la plus légère. C'est un gaz incolore et sans saveur. La molécule d'hydrogène est apolaire; elle est de ce fait pratiquement insoluble dans l'eau, 2 mL de H<sub>2</sub>/1L d'eau à la température ambiante et à la pression atmosphérique.

Il existe trois isotopes d'hydrogène, le plus abondant dans la nature est H<sup>1</sup> (99.985 %). Le Deutérium (H<sup>2</sup>) et le Tritium, radioactif, (H<sup>3</sup>) existent seulement à l'état de traces.



**Figure II.1. Modèle schématique de la conversion ortho/para-H<sub>2</sub> (G. Buntkowsky, 2006).**

L'hydrogène est constitué de deux types de molécules, l'*ortho*-hydrogène dont les deux spins de protons sont parallèles et le *para*-hydrogène dans lequel les spins sont antiparallèles (A. Demirbas, 2009). La figure II. 2 schématise la structure de la molécule d'hydrogène.

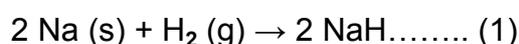


**Figure II.2. Structure de la molécule d'hydrogène (A. Demirbas, 2009)**

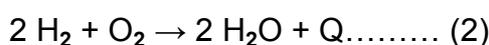
La figure montre la structure de la molécule d'hydrogène. Deux atomes d'hydrogène chacun avec un électron; combinés par la liaison chimique la plus simple «la liaison covalente». La faiblesse de cette force d'attraction intermoléculaire est indiquée par le faible point normal d'ébullition (15.5 K), le point de normal de fusion (14.1 K) et par la température critique (30.2 K) à une pression critique de 12.8 atm. Dans la molécule de l'hydrogène, les deux électrons sont partagés entre les atomes et servent à donner pour chacun une couche de valence saturée. Puisque les deux atomes sont rapprochés l'un de l'autre, le noyau d'un atome est attiré par l'électron de l'autre. Finalement, les deux orbitales se chevauchent, donnant naissance à une seule orbitale contenant deux électrons (**D. Ayhan, 2009**).

## ***II.2. Comportement chimique de l'hydrogène***

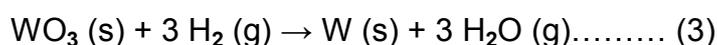
Puisque l'énergie de la liaison intermoléculaire H-H est de 431 kJ/mol; le potentiel d'ionisation de l'hydrogène est relativement élevé (1312 kJ/mol). L'affinité d'électron est faible (-72 kJ/mol) et cela seulement lorsque l'hydrogène réagit avec les métaux les plus réactifs; pour produire des métaux hybrides par exemple:



L'hydrogène brûle aux hautes températures avec des explosions dans l'air (**A. Caglar, 2000**):



L'hydrogène réagit avec plusieurs oxydes métalliques afin de donner naissance à un métal libre et de l'eau, certaines réactions de ce genre sont employées dans la métallurgie des oxydes de minerais, telle que la production commerciale du tungstène:



Le monoxyde de carbone et l'hydrogène réagissent entre eux en présence d'un catalyseur, à base de cuivre et de zinc, pour produire le méthanol selon le processus:



L'hydrogène réagit avec l'azote à des pressions allant de 300 à 1000 atm. et entre 200 et 500°C en présence d'un catalyseur, à base de fer, tout en produisant l'ammoniac: **(A. Midilli et al., 2005)**



### **II.3. Propriétés du carburant d'hydrogène**

L'hydrogène est considéré comme étant un vecteur énergétique synthétique et une source énergétique secondaire. Il transporte, stocke et délivre l'énergie produite par d'autres procédés sous une forme aisément utilisable **(G. D. Berry et al., 1996)**.

L'hydrogène apparaît comme l'alternatif préféré des combustibles fossiles grâce à ses bonnes propriétés comme carburant de moteurs. En effet, les tests effectués sur les moteurs d'automobiles à combustion interne alimentés par l'hydrogène; ont démontré une bonne performance par rapport aux moteurs à essence, car l'émission des oxydes d'azote par les premiers est beaucoup moindre. Le produit de combustion de l'hydrogène par l'air est constitué de vapeur d'eau et une pollution négligeable. Cependant, certains oxydes d'azotes (NO<sub>x</sub>) sont formés à des températures de combustion trop élevées (< 2300 K); heureusement que la température d'auto- inflammation de l'hydrogène est seulement de 858 K.

Certaines propriétés caractéristiques du mélange hydrogène- air peuvent vraiment influencer le design et la performance des moteurs: densité extrêmement faible, haute vitesse de diffusion, faible énergie d'inflammation, un large intervalle d'explosion en présence d'oxygène (de 4 à 75% dans l'air) **(J. H. Plass, 1990)**.

L'hydrogène possède une énergie de prise de flamme plus faible par rapport aux autres carburants. En effet, pendant que l'énergie d'inflammation du mélange air-essence est de 0,2 et 0,4 MJ sous pression atmosphérique et à la température

ambiante. Elle est de, seulement, 0,02 MJ pour les mélanges air- hydrogène. Par ailleurs, l'hydrogène se caractérise par une large gamme de limites d'inflammation située entre la borne inférieure de [4- 10] % et la borne supérieure de [60- 75] % (**A. Caglar, 2000**).

#### ***II.4. Méthodes de stockage de l'Hydrogène***

L'hydrogène peut être stocké par différentes méthodes (**A. Züttel, 2003; T. Ozturk, 2007**):

##### ***II.4.1 Réservoirs cryogéniques pour le stockage de l'hydrogène liquéfié***

Les récipients de l'hydrogène liquide sont des systèmes ouverts pour prévenir la grande surpression. Cette opération est conduite à une température de 21 K. Le transfert de chaleur à travers le conteneur cause une perte directe de H<sub>2</sub> par évaporation continue. Pour y remédier, ces tanks ont été munis d'un système de sécurité dans lequel H<sub>2</sub> peut être catalysé par combustion en contact direct avec l'air ou bien collecté à nouveau dans un matériau hybride (**L. Schlapbach, 2001**).

##### ***II.4.2 Absorption sur des sites interstitiels dans un matériau hôte à température et pression ambiantes***

L'alliage Fer- Titane (Fe-Ti) agit comme une éponge pour absorber l'hydrogène et devient donc un matériau hybride de type FeTiH<sub>1,6</sub>. Le gaz H<sub>2</sub> se combine à l'alliage du matériau par absorption exothermique. Le processus constitue un moyen utile pour le démarrage instantané des véhicules tout en diminuant la pollution totale dégagée de plus de 80%. Le matériau hybride offre donc la méthode la plus sécurisée pour stocker l'hydrogène dans les véhicules alimentés par ce dernier (**D. Ayhan, 2009**).

### *II.4.3 Cylindres de gaz à haute pression*

L'hydrogène peut être hautement comprimé dans des citernes à ultra- haute pression ~ 800 bars (**D. Ayhan, 2009**).

### *II.4.4 Oxydation des métaux réactifs par l'eau*

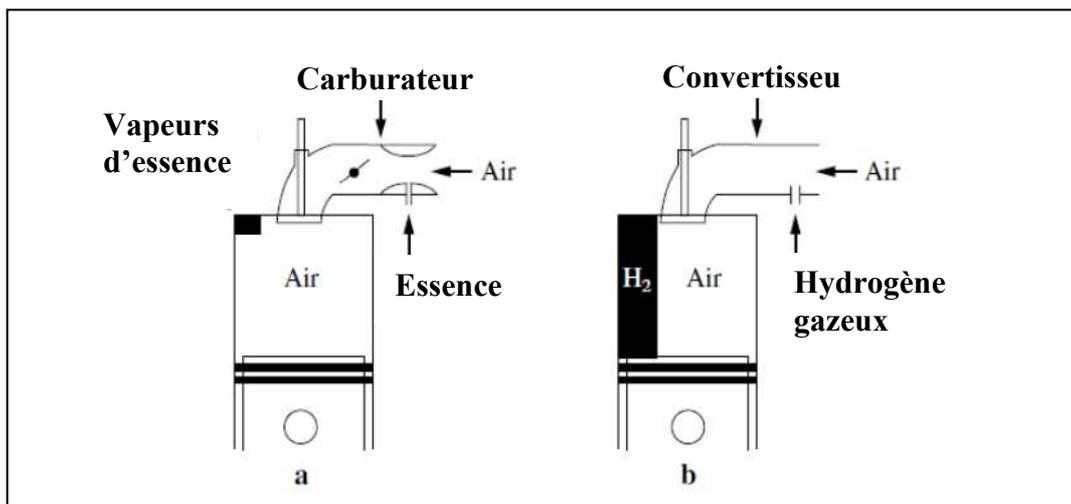
Le défi principal avec le stockage de H<sub>2</sub> via l'oxydation des matériaux réactifs est le contrôle de ce processus réversible (**L. Schlapbach, 2001**).

## **II.5. Différentes applications de l'hydrogène**

Dans l'industrie automobile, l'hydrogène peut être utilisé de deux façons: la combustion interne pour la génération de puissance ou bien il peut être combiné avec l'oxygène dans une pile à combustible afin de générer de l'électricité.

### *II.5.1 Moteurs à combustion interne*

Les moteurs à combustion interne, fonctionnant à l'hydrogène, sont pratiquement identiques à leurs prédécesseurs essence. Ils possèdent à la fois la même performance opérationnelle excellente des moteurs à essence (**R. K. Green, 1992**), et une efficacité thermique élevée tout comme les moteurs à diesel (**L. M. Das, 1996**). La différence entre eux réside dans le léger changement du design et que le sous produit de combustion par l'oxygène est l'eau au lieu des substances polluantes nocives. A cause du large intervalle d'explosion de l'hydrogène dans l'air qui est significativement supérieur à celui de l'essence, les HICE possèdent un système électronique contrôlant la quantité de l'air entrant au moteur. Une autre caractéristique des HICE est l'utilisation des pistons à haute compression afin d'achever plus de puissance à partir du processus de combustion (**A. Demirbas, 2002**)

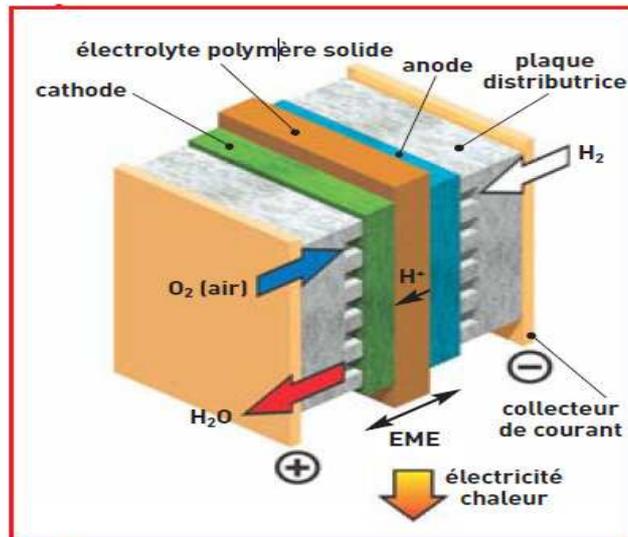


**Figure II.3. (a) Carburateur d'un moteur d'automobile alimenté par l'essence liquide. (b) Convertisseur d'un système de moteur modifié alimenté par l'hydrogène gazeux.**

### II.5.2 Piles à combustible

La pile à combustible a la particularité d'utiliser l'hydrogène et l'oxygène comme couple électrochimique via les réactions d'oxydoréduction qui s'opèrent au sein de la pile. Au niveau de l'anode, l'hydrogène se dissocie en protons suivant la réaction d'oxydation:  $H_2 \rightarrow 2 H^+ + 2 e^-$ . L'oxygène, les électrons et les protons se combinent, à la cathode, pour former l'eau suivant la réaction de réduction:  $2 H^+ + \frac{1}{2} O_2 + 2 e^- \rightarrow H_2O$ . L'énergie est dissipée sous forme de chaleur.

Les piles à combustible, fonctionnant à l'hydrogène, donnent la possibilité de produire du courant électrique par conversion directe de l'énergie chimique du combustible (S. Calathea, 2005). Elles sont donc très utiles dans les sites isolés notamment les vaisseaux spatiaux, les stations météorologiques isolées, les grands parcs, les régions rurales et certaines applications militaires. Il existe plusieurs prototypes de voitures et de bus basés sur la technologie des piles à combustible qui ont été manufacturés, mais selon l'Industrie Automobile la commercialisation de tels véhicules pratiques n'est prévue qu'à partir de 2015 (A. Demirbas, 2002).



**Figure II.4. Principe de fonctionnement de la pile à combustible à membrane échangeuse de protons.**

**EME = Ensemble électrodes- membrane.**

## **II.6. Avantages de l'hydrogène comme vecteur énergétique**

L'hydrogène apparaît comme étant un médiateur énergétique universel du fait qu'il constitue le carburant le plus convenable pour les piles à combustible et que la transmission d'énergie sous forme d'hydrogène est beaucoup plus économique qu'à travers les lignes de courant alternatif à haute tension, pour les grandes distances.

L'hydrogène est non toxique et extrêmement doux pour l'environnement, puisque l'eau vapeur et liquide constitue pratiquement le seul produit de la réaction de combustion au cours de sa conversion en énergie et sans formation de produits toxiques tels que: les hydrocarbures, le monoxyde de carbone, les oxydes d'azote, les acides organiques et le CO<sub>2</sub>. Bien plus, la production d'hydrogène est possible à partir du composé chimique le plus abondant sur terre, en l'occurrence l'eau (**A. Midilli, 2005**).

L'hydrogène possède plusieurs propriétés qui le rendent idéal comme carburant pour les moteurs d'automobiles à combustion interne. En effet, son pouvoir calorifique est le plus élevé par rapport autres carburants (**A. Demirbas, 1998**), puisque l'énergie de 1,0 kg d'hydrogène est équivalente à 2,1 kg de gaz naturel et

2,8 kg de pétrole. Le cycle thermodynamique pour l'hydrogène est beaucoup plus proche du cycle Otto idéal par rapport aux autres carburants. L'efficacité opérationnelle du moteur est améliorée grâce à la haute vitesse de flamme de l'hydrogène et ses larges limites d'inflammation, ainsi que la conservation de son état gazeux à 20.1 K, donc le problème de démarrage du moteur même aux températures d'hiver les plus basses ne se pose pas (**D. Ayhan, 2009**).

### ***II.7. Désavantages de l'hydrogène comme vecteur énergétique***

L'inconvénient principal de l'utilisation de l'hydrogène comme carburant automobile est la nécessité de disposer d'un grand réservoir à cause de sa densité extrêmement faible. Cependant, Cela donne un avantage de stocker 2,6 fois plus d'énergie par unité de masse par rapport à l'essence.

L'hydrogène n'est pas disponible à l'état libre dans la nature en quantités utiles. Il est produit, entre autre, par l'hydrolyse de l'eau qui nécessite beaucoup d'énergie à cause des inefficacités. L'hydrogène est, donc, un vecteur énergétique plutôt qu'une source énergétique primaire.

La génération d'hydrogène à grande échelle est coûteuse. En effet, le moyen le plus facile et le plus économique est l'électrolyse qui est un processus très gourmand en électricité, or la source d'électricité la plus bon marché est les carburants fossiles, qui polluent l'environnement.

### **II.8. PROCÉDES DE PRODUCTION DE L'HYDROGENE**

Les principales méthodes de production de l'hydrogène sont données par le tableau ci-dessous (**D. Ayhan, 2009**).

**Tableau II. 1 : Principales méthode de production d'hydrogène.**

<b>Méthode</b>	<b>Processus</b>	<b>Précurseur</b>
<b>Thermique</b>	Vaporeformage	Gaz naturel
	Hydrolyse thermochimique	Eau
	Pyrolyse	Biomasse
	Gazéification	Charbon, biomasse
<b>Electrochimique</b>	Electrolyse	Eau
	Photo- électrochimique	Eau
<b>Biologique</b>	Photo- biologique	Eau et algues
	Microorganisme	Souches
	Fermentatif	
	Digestion anaérobique	Biomasse

### **II.8.1. Techniques au stade industriel**

Actuellement, 85% de l'hydrogène est produit à partir des hydrocarbures, en raison de leur intégration dans l'industrie pétrolière qui est l'une des premières consommatrices d'hydrogène, leur disponibilité actuelle ainsi que leur réactivité chimique et le coût global de production (**D. Tigéat, 2008**).

L'hydrogène est produit commercialement dans presque une douzaine de processus, dont la plupart nécessitent l'extraction de la partie "hydro" à partir des hydrocarbures (**P. Hohmann, 2002**). De nos jours, les méthodes les plus communément utilisées pour la production d'hydrogène sont: (i) le vaporeformage du méthane, qui seul produit près de 90% d'hydrogène. Bien que d'autres hydrocarbures puissent être utilisés comme matière première et (ii) l'électrolyse de l'eau. Le taux de la production mondiale d'hydrogène à partir du gaz naturel, pétrole, charbon et électrolyse de l'eau est de 48, 30, 18, et 4 % respectivement (**D. Ayhan, 2009**).

### 8.1.1. Processus thermiques

#### A/ Vaporeformage du gaz naturel

Le reformage à l'eau, développé en 1924, est le principal processus industriel de génération d'hydrogène. Le vaporeformage catalytique et l'oxydation partielle des hydrocarbures représentent les processus les plus efficaces et les plus largement utilisés pour la production d'hydrogène et des mélanges hydrogène/monoxyde de carbone (**J. R. Rostrup-Nielsen, 1984**).

Le processus implique une conversion catalytique de l'hydrocarbure et des vapeurs d'eau en hydrogène et oxydes de carbone (gaz de synthèse). Les matières premières classiquement utilisées sont les hydrocarbures légers pouvant être complètement vaporisés sans formation de carbone; incluant le gaz naturel, le GPL et le naphta jusqu'à des points d'ébullition de 200 à 220 °C. Des alcools comme le méthanol ou l'éthanol peuvent également être utilisés (**D. Tigreat, 2008**).

Ces différentes charges hydrocarbonées contiennent généralement du soufre, qui est un poison pour le catalyseur. Il est donc nécessaire de procéder à une désulfuration de la charge préalablement à l'étape de vaporeformage afin d'atteindre des teneurs en soufre inférieures à 0,5 ppm en masse. L'opération de désulfuration consiste à faire réagir la charge avec de l'hydrogène pour obtenir des hydrocarbures et du sulfure d'hydrogène. La réaction générale de vaporeformage est la suivante (**D. Tigreat, 2008**):



Les étapes de base du processus conventionnel de vaporeformage sont:

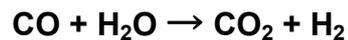
#### Génération des gaz de synthèse

L'hydrocarbure ainsi désulfuré est mélangé avec les vapeurs en présence d'un catalyseur à base de Nickel dans le réacteur où la réaction de reformage endothermique se produit à 1175 K (**A. Caglar, 2000**) selon le schéma suivant:



## Génération supplémentaire d'hydrogène (*Water Gas Shift Reaction*)

Lorsque le reformage est associé au captage de CO<sub>2</sub>, des réacteurs catalytiques de conversion sont utilisés pour convertir, en présence d'eau, le CO du gaz synthèse en CO<sub>2</sub> et en H<sub>2</sub>. Le mélange ainsi obtenu est alors très riche en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> (**D. Tolleter, 2011**). La réaction est exothermique et se produit en deux étapes entre 475 et 675 K (**A. Caglar, 2000**):

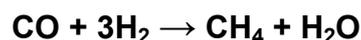


### Purification du gaz

Afin d'être utilisé comme vecteur énergétique et notamment dans une pile à combustible, l'hydrogène doit être pur. En effet, les piles à combustible existantes doivent être alimentées avec de l'hydrogène contenant moins de 100 ppm de monoxyde de carbone ou de soufre. Pour cela, il est nécessaire d'effectuer des étapes de purification de l'hydrogène produit (**D. Tigreat, 2008**). Au niveau du réacteur, les conditions opératoires à mettre en œuvre sont plus ou moins sévères. Elles dépendent principalement du mode de purification finale de l'hydrogène. Deux voies sont industriellement possibles: la méthanation et l'adsorption sélective sur tamis moléculaires (*Pressure Swing Adsorption*) (**D. Tolleter, 2011**).

### Méthanation

Pour obtenir une pureté d'hydrogène encore plus élevée, le monoxyde de carbone et le dioxyde de carbone résiduaux peuvent être éliminés par une étape de méthanation consistant à faire réagir ces derniers avec l'hydrogène selon les équations exothermiques suivantes:



Cette réaction a lieu en présence d'un catalyseur à base de nickel entre 300 et 340 °C. Les teneurs résiduelles en monoxyde de carbone et en dioxyde de carbone sont inférieures à 10 ppm (**D. Tigreat, 2008**).

## Adsorption sélective

L'adsorption sélective des impuretés sur lit de tamis moléculaire (PSA, *Pressure Swing Adsorption*) est basée sur le principe de l'adsorption des impuretés sur des lits de tamis moléculaire. L'opération a lieu à température ambiante et sous une pression de 20 à 25 bars. La pureté finale de l'hydrogène est de l'ordre de 99,9999 vol% (**D. Tigreat, 2008**).

L'hydrogène produit par vaporeformage a typiquement une pureté de 97- 98 %. Il faut noter que 50 % de l'hydrogène est dérivé à partir de l'eau lorsque la charge hydrocarbonée est le méthane et 64,5 %, quant il s'agit du naphta (**A. Caglar, 2000**). Des compositions type des gaz évacués du vaporeformeur sont données dans le Tableau II. 2 (**D. Tigreat, 2008**).

**Tableau II. 2: Compositions type des gaz à la sortie d'un vaporeformeur selon différentes charges hydrocarbonées.**

Composition (%vol)	Méthane	Gaz naturel	GPL	Naphta
CH4	3,06	2,91	2,39	2,12
CO	12,16	12,62	13,62	14,17
CO2	9,66	10,40	12,73	14,19
H2	75,12	73,98	71,86	69,52
N2	-	0,09	-	-

### *B/ Oxydation partielle (POX) d'hydrocarbures*

La production de l'hydrogène par oxydation partielle est similaire à celle conduite par vaporeformage catalytique. Essentiellement, le processus entraîne une conversion d'hydrocarbures en gaz de synthèse par oxydation ménagée en présence d'oxygène (**D. Ayhan, 2009**). Cette réaction a lieu à haute température (1200 à

1500°C) et à des pressions modérément élevées (20 à 90 bar) (**D. Tigreat, 2008**) avec ou sans catalyseur en fonction de la matière première et du processus sélectionné.

Le procédé d'oxydation partielle permet de traiter n'importe quelle matière première gazeuse, liquide ou solide. Les charges classiquement utilisées sont les hydrocarbures lourds et les résidus pétroliers. La réaction générale d'oxydation partielle est la résultante de nombreuses réactions intervenant dans le mélange:



Il existe trois étapes principales:

### **Génération du gaz synthétique**

C'est un processus dans lequel les hydrocarbures légers sont partiellement oxydés par l'oxygène en présence d'un catalyseur à environ 875 K.

### **Conversion du gaz à l'eau**

Les hydrocarbures lourds sont partiellement oxydés sans avoir recours aux catalyseurs grâce à la haute température.

### **Purification des gaz**

Les hydrocarbures solides comme le charbon sont partiellement oxydés sans catalyseur dans le processus (**D. Ayhan, 2009**).

Un exemple de composition typique de gaz de synthèse débouchant d'une réaction POX du pétrole lourd est donné dans le tableau 3 (**A. Caglar, 2000**).

### *C/ Gazéification du charbon*

L'hydrogène dérivant des carburants fossiles n'est pas une source renouvelable propre. Il est peut être plus facile de soutenir une expansion des processus

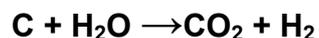
commerciallement disponibles et relativement peu couteux, telle que la fabrication de l'hydrogène à partir du charbon. Le charbon est la source énergétique majeure qui peut être transformée en carburant de transport et une matière première chimique relativement abondante et à faible cout pour la production d'hydrogène.

**Tableau II. 3: Composition type du gaz de synthèse d'un réacteur POX à 5.4 MPa.**

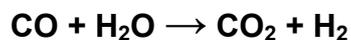
<b>Composant</b>	<b>Vol. (%)</b>
<b>H<sub>2</sub></b>	<b>46</b>
CO	46
CO <sub>2</sub>	6
CH <sub>4</sub>	1
N <sub>2</sub> et Ar	1

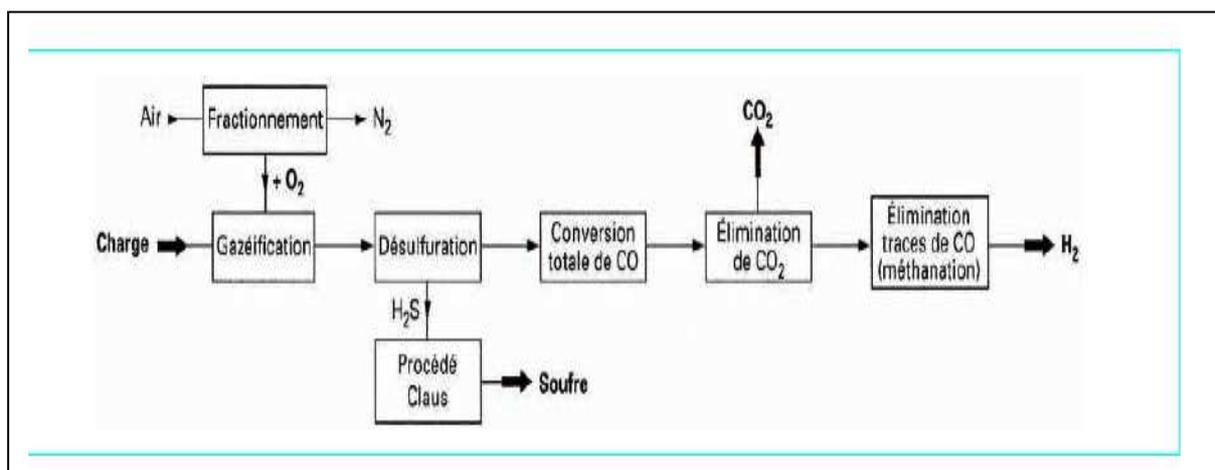
Le gazéificateur converti le charbon en composés gazeux par l'application de la chaleur et de la pression et en présence de vapeurs et d'oxygène. Un gazéificateur diffère du réacteur à combustion par le fait que la quantité d'oxygène dans le gazéificateur est soigneusement contrôlée selon ses conditions internes et le type de matière première sélectionnée; de telle façon que seulement une petite quantité du carburant est complètement brûlée, minimisant ainsi la formation de CO<sub>2</sub> (**A. Demirbas, 2009**).

La gazéification du charbon est souvent représentée par la réaction suivante:



La seconde étape dans le processus consiste en un nettoyage et un transfère du CO afin de former H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> par réaction avec la vapeur d'eau (**A. Demirbas, 2009**):





**Figure II. 5. Schéma explicatif du processus de gazéification (R. Marseu, 1997).**

Les étapes décrites précédemment sont suivies d'une méthanation au cours de laquelle les traces de CO sont transformées en méthane en présence d'un catalyseur à base de nickel (R. Marseu, 1997).

**Tableau II.4: Composition type d'un gazéificateur Texaco.**

Composé	Vol. (%)
H <sub>2</sub>	34
CO	48
CO <sub>2</sub>	17
N <sub>2</sub> et Ar	1

### 8.1.2. Processus électrochimique

L'hydrogène peut être obtenu à partir de l'eau par différents procédés électrochimiques, dont les principaux sont:

#### Electrolyse directe de l'eau

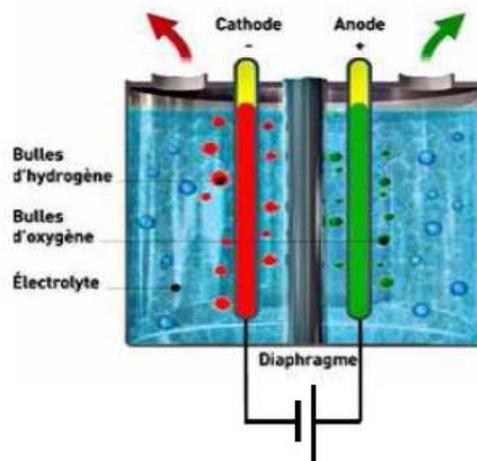
La production d'hydrogène est possible par électrolyse avec production d'électricité à partir des sources énergétiques fossiles, nucléaire, hydrique,

biomasse, solaire et éolienne. Mais cet hydrogène électrolytique ne contribue en aucun cas à réduire la pollution atmosphérique car l'électricité requise pour la réaction est obtenue à travers les carburants fossiles (**B. Viswanathan, 2006**).

Bien qu'à présent seul 4% d'hydrogène électrolytique est produit (**D. Tigreat, 2008**), du fait qu'il est économiquement non compétitif avec H<sub>2</sub> produit à partir d'hydrocarbures. Il présente, tout de même, quelques avantages tels que l'obtention d'un produit de haute pureté et la flexibilité de l'opération. L'hydrogène non polluant peut provenir à partir des ressources renouvelables comme l'eau, le soleil, le vent et la photo-catalyse.

Le procédé industriel disponible à l'heure actuelle nécessite le passage d'un courant électrique à travers l'eau pour réaliser son électrolyse. Elle consiste en deux réactions chimiques ayant lieu séparément. Sur la cathode se déroule la réduction de l'eau pour produire le gaz H<sub>2</sub>:  $4 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ e} \rightarrow 2 \text{ H}_2 + 4 \text{ OH}^-$ . Et au niveau de l'anode l'oxydation des ions hydroxydes en donnant le gaz d'oxygène:  $4 \text{ OH}^- \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 4 \text{ e}$ . Le schéma classique d'une cellule d'électrolyse est illustré par la Figure II.6.

Il existe différents procédés de production selon la nature de l'électrolyte employée et selon la manière d'assemblage des cellules entre elles. L'électrolyte peut être une solution aqueuse acide ou basique ou une membrane polymérique échangeuse de protons dont le système est plus compact, gagne en simplicité, et limite les problèmes de corrosion et offre des performances légèrement supérieures. Dans le cas de l'électrolyse industrielle, l'électrolyte est généralement une solution aqueuse basique de soude NaOH ou de potasse KOH, dont la concentration varie en fonction de la température du procédé. La potasse est préférée à la soude pour des raisons de conductivité ionique supérieure à température égale et pour sa plus grande pureté (D. Tigreat, 2008). La nature de l'anode et de la cathode est décidée selon leurs surtensions d'hydrogène et d'oxygène dans le milieu électrolytique, en plus de leur stabilité dans le milieu particulier.



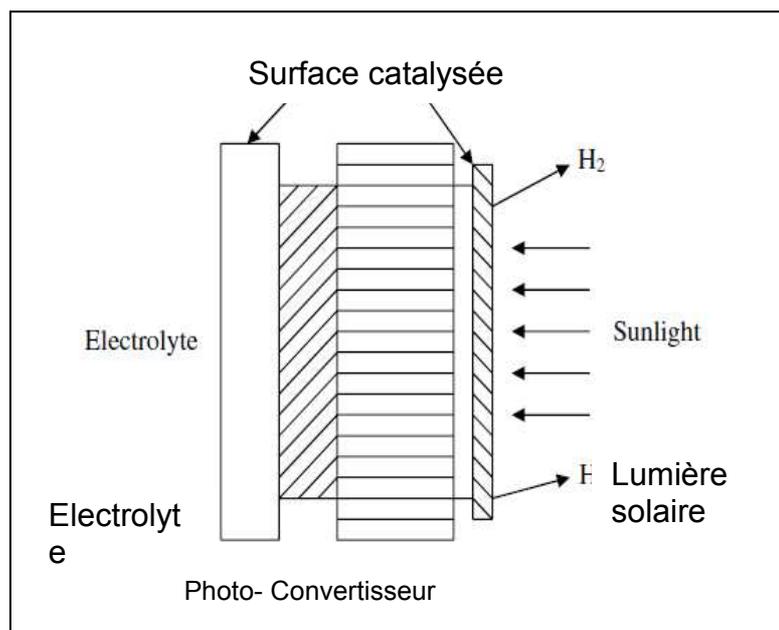
**Figure II. 6. Cellule d'électrolyse de l'eau.**

### **Production photo- électrochimique d'hydrogène**

Le rayonnement solaire est la plus grande source d'énergie renouvelable sur terre. La production photo- électrochimique d'hydrogène remplace une électrode d'un électrolyseur avec un matériau photovoltaïque semi-conducteur pour générer l'électricité nécessaire pour la réaction de lyse de l'eau.

La PEC est simple et élégante, mais retrouver les matériaux photovoltaïques, à la fois, assez forts pour conduire la scission de l'eau et stables dans un système liquide; présente un grand défi pour les chercheurs. Dans sa version la plus simple, une cellule PEC de production d'hydrogène consiste à une électrode semi-conductrice et une contre-électrode immergées dans un électrolyte aqueux. Lorsque la lumière est incidente à l'électrode semi-conductrice, elle absorbe une partie de la lumière et génère l'électricité, qui est ensuite utilisée pour l'électrolyse de l'eau.

Dans l'illustration d'une photo-électrode génératrice d'hydrogène représentée dans la figure II. 7, la lumière solaire illuminant des régions photosensibles de l'électrode produit un courant électrique pour conduire les réactions d'évolution d'hydrogène et d'oxygène (HER, OER) sur des surfaces opposées. L'opération de la photo-électrode d'hydrogène représente une interaction complexe des effets photovoltaïques, optiques et électrochimiques (**R. E. Rocheleau, 1994**).



**Figure II. 7. Production photo- électrochimique d'hydrogène.**

Les films d'oxyde de fer et d'oxyde de tungstène ont été étudiés et développés comme candidats de matériaux semi-conducteurs pour la jonction PEC (photo-anode). Les études ont montré que les propriétés optoélectroniques des films de WO<sub>3</sub> sont supérieures à celles des films de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**E. Miller, 2004**).

Cette méthode est un moyen efficace de production d'hydrogène sans émission de gaz à effet de serre avec une pollution locale très faible et un équipement plus compact (**A. Midilli, 2000**).

### **III. Biohydrogène**

Les méthodes biologiques de production d'hydrogène sont préférables aux méthodes chimiques en raison de la possibilité de l'utilisation de la lumière solaire, le CO<sub>2</sub> pour une conversion écologique des déchets organiques en hydrogène et ceux sous des conditions modérées (**D. Mark, 2008**).

En règle générale, les procédés de production du bio-hydrogène se déroulent à la température ambiante et sous pression atmosphérique. Ils sont ainsi moins gourmands en énergie et plus respectueux vis à vis de l'environnement par rapport aux procédés thermo-chimique et électrochimique (**B. Nitai, 2007**).

Ces processus peuvent être classés en deux catégories selon l'implication de la lumière: la photo-fermentation et la fermentation obscure. Pour ce faire deux enzymes sont impliquées, en l'occurrence la nitrogénase et l'hydrogénase. Elles jouent un rôle majeur dans la production du bio-hydrogène (**B. Nitai, 2007**).

#### **III.1. Définition**

Le terme du bio-hydrogène peut globalement être décrit comme étant l'hydrogène non fossile et biodégradable originaire de plantes, des animaux et surtout de microorganismes. Le bio-hydrogène peut être généré et produit à partir de toute sorte de biomasse (**J.R. Benemann, 1998**).

La bio-production d'hydrogène peut nécessiter différents processus tels que la fermentation thermophile, la fermentation obscure ou la photo-fermentation. Elle peut aussi nécessiter une étape de digestion anaérobie où le méthane du biogaz produit est converti en hydrogène à travers le vaporeformage. Chez certains microorganismes la production d'hydrogène se fait d'une manière indirecte à partir des sucres *via* l'hydrogénase; et nécessite au préalable une étape d'inhibition du transfert d'électrons par élimination de l'oxygène (**H. Masukawa et al., 2002**).

Depuis 25 ans, Les recherches portées sur l'application du processus de production du bio-hydrogène dans des procédés pratiques. Cependant, ce processus apparaît particulièrement approprié à des échelles relativement petites, aux systèmes décentralisés, à l'intégration avec des activités agricoles et industrielles ou avec des installations de traitement des déchets désigné à compenser les demandes énergétique futures (**S.M. Kotay et al., 2008**).

Selon les revues et les données publiées, il n'y a pratiquement pas de procédés de bio-production d'hydrogène à grande échelle (**J.R. Benemann, 1998**). Cependant, les systèmes partiellement illuminés avec une réaction fermentative obscure comme étape initiale; sont très prometteur dans le cadre d'une application industrielle (**D. Mark, 2008**).

### **III.2. Historique**

Hans Gaffron (**1939**) a obtenu l'hydrogène fermentatif et photochimique à partir d'algues lorsqu'il travaillait à l'université de Chicago en 1939. Gaffron et Rubin (**1942**) ont été les premiers à reporter que *Scenedesmus*, une micro-algue verte, donne l'hydrogène moléculaire sous des conditions d'éclairage après maintien dans l'obscurité en anaérobiose (**A. Demirbas, 2009**).

La photo-production d'hydrogène à partir de la décomposition de l'eau utilisant l'énergie en provenance de la lumière solaire a constitué le sujet de plusieurs recherches appliquées depuis les années 1970 (**J.R. Benemann, 2000**). En effet, Fujishima et Honda sont les premiers à pouvoir générer l'hydrogène et l'oxygène à partir d'une cellule photo-électrochimique (PEC) (**J.R. Bolton, 1996**). En 1973 Benemann et ses collaborateurs étudièrent l'évolution de l'hydrogène à partir de l'eau en utilisant l'hydrogénase de *Clostridium kluyveri*. D'autres chercheurs, à l'instar de (**R. Nandi, 1998**) ont travaillé sur la production d'hydrogène par les bactéries anaérobiques. En 2001, des manipulations du processus photosynthétique des épinards ont été conduites afin de produire l'hydrogène, mais ce moyen n'est faisable qu'à l'échelle de laboratoire. La fermentation obscure pour la production du bio-hydrogène à partir de déchets, fournit une approche plausible, et peut entrer en

compétition avec la production d'hydrogène à partir des ressources fossiles. Cependant, la plupart des recherches munies sur la production du biohydrogène à partir des déchets organiques durant les deux dernières décennies ont été concentrées sur l'usage des bactéries photosynthétiques (**K. Sasikala et al, 1993**).

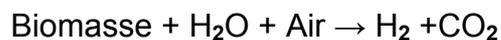
### **III.3. Mécanismes de production du bio-hydrogène**

#### ***III.3.1. Production du bio-hydrogène via les procédés thermochimiques***

##### ***(Pyrolyse)***

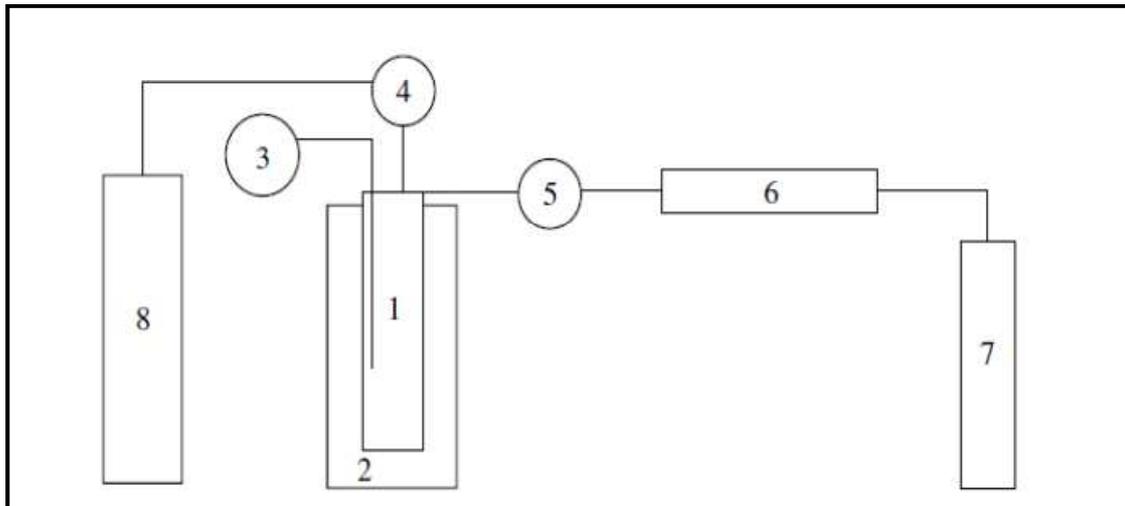
L'hydrogène peut être produit à partir des ressources bio-renouvelables via les procédés de conversion thermochimique telle que la pyrolyse. Cette dernière est une technique reposant sur une stratégie de coproduction avec utilisation de la biomasse comme matière première afin de réduire le coût de l'hydrogène résultant (**D. Wang et al., 1998**).

Contrairement à la combustion, le procédé thermochimique de pyrolyse peut être défini comme étant la décomposition thermique de la biomasse telle que la paille, les noyaux d'olives, les écorces de noix ainsi que les déchets industriels (liqueur noire des papeteries,...) en un carburant plus utile (**K. Salmenoja, 1993**). Durant ce procédé la biomasse est typiquement chauffée à [675- 975 K] sous des conditions anaérobiques ou partiellement brûlée sous des conditions de limitation en oxygène pour produire un mélange gazeux riche en hydrocarbures, une huile liquide et/ou un résidu solide riche en carbone (**D. Mohan et al., 2006**). La réaction de pyrolyse se résume d'une manière générale à ce qui suit :



La pyrolyse est plus favorable à la production des carburants liquides de haute qualité pouvant être employés directement ou après raffinage comme carburants de moteur (source primaire d'énergie) et dans l'industrie chimique d'adhésifs et d'autres produits chimiques (**D. Mohan et al., 2006**). En général, les rendements d'hydrogène à partir de la pyrolyse de biomasse sont proportionnels à la température utilisée au

cours de la réaction de conversion (**A. Demirbas, 2001**). La figure III1 représente un diagramme simplifié du procédé de pyrolyse de biomasse.



1. Tube en acier inoxydable, 2. Chauffage électrique, 3. Moniteur de contrôle de température, 4. Moniteur de contrôle de pression d'azote, 5. Vanne de sortie du produit, 6. Condenseur, 7. Récipient collecteur de produits huileux, 8. Bouteille d'azote.

**Figure III.1. Diagramme simplifié du procédé de pyrolyse de biomasse (A. Demirbas, 2009).**

### **III.3.2. Production du bio-hydrogène via les processus biologiques**

Les méthodes biologiques de production d'hydrogène sont généralement basées sur la bio-photolyse de l'eau par les algues et les cyanobactéries, la photo-décomposition des matières organiques par les bactéries photosynthétiques, la production fermentative de l'hydrogène et les systèmes hybrides utilisant les bactéries photosynthétiques et fermentatives. Cependant, les voies majeures de la production microbienne d'hydrogène sont conduites par le métabolisme du pyruvate formé au cours du catabolisme de différents substrats organiques (**A. Demirbas, 2009**).

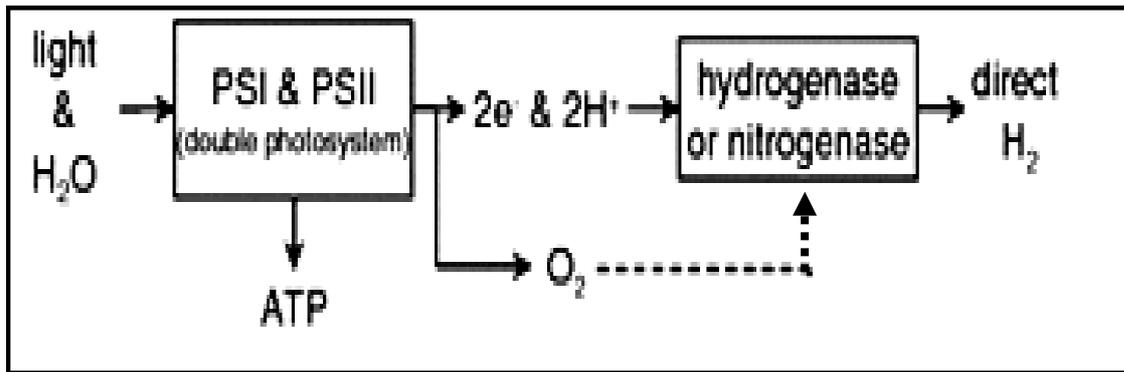
### ***a/ La bio-photolyse chez les microorganismes photo-autotrophes***

Bien évidemment, les rayons solaires représentent la ressource énergétique renouvelable la plus abondante disponible avec 178,000 TW réchauffant la terre chaque année (**J. Rupprecht, 2007**). Cette ressource largement disponible a incité à de nombreuses études portant sur la production photobiologique d'hydrogène.

Beaucoup de microorganismes dits photosynthétiques ont développé la capacité de capter l'énergie solaire pour leur croissance et sont pour plusieurs types d'entre eux potentiellement utiles pour la bio-production d'hydrogène. Les microorganismes photo-autotrophes produisent l'hydrogène par deux mécanismes distincts: la biophotolyse directe et indirecte (**T. Happe, 2002**).

#### ***a.1/ La bio-photolyse directe chez les micro-algues et les cyanobactéries***

Comme les plantes supérieures les algues vertes et les cyanobactéries dépendent de la photosynthèse comme un point de départ pour toute production ultérieure d'hydrogène. La conversion de l'énergie solaire commence par le captage des photons lumineux par des antennes pigmentaires comportant des pigments photosynthétiques (chlorophylles, caroténoïdes et phycobilisomes) (**R.C. Prince, 2005**) qui par leur grand pouvoir de récolte de lumière donnent à ces microorganismes l'avantage de survivre même sous des conditions de faible luminosité (**B. Hankamer, 2007**). Ces antennes font partie des systèmes complexes dits photosystèmes, situés dans les thylakoïdes des algues ou bien dans la membrane plasmique des cyanobactéries (**R.C. Prince, 2005**). Ils sont excités par les photons capturés tout en scindant les molécules d'eau et en transférant les électrons résultants vers les protéines de la chaîne de transport d'électrons (**Figure III.2**).



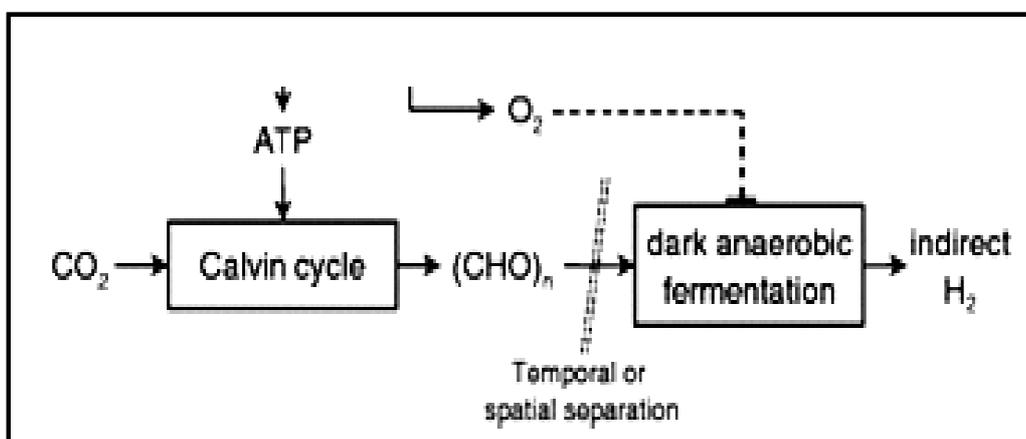
**Figure III.2. Méthodes de production de  $H_2$  par bio-photolyse directe chez les micro-algues (T. Happe, 2002).**

La production d'hydrogène par la photolyse directe (photosynthèse aérobie) chez les micro-algues et les cyanobactéries se fait par le biais de leur deux photosystèmes: photosystèmes I (PSI) et photosystèmes II (PSII) qui produisent l'hydrogène. Le PSI scinde la molécule d'eau en électrons et en protons tout en réduisant la ferrédoxine pour la génération du gradient protonique pour produire l'ATP (Miyake et al., 1999; Benemann, 2000). La réaction de génération d'hydrogène requiert des enzymes spécifiques qui diffèrent selon les microorganismes (Levin et al., 2004). Une de ces enzymes est la [FeFe]-hydrogénase bidirectionnelle trouvée chez les algues vertes, qui utilise les électrons à partir de la ferrédoxine réduite par le PSI, et les combine avec les protons disponibles dans le milieu pour produire le gaz d'hydrogène (D.B. Levin, 2004). Les cyanobactéries peuvent également effectuer cette réaction à l'aide de leurs nitrogénases en coopération avec les [Ni-Fe]-hydrogénases de prise de faible activité (M.L. Ghirardi, 2007).

Cependant, il a été clairement démontré que ce processus est plutôt faible, fragile et plein de difficultés. En effet, c'est une réaction de très courte durée et les taux de production d'hydrogène sont très faibles. Donc le processus de photolyse directe est limité en raison de l'inhibition de l'hydrogénase et de la nitrogénase par l'accumulation de l'oxygène généré par le PSII, ainsi que par une haute pression partielle d'hydrogène (J. R. Benemann, 2000 ; Levin et al. 2004 ; J. Rupprecht, 2006).

## a.2 / La bio-photolyse indirecte

La bio-photolyse indirecte permet de contourner les problèmes de la bio-photolyse directe par la séparation temporelle ou spatiale de la photosynthèse et l'évolution du gaz d'hydrogène (**Hallenbeck, 2002; Prince, 2005**). Au cours de cette voie, la première étape nécessite la croissance des microorganismes photosynthétiques. Ainsi, le  $\text{CO}_2$  est fixé *via* le cycle de Calvin pour la synthèse des sucres simples, qui s'accumulent ensuite sous forme de polysaccharides ou d'amidon chez les microalgues ou bien sous forme de glycogène chez les cyanobactéries. On obtient donc une biomasse très riche en réserves glucidiques qui seront ensuite utilisés dans une deuxième étape pour production fermentative d'hydrogène (**Prince, 2005; Levin, 2004; Zaborsky, 1998**).



**Figure III.3. Méthodes de production de  $\text{H}_2$  par bio-photolyse indirecte chez les micro-algues (T. Happe, 2002).**

En effet, la fermentation à l'obscurité commence par une étape glycolytique initiale pour la génération d'ATP, le NADH et le pyruvate. Ensuite trois enzymes entrent en compétition pour le pyruvate: ferrédoxine oxydoréductase (PFOR), pyruvate formate lyase (PFL) et le lactate déshydrogénase fermentative (LDH) (**Sode et al., 2001; Chen et al., 2006**). L'oxydation du pyruvate requiert la réduction de la ferrédoxine, qui est ensuite régénérée par l'enzyme productrice d'hydrogène tout en produisant le gaz d'hydrogène (**A. Tsygankov 2007a, b**). Les rendements d'hydrogène dépendent du devenir de pyruvate qui diffèrent selon les espèces en

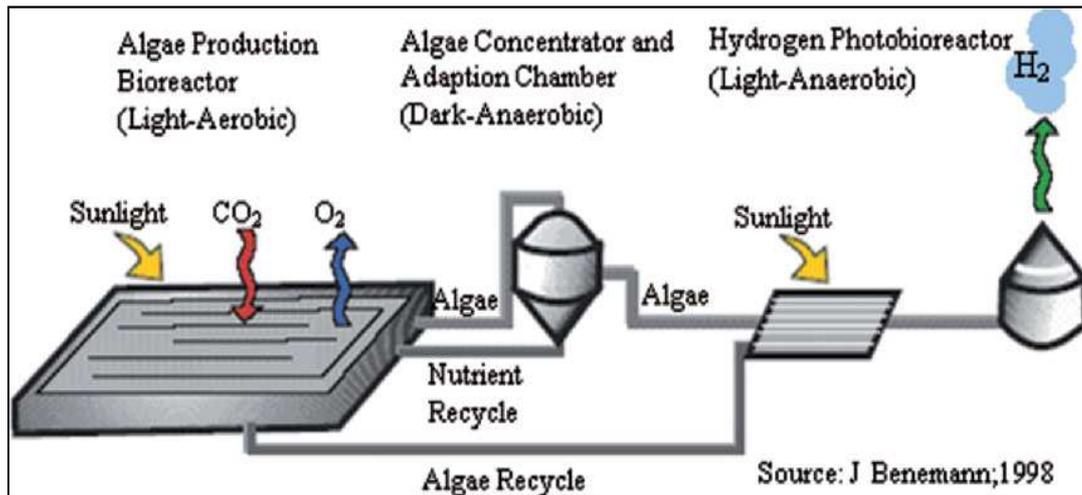
raison des activités variables de ces trois enzymes, dont une ou plus peuvent être présentes (**Sode et al., 2001; Chen et al., 2006**).

Certains microorganismes ont la capacité d'utiliser leurs réserves glucidiques sous des conditions d'anaérobiose lorsque la phosphorylation oxydative mitochondriale est largement inhibée (**O. Kruse, 2005**). Cette voie métabolique alternative produit l'ATP en réorientant l'énergie stockée dans les sucres à une [FeFe]-hydrogénase chloroplastique dans le cas des algues vertes (**J. Rupprecht, 2006**) ou à une [NiFe]-Hydrogénases bidirectionnelle chez les cyanobactéries afin d'achever ce processus bi-phasique (**R.C. Prince, 2005**). La ferrédoxine réduite est utilisée pour délivrer directement les électrons à partir du catabolisme des sucres pour activer l'enzyme productrice d'hydrogène (**M.C. Posewitz, 2004**).

Le mécanisme de production d'hydrogène par photolyse indirecte chez les cyanobactéries diffère selon le type de celles-ci. En effet, chez les cyanobactéries non-fixatrices d'azotes (*Synechococcus* spp, *Spirulina* spp), la production d'hydrogène et celle de l'oxygène sont séparées temporellement car elles ne produisent l'hydrogène qu'en anaérobiose par fermentation obscure des réserves glucidiques photosynthétiques (**Carrieri et al., 2008**). Lors de la transition à l'obscurité, la génération de l'oxygène par les photosystèmes cesse et l'oxygène résiduel est consommé par la respiration pour permettre ainsi la production de l'hydrogène (**A. Tsygankov 2007a, b**).

Cependant chez les cyanobactéries fixatrices d'azote (*Nostoc*, *Anabaena* spp), la production d'hydrogène et celle de l'oxygène sont séparées spatialement par cloisonnement. En effet, le glycogène est accumulé dans les akinètes végétatives et il est ensuite fermenté dans les hétérocystes anaérobiques afin de produire l'hydrogène (**A. Tsygankov 2007a, b**).

Dans certains exemples, les algues et les cyanobactéries synthétisent initialement les sucres qui seront ensuite fermentés par les mêmes organismes, pendant que d'autres systèmes utilisent les glucides comme matière première (sous forme de déchets, de solutions artificielles ou de biomasse algale). La figure III.4 représente le schéma d'un système bi-phasique de production photobiologique par voie indirecte.



**Figure III.4. Schéma d'un système de production photobiologique indirecte (J.R. Benemann, 1998)**

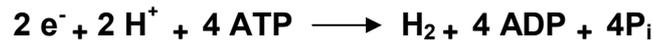
Dans ce système les algues sont cultivées dans un grand bassin ouvert afin de produire une grande quantité de biomasse riche en glucides servant de substrat pour la production d'hydrogène dans des photobioréacteurs tubulaires (J.W. Sheffield, 2007).

***b/ La photo-décomposition des matières organiques par les microorganismes photo-hétérotrophes***

Les bactéries anaérobiques photosynthétiques fournissent une intéressante méthode de production du bio-hydrogène via une variété de ressources organiques (A. Demirbas, 2009). Les meilleures espèces étudiées sont les bactéries pourpres non-sulfureuses (PNS) appartenant au genre *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* et *Rhodospirillum* (Vignais et al. 2001). Ce sont des bactéries photosynthétiques anaérobiques qui ne produisent pas du H<sub>2</sub>S (un catalyseur toxique puissant). Elles sont donc adéquates pour l'alimentation des piles à combustible PEM sans avoir recours à l'étape de purification (Nakada et al., 1995). Leur taux de production d'hydrogène est supérieur à 90%. Ce qui leur confère un potentiel significatif pour l'application industrielle sous forme de cultures mixtes pour des périodes étendues (Ko et Noike 2002; Fang et al., 2005; Ying Li et al., 2008). Cette bonne propriété est attribuée à leur PSI non générateur d'oxygène inhibiteur de la production d'hydrogène (Franchi et al., 2004; Shi et Yu, 2006). L'inconvénient le plus important

avec les PNS est l'incompatibilité de l'activité de nitrogénase et la présence du  $\text{NH}_4^+$  (Zhu et al., 2001).

Les PNS sont capables de produire l'hydrogène sous des conditions photo-hétérotrophes anaérobique: en présence de lumière, d'un donneur d'électrons organiques et en absence d'azote suivant la réaction décrite par Koku et al. 2002:



Dans ce sens la réaction sert à dissiper l'excès d'ATP lorsque la croissance est limitée par l'absence d'azote (H. Koku et al., 2002). Dans ce processus de fermentation différents déchets peuvent être utilisés comme substrats, l'effluent liquide hautement riche en carbone est l'un des biomasses les plus abondamment disponibles (K. Nath et al., 2003). Les boues de digestion et d'acido-genèse des déchets municipaux solides ont le potentiel de production de  $\text{H}_2$  le plus élevé. (A. Demirbas, 2009).

### ***c/Production d'hydrogène par voie fermentaire obscure par les microorganismes chimiotrophes***

Les bactéries fermentatives représentent un moyen prometteur de production d'hydrogène par le processus de fermentation obscure en utilisant les substances organiques riches en glucides comme matière première (Bartelings et al., 2005; Adams, 1990):



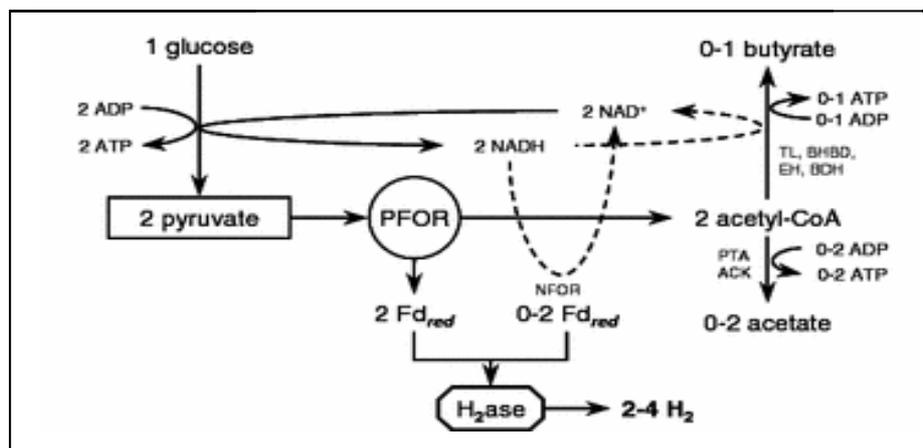
Les glucides simples et complexes sont disponibles en grandes quantités dans les résidus agricoles et les déchets ménagés (Haq et al., 2006; Levin et al., 2007).

La fermentation génère l'énergie exclusivement *via* l'étape de phosphorylation. Les rendements d'ATP sont faibles par comparaison à la respiration. La formation des molécules organiques constitue une partie intégrale du processus fermentatif et l'accumulation de certaines d'entre elles (par exemple: acétate) peut inhiber la production d'hydrogène (S. Van Ginkel, 2005).

Les rendements de l'hydrogène fermentaire les plus élevés ont été achevés en utilisant les clostridies, les entérobactéries et les hyper-thermophiles (**Hallenbeck 2005; Davila-Vazquez et al., 2008a**).

### c.1/ Cultures axéniques

Les clostridies utilisent la voie du NADH pour produire l'hydrogène. Dans un premier temps la PFOR clive le pyruvate en acétyl-CoA et CO<sub>2</sub> et catalyse le transfert des électrons à la ferrédoxine couplée à l'hydrogénase bidirectionnelle qui produit l'hydrogène. Dans cette situation la génération d'hydrogène est achevée par une seule réaction réversible (**O. Mizuno et al., 2000**). La figure III.5 illustre les différentes voies cataboliques du pyruvate par la fermentation anaérobie chez *Clostridium butyricum* (**O. Mizuno et al., 2000**).



**Figure III.5. Fermentation anaérobie chez *Clostridium butyricum* (D. Mark, 2008).**

Divers *Clostridium spp* ont été étudiés pour la production du biohydrogène (**C. Collet et al, 2004**). *C. butyricum* est probablement l'espèce la meilleure connue (**H. Yokoi et al, 2001**).

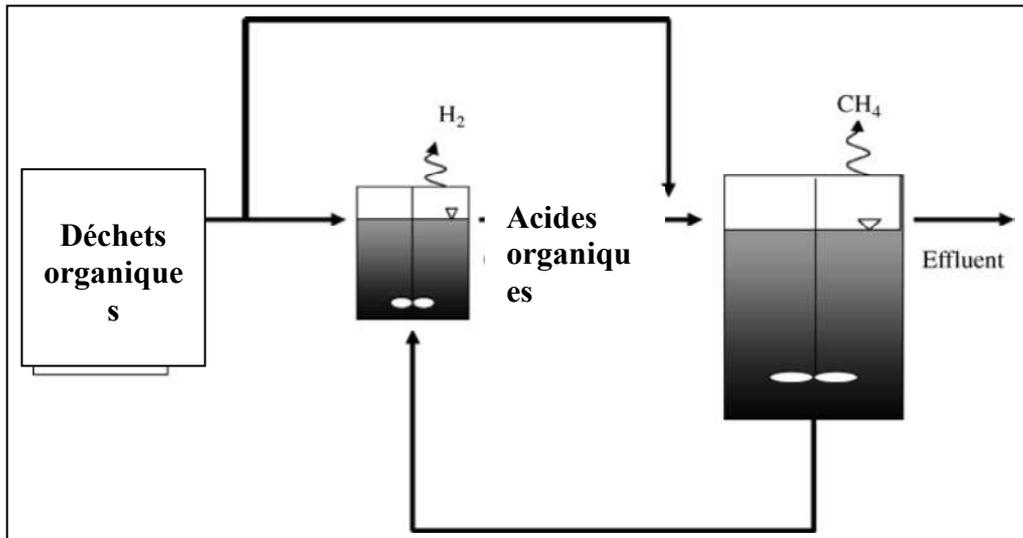
Contrairement aux entérobactéries, les clostridies ont démontré une propriété avantageuse leur permettant d'utiliser des sucres complexes tels que la cellulose et l'amidon (**S.A. Van Ooteghem et al, 2004**).

### ***c.2/ Cultures mixtes***

L'utilisation des cultures mixtes afin de produire l'hydrogène constitue une technologie commercialement réalisable (**G. Kyazze et al., 2007**). Les inocula pour la production d'hydrogène sont obtenus à partir du sol, le compost ou la microflore des boues des digestions anaérobiques (**F.R. Hawkes et al., 2002, 2007**). La population microbienne est souvent manipulée par application d'une présélection de l'inoculum (**I. Valdez-Vazquez et al., 2005**). Les cultures mixtes ont une tendance vers de faibles taux de production d'hydrogène car les microorganismes non producteurs d'hydrogène comme les méthanogènes et les sulfite-réducteurs consomment une partie du substrat et captent l'hydrogène afin de l'utiliser comme donneur d'électrons. En plus, le H<sub>2</sub>S constitue un poison et un catalyseur puissant et devrait être éliminé si le bio-hydrogène est destiné à l'utilisation dans une pile à combustible (**F.R. Hawkes et al., 2007**). La technologie de production du bio-hydrogène à partir des cultures mixtes peut améliorer la viabilité économique de plusieurs procédés alimentés par l'hydrogène (**M.W.W. Adams, 1990**).

### ***d/ Système hybrides de production d'hydrogène en continu***

Les systèmes à un seul niveau n'ont pas démontré une grande productivité. En outre, dans le système de bioréacteur en mode continu, la production d'hydrogène subit un déclin au dernier stade. Donc on suppose que les microorganismes pourraient subir un phénomène de "dégénération" au cours duquel la capacité de production d'hydrogène est perdue. De ce fait, l'inoculation de cultures fraîches pourrait fournir un moyen faisable pour le maintien de la production d'hydrogène. Au sein de ces systèmes dits hybrides l'une des phases est désignée pour la génération d'hydrogène, tandis que l'autre est destinée à la production de cultures fraîches pour la perpétuité d'alimentation de la première phase (**S. Sung, 2004**). Les systèmes doubles ont tous en commun la conversion des glucides en acides organiques dans un premier temps sous des conditions mésophiles ou thermophiles. Cette étape est suivie d'une conversion des produits de fermentation en hydrogène Figure III.6.



**Figure III.6. Diagramme schématique d'un de réacteur à deux phases (A. Demirbas, 2009).**

### III.4. Enzymes productrices d'hydrogène

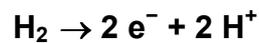
Chaque méthode de production du biohydrogène dépend du type d'enzymes responsables et présentes dans le microorganisme en question. Ces enzymes catalysent une réduction très simple :



Afin de performer cette réaction, ces enzymes possèdent un cœur métallique complexe constituant leur site actif et leurs protéines doivent subir une maturation spécifique (P.C. Hallenbeck, 2002). Les trois principales enzymes génératrices d'hydrogène sont: les nitrogénases, les [NiFe]-hydrogénase, et les [FeFe]-hydrogénase (P.M. Vignais, 2001). Ces dernières sont considérées comme étant les enzymes les plus efficaces pour produire de l'hydrogène. En effet, elles possèdent une activité 1000 fois supérieure à celle des nitrogénases et environ 10 à 100 fois meilleure que la [NiFe]-hydrogénase (D.S. Horner, 2002). Cependant, toutes ces enzymes sont généralement sensibles à l'oxygène et doivent être séparées soit spatialement ou temporellement de celui-ci afin de pouvoir générer l'hydrogène à des taux optimaux (D. Das, 2006). Pendant que les Nitrogénases sont restreintes aux

procaryotes, les Hydrogénases peuvent également exister dans les cellules eucaryotes, mais pas chez les plantes supérieures. La distribution de ces deux enzymes chez les cyanobactéries n'est pas un critère taxonomique (**W.E. Newton, 2007**).

Chez certains microorganismes, la Nitrogénase et l'Hydrogénase coexistent et représentent deux complexes enzymatiques fonctionnellement liés. En effet, la Nitrogénase catalyse la réaction de formation d'hydrogène, alors que l'Hydrogénase de prise "*Uptake hydrogenase*" l'oxyde comme suit (**B. Hermann et al., 2011**):



La formation d'hydrogène gouvernée par la nitrogénase est irréversible (**P. Hillmer et al., 1977b**). Ce qui constitue une propriété avantageuse par rapport à l'hydrogénase bidirectionnelle qui nécessite de faibles pressions partielles d'hydrogène pour opérer efficacement (**P. Tamagnini, 2007**).

#### **III.4.1. L'Hydrogénase**

Les hydrogénases ont été mises en évidence dans une grande variété de bactéries: sulfito-réductrices, photosynthétiques, entériques, méthanogènes et chez des archaebactéries hyper-thermophiles (**B. Hermann et al., 2011**). Elles sont également présentes dans la plupart des organismes fixateurs d'azote et non-fixateurs d'azote ne possédant pas le gène codant pour la Nitrogénase (**Newton 2007**). Selon le type d'Hydrogénase présent chez ces bactéries, elles seront capables soit de produire de l'hydrogène, soit de l'oxyder, soit d'accomplir les deux fonctions. On distingue donc trois groupes: Hydrogénases productrices d'hydrogène, Hydrogénase catalysant l'oxydation de l'hydrogène dites consommatrices d'hydrogène (*uptake hydrogenase*) ou bien une autre variété capable d'effectuer les deux fonctions en même temps présentes chez les cyanobactéries filamenteuses. Elle est dite Hydrogénase réversible ou bidirectionnelle (**B. Hermann et al., 2011**)

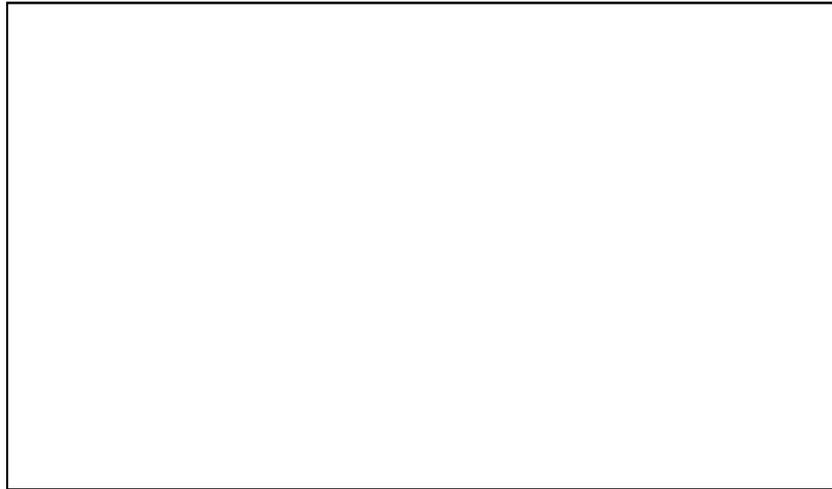
**Tableau III.1.**

**Tableau III.1. Différents types d'Hydrogénases (A. Saidi, 2007; B. Hermann et al., 2011).**

Classe	Dénomination	Fonction physiologique	caractéristique	Microorganismes
I	[NiFe]Hydrogénase	Consommation d'hydrogène	membranaire	E. Coli
II	[NiFe(Se)]Hydrogénase	Consommation d'hydrogène	Périplasmique et membranaire	bactéries sulfato-réductrices
III	[Fe] Hydrogénase	Consommation d'hydrogène	Périplasmique	Bactéries anaérobies strictes
IV	[NiFe(Se)]Hydrogénase	Réduction du NAD <sup>+</sup>	Soluble	Méthanogènes et <i>Alcaligenes eutrophus</i>
V	Hydrogénase 3	Production d'hydrogène	Très labile	E. Coli
VI	[NiFe]Hydrogénase	Production et consommation d'hydrogène	Bidirectionnelle et soluble	Cyanobactéries

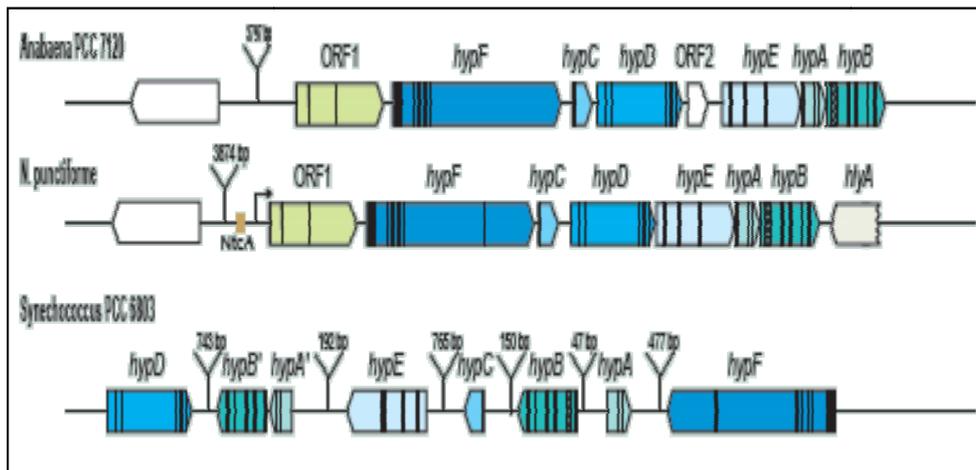
### **La [NiFe] Hydrogénase bidirectionnelle des cyanobactéries**

L'hydrogénase bidirectionnelle est une enzyme soluble ou peu attachée à la membrane, mais elle n'est pas universellement présente chez toutes les cyanobactéries. Le cœur catalytique des [NiFe]-hydrogénase est un hétéro-dimère protéique. La plus grande sous-unité contient le site actif Ni-Fe et la petite sous-unité contient le complexe Fe-S (**G. Vardar-Schara, 2007**). Les [NiFe]-hydrogénases produisent non seulement l'hydrogène 15 fois plus que les nitrogénases indépendamment d'ATP (**P.C. Hallenbeck, 2002**), mais elles peuvent également jouer le rôle d'hydrogénases de prise en utilisant les électrons à partir de l'hydrogène pour réduire le NAD<sup>+</sup> (**Laurinabichene T.V., 2001; M. Hakobyan, 2005**).



**Figure III.7. Structure et fonction de l'Hydrogénase bidirectionnelle des cyanobactéries (O. Ellenor, 2005).**

L'hydrogénase bidirectionnelle est constituée d'une partie diaphorèse (HoxF, HoxU et HoxE) et d'une partie hydrogénase (HoxH et HoxY). Les gènes *hox* sont hautement homologues. Les gènes accessoires, *hyp*, sont nécessaires pour obtenir une hydrogénase fonctionnelle (O. Ellenor, 2005).



**Figure III.8. Organisation des gènes *hyp* des l'hydrogénase bidirectionnelle chez quelques cyanobactéries (O. Ellenor, 2005).**

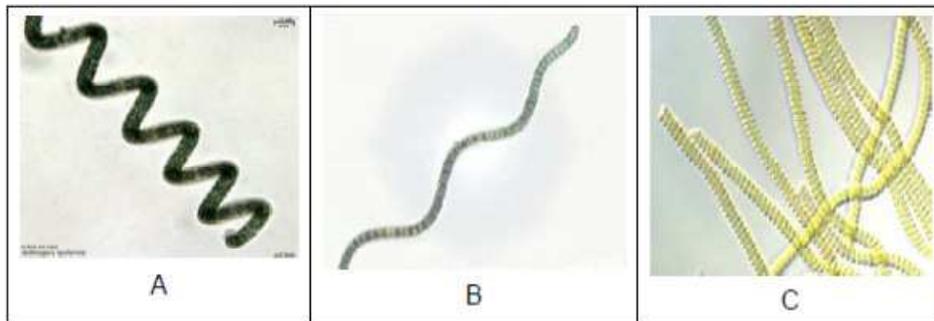
### **III.4.2. La Nitrogénase**

L'activité de la Nitrogénase représente une facette du métabolisme anaérobie des microorganismes fixateurs d'azote. En effet, le complexe prosthétique de cette enzyme et ses photo-pigments est irréversiblement endommagé par l'oxygène (**H. Koku et al., 2002**). Les nitrogénases catalysent la réaction de fixation d'azote en ammoniac. Cette réaction est accompagnée obligatoirement par la réduction des protons ( $H^+$ ) en hydrogène (**P. Tamagnini, 2007**). Elle est ATP-dépendante (**P.C. Hallenbeck, 2002**). La formation de l'ammoniac ( $NH_3$ ) par la Nitrogénase est donc parallèle à la production du gaz d'hydrogène avec une stœchiométrie de 2 :1 selon la réaction suivante :



#### IV. La Spiruline: *Spirulina platensis*

**Définition** : Apparue sur Terre il y a 3,5 milliards d'années, la Spiruline produit le premier oxygène respirable par les organismes (**R. Rakotoarisoa et al., 2011**). Il s'agit d'une cyanophycée microscopique mobile d'une longueur moyenne d'environ 500  $\mu\text{m}$ , bien que dans certains cas lorsque l'agitation des cultures n'est pas suffisante la longueur des trichomes atteint approximativement 1 mm (**O. Ciferri, 1983**). Ses filaments sont composés de cellules cylindriques ayant un diamètre de 10 à 12  $\mu\text{m}$ , non ramifiés et enroulés en spirale. L'hélice a généralement en 6 ou 7 spires avec un diamètre de 30-70  $\mu\text{m}$  (**L. Tomaselli, 1997**). Cette forme hélicoïdale lui donnant l'allure d'un minuscule ressort lui a valu son appellation. Cependant les Spirulines présentent différentes formes : on trouve des formes spiralées classiques (A), ondulées (B) et parfois droites (C). Cette particularité est en relation directe avec les conditions écologiques rencontrées dans leur habitat (**L. Charpy, 2008**).



**Figure IV.1. Différentes formes prise par la Spiruline (L. Charpy, 2008)**

Ce microorganisme se reproduit par la division cellulaire grâce au phénomène de scission binaire vit de photosynthèse comme les plantes supérieures et prospère naturellement dans les lacs salés et alcalins des régions chaudes du globe (**J. P. Jourdon, 2006**). Le système pigmentaire de la Spiruline est constitué de chlorophylle *a*, les phycobilines rouge (phycoérythrine) et bleu (phycocyanine) et de caroténoïdes ( $\beta$ -carotène, cryptoxanthine). Ces pigments sont responsables de la couleur caractéristique de ce microorganisme (**L. Charpy, 2008**). Les teneurs en pigments de *Spirulina platensis* apparaissent dans le tableau annexe II. De point de vue scientifique, la manipulation facile de cette souche sous des conditions

contrôlées et la reproductibilité expérimentale a fait d'elle la préférée pour les études biochimiques, photosynthétiques ainsi que ceux menées sur la physiologie végétative (**R. Devlin, 1975**).

## 1. Historique

En 1940, le physiologiste français **Dangeard** a noté que le peuple de la tribu de Kanembu vivant pas loin de la rive du lac de Chad; consommait le *dihé* qui est un gâteau d'algues bleues-vertes collecté à partir des bords de petits bassins entourant le lac, ensuite séché et durcie sous le soleil. Dangeard a étudié un échantillon de ce gâteau et il a conclu qu'il s'agit d'une purée de phytoplancton existant dans un large nombre de vallées des lacs africains (**O. Ciferri, 1983**).

Au milieu des années 1960, une botaniste belge **Jean Léonard** en mission d'expédition parcourait les marchés indigènes à la recherche des produits végétaux. Sa curiosité fût frappée par les galettes vertes bleuâtres. La substance fût identifiée et analysée: la spiruline, trésor de protéines, de vitamines, de minéraux, d'enzymes, et de pigments (**J. Leonard, 1966**). **Léonard** ses collègues ont comparé la substance qu'ils ont observée avec celles étudiées par **Dangeard**. C'est ainsi que les analyses chimiques de la spiruline ont commencé (**Ciferri, 1983; Richmond, 1992**). Cependant, la souche *S. platensis* fut décrite pour la première fois par **Wittrock** en 1844 (**R. Rakotoarisoa, 2011**) puis par **Lavoslav Geitler** en 1925 selon **Castenholz, 1989**.

A partir de 1970, les études nutritionnelles et médicinales portant sur la Spiruline ont proliféré (**G. Chamorro et al., 1996**) et depuis, la Spiruline est commercialisée et consommée dans différents points du monde : Allemagne, Brésil (**Lacaz et Nascimento, 1990**), Chili, Espagne, France, Canada, Belgique, Egypte, Etat unis, Irlande, Argentine, Philippines, Inde, Afrique, et dans d'autres pays ou l'administration publique, les organismes et associations sanitaires ont approuvé la consommation de la spiruline (**R. Henrikson, 2009**).

## 2. Habitat naturel

La Spiruline se développe préférentiellement dans des eaux chaudes, alcalines et riches en nutriments azotés et phosphorés. Plus communément, elle s'observe

dans les eaux saumâtres ainsi que dans les lacs salins de régions tropicales et semi-tropicales (**R. W. Castenholz et al., 2001**). Son caractère thermophile et ses besoins important en lumière limitent son aire de répartition à une bande intertropicale située environ entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud.

Sa forte plasticité écologique permet de la retrouver à l'état naturel à la fois dans les lacs alcalins en Afrique (Tchad, Ethiopie, Tunisie), en Amérique latine (Mexique, Pérou), en Asie du Sud (Inde, Sri Lanka, Thaïlande). Ce microorganisme est dit ubiquiste. Il est cependant beaucoup moins abondant en Amérique du Nord et en Europe (**L. Charpy, 2008**). Le tableau annexe I illustre la répartition géographique de la Spiruline dans les différents pays et régions du globe.

### 3. Taxonomie

La Spiruline, longtemps considérée comme une algue, est en réalité une cyanobactérie (**R. Rakotoarisoa et al., 2011**). La position systématique des cyanobactéries a constitué un sujet de discussion, mais en 1969 après la distinction des eucaryotes par la particularité de présence d'enveloppes délimitant leurs organites cellulaires; **Stanier** et **Van Neil** incorporèrent la Spiruline dans le royaume des procaryotes et proposèrent de les appeler « cyanobactéries » (**G. Guglielmi et al., 1993**). Les noms de cyanobactéries et d'algue bleue-vertes (*Cyanophyceae*) sont considérés comme étant des termes compatibles (**Castenholz et Waterbury, 1989**).

Selon la classification du manuel de Bergey de Détermination Bactériologique, la Spiruline appartient aux bactéries aérobies photosynthétiques (**Castenholz et Waterbury, 1989; Whitton, 1992**), qui sont reliées phylogénétiquement par la séquence de la sous-unité 16S de leur ARN<sub>r</sub>, dont la fonction et celle de la sous-unité 5S constituent le critère de classification de ces microorganismes procaryotes parmi le groupe des eubactéries.

**Gomont** (1892) attribuât la forme aseptale au genre *Spirulina* et la forme septale au genre *Arthrospira*. Ces deux genres se différencient morphologiquement par le type d'hélice, la distribution des pores sur la paroi cellulaire, la visibilité des septums sous microscopes photoniques ainsi que le diamètre et le type de fragmentation des trichomes (**Guglielmi et al., 1993; Vonshak et Tomaselli, 2000**). Cette classification

a été confirmée en 1989 (Castenholz et Waterbury, 1989) et elle est actuellement acceptée (Vonshak et Tomaselli, 2000).

**Tableau IV.1. Classification de *Spirulina platensis*: (Charpy, 2008 et Fox, 1999)**

règne	<b><i>Bacteria</i></b>
classe	<u><i>Cyanobacteria</i></u>
ordre	<i>Oscillatoriales</i>
famille	<i>Oscillatoriaceae</i>
genre	<i>Spirulina</i>
espèce	<i>platensis</i>

*S. maxima* et *S. platensis* représentent les espèces les plus importantes de la Spiruline. Elles sont différentes sur le plan taxonomique par la structure de leurs filaments, leurs vacuoles à gaz (Tomaselli, 1997) et la présence d'irrégularités au niveau de la capsule autour du filament de *S. platensis* (A. Belay, 1997).

#### 4. Ultra-structure

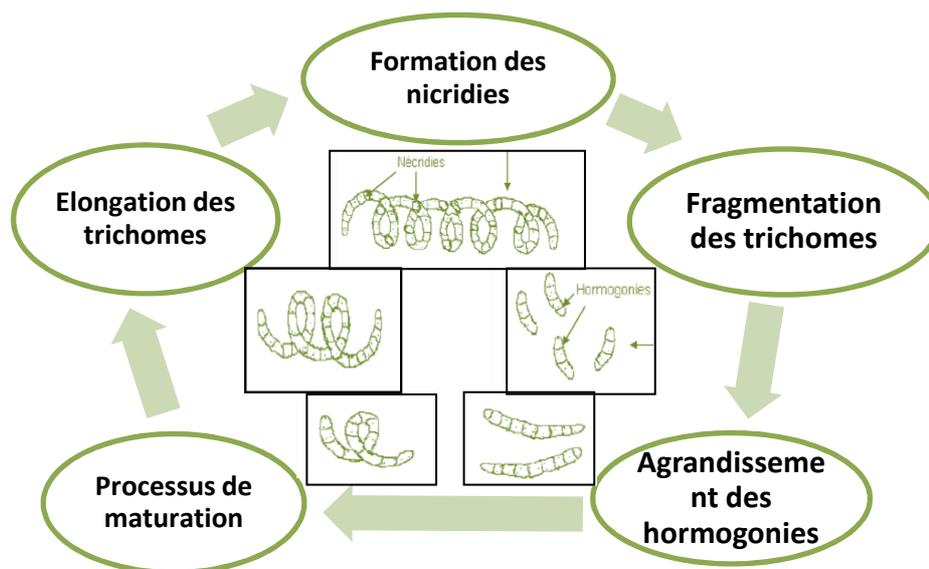
L'observation de *Spirulina* sous microscope électronique à transmission (MET) a permis de révéler son ultra-organisation, sa capsule à structure fibrillaire couvrant et protégeant chaque filament, ses parois cellulaires pluristratifiées, le système lamellaire photosynthétique et thylacoïdale, les ribosomes et les fibrilles d'ADN, etc.

La paroi cellulaire de la Spiruline est formée de quatre couches. Partant de l'intérieur, elles sont dites: LI, LII, LIII et LIV. Toutes ces couches sont fines sauf la LII qui est constituée de peptidoglycane qui donne à cette paroi sa rigidité (O. Ciferri, 1983). Chez ces microorganismes la chlorophylle a, les carotènes et les phycobilisomes sont localisées dans les thylakoïdes ou lamelles photosynthétiques. L'espace inter- thylacoïdales est limité à cause de la présence des protéines de vacuoles à gaz électroniquement transparentes avec une forme cylindrique. C'est grâce à ce système que la Spiruline possède sa capacité de flottaison (O. Ciferri, 1983).

Les ribosomes et les fibrilles d'AND sont généralement localisés au centre (**W. Balloni, et al., 1980**). La Spiruline contient plusieurs caractéristiques périphériques très importantes associées au thylakoïdes: les granules peptidiques de réserve qui sont, les corps poly-hydrique ou carboxysomes contenant principalement l'enzyme ribulose 1,5-diphosphate carboxylase permettant la fixation du CO<sub>2</sub>, les granules polyglucanique contenant du glycogène. Les granules lipidiques constituées de poly-β-hydroxybutyrate (PHB) qui joue le rôle d'une source d'énergie et de carbone (**Balloni et al., 1980; Ciferri, 1983**) (**M. Vincenzini et al., 1990**).

## 5. Le cycle de vie de la Spiruline

L'aspect fondamental de la biologie de Spiruline est son cycle de vie, en raison de son implication dans la taxonomie physiologique et de la culture de cette souche (**Ciferri, 1983; Richmond, 1984**).



**Figure IV.2. Cycle biologique de la Spiruline (W. Balloni et al. 1980).**

Les trichomes matures se divisent en plusieurs petits fragments dits hormogonies, à partir de cellules spéciales appelées nécries. Ces dernières se différencient des autres par leur aspect biconcave et dans lesquelles le matériel cellulaire est réabsorbé afin de permettre la fragmentation. Les hormogonies croissent en longueur par division binaire et prennent la forme hélicoïdale typique. En

conditions expérimentales, le temps de génération maximale de la Spiruline est de l'ordre de 7 heures (**Zarrouk 1966; Balloni et al., 1980**).

## **6. Conditions physique et chimiques de croissance**

Pour se développer, la Spiruline a besoin d'éléments simples tels que l'eau, les sels minéraux, le CO<sub>2</sub> et l'oxygène. Elle les puise directement de son milieu tout en utilisant la lumière solaire comme source d'énergie, et ce grâce à son système pigmentaire. Ce mode de synthèse de biomasse est appelé la photo- autotrophie.

La Spiruline croît dans des milieux naturels caractérisés par des eaux saumâtres, chaudes, alcalines ( $8 < \text{pH} < 11,5$ ) et natronées c'est-à-dire fortement concentrées en carbonates et en bicarbonates. En règle générale les phosphates, les carbonates, les nitrates et le fer sont les éléments limitant la production phytoplanctonique dans les milieux aquatiques. En milieu naturel, ces éléments sont apportés naturellement par les bassins versants. Lorsque les conditions sont optimales, les Spirulines peuvent se développer en grande quantité et entrent alors en compétition avec d'autres microorganismes. Heureusement que lors des efflorescences, on assiste à une augmentation de la consommation des carbonates et bicarbonates entraînant une élévation du pH limitant ainsi la croissance des autres microorganismes (**L. Charpy, 2008**).

La Spiruline se développe dans les eaux chaudes (28 à 40°C) et bénéficie d'une intensité lumineuse élevée (**L. Charpy, 2008**). Il est à noter que la température idéale de sa culture est de l'ordre de 37°C. Au-dessus de cette température, c'est trop chaud. En dessous, la vitesse de multiplication baisse drastiquement et tend vers zéro aux alentours de 20°C (**J. P. Jourdon, 2006**).

Le vent joue un rôle important en créant une agitation qui favorise une dispersion homogène de la Spiruline dans le milieu et donc son exposition à la lumière (**L. Charpy, 2008**).

## **7. propriétés nutritionnelles et thérapeutiques de la Spiruline**

C'est d'abord l'impressionnante teneur en protéines de la Spiruline qui a attiré l'attention des chercheurs et des industriels. Par la suite, plusieurs propriétés particulièrement intéressantes sur le plan nutritionnel sont apparues : composition protéique équilibrée, présence de lipides essentiels rares ainsi que de nombreux minéraux et vitamines.

Outre son intérêt nutritionnel, la Spiruline présente des propriétés thérapeutiques. Elle renferme plusieurs molécules ayant fait l'objet d'études pour leurs activités biologiques. Leurs propriétés immunostimulantes et antivirales de la Spiruline présentent notamment un grand intérêt dans la malnutrition, qui affaiblit les défenses immunitaires de l'enfant malnutri (**H. Christophe, 2011**).

### **7.1 Protéines et acides aminés**

La teneur en protéines de la Spiruline est très élevée. Elle représente 60% à 70% de sa matière sèche (**R. D. Fox, 1999**). En plus de la plupart des acides aminés, ce microorganisme renferme les acides aminés essentiels (**A. Briend, 1998**) dont les teneurs les plus élevées sont celles de leucine (10.9%), valine (7,5%) et isoleucine (6.8%). La Spiruline est donc très utile dans la nutrition humaine, grâce à la quantité et la haute qualité de ses protéines (**H. Christophe, 2011**). Le tableau annexe IV représente la composition protéique de *Spirulina platensis* selon différents auteurs.

### **7.2 Lipides et acides gras**

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 à propriétés antioxydantes, incluant des *oméga-3* et des *oméga-6*.

La Spiruline figure parmi les meilleures sources connues d'acide gamma-linolénique qui est un précurseur de médiateurs chimiques des réactions inflammatoires et immunitaires. Sa teneur est d'environ 40% des acide gras totaux (**Ciferri, 1983; Cohen, 1993**) ce qui mérite d'être souligné du fait de sa rareté dans

les aliments courants (**J. Falquet, 2006**). La Spiruline est également riche en sulfolipides qui intéressent les chercheurs pour leur activité protectrice contre les infections virales. Le composant lipidique sulfoquinovosyldiacyl glycérol (SQDG), par exemple, a démontré par expérience *in vitro* sa capacité à inhiber la transcriptase inverse du VIH (**P. Q. Kiet, 2006**).

## **7.5 Glucides et polysaccharides**

Les glucides représentent environ 15% à 25% de la matière sèche de la Spiruline (**J. Falquet, 2006**). Elle est également constituée de polysaccharides spécifiques tels que le *spirulane calcique (Ca-SP)* et le *spirulane sodique (Na-SP)* (**J.B. Lee, 1998**) ainsi que d'*Immulina* (**M. Lobner, 2008**). Ces polysaccharides présentent d'intéressantes propriétés (**J.B. Lee, 2001**):

### *7.5.1 Activité anticoagulante*

Le spirulane calcique agit en activant le cofacteur II de l'héparine, molécule inhibant la thrombine, donc la coagulation (**Y. Hayakawa, 2000, 2003**). Le spirulane sodique aurait aussi des effets anticoagulants (**C. Yamamoto, 2003**).

### *7.5.2 Renforcement du système immunitaire*

Plusieurs expériences attestent que la Spiruline régulerait favorablement le système immunitaire (**A.T. Borchers, 2007**). Elle augmente l'activation des macrophages, l'activité des cellules T et l'activité des cellules NK. Ce processus permet la libération d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), ce qui peut finalement de rendre les virus inactifs. Ces actions se feraient par le biais des polysaccharides (**H. Christophe, 2011**).

### *7.5.3 Activité antivirale*

L'activité antivirale de la Spiruline a été étudiée sur l'inhibition de la pénétration du virus *Herpes simplex* dans les cellules *HeLa* et chez des hamsters (**T. Hayashi, 1993**). Plus tard, les mêmes auteurs ont mis en évidence le rôle de Ca-SP qui

interviendrait en inhibant la pénétration des virus ainsi que leur phase de réplication (**T. Hayashi, 1996**). L'Immulina provoque quant à elle une activation des monocytes 100 à 1000 fois plus élevée que celle produite par des préparations de polysaccharides utilisés habituellement en clinique pour traiter les cancéreux. Un article récent portant sur l'ingestion d'Immulina par 11 patients en bonne santé rapporte un effet immédiat sur les défenses immunitaires (**M. Lobner, 2008**).

## **7.6 Vitamines**

Parmi les vitamines hydrosolubles, on note une teneur très élevée en vitamine B12. Du fait que le besoin journalier en vitamine B12 d'un enfant est de 0,5 à 0,9 µg. Une dose de 10 g de Spiruline couvre de 142% (teneur basse) à 486% (teneur haute) de ses exigences (**L. Charpy, 2008**).

Il est important à souligner, aussi, la richesse de la Spiruline en provitamine A (β-carotène). L'organisme humain convertit ce pigment en vitamine A en quantité nécessaire à ses besoins (**R. Henrikson, 2009**). Une étude récente de **Wang et al. (J. Wang, 2008)** portant sur des adultes, montre que l'ingestion de 4,5 mg de β-carotène provenant de la Spiruline apporte 1 mg de vitamine A (**L. Charpy, 2008**).

## **7.7 Sels minéraux et oligo-éléments**

La Spiruline est naturellement riche en certains minéraux essentiels, particulièrement importants lors de malnutrition (**R.S. Gibson, 2006**). La Spiruline a des teneurs en fer allant jusqu'à 500 mg/kg (**L. Campanella, 1999**). En revanche, elle ne contient généralement que des traces de zinc (21 – 40 µg/g) (**G. Cogne, 2003**). Elle est naturellement riche en magnésium (**Planes, 2002; Briend, 1998**).

Il est nécessaire de mentionner qu'il est possible de jouer sur les intrants de la Spiruline naturelle par modification de son contenu en acides gras ou en certains minéraux (**J. Falquet, 2006**).

## IV. Photobioréacteur

### IV.1. Présentation générale

La culture en milieu isolé de l'extérieur se fait en système clos appelé photobioréacteur (**J. Pruvost, 2011**). Un bioréacteur peut être décrit comme étant un récipient de culture fermé désigné pour la production contrôlée de biomasse. Il se réfère aux systèmes clos isolés du milieu extérieur (**R.N. Singh, 2012**). Puisque la lumière est un paramètre essentiel pour la croissance des cyanobactéries et des bactéries photosynthétiques, tous les réacteurs doivent être transparents. Ils sont, par voie de conséquence appelés photobioréacteurs (PBR) (**Asada, 1999; Akkerman, 2002**).

Tous les photobioréacteurs nécessitent une entrée adéquate de la lumière. Il s'agit souvent de la lumière solaire, mais dans certains PBR d'autres sources lumineuses artificielles sont également utilisées afin de permettre le contrôle de la lumière (**D. Dutta, 2005**). Au sein du PBR, il existe une zone lumineuse près de la surface illuminée et une zone obscure lointaine de cette surface. La zone obscure est due à la l'absorption de la lumière par les cellules et l'effet d'ombre mutuel entre elles (**S. Suh, 2003**).

Le confinement élargit la possibilité de culture à des espèces pas nécessairement résistantes aux contaminations, même si, pour des installations de grande taille, un contrôle poussé de l'axénie reste nécessaire. Un meilleur contrôle des conditions de croissance (pH, température, carbone dissous), des échanges gaz- liquide est également obtenu. Dans ce type de réacteur, l'évaporation y est quasi nulle. En dépit de leur coût et de la complexité d'extrapolation sur de grandes surfaces (**J. Pruvost, 2011**), les systèmes clos présentent plusieurs avantages majeurs par rapport aux systèmes ouverts (**R.N. Singh, 2012**):

- Les photobioréacteurs minimisent les contaminations et permettent d'effectuer des cultures algales axéniques et des monocultures,
- Les photobioréacteurs offrent un meilleur contrôle des conditions tels que: le pH, la température, la lumière, la concentration de CO<sub>2</sub>, etc.,
- Les photobioréacteurs permettent de réduire les pertes de CO<sub>2</sub>,

- Les photobioréacteurs prévoient l'évaporation de l'eau,
- Les photobioréacteurs permettent l'utilisation de concentrations cellulaires plus importante,
- Les photobioréacteurs permettent la production des complexes biopharmaceutiques.

Le fonctionnement clos a également tendance à mener à un réchauffement de la culture et ce, du fait de la captation solaire contenant une part élevée d'infrarouges (~ 55%). Les photobioréacteurs intègrent donc souvent des systèmes de refroidissement, soit par aspersion d'eau, qui peut provoquer des dépôts minéraux sur les faces optiques, soit par immersion en bassin thermo-régulé. L'hydrodynamique du système a aussi un rôle majeur, en particulier pour éviter la formation de bio-films sur les parois optiques (**J. Pruvost, 2011**).

## **IV.2. Technologies existantes**

### ***IV.2.1. Photobioréacteurs tubulaires et cylindriques***

Les géométries cylindriques et tubulaires se prêtent bien aux contraintes des photobioréacteurs avec, tout de même, une bonne circulation et une courbure exposée favorable à la surface éclairée.

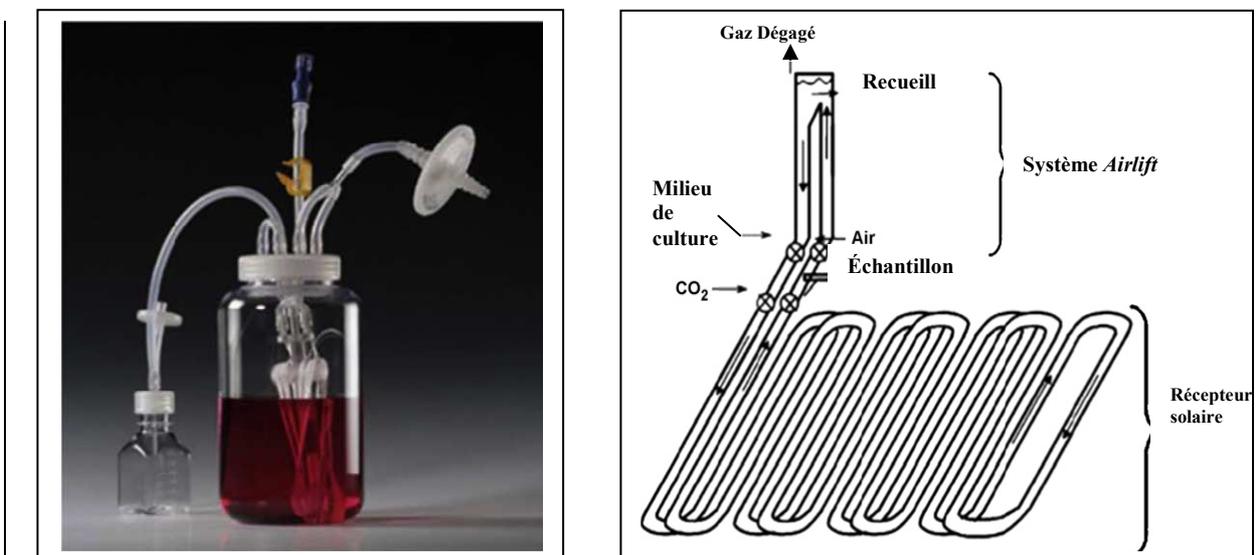
Les photobioréacteurs cylindriques (Figure V.1) reprennent le principe des colonnes à bulles intégrant une zone ascendante d'aération et une zone descendante, sur le principe *airlift*. Ils sont généralement placés verticalement avec une injection de gaz en bas de colonne. Le concept est simple mais peu favorable aux productivités élevées car les diamètres importants ( $\geq 10$  cm) mènent à des surfaces spécifiques éclairées faiblement. La disposition verticale n'est également pas idéale pour la captation du flux solaire. Le dimensionnement est facilité par l'abondante littérature éprouvée sur de nombreuses autres applications (**J. Pruvost, 2011**).

Le photobioréacteur de type hélicoïdal ou tubulaire (Figure V.1) se compose de tubes transparents, enroulés, flexibles et de petit diamètre. Cette partie est souvent

placée horizontalement afin de collecter la lumière. L'autre partie est une unité de dégazage séparée ou attachée assurant la mise en circulation, les transferts de gaz et l'apport en nutriments grâce à une pompe centrifuge ou à un système de pompage *airlifts* (R.N. Singh, 2012) (J. Pruvost, 2011). Cette forme de PBR constitue une alternative permettant une installation de grande taille et augmentant ainsi la surface spécifique éclairée mais aussi la possibilité de biofilms et les pertes de charge.

Le système de mise en circulation doit être puissant sans toutefois générer de cisaillements néfastes, ce qui limite la longueur de tubes. Dans le cas de longueurs élevées, le comportement hydrodynamique se rapproche du réacteur piston, avec une régulation complexe et des hétérogénéités de comportement biologique (J. Pruvost, 2011).

En photobioréacteur exposé à un flux lumineux élevé en cas d'éclairage direct, des temps d'exposition trop longs peuvent mener, par photo-inhibition, à des pertes de rendement. Il est alors nécessaire de mélanger suivant l'épaisseur, pour provoquer un renouvellement des cellules au droit de la source lumineuse, ce qui n'est pas aisé dans des tubes droits longs, ou l'écoulement tend vers l'axialité. L'accumulation d'oxygène est aussi une préoccupation, surtout en tubes horizontaux.



**Figure V.1. Schéma d'un réacteur cylindrique à bulles et d'un réacteur tubulaire (R.N .Singh, 2012).**

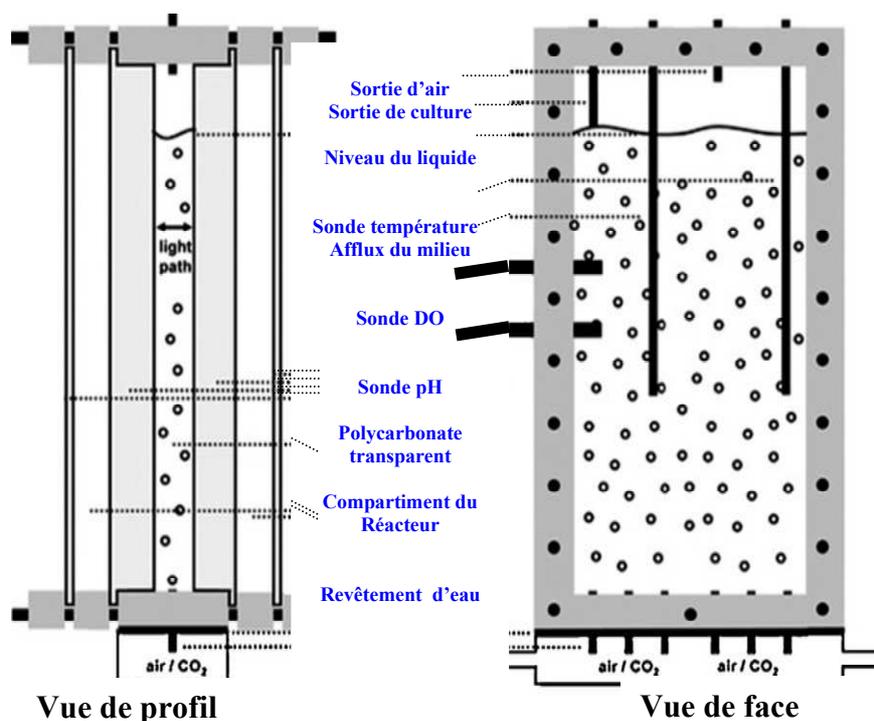
L'accumulation de poches d'oxygène quasi pur mène à une teneur en O<sub>2</sub> dissous élevée. Les effets ne sont cependant pas clairs, mais une tendance à un impact négatif est recensée en particulier lors d'une exposition intense au soleil (**J. Pruvost, 2011**).

#### ***IV.2.2. Photobioréacteurs plans***

Le photobioréacteur plan peut être fait de matériaux transparents tels que le verre, le plexiglas, le polycarbonate, etc. Il est caractérisé par un ratio surface d'exposition/volume élevé et des systèmes ouverts de dégagement de gaz. L'agitation est fournie soit par barbotage d'air sur l'une de ses surfaces à l'aide d'un tube perforé ou bien par rotation mécanique par un moteur (**R.N. Singh, 2012**) (**Figure V.2**).

La géométrie plane s'impose comme une possibilité de conception par analogie au panneau photovoltaïque. Pour une surface spécifique d'éclairement élevée, ces photobioréacteurs ont une épaisseur de 1 à 10 cm. Ils sont orientables, avec une inclinaison ajustable. Pour des raisons pratiques, les systèmes solaires sont souvent placés verticalement. Ce fonctionnement vertical est adapté aux latitudes élevées car une bonne captation moyenne en cours de la journée est constatée.

L'augmentation la taille d'un photobioréacteur vertical ou incliné est une problématique à cause de la pression hydrostatique, sauf l'ajustement de l'épaisseur de matériau avec risque de diminuer sa transmission optique, et/ou ajout des structures de maintien comme les barres de renfort. L'utilisation de géométries planes passe le plus souvent par la duplication d'unités de base, fonctionnant en série ou en parallèle. Un autre inconvénient est la présence de zones à faible mélange; on parle des coins du photobioréacteur plan. Le principe est sensible au problème de biofilms, problème accentué ici par le besoin d'une faible épaisseur (**J. Pruvost, 2011**).



**Figure V.2. Vue de face et de profil d'un photobioréacteur plan  
(R.N. Singh, 2012).**

#### **IV.2.3. Photobioréacteurs solaires à éclairage interne**

Le concept de photobioréacteurs à éclairage interne est né à la fin des années 1980 (**R.J. Radmer, 1990**), sur la base de l'utilisation de tubes fluorescents en vue de concevoir des systèmes extrapolables en volume, suivis de nombreux autres concepts de laboratoire dans les années 1990 à 2000 (**Ogbonna, 1996; Suh, 2003**). Les fibres optiques à diffusion latérale (FODL) sont aussi utilisées pour conduire la lumière solaire à l'intérieur des premiers prototypes de quelques litres (**Ogbonna, 1996; An, 2000**). Les développements actuels se portent sur la captation solaire (**Ono, 2004; Schleguel, 2004**) qui n'en sont qu'à leurs balbutiements. Le seul résultat expérimental probant a été obtenu sur *Chlorella pyrenoidosa* (**J.C. Ogbonna, 1996**), mais il reste un considérable travail de développement pour estimer la rentabilité de ces systèmes qui atteindront certainement un degré de raffinement technologique important (**J.F. Cornet, 2010**) avec l'introduction de la technologie de photobioréacteur à dilution contrôlée du flux en volume (DiCoFLuV) qui a conduit à la réalisation d'un démonstrateur de 25L utiles en cours de caractérisation (**J. Pruvost, 2011**).

#### **IV.2.4. Photobioréacteurs à lumière artificielle**

Une source lumineuse artificielle permet une illumination continue contrôlée en intensité, sans les contraintes du solaire. Cela permet aussi l'installation en intérieur. Ce type de réacteur est employé pour la production de biomasse ou d'une molécule cible en faible quantité.

La culture peut être au contact de l'extérieur, comme c'est le cas couramment en éclosérie où les micro-algues de fourrage sont cultivées dans des bacs cylindriques à l'air libre. Plus généralement, la lumière artificielle générée par des tubes fluorescents, est associée à un fonctionnement clos. La maîtrise de l'énergie lumineuse et le contrôle strict des conditions assurent alors une stabilité essentielle à la synthèse des molécules à haute valeur ajoutée. Bien qu'initialement marginal, le nombre de ces systèmes est croissant, car il permet de proposer les productivités les plus élevées adaptées à des applications spécifiques (**J. Pruvost, 2011**).

En plus des géométries classiques planes, tubulaires et cylindriques, l'éclairage artificiel et la taille modeste des technologies permettent des géométries originales. On note par exemple: le réacteur modulaire LAMP (Lumière Artificielle Moyenne Productivité) conçu par l'Ifremer en collaboration avec l'université de Nantes. Ce photobioréacteur repose sur une géométrie de chambres annulaires entourant des tubes fluorescents (**J. Pruvost, 2000**), et un système modulaire aujourd'hui commercialisé et basé sur une géométrie tubulaire (**K. Loubiere, 2009**).

#### **IV.3. Photobioréacteurs et production d'Hydrogène par les cyanobactéries**

Les photobioréacteurs sont essentiels pour la production d'hydrogène à grande échelle (**Asada, 1999; Akkerman, 2002**). Le régime lumineux est déterminé par le gradient lumineux qui doit être diminué au maximum et distribué autant que possible; car la productivité d'hydrogène d'un photobioréacteur est limitée par la lumière et tend à diminuer aux intensités lumineuses les plus élevées. La productivité de H<sub>2</sub> est en relation avec le taux de circulation du liquide ou d'aération. Comme résultat du mélange, les cellules vont circuler entre la zone lumineuse et la zone obscure du réacteur à une certaine fréquence et à des intervalles réguliers; au dépend du

design du réacteur et de l'alimentation en gaz. La position de la source lumineuse et l'hydrodynamique du liquide affectent également la culture cyanobactériale ainsi que la production d'hydrogène (**S. Suh, 2003**).

Un réacteur destiné à la production photobiologique doit réunir certaines conditions (**R. N. Singh, 2012**):

- Il doit être un système fermé afin que l'hydrogène puisse être collecté sans aucune perte,
- Le design du réacteur doit permettre une stérilisation convenable et facile,
- Afin de maximiser la croissance et la production de H<sub>2</sub>, la surface de lumière incidente doit être grande donc le photobioréacteur doit avoir un ratio surface/volume élevé.

#### **IV.4. Condition influençant la production d'hydrogène par les cyanobactéries**

##### **1. Lumière**

Malgré que les cyanobactéries absorbent préférentiellement la lumière rouge autour de 680 nm, le besoin lumineux pour la production de H<sub>2</sub> varie en fonction des espèces cyanobactériales (**N.M. Pinzon- Gamez, 2005**). Pendant que *Spirulina platensis* produit l'hydrogène sous des conditions anaérobiques dans l'obscurité et la lumière (**K. Aoyama, 1997**), certaines espèces comme *Anabaena cylindrica* ne le produisent qu'en présence de lumière (**L.J. Stal, 1985**).

##### **2. Température**

L'optimum de température pour la production de H<sub>2</sub> par les cyanobactéries varie d'une espèce à l'autre, mais pour la plupart d'entre elles elle se situe entre 30 et 40 °C. Le tableau V.1 illustre les températures optimales pour la production de H<sub>2</sub> pour quelques espèces cyanobactériales (**K. Aoyama, 1997; L.T. Serebryakova, 2000**)

**Tableau V.1 : Températures optimales pour la production de H<sub>2</sub> pour quelques espèces cyanobactériales.**

<b>Espèce</b>	<b>Température optimale de production de H<sub>2</sub> (°C)</b>
<i>Nostoc muscorum</i> SPU004	40
<i>Anabaena variabilis</i> SPU 003	30
<i>Spirulina platensis</i>	32

### **3. Salinité**

La salinité du milieu a un fort impact sur la production de H<sub>2</sub> chez les cyanobactéries. En général, les cyanobactéries d'eau douce montre des taux plus faibles de production d'hydrogène en augmentant la salinité (**V. Shah, 2003**).

### **4. Micronutriments**

Plusieurs éléments traces sont apparus en faveur d'une amélioration remarquable de la production de H<sub>2</sub>. Ils sont, vraisemblablement, impliqués dans le fonctionnement de la Nitrogénase. A titre d'indication, *Anabaena variabilis* SPU003 est hautement sensible aux ions Co, Cu, Mn, Zn, Ni, Fe et ne montre aucune production de H<sub>2</sub> à des concentrations inférieures à 10 mM (**R. Moezelaar, 1994**).

### **5. Source de Carbone**

Les sources de carbone sont connues pour leur impact considérable sur la production de H<sub>2</sub> en influençant l'activité de la Nitrogénase. La présence de différentes sources de carbone engendre une variation des capacités de don d'électrons par les équivalents réducteurs à la Nitrogénase (**B. Hermann, 2011**).

### **6. Source d'azote**

Le nitrite, le nitrate, l'ammoniaque et toutes les sources d'azote exogènes sont généralement des inhibiteurs de la synthèse des Nitrogénase donc de la production

de H<sub>2</sub> (**Lambert G. R., 1979**). En effet, l'élimination de l'azote moléculaire est souvent nécessaire pour effectuer la production d'hydrogène (**G.R. Lambert, 1979**).

## **7. Oxygène**

En raison de l'extrême sensibilité des Hydrogénases ou des Nitrogénases à l'oxygène, la photo-évolution d'hydrogène catalysée par celles-ci peut se dérouler seulement sous des conditions anaérobiques (**P. Fay, 1992**). Du fait que l'oxygène est un sous produit de la photosynthèse, les organismes contenant la Nitrogénase ont développé plusieurs stratégies de séparation spatiale et temporelle pour protéger cette enzyme contre l'inactivation par l'oxygène (**P. Tamagnini, 2002**).

## **8. Soufre**

L'appauvrissement en soufre améliore les taux de production d'hydrogène chez plusieurs espèces cyanobactériales à l'instar de *Gloeocapsa alpicola* et *Synechocystis PCC 6803*. Il est possible d'inhiber la photosynthèse aérobie et améliorer la production de H<sub>2</sub> en incubant les cyanobactéries dans un milieu dépourvu en soufre (**T. K. Antal, 2005**).

Le soufre est un composé très important dans le cycle de réparation du photosystème II. En effet, en absence de cet élément la biosynthèse des protéines est hautement affectée et la production de la cystéine et de la méthionine devient impossible. Il en résulte un manque en une protéine D<sub>1</sub>; essentielle pour le fonctionnement du PSII et doit être constamment remplacée (**T. K. Antal, 2005**). Pour ces raisons, durant la privation en soufre la photosynthèse et la respiration diminuent, même en présence de la lumière. Puisque la photosynthèse décline plus rapidement que la respiration, par conséquent un point d'équilibre s'établit ensuite la quantité de O<sub>2</sub> utilisée dans la respiration dépasse celle dégagée par la photosynthèse et les cellules deviennent anaérobiques et à ce moment là que la production d'hydrogène peut avoir lieu intensivement (**T. K. Antal, 2005**).

*Matériels et*

*Méthodes*

## VI. Matériels et méthodes

Notre thématique de recherche vise à mieux conduire les cultures de *Spirulina platensis* et à mieux comprendre les mécanismes biologiques qui sont impliqués dans l'adaptation aux différents bioprocédés ou différentes conditions environnementales (température, pH, redox, inhibitions...). Afin de caractériser ces réponses physiologiques, nous développons des méthodes complémentaires pour l'analyse de l'état physiologique et moléculaire de cette cyanobactérie (composition en réserves glucidiques, en chlorophylle et la production des acides organiques au cours de la fermentation obscure). Ces approches nous permettent ainsi dans l'avenir de définir des stratégies en vue d'améliorer l'état physiologique bactérien. Au cours de notre travail on a eu recours à l'utilisation du matériel suivant :

- pH mètre (HANNA® instruments).
- Pompe d'aération (CHAMPION® CX-0088).
- Lux mètre (Testo® 545).
- Spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU®).
- Etuve (Lab Tech®).
- Balance de précision (OHAUS®).
- Centrifugeuse (TOMOS®).

### VI.1. Souche et mise en culture en discontinue

Les cultures discontinues ou cultures en « *fed- batch* » selon certains auteurs sont des systèmes de cultures aqueuses en flacons ou en bioréacteurs clos sans soutirage permettant de contrôler les principaux paramètres environnementaux influençant la culture. Dans ces enceintes fermées, on met au départ une quantité de nutriments définie dans le milieu ainsi que l'inoculum. On laisse croître la biomasse jusqu'à ce qu'il y ait épuisement du milieu de culture.

La culture des microorganismes photosynthétiques nécessite deux substrats: la lumière et le dioxyde de carbone. Ils assurent la photosynthèse et la croissance des micro-algues. En général, ces cultures sont éclairées en continu par un flux lumineux artificiel ou par l'énergie solaire aussi elles sont alimentées en continu par du CO<sub>2</sub> dilué dans l'air (K.A. Rusch, 2003).

Dans notre étude, la production de biomasse est une étape primordiale pour maintenir la culture en croissance et produire la quantité de biomasse qui servira dans les expériences ultérieures. Une culture axénique de *Spirulina platensis* est obtenue au laboratoire des Biotechnologies Environnement et de Génie des Procédés (BIOGEP) en provenance de Tamanrasset. La cyanobactérie est mise en culture discontinue dans le milieu de culture Zarrouk (C. Zarrouk, 1966). La composition chimique de ce milieu minéral est chiffrée dans le tableau VI. 1.

**Tableau VI.1. Composition chimique du milieu Zarrouk**

Composés	Teneur (g. L <sup>-1</sup> )
NaHCO <sub>3</sub>	16.8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
NaNO <sub>3</sub>	2.50
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
NaCl	1.00
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.20
CaCl <sub>2</sub>	0.04
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.01
EDTA	0.08
A5	1*
B6	1*

\* 1 mL

**Tableau VI.2. Composition chimique de la solution A<sub>5</sub>.**

Oligo-éléments	Teneur (g. L <sup>-1</sup> )
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	1.80
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.08
MoO <sub>3</sub>	0.01

**Tableau VI.3. Composition chimique de la solution B<sub>6</sub>.**

<b>Oligo-éléments</b>	<b>Teneur (g. L<sup>-1</sup>) x 10<sup>+4</sup></b>
	960
K <sub>2</sub> Cr(SO <sub>4</sub> ). 24H <sub>2</sub> O	477
NiSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	400
Ti(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	229
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	179
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	44
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	

Des éléments comme le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le molybdène (Mo), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et le nickel (Ni) influencent la production d'hydrogène (**S. Ramchandran, 1984**). Ces métaux sont nécessaires mais en très faibles quantités. Ces oligoéléments sont ajoutés au milieu de cultures à l'état de traces (Tableau VI.2).

La souche *S. platensis* est menée en culture Batch dans des Erlen-Meyers de 500 mL à une température ambiante d'environ 30 C°. Les cultures de spiruline sont exposées à 2500 Lux (3.6 W/m<sup>2</sup>) de lumière incidente produite par une lampe à lumière blanche fluorescente assurant ainsi une densité de flux photonique photosynthétique moyen de 3,38 μmol. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Elles sont illuminées 12 h par jour à l'aide d'une prise programmable. Des cycles 12 h de lumière/12 h d'obscurité conditionnent les cellules pour une production d'hydrogène plus élevée. Cela permet aussi une activation plus rapide de la production d'hydrogène à l'anaérobiose. Ce qui a été reportée par **Anayev et al. (2008)**. La mise en culture est réalisée dans un milieu isolé clos afin d'éviter la contamination par l'air ainsi que la dissipation de la chaleur.

Afin d'assurer l'agitation de la suspension cellulaire, l'air filtré est barboté dans les cultures à l'aide d'une pompe à air à un débit modéré tout en évitant le cisaillement des filaments cellulaires. L'air injecté assure l'apport en CO<sub>2</sub> au milieu de culture pour le maintien du pH entre 9 et 10. Ce pH alcalin peut créer un environnement défavorable pour les contaminants compétitifs. Sous ces conditions, on assiste

également à un déclenchement de la formation du bicarbonate à partir du CO<sub>2</sub> en enrichissant ainsi le milieu de culture en source de carbone (**T.C. Summerfield, 2008**).

La fréquence et la durée du barbotage est de 2 min chaque 2 h, car les cellules algales peuvent tolérer le CO<sub>2</sub> seulement à un certain seuil au-delà duquel il y'a création d'un stress environnemental provoquant une réduction biologique des capacités de séquestration de ce dernier par les cellules algales (**K. Kanhaiya, 2011**).

### 1. *Courbe étalon DO = f (PS)*

Afin d'estimer la concentration cellulaire exprimée en g.L<sup>-1</sup>, une courbe étalon des densités optiques (DO) en fonction des poids secs (PS), à  $\lambda$  max = 618 nm, a été réalisée comme suit (**A. Vonshack, 2002**):

- Cinq filtres (Wattman) N° 05 ont été séchés dans l'étuve pendant 24 h à 70°C ou à 105°C pendant 2 h.
- Après séchage, les filtres ont été laissés refroidir dans un dessiccateur pour une déshumidification, ils sont ensuite pesés (P<sub>0</sub>).
- Cinq suspensions de 50 mL de culture de spiruline à différentes concentrations ont été préparées, en même temps, puis filtrées à travers les filtres préalablement préparés.
- La filtration des suspensions algales à travers les filtres est suivie d'un lavage par 20 mL d'eau acidifiée (pH = 4) afin d'entraîner tous les sels insolubles sur l'algue.
- Les filtres sont mis dans l'étuve dans les mêmes conditions précédentes.
- Après refroidissement dans le dessiccateur, les filtres sont pesés une deuxième fois (P<sub>1</sub>).

Les poids secs sont estimés par la relation suivante:

$$(Ps) = (P_1 - P_0) \times 20 \text{ (g. L}^{-1}\text{)} \dots\dots\dots(1)$$

## **2. Contrôle de la contamination des cultures de *Spirulina platensis***

Durant les dilutions, les contaminants peuvent survenir aux cultures de Spiruline, et entrent en compétition avec notre bactérie sur la source de carbone. Ils affectent, de ce fait, la culture de Spiruline et peuvent également diminuer les taux de production d'hydrogène par celle-ci.

Heureusement que la culture de Spiruline ne se contamine pas facilement par d'autres micro-organismes, au pH basique du milieu qui inhibe la croissance de la plupart des contaminants. Cependant, il existe des micro-organismes qui tolèrent ce pH élevé tels que les streptocoques, les chlorelles, etc. Donc il a été important de prendre des précautions lors des manipulations telles que le contrôle de la pureté des cultures qui est testée par observations d'échantillons frais sous microscope photonique (agrandissement X 40), ainsi que la stérilisation de la verrerie et du matériel utilisés lors de la manipulation de la souche.

## **3. Suivi de la cinétique de croissance**

La détermination du comportement des bactéries durant la croissance est un critère essentiel permettant de visualiser les différentes phases de croissance. Par conséquent, cela donne la possibilité de bien exploiter la souche en question afin d'atteindre le maximum de productivité et déterminer les paramètres cinétiques de croissances  $g$  et  $\mu_{max}$ .

Un inoculum de la souche *S. platensis* a étéensemencé dans le milieu de culture Zarrouk préalablement stérilisé, à raison de 1 g/L et un pH initial de 9,11. Cette étude à été réalisée sous une lumière d'une intensité de 2500 Lux et à une température d'incubation d'environ 30 C°.

En plus, et afin de suivre l'évolution du pH du milieu durant la croissance de notre souche, des prises de valeurs journalières du pH de la culture ont également été effectuées à l'aide d'un pH mètre.

Le taux de croissance de *S. platensis* suit le modèle commun de la croissance microbienne, qui implique une division cellulaire simple sans aucune étape de différenciation ou de sexualité. Ainsi, sous les conditions "normales" la vitesse spécifique de croissance ( $\mu$ ) est décrite par l'équation suivante (A. Vonshack, 2002):

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \dots\dots\dots(2)$$

Où  $x$  est la concentration initiale de biomasse. La vitesse spécifique de croissance chez les micro-algues a été décrite par plusieurs auteurs, mais la formule la plus communément utilisée est la suivante (Vonshack A., 2002):

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \dots\dots\dots (3)$$

Où  $x_1$  et  $x_2$  représentent les concentrations de biomasse aux intervalles de temps  $t_1$  et  $t_2$ .

L'équation la plus simple combinant la vitesse spécifique de croissance et le temps de dédoublement de la génération ( $g$ ) d'une culture est:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} dt \dots\dots\dots(4)$$

Ces équations sont valables seulement pour la phase logarithmique ou exponentielle de la croissance en cultures batch (A. Vonshack, 2002).

#### **4. Comparaison de l'aspect d'une culture jeune et âgée de *Spirulina platensis***

L'état physiologique des microorganismes est fortement lié à leur environnement et aux bioprocédés dans lesquels ils sont impliqués. Lorsque des cellules bactériennes sont confrontées à des conditions délétères, elles mettent en place des réponses passives qui conduisent à la mort ou à la dégradation cellulaire. Toutefois, dans certaines conditions, les cellules peuvent développer des réponses adaptatives, pour contrebalancer ces effets négatifs, mais dans ce cas la elles sont dans un état de stress cellulaire.

La caractérisation de l'état des cellules au cours du processus de production de biomasse peut apporter des informations cruciales pour optimiser les paramètres de production d'hydrogène. Ces approches peuvent répondre à différents objectifs

technologiques telle que l'estimation de la capacité des cellules à résister à un stress et à se maintenir sous une forme stable au cours de la conservation. Ces outils peuvent ensuite être transférés dans une démarche de contrôle de qualité des préparations bactériennes.

L'état physiologique de notre souche est réalisé sur deux cultures de *S. platensis*: culture (A) jeune en pleine phase exponentielle, et culture (B) âgée en phase de déclin. L'analyse est faite à l'œil nu ainsi qu'à travers le dosage du contenu en chlorophylle par la méthode de **John J. H. (2006)** dans un prélèvement à partir des deux cultures testées; la concentration de la chlorophylle est proportionnel à la quantité efficace du PSII (**A. Anayev , 2008**).

## **VI.2. Fermentation production d'hydrogène et effet des différents paramètres expérimentaux**

### **VI.2.1. Procédure de production du bio-hydrogène par *Spirulina platensis***

La production auto-fermentative d'hydrogène a été effectuée sur *Spirulina platensis* par **Rocheleau et al. (2000)** et **Aoyama et al. (1997)** qui ont décrit la possibilité de production de H<sub>2</sub> en pleine obscurité sous les conditions d'anaérobiose. *Spirulina platensis* constitue une bonne candidate pour servir comme facteur cellulaire pour la production d'hydrogène à grande échelle; car les espèces de *Spirulina* ont démontré avoir la plus haute activité de production d'hydrogène parmi toutes les cyanobactéries testées (**Asada, 1999**). En plus, elles se caractérisent par une haute productivité de biomasse dans la nature et se propagent avec une contamination parasitique microbienne minimale et ce, grâce à leur habitat écologique qui est un milieu alcalin riche en carbonate. Ses longs filaments (~1 mm) sont flottants permettant ainsi leur récolte et leur transfert dans un milieu neuf.

Après l'étape de la croissance cellulaire et de l'accumulation des glucides endogènes sous les conditions expérimentales de croissance préalablement décrites, les cellules ont été déplacée du milieu de culture vers un milieu Zarrouk modifié.

### **Choix du milieu de production**

L'élimination de l'azote est souvent nécessaire pour effectuer la production d'hydrogène car toutes les sources d'azote exogènes sont généralement des inhibiteurs de cette voie métabolique (**Datta M., 2000**). L'appauvrissement en azote améliore les taux de production d'hydrogène chez plusieurs espèces cyanobactériales. Dans le but d'estimer la production de l'hydrogène chez *Spirulina platensis* sous ces conditions d'épuisement, la culture de notre souche est filtrée à travers des filtres Wattman n°5. Elle est ensuite suspendue à raison de 1 g/L dans un milieu Zarrouk épuisé en soufre «milieu (1)» et/ou en azote «milieu (2)» (Tableau VI.4).

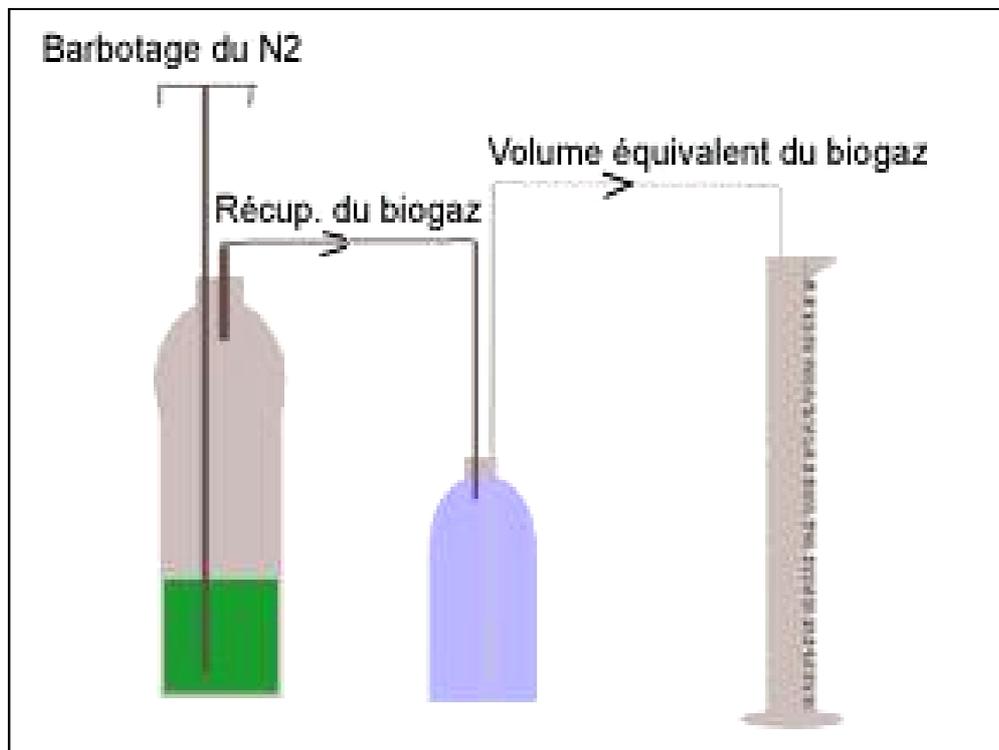
**Tableau VI.4. Composition de deux milieux de production testés.**

<b>milieu de production</b>	<b>Milieu (1)</b>	<b>Milieu (2)</b>
<b>Réactif</b>		
Réactif du milieu Zarrouk	<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O...0,2 g/L</b>	<b>NaNO<sub>3</sub>....2,5 g/L</b>
Réactifs du milieu de production	<b>MgCl<sub>2</sub>.....0,05 g/L</b> <b>KCl.....0,58 g/L</b>	<b>NaNO<sub>3</sub>....0,005 g/L</b>

La suspension cellulaire (concentrée si nécessaire) est ensuite placée dans un photobioréacteur clos, préalablement stérilisé à l'autoclave à 120 °C pendant 15 min, à raison de 200 mL de suspension cellulaire pour le PBR cylindrique et conique, et de 300 mL pour le PBR conique plat. Selon Aoyama. K (1997) *Spirulina platensis* produit l'hydrogène sous des conditions anaérobiques dans l'obscurité et en présence de la lumière. Le dithionate de sodium (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), jouant le rôle de donneur d'électron et absorbant toute trace d'oxygène dissout, est additionné au milieu. L'air est chassée par un barbotage à l'azote, ce qui évite également le passage métabolique de la production d'hydrogène vers la dissolution de celui-ci (**I. Valdez- Vazquez, 2006**). A travers ces deux étapes, on assiste à un blocage de la respiration permettant à l'anaérobiose de s'installer et d'induire la biosynthèse de l'enzyme hydrogénase (**I. Valdez- Vazquez, 2006**).

Le photobioréacteur, une fois installé, est incubé 24 h à l'obscurité puis exposé pendant 10 h à une lumière fluorescente blanche dont l'intensité dépend du

paramètre choisi. Le volume d'hydrogène produit est récolté à l'aide du dispositif schématisé dans la figure VI.1.



**Figure VI.1. Schéma du dispositif de récupération d'hydrogène.**

Les cellules usées sont récupérées par filtration sur papier Wattman n°5 ensuite inoculées dans un milieu Zarrouk neuf afin d'être réutilisées pour des cycles additionnels de croissance de fixation de CO<sub>2</sub> et des cycles ultérieures de production d'hydrogène.

### **VI.2.2. Effet des différentes conditions expérimentales sur la production du biohydrogène par *Spirulina platensis***

Il est très bien connu que certains facteurs environnementaux, comme la température, le pH, l'intensité lumineuse et les concentrations des nutriments, influencent fortement la croissance des microorganismes (Aoyama K., 1997). On a investigué l'effet de ces facteurs sur la production d'hydrogène dans le but d'améliorer le taux de production d'hydrogène à la température optimale de 32°C.

### **VI.2.2.1. Effet de la concentration de biomasse en fonction de l'intensité lumineuse**

La diffusion de la lumière dans la culture est très influencée par la densité de la biomasse. En effet, les rayonnements lumineux s'atténuent en profondeur du bioréacteur sous l'effet de l'ombre des filaments superposés (**James C., 2000**). Pour minimiser cet effet d'ombre au sein de nos photobioréacteurs, deux procédures ont été suivies: la recherche du seuil de la concentration de biomasse qui donne le maximum de production d'hydrogène en fonction de l'intensité lumineuse 800- 3000 Lux et l'optimisation du photobioréacteur.

Afin de déterminer la concentration de biomasse donnant le meilleur taux de production d'hydrogène, des suspensions de spiruline dont l'âge varie entre 10 et 15 jours ont été préparées dans le milieu de production (L-N) dont le pH moyen est de 8. Ces suspensions cellulaires ont été employées à différentes concentrations allant de 0,5 à 1,5 g/L dans un photobioréacteur cylindrique standard. L'utilisation de concentrations cellulaires supérieures à 1,5 g/l donne de faible taux de production d'hydrogène (**K. Aoyama, 1997**).

Après la phase de fermentation qui s'est déroulée pendant 24 h à l'obscurité selon les conditions expérimentales préalablement décrites, le photobioréacteur a été exposé à une lumière blanche pendant 10 h à différentes intensités lumineuses allant de 800 à 3000 Lux.

### **VI.2.2.2. Influence de la concentration en bicarbonate de sodium dans le milieu de production (L-N)**

Le bicarbonate est un anion très important car il module le transport d'électrons au PSII entre  $Q_A$  et  $Q_B$ . Le bicarbonate constitue bien évidemment la forme hydratée du  $CO_2$  utilisée par les cellules dans le cycle de Calvin et chez la *Spirulina* le  $HCO_3^-$  est la forme dominante du carbone inorganique qui peut accéder aux cellules (**A. Anayev , 2008**). Donc le bicarbonate représente la source de carbone pour notre souche. Les valeurs retenues pour les besoins de cette étude sont: 200, 250, 275, 300 et 350 mM de  $NaHCO_3$ .

### **VI.2.2.3. Effet du pH du milieu production (L-N)**

Une gamme de pH du milieu de production L-N allant de 6,5 à 12 est appliquée en employant un photobioréacteur cylindrique standard de 500 mL. La production d'hydrogène s'est déroulée en mode batch suivant les deux phases: 24 h d'obscurité en anaérobiose et 10 h d'exposition à la lumière à 2000 Lux.

### **VI.2.2.4. Influence de la concentration en NaCl dans le milieu de production (L-N).**

L'application de stress salin dans le milieu de culture affecte, au premier lieu, la biosynthèse des protéines du photosystème PSII et indirectement la génération d'oxygène. Cela favorise l'établissement de l'anaérobiose d'une manière stable durant toute la durée de fermentation (K. Mi- Sun, 2006). Dans le but de prolonger la production d'hydrogène, on a réalisé une série de milieu de production (L-N) dont la concentration en NaCl appartient à une faible gamme: 17, 35, 50, 60, 70, 80 et 90 mM. Afin de déterminer la concentration en NaCl qui donne la meilleure production d'hydrogène, en présence de la lumière, l'étude a été réalisée sur des flacons cylindriques standard de 500 mL.

### **VI.2.2.5. Effet de l'âge de la culture**

L'âge de la souche constitue un paramètre essentiel afin de vérifier à quel stade de sa vie *S. platensis* donne l'optimum de production d'hydrogène. L'étude a été réalisée sur des photobioréacteurs cylindriques de 500 mL en utilisant des souches ayant des âges de: 7 ; 9 ; 13 ; 17 ; 21 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 42 ; 50 et 60 jours.

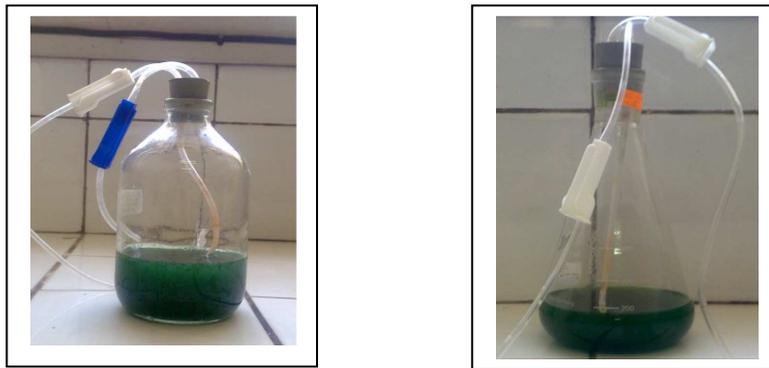
### **VI.2.2.6. Effet de la forme du photobioréacteur en fonction de l'intensité lumineuse**

Afin d'éviter l'effet d'ombre l'une des stratégies est l'optimisation des paramètres du PBR tel que l'épaisseur, la forme de la cuve du réacteur et le type d'agitation. Au cours de notre étude, les expériences de production d'hydrogène ont été conduites dans des flacons cylindriques en verre d'une capacité volumique moyenne de 500 mL.

Afin d'estimer les taux de génération d'hydrogène par *S. platensis* par un PBR conique, des flacons Erlenmeyer de 500 mL en verre ont été employées. La forme

conique donne l'avantage d'une bonne transmission lumineuse ainsi qu'une bonne montée du biogaz produit au sein du PBR. Ce qui facilite la récolte du biogaz.

Les sommets des PBR sont scellés par des bouchons hermétiques en caoutchouc à deux sorties dont l'une sert au dégazage de l'air dans le mélange réactionnel grâce à un barbotage par l'azote moléculaire. L'autre sortie permet la récupération de l'hydrogène produit à partir du *head space*. L'agitation du mélange réactionnel au sein de ces feux PBR est réalisée par secouage manuel régulièrement (voir figure VI.2).



**Figure VI.2. Photobioréacteur cylindrique et conique.**

Afin d'améliorer la production d'hydrogène par *S. platensis*, une troisième forme de photobioréacteur a été également employée durant nos expériences, il s'agit de la forme conique-plate.

#### **VI.2.2.7. production d'hydrogène sous l'effet de la mixotrophie.**

La croissance en mixotrophie est l'une des méthodes qui améliore la croissance des micro-organismes photosynthétiques. Ainsi **K. Aoyama (1997)** a montré que l'addition du glucose à une concentration d'ordre 2.5 g/L n'affecte pas l'activité photosynthétique de *S. platensis*. **C. Katarzyna (2004)** a obtenu des valeurs de  $\mu_{max}$  de 0.055 h<sup>-1</sup> en mixotrophie représentant le double de ceux obtenus en photo-autotrophie (**K. Aoyama, 1997**).

On a étudié l'effet de la mixotrophie sur la production d'hydrogène:

- 1) en présence de la mélasse de canne qui est un sous produit de l'industrie sucrière contenant encore du sucre ainsi que de grandes quantités d'impuretés tels que les minéraux et les produits de caramélisation,
- 2) en présence des carbonates  $H_2CO_3$  et  $CaCO_3$  susceptibles de contribuer à l'amélioration de la production d'hydrogène,
- 3) en présence du D-glucose.

Le D-glucose inhibe la génération d'oxygène par la voie de photolyse directe (**N. Mykhaylenko, 2008**). Les concentrations retenues sont de: 1 ; 2,5 ; 3,5 ; et 4,5 g/L du D-Glucose.

#### **VI.2.8. Effet de la pré- incubation de la souche dans le milieu de production (L-N)**

Le composé carboné majeur de réserve accumulé chez les cyanobactéries au cours de la croissance photo-autotrophe est généralement le glycogène. Ce polymère est massivement accumulé dans les cellules cyanobactériales si la croissance est entravée par une déficience en un nutriment particulier ou bien une augmentation soudaine dans l'apport énergétique. Une fois les conditions physiologiques de la croissance sont rétablies, le glycogène stocké est dégradé pour fournir de l'énergie au métabolisme cellulaire. Partant sur ces données, il a été suggéré que le glycogène joue le rôle d'un composé dynamique à double fonction: produit de réserve et une source de carbone pouvant alimenter d'autres voies biosynthétiques (**D.P. Roberto, 1992**).

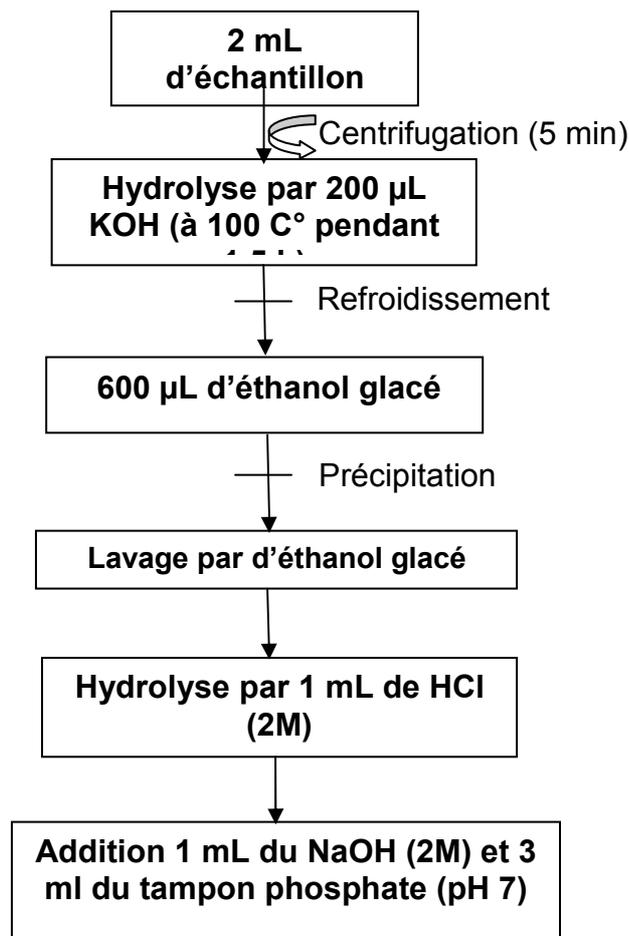
Afin d'évaluer l'effet de la pré-incubation de *S. platensis* dans le milieu de production déficient en azote (L-N) sur la quantité du glycogène accumulé et sur les taux de production d'hydrogène, par rapport au cas de la fermentation directe, dans un premier temps notre souche est mise en culture dans ce milieu pendant 24 h et 48 h. Ces expériences ont été conduites en présence de lumière à 2000 Lux et à une température d'incubation de l'ordre de 30 °C.

### VI.2.8.1. Cinétique du glycogène endogène

#### a- Méthode d'extraction du glycogène

Afin de suivre les taux du glycogène endogène chez *Spirulina platensis*, un échantillonnage a été effectué chaque 2 h à partir d'une suspension cellulaire mise en fermentation à l'obscuré directement après 24 h et 48 h de pré-incubation dans le milieu de production (L-N).

Les taux du glycogène sont déterminés dans des échantillons de 2 mL de culture, centrifugés pendant 5 min puis hydrolysés par 200  $\mu$ L de KOH à 100 °C durant 1,5 h. Après refroidissement, 600  $\mu$ L d'éthanol absolu glacé est ajouté permettant aux sucres polymériques de précipiter pendant 2 h sur de la glace. Les sucres précipités sont lavés à l'éthanol glacé suivi d'une hydrolyse par 1 mL de HCl (2 M), 1 mL de NaOH (2 M) et enfin 3 mL du tampon phosphate (pH = 7) sont additionnés à l'hydrolysate (O. C. Jose- Julio, 1991):



**Figure VI.3. Schéma du protocole d'extraction des sucres à partir de la spiruline.**

Le contenu en sucre réducteur est déterminé par le réactif DNS par la méthode suivante:

***b- Dosage des sucres réducteurs***

Cette méthode est basée sur la formation d'un chromatophore entre le réactif DNS et les terminaisons réductrices des molécules des sucres. En effet, à température élevée en milieu basique et en présence des sucres réducteur, le réactif DNS de couleur jaune est réduit en acide 3 Amino-5-nitrosalicylique (brun) et les groupements aldéhydes des sucres sont oxydés en groupements carboxyles.

***Tableau VI.5. Composition du réactif DNS***

<b>Réactif DNS</b>	<b>Proportions (%)</b>
Acide dinitrosalicylique	1
Phénol	0.2
Sulfite de sodium	0.05
NaOH	1
Tartrate double de sodium et de potassium	40

Les réactifs doivent être mélangés dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-dessus à l'exception du tartrate double de sodium et de potassium qui doit être préparé seul et ajouté aux échantillons après ébullition. Méthode de dosage des sucres réducteurs par le réactif DNS (voir *Annexe VII*).

# *Résultats et Discussion*

## **VII. Résultats et discussion**

Cette partie de notre travail consiste à développer, contrôler et caractériser des cultures de la spiruline choisie pour les besoins de notre étude. Ce qui représente, en soit, une étape cruciale pour les étapes ultérieures ainsi que l'investigation de l'état physiologique de notre souche. Dans une deuxième étape, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet des différents paramètres physicochimiques et de la composition du milieu sur la production d'hydrogène par *S. platensis*.

### **VII.1. Souche et mise en culture**

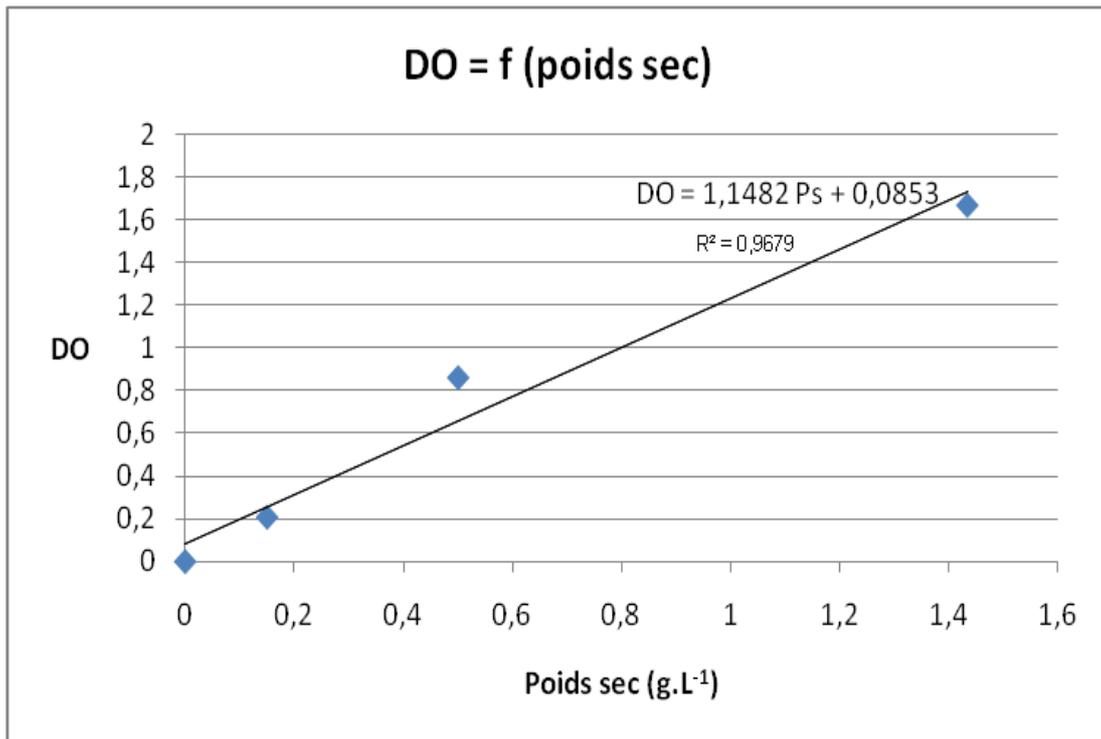
#### **1. Courbe étalon (DO = f (PS))**

La courbe étalon DO = f (PS) a été réalisée selon la méthode de **VONSHAK A., 2002** afin d'avoir la concentration de la culture de spiruline par simple lecture de la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 618 nm. Les résultats obtenus sont donnés par l'illustration VII.1 où figurent les différentes densités optiques en fonction du poids sec (Ps) de la souche. Cette courbe est une droite, d'équation  $y = a.x + b$ , qui passe par la majorité des points obtenus avec un bon coefficient de corrélation  $R^2 \sim 1$ . L'équation reliant la densité optique et le poids sec est définie expérimentalement par la relation suivante:

$$\mathbf{DO = 1,1482 Ps + 0,0853}$$

#### **2. Contrôle de la contamination de la souche**

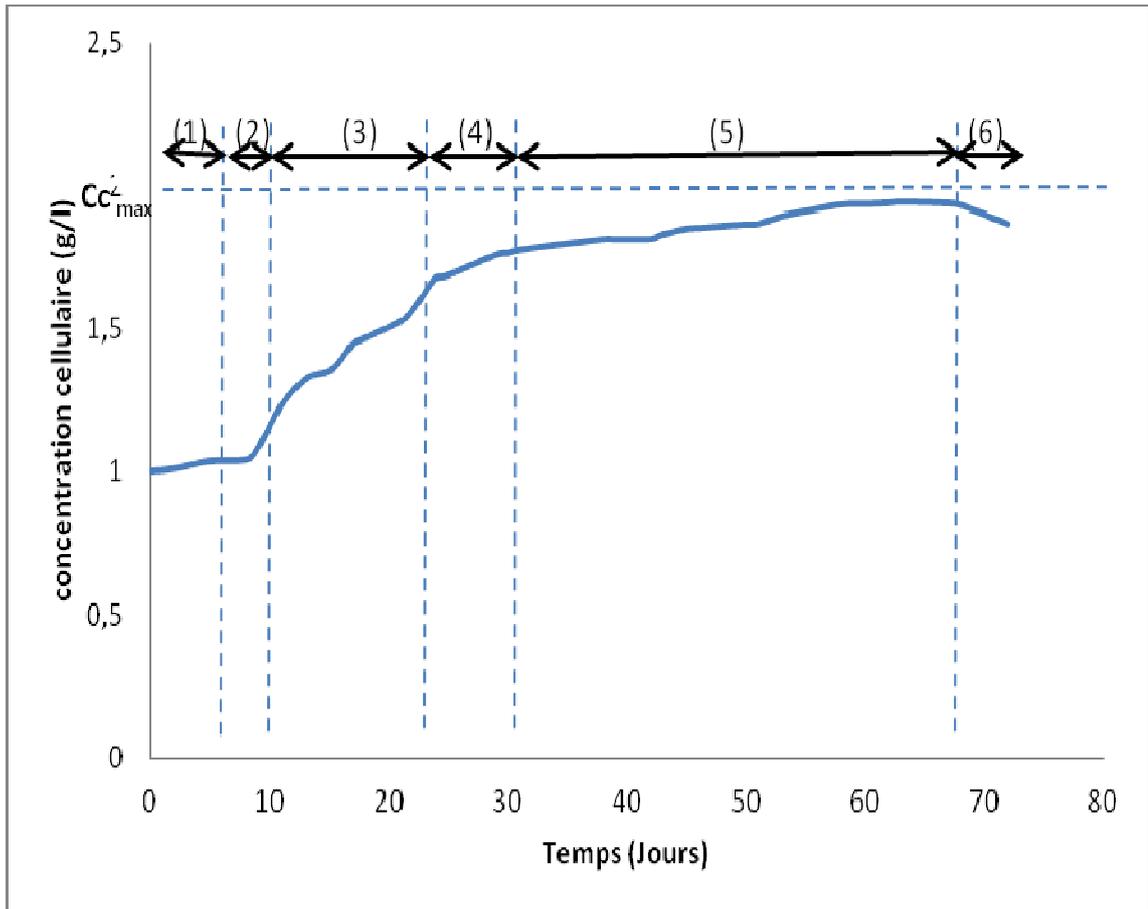
Des observations régulières au microscope optique avec un agrandissement X 40 nous a permis d'assurer que nos cultures de *Spirulina platensis* sont axéniques. Ainsi lors des observations, on a affirmé l'absence de toute cellule étrangère autre que celles de la spiruline; qui dans notre cas se présente sous la forme de filaments droits ainsi que quelques rares filaments de forme spiralée. Ceci est dû vraisemblablement à l'absence de rayons UV dans l'enceinte où se trouve la souche éclairée par une simple lampe fluorescente (**Hongyan W., 2005; Zengling M., 2010**).



**Figure VII. 2. Courbe étalon de la densité optique en fonction du poids sec de *Spirulina platensis*.**

### **3. Cinétique de croissance de la souche *Spirulina platensis***

La souche *Spirulina platensis* est mise en culture photo-autotrophe discontinue sur un milieu minérale standard Zarrouk. Les caractéristiques des différentes phases de croissance peuvent être graphiquement représentées par cinétique (Figure VII.2). La courbe de croissance de *S. platensis* apparaît sous une allure sigmoïde qui exprime différents stades de croissance. Sous les conditions expérimentales utilisées la courbe de croissance peut être subdivisée en six phases:



**Figure VII.2. Cinétique de croissance de *Spirulina platensis*.**

- **Phase de latence [0- 5] jours:** correspondant à la période d'adaptation pendant laquelle *S. platensis* a synthétisé les enzymes qui vont lui être nécessaires pour utiliser les éléments nutritifs du milieu de culture.

- **Phase d'accélération [5- 8] jours:** durant laquelle les divisions cellulaires ont commencé à se développer.

- **Phase de croissance exponentielle [8- 21] jours:** d'allure droite durant laquelle la vitesse de la croissance cellulaire est maximale et demeure pratiquement constante.

En phase exponentielle on a pris les valeurs suivantes:

$$\left\{ \begin{array}{l} x_1 = 1,04 \text{ g/L} \\ t_1 = 8 \text{ jours.} \end{array} \right.$$

$$\left\{ \begin{array}{l} x_2 = 1,322 \text{ g/L} \\ t_2 = 13 \text{ jours.} \end{array} \right.$$

L'équation (1) devient:

$$\mu = \frac{\ln 1,322 - \ln 1,04}{13 - 8} = 0,04798 \text{ j}^{-1}$$

Donc la vitesse spécifique de la croissance chez notre souche *S. platensis* est:

$$\mu = 0,04798 \text{ j}^{-1}$$

Le taux maximal de la croissance serait, en accord avec les travaux de **Michele R. et al., 2007** de:

$$\mu_{max} = \frac{\mu}{\ln 2} = 0,06923 \text{ j}^{-1}$$
$$g = \frac{1}{\mu_{max}} = \frac{1}{0,06923} = 14 \text{ j et } 10 \text{ h.}$$

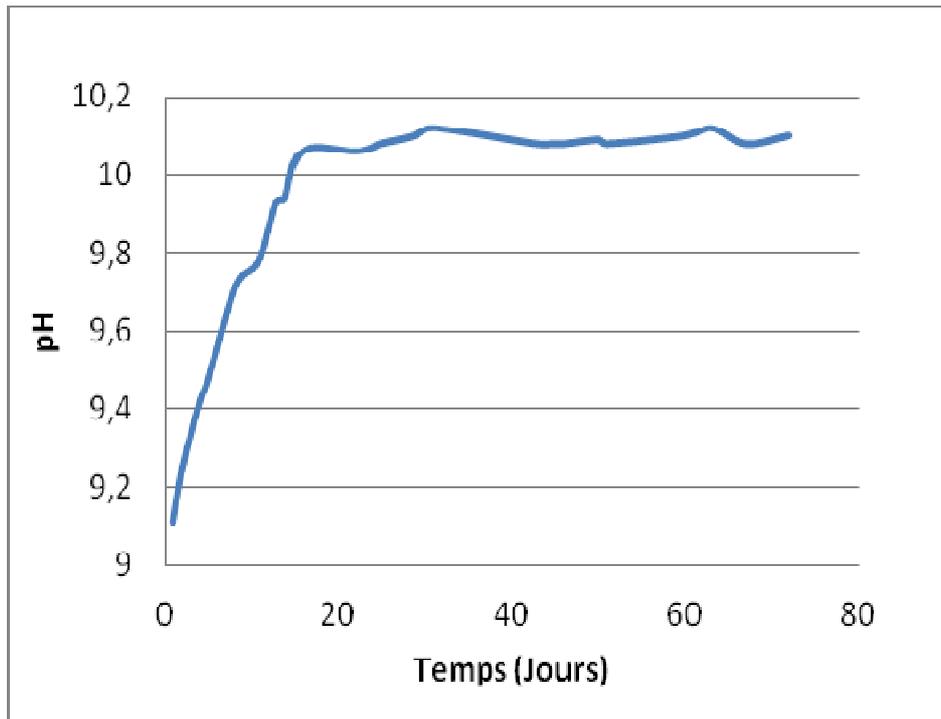
- **Phase décélération de la croissance [21- 29] jours:** la reproduction commence à être limitée et tend à se ralentir petit à petit. Elle est due principalement à l'apparition des facteurs limitants.

- **Phase stationnaire [29- 67] jours:** au cours de laquelle la biomasse synthétisée se stabilise. La croissance cellulaire semble s'arrêter après 60 jours lorsque la concentration cellulaire maximale est de 1945 mg de poids sec. L<sup>-1</sup> est atteinte. Ces résultats confirment ceux de **Binaghi L., 2003**.

- **Phase de déclin [67- 72] jours:** due généralement à une forte mortalité cellulaire.

#### **4. Suivi du pH durant la croissance de notre souche**

Les données expérimentales montrent que la cyanobactérie a poussé efficacement dans le milieu Zarrouk permettant ainsi une augmentation progressive du pH en fonction du temps (jours), et ce en partant d'une valeur initiale de 9,11 jusqu'à atteindre une valeur maximale de 10,12 au 31<sup>e</sup> jour de la croissance **Figure VII.3**.

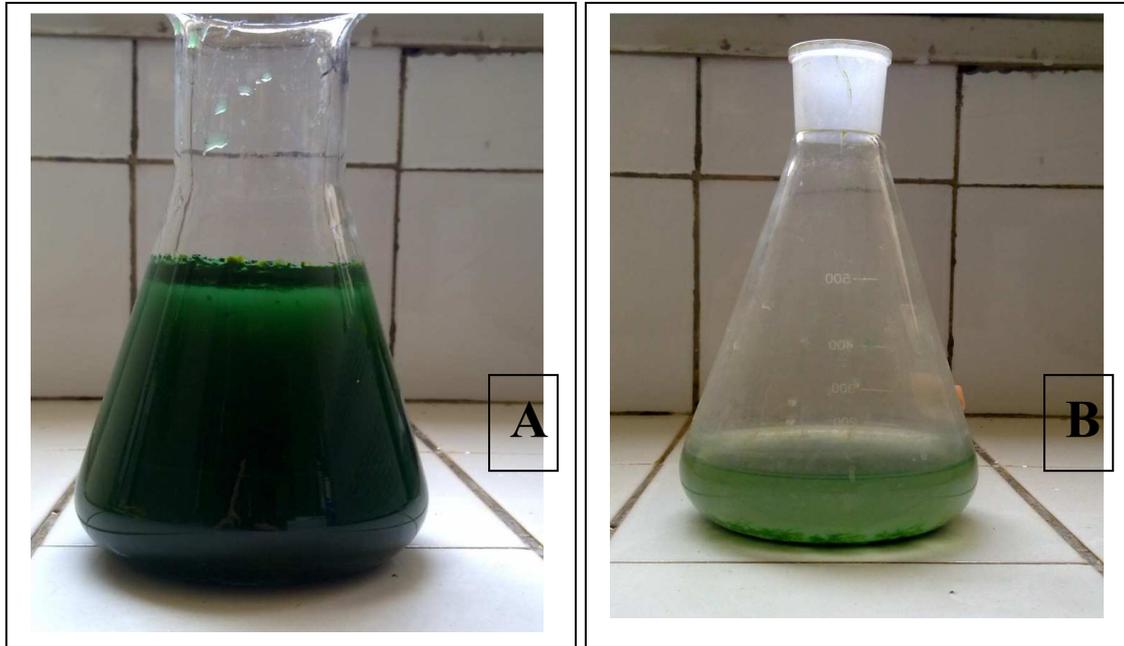


**Figure VII.3. Evolution du pH durant la croissance de *S. platensis***

Selon le modèle de Cezare de fixation du carbone inorganique par cette cyanobactérie, l'augmentation progressive du pH durant la croissance serait due à la libération de 0,5 mole de carbonate et la fixation de 0,5 mole de CO<sub>2</sub> par mole de bicarbonate assimilé (**Cezare, 1998**). Au-delà on assiste à une stabilisation des valeurs de pH qui reste pratiquement constant jusqu'à la fin de la croissance. Il est important de noter que ceci est synchrone avec la phase de décélération de la croissance (*Figure VII.2*). Cela pourrait être expliqué par l'hypothèse émise par **Binaghi et al., (2003)** supposant que la croissance négligeable, observée sous ses conditions alcalines, est raisonnablement justifiée par la capacité de *S. platensis* à assimiler le bicarbonate dont les concentrations sont très faibles aux pH alcalins.

De la courbe d'équilibre du système chimique H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, le bicarbonate est l'espèce dominante dans l'eau à pH ≈ 9. Alors qu'il est presque complètement absent à pH ≈ 11. Par conséquent, une augmentation continue de pH du milieu peut rendre ce phénomène progressivement plus difficile (**Binaghi L., 2003**).

## 5. Comparaison de l'aspect d'une culture jeune et âgée de *Spirulina platensis*



**Figure VII.4. (A): *S. platensis* en culture jeune (phase exponentielle), (B): *S. platensis* en culture vieille (phase de déclin)**

La différence entre une culture jeune (A) en pleine phase exponentielle et une autre âgée (B) en phase de déclin est visible à l'œil nu. En effet, contrairement à la culture (B) dans laquelle la souche est pratiquement précipitée la culture (A) se présente sous forme d'une suspension algale bien homogène. On remarque la présence d'un anneau de biomasse attaché à la surface de la culture (A), due à la flottaison de la souche grâce à ses vacuoles à gaz en bon développement à cet âge. Ceci représente un signe de bon état physiologique de cette dernière.

La couleur de la culture (A) est un bleu-vert fluorescent alors que celle de la culture (B) est un vert clair. Ceci est confirmé par la méthode de **JOHN J.H. (2006)** qui dose les taux de chlorophylle. La concentration anormalement élevée de  $\beta$ -carotène dans les cellules de la culture (B) laisse indiquer que les cellules sont en état de stress.

## VII.2. Effet des conditions expérimentales du milieu sur la production de H<sub>2</sub>

- **Choix du milieu de production**

Après les expériences d'essais des deux milieux de production, nous avons obtenu les résultats consignés dans le Tableau VII.1.

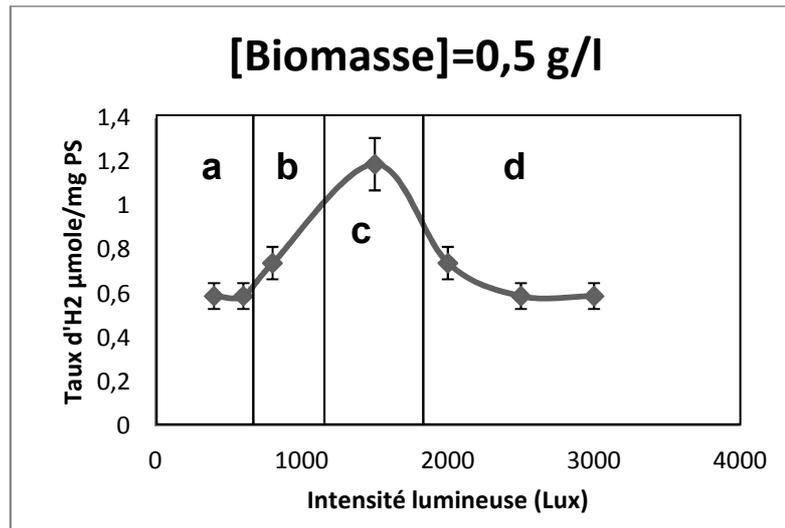
**Tableau VII.1. Production d'hydrogène selon les milieux de production testés.**

Milieu de production	Milieu (1)	Milieu (2)
Taux d'H <sub>2</sub> (μmole/mg PS)	0	1,71

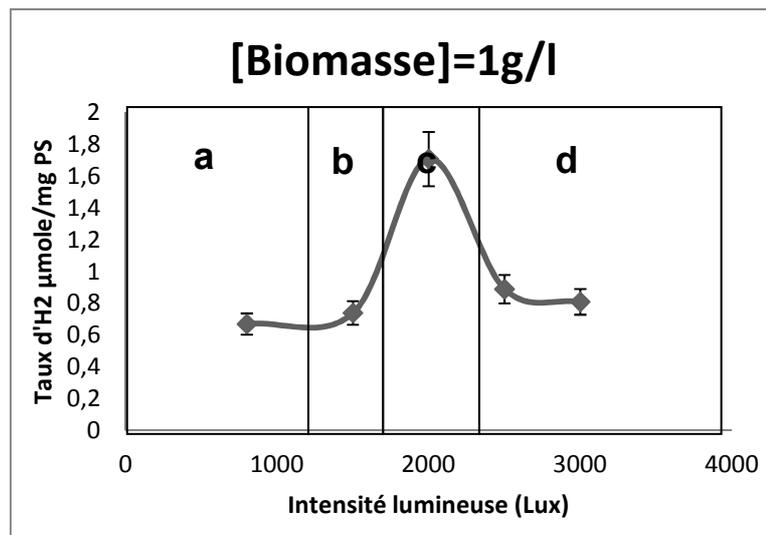
D'après le tableau, nous constatons clairement que le milieu (2), déficient en azote, permet une production de 1,71 μmole d'hydrogène /mg de biomasse sèche. En revanche, dans le cas du milieu (1) pauvre en azote et en soufre, il n'y a aucune génération d'hydrogène. Ces résultats s'expliquent par le fait que le soufre est un élément important dans la biosynthèse de la cystéine responsable de la chaîne de transport d'électrons et ayant une influence directe sur le PSI et le plastoquinone en phase lumineuse (PELMONT J., 1994).

### VII.2.1. Effet de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène

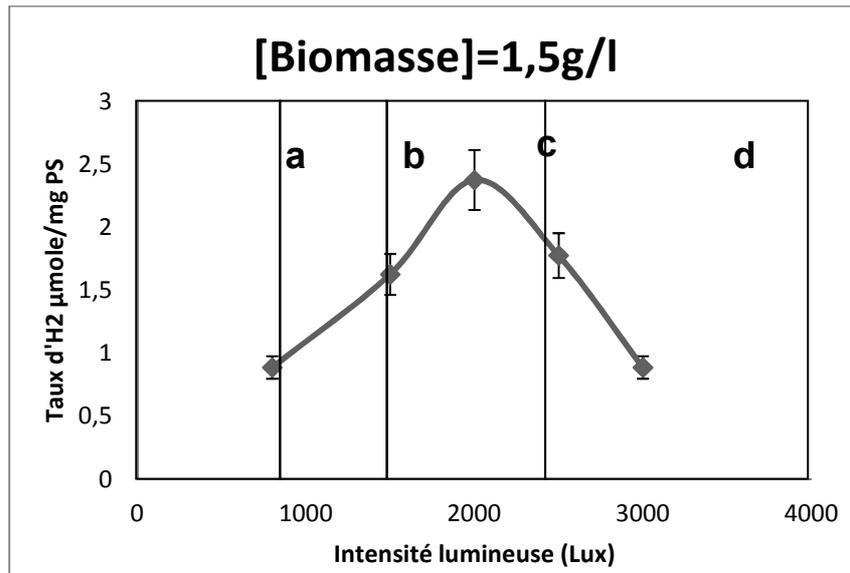
Les résultats sont représentés sur les figures VII.6, VII.7, et VII.8.



**Figure VII.6. Optimisation de la production d'hydrogène à 0,5 g/L de biomasse cellulaire en fonction de l'intensité lumineuse**



**Figure VII.7. Optimisation de la production d'hydrogène à 1 g/L de biomasse cellulaire en fonction de l'intensité lumineuse.**



**Figure VII.8. Optimisation de la production d'hydrogène à 1,5 g/L de biomasse cellulaire en fonction de l'intensité lumineuse.**

Des figures VII.6, VII.7, VII.8 il ressort que l'évolution des volumes d'hydrogène en fonction de l'intensité lumineuse a l'allure d'une gaussienne. La production d'hydrogène augmente proportionnellement avec l'intensité lumineuse pour atteindre son maximum à 1500 Lux pour la concentration de 0,5 g/l, et à 2000 Lux pour les concentrations 1 g/l et 1,5 g/l. Au-delà de ces valeurs optimales, les taux de production diminuent progressivement. Ces résultats sont en parfait accord avec les résultats rapportés par **JAMES C. et al., (2000)**:

**Phase a:** intervalle de faible production d'hydrogène due à l'intensité lumineuse négligeable.

**Phase b:** intervalle de photo- limitation où la production d'hydrogène dépend de l'intensité lumineuse; donc elle augmente proportionnellement avec la lumière.

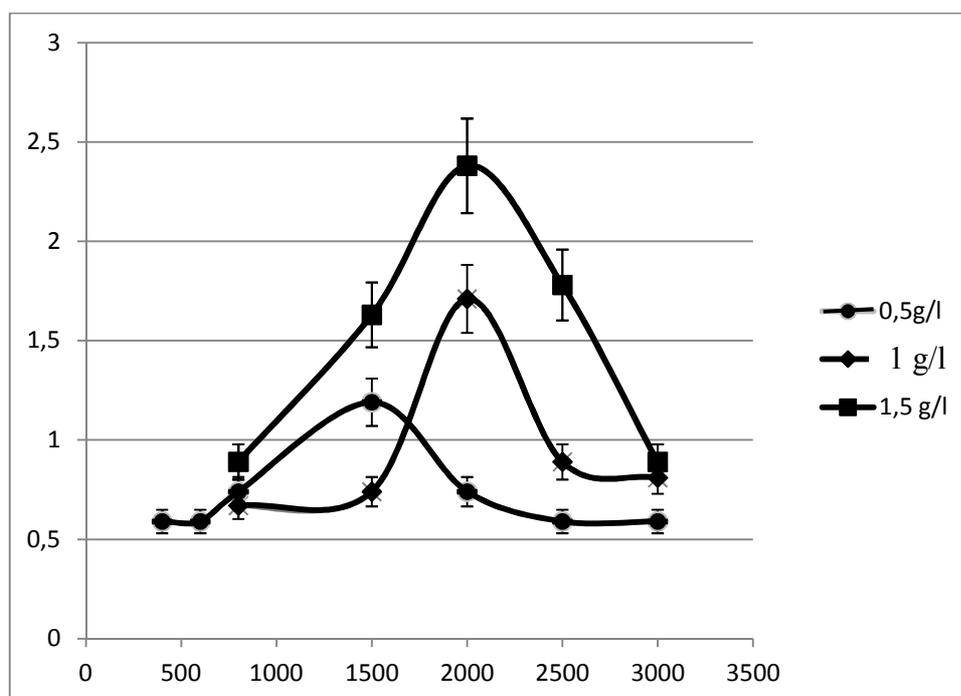
**Phase c:** intervalle de photo- saturation comportant le point optimale de production d'hydrogène, cela peut être expliqué par la saturation des antennes collectrices de lumière par les photons lumineux.

**Phase d:** intervalle de photo- inhibition au cours duquel la production d'hydrogène diminue. Ce qui peut être dû à son inhibition par les fortes intensités lumineuses par la photolyse.

Par ailleurs, la figure VII.9 illustre l'évolution des volumes d'hydrogène recueillis à partir des suspensions de spiruline de 0,5 g/L, 1 g/L et 1,5 g/L en fonction de l'intensité lumineuse. L'analyse de ces résultats met en évidence un optimum de production de H<sub>2</sub> de 2,38 μ mole/mg de biomasse sèche à une concentration de biomasse de 1,5 g/L et sous une intensité lumineuse égale à 2000 Lux. Ce maximum de bio- génération d'hydrogène est fort probablement dû à la bonne diffusion de lumière dans la culture de spiruline.

Bien au contraire, dans le cas de l'exposition des faibles intensités lumineuses aux 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'ombre. Cette hypothèse peut expliquer les faibles taux de production d'hydrogène sous ces conditions (**JAMES C., 2000**).

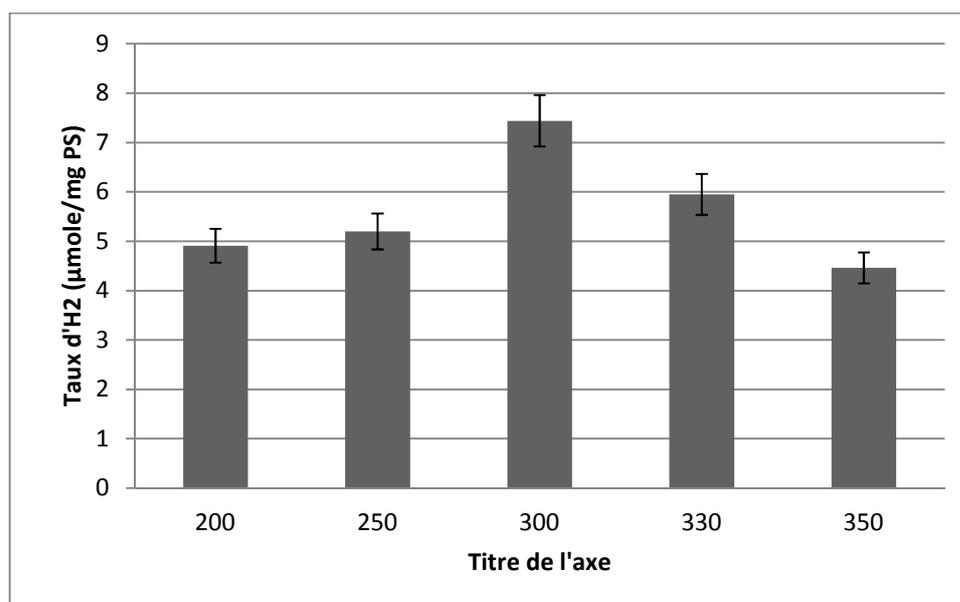
Cette figure met en évidence que l'exposition de faible concentration de biomasse aux fortes intensités lumineuses entraîne une chute de la production d'hydrogène. Il s'agit ici du phénomène de photolyse, survenant dans les cultures de spiruline soumises au froid ou à un éclairage trop fort, qui conduit au stress cellulaire, à la saturation du photosystème II et à une lyse cellulaire (**JOURDAN J. 2006**).



**Figure VII.9. Optimum de production d'hydrogène en fonction de la concentration de biomasse.**

### **VII.2.2. Influence de la concentration en bicarbonate de sodium dans le milieu de production (L-N)**

Nous notons à partir de la figure VII.10 que le taux d'hydrogène augmente proportionnellement à la concentration du bicarbonate dans le milieu de production (L-N) jusqu'à atteindre la concentration de 300 mM qui donne un meilleur taux de production de 7,44  $\mu\text{mole}$  d' $\text{H}_2$ /mg de biomasse sèche. En effet, L'addition du bicarbonate dans le milieu (L-N) favorise les taux de production d'hydrogène (**Antal T.K, et al., 2004**) par entraînement d'une demande plus élevée en ATP afin de maintenir la balance osmotique intracellulaire *via* la pompe  $\text{Na}^+$  ATP- dépendante. Ce qui déclenche une demande précoce par la synthèse anaérobie d'ATP à travers la dégradation du glycogène. Par addition, nous constatons une augmentation et une accélération de la production du NADH et des équivalents réducteurs couplés directement à la synthèse d'hydrogène (**Gennady A., 2008**).

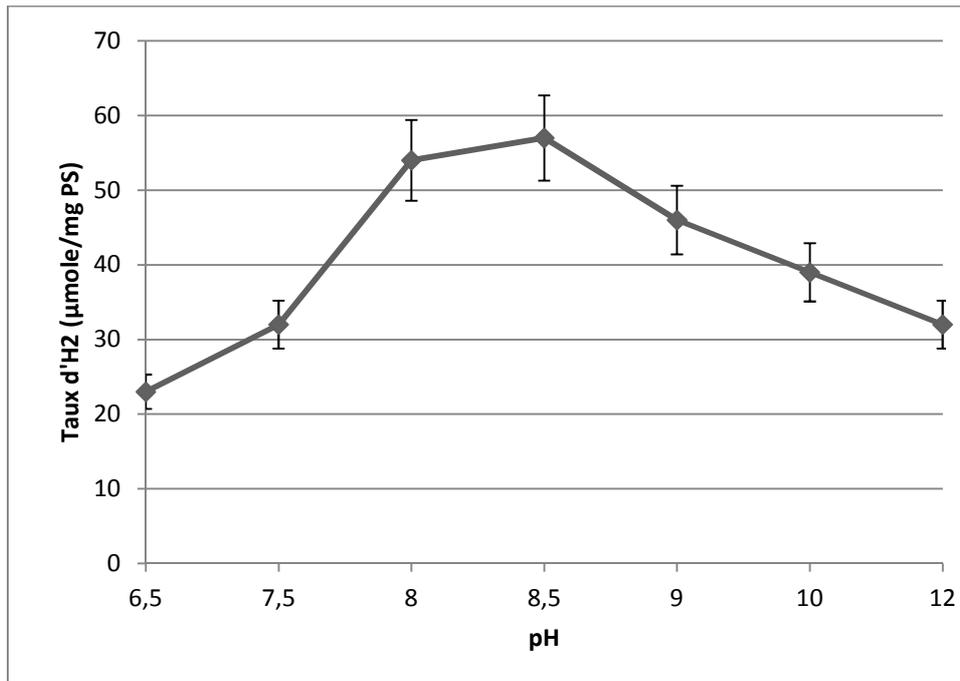


**Figure VII.10. Effet de  $[NaHCO_3]$  sur la production du biohydrogène.**

Au-delà de la concentration optimale, la production d'hydrogène subit une diminution attribuée, ici, à la tolérance du bicarbonate par des cellules algales. Cet effet est lié à la diminution du pH du milieu à des concentrations élevées en bicarbonate (**Kanhaiya K., 2011**). Néanmoins, certains auteurs ont rapporté que des concentrations excédentaires en bicarbonate peuvent affecter l'acquisition du  $CO_2$  par les cellules algales. Le pH du milieu s'alcalinise alors et s'éloigne, de ce fait, du pH optimal (**Kanhaiya K., 2011**). Cependant, d'autres auteurs ont supposé que l'augmentation de la concentration du bicarbonate dans le milieu favorise la fixation du  $CO_2$  qui est une voie consommatrice du NADPH. Ce qui explique la diminution de la production d'hydrogène (**Gennady A., 2008**).

### **VII.2.3. Effet du pH du milieu production (L-N).**

La production d'hydrogène est en fonction du pH du milieu est représentée dans la figure suivante :

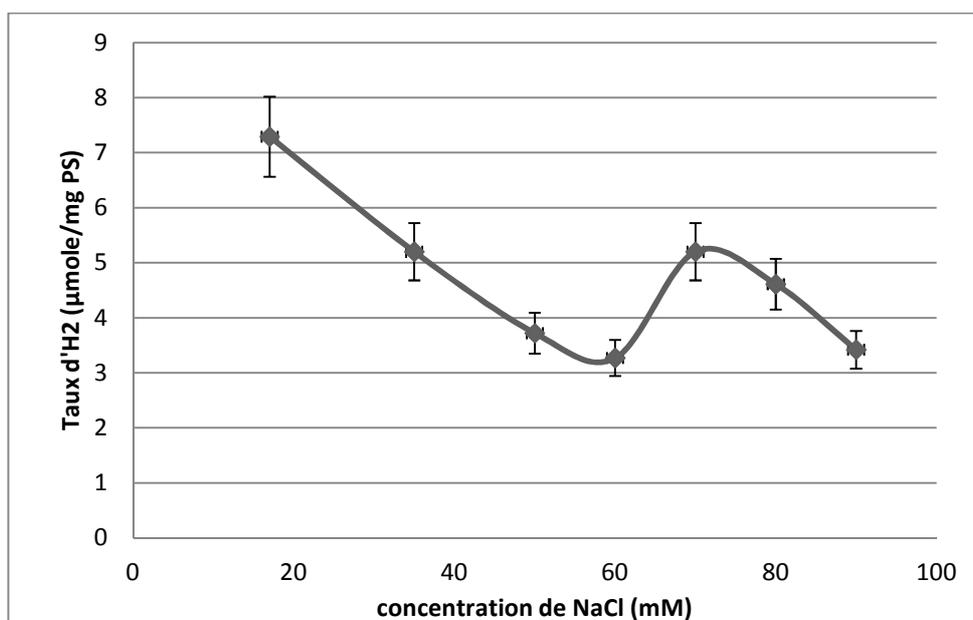


**Figure VII.11. Optimisation du pH de la production d'hydrogène.**

Cette courbe montre que la production d'hydrogène augmente progressivement avec le pH jusqu'à atteindre une valeur maximale de pH 8,5. Ainsi le pH 8,5 du milieu L-N correspond à la meilleure amplitude de production d'hydrogène par rapport au pH physiologique pour la spiruline qui est de [9- 10] (**GENNADY A. et al., 2008**). Les argumentations plausibles au déclin de bio- génération de H<sub>2</sub> sont l'inhibition par les produits acides de fermentation et le changement de pH au moment où l'hydrogénase des cyanobactéries est sensible à l'acidité (**KATSUHIRO A., 1997**).

#### **VII.2.4. Influence de la concentration en NaCl dans le milieu de production (L-N).**

Les résultats présentés sur la figure VII.12 révèle que la production d'hydrogène fluctue fortement avec la concentration de NaCl dans le milieu L-N. En effet, en rajoutant ce sel nous pouvons remarquer que le taux d'hydrogène diminue de 55 %. Il passe de la valeur initiale (7,29 μmole d'H<sub>2</sub>/mg de biomasse sèche) à 17 mM de NaCl à un minimum de 3,27 μmole d'H<sub>2</sub>/mg de biomasse sèche à 60 mM de NaCl. Nous observons ensuite un léger rétablissement de la production d'hydrogène de 30 % à la concentration de 70 mM au-delà de laquelle la production chute une deuxième fois.

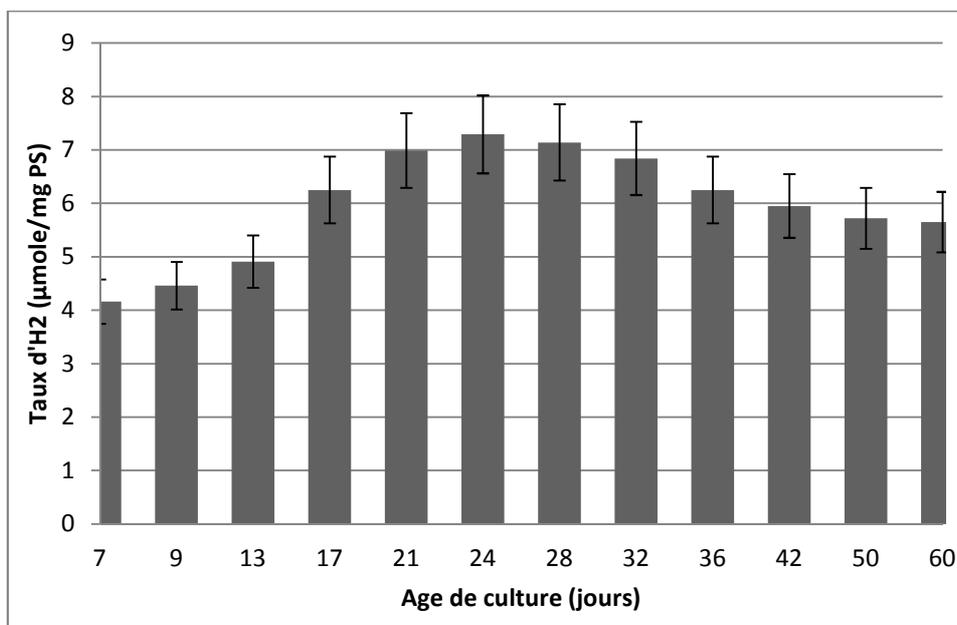


**Figure VII.12. Effet de la concentration du NaCl sur la production du biohydrogène.**

L'addition de NaCl expose la spiruline à un stress de type choc du à la pénétration de ce sel dans la cellule. Le rétablissement de la production jusqu'à un taux maximal de 5,2 µmole d'H<sub>2</sub>/mg de biomasse sèche d'hydrogène est attribué à l'effet inductible de la concentration de NaCl de 70 mM. Cette dernière peut être responsable du déclenchement de l'accumulation de substances osmo-protectrices dans la cellule (glucides, bétaïnes, prolines, glucosyl-glycerol,...) qui maintiennent l'osmolarité interne de celle-ci ainsi que la biosynthèse des pompes ioniques permettant d'évacuer l'excès de sel à l'extérieur de la cellule (**Marin K., 2006; Lucas J., 1997**). Ce point d'inflexion est donc considéré comme étant la concentration inductible de la réponse au stress ionique choc aux concentrations élevées de NaCl (**Rai A.K., 1995**).

#### **VII.2.5. Effet de l'âge de la culture.**

L'âge de la culture de spiruline à une incidence directe sur la bio-production d'hydrogène. En effet, selon **Gennady et al. (2008)** ce paramètre représente le facteur le plus reproductible pour la production d'hydrogène (Figure VII.13).



**Figure VII.13. Effet de l'âge de la culture sur la production d'hydrogène.**

Le maximum de production d'hydrogène est obtenu pour des cultures âgées de 20 à 32 jours. Au-delà de 32 jours la bio-production baisse légèrement. Elle passe de 7,29 à 5,65 µmole d'H<sub>2</sub>/mg de biomasse sèche pour une culture de 60 jours. Cette diminution s'explique par le fait qu'au cours de la production d'hydrogène via le processus:  $2 H^+ + 2 e^- \rightarrow H_2$  le milieu devient basique. Donc non indiqué pour cette étude comme l'a montré le point précédent. Ainsi, cette étude nous a permis de trouver la fourchette de l'âge de la culture cyanobactériale permettant une meilleure production d'hydrogène. On suspecte que les cultures les plus âgées en mode batch seront naturellement dépourvues de nitrate. L'optimum de production d'hydrogène est obtenu au bout de 24 jours c'est à dire dans la phase de ralentissement (**Pei-chung. C et al., (2008).**)

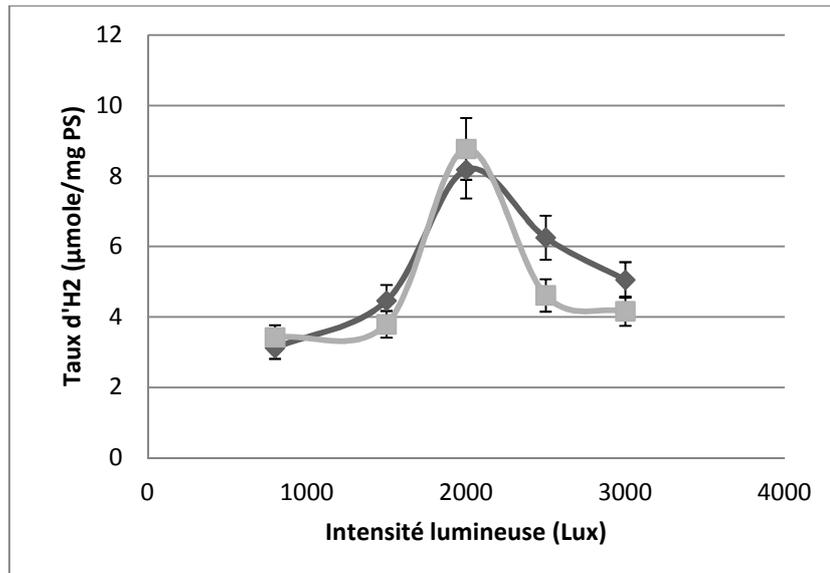
#### **VII.2.6. Effet de la forme du photobioréacteur en fonction de l'intensité lumineuse :**

La lumière est connue comme étant le facteur essentiel gouvernant l'efficacité des photobioréacteurs (PBR). Un PBR est toujours caractérisé par un champ de rayonnement hétérogène dû à l'absorption et la diffusion de la lumière par les cellules en suspension. Ce qui amène à diviser le volume réactionnel en deux zones: une zone dite photonique où les micro-organismes sont exposés à une quantité de lumière suffisante pour assurer la photosynthèse et une zone sombre où cette

quantité est insuffisante pour assurer la croissance photosynthétique. Cet effet diffère selon la forme du photobioréacteur.

### **- Photobioréacteur cylindrique et conique**

La figure VII.14 montre la production d'hydrogène sous différentes intensités lumineuses dans un photobioréacteur cylindrique et conique.



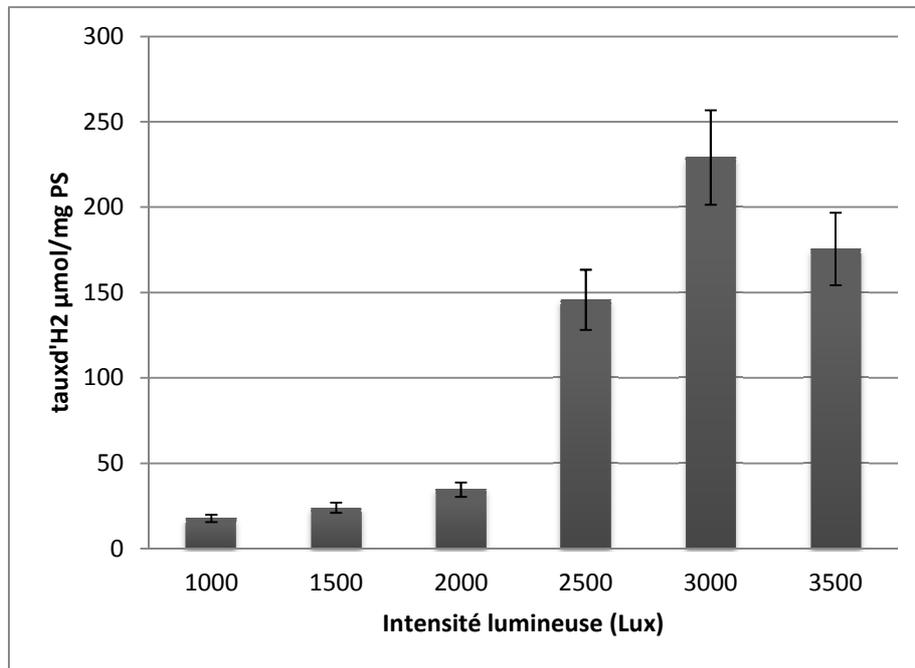
**Figure VII.14. Optimisation de l'intensité lumineuse pour le photobioréacteur cylindrique et conique.**

D'après cette figure on note que l'optimum de production est de 8,77 et de 8,18 µmole d'H<sub>2</sub>/mg de biomasse sèche pour le photobioréacteur cylindrique et conique respectivement, sous une intensité lumineuse de 2000 Lux.

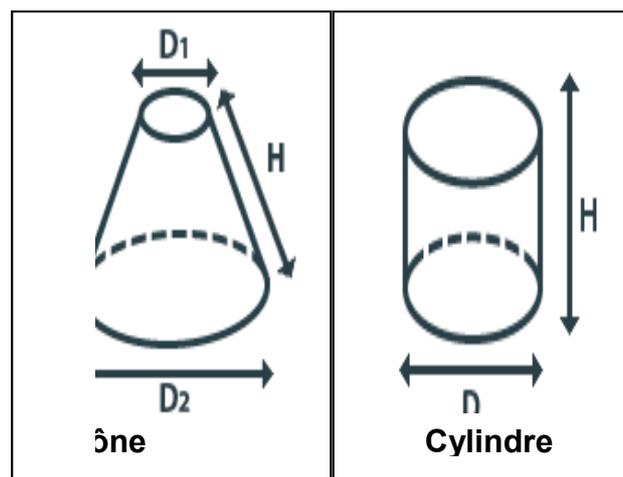
### **-Photobioréacteur conique- plat**

L'histogramme de la figure VII.15 montre la production d'hydrogène sous différentes intensités lumineuses dans un photobioréacteur conique- plat. Nous remarquons que la production d'hydrogène augmente progressivement avec l'intensité lumineuse jusqu'à un optimum avoisinant les 229,16 µmole d'H<sub>2</sub>/mg de biomasse sèche.

Les surfaces spécifiques d'exposition lumineuse de la suspension algale dans les différents photobioréacteurs (Figure VII.16 et Tableau VII.2)



**Figure VII.15. Optimisation de l'intensité lumineuse pour le photobioréacteur conique- plat.**



**Figure VII.16. Schéma de dimensions d'un photobioréacteur conique et cylindrique.**

**Tableau VII.2. Volume d'hydrogène selon la forme du photobioréacteur**

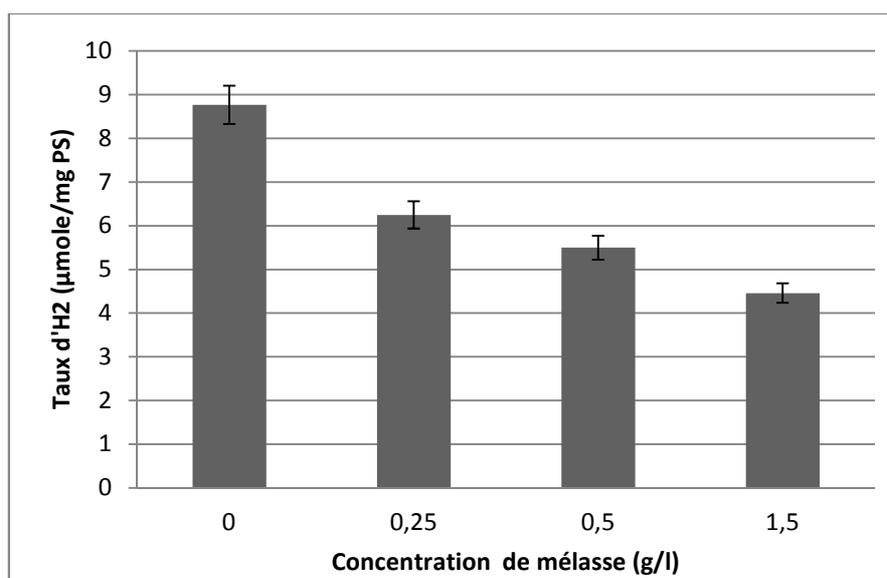
Forme du PBR	Cylindrique	conique	Conique- plat
Volume de H <sub>2</sub> ( $\mu\text{mole d'H}_2/\text{mg PS}$ )	8,77	8,18	229,16.
Surface spécifique ( $\text{m}^{-1}$ )	50	49	82

Nous remarquons que la production maximale d'hydrogène (229,16  $\mu\text{mole d'H}_2/\text{mg PS}$ ) obtenue dans un photobioréacteur conique- plat est très élevée par rapport aux volumes de 8,77  $\mu\text{mole d'H}_2/\text{mg PS}$  et de 8,18  $\mu\text{mole d'H}_2/\text{mg PS}$  obtenues respectivement par le photobioréacteur cylindrique et conique. La surface spécifique de la première forme, valant 50  $\text{m}^{-1}$ , est du même ordre que celle de la deuxième conique dont la valeur est de 49  $\text{m}^{-1}$ . Nous tenons à relever que la production d'hydrogène obtenue par utilisation d'un PBR conique- plat est un résultat très significatif. Ce résultat prometteur est attribué à sa grande surface d'exposition aux rayons lumineux (82  $\text{m}^{-1}$ ).

### **VII.2.7. production d'hydrogène sous l'effet de la mixotrophie.**

#### **1. En présence de la mélasse de betterave sucrière**

Les résultats de l'effet de la mélasse de betteraves sucrières sur la production d'hydrogène sont consignés dans la figure VII.17.



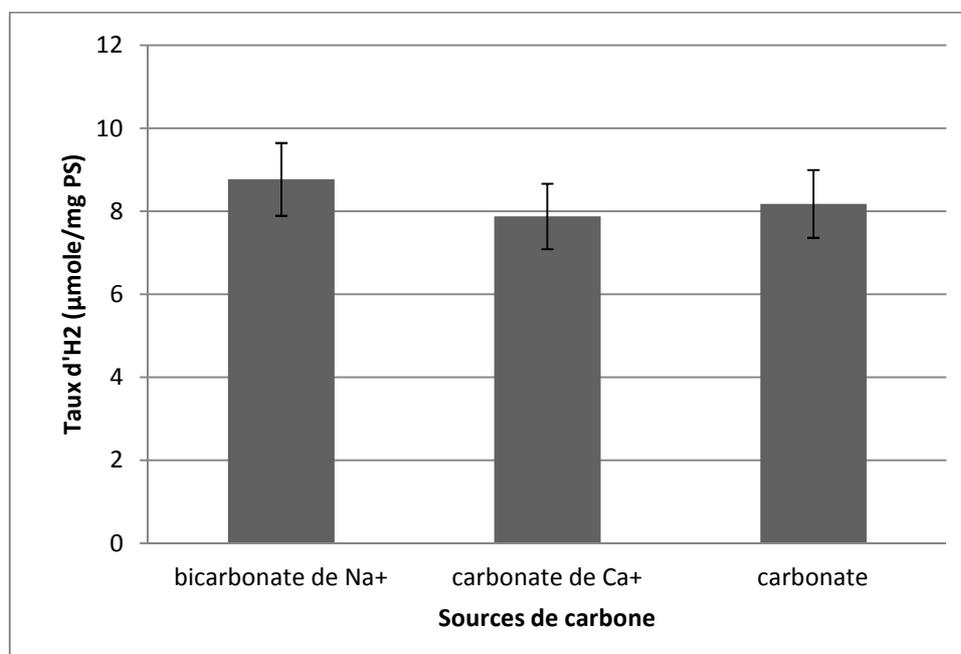
**Figure VII.17. Effet de la mélasse sur la production d'hydrogène.**

D'après la figure VII.17, nous pouvons constater clairement que contrairement à la croissance chez *Spirulina platensis*, stimulé par la mélasse (**Michele R., 2007**). Cette dernière possède un effet inhibiteur sur la production d'hydrogène. Ce résultat est expliqué par la teneur élevée des matières azotées contenues dans la mélasse comprise entre 384 et 656 g/kg MS (**TROCCON J.L., 1989**).

## **2. En présence du carbonate de sodium et du carbonate de calcium**

Dans cette étape, une tentative de production d'hydrogène est réalisée sous différentes sources de carbone minéral ajoutées au milieu de production. Il s'agit de carbonate de sodium et de carbonate de calcium.

La figure VII.18 montre l'effet de l'addition de source de carbone minéral au milieu de production sur le rendement de génération d'hydrogène par *S. platensis*.

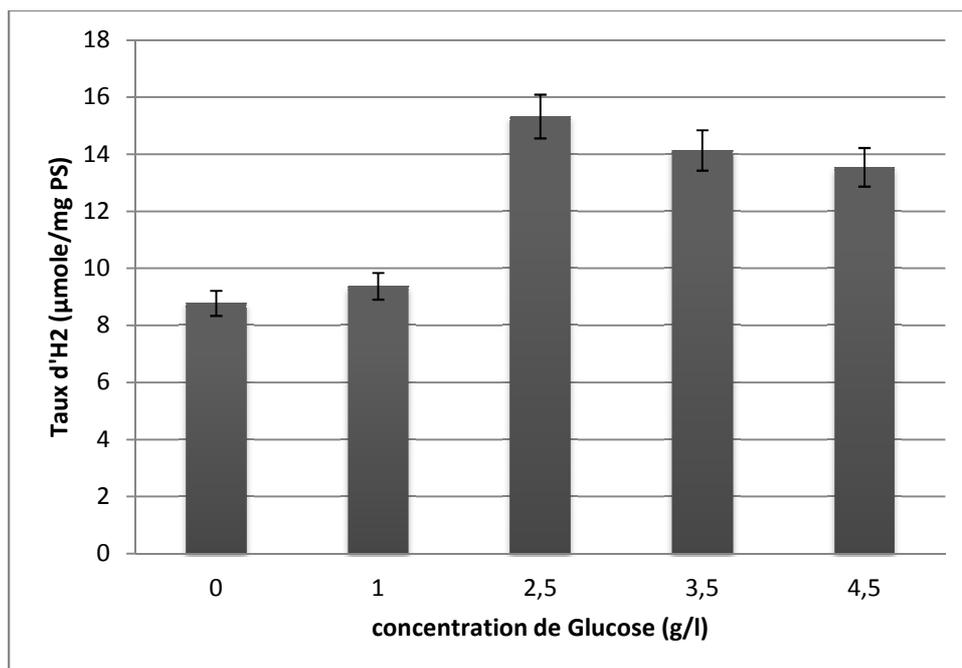


**Figure VII.18. Effet des sources de carbone minérales sur la production d'hydrogène.**

Nous remarquons que l'addition de sources de carbone inorganique au milieu de production n'a pas un effet significatif sur la production d'hydrogène contrairement à la croissance cellulaire (**Shikha M., 2011**).

## 2. En présence du D-glucose

Nous notons que la production d'hydrogène augmente progressivement avec les teneurs en glucose jusqu'à atteindre une valeur optimale de 15,32  $\mu\text{mole d'H}_2$  mg de biomasse sèche pour la concentration de 2,5 g/L du D-glucose. Au delà de cette concentration nous assistons à une diminution de la production d'hydrogène (Figure VII.19).



**Figure VII.19. Effet du D-glucose sur la production d'hydrogène.**

L'effet du glucose réside dans l'inactivation du photosystème II durant la phase lumineuse par le glucose dont l'impact est l'arrêt de la photolyse directe (MYKHAYLENKO N., (2008)). Le mécanisme de répression hexokinase- dépendant joue seulement un rôle partiel dont le résultat est un obstacle du retrait des électrons à partir du centre du PSII. Cette inhibition favorise l'activité de l'hydrogénase et améliore ainsi la production d'hydrogène. En outre, Comme il a été précédemment décrit la production d'hydrogène par cette souche se fait par le biais de l'hydrogénase, en admettant que les sucres jouent le rôle de donneurs d'électrons. Ils peuvent constituer une source des équivalents réducteurs et d'énergie sous forme d'ATP aux microorganismes photosynthétiques (Pei-chung C., 2008). Par

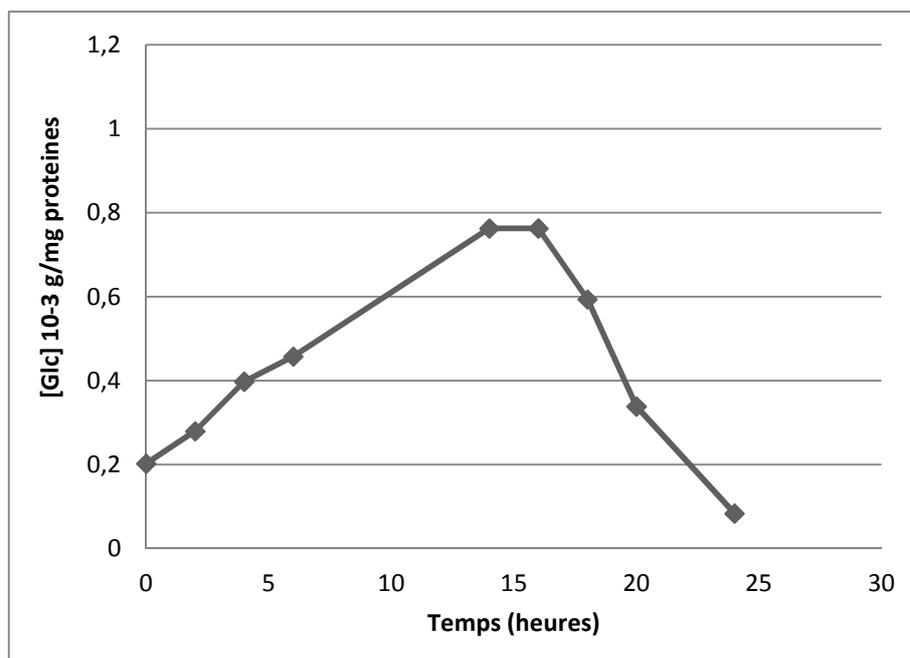
conséquent, pendant la phase lumineuse le glucose est utilisé comme donneur d'électron alimentant la suite de la chaîne photosynthétique (Pei-chung C., 2008). Donc, ce substrat carboné utilisable sous des conditions mixotrophiques par *S. platensis* est fait en faveur de la production d'hydrogène (Shah V. et al., (2001).

### VII.2.8. Effet de la pré-incubation de la souche dans le milieu de production (L-N).

#### 1. Cinétique du glycogène endogène.

##### Fermentation directe

L'évolution du glycogène au cours de la fermentation directe est représentée dans la figure suivante :

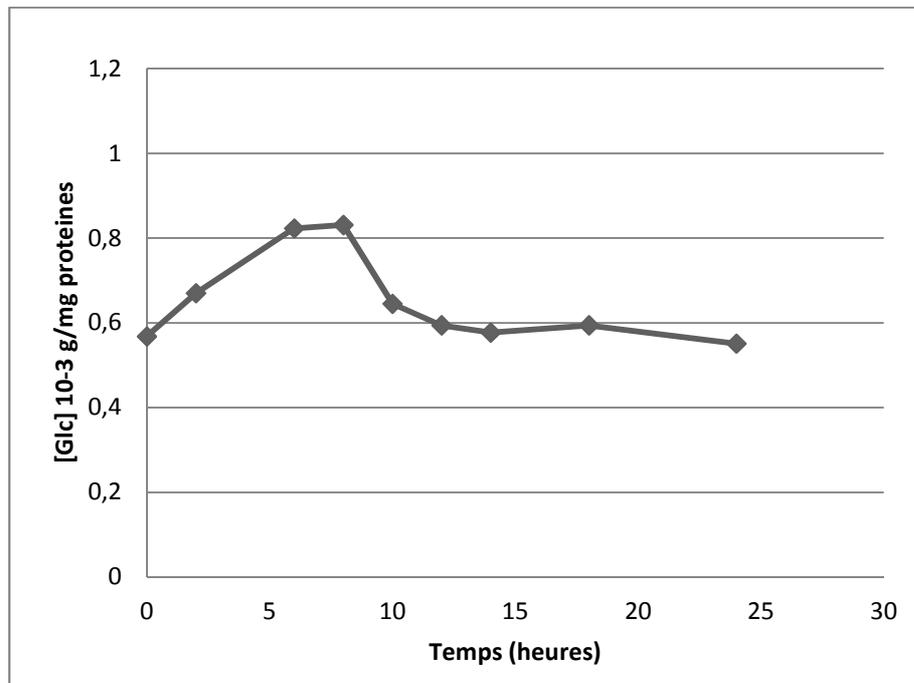


**Figure VII.20. Taux de glycogène endogène de la spiruline sans pré-incubation de la dans le milieu L-N.**

Cette courbe a une allure gaussienne avec une valeur initiale de 0,20 mg/mg de protéines et un maximum de 0,76 mg/mg de protéines au bout de 16 h de fermentation. Ce pic est suivi d'une dégradation totale de ces réserves ce qui pourrait alimenter les voies fermentaires. En effet, le catabolisme du glycogène conduit à

l'accumulation du NADH en excès. Cet excès qui pourrait servir comme alimentation pour l'hydrogénase durant la fermentation (**Gennady, 2008**).

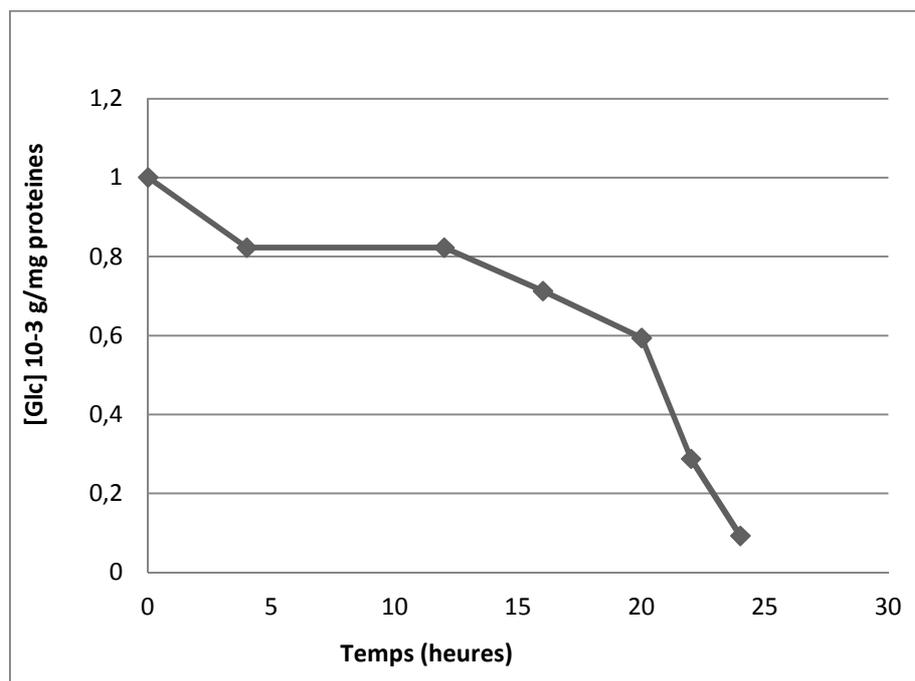
### ***Pré-incubation de 24 heures***



***Figure VII.21. Taux de glycogène endogène après la pré-incubation de la spiruline 24h dans le milieu L-N.***

Nous remarquons que la pré-incubation de la souche pendant 24 h dans le milieu de production (L-N), avant la fermentation, conduit à une accumulation des réserves glucidiques à travers la phase lumineuse de la photosynthèse. La synthèse du glycogène continue au début de la fermentation grâce à la phase obscure de la photosynthèse. La quantité initiale de glycogène notée est de 0,57 mg/mg de protéines. Elle représente une valeur supérieure à celle de la fermentation directe. Nous assistons ensuite à une dégradation des réserves qui se stabilisent vers une valeur de 0,55 mg/mg de protéines.

### Pré-incubation de 48 heures



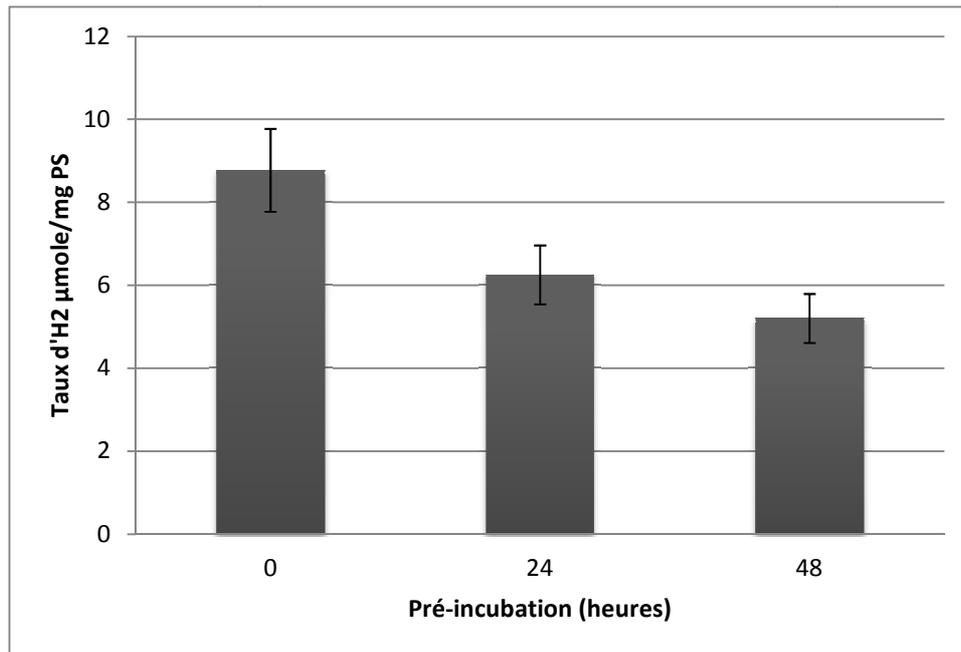
**Figure VII.22. Taux de glycogène endogène après la pré-incubation de la spiruline 48h dans le milieu L-N.**

Nous notons que la pré-incubation de 48 h dans le milieu L-N conduit à une forte accumulation du glycogène. Selon ces résultats, nous constatons que la pré-incubation dans un milieu déficient en azote favorise l'accumulation du glycogène endogène dosé chez la souche *S. platensis*. Ce qui est en accord avec les travaux de **ROBERTO D.P., (1992)**. Les quantités de ces réserves glucidiques sont proportionnelles à la durée de pré-incubation.

Les bactéries dans les conditions d'épuisement d'azote se trouvent dans un état de stress cellulaire. Donc afin d'assurer la survie bactérienne dans ce milieu déficient, elles accumulent les réserves glucidiques à partir du NADPH issu de photosynthèse après l'épuisement des pools métaboliques (ATP, NADHP). Ainsi, le métabolisme des bactéries s'oriente vers une voie catabolique (glycolyse) réserve glucidique et fermentaire pour convertir le pyruvate en acides organiques. (**Lucas J., 1997; Benemann J.R., 2000**).

## **2. Influence de la pré-incubation de la souche dans le milieu de production (L-N) sur la bio-production d'hydrogène.**

Nous relevons, malgré la pré- incubation dans le milieu L-N, un effet positif sur la quantité du glycogène conduisant à des volumes d'hydrogène plus faibles (figure VII.23).

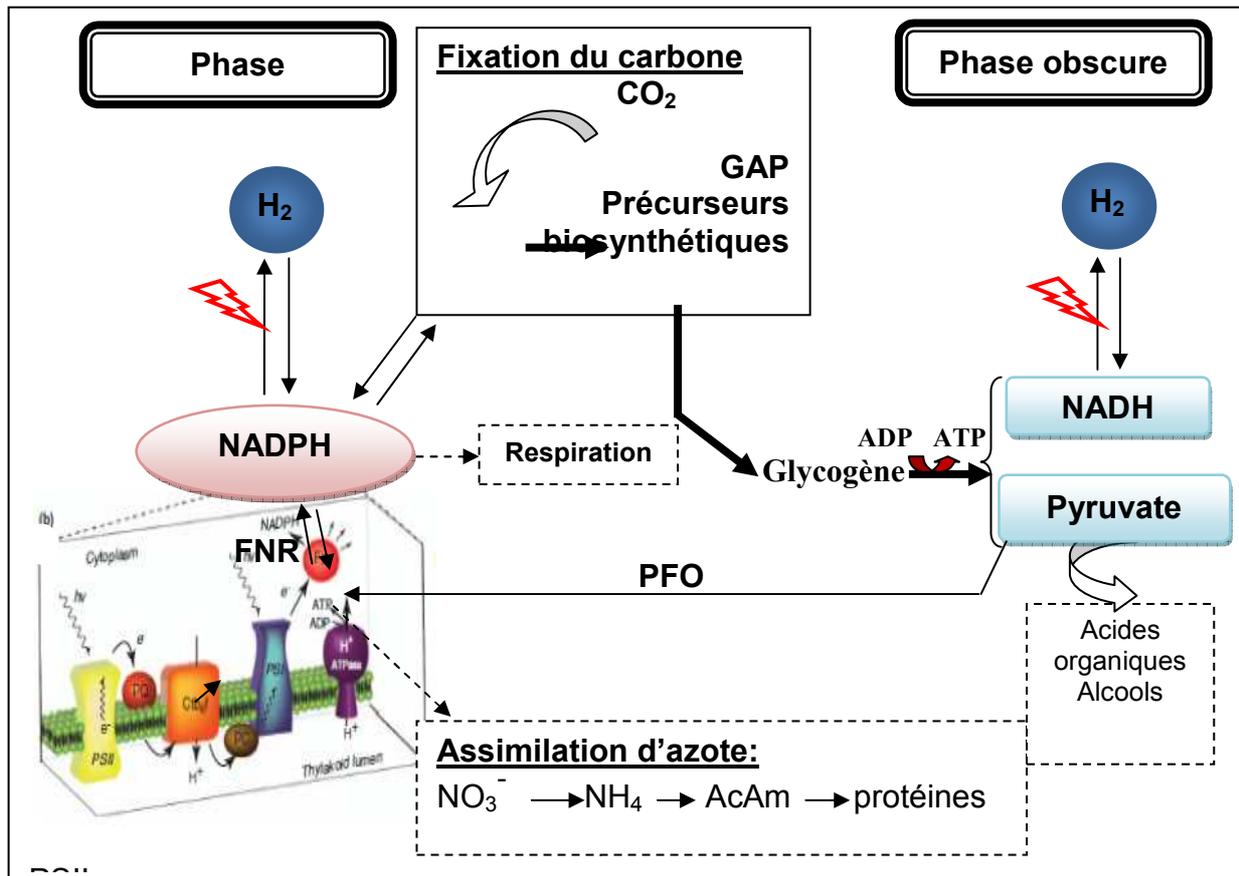


**Figure VII.23. Effet de l'incubation de la spiruline dans le milieu L-N sur la production d'hydrogène.**

La pré- incubation dans le milieu L-N pourrait augmentée les dépenses d'énergie de maintenance afin d'assurer la survie cellulaire par la biosynthèse des parois et des exo-polysaccharides (EPS), la synthèse des capsules de glycocalyx et la formation  $\beta$  poly-hydroxybutyrate qui alimentant pas l'hydrogénase. En effet, le rôle du BHP chez les cyanobactéries est de fournir aux cellules un mécanisme pour l'élimination de l'excès des équivalents réducteurs (NADPH) résultants d'une perturbation de la biosynthèse d'ATP par la photosynthèse (**ROBERTO D.P., 1992**). Donc cette voie constitue peut être un métabolisme compétitif à celui de la production d'hydrogène. Ce qui explique la diminution des rendements d'hydrogène dans le cas de la pré-incubation de la souche dans le milieu (L-N).

### VII.3. Le mécanisme de production d'hydrogène chez *Spirulina platensis*

Certains auteurs considèrent que l'Hydrogénase fonctionne pour éliminer l'excès des équivalents réducteurs dans la cellule (Hermann Bothe et al., 2011; Tolleter et al., 2011).



**Figure VII.24. Origine des équivalents réducteurs et leur contribution à la production d'hydrogène (Gennady, 2008)**

Ce schéma explique la phase lumineuse et la phase obscure de la production d'hydrogène chez *S. platensis* d'une manière prévisible, en terme de disponibilité d'équivalents réducteurs (NADPH et NADH), autrement dit la disponibilité des protons à l'hydrogénase afin d'être réduits en hydrogène, ainsi que les voies compétitives au métabolisme de production d'hydrogène (représenté en traits pointés). La production anaérobie d'hydrogène à l'obscurité par les cyanobactéries non-fixatrices d'azote implique deux processus métaboliques distincts, qui sont reliés

à la production photosynthétique du NADPH et la production fermentative du NADH **(Gennady. A, 2008)**.

Il est plus probable que chez les cyanobactéries l'activité de l'hydrogénase bidirectionnelle se déclenche en obscurité sous des conditions anaérobiques, ce qui a été suggéré par plusieurs auteurs **(Van der Oost et al. 1989)**. La plupart de ces organismes vivent en autotrophie et leurs capacités de dégradation des substrats organiques sont très limitées, donc en présence de lumière elles relisent la photosynthèse tout en accumulant les réserves glucidiques sous forme de glycogène, qui sera ensuite convertie en pyruvate par la voie des pentoses phosphate **(Ernst et al. 1990)**.

Beaucoup de cyanobactéries formants les tapis et les biofilms, se trouvent sous des conditions de limitation en oxygène et à l'obscurité, elles seront donc obligées à consommer leurs réserves glucidiques afin de générer l'ATP nécessaire à leur survie sous ces conditions défavorables, ainsi le pyruvate sera dégradé *via* la pyruvate ferrédoxine oxydoréductase (PFO) ce qui permet la réduction la ferrédoxine, qui à son tour joue le rôle de donneur d'électrons au NADPH à l'aide de la NADPH-ferrédoxine oxydoréductase (FNR). Puisque l'oxygène nécessaire pour l'utilisation respiratoire du NADPH est absent, ce dernier sera utilisé par l'hydrogénase bidirectionnelle tout en produisant l'hydrogène qui sera ensuite libéré dans la phase gazeuse **(Schmitz et al. 2001)**.

À présent, il est retenu que plus d'un tiers de la production d'hydrogène stocké sous forme de réserves glucidiques peut être achevée *via* la fermentation obscure **(Thauer, 1977)**. Ainsi l'Hydrogénase bidirectionnelle doit avoir un rôle essentiel dans l'obscurité et sous les conditions de limitation en oxygène afin d'éviter la sur-réduction cellulaire, pour cela un ratio de  $\text{NADPH} / \text{NADP}^+ \approx 100$  est atteint sous ces conditions afin de permettre la production d'hydrogène par l'Hydrogénase bidirectionnelle **(Hermann Bothe et al, 2011)**

Ensuite, en présence de lumière la production d'hydrogène continue *via* le plastoquinone (PQ), tout en étant entretenue par le PSI **(YASUO. A, 1999)** **(Benemann, 1998)**. Donc globalement l'hydrogène peut être généré par le processus de biophotolyse indirecte *via* la chaîne photosynthétique de transport

d'électron à l'aide de la ferrédoxine réduite, la NADPH ferrédoxine oxydoréductase (FNR), NADPH, et l'Hydrogénase bidirectionnelle (**Hermann Bothe et al, 2011**). En outre, on suppose que l'évolution d'hydrogène est une voie majeure de génération d'énergie durant la fermentation avec un rôle d'un accepteur final d'électrons durant le métabolisme anaérobique; ce rôle permet la régénération du  $\text{NAD}^+$  par l'hydrogénase tout en produisant l'hydrogène, ce qui est essentiel pour le maintien du flux des équivalents réducteurs à partir du glycogène *via* la glycolyse et d'autres substrats de catabolismes (**Gennady. A, 2008**).

Plusieurs travaux de recherche ont montré qu'un "éclatement" de production d'hydrogène est constaté lorsque les cyanobactéries sont exposées soudainement pendant quelques minutes à une haute intensité lumineuse (**Appel et al. 2000; Cournac et al. 2004; Ludwig et al. 2006**). Cela est une simulation des conditions extrêmes que ces microorganismes peuvent affronter dans leur milieu naturel, par conséquent, les cyanobactéries peuvent être forcées à produire l'hydrogène continuellement lors de leur exposition à de fortes intensités lumineuses. Donc cette voie métabolique de production d'hydrogène, représente une voie majeure de production d'énergie, en réponse aux perturbations environnementales et nutritionnelles (**Gennady. A, 2008**).

#### **VII.4. Production d'hydrogène par *Spirulina platensis* sous les conditions optimales :**

Comme il a été déjà cité par **Asada et al (1998)**, les espèces de *Spirulina* ont démontré les taux les plus élevés de production de l'hydrogène parmi toutes les cyanobactéries testées, et notre étude vient également de le confirmer. En effet, notre souche *S. platensis* mise sous les conditions optimales de productions d'hydrogène à savoir : un pH de 8,5 du milieu de production déficient seulement en azote, une concentration de biomasse de 1,5 g/l, une concentration de bicarbonate de sodium de 300 mM, en utilisant une culture ayant un âge de 24 jours ; on a obtenu un taux maximal de production d'hydrogène **8,77  $\mu\text{mole/mg}$**  de biomasse sèche correspondant à de **19,667  $\mu\text{l/heure/mg}$**  de poids sec.

Par la comparaison de notre taux maximal de production d'hydrogène qui est de **0,3 ml d' $\text{H}_2$ /ml** de suspension cellulaire; à ceux donnés par les autres souches testées

on remarque qu'il est supérieur à celui de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (**0,26 ml d'H<sub>2</sub>/ml de suspension cellulaire**). Notant que cette supériorité de capacité de génération d'hydrogène par notre cyanobactérie est remarquable au niveau intra-générique et intra-spécifique. En effet, pendant que la productivité de *S. maxima* sous pratiquement les mêmes conditions expérimentales n'était que de **13,3 ml d'hydrogène/g de poids sec/ jour** (A. Gennady, 2008) et celle de *S. platensis* n'est que 2 µmole/mg de poids sec (A. Katsuhiko, 1997); notre souche *S. platensis* a démontré une productivité de **472 ml d'hydrogène/g de poids sec/ jour** soit **8,77 µmole/mg de poids sec**. De plus, en additionnant le D-glucose au milieu de production sous les conditions normales, la production d'hydrogène par notre souche *S. platensis* s'est élevée à **15,32 µmole/mg** de biomasse sèche soit une productivité de **247,2 ml d'hydrogène/g de poids sec/jours** pour une concentration de D-glucose de 2,5 g/l.

Cependant, la productivité la souche CA d'*Anabaena spp* ainsi que celle de *Rhodospseudomonas capsulata*, qui est de **80 µl et 130 µl/heure/mg de poids sec** respectivement, est nettement supérieur à celle de *S. platensis* qui est de **19,667 µl/heure/mg** de poids sec (P. Hillmer, 1977) (X. ZHANG, 1983). Le tableau ci-dessous illustre les rendements de production d'hydrogène par différentes souches testées par rapport à celui de *S. platensis*:

**Tableau VII.3. Tableau récapitulatif des taux de production d'hydrogène de *S. platensis* par rapport aux cyanobactéries testées.**

<b>Unités souche</b>	ml H <sub>2</sub> /g de poids sec/ jour	µl H <sub>2</sub> /heure/mg de poids sec	ml d'H <sub>2</sub> /ml suspension algale	µmole/mg de poids sec
<b><i>Spirulina platensis</i></b>	<b>~472</b>	<b>~19,667</b>	<b>~0,295</b>	<b>8,77</b>
<i>S. platensis</i>				<b>2</b>
<i>S. maxima</i>	13,3	~0,554	/	/
<i>Anabaena spp</i>	/	80	/	/
<i>Rhodospseudomonas capsulata</i>	/	130	/	/
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	/	~2,5	0,26	/

# *Conclusions Générales*

## Conclusions générales

L'objectif de notre travail était de conduire la bio-production de l'hydrogène à partir d'une cyanobactérie photosynthétique non fixatrice d'azote, *Spirulina platensis*. Pour cela, différents paramètres expérimentaux ont été testés, tels que: l'effet de l'intensité lumineuse sur la concentration de biomasse, l'effet du bicarbonate de sodium, de NaCl, du pH, du milieu de production ainsi que l'âge de la culture sur la bio- génération de H<sub>2</sub>. Nous avons également étudié l'effet de la mixotrophie sur les taux de production d'hydrogène en présence de trois sources carbonées, la mélasse de betterave, le D-glucose, le carbonate de sodium et le carbonate de calcium. En outre, nous avons examiné la variation de la génération d'hydrogène par notre souche ainsi que les taux du glycogène endogène après avoir subi une étape antérieure de pré-incubation de la souche dans le milieu de production.

Trois photobioréacteurs clos ont été utilisés: un PBR cylindrique, un PBR conique manuellement agités et un troisième de forme conique- plate unique à circulation interne. Ce dernier est conçu spécialement dans le but d'améliorer la production d'hydrogène par notre souche *Spirulina platensis* grâce à ses avantages.

La micro- algue, recueillie à partir de la *sabkha* de Tamanrasset, a subi un bon développement et une bonne adaptation dans le milieu de culture minéral Zarrouk avec le bicarbonate de sodium comme seule source de carbone sous une lumière de 2500 Lux et une température modérée de 30 °C. Ce qui nous a permis de définir une courbe avec un taux de croissance maximale 0,07 j<sup>-1</sup>.

La production d'hydrogène a été effectuée à partir de la souche *Spirulina platensis* sous des conditions opératoires spécifiques en essayant deux milieux Zarrouk modifiés, l'un déficient en azote et en soufre et l'autre dépourvu seulement d'azote. Ce travail nous a amené aux conclusions suivantes:

- Le milieu adéquat à la production d'hydrogène était celui dépourvu seulement en azote car le soufre contribue à la composition des protéines de la chaîne de transport d'électron intervenant dans le processus de bio-production d'hydrogène.

- La concentration de biomasse de 1,5 g/L a démontré une production maximale d'hydrogène de 8,77  $\mu\text{mole d'H}_2/\text{mg}$  de biomasse sèche sous une lumière de 2000 Lux. Pour les trois formes de PBR, l'augmentation de l'intensité lumineuse est en faveur à la production d'hydrogène par *Spirulina platensis* avec, tout de même, un optimum de production du à une saturation des PS observée vers 2000 Lux pour les PBR cylindrique/conique et aux alentours de 3000 Lux pour la forme conique- plate. Les intensités lumineuses trop élevées causent le phénomène de photolyse et conduisent à de faibles taux de production d'hydrogène.

Nous avons constaté qu'il existe une relation étroite entre la composition du milieu de production et les taux d'hydrogène. En effet, la production d'hydrogène atteint son maximum en augmentant la concentration de  $\text{NaHCO}_3$  jusqu'à 300 mM à un pH optimale de 8,5 mais à des concentrations excédentaires la productivité diminue. L'optimum de production d'hydrogène est enregistré pour une concentration de NaCl de 17 mM au-delà de laquelle nous avons assisté à une diminution de la productivité qui est attribué au stress de la Spiruline. Puis à des concentrations élevée en NaCl, nous notons un rétablissement de la production du, éventuellement, à l'induction de la biosynthèse des molécules osmoprotectrices qui maintiennent l'osmolarité interne des cellules.

L'étude de la production d'hydrogène en fonction de l'âge de la culture nous a révélée que les cultures ayant un âge compris entre 20 et 32 jours donnent les meilleurs taux de production avec un optimum pour l'âge de 24 jours. Cet intervalle est synchrone avec la phase exponentielle de croissance où a été enregistré le taux maximal de croissance. La production d'hydrogène étant proportionnelle au contenu cellulaire en pigments photosynthétique. Ce résultat a été confirmé par le dosage de la chlorophylle a. En effet, nous avons trouvé qu'à cet âge la souche se trouve à son état physiologique idéal; et contient une concentration maximale en *chlorophylle a* de 1,447  $\mu\text{g/mL}$ .

L'addition d'autres sources de carbone minéral au milieu de production autres que le  $\text{NaHCO}_3$  tels que le carbonate de sodium et de calcium n'a pas un effet significatif sur la production d'hydrogène. Cependant, la mélasse a entraîné une

diminution de la production d'hydrogène due probablement à la richesse de cette source carbonée en azote qui est en défaveur à la production d'hydrogène comme préalablement prouvée. Cet effet est dose- dépendant. Pendant que le D-glucose a induit une augmentation de la production d'hydrogène jusqu'à 15,32  $\mu\text{mole/mg}$  de biomasse sèche. Nous avons révélé qu'une forte accumulation du glycogène endogène est produite suite à la pré-incubation de la souche dans le milieu de production (L-N) et la quantité des réserves glucidiques est proportionnelle à la durée de la pré-incubation. Toutefois, elle a un effet négatif sur le taux d'hydrogène.

En perspective, il serait intéressant de produire l'hydrogène en mode continu afin d'éviter les contaminations dues au changement du milieu, la recherche de souches résistantes ayant des capacités de production d'hydrogène plus élevée par la sélection aléatoire à l'aide d'agents mutagènes. D'autres approches visent à étudier et à développer des souches par le génie génétique afin de développer des mutants en PSII ou ayant des hydrogénases tolérantes à l'oxygène.

La bio-production d'hydrogène est très prometteuse dans un photobioréacteur conique-plat. Des études supplémentaires doivent être effectuées sur ce dernier (design du PBR, par exemple) afin de maximiser la production d'hydrogène ainsi que la production de biomasse à grande échelle. L'utilisation de différentes matrices solides pour l'immobilisation des cellules entières constitueront également des moyens intéressants pour des taux de production d'hydrogène plus élevés en utilisant des matières premières à faible coût couplé à l'amélioration de ce processus biologiques va sûrement le rendre plus compétitif aux procédés conventionnels de génération d'hydrogène dans un prochain avenir.

*Références*  
*Bibliographiques*

- Adams, M.W.W. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim Biophys Acta*, 1990;1020:115–145.
- Akkerman I, Janssen M, Rocha J, Wijffels RH. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002; 27:1195-1208.
- Akkerman I, Janssen M, Rocha J, Wijffels RH. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2002; 27:1195-1208.
- An. J.Y et Kim .B.W. Biological desulfuration in an optical-fiber photobioreactor using and automatic sunlight collection system. *Journal of biotechnology*, 2000; 80, p. 35-44.
- Antal TK, Lindblad P: Production of H<sub>2</sub> by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *Journal of Applied Microbiology* 2005; 98:114-120.
- Appel JSP, Steinmüller K and Schulz R. The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch Microbiol*, 2000; 173: 333–338.
- Asada Y, Miyake J. Photobiological hydrogen production. *J Biosci Bioeng*, 1999; 88:1-6.
- Avigad Vonshack. *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor and Francis e-Library, 2002.
- Balloni W., Tomasselli S., Giovannetti and Margheri M. C. *Biologia fondamentale del genera Spirulina*, in Materassi R. (ed) *Prospective della coltura di Spirulina in Italia*. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Rome, 1980; 49-85.
- Bartelings H, van Beukering P, Kuik O, Linderhof V, Oosterhuis F, Brander L, Wagtendonk A. Effectiveness of landfill taxation, report prepared for the Dutch Ministry of Housing, spatial planning and the environment, Institute for Environmental Studies, 2005.
- Benemann John R. *Biohydrogen Production: Final Summary Report*, 2000.
- Benemann, J. R. *Process Analysis and Economics of Biophotolysis of Water*, 1998.
- Berry, G.D., Pasternak, A.D., Rambach, G.D., Smith, J.R., Schock, R.N. Hydrogen as a future transportation fuel. *Energy*, 1996; 21:289–303.
- Binaghi . L., A. Del Borghi, A. Lodi, A. Converti, M. Del Borghi. Batch and fed-batch of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. *Process Biomechemistry*, 2003; 38: 1340-1346.
- Bolton, J. R. September. *Solar Photoproduction of Hydrogen*. IEA Technical Report, IEA Agreement on the Production and Utilisation of Hydrogen, 1996.
- Borchers AT, Belay A, Keen CL, Gershwin ME. *Spirulina and Immunity In Spirulina in Human Nutrition and Health*. Gershwin & Belay (ed.), CRC Press, 2007; 177-193.
- Borowitzka MA, Borowitzka LJ. *Micro-Algal biotechnology*. New York: Cambridge University Press, 1988: 477 pp.
- Briend A. *La malnutrition de l'enfant*. Institut Danone, Bruxelles, 1998; 163 p.
- Buntkowsky, G., Walaszek, B., Adamczyk, A., Xu, Y., Limbach, H.-H., Chaudret, B. Mechanism of nuclear spin initiated para-H<sub>2</sub> to ortho-H<sub>2</sub> Conversion. *Phys Chem Chem Phys* ,2006; 16:1929–1935.
- Caglar, A., Ozmen, H. Hydrogen: as an attractive fuel in future. *Energy Edu Sci Technol*, 2000; 6:1–18.

Calathea.S comment produire l'hydrogène, 2005.

Campanella L, Crescentini G, Avino P. *Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on Spirulina*. *Analisis*, 1999; 27: 533-540.

Carrieri D, Ananyev G, Garcia Costas AM, Bryant DA, Dismukes GC. Renewable hydrogen production by cyanobacteria: nickel requirements for optimal hydrogenase activity. *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33(8):2014–2022.

Castenholz RW, Rippka R, Herdman M, Wilmotte A. Form-genus I. *Arthrospira* Stizenberger. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (D. R. Boone & R.W. Castenholz, eds.), 2001; 1: 542-543.

castenholz, R.W., and WATERBURY, J.B. Oxygenic photosynthetic bacteria. Section 19, In: Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., Holt, J.G., Eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3, Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, 1989; pp 1710-1806.

Cezare, E.A. Contribuição ao estudo da produção de biomassa de *S. platensis* empregando uréia como fonte de nitrogênio por meio de processo descontínuo alimentado. MSc Thesis. University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, 1998.

Chamorro, G., Salazar, M., Favila, L., and Bourges, H.. *Farmacología y toxicología del alga Spirulina*. *Rev Invest Clin*, 1996; 48:389-399.

Chen X, Sun Y, Xiu Z, Li X, Zhang D. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *Int J Hydrogen Energy*, 2006; 31:539–549.

Christophe Hug & Denis von der Weid. La spiruline dans la lutte contre la malnutrition. *Bilan et perspectives : Fondation Antenna Technologies*, 2011.

Ciferri O. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*, 1983; 47: 551-578.

Cogne G, Lehmann B, Dussap CG, Gros JB. *Uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium Spirulina platensis under photoautotrophic conditions: Culture medium optimization*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003; 81: 588-593.

Cohen Z, Reungjitchachawali M, Siangdung W, Tanticharoen M. *Production and partial purification of  $\gamma$ -linolenic acid and some pigments from Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 1993; 5: 109-115.

Collet C, Adler N, Schwitzguebel J-P, Peringer P. Hydrogen production by *Clostridium thermolactum* during continuous fermentation of lactose. *Int J Hydrogen Energy*, 2004; 29:1479–1485.

Cornet.J.F. Calculation of optimal design and ideal productivities of volumetrically-lightened photobioreactors using the structural approach. *Chem.eng.sci*; 2010; 65, p. 985-998.

Cournac L, Guedeney G, Peltier G and Vignais PM. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp strain PCC 6803 deficient in the type I NADH dehydrogenase complex. *J Bacteriol*, 2004; 186: 1737–1746.

Das D, Dutta T, Nath K, Kotay SM, Das AK, Veziroglu N. Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production. *Curr Sci*, 2006; 90:1627–37.

Das, L.M. Hydrogen–oxygen reaction mechanism and its implication to hydrogen engine combustion. *Int J Hydrogen Energy*, 1996; 21:703–715.

Davila-Vazquez G, Arriaga S, Alatraste-Mondragón F, de León-Rodríguez A, Rosales-Colunga LM, Razo-Flores E. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 2008a; 7(1):27–45.

- Demirbas Ayhan. Biohydrogen For Future Engine Fuel Demands, 2009.
- Demirbas, A. Fuel properties of hydrogen, liquefied petroleum gas (LPG), and compressed natural gas (CNG) for transportation. *Energy Sources*, 2002; 24:601–610.
- Demirbas, A. Yields of hydrogen of gaseous products via pyrolysis from selected biomass samples. *Fuel*, 2001; 80:1885–1891.
- Devlin, R. *Fisiología Vegetal*. 3<sup>ra</sup>. ed. Editorial Omega, Barcelona, España, 1975; pp. 189-215.
- Dutta. D, Debojyoti De, Surabhi Chaudhuri et Sanjoy K Bhattacharya. Hydrogen production by Cyanobacteria. *Microbial Cell Factories*, 2005.
- Ellenor Olsson, Marie Holmquist, Åsa Nossed, Peter Lindblad. Assembly of a functional cyanobacterial hydrogenase. Department of Physiological Botany EBC, Uppsala Universitet: Sweden, 2005.
- Ernst A, Reich S and Böger P. Modification of dinitrogen reductase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* due to C-starvation and ammonia. *J Bacteriol*, 1990; 172: 748–755.
- Falquet J, Hurni JP. *Spiruline, Aspects Nutritionnels*. Antenna Technologies, Genève. 2006: 41 p.
- Fang HHP, Liu H, Zhang T. Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater. *Int J Hydrogen Energy*, 2005; 30:785–793.
- Fay P: Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol Rev* 1992; 56:340-373.
- fermentation. *Microbiol Biotechnol*, 2007;1:107–25.
- Flores. E, J. E. Frias, L. M. Rubio. A. Herrero. Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynth. Res*, 2005; 83: 117-133.
- Fox. R. D. *Spiruline: Technique pratique et promesse*. EDISUD, Aix-en-Provence, 1999.
- Franchi E, Tosi C, Scolla G, Penna GD, Rodriguez F, Pedroni PM. Metabolically engineered *Rhodobacter sphaeroides* RV strains for improved biohydrogen photoproduction combined with disposal of food wastes. *Mar Biotechnol*, 2004; 6:552–565.
- Gennady. A, Damian. C, et G. Charles Dismukes. Optimization of metabolism capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the cyanobacterium “*Arthrospira* (Spirulina) *maxima*”. *Applied And Environmental Microbiology*, Oct. 2008, p. 6102-6113.
- Ghirardi ML, Posewitz MC, Maness P-C, Dubini A, Yu J, Seibert M. Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms. *Annu Rev Plant Biol*, 2007;58:71–91.
- Gibson RS. *Zinc: the missing link in combating micronutrient malnutrition in developing countries*. Proceedings of the Nutrition Society, 2006; 65: 51-60.
- guglielmi, G., Rippka, R., and Tandeau De Marsac, N.. Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina* sp. and *Arthrospira* sp. among cyanobacteria. In: Doumenge, F., Durand-Chastel, H., Toulemont, A., Eds. *Spiruline* algue de vie. Bulletin de l’Institut Océanographique Monaco. Musée Océanographique. Numéro spécial, 1993 ; 12:13-23.
- Hakobyan M, Sargsyan H, Baramyan K. Proton translocation coupled to formate oxidation in anaerobically grown fermenting *Escherichia coli*. *Biophys Chem*, 2005;115:55–61.
- Hallenbeck PC, Benemann JR. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1185–93.
- Hallenbeck PC. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci Technol*, 2005; 52(1–2):21–29

Hankamer B, Lehr F, Rupprecht J, Mussgnug JH, Posten C, Kruse O. Photosynthetic biomass and H<sub>2</sub> production by green algae: from bioengineering to bioreactor scale-up. *Physiol Plant* 2007;131:10–21.

Happe T, Hemschemeier A, Winkler M, Kaminski A. Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems? *Trends Plant Sci* 2002; 7: 246–50.

Haq Z, Easterly JL. Agricultural residue availability in the United States. *Appl Biochem Biotechnol* 2006; 129–132:3–21.

Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL, Hussy I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *Int J Hydrogen Energy*, 2002; 27:1339–1347.

Hawkes FR, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes DL. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *Int J Hydrogen Energy*, 2007; 32:172–184.

Hayakawa Y, Hayashi T, Lee J-B, Ozawa T, Sakuragawa N. *Activation of Heparin Cofactor II by Calcium Spirulan*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275: 11379-11382.

Hayakawa Y, Hirashima Y, Yamamoto H, Kurimoto M, Hayashi T, Lee J-B, Endo S. *Mechanism of activation of heparin cofactor II by calcium spirulan*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003; 416: 47-52.

Hayashi K, Hayashi T, Morita N, Kojima I. An extract from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of herpes simplex virus type 1 penetration into HeLa cells. *Phytotherapy Research*, 1993; 7: 76-80.

Hayashi T, Hayashi K, Maeda M, Kojima I. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *Journal of Natural Products*, 1996; 59: 83-87.

Henrikson R. *Earth Food Spirulina*. Ronore Enterprises, Inc., Hawaii, 2009: 188 p.

Hermann Bothe, Oliver Schmitz, M. Geoffrey Yates and William E. Newton. Nitrogenases and Hydrogenases in Cyanobacteria. *Bioenergetic Processes of Cyanobacteria*, Springer Science Business Media B.V, 2011.

Hillmer, P., and H. Gest. H<sub>2</sub> metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H<sub>2</sub> production by growing cultures. *J. Bacteriol*, 1977; 129:724-731.

Hohmann, P. *Tomorrow's energy: hydrogen, fuel cells, and the prospects for a cleaner planet*. MIT Press, Cambridge, MA, London, UK, 2002.

Hohmann, P. *Tomorrow's energy: hydrogen, fuel cells, and the prospects for a cleaner planet*. MIT Press, Cambridge, MA, London, UK, 2002.

Hongyan Wu, Kunshan Gao, Virginia E. Villafan Teruo Watanabe et E. Walter Helbling. Effects of Solar UV Radiation on Morphology and Photosynthesis of Filamentous Cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005; p. 5004–5013.

J.W. Sheffield, Ç. Sheffield.. *Assessment of Hydrogen Energy for Sustainable Development*, Springer: 2007; 135–146.

James C. Ogonna & Hideo Tanaka. Light requirement and photosynthetic cell cultivation – Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 2000; 12: 207–218, 2000.

Jean Pelmont. *bactéries et environnement, adaptation physiologie*. Volume I et II ; édition PUG ; Grenoble, 1994.

Jean-Paul Jourdan. *Cultivez Votre Spiruline*. Manuel de Culture Artisanale de la Spiruline, 2006.

John J Hahn. Hydrogen Production From Biomass. In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree: Doctor of Philosophy, 2006.

Jose-Julio Ortega-Calvo , LUCAS J . STAL. Diazotrophic growth of the unicellular cyanobacterium *Gloeothece* sp. PCC 6909 in continuous culture. *Journal of General Microbiology*, 1991; 137, 1789-1797.

K. A. Rusch, J.M. Christensen.. The hydraulically integrated serial turbidostat algal reactor (HISTAR) for microalgal production, *Aquac. Eng* 2003; 27: 249-264.

Kanhaiya Kumar, Chitralkha Nag Dasgupta, Bikram Nayak, Peter Lindblad, Debabrata Das. Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 2011; 4945–4953.

Katarzyna Chjnicka, Andrzej Noworyta. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 34, 2004; 461–465.

Katsuhiro Aoyama, Ieaki Uemura, Jun Miyake, Yasuo Asada. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Journal Of Fermentation And Bioengineering* : 1997; vol. 83, no. 1, 17-20.

Kiet PQ, Durand-Chastel H. *Spirulina* rich in AIDS-Antiviral Sulfolipids. In Charpy et al. (ed.) International Symposium on Cyanobacteria for Health, Science and Development: 2006; 111-117

Ko IB, Noike T, Use of blue optical filters for suppression of growth of algae in hydrogen producing non-axenic cultures of *Rhodobacter sphaeroides* RV. *Int J Hydrogen Energy*, 2002; 27(11–12):1297–1302.

Koku H, Eroğlu I, Gündüz U, Yücel M, Türker L. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy*, 2002; 27:1315–1329.

Kosourov S, Tsygankov A, Seibert M, Ghirardi ML. Sustained Hydrogen Photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of Culture Parameters. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 2002; 78: 731-741.

Kotay, S.M., Das, D. Biohydrogen as a renewable energy resource: prospects and potentials. *Int J Hydrogen Energy*, 2008; 33:258–263.

Kruse O, Rupprecht J, Bader KP, Thomas-Hall S, Schenk PM, Finazzi G, et al. Improved photobiological H<sub>2</sub> production in engineered green algal cells. *J Biol Chem*, 2005; 280:34170–7.

Kyazze G, Dinsdale R, Guwy AJ, Hawkes FR, Premier GC, Hawkes DL. Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously. *Biotechnol Bioeng*, 2007; 97(4):759–770.

Iacaz, R., et Nascimento, E. Produção de biomassa de *Spirulina máxima* para alimentação humana e animal. *Rev Microbiol*, 1990; 21:85-97.

Lambert GR, Daday A, Smith GD: Hydrogen evolution from immobilized cultures of cyanobacterium *Anabena cylindrica*. *FEBS Letters*, 1979; 101:125-128.

Laurinabichene TV, Tsygankov AA. H<sub>2</sub> consumption by *Escherichia coli* coupled via hydrogenase 1 or hydrogenase 2 to different terminal electron acceptors. *FEMS Microbiol Lett*, 2001;202:121–4.

Lee JB, Hayashi T, Hayashi K, Sankawa U, Maeda M, Nemoto T, Nakanishi H. Further purification and structural analysis of calcium spirulan from *Spirulina platensis*. *Journal of Natural Products*, 1998; 61: 1101- 1104.

Lee JB, Srisomporn P, Hayashi K, Tanaka T, Sankawa U, Hayashi T. Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2001; 49: 108-110.

Léonard, J. The 1964-65 Belgian Trans-Saharan Expedition. *Nature*, 1966; 209:126-128.

Levin DB, Pitt L, Love M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy*, 2004; 29:173–89.

Levin DB, Zhu H, Beland M, Cicek N, Holbein BE. Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada. *Bioresour Technol* 2007; 98:654–660.

Lobner M, Walsted A, Larsen R, Bendtzen K, Nielsen CH. *Enhancement of Human Adaptive Immune Responses by Administration of a High-Molecular-Weight Polysaccharide Extract from the Cyanobacterium Arthrospira platensis*. *Journal of Medicinal Food* , 2008; 11: 313-322.

Loïc Charpy, Marie José Langlade et Romain Alliod. La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? Institut de Recherche pour le Développement, 2008.

Loubiere. K, Olivio. E, Bougaran. G, Pruvost. J, Robert. R et Legrand. J. A. A new photobioreactor for continuous microalgal production in hatcheries based on external-loop *airlift* and swirling flow. *Biotechnol. Bioeng*; 2009; 102(1), p. 132-147.

Lucas. J. Stal, Roy Moezelaar. Fermentation in cyanobacteria. *Microbiologie reviews*, 1997; 21: 179-211.

Ludwig M, Schulz-Friedrich R and Appel J. Occurrence of hydrogenases in cyanobacteria and anoxygenic photosynthetic bacteria: implications for the phylogenetic origin of cyanobactériale and algal hydrogenases. *J Mol Evol* , 2006; 63: 758–768.

Mark D. Redwood, Marion Paterson-Beedle, Lynne E. Macaskie. Integrating dark and light biohydrogen production strategies: towards the hydrogen economy. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2008; Volume 8, Number 2, 149-185.

Marseu. R. Gazéification des résidus pétroliers par le procédé Shell. *Technique de l'ingénieur*, 1997.

Masukawa, H., Mochimaru, M., Sakurai, H. Hydrogenases and photobiological hydrogen production utilizing nitrogenase system in cyanobacteria. *Int J Hydrogen Energy* ,2002; 27:1471–1474.

Michele R. Andrade, Jorge A.V. Costa. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 2006; 264: 130 – 134.

Midilli, A., Olgun, H., Ayhan, T. Solar hydrogen production from hazelnut shells. *Int J Hydrogen Energy* ,2000 ; 25:723–732.

Midilli, A., Olgun, H., Ayhan, T. Solar hydrogen production from hazelnut shells. *Int J Hydrogen Energy*, 2000; 25:723–732.

Miller, E., Rocheleau, R., Khan, S. A hybrid multijunction photoelectrode for hydrogen production fabricated with amorphous silicon/germanium and iron oxide thin films. *Int J Hydrogen Energy*, 2004; 29:907–914.

Mi-Sun Kim, Jin-Soon Baek, Jeong K. Lee. Comparison of H<sub>2</sub> accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant. *International journal of hydrogen energy*, 2006; 31: 121-127.

Miyake J, Miyake M, Asada Y. Biotechnological hydrogen production: research for efficient light conversion. *J Biotechnol.* 1999; 70:89–101.

Mizuno O, Dinsdale R, Hawkes FR, Hawkes DL, Noike T. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour Technol*, 2000; 73:59–65.

*Moezelaar R, Stal LJ: Fermentation in the unicellular cyanobacterium Microcystis PCC7806. Arch Microbiol, 1994; 162:63-69.*

Mohan, D., Pittman, C.U., Steele, P.H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. *Energy Fuels*, 2006; 20:848–889.

Nakada E, Asada Y, Arai T, Miyake J. Light penetration into cell suspensions of photosynthetic bacteria and relation to hydrogen production. *J Ferment Bioeng*, 1995; 80(1):53–57.

Nandi, R., Sengupta, S. Microbial production of hydrogen: an overview. *Critical Rev Microbiol*, 1998; 24:61–84.

Nataliya Mykhaylenko, Elena Zolotareva. Inhibition of photosystem II activity in *Spirulina platensis* by carbohydrates: Details revealed by chlorophyll fluorescence analysis, 2008.

Nath K, Das D. Hydrogen from biomass. *Curr Sci*, 2003; 85(3):265–271

Newton WE. Physiology, biochemistry, and molecular biology of nitrogen fixation. In: Bothe H, Ferguson SJ and Newton WE (eds), *Biology of the nitrogen cycle*, 2007; pp 109–129. Elsevier, Amsterdam

Nitai Basak, Debabrata 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; Volume 23, Number 1, 31-42.

Ogbonna. J.C, Yada. H, Masui.H, et Tanaka. H. A novel internally illuminated stirred tank photobioreactor for large-scale cultivation of photosynthetic cells. *Journal of Fermentation and Bioreengineering*, 1996; 82 (1), p. 61-67.

Ono. E et Cuello. J. L. design parameters of solar concentrating systems for CO<sub>2</sub> mitigation algal photobioreactor. *Energy*, 2004; 29, p. 1651-1657.

Ozturk, T., Demirbas, A. Boron compounds as hydrogen storage materials. *Energy Sources Part A*, 2007; 29:1415–1423.

*Pascaud M, Doumenge F, Durand-Chastel H, Toulemont A. The essential polyunsaturated fatty acids of Spirulina and our immune response. Bull. Inst. Océanogr, 1993 ;NS12: 49-57.*

Pei-chung Chen, Shin-Huei Fan, Char-Lin Chiang, Chi. Effect of growth conditions on the hydrogen production with cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain CH3. *International journal of hydrogen energy*, 2008; 33: 1460-1464.

Pierlovisi 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, 2007, Paris (162).

Pinzon-Gamez NM, Sundaram S, Ju LK. Heterocyst Differentiation and H<sub>2</sub> Production in N<sub>2</sub>-Fixing Cyanobacteria. *Technical program*. (Pinzon-Gamez. NM, 2005.

Planes P, Rouanet J-M, Laurent C, Baccou J-C, Besancon P, Caporiccio B. *Magnesium bioavailability from magnesium-fortified spirulina in cultured human intestinal Caco-2 cells*. *Food*, 2002.

Plass, J.H., Barbir, F., Miller, H.P., Veziroglu, T.N. Economics of hydrogen as a fuel for surface transportation. *Int J Hydrogen Energy*, 1990; 15:663–668.

Posewitz MC, Smolinski SL, Kanakagiri S, Melis A, Seibert M, Ghirardia Maria L. Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, 2004;16:2151–63.

Prince RC, Kheshgi HS. The photobiological production of hydrogen: potential efficiency and effectiveness as a renewable fuel. *Crit Rev Microbiol*, 2005;31:19–31.

Pruvost. J, Jean-François Cornet, Jean Jenck. Production industrielle de micro-algues et cyanobactéries. *Techniques De L'ingenieur*, 2011.

Radmer. R.J. et Inventor (1990) Photobioreactor.

Rija Rakotoarisoa, Alain Riva, Nardo Vicente. Experimental Culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis* - Nordsted, 1844. *Springer Science Business Media B.V.*,2011; Part 1, 35-36.

Roberto De Philippis, Claudio Sili And Massimo Vincenzini. Glycogen AND poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis in *Spirulina maxima*. *Journal of general microbiology*, 1992; 138, 1623-1628.

Rocheleau, R. et J. R. Benemann. Biohydrogen production, final summary report,. Report to the U.S. Department of Energy. Hawaii Natural Energy Institute, University of Hawaii, Manoa, 2000.

Rocheleau, R.E., Vierthaler, M. Optimization of multijunction a-Si:H solar cells using an integrated optical/electrical model, *in Proceedings of the 21st World Conference on Photovoltaic Energy Conversion*, 1994 ; pp. 567–570.

Rostrup-Nielsen, J.R. Catalytic steam reforming, *in Catalysis: science and technology*, Vol. 5, J.R. Anderson, M. Boudart. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 1–117.

Rupprecht J, Hankamer B, Mussnug JH, Ananyev G, Dismukes C, Kruse O. Perspectives and advances of biological H<sub>2</sub> production in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006; 72:442–9.

Saidi A, B. Chaouchi-Abada, S. Chergui-Bouafia. Produire de l'hydrogène à partir d'eau et de lumière grâce aux microorganismes, 2007; 27-29.

Salmenoja, K. Black-liquor gasification: theoretical and experimental studies. *Biores Technol*, 1993; 46:167–171.

Sandrock, G., Thomas, G. 2001. The IEA/DOE/SNL on-line hydride databases. *Appl Phys A Mater Sci Proc* ,1984; 72A:153–155.

Sasikala, K., Ramana, C.V., Rao, P.R., Kovacs, K.L. Anoxygenic phototrophic bacteria: physiology and advances in hydrogen technology. *Adv Appl Microbio*, 1993; 38:211–295.

Schlapbach, L., Züttel, A. Hydrogen-storage materials for mobile applications. *Nature* ,2001; 414:353–358.

Schleguel. G.O, Burkholder. F. W, Klein .S.A. Beckman. W. A, Wood. B.D et Muhs. J. D. Analysis of a full spectrum hybrid lighting system. *Sol. Energy*, 2004; 46, p. 359-368.

Schmitz O, Gurke J and Bothe H. Molecular evidence for the aerobic expression of *nifJ*, encoding pyruvate: ferredoxin oxidoreductase, in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2001; 195: 97–102.

Serebryakova LT, Sheremetieva ME, Lindblad P: H<sub>2</sub>-uptake and evolution in the unicellular cyanobacterium *Chroococcidiopsis thermalis* CALU 758. *Plant Physiol Biochem*, 2000; 38:525-530.

Shah V, Garg N, Madamwar D. Ultrastructure of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* and exploitation of the culture for hydrogen production. *Folia Microbiol (Praha)*, 2001; 48:65-70.

Shi X-Y, Yu Q-H, Continuous production of hydrogen from mixed volatile fatty acids with *Rhodospseudomonas capsulata*. *Int J Hydrogen Energy*, 2006; 31:1641–1647.

Shikha Masih, M Yasin Sofi and Samuel G Singh. Growth Performance of *Spirulina platensis* under Mixotrophic Culture. *Research Journal of Agricultural Sciences* 2011; 2(1): 119-121.

Singh. R. N, Shaishav Sharma. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2012; 16: 2347– 2353.

Sode K, Yamamoto S, Tomiyama M. Metabolic engineering approaches for the improvement of bacterial hydrogen production based on *Escherichia coli* mixed acid fermentation. In: Miyake J, Matsunaga T, San Pietro A (eds) *Biohydrogen II: an approach to environmentally acceptable technology*. Pergamon, Oxford, 2001; pp 195–204.

Stal LJ, Krumbein WE: Oxygen protection of nitrogenase the aerobically nitrogen fixing, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Archives of microbiology*, 1985; 143:72-76.

Suh S, Lee SB: A light distribution model for an internally radiating photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 2003, 82:180-189.

Suh.I.S. et Lee.S.B. A light distribution model for an internally radiating photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng*; 2003; 82, p. 180-189.

Summerfield, T.C. and Sherman, L.A. Global transcriptional response of the alkali-tolerant cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 to a pH 10 environment. *Appl. Environ. Microbiol* 2008; 74, 5276–5284

Sung, S. Biohydrogen production from renewable organic wastes. Final Technical Report. Iowa State University, Ames, IA, 2004.

Tamagnini P, Axelsson R, Lindberg P, Oxelfelt F, Wunschiers R, Lindblad P: Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66:1-20.

Tamagnini P. Cyanobacterial hydrogenases. Diversity, regulation and application. *FEMS Microb Rev* ,2007; 31: 692–720.

Thauer. R. Limitation of microbial hydrogen formation via fermentation. In Schlegel HG and Barnea J (eds), *Microbial Energy Conversion*. Erich Goltze, Gottingen, Germany, 1977; pp. 201–294.

Tigreat. D. Les techniques de production de l'hydrogène et les risques associés. Rapport d'étude, 2008.

Tolleter D, Ghysels B, Alric J, Petroutsos D, Tolstygina I, Krawietz D, Happe T, Auroy P, Adriano JM, Beyly A, Cuié S, Plet J, Reiter IM, Genty B, Cournac L, Hippler M, Peltier G. Control of hydrogen photo-production by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*, 2011; 23(7):2619-30.

Tolleter. D, Ghysels B, Alric J, Petroutsos D, Tolstygina I, Krawietz D, Happe T, Auroy P, Adriano JM, Beyly A, Cuié S, Plet J, Reiter IM, Genty B, Cournac L, Hippler M, Peltier G. Control of hydrogen photo-production by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*, 2011; 23(7):2619-30.

Tomaselli, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. In: Vonshak, A., Ed. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor and Francis. London, 1997; pp. 1 – 16.

Troccon J.L. C. Demarquilly. La vinasse de mélasse pour les ruminants. *INRA Prod. Anim*, 1989; 2(4), 245-248.

- Tsygankov A. Nitrogen-fixing cyanobacteria: a review. *Appl Biochem Microbiol*, 2007a 43(3):250.
- Tsygankov AA. Biological generation of hydrogen. *Russ J Gen Chem*, 2007b; 77(4):685–693.
- Valdez-Vazquez I, Sparling R, Risbey D, Rinderknecht-Seijas N, Poggi-Varraldo HM. Hydrogen generation via anaerobic fermentations of paper mill wastes. *Bioresour Technol*, 2005; 96:1907–1913.
- Valdez-Vazquez, I., Rnos-Leal, E., Musoz-Paez, K.M., Carmona-Martinez, A., and Poggi-Varaldo, H.M., *Biotechnol. Bioeng*, 2006; vol. 95, no. 3, p. 342.
- Van der Oost J, Builthuis BA, Feitz S, Krab K and Kraayenhof R. Fermentation metabolism of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7822. *Arch Microbiol*, 1989; 151: 415–419
- Van Ginkel S, Logan BE. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environ Sci Technol*, 2005; 39:9350–9356.
- Van Ooteghem SA, Jones A, van der Lelie D, Dong B, Mahajan D. H<sub>2</sub> production and carbon utilization by *Thermotoga neapolitana* under anaerobic and microaerobic growth conditions. *Biotechnol Lett*, 2004; 26(15):1223–1232.
- Vardar-Schara G, Maeda T, Wood TK. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via Vignais PM, Billoud B, Meyer J. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* 2001;25(4):455–501
- Vincenzini, M., SILI, C., Philippis, R., Ena, A., and Materassi, R. Occurrence of poly-β-hydroxybutyrate in *Spirulina* species. *J. Bacteriol*, 1990; 172:2791-2792.
- Viswanathan, B. An introduction to energy sources. Indian Institute of Technology, Madras, India, 2006.
- vonshak, A. et Tomaselli, L. *Arthrospira (Spirulina): Systematics and ecophysiology*. In: Whitton, A., Potts, M., Eds. *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, 2000; pp. 505-522.
- Vrije Universiteit, R-05/05, Amsterdam. Available at belay, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors. – The Earthrise Farms experience. In: Vonshak, A., Ed. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor and Francis. London, 1997; pp. 131-158.
- Wang J, Wang Y, Wang ZX, Li L, Qin J, Lai WQ, Fu Y, Suter PM, Russell RM, Grusak MA, Tang GW, Yin SA. Vitamin A equivalence of spirulina β-carotene in Chinese adults as assessed by using a stableisotope reference method. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2008; 87: 1730-1737.
- Wang, D., Czernik, S., Chornet, E. Production of hydrogen from biomass by catalytic steam reforming of fast pyrolysis oils. *Energy Fuels*, 1998; 12:19–24.
- whitton, B. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In: Mann N, Carr N, Eds. *Photosynthetic prokaryotes*. Plenum Press, 1992; pp. 1-37.
- Yamamoto C, Nakamura A, Shimada S, Kaji T, Lee JB, Hayashi T. Differential effects of sodium spirulan on the secretion of fibrinolytic proteins from vascular endothelial cells: Enhancement of plasminogen activator activity. *Journal of Health Science*, 2003; 49: 405-409.
- Yasuo Asada, Jun Miyake. Photobiological Hydrogen Production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 1999; Vol. 88, No. 1, 1-6.
- Ying Li R, Zhang T, Fang HHP. Characteristics of a phototrophic sludge producing hydrogen from acetate and butyrate. *Int J Hydrogen Energy*, 2008; 33(9):2147–2155.

Yokoi H, Saito A, Uchida H, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y. Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *J Biosci Bioeng*, 2001; 91(1):58–63.

Zaborsky. O. Biohydrogen. New York, NY: Plenum Press, 1998.

Zarrouk. C. 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 Doctorat Faculté des Sciences. Université de Paris, 1966.

Zengling Ma, Kunshan Gao. Spiral breakage and photoinhibition of *Arthrospira platensis* (Cyanophyta) caused by accumulation of reactive oxygen species under solar radiation. *Environmental and Experimental Botany*, 2010; 68 : 208–213.

Zhang Xiankong, J. Ben Haskell, F. Robert Tabita et Chase Van Baalenl. Aerobic Hydrogen Production by the Heterocystous Cyanobacteria *Anabaena* spp. Strains CA and 1F. *Journal Of Bacteriology*, 1983; Vol. 156, No. 3 : p. 1118-1122.

Zhu H, Wakayama T, Asada Y, Miyake J. Hydrogen production by four cultures with participation by anoxygenic photosynthetic bacterium and anaerobic bacterium in the presence of  $\text{NH}_4^+$ . *Int J Hydrogen Energy*, 2001; 26(11):1149–1154.

Züttel, A., Wenger, P., Rentsch, S., Sudan, P., Maurona, P., Emmenegger, C. LiBH<sub>4</sub> a new hydrogen storage material. *J Power Sources*, 2003; 118:1–7.

# *Annexes*

**Annexe I. Sites géographiques où pousse naturellement la Spiruline (R. D. Fox, 1999).**

<b>Continent</b>	<b>Pays</b>	<b>Localisation précise</b>
<b>Afrique</b>	Algérie	Tamanrasset
	Tchad	Région du Kanem : lacs Latir, Ouna, Borkou, Katam, Yoan, Leyla, Bodou, Rombou, Moro, Mombolo, Liwa, Iseirom, Ounianga kebir
	Soudan	Cratère de Djebel Marra
	Djibouti	Lac Abber
	Ethiopie	Lacs Aranguadi, Lesougouta, Nakourou, Chiltu, Navasha, Rodolphe
	Congo	Mougounga
	Kenya	Lacs Nakuru, Elmenteita, Cratère, Natron
	Tanzania	Lac Natron
	Tunisie	Lac Tunis; Chott el Jerid
	Zambie Madagascar	Lac Bangweoulou Beaucoup de petits lacs près de Toliara
<b>Asie</b>	Inde	Lacs Lonar et Nagpur, réservoir près de Madurai
	Myanmar	Lacs Twyn Taung, Twyn Ma et Taung Pyank
	Sri Lanka	Lac Beira
	Pakistan	Mares près de Lahore
	Thaïlande	Lacs d'effluents d'une usine de tapioca, province de Radburi, 80 km au Sud-Ouest de Bangkok
<b>AMERIQUE du SUD</b>	Pérou	Réservoir d'eau près de Paracas, Près de l'île d'Amantani dans le lac Titicaca
	Mexique Uruguay	Lac Texcoco ; Lac Cratère Montevideo
	Equateur	Lac volcanique Quiliotoa : cratère de 1km de diamètre

<b>AMERIQUE du NORD</b>	Californie	Oakland ; Del Mar Beach
	Haïti	Lac Gonâve Lac Enriquillo
	République Dominicaine	

**Annexe II : Teneurs en pigments exprimées en mg pour 10g de matière sèche de *Spirulina platensis* (C. Pierlovisi, 2007).**

<b>Pigments</b>	<b>Teneur en mg/10g</b>
Chlorophylles totales	115
Chlorophylle a	61-75
Caroténoïdes (orange)	37
Phycocyanine (bleu)	1500-2000
Phycoérythrine (rouge)	2900-10000

**Annexe III. Composition typique en pourcentage des principaux acides gras de 3 espèces de *Spiruline* d'après Pascaud et al (1993).**

<b>Acides gras</b>	<b><i>S pacifica</i></b>	<b><i>S maxima</i></b>	<b><i>S platensis</i></b>
Palmitique (16:0)	44,2	63,0	25,8
Palmitoléique (16:1) oméga-6	4,4	2,0	3,8
Stéarique (18:0)	Traces	1,0	1,7
Oléique (18:1) oméga-6	0,4	4,0	16,6
Linoléique (18:2) oméga-6	24,3	13,0	40,1
Gamma-linolénique (18:3) oméga-6	22,1	13,0	40,1
Alpha-linolénique (18:3) oméga-3	Traces	Traces	Traces

**Annexe IV. Pourcentage moyen des acides aminés de *Spirulina platensis* d'après différents auteurs (Borowitzka et Borowitzka, 1988).**

Acides Aminés	Jacquet 1974	Clément 1975b	Fox 1999
<b>Acides aminés essentiels* (%)</b>			
Isoleucine	5,60	6,40	5,98
Leucine	8,00	9,00	8,71
Lysine	4,20	4,80	5,28
Méthionine	2,25	2,60	2,85
Phénylalanine	4,40	4,60	5,09
Thréonine	4,70	5,50	5,58
Tryptophane	1,00	1,60	1,48
Valine	5,70	6,90	7,72
<b>Acides aminés non essentiels (%)</b>			
Alanine	7,25	7,90	8,24
Arginine	6,60	6,70	7,92
Acide aspartique	9,30	9,20	9,50
Cystéine	0,95	0,90	0,93
Acide Glutamique	NC	12,90	13,20
Glycine	4,80	5,00	5,07
Histidine	1,60	1,60	1,50
Proline	3,60	3,90	4,32
Sérine	5,00	5,60	5,46
Tyrosine	4,30	4,90	NC

**Annexe V. Composition en minéraux de la *Spiruline* cultivée en  $\mu\text{g/g}$  de sa matière sèche d'après (J. Falquet, 2006)**

Minéraux	Teneur	Minéraux	Teneur
Calcium	1300-14000	Cuivre	8-10
Phosphore	6700-9000	Chrome	2,8
Magnésium	2000-2900	Manganèse	25-37
Fer	580-1800	Sodium	4500
Zinc	21-40	Potassium	6400-15400

**Annexe VI. Teneur en vitamines en µg/g de matière sèche de Spiruline d'après (J. Falquet, 2006)**

Vitamine	Teneur	Vitamine	Teneur
<b>Vitamines hydrosolubles</b>		<b>Vitamines liposolubles</b>	
B1 (thiamine)	34-50	Provitamine A (β-carotène)	700-1700
B2 (riboflavine)	30-46	Cryptoxanthine	100
B3 (niacine)	130	Vitamine E (alpha-tocophérol)	120** 50-190*** 13****
B5 (pantothénate)	4,6-25		
B6 (pyridoxine)	5-8		
B8 (biotine)	0,05		
B9 (folate)	0,5		
B12 (cobalamine)	0.10-0.34*		
C (acide ascorbique)	Traces		

**Annexe VII. Dosage des sucres réducteurs par la méthode du DNS**

➤ **Mode opératoire :**

Mettre 3 ml d'échantillon convenablement dans un tube à essai, ajouter le réactif DNS, l'agiter ensuite le plonger dans un bain Marie bouillant pendant 5mn. ajouter 1ml du sel de Rochelle et laissez refroidir. L'échantillon est dosé à 575 nm. Les concentrations des sucres réducteurs sont déterminées par spectrophotométrie a l'aide d'un spectrophotomètre (SHIMADZU: UV-Vis spectrophotometer, mini 1240), dont le principe est liée que la quantité de la lumière absorbée elle est proportionnelle à la concentration du composé coloré recherché, suivant la loi de BEER-LAMBERT qui s'exprime ainsi :

$$DO = \text{Log } I_0/I = kLC$$

$I_0$  : Intensité faisceau lumineux monochromatique incident.

$I$  : Intensité faisceau lumineux

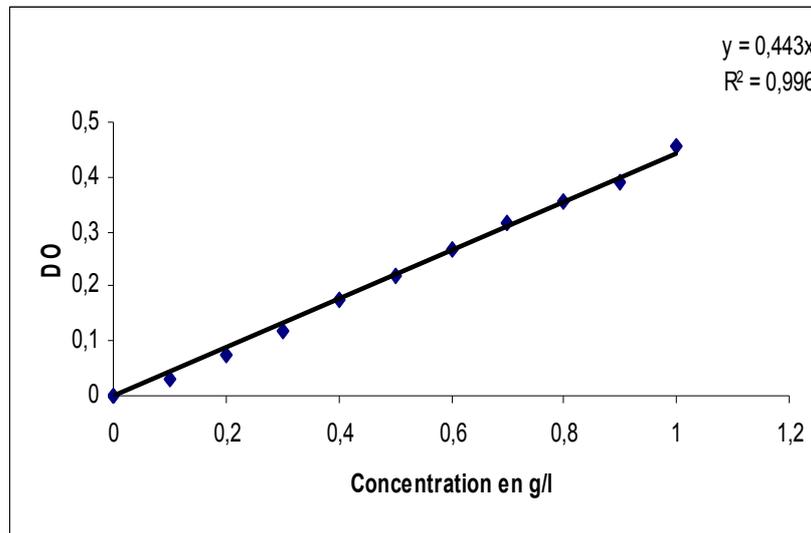
$L$  : Epaisseur de la cuve (1cm).

$K$  : Coefficient d'extinction moléculaire.

$C$  : Concentration du corps absorbant dans la solution.

DO : Densité optique lue directement sur le spectrophotomètre.

Les densités optiques sont converties en concentration au moyen d'une courbe d'étalonnage établie préalablement. Cela nous a permis de tracer la courbe de la cinétique d'évolution de la concentration des sucres réducteurs en fonction du temps.



***Courbe étalon de la concentration du glucose par la méthode de DNS.***

#### ***Annexe VIII : méthode de dosage de la chlorophylle : (S, Kosourov, 2002)***

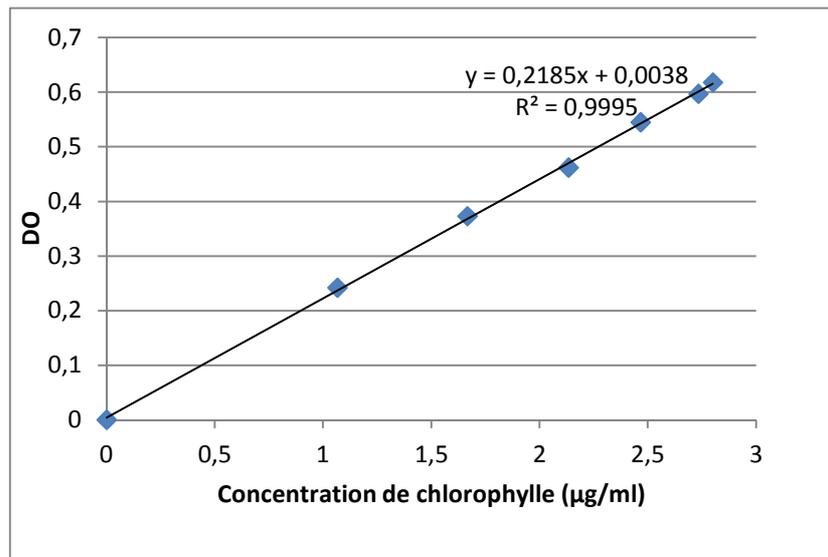
La densité cellulaire peut être déterminée par la mesure de la concentration de la chlorophylle par le moyen de l'absorption spectroscopique ultraviolet/visible, comme elle a été décrite par Kosourov *et al* (2002) :

- Un échantillon de 1 ou 2 ml de la suspension algales est collecté.
- La suspension est centrifugée pendant 2 min pour faire précipiter les cellules algales et le surnageant est jeté.
- Un volume de l'éthanol 95% est ajouté sur le culot afin de le suspendre.
  
- Une deuxième centrifugation est réalisée pendant 2 min.
- L'absorbance du surnageant est mesurée à 649, 665, et 750 nm en utilisant l'éthanol 95% comme un blanc.
- La concentration en chlorophylle ( $\mu\text{g/mL}$ ) est déterminée par la formule suivante :

Conc ChL = [6.10 (A665 – A750) + 20.04 (A649 – A750)] x [Facteur de dilution]

[Facteur de dilution] = [vol. éthanol (ml)] / [vol. suspension (ml)]

Une courbe étalon DO=f (concentration de chlorophylle) est réalisée selon la méthode décrite ci-dessus, en utilisant des suspensions algales à différentes dilutions. Cette courbe est apparue utile dans le cas de détermination de la concentration des suspensions algales utilisées au cours de nos expériences.



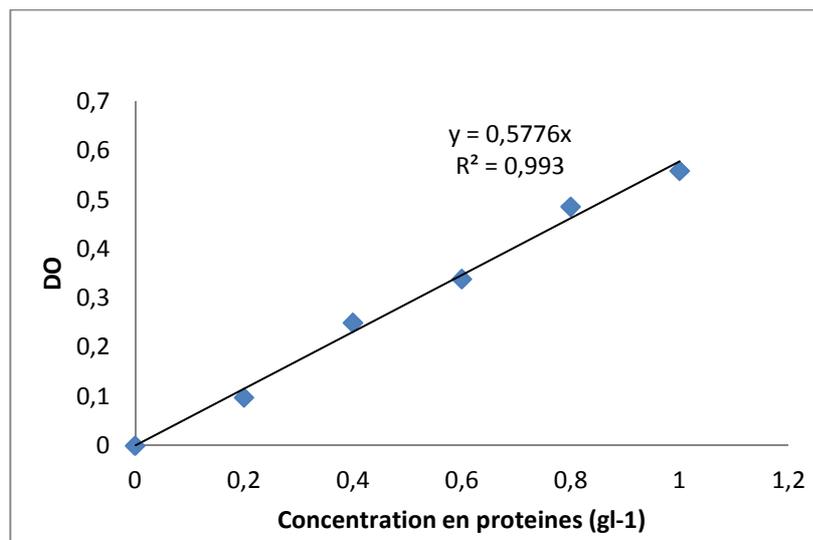
***Courbe étalon de la concentration de la chlorophylle.***

### ***Annexe IX. Méthode du dosage des protéines :***

#### **1. Extraction des protéines à partir de l'algue**

- Un échantillon de 1-5 ml d'une suspension algale de *Spirulina platensis* a été utilisé pour l'extraction des protéines.
- On procède à une extraction de la chlorophylle comme il a été décrit précédemment, et le culot restant en fin du protocole est utilisé pour l'extraction des protéines.
- Les pellets sont séchés soit par l'azote moléculaire N<sub>2</sub> ou bien à température ambiante.
- Ajouter 2 ml du NaOH (0,5 N), bien mélanger ensuite incubé 20 min à 100 °C.

- Centrifuger afin d'éliminer tous les débris cellulaires et récupérer le surnageant, ensuite ajouter un autre volume du NaOH (0,5 N) chaud, et bien mélanger.
- Une dernière centrifugation et récupération du surnageant, puis combiner les deux surnageant.
- Le contenu protéique du surnageant résultant est dosé par la méthode de Bradford en utilisant 0,1 mL de l'échantillon plus 5 mL du réactif de Bradford



***Courbe étalon de la concentration des protéines par la méthode de Bradford.***

### ***Annexe X. Réactifs et tampons utilisés***

#### **Protéines**

- **Réactif de Bradford**

10 mg du bleu de Coomassie (G250)

10 mL d'acide ortho phosphorique à 85 % ( $H_3PO_4$ )

5 mL d'éthanol a 95 %

Compléter a 100 mL avec de l'eau distillée

- **Tampon phosphates 0,2 M (pH 7)**

**Solution acide** : 31,4 g/l de  $NaH_2PO_4, 2H_2O$

**Solution basique** : 35,59 g/l de  $NaHPO_4, 2H_2O$