

REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENNE**

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



THESE

Présentée pour l'obtention du grade de DOCTORAT

En : Sciences de la Nature

Spécialité : Biologie de la rhizosphère

Par : CHADER Samira

THEME

**Etude du mécanisme de production biologique
de l'hydrogène par les microalgues**

Soutenue publiquement le 25 février 2009, devant le jury composé de

Mme SERIDJI Rabea

Professeur, Faculté des Sciences Biologiques, USTHB

Présidente

Mr HACENE Hocine

Professeur, Faculté des Sciences Biologiques, USTHB

Directeur de thèse

Mr TOUZI Abdelkader

Directeur de Recherche, Directeur de l'Unité de Recherche en
Energies Renouvelables en Milieu Saharien, Adrar

Examineur

Mme SERIDI Halima

Maître de conférences, Faculté des Sciences Biologiques, USTHB

Examinatrice

Mr KACI Yahia

Maître de conférences, Faculté des Sciences Biologiques, USTHB

Examineur

« C'est en me hissant sur les épaules de géants que je suis parvenu à voir plus loin. »

I. Newton

« A la lumière de la connaissance, l'heureux résultat semble presque aller de soi ; tout étudiant (...) peut l'appréhender sans trop de difficulté. Mais les longues années de tâtonnements, de recherches dans le noir, avec leur lancinante tension, l'alternance des périodes de confiance et de découragement, puis finalement la sortie vers la lumière, seuls ceux qui ont éprouvé cela peuvent le comprendre. »

A. Einstein (1934)

REMERCIEMENTS

Les travaux de cette thèse ont été réalisés dans le cadre d'un programme de recherche développé au Centre de Développement des Energies Renouvelables de Bouzaréah.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Belhamel.M qui m'a orienté vers ce sujet de recherche original et pertinent mais néanmoins passionnant. Je lui exprime toute ma reconnaissance et mes respects.

Je remercie tout particulièrement l'ensemble du jury, c'est un honneur pour moi que ses membres aient accepté de juger ma thèse :

Le Professeur Seridji.R de la faculté des Sciences biologiques, USTHB pour avoir accepté de présider ce jury.

Je tiens à remercier Monsieur HACENE. H Professeur à l'USTHB pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, pour l'aide et les conseils qu'il m'a apportés tout au long du travail effectué et enfin pour la gentillesse et la patience dont il a fait preuve à mon égard.

Ma reconnaissance et mes vifs remerciements vont à Monsieur Touzi A Directeur de Recherche, d'avoir été pour moi l'initiateur d'une dynamique sans équivoque et qui n'a pas cessé de m'encourager et orienté ma recherche vers la valorisation des microalgues, voilà qu'il me fait honneur d'être mon examinateur.

Madame Seridi.H Maître de Conférence à l'USTHB pour avoir accepté d'examiner ce travail et surtout pour le temps qu'elle m'a consacré et sa grande compréhension.

Monsieur Kaci Y Maître de Conférence à l'USTHB pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour avoir été très attentif et compréhensif.

Mes vifs et sincères remerciements vont à Monsieur Agathos Spyros Professeur et responsable de l'Unité de Génie Biologique à l'Université Catholique de Louvain (Belgique), qui m'a accueilli dans ses laboratoires et m'a permis de finaliser une partie des expérimentations.

J'exprime toute ma reconnaissance et ma gratitude à Monsieur Christophe Detez, ingénieur à l'Unité de Génie Biologique de l'Université Catholique de Louvain (Belgique), pour l'aide et les précieux conseils qu'il m'a fournis pendant mon stage. De même je remercie Christine Taburiaux, Albert Lorge et Isabelle Georges pour leur orientation.

Je n'oublie évidemment pas de remercier toute ma famille pour son aide et son soutien inconditionnel, je cite ; mes parents, Abderrahmane, tous mes frères et sœurs, mes cousines Hassiba, Naima et Souhila.

Mes sincères remerciements vont aussi à tous mes collègues enseignants et chercheurs de la FSB/USTHB, du CDER de Bouzaréah et du CNRDPA de Bousmail, pour leur soutien et encouragement, je cite entre autres : Benaïcha A, Mahmah.B, Mohammedi Y, M'raoui A, El Mokretar S, Harouadi F, Bessah R, Aziza A.M et la toute nouvelle Amrouche F.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	1
LISTE DES TABLEAUX	4
INTRODUCTION GENERALE	6
CHAPITRE I – REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	8
I. Introduction	8
II. Production et stockage	12
II.1 Les voies de production à partir des énergies fossiles	12
II. 1.1 Reformage des combustibles fossiles	12
II.1.2 Pyrolyse de la biomasse	13
II. 1.3 Reformage de la vapeur d'eau	13
II. 1.4 Electrolyse	14
II. 1.5 Photochimique	14
II. 1.6 Nucléaire	15
II.2 Les voies de production à partir des énergies renouvelables	15
II. 2.1 Production à partir d'énergie solaire	16
II.2.2 Procédés biologiques de production d'hydrogène	17
II.2.2.1 Biophotolyse de l'eau par les algues et les cyanobactéries	19
II.2.2.2 Photo décomposition par les bactéries	22
II.2.2.3 Fermentation des composés organiques	24
II.2.2.4 Système hybride bactéries photosynthétiques et anaérobiques	24
II.2.3 Biochimie des systèmes enzymatiques de la production d'hydrogène	27
II.3 Stockage et distribution de l'hydrogène	30
II.4 La pile à combustible	
III. Ecologie et classification des microalgues	32
III.1 Ecologie des microalgues d'eau douce	32
III. 2 Classifications sommaires des algues d'eau douce	32
III.2.1 Rappel des principales caractéristiques des groupes de microalgues	33
IV Généralités sur les photobioréacteurs	38
IV.1 Définition d'un photobioréacteur	38

IV.2 Conception et problématique générale	38
IV.2.1 La lumière et le photobioréacteur	38
IV.2.2 La notion d'irradiance disponible	38
IV.2.3 L'hydrodynamique au sein des photobioréacteurs	39
IV.2.4 Régulation	40
IV.2.5 Technique d'agitation et mise en circulation	40
IV.2.6 Conclusion sur l'efficacité des photobioréacteurs	41
CHAPITRE II – MATÉRIELS ET MÉTHODES	44
I. Site de prélèvement et méthode d'échantillonnage	44
I.1 Description de la zone d'étude	44
I.2 Conditions climatologiques	44
I.3 Valeurs hydrologiques	44
I.4 Caractéristiques écologiques	45
II. Prélèvement	47
II.1 Zones de prélèvement et récolte des microalgues	47
II.2 Méthodes de prélèvement	47
II.3 Analyse physicochimiques des eaux	48
III. Isolement, culture et identification	48
III.1 Milieux de culture	48
III.2 Isolement et identification des microalgues	49
III.2.1 Identification macroscopique	49
III.2.2 Identification microscopique	49
III.3 Purification des microalgues étudiées	50
III.4 Conservation des souches et contrôle de pureté	50
IV. Recherche du potentiel de production d'hydrogène	50
IV.1 Conception des photobioréacteurs	50
IV.2 Protocole expérimental de la production d'hydrogène	54
IV.2.1 Production d'hydrogène sous conditions autotrophes	54
IV.2.2 Production d'hydrogène sous conditions hétérotrophes	54
IV.2.3 Protocole de mise en carence de soufre	54
IV.3 Conditions opératoires et incubation	54
V. Méthodes d'analyse des gaz, mesure des paramètres biométriques et dosage	55

V.1 Analyse des gaz produits	55
V.1.1 Collecte et mesure	55
V.1.2 Analyse chromatographique	55
V.2 Estimation de la croissance et du comportement morphologique	56
V.2.1 Viabilité cellulaire	56
V.2.2 Estimation du poids sec	56
V.2.3 Concentration de la biomasse	56
V.3 Dosage biochimique	57
V.3.1 Dosage des carohydrates totaux	57
V.3.2 Dosage des protéines	57
V.3.3 Analyse des pigments photosynthétiques	57
V.3.4 Mesure de la fluorescence	58
V.4 Estimation des rendements de production	60
CHAPITRE III – RESULTATS ET DISCUSSION	61
I. Répartition et isolement des souches de microalgues	61
I.1 Analyse physicochimique des eaux	61
II. Identification des souches isolées	65
II.1 Principales familles identifiées	65
III.1.1 Principales espèces des microalgues identifiées	67
III.1.1.1 Espèces apparentées à <i>Chlorella</i>	70
III.1.1.2 Espèces apparentées à <i>Scenedesmus</i>	72
 <i>Conclusion sur l'isolement des souches de microalgues</i>	 73
 III. Essai de production d'hydrogène par les souches isolées	 74
III.1 Production dans les milieux BG 11 et TAP	76
III.2 Influence de la carence en soufre sur la production d'H ₂	77
III.3 Analyse chromatographique des gaz produits	78
III.3.1 Cinétique de production par <i>Chlorella sorokiniana</i> Ce	79
III.3.2 Cinétique de production par <i>Chlorella salina</i> Mt	81
III.3.3 Cinétique de production par <i>Chlorella sp Pt6</i>	82
III.4 Influence des paramètres physiques sur la production d'H ₂	85
IV. Mesure des paramètres biochimiques	85

IV.1 Viabilité cellulaire et comportement physiologique	85
IV.2 Mesure de la croissance cellulaire et du poids sec	87
IV.3 Dosage des carbohydrates et des protéines	88
IV.4 Dosage des chlorophylles	88
<i>Conclusion sur la production d'hydrogène par les souches sélectionnées</i>	88
V. Mesure de la fluorescence et l'efficacité photosynthétique	89
VI. Modèle mathématique et validation numérique des résultats	90
Obtenus.	
DISCUSSION	92
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	94
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS LIEES A LA THESE	
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Figure I.1	Evolution annuelle du nombre d'articles scientifique dédiés à la production d'hydrogène (Aceves Lara, 2007).	9
Figure I.2	Evolution annuelle du nombre d'articles scientifique dédiés au stockage et à la distribution d'hydrogène (Aceves Lara, 2007).	9
Figure I.3	Production photocatalytique d'hydrogène	15
Figure I.4	Filières de synthèse de l'hydrogène par voie solaire (Ferriere et Flamant, 2004).	16
Figure I.5	Sites enzymatiques de conversion et transport des électrons pour la production du biohydrogène (réaction catalysée par une hydrogénase) chez les organismes photoautotrophes.	20
Figure I.6	Sites enzymatiques de conversion et transport des électrons pour la production du biohydrogène (réaction catalysée par une nitrogénase) dans les organismes photo hétérotrophes.	22
Figure I.7	Mécanisme de la production de l'hydrogène par des bactéries photosynthétiques (Basak and Das, 2007).	23
Figure I.8	Dispersion de la lumière pour diminuer la photoinhibition.	24
Figure I.9	Mécanisme biochimique de la décomposition du glucose par des microorganismes photosynthétiques et des bactéries anaérobiques pour la production hybride de l'hydrogène.	24
Figure I.10	Structure cristalline des hydrogénases à Fe (A) et à NiFe (B) (Nicolet <i>et al.</i> , 2002).	27
Figure I.11	Principe de fonctionnement d'une pile à combustible à H ₂	31
Figure I.12	Représentation schématique de l'atténuation de la lumière en fonction de l'épaisseur de culture de microalgues.	39
Figure II.1	Situation géographique et principaux sites de prélèvement (en vert) prospectés dans la région du Touat dans la wilaya d'Adrar.	46
Figure II.2	Photos de quelques zones de prélèvement (Foggaras à Tamentit).	48
Figure II.3	Mise au point du dispositif pour la production d'hydrogène par les microalgues.	52
Figure II.4	Installation complète et dispositif expérimental des quatre photobioréacteurs toriques sur plan horizontal.	53
Figure II.5	Chromatographe GC Trace, Thermo Finnigan équipé d'une boucle d'injection à pression atmosphérique et une vanne 6 voies spéciale gaz.	56
Figure II.6	Installation complète pour la mesure de la fluorescence et l'efficacité photosynthétique (Hansatech Instruments Ltd., UK).	59

- Figure III.1** Prolifération des microalgues dans les différents milieux de culture à partir des prélèvements de sol.
- Figure III.2** Prolifération des microalgues dans les différents milieux de culture à partir des prélèvements liquides.
- Figure III.3** Aspect des microalgues (cellules en vert) pendant la phase d'isolement observées au microscope photonique, avec apparition de contaminations, grossissement x10 (A), grossissement x40 (B). Les flèches indiquent les hyphes mycéliens et les bactéries.
- Figure III.4** photographies montrant des cultures de microalgues en phase de purification par méthode de repiquages répétitifs en stries.
- Figure III.5** Fenêtre de mesure du logiciel Leica Qwin lite (Digital Image Processing and Analysis Soft Ware for Professional Microscopy Leica Systems).
- Figure III.6** Souches de microalgues appartenant au genre *Chlorella* observées au microscope photonique (grossissement x 40).
- Figure III.7** Quelques photographies montrant les différents stades de reproduction asexuée (formation des autospores) des souches de chlorelle isolées (grossissement x 40).
- Figure III.8** Souches de microalgues appartenant au genre *Scenedesmus* observées au microscope photonique (grossissement x 40).
- Figure III.9.a** Principales enzymes impliquées dans la photosynthèse localisées dans la membrane chloroplastique.
- Figure III.9.b** Induction de l'activité de l'hydrogénase par l'inactivation du PSII et principales enzymes impliquées dans la production d'hydrogène.
- Figure III.10** Chromatogramme type (Chroma-Card) obtenu lors des analyses de gaz effectuées.
- Figure III.11.a** Chromatogramme des gaz collectés dans la culture de *Chlorella sorokiniana* Ce.
- Figure III.11.b** Cinétique de la production d'hydrogène et d'oxygène chez *Chlorella sorokiniana* strain Ce pendant la carence en soufre.
- Figure III.12.a** Cinétique de la production d'hydrogène et d'oxygène chez *Chlorella salina* souche Mt pendant la carence en soufre.
- Figure III.12.b** Chromatogramme des gaz collectés dans la culture de *Chlorella salina* Mt.
- Figure III.13.a** Cinétique de la production d'hydrogène et d'oxygène chez *Chlorella* sp souche Pt6 pendant la carence en soufre.
- Figure III.13.b** Chromatogramme des gaz collectés dans la culture de *Chlorella* sp Pt6

Figure III.14	Evolution du Pourcentage d'oxygène dans les différentes cultures pendant la carence en soufre (étape de production d'hydrogène).	84
Figure III.15	Morphologie des Chlorelles en phase ou non de la production d'hydrogène observées au microscope photonique (grossissement x 40).	86
Figure III.16	Evolution de la croissance des souches étudiées exprimée en poids sec (g/l), incubées dans les conditions autotrophiques (BG 11) et hétérotrophiques (Tris Acétate Phosphate ?TAP?).	87
Figure III.17	Graphe typique de la fluorescence de <i>Chlorella sorokiniana</i> Ce.	89
Figure III. 18	Graphe modélisé de la variation des concentrations de l'oxygène et de l'hydrogène dans les conditions de carence en soufre en fonction du temps (Orlando <i>et al.</i> , 2008).	91
Figure III. 19	Graphe expérimental montrant les variations des gaz dans la culture carencée en soufre de <i>Chlorella sorokiniana</i> Ce	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1	Propriétés physiques de l'hydrogène sous forme gazeuse (Piera <i>et al.</i> , 2006).	11
Tableau I. 2	Propriétés physiques de l'hydrogène sous forme liquide (Piera <i>et al.</i> , 2006).	12
Tableau I.3	La demande en sources d'énergie renouvelable en Europe et potentiel en Algérie.	16
Tableau I.4	Microorganismes utilisés pour la production d'hydrogène (Das et Vizeroglu, 2003).	18
Tableau I.5	Taux d'hydrogène produit et nature des métabolites secondaires par les différents microorganismes.	25
Tableau I.6	Comparaison des procédés de production biologique les plus importants.	29
Tableau I.7	Classification des algues d'eau douce en fonction de leurs pigments et de leurs types de réserves.	34
Tableau I.8	Relation entre le type de photobioréacteur, l'efficacité photosynthétique (EP) et le taux de biomasse ($Y_{dw, E}$).	42
Tableau I.9	Efficacité de la conversion énergétique en biohydrogène de quelques espèces de microalgues (Melis <i>et al.</i> , 2000).	42
Tableau I.10	Taux d'hydrogène et efficacité de la conversion du substrat chez <i>Rhodobacter capsulatus</i> cultivée dans un photobioréacteur en cuve agité de 3L (Greenbaum, 1988).	43
Tableau III.1	Caractéristiques physiques des eaux de prélèvement récoltées de la région du Touat.	61
Tableau III.2	Caractéristiques chimiques des eaux de prélèvement de la région du Touat (concentrations des différents ions exprimées en mg/l).	62
Tableau III.3	Apparition et prolifération des microalgues dans les différentes zones de prélèvement en fonction des milieux de culture.	65
Tableau III.4	Identification de quelques familles de microalgues en fonction de la zone de prélèvement et du milieu d'isolement utilisé.	66
Tableau III.5	Identification de quelques genres de microalgues en fonction de la zone de prélèvement et du milieu d'isolement utilisé.	69
Tableau III.6	Réponse différentielle des souches sélectionnées en rapport avec la production d'hydrogène dans les différentes conditions.	77
Tableau III.7	Comparaison du taux d' H ₂ produit et de la pression partielle d'O ₂ inhibitrice chez différentes espèces de microalgues (Chader <i>et al.</i> , 2008).	84



INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les émissions de gaz à effet de serre constituent actuellement le fléau environnemental le plus inquiétant pour les générations futures. Les combustibles fossiles, répondant à 80% de la demande énergétique mondiale, en sont les principaux responsables.

Pour lutter contre ce phénomène et face à l'épuisement des énergies fossiles programmé à moyen terme, la recherche de combustibles de substitution, moins polluants, liquides ou gazeux s'impose. Aussi, les préoccupations croissantes pour l'environnement et les changements climatiques, en relation avec l'engagement pris par les pays signataires du protocole de Kyoto y compris l'Algérie, tous, militent en faveur de l'utilisation des sources d'énergie propres et renouvelables. Il est donc plus qu'indispensable de développer des systèmes et des technologies, basés sur des ressources renouvelables et durables, sans danger pour l'atmosphère.

Parmi ces technologies, figurent celles liées à l'utilisation de l'hydrogène et qui suscitent de plus en plus d'intérêt et connaissent un essor important. En effet, l'hydrogène est un très bon candidat pour devenir cette source puisqu'il présente une combustion propre, produisant uniquement de l'eau et possédant un grand pouvoir calorifique (122 kJ/g). De plus, il est un vecteur énergétique idéal car toutes les énergies primaires sont transformables en hydrogène.

L'hydrogène n'est pas lui-même une source d'énergie, il est plutôt produit à partir d'autres sources. Excepté la production biologique, les procédés actuellement préconisés (vaporéformage, craquage, gazéification du charbon,...) sont consommatrices d'une grande quantité d'énergie fossile, électrique ou thermique. Par contre, la production biologique s'opère dans les conditions ambiantes de température et de pression et ne nécessite aucun apport énergétique, de plus elle est sans danger pour l'environnement, tout au contraire elle permet la mise en valeur de certaines ressources naturelles trop souvent négligées.

Parmi les nombreuses voies de production de l'hydrogène, nous nous intéressons dans notre recherche à la voie biologique en général (Das et Veziroglu, 2001) et en particulier, à celle qui s'opère par les microorganismes photosynthétiques déjà rapportée par de nombreux travaux (Gaffron et Rubin 1942 ; Schnackenberg *et al.*, 1993 ; Aoyama *et al.*, 1997). En effet, l'exposition prolongée de *Scenedesmus obliquus* à l'obscurité et sous les conditions anaérobiques mène à l'expression de l'hydrogénase et au dégagement de l'hydrogène, cette production est nettement stimulée en présence de la lumière, un phénomène rapporté pour la première fois il y a plus de 60 ans par Gaffron (1940). La production biologique de l'hydrogène est un processus métabolique qui se déclenche lorsque le pouvoir réducteur formé par le photosystème I (PSI) est détourné pour réduire les protons en hydrogène gazeux, une réaction catalysée par une Fe-hydrogénase (Gaffron et Rubin 1942 ; Greenbaum, 1988) selon les réactions suivantes :



Cependant, l'activité de la Fe-hydrogénase est stimulée en milieu anoxique. En présence d'oxygène, l'hydrogénase est complètement inhibée (Greenbaum, 1982, Happe et Naber, 1993), ce qui limite la production d'hydrogène à cause du dégagement continu de l'oxygène lors du processus de photosynthèse.

Un protocole utilisant *Chlamydomonas reinhardtii* (microalgue de référence largement étudiée) est toutefois proposé définissant deux étapes pour la production de l'hydrogène. La première servira pour la synthèse des réserves et la seconde se déroulant en anoxie assurera la production d'hydrogène (Melis *et al.*, 2000).

Seulement, cette production est vite inhibée par une pression partielle d'oxygène inférieur ou égal à 0.2% (Melis *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2002). D'autres travaux indiquent que la production d'hydrogène par les algues vertes adaptées à l'anaérobiose comparées à d'autres microalgues (Boichenko et Hoffmann, 1994), ainsi que l'efficacité de conversion de la lumière se révèle être un critère sélectif pour la recherche de nouvelles espèces (Greenbaum, 1988 ; Boichenko *et al.*, 1989).

L'objet principal de notre étude est la compréhension et la maîtrise du mécanisme de production biologique de l'hydrogène par les microorganismes en général et par les microalgues en particulier.

La thèse est constituée de trois chapitres. Le premier chapitre consiste en une étude bibliographique composée de plusieurs parties. La première partie s'intéresse à la problématique de la production d'hydrogène par les différentes sources d'énergie fossiles et renouvelables. Une seconde partie est dédiée à la production biologique de l'hydrogène par les différents microorganismes (bactéries, cyanobactéries et microalgues). Un rappel de la classification des algues est aussi donné. Enfin, un bref aperçu sur la technologie des photobioréacteurs pour la culture en masse des microalgues et l'optimisation du procédé de production d'hydrogène, sont montrés.

Le deuxième chapitre décrit l'ensemble des moyens expérimentaux mis en œuvre lors de ce travail. Ce chapitre est également divisé en plusieurs parties. La première partie correspond à la présentation du site de prélèvement des souches étudiées, les méthodes d'identification et d'analyse et la conception des photobioréacteurs utilisés pour les cultures en batch. La deuxième partie expose le protocole qui concerne les cinétiques de production d'hydrogène par les différentes souches et le dosage simultané des paramètres de croissance (composés hydrocarbonés, les protéines, les chlorophylles totales et la variation des poids sec pendant la phase de production),

Le troisième chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus. Il est constitué de cinq parties distinctes mais complémentaires. La première partie est un exposé de la répartition et l'identification des microalgues en fonction des zones de prélèvement et les milieux d'isolement. La deuxième partie concerne les résultats régissant le choix des milieux et la méthode préconisée pour induire le processus de production d'hydrogène. Elle présente aussi le schéma réactionnel et la réponse des différentes souches face aux conditions opératoires. Enfin, la mesure de l'efficacité photosynthétique et un essai de validation des résultats obtenus sont brièvement exposés.

Finalement, une discussion de l'ensemble des résultats obtenus en dégagant des perspectives pour des travaux ultérieurs en rapport avec la structure biomoléculaire des enzymes impliquées dans la production d'hydrogène. Cette recherche permettra, à plus long terme, de valoriser les souches microalgales autochtones par la mise au point d'un processus de production semi industriel de l'hydrogène à des fins énergétiques, à travers par exemple, la production d'électricité via les piles à combustible.



CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I – Revue bibliographique

I. Introduction

Ce chapitre dresse un état de l'art non exhaustif sur les technologies liées à l'hydrogène sous tous ses aspects ; sa production, son stockage, sa distribution et sa conversion.

La première partie traite des propriétés de l'hydrogène et les différentes voies de production, quelles soient d'origine fossile ou renouvelable, notamment par voies biologiques à partir des microorganismes en général et par les microalgues en particulier. La seconde partie s'attache à présenter des généralités sur les microalgues, leur écologie et leur utilisation dans la production biologique de l'hydrogène. La troisième partie traite de la problématique de conception des photobioréacteurs et rappelle les photobioréacteurs existants (différentes géométries, principales caractéristiques), à décrire les divers types de systèmes d'agitation (homogénéisation du milieu de culture) et d'optimisation des photobioréacteurs. La dernière partie est consacrée aux choix des éléments de conception des photobioréacteurs et déterminer les contraintes à intégrer pour optimiser les rendements des conversions énergétiques.

Ce nouveau siècle présente plusieurs défis environnementaux. La distribution d'eau potable, le réchauffement planétaire et l'obtention de nouvelles sources d'énergie en substitution des combustibles fossiles en sont les plus cruciaux. Ces deux derniers sont intimement liés car la majeure partie du dioxyde de carbone (CO₂), considéré comme le principal responsable de l'effet de serre, est issu de l'utilisation des combustibles fossiles.

Ainsi, les nouvelles sources d'énergie devront avoir comme caractéristique principale l'émission presque nulle de CO₂. L'hydrogène avec ses propriétés répond à cette exigence puisque sa combustion libère de la vapeur d'eau.

Découvert par Henry Cavendish en 1766, il le dénommait « air inflammable », il a montré que l'hydrogène combiné avec de l'oxygène générait de l'eau. Cette caractéristique amena Lavoisier à proposer le nom d'hydrogène (Piera *et al.*, 2006).

Ces dernières années, l'hydrogène a reçu une attention particulière car il présente une combustion propre, produisant uniquement de l'eau, et possède un grand pouvoir calorifique (*i.e.*, 122 kJ/g). Il est ainsi considéré comme étant le vecteur énergétique idéal puisqu'il permet le stockage et le transport d'énergie sur des courtes, moyennes et longues durées (Berry and Aceves, 2005; Orecchini, 2006).

De plus, toutes les énergies renouvelables sont transformables en hydrogène et par conséquent elles peuvent être stockées sous sa forme gazeuse ou liquide, ce qui renforce d'autant son attrait.

Pour illustration, les figures I.1 et I.2 présentent le nombre d'articles annuels référencés par « Science direct » et « ISI Web of Knowledge » en utilisant les mots clés "hydrogen production" et "hydrogen storage distribution". Il est clair qu'à compter de la fin des années 90, nous observons une croissance rapide des recherches, surtout concernant la production. De plus, le nombre de publications sur la production d'hydrogène (plus de 800 en 2006) est dix fois plus grand que celle sur le stockage et la distribution (80 publications en 2006). Cela indique l'intérêt de la communauté scientifique pour l'amélioration des rendements des méthodes de production d'hydrogène. Cela donne également une explication quant au retard des techniques de stockage et de distribution.

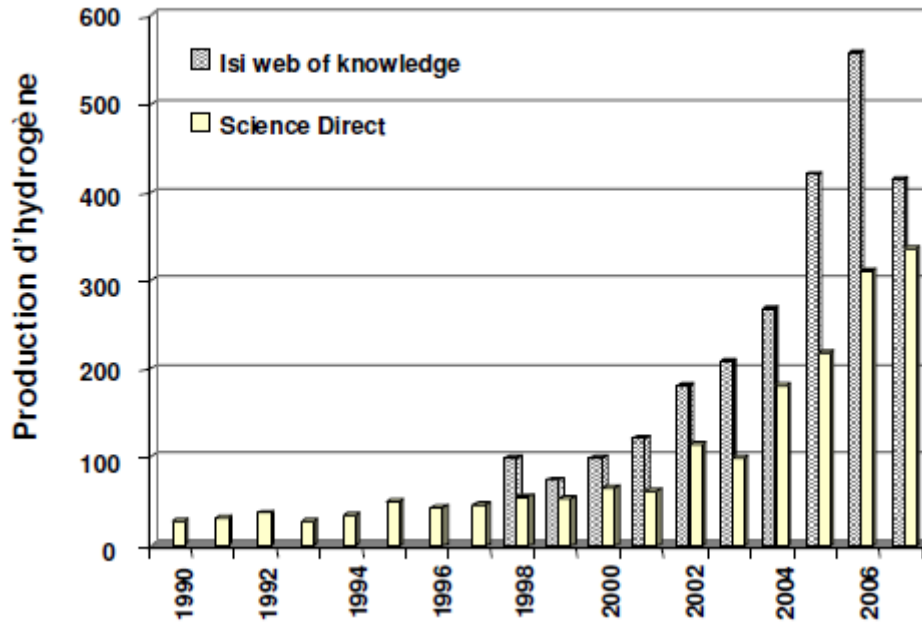


Figure I.1 Evolution annuelle du nombre d'articles scientifique dédiés à la production d'hydrogène (Aceves Lara, 2007).

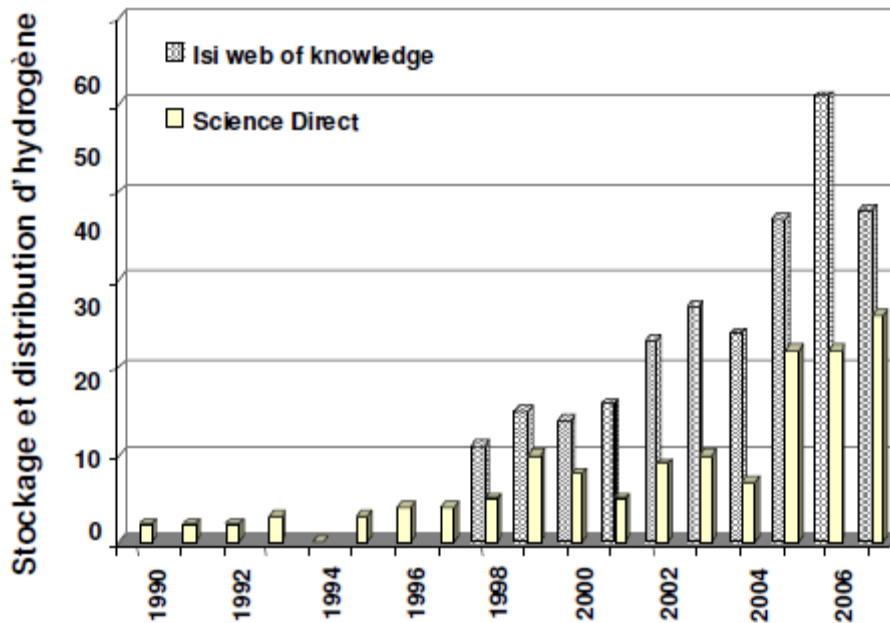


Figure I.2 Evolution annuelle du nombre d'articles scientifique dédiés au stockage et à la distribution d'hydrogène (Aceves Lara, 2007).

L'utilisation de l'hydrogène comme source inépuisable d'énergie avait déjà été prédite depuis 1874 par Jules Verne dans son roman « l'Île Mystérieuse ». Il imagina en effet l'hydrogène

comme un substitut du charbon et évoqua le principe de la pile à combustible : « *Je crois que l'eau sera un jour employée comme combustible, que l'hydrogène et l'oxygène qui la constituent, utilisés isolément ou simultanément, fourniront une source de chaleur et de lumière inépuisables. L'eau est le charbon de l'avenir* », « *Ce que j'ai écrit sera réalisé à la fin du siècle* »

Bien plus tard, l'hydrogène a été utilisé comme combustible, entrant à 50 % dans le mélange de gaz de ville fourni aux grandes métropoles jusque dans les années 1950 (Bjørnar *et al.*, 2002; Maddy *et al.*, 2003). Ce gaz est d'ailleurs toujours utilisé en Chine, en Afrique du Sud et dans tous les lieux où le gaz naturel est cher (Bjørnar *et al.*, 2002).

L'hydrogène est l'élément le plus abondant de la planète, il ne se trouve jamais à l'état libre il est plutôt combiné à d'autres éléments, comme l'eau ou les hydrates de carbone. C'est la molécule la plus énergétique (120MJ/kg) par rapport au gaz naturel par exemple (50 MJ/kg).

Ceci étant, l'hydrogène présente des avantages et des inconvénients qui sont liés à ses propriétés physiques résumées dans les tableaux I.1 et I.2. Il a un grand pouvoir énergétique par rapport à sa masse puisque 1 kg de H₂ est équivalent à 2,8 kg d'essence et 2,4 kg de méthane. Il a ainsi été utilisé par la NASA pour les voyages dans l'espace, dont la consommation représente actuellement 0,1 % de la production mondiale (Koroneos *et al.*, 2004). C'est le gaz le plus léger (grande vitesse de diffusion), il n'est ni toxique ni polluant, sa combustion ne génère que de l'eau.

Tableau I.1 Propriétés physiques de l'hydrogène sous forme gazeuse (Piera et al.. 2006).

Propriété	Valeur
Masse molaire (g)	2.02
Point d'ébullition (K)	20.3
Température critique (K)	33
Densité du gaz à TPS (kg/m ³)	0.0838
Viscosité du gaz à TPS (g/cm.s)	809.10 ⁻⁵
Energie minimale d'ignition	0.02
Limite d'inflammabilité dans l'air (vol. %)	4.1-75
Limite de détonation dans l'air (vol. %)	18.3-59
Température de flamme (K)	2318
Vitesse de détonation (km/s)	1.48-2.15
Surpression de détonation (kPa)	1470
Energie thermique minimale (kJ/g)	120
Energie thermique maximale (kJ/g)	142
Vitesse de combustion à TPS (cm/s)	265-325
Pourcentage d'énergie thermique rayonnante (%)	~21
Flux d'énergie transmise par convection (kJ/cm.s)	1. 53.10 ⁻²
Energie d'explosion (kg TNT/m ³)	2
Coefficient de diffusion (cm ² /s)	0.61

Tableau I. 2 Propriétés physiques de l'hydrogène sous forme liquide (Piera et al., 2006).

Propriété	Valeur
Température au point normal d'ébullition (K)	20.3
Chaleur de vaporisation (MJ/kg)	0.46
Densité du liquide (kg/m ³)	71
Densité de vapeur (kg/m ³)	1.34
Viscosité du liquide (g/cm.s)	13.56
Vitesse de vaporisation du liquide sans être brûlé (cm/min)	2.5-5.0
Energie d'explosion (gTNT/cm ³ du liquide)	1.71

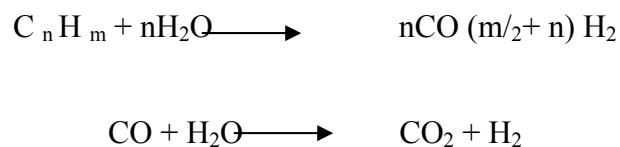
II. Production et stockage d'hydrogène

II.1 Les voies de production à partir des énergies fossiles (non renouvelables)

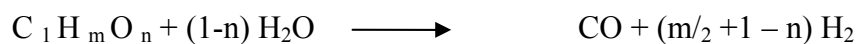
II.1.1 Reformage des combustibles fossiles (Aceves Lara, 2007).

Parmi les méthodes de production de l'hydrogène à partir des énergies fossiles, on cite : le vaporeformage du gaz naturel, le craquage du gaz naturel, l'oxydation partielle des hydrocarbures et la gazéification du charbon, la pyrolyse de la biomasse et l'électrolyse de l'eau.

Actuellement, l'hydrogène est produit principalement à partir du reformage à la vapeur de combustibles fossiles tels que le méthane ou le gaz naturel (Damen *et al.*, 2006). Près de 90 % de la production mondiale sont obtenus par cette voie – soit 45 milliards de tonnes ce qui engendre un niveau élevé de CO₂ (Maddy *et al.*, 2003). Le reformage des combustibles fossiles se fait en deux réactions principales :



Le reformage du charbon et d'autres solides carbonés est quant à lui décrit par la réaction suivante :



Ces diverses réactions se déroulent à des températures situées entre 800-900°C avec un catalyseur métallique tel que le nickel. Ces dernières années, plusieurs modifications technologiques ont été proposées afin de diminuer les quantités de CO₂ émises dans l'atmosphère. C'est le cas du réformage autothermique, du réformage avec des membranes et avec des unités

d'absorption (Damen *et al.*, 2006). De plus, une partie des combustibles fossiles peut être transformée directement par reformage solaire, par cette réaction (Zedtwitz *et al.*, 2006):



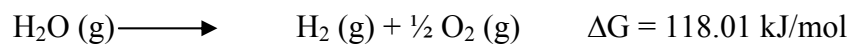
II.1.2 Pyrolyse de la biomasse

A partir de la biomasse sous toutes ses formes (résidus forestiers, agroalimentaires ou déchets organiques,...), la production d'hydrogène se fait soit par pyrolyse ou gazéification en donnant un mélange gazeux (H_2 , CH_4 , CO_2 , CO et N_2). Au cours de la pyrolyse, la biomasse est transformée en hydrogène à hautes températures (autour de $700\text{ }^\circ\text{C}$) par un procédé semblable au reformage des combustibles carbonés.

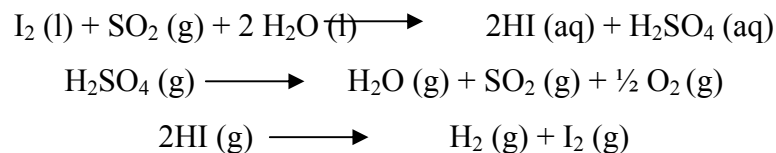
Ces dernières années, ce procédé est devenu attractif grâce à la réduction des coûts obtenue en utilisant des déchets solides (Dowaki *et al.*, 2007) ou des boues d'une station d'épuration (Midilli *et al.*, 2002). Actuellement, la pyrolyse présente des rendements proches de 30 % mais ceux-ci varient avec la température (Demirbas, 2007), l'humidité et les catalyseurs utilisés (Hao *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2007). Il est par ailleurs à noter que généralement, le reformage du gaz est couplé à la pyrolyse afin d'augmenter les quantités d'hydrogène produites (Demirbas, 2007; Dowaki *et al.*, 2007).

II.1.3 Reformage de la vapeur d'eau

L'hydrogène peut également être produit à partir de la vapeur d'eau grâce à la rupture de cette molécule selon la réaction :



Malheureusement, cette réaction n'est pas spontanée et il est nécessaire de fournir une énergie thermique importante jusqu'à obtenir des températures proches de $2000\text{ }^\circ\text{C}$. L'utilisation de cycles thermiques a été proposée afin de réduire la quantité d'énergie nécessaire à la rupture des molécules d'eau en abaissant la température à $1250\text{ }^\circ\text{C}$ (Maddy *et al.*, 2003). Le cycle thermochimique du sulfure-iode est le plus utilisé (Barbarossa *et al.*, 2006; Giaconia *et al.*, 2007) et a été inventé par *General Atomic*[®] suivant les réactions:

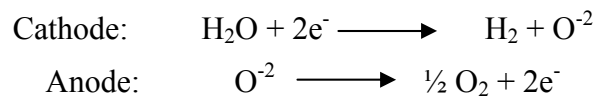


Cette méthode a été améliorée grâce à l'utilisation de catalyseurs comme le complexe Ag–Pd/PdO et le Fe₂O₃ (Barbarossa *et al.*, 2006) qui permettent de réduire la température utilisée à 600 °C.

II.1.4 Electrolyse de l'eau

L'hydrogène peut aussi être produit en utilisant de l'électricité afin de séparer l'eau en ses deux éléments constitutifs (Maddy *et al.*, 2003; Lessing, 2007). Les réactions se produisent dans un électrolyte conducteur d'ions oxygène ou de protons.

Les températures nécessaires varient entre 80 °C et 1000 °C. Avec un électrolyte à ions oxygène, les températures doivent être proches de 1000 °C (Miri and M'raoui, 2007). Les principales réactions de l'électrolyse de l'eau sont les suivantes :



Les cathodes utilisées sont constituées de membranes solides perméables à l'oxygène. Pour cette raison, l'hydrogène doit être séparé de la vapeur d'eau de différentes façons (Lessing, 2007). L'anode est habituellement constituée de nickel et de cuivre enduit d'oxydes de métaux comme le tungstène et le ruthénium. La cathode, quant à elle, est réalisée en nickel enduit de platine (Koroneos *et al.*, 2004).

II.1.5 Photocatalyse

L'utilisation de la photocatalyse est une voie supplémentaire de production d'hydrogène. La photocatalyse est une catalyse hétérogène où des matériaux semi conducteurs couplés à des métaux, sont utilisés pour déshydrogéner des composés organiques ou de l'eau (Figure I.3). Jusqu'à présent, des rayonnements ultraviolets ont été utilisés dans la plupart des expériences, bien qu'il soit envisagé d'utiliser de la lumière solaire afin de réduire les coûts.

La figure montre le transfert d'énergie à partir de la bande de valence E_V jusqu'à la bande de conduction E_C . Le symbole M représente un métal de transition comme le Ti, Ru, Pd, etc. Le meilleur couple de photocatalyseurs découvert jusqu'à maintenant est le RuO₂/TiO₂ en utilisant du méthanol et des rayonnements ultraviolets (Nada *et al.*, 2005). Le pH est un facteur important de la photocatalyse avec des catalyseurs comme le CuLaO_{2.62} (Koriche *et al.*, 2006) et le Fe₂O₃ (Gondal *et al.*, 2004).

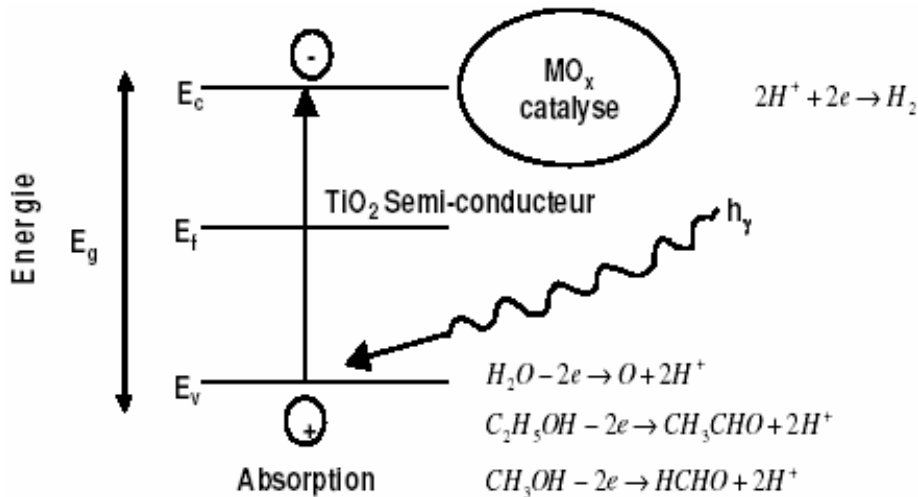


Figure I.3 Production photocatalytique d'hydrogène (Aceves Lara, 2007).

II.1.6 Production à partir d'énergie nucléaire

L'énergie nucléaire issue de la fission est utilisée actuellement pour la production d'électricité. Cependant, l'hydrogène peut également être produit directement à partir de l'énergie thermique libérée pendant la fission avec un rendement proche de 55 % (Piera *et al.*, 2006). Par électrolyse, il est possible d'obtenir des rendements compris entre 20 et 40 % à basses températures et jusqu'à 50 % pour de hautes températures (Piera *et al.*, 2006). L'électrolyse à hautes températures semble être un bon compromis car elle utilise l'électricité produite et la chaleur dégagée par l'énergie nucléaire.

Cependant, pour limiter à la fois les inconvénients liés au dégagement des gaz à effet de serre et le réchauffement planétaire ainsi que la disparition des combustibles fossiles, il est nécessaire de mettre au point des procédés de production durable d'hydrogène à partir de procédés propres, durables et renouvelables.

II.2 Les voies de production à partir des énergies renouvelables

Les mêmes procédés cités précédemment sont possible, à condition que l'énergie électrique ou thermique utilisée, soit d'origine renouvelable (électricité photovoltaïque, énergie solaire thermique, géothermique ou éolienne). Dans ces procédés dits hybrides solaire-fossile, les combustibles fossiles servent uniquement de matière première pour produire de l'hydrogène (Zedtwitz *et al.*, 2006; Z'Graggen *et al.*, 2006).

II.2.1 Production à partir d'énergie solaire

Parmi les voies renouvelables les plus rentables pour une production intensive d'hydrogène, la voie de l'énergie solaire thermique semble la solution la plus intéressante (Figure I.4). De nombreux projets sont en cours dans le monde concernant le domaine d'hydrogène produit à partir d'énergie solaire. Le tableau I.3 donne la demande énergétique annuelle en Europe comparée à sa disponibilité en Algérie. En effet, l'Algérie compte tenu de ses potentialités énergétiques satisfait pleinement toutes les exigences pour une telle production (Harouadi *et al.*, 2007).

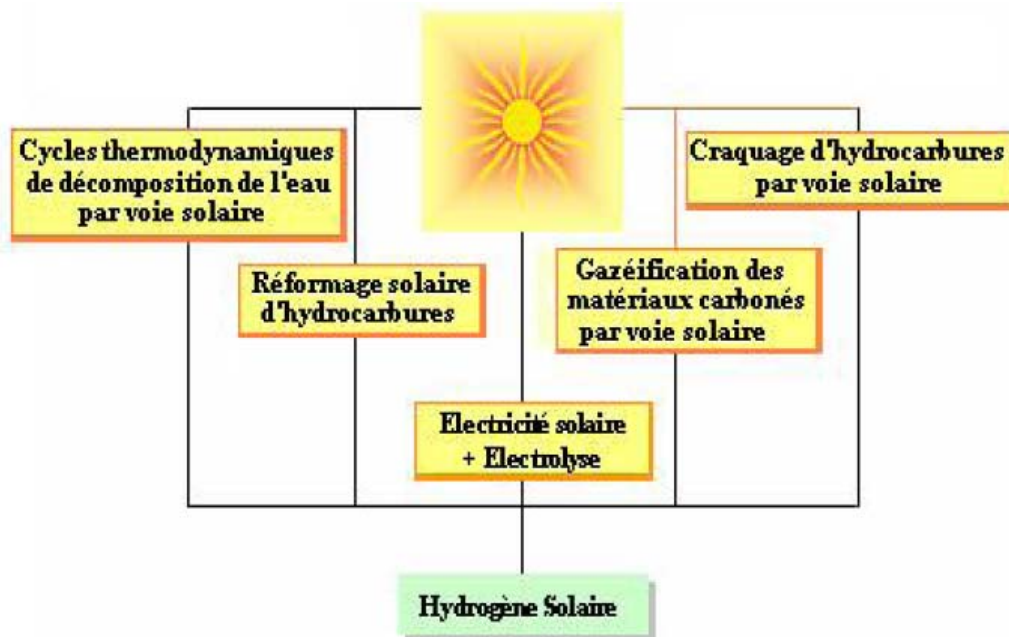


Figure I.4 Filières de synthèse de l'hydrogène par voie solaire (Ferriere et Flamant, 2004).

Tableau I.3 La demande en sources d'énergie renouvelable en Europe et potentiel en Algérie (Cherigui *et al.*, 2009).

Ressources renouvelables	Demande énergétique (TWh/an)
Biomasse	620
Géothermie	380
Energie éolienne	1520
Energie hydraulique	910
Energie solaire	1730
Energie solaire en Algérie	169 440

II.2.2 Procèdes biologiques de production d'hydrogène

L'innovation majeure de la production de l'hydrogène par les sources renouvelables est belle et bien la production biologique, qui repose sur l'utilisation d'organismes vivants capables, grâce à leur pouvoir de conversion photochimique de convertir l'énergie solaire en hydrogène. La production biologique de l'hydrogène est définie comme le résultat du métabolisme d'un organisme vivant qui libère, dans des conditions données, de l'hydrogène gazeux comme métabolite primaire. Le tableau I.4 donne les principales espèces de microorganismes (cyanobactéries, bactéries et microalgues) ayant été déterminées comme étant des souches capables de produire de l'hydrogène.

Tableau I.4 Microorganismes utilisés pour la production d'hydrogène (Das et Vizeroglu, 2001).

Taxons	Nom de l'organisme	Références
Microalgues vertes (Chlorophyceae)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Schnackenberg <i>et al.</i> 1993
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Greenbaum, 1990
	<i>Chlamydomonas moewusii</i>	Greenbaum, 1990
Cyanobactérie		
Avec hétérocyste	<i>Anabaena azollae</i>	Banerjee <i>et al.</i> , 1989 ; Shi <i>et al.</i> , 1987
	<i>Anabaena CA</i>	Kumar et Kumar, 1991
	<i>Anabaena variabilis</i>	Tsygankov <i>et al.</i> , 1997; Vyas et Kumar, 1995
	<i>Anabaena cylindrica</i>	Smith <i>et al.</i> , 1992; Stewart et Rowell, 1975.
	<i>Nostoc muscorum</i>	Spiller <i>et al.</i> , 1978
	<i>Nostoc spongiaeforme</i>	Vyas et Kumar, 1995
Sans hétérocyste	<i>Westiellopsis prolifica</i>	Vyas et Kumar, 1995
	<i>Plectonema boryanum</i>	Sarker <i>et al.</i> , 1992
	<i>Oscillatoria Miami BG7</i>	Kumazawa et Mitsui, 1992
	<i>Synechococcus sp.</i>	Reddy et Mitsui, 1984
	<i>Aphanothece halophytico</i>	Belkin et Padan, 1978
	<i>Mastidocladus laminosus</i>	Bothe et Kentemicj, 1990
Bactéries Photosynthétiques	<i>Phormidium valderianum</i>	Bagai et Madamwar, 1998
	<i>Rhodobater sphaeroides</i>	Fascetti <i>et al.</i> , 1998; Sasikala <i>et al.</i> , 1995
	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	Singh et Srivastava, 1991
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Zurrer et Bachofen, 1982
	<i>Chromatium sp. Miami PSB 1071</i>	Ohta <i>et al.</i> , 1981
	<i>Halobacterium halobium</i>	Khan et Bhatt, 1991
Bactéries Fermentatives	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Tanisho <i>et al.</i> , 1983
	<i>Clostridium butyricum</i>	Tanisho <i>et al.</i> , 1987
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Bothe et Kentemicj, 1990
	<i>Magashaera elsdenii</i>	Bothe et Kentemicj, 1990
	<i>Citrobacter intermedius</i>	Brosseau et Zajic, 1982
	<i>Escherichia coli</i>	Tanisho <i>et al.</i> , 1987

La production biologique de l'hydrogène par les microalgues a été rapporté il y a plus de 100 ans (Jackson et Ellms, 1896 *in* Richmond, 2004), et devenue un sujet de recherche scientifique depuis les années 40 (Gaffron, 1940 ; Gaffron et Rubin, 1942). Enfin, la recherche & développement appliqué a été lancée au début des années 70 (Benemann et Weare, 1974). Cependant les avancées d'application pratique ces 30 dernières années restent négligeables (Benemann, 1997, 1998).

II.2.2.1 Biophotolyse de l'eau par les algues et les cyanobactéries

Les microalgues et les cyanobactéries sont capables de produire de l'hydrogène couplé à la photosynthèse grâce à des hydrogénases et des nitrogénases (Tamagnini *et al.*, 2002). La photosynthèse est réalisée par deux systèmes différents qui fonctionnent en série. Le premier sépare les molécules d'eau (Photosystème II, PSII) et le deuxième produit les réducteurs (Photosystème I, PSI) et l'hydrogène (Melis et Happe, 2001).

La production de l'hydrogène par biophotolyse repose sur le principe de la photosynthèse connue chez toutes les plantes. Le métabolisme est réorienté, dans certaines conditions, notamment en anaérobiose, vers la production d'hydrogène au lieu de la synthèse des hydrates de carbone (cycle de Calvin) et la formation de la biomasse.

En effet, à partir d'eau et d'énergie lumineuse, ces microorganismes photosynthétiques produisent de l'hydrogène. Les schémas ci après résument les voies métaboliques de la production du bio hydrogène selon qu'il s'agit des microorganismes photosynthétiques autotrophes ou hétérotrophes :

II.2.2.1.1 Production photo autotrophique par les microalgues et les cyanobactéries utilisant le CO₂ comme seule source de carbone (Figure I.5)

Les micro-organismes photoautotrophes utilisent les longueurs d'onde du spectre visible comprises entre 400 et 700 nm (Akkerman *et al.*, 2002; Melis and Melnicki, 2006). Jusqu'à présent, les micro-organismes produisant de l'hydrogène offrent des rendements de conversion de substrat de 3-10 % si l'oxygène est rapidement retiré du milieu (Akkerman *et al.*, 2002) et pour des rendements de conversion de photons supérieurs à 80 % (Melis and Happe, 2001).

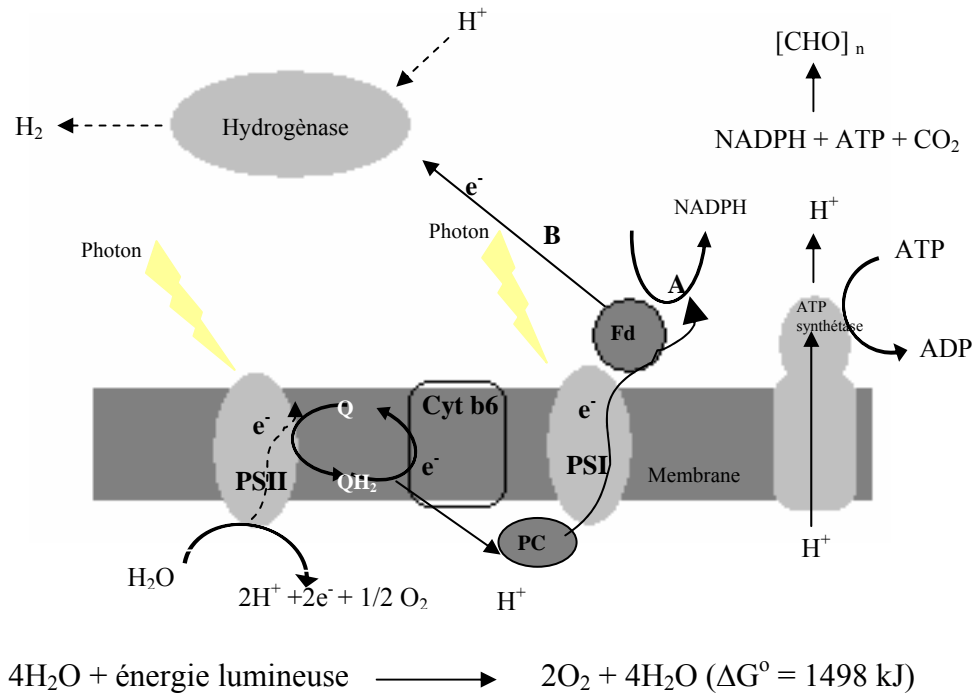
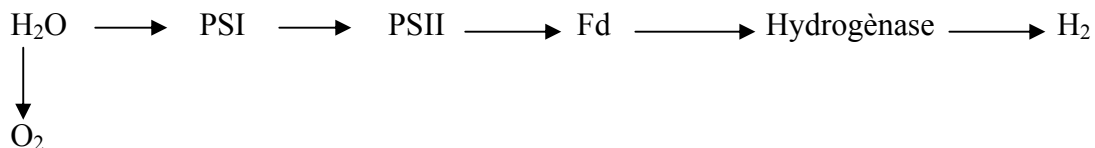


Figure I.5 Sites enzymatiques de conversion et transport des électrons pour la production du biohydrogène (réaction catalysée par une hydrogénase) chez les organismes photoautotrophes ; (A) vers le cycle de Calvin ; (B) vers la production d'hydrogène (Akkerman *et al.*, 2002).

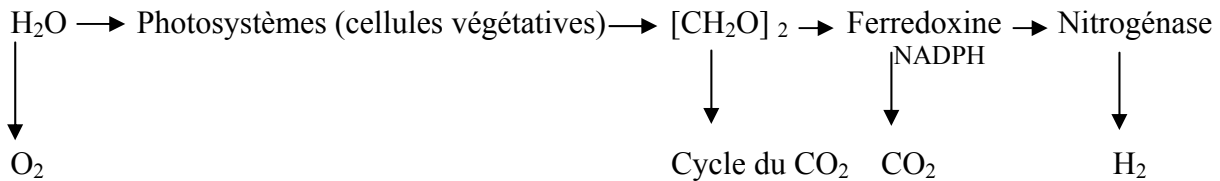
La photosynthèse implique l'absorption de la lumière par deux photosystèmes (photosystème I : PSI et photosystème II : PSII) distincts opérant en série pour la dissociation de deux molécules d'eau et libérant de l'oxygène. Ainsi des électrons sont libérés et seront utilisés soit pour réduire le CO_2 (Cycle de Calvin) soit sont eux même réduits en hydrogène gazeux par une hydrogénase se trouvant dans les plastes.

Cette dernière absente chez les plantes supérieures et spécifiques aux microalgues, quelques macroalgues vertes et les cyanobactéries, peut réduire les protons en hydrogène gazeux. Ce phénomène a été rapporté pour la première fois par Gaffron et Rubin (1942), puis repris par plusieurs chercheurs (Healey, 1970; Benemann *et al.*, 1980). Ces derniers expliquent que la bio-décomposition directe de la molécule d'eau par l'énergie des PSI et PSII libèrent des électrons qui sont transportés via des porteurs (Ferredoxine : Fd). Jusqu'à une hydrogénase qui va les réduire en gaz selon la réaction simplifiée suivante :

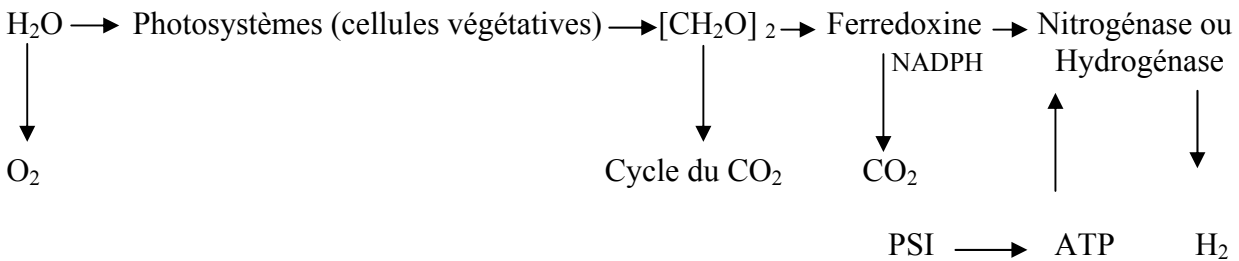


Les cyanobactéries sont aussi capables de produire de l'hydrogène via la photosynthèse en impliquant un complexe enzymatique faisant intervenir en plus de l'hydrogénase, une nitrogénase en fonction du type de cyanobactérie (avec ou sans hétérocyste) selon les réactions ci-après (Smith *et al.*, 1992) :

Cyanobactéries avec hétérocyste :



Cyanobactéries sans hétérocyste :



II.2.2.1.2 Production hétéro trophique par les bactéries photosynthétiques (Figure I.6)

Le principe de production chez ces espèces est le même que celui exposé plus haut, seulement ces microorganismes (bactéries photosynthétiques) utilisent obligatoirement une source organique de carbone.

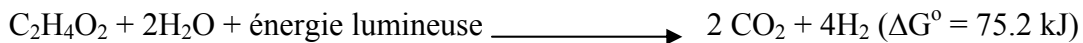
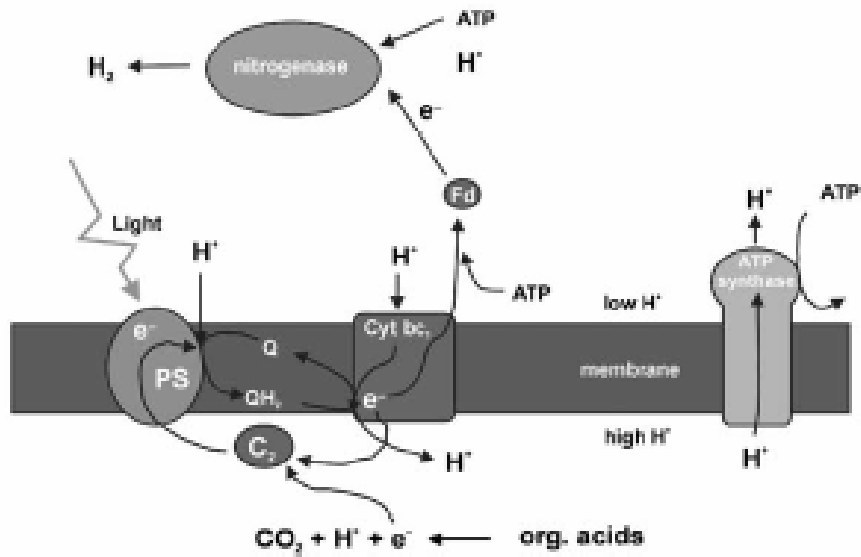


Figure I.6 Sites enzymatiques de conversion et transport des électrons pour la production du biohydrogène (réaction catalysée par une nitrogénase) dans les organismes photohétérotrophes (Akkerman *et al.*, 2002).

II.2.2.2 Photo décomposition des composés organiques par les bactéries photosynthétiques (Figure I.7)

L'hydrogène est également produit à partir de composés organiques par photofermentation à l'aide de micro-organismes photohétérotrophiques grâce aux nitrogénases (Das and Veziroglu, 2001; Akkerman *et al.*, 2002). Les bactéries photohétérotrophiques présentent plusieurs avantages par rapport aux microalgues : tout d'abord, elles sont anaérobies facultatives, ensuite les réactions de photodécomposition ont un ΔG proche de zéro (Miyake *et al.*, 1999) et enfin, elles sont capables de travailler à des longueurs d'onde comprises entre 400 et 1000 nm, ce qui intègre une partie du spectre non visible de la lumière et du proche infrarouge (Akkerman *et al.*, 2002; Melis and Melnicki, 2006).

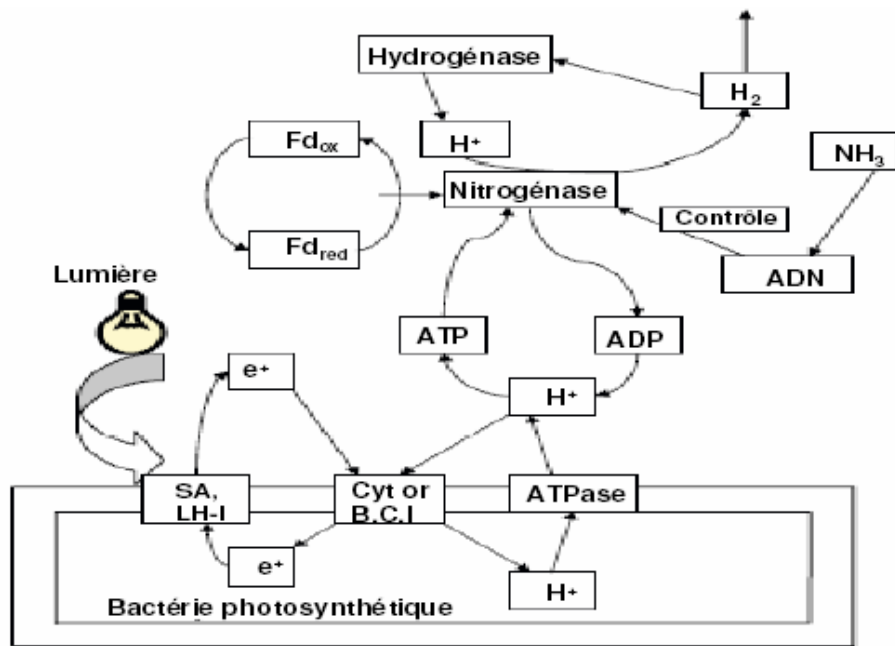


Figure I.7 Mécanisme de la production de l'hydrogène par des bactéries photosynthétiques. SA, site actif; Cyt, Cytochrome; B.C.I Bactériochlorophylle I (Basak and Das, 2007).

Les inconvénients de la photofermentation résident dans les faibles rendements de conversion de la lumière dans les photobioréacteurs et par l'inhibition due à l'excès de lumière i.e., photoinhibition (Wakayama and Miyake, 2002). Les rendements obtenus se situent autour de 4 %, sauf pour quelques mutants qui atteignent 35 % (Akkerman *et al.*, 2002; Shi and Yu, 2006). L'utilisation de réacteurs plans disposés en série et alimentés en parallèle est une solution au problème des faibles rendements car cette configuration permet l'utilisation de longueurs d'onde différentes avec des bactéries de différents types (Kondo *et al.*, 2002). Le deuxième inconvénient peut être résolu en utilisant des bandes pour faire des zones d'ombre, à l'aide de panneaux solaires, par exemple, de sorte que la radiation soit diminuée (Figure I.8) .

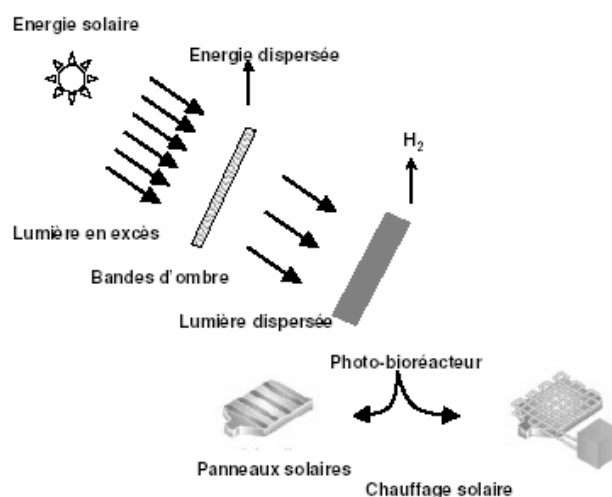
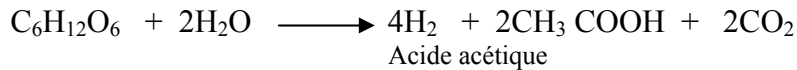


Figure I.8 Dispersion de la lumière pour diminuer la photoinhibition (Aceves Lara, 2007).

II.2.2.3 Fermentation des composés organiques par les bactéries

Cette méthode de production d'hydrogène se fait par des bactéries fermentatives qui dégradent à l'obscurité, les composés organiques issus de l'hydrolyse des déchets de la biomasse riche en glucose. Seulement, l'hydrogène peut être contaminé par d'autres gaz, tel que le méthane, il sera donc nécessaire de le purifier.



II.2.2.4 Système hybride utilisant des bactéries photosynthétiques et des bactéries Anaérobiques

Dans les systèmes hybrides, les deux types de microorganismes (photosynthétiques et non photosynthétiques) sont impliqués dans le processus de production de l'hydrogène (Miyake, 1990). En effet, certaines bactéries, telle que *Clostridium* peuvent digérer à l'obscurité et en anaérobiose (fermentation), les carbohydrates produits par des microalgues (en présence de lumière) en acides organiques qui seront réduits à leur tour en hydrogène (Figure I.9).

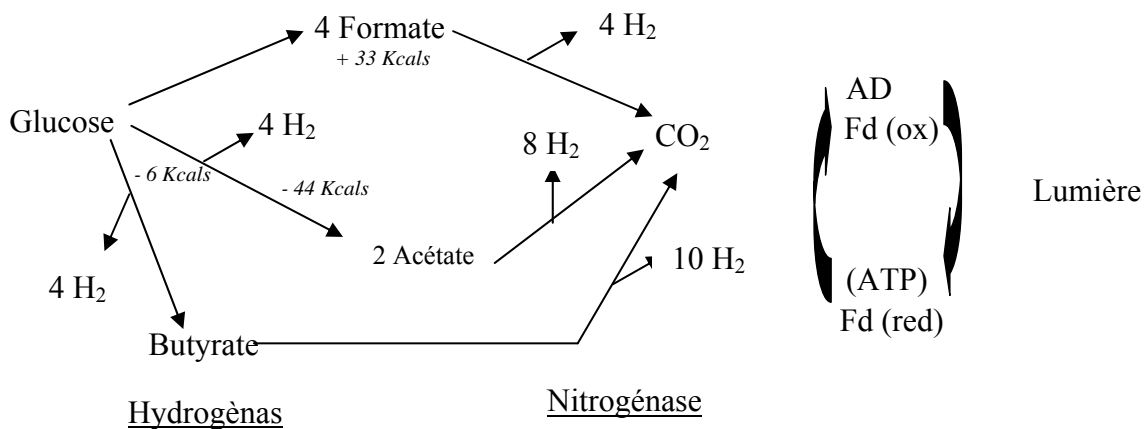


Figure I.9 Mécanisme biochimique de la décomposition du glucose par des microorganismes photosynthétiques et des bactéries anaérobiques pour la production hybride de l'hydrogène (Miyake, 1990).

Par ailleurs, Il est important de signaler que chaque espèce, présente des spécificités quand aux conditions de culture et de production (composition du milieu, temps de dédoublement,...). Ainsi les taux d'hydrogène produit et la nature des métabolites secondaires seront différents à l'intérieur d'un même genre et d'une espèce à une autre (Tableau I.5).

Tableau I.5 Taux d'hydrogène produits et nature des métabolites secondaires par les différents microorganismes.

Organisme utilisé	Matière première utilisée	Temps de dédoublement (h)	Taux Maximum d'H ₂ produit (mmol H ₂ / gms h)	Métabolites majeurs produits	Références
Bactéries Photosynthétique					
<u>Photosystèmes Double (PSI et PSII)</u>					
		7 - 25			
<i>Oscillatoria sp. Miami BG7</i>	Milieu A sans NH ₄ Cl	25	0.3	H ₂ /CO ₂ /O ₂ = 6:3:1, biomasse	Kumazawa et Mitsui, 1992
<i>Anabaena cylindrical</i>	Milieu avec azote	2.2 - 9	1.3	H ₂ , O ₂ , biomasse	Philips et Mitsui, 1983
<u>Un seul photosystème</u>					
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Lactate avec d'autre source d'azote		5.3	H ₂ , CO ₂ , O ₂ , une quantité de lipides et biomasse	Hillmer et Gest, 1977; Tanisho, 1996
<i>Rhodopseudomonas Capsulate</i>	Bouse de vaches		0.3	H ₂ , CO ₂ , O ₂ , une quantité de lipides et biomasse	Fascetti <i>et al.</i> , 1998
<i>Rhodopseudomonas sp</i>	Amidon		1.3	H ₂ , CO ₂ , O ₂ , une quantité de lipides et biomasse	Fascetti, 1983
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Acide lactique Déchets		5.9	H ₂ , CO ₂ , O ₂ , une quantité de lipides et biomasse	Sasikala, 1991
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Eaux usées		0.46	H ₂ , CO ₂ , O ₂ , une quantité de lipides et biomasse	Sasikala <i>et al.</i> , 1992

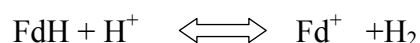
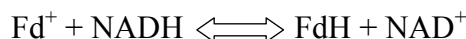
Tableau I.5 Taux d'hydrogène produits et nature des métabolites secondaires par les différents microorganismes (suite).

Mélange de microorganismes					
<i>Phormidium valderianum</i> <i>Halobacterium halobium</i> , <i>Escherichia coli</i> 1:1:1	ASNIII combiné avec TES et azote		19	H ₂ , CO ₂ , O ₂ , une quantité de lipides et biomasse	Bagai et Madamwar, 1999
Bactéries Fermentatives					
<u>Anaérobie Stricte</u>					
<i>Clostridium butyricum</i>	Milieu contenant du glucose	0.16 - 2	7.3	H ₂ , CO ₂ , une importante quantité de lipides, biomasse	Karube <i>et al.</i> , 1976
<u>Anaérobie Facultative</u>					
<i>Citrobacter intermedius</i>	Cellulose, Amidon, glucose		9.5	H ₂ , CO ₂ une importante quantité de lipides, biomasse	Brosseau et Zajic, 1982
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT	Saccharose		29.63	H ₂ , CO ₂ , une importante quantité de lipides, biomasse H ₂ /CO ₂ = 9	Kumar et Das, 1999

De ce qui précède, il ressort que l'élément clef du mécanisme de la production biologique d'hydrogène repose sur l'activité des systèmes enzymatiques des hydrogénases et des nitrogénases (Asada and Miyake, 1999) pour lesquelles une connaissance aussi complète que précise doit être fournie.

II.2.3 Biochimie des systèmes enzymatiques de la production de l'hydrogène

Les hydrogénases sont des enzymes capables de produire de l'hydrogène ou de catalyser son oxydation, d'une façon réversible, en protons et électrons suivant les réactions (Desai *et al.*, 1999):



Fd est la ferredoxine et *NAD* est la nicotinamide adénine dinucléotide.

Dans la nature, les hydrogénases sont produites, sous conditions anaérobies ou microaérobies, par plusieurs bactéries et *archaea* (Laurinavichene *et al.*, 2001) qui utilisent l'hydrogène comme source d'électrons (Nicolet *et al.*, 2002).

Les hydrogénases sont classées en trois types selon les centres actifs qui agissent comme coenzymes (Tamagnini *et al.*, 2002): les hydrogénases à Fe, les hydrogénases à NiFe et les hydrogénases sans métaux. Les deux premiers types d'hydrogénases sont souvent liés à la consommation d'hydrogène (Adams and Mortenson, 1984).

La configuration de leurs centres actifs (Figure I.5) leur permet d'avoir une bonne affinité aux molécules de gaz hydrophobes comme l'hydrogène (Nicolet *et al.*, 2002). Les cinétiques enzymatiques sont comprises entre 6000 et 9000 s⁻¹, traduisant une grande spécificité de la réaction (Melis and Melnicki, 2006).

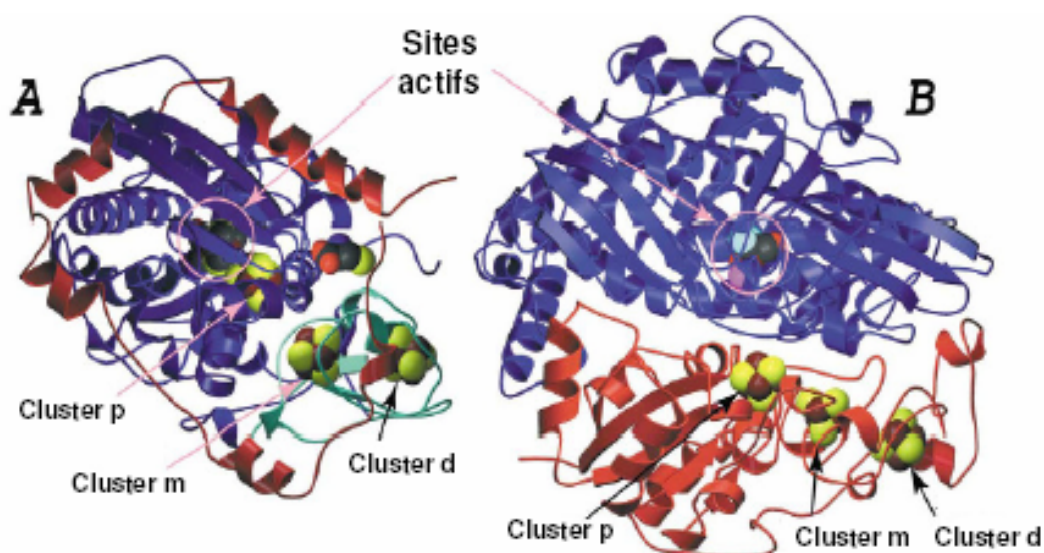
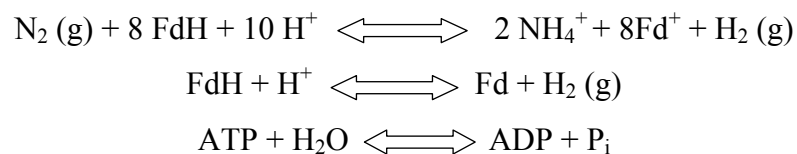


Figure I.10 Structure cristalline des hydrogénases à Fe (A) et à NiFe (B) (Nicolet *et al.*, 2002).

Les nitrogénases sont des enzymes composées de deux protéines : la dinitrogénase, une protéine MoFe réduisant l'azote, et la dinitrogénase réductase, une protéine à Fe qui transfère les électrons à la dinitrogénase (Alberty, 1994). Elles se retrouvent chez les cyanobactéries, les bactéries photosynthétiques pourpres et les bactéries photosynthétiques vertes sulfureuses. Ces enzymes réalisent trois réactions différentes :



En absence d'azote, les nitrogénases ont la particularité d'agir comme des hydrogénases mais, au contraire des hydrogénases, elles ont des cinétiques de vitesse enzymatique relativement faibles, comprises entre 6 et 9 s⁻¹ (Melis and Melnicki, 2006). Les hydrogénases présentent, par ailleurs, l'inconvénient de nécessiter un environnement anaérobie et les nitrogénases de consommer des grandes quantités d'énergie.

Dans la littérature, les procédés qui utilisent des micro-organismes ont des rendements de conversion des substrats compris entre 16 et 45 % (Woodward *et al.*, 2000; Van Ginkel and Logan, 2005). Ils sont répartis en deux classes : ceux qui utilisent la lumière (*i.e.*, les photobioprocédés) et ceux qui réalisent une fermentation obscure par digestion anaérobie (Das et Veziroglu, 2001).

En conclusion deux approches sont abordées dans la production biologique de l'hydrogène. Une approche classique (conventionnelle) basée sur la biophotolyse de l'eau (directe ou indirecte) et la nouvelle approche basée sur les systèmes hybrides. Le tableau I.6 résume les travaux réalisés sur les différents procédés biologiques de la production d'hydrogène et les microorganismes impliqués ainsi que l'avantage de chaque process (Kotay et Das, 2008).

Tableau I.6 Comparaison des procédés de production biologique les plus importants.

Procédé	Avantages	Microorganisme	Taux maximum d'H ₂ (mmol H ₂ /l/h)	Références
Classique				
Biophotolyse directe	Efficacité de conversion 10 fois plus grande que celle des arbres et des céréales.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0.07	Levin et Pitt, 2004, Mahyudin <i>et al.</i> , 1997
Biophotolyse indirecte	Production d'H ₂ avec capacité de fixer l'N ₂ atmosphérique	<i>Anabaena variabilis</i>	0.36	Tanisho <i>et al.</i> , 1998 ; Kataoka <i>et al.</i> , 1997
Photofermentation	Un large spectre de lumière peut être utilisé. Utilisation des déchets et effluents.	<i>Rhodobacter spheroides</i>	0.16	Mizuno <i>et al.</i> , 2000
Fermentation à l'obscurité	Production d'H ₂ continue, toutes les sources de carbone peuvent être utilisées comme substrat.	<i>Enterobacter cloacae</i> DM 11	75.60	Hussy <i>et al.</i> , 2003
	Production de métabolites à haute valeur ajoutée O ₂ non limitant puisque anaérobiose totale.	<i>Clostridium sp.</i> strain No. 2	64.50	Lay, 2000
Nouvelle approche				
Deux stades de fermentation (Obscurité + photofermentation)	Objectif : Atteindre un taux de conversion de 12 moles d'H ₂ par mole d'hexose utilisé.	<i>Enterobacter cloacae</i> DM 11 + <i>Rhodobacter Sphaeroides</i> OU 001	51.20	Lin et Chang 1999
		Microflore mixte + <i>Rhodobacter sphaeroides</i> OU 001	47.92	Kumar et Das, 2000

II.3 Stockage et distribution de l'hydrogène

Le stockage et la distribution d'hydrogène sont deux aspects très importants à résoudre avant d'établir une économie mondiale de l'hydrogène. Malheureusement, comme souligné précédemment, ces deux aspects n'ont reçu qu'une attention limitée par le passé. Dans le domaine du transport par exemple, vouloir substituer les combustibles fossiles par de l'hydrogène nécessite un stockage sûr et de qualité.

Malheureusement, à l'image du paradoxe de la poule et de l'œuf, une infrastructure de distribution adaptée doit être mise en place mais pour y parvenir, sa rentabilité économique doit être démontrée (Shayegan *et al.*, 2006). Plusieurs solutions ont été proposées afin de résoudre ce paradoxe. Une des plus remarquables, au niveau mondial, est l'implantation d'une « autoroute de l'hydrogène » dans l'état de la Californie, aux Etats Unis, le long de laquelle 200 stations d'hydrogène seront installées avant l'année 2010 (Berry and Aceves, 2005).

De manière générale, plusieurs méthodes ont été proposées pour stocker l'hydrogène (Boucher, 2006). Les deux techniques les mieux maîtrisées sont la compression et la liquéfaction. La compression entre 350 et 700 bars est la technologie considérée comme étant la moins chère pour la fourniture d'hydrogène aux automobiles, et plus spécialement pour les bus (Shayegan *et al.*, 2006). La liquéfaction de l'hydrogène, quant à elle, se réalise grâce à plusieurs cycles thermodynamiques (effet Joule-Thomson) afin d'arriver à des températures proches de 20 K. L'hydrogène liquide est, en fait, la meilleure option d'un point de vue énergétique car elle procure le plus petit poids pour un combustible (Hettinger *et al.*, 1998).

De plus, la liquéfaction permet le stockage d'environ 10 fois plus d'hydrogène pour le même volume que la compression à 350 bars. Malheureusement, l'hydrogène liquide présente plusieurs inconvénients dus à ses propriétés physiques, comme un point d'ébullition très bas et une grande vitesse d'évaporation (Tableau I.2), qui nécessitent l'utilisation de réservoirs cryogéniques parfaitement isolés.

La compression et la liquéfaction présentent un dernier obstacle à leur utilisation à grande échelle puisqu'elles consomment entre 10 et 30 % de la valeur énergétique intrinsèque de l'hydrogène (Berry and Aceves, 2005). Les trois autres technologies de stockage de l'hydrogène sont l'utilisation de nanostructures en carbone, d'hydrures métalliques ou d'hydrures chimiques. D'un point de vue théorique, elles permettent de stocker des quantités d'hydrogène comparables à celles de l'hydrogène liquide, mais leurs rendements sont encore trop faibles et leurs coûts trop élevés (Boucher, 2006).

En parallèle, trois grands types de distribution d'hydrogène ont été proposés: (i) l'utilisation de réseaux pour les grandes distances, (ii) l'utilisation de camions-citernes pour les moyennes et courtes distances et (iii) la distribution sous forme de bouteilles pour les courtes distances. L'utilisation de réseaux est la méthode la plus ancienne puisqu'au niveau mondial, il y a déjà 1000 km de réseaux comme celui de la vallée de la Ruhr, en Allemagne, ou le complexe industriel de La Porte au Texas, qui distribuent de l'hydrogène à plusieurs industries.

Cependant, le principal inconvénient des réseaux d'hydrogène – comme d'ailleurs des camions-citernes et des bouteilles – est la nécessité d'employer des matériaux appropriés, capables de supporter les basses températures, d'où le développement d'une recherche approfondie dédiée aux nanotechnologies pour résoudre ce problème.

II.4 La pile à combustible

Comme nous l'avons déjà mentionné, par rapport aux autres combustibles, l'hydrogène présente l'avantage de pouvoir stocker l'énergie issue d'autres sources énergétiques. La pile à combustible permet ensuite de convertir cet hydrogène en électricité. Il est à noter que le principe de la pile à combustible a été inventé dans les années 1800 et ce, avant le moteur à combustion interne. Son développement s'est ensuite accéléré à partir des années 1960, principalement sous l'impulsion des programmes spatiaux de la NASA (Bjørnar *et al.*, 2002; Maddy *et al.*, 2003; Berry and Aceves, 2005). Aujourd'hui, les piles à combustibles sont utilisables pour des voitures particulières mais avec des rendements faibles, proches de 40 % seulement (Hetland and Mulder, 2007).

La pile à combustible fonctionne en fait comme une batterie, dans laquelle une membrane anodique et une membrane cathodique sont séparées par un électrolyte (Fuel Cell Handbook, 2000). L'anode et la cathode sont alimentées en continu par de l'hydrogène et de l'oxygène, respectivement, en produisant du courant électrique et de l'eau (Figure I.11). La principale différence entre une batterie et une pile à combustible est que cette dernière fonctionne uniquement s'il y a des débits d'hydrogène et d'oxygène et qu'elle ne consomme pas d'électrolyte.

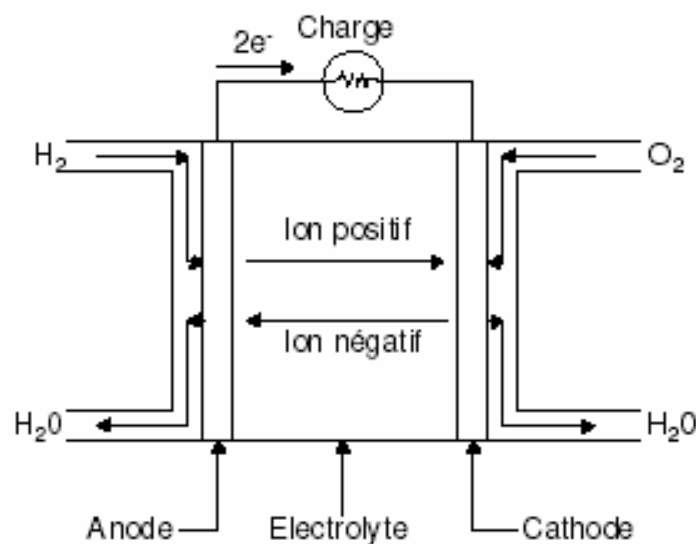


Figure I.11 Principe de fonctionnement d'une pile à combustible à H₂ (Fuel Cell Handbook, 2000).

III. Ecologie et classification des microalgues

Dans notre étude, nous nous intéresserons uniquement aux microalgues unicellulaires. Ce sont des espèces photosynthétiques microscopiques dont la productivité est importante du fait des vitesses de croissance et des successions des populations dans le temps. Leurs structures relativement molles (totalement dépourvues de lignines) pourraient en faire une biomasse très avantageuse pour un certain nombre de pratiques.

Les algues (du latin *alga*) ou encore les phycophytes *sensu lato* (du grec *phukos*, algue, et *phuton*, végétal) sont des végétaux qui appartiennent au grand ensemble des cryptogames, c'est à dire plantes dont les organes de reproduction sont cachés. Le grand public connaît une partie des algues marines, à savoir celles qui vivent fixées sur leur substrat naturel ou qui flottent en épave car leurs dimensions sont suffisantes pour les rendre visibles à l'œil nu. L'appellation microalgues désigne toutes les "plantes" de ce groupe suffisamment petites pour ne pas être perceptibles à l'œil nu.

III.1 Ecologie des microalgues d'eau douce

Comme leur nom l'indique, ces microalgues se trouvent en eau douce qu'elle soit stagnante ou courante. Ces populations sont plus denses dans les eaux stagnantes : parce qu'il n'y a pas de mouvement d'eau. Elles peuvent se développer en une couche (bloom) allant jusqu'à 10 cm d'épaisseur à la surface de l'eau, elles flottent parce qu'elles contiennent des vacuoles gazeuses.

Au cours de l'année, les populations de microalgues varient de manière cyclique dans le milieu en fonction de la température, de la luminosité, des besoins propres à chaque espèce, et de leur durée de vie variant de 15 jours à 3 mois. Les microalgues se développent dès que le milieu est riche en substances minérales (nitrates, phosphates).

La présence des microalgues a été localisée dans de nombreux sites : milieu marin, eau douce, eaux thermales, les lacs et les chotts et même dans les glaciers. En fonction de leur habitat, les algues peuvent se répartir en deux groupes :

1. les algues vivant librement dans l'eau : elles forment le plancton végétal que l'on récolte à l'aide d'un filet à plancton à mailles très fines (10 microns);
2. les algues fixées sur les cailloux ou sur les plantes aquatiques et que l'on récolte par grattage : elles forment le périphyton. Ces algues sont filamenteuses ou forment des revêtements plus ou moins gélatineux sur les surfaces immergées.

III.2 Classification sommaire des algues d'eau douce

Selon les travaux récents de Amirouche *et al.*, (2009) les algues ne constituent pas un groupe ou unité systématique (taxon), mais un ensemble hétérogène. Elles forment des groupes polyphylétiques (plusieurs groupes d'algues n'ont pas d'ancêtre commun direct). Les algues sont réparties en 11 groupes (Lecointre et Le Guyader, 2001 ; De Reviers, 2002) dont un de nature procaryotique : les cyanobactéries appartenant au règne des Eubactéria. Les dix autres groupes d'algues eucaryotes sont répartis dans plusieurs lignées évolutives.

Dans la classification des algues basée sur la structure cellulaire (basée sur la présence ou non du noyau) observée au microscope photonique, on distingue :

1. **les procaryotes** qui ne présentent pas de noyau, le matériel génétique étant dispersé dans toute la cellule; les pigments sont également répartis dans le cytoplasme; ce groupe forme les cyanophytes anciennement appelées algues bleues-vertes;
2. **les eucaryotes** qui possèdent un véritable noyau entouré par une membrane nucléaire (toutes les autres algues) et des organites bien individualisés dans le cytoplasme ; les plastes notamment.

Le deuxième critère utilisé pour la classification, est la composition chimique des pigments et des substances de réserve (différents types d'amidon et des matières grasses). La mise en évidence de l'amidon se fait par le réactif iodo-ioduré (ou lugol) : l'iode colore en rouge, brun, bleu ou noir les différents types d'amidon.

III.2.1 Rappel des principales caractéristiques des groupes de microalgues

La classification des microalgues est basée également sur l'ultrastructure des plastes, la présence de pigments, la morphologie du thalle et le type de réserves et leur localisation (Gayral, 1975 ; Gorenflot, 1975). Le tableau I.7, donne quelques exemples selon les critères précédemment cités, répartis sur 1100 genres, soit 14000 espèces.

- **Les Chlorophytes (Chlorophyta) :** ces algues ont des plastes d'un vert-franc où est stocké l'amidon avec le pyrénolide (corps protéique entouré d'amidon et spécifique aux microalgues) de l'amidon en réserve, on dit que l'amidon est intraplastidial. Cet amidon peut être mis en évidence avec la solution iodo-iodurée, il prend alors une couleur bleu-noirâtre. Les cellules nageuses possèdent habituellement un ou deux fouets de même taille.
- **Les Chromophytes (Ochromphyta) :** caractérisées par des chromatophores bruns, jaunes ou vert-jaunâtre, ces algues ne possèdent jamais d'amidon mais un polysaccharide ne se colorant pas avec la solution iodo-iodurée. Elles ne possèdent jamais de chlorophylle b. Les formes flagellées ont ordinairement deux fouets de taille inégale ou un fouet unique, plus rarement deux fouets égaux
- **Les Pyrrophytes (Cryptophyta) :** elles ont des plastes bleu-vert, parfois rouges et mettent de l'amidon en réserve mais cet amidon n'est pas contenu dans les plastes, on dit qu'il est extraplastidial
- **Les Euglénophytes (Euglenozoa) :** Elles sont toutes unicellulaires et flagellées, elles ont des plastes bleu-vert, le ou les fouets sortent d'une fossette apicale ou subapicale. Les réserves sont constituées par de gros grains de paramylon qui présentent au microscope une réfringence particulière. La solution iodo-iodurée ne les colore pratiquement pas
- **Les Rhodophytes (Rhodophyta) :** Ou algues rouges. Elles englobent surtout des algues marines. En eau douce on ne connaît que 175 espèces. Les réserves sont constituées par de l'amidon.
- **Les Cyanophytes (Cyanophyta) :** Les pigments sont surtout des phycocyanines et phycoérythrine et peu de chlorophylles. Ils sont diffus, dispersés dans le cytoplasme qui prend alors une couleur homogène. Cette couleur des Cyanophytes est très variable, généralement bleu-vert, parfois vert noirâtre ou brunâtre, rouge, bleu ou même violet. Les réserves sont constituées par un polysaccharide voisin du glycogène et qui prend une teinte acajou avec la solution iodo-iodurée

Tableau I.7 Classification des algues d'eau douce en fonction de leurs pigments et de leurs types de réserves (Leclercq et Maquet, 2001).






Embranchement	Pigments	Type de réserves	Coloration in vivo	Forme du thalle	Exemples types	Particularités
CYANOPHYTA = CYANOBACTERIA (pas de vrai noyau)	Chlorophylle a Phycocyanine (bleu)	Amylopectine+iode : brun acajou	Bleu-vert (parfois rouge ou violette)	Cellules libres	<i>Gloeocapsa</i> 	
	Phycoérythrine (rouge)			Colonies filaments de	<i>Nostoc</i> 	Certaines espèces vivent sur le sol. Elles se gorgent d'eau après chaque pluie et forment les « crachats de lune ».
				Filaments	<i>Oscillatoria</i> 	L'extrémité de ces algues est animée d'un mouvement hélicoïdal caractéristique d'où leur nom. Les cyanophytes peuvent former des fleurs d'eau (= développement spectaculaire à la surface des lacs,...) dont certaines indiquent une pollution. Quelques espèces fixent l'azote de l'air et sont utilisées comme engrais. Des espèces aquatiques donnent aux carpes qui s'en nourrissent leur goût de vase caractéristique.
EUCARYOTES (un vrai noyau) CRYPTOPHYTA	Chlorophylle a et c Phycocyanine (bleu) Phycoérythrine (rouge)	Amidon + iode : bleu		Unicellulaire	Sans thèque : <i>Cryptomonas</i>  Avec thèque : <i>Péridiniens</i> 	Le genre <i>Ceratium</i> porte de longues cornes dont la longueur varie avec la température de l'eau. Quand l'eau est chaude et donc plus fluide, les cornes s'allongent pour permettre à l'algue de flotter plus facilement.

Tableau I.7 Classification des algues d'eau douce en fonction de leurs pigments et de leurs types de réserves (suite).











RHODOPHYTA (Algues Rouges)	Chlorophylle a et d	Amidon floridéen + iode : acajou	Espèces marines généralement rouges en eau douce vert-bleu, brun-olive, noire.	Unicellulaire	<i>Porphyridium</i>		Certaines espèces affectionnent les vieux murs de plâtre humides et riches en déjections animales.
	Phycocyanine (bleu)				<i>Thorea</i>		C'est la plus grande algue rouge d'eau douce (plus d'un mètre de long parfois).
	Phycoérythrine (rouge)				<i>Batrachospermum</i>		Ces algues très gélatineuses ont l'aspect de ponte de Batraciens d'où leur nom.
					<i>Lemanea</i>		Ces algues sont caractérisées par leur aspect en tige de bambou.

Tableau I.7 Classification des algues d'eau douce en fonction de leurs pigments et de leurs types de réserves (suite).

Embranchement	Pigments	Type de réserves	Coloration in vivo	Forme du thalle	Exemples types	Particularités
OCHROPHYTA (Algues Jaunes)	Chlorophylle a et c	Chrysolaminarine		Unicellulaire, colonies filaments	Chrysophycées : <i>Hydrurus</i>	Cette algue est la plus grande des algues jaunes d'eau douce (jusqu'à 30 cm).
		Matières grasses			<i>Dinobryon</i>	Cette algue est constituée d'un seul élément avec plusieurs noyaux (= siphon).
					Xanthophycées : <i>Vaucheria</i>	Ces algues présentent une logette de silice richement ornementée. Elles sont de bons indicateurs de la qualité de l'eau dans les études de pollution.
				Diatomées :	Elles ont formé des dépôts importants de « diatomite » (roches formées de diatomées fossiles) employée pour la stabilisation de la dynamite et comme abrasif.	
OCHROPHYTA (Algues Brunes)	Chlorophylle a et c	Laminarine		Filaments	Très rares en eau douce	

Tableau I.7 Classification des algues d'eau douce en fonction de leurs pigments et de leurs types de réserves (suite et fin).

EUGLENOZOA	Chlorophylle a et b	Paramylon		Unicellaire flagellé	<p><i>Euglena</i> : peuvent former des fleurs d'eau vertes ou rouges dans les lacs d'alpages. Beaucoup d'espèces vivent dans les milieux riches en matières organiques (mares à purin p. ex.) : ce sont alors des formes incolores qui vivent comme des animaux mais quand on les transfère dans un milieu pauvre et à la lumière, la chlorophylle apparaît .</p>
CHLOROPHYTA et STREPTOPHYTA (Algues Vertes)	Chlorophylle a et b	Amidon + iode : bleu-noir	Vertes	<p>Unicellulaires colonies</p> <p>Filaments</p> <p>Unicellulaires ou filamenteux</p> <p>Forme très complexe</p>	<p><i>Chlamydomonas</i> ; <i>Chlorella</i></p>  <p><i>Scenedesmus</i> <i>Volvox</i></p>  <p><i>Cladophora</i></p>  <p><i>Spirogyra</i></p>  <p>Desmidiées au sens large</p>  <p><i>Chara</i></p>  <p>Enormes colonies (1,5 mm) de 500 à plusieurs milliers de cellules; des colonies filles se forment dans la colonie-mère.</p> <p>Très fréquente en eau calcaire où elle forme de grosses masses vertes.</p> <p>Ces algues sont particulièrement fréquentes dans les eaux acides de tourbière p. ex. dans nos fagnes. Elles sont très sensibles à la moindre pollution.</p> <p>Ces algues vertes se présentent souvent sous forme d'un axe plus ou moins ramifié avec des verticilles de rameaux; elles sont souvent incrustées de calcaire et vivent dans les eaux calmes riches en calcium.</p>

IV. Généralités sur les photobioréacteurs

IV.1 Définition d'un photobioréacteur

Un photobioréacteur est défini comme un système clos à l'intérieur duquel se déroulent, en présence d'énergie lumineuse, des interactions biologiques que l'on cherche à contrôler en maîtrisant les conditions de culture. En son sein, une réaction biochimique de photosynthèse a lieu dans le but de produire de la biomasse végétale à partir de microalgues, de CO₂ et de lumière. La notion de photobioréacteur date déjà de quelques décennies. Les premiers systèmes clos sont apparus à la fin des années 40, mais faute de moyens techniques leur développement a été interrompu et les cultures ont continué à être réalisées en bassins rudimentaires. Dans les années 80, les recherches ont repris activement et de nombreux photobioréacteurs ont été réalisés et expérimentés avec des formes géométriques diverses.

IV.2 Conception et problématique générale

Le principe du fonctionnement des photobioréacteurs est basé sur la culture de microalgues dans une enceinte confinée et sous des conditions contrôlées, à l'aide des substrats nécessaires à leur croissance et d'un apport d'énergie lumineuse. Il faut en particulier gérer l'accès aux nutriments, à la lumière et effectuer un suivi de la température et du pH de sorte que le processus d'homogénéisation du milieu soit bien assuré.

IV.2.1 La lumière et le photobioréacteur

La particularité d'un photobioréacteur tient, en plus des besoins habituels communs à tous les bioréacteurs, à la nécessité de fournir une énergie photonique aux microorganismes à cultiver (ici les microalgues), cet apport étant incontournable pour la réalisation de la photosynthèse. D'un point de vue technologique, l'enceinte du système doit donc être transparente et être conçue de façon à fournir une intensité lumineuse suffisante, mais non létale, pour les microalgues.

IV.2.2 La notion d'irradiance disponible

La croissance des microalgues (la production de biomasse) dépend de la quantité de lumière reçue par chaque microalgue. Deux facteurs sont à distinguer :

- D'une part, la quantité et la qualité de la lumière émise par le dispositif d'éclairage (intensité, spectre d'émission des sources lumineuses et nombre de ces sources).
- D'autre part, la quantité et la qualité de la lumière réellement disponible pour les microalgues au sein du photobioréacteur : celle-ci étant différente du flux lumineux incident du fait des pertes par absorption et diffusion qui ont lieu en traversant la culture et les parois du réacteur.

L'irradiance réellement disponible pour la culture est fonction de la concentration cellulaire. Globalement, celle-ci est atténuée de façon exponentielle en fonction de la profondeur de culture. Ce phénomène dit d'auto-ombrage (absorption et diffusion de la lumière par les microalgues) raréfie le rayonnement lumineux et rend hétérogène la distribution en énergie photonique au sein du procédé (Figure I.12). La distribution hétérogène de l'irradiance selon l'épaisseur de la culture conduit à des cinétiques locales de croissance :

- En surface, du fait d'une intensité lumineuse trop forte, une zone de photoinhibition peut apparaître et entraîner la dégradation des photosystèmes I et II (PSI et PSII) des antennes collectrices de la chlorophylle a et l'apparition de pigments accessoires,
 - En profondeur, des effets d'auto-ombrage peuvent conduire à une photoalimantation avec un manque d'énergie ou même à un basculement vers un mécanisme respiratoire
- Concevoir un photobioréacteur suppose donc une réflexion poussée sur les conditions d'accès à la lumière.

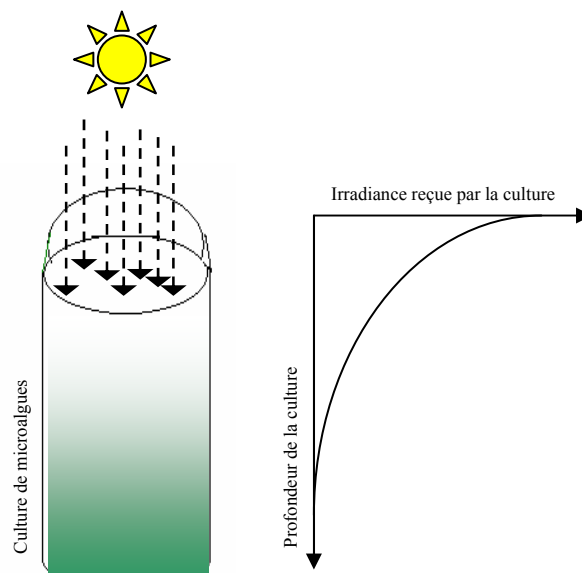


Figure I.12 Représentation schématique de l'atténuation de la lumière en fonction de l'épaisseur de culture de microalgues.

IV.2.3 L'hydrodynamique au sein des photobioréacteurs

L'homogénéisation de la culture est importante pour que les diverses réactions se déroulant au sein du photobioréacteur aient lieu. Des systèmes d'agitation et d'aération du milieu sont à mettre en place pour favoriser le mélange. Cependant cela entraîne des effets antagonistes car si ces systèmes améliorent les transferts, ils peuvent aussi fragiliser le matériel biologique.

L'hydrodynamique (turbulence, bulles, cisaillement...) est un facteur potentiellement stressant pour la croissance des cellules. Elle peut perturber voire modifier l'état physiologique cellulaire au-delà d'un certain seuil et/ou une certaine fréquence.

Il est à noter également que le bullage peut provoquer des perturbations de l'état physiologique des cellules et de la croissance (Sanchez Miron *et al.*, 1999). Différents facteurs peuvent en être responsables : les forts cisaillements au niveau de l'injecteur de gaz, l'entraînement des cellules par flottation et l'éclatement des bulles à la surface (Sanchez Miron *et al.* 1999; Barbosa 2003).

Les différentes phases au sein d'un photobioréacteur doivent être mélangées afin de favoriser l'accès à la lumière et les transferts liquide - liquide et gaz - liquide, de limiter la formation de zones de photolimitation et de photoinhibition (cinétiques locales de croissance) et d'éviter l'encrassement des parois (biofilm).

En conséquence, un compromis hydrodynamique est à rechercher, pour assurer d'une part, un mélange suffisant, et, d'autre part, préserver l'intégrité cellulaire.

IV.2.4 Régulation

Un suivi et un contrôle caractérisant la croissance sont nécessaires, tels que le dégagement d'oxygène, la consommation de dioxyde de carbone, l'augmentation du pH... Une régulation est mise en place afin d'assurer une optimisation des cultures. Le minimum requis pour un photobioréacteur industriel est le contrôle des conditions de culture à savoir le pH et la température.

En laboratoire, la régulation peut s'avérer plus poussée et des périphériques sont alors ajoutés pour permettre un suivi expérimental (Prélèvement et échantillonnage). Les photobioréacteurs sont placés dans des pièces climatisées (Zittelli *et al.*, 2000). Le suivi et la surveillance d'une production en continu, nécessitent des appareils périphériques afin d'assurer le contrôle des cultures.

IV.2.5 Techniques d'agitation et de mise en circulation

Chaque type de photobioréacteur nécessite une agitation spécifique de façon à obtenir d'une part, un mélange satisfaisant, et d'autre part, préserver l'intégrité cellulaire. Le système le plus basique et le moins coûteux consiste à injecter du gaz sous forme de bulles en fond de réacteur appelé alors colonne à bulles : les mouvements complexes de la phase liquide sont simplement induits par la population de bulles.

Dans les systèmes de type air - lift par exemple, l'injection de gaz est réalisée seulement dans une zone localisée du réacteur. La phase liquide est mise en mouvement naturellement, par différence de poids de colonnes d'eau entre les zones aérée et non aérée. Ces modes de fonctionnement permettent également de fortement aérer le milieu et ainsi de ne pas être limitant en terme de transferts gaz - liquide (apport du dioxyde de carbone et élimination de l'oxygène dissous).

Les mobiles d'agitation (hélice, turbine) sont des dispositifs technologiques internes d'agitation mis en rotation par des moteurs. Quelle que soit leur forme, le diamètre des mobiles d'agitation correspond généralement à un tiers de celui du cylindre lorsqu'il s'agit de favoriser le dégazage. Lorsqu'il s'agit de mélanger le milieu, il est réduit entre 0,5 et 0,6 fois celui du photobioréacteur (Chisti et Moo-Young 2001).

Les turbines sont efficaces pour homogénéiser le milieu (mouvement de convection) mais ne permettent pas généralement d'éviter la formation de dépôts (salissures) en parois. Dans le cas de cultures de cellules sensibles à l'hydrodynamique, des hélices marines de large diamètre sont utilisées à des vitesses de rotation faibles (Chisti et Moo-Young 2001).

La conception des systèmes clos est relativement récente et est actuellement en phase d'optimisation. Les photobioréacteurs les plus performants en terme de productivité sont plats ou tubulaires, le choix ultime du système à utiliser pour une algue particulière est cependant dépendant du critère économique (Borowitzka 1996) et du volume de culture recherché.

Pour Pulz *et al.*, (2001), les inconvénients majeurs liés à l'utilisation des photobioréacteurs plats alvéolaires sont les fuites, la propension aux salissures (dues aux nombreuses chicanes) et le trop grand nombre d'unités nécessaires à une exploitation commerciale.

En conséquence, leurs recherches s'orientent vers l'utilisation d'une géométrie tubulaire (Tredici 2004). Parmi ces géométries, les photobioréacteurs cylindriques de type colonne ont l'avantage de permettre la mise en œuvre de grands volumes de culture mais ne sont pas optimisés d'un point de vue accès à la lumière.

Du point de vue de l'agitation, seule la géométrie tubulaire (faible diamètre) permet d'utiliser tous les types de systèmes d'agitation, ce qui en final, apportent un choix plus large et une plus grande flexibilité pour s'adapter aux contraintes.

IV.2.6 Conclusion sur l'efficacité des photobioréacteurs et l'efficacité de conversion

IV.2.6.1 Les photobioréacteurs et efficacité photosynthétique

De ce qui précède, il ressort que l'efficacité des photobioréacteurs repose sur plusieurs critères notamment, le volume des cultures et la zone d'éclairement (uniformité de l'accès à la lumière). Sur la base de données empiriques et des modèles de calcul prédits dans les travaux de Janssen (2002 *in* Akkerman, 2002) qui montrent une efficacité différentielle selon le type de photobioréacteur utilisé (Tableau I.8) et selon l'espèce impliquée dans le processus de production (Tableau I.9).

Tableau I.8 Relation entre le type de photobioréacteur, l'efficacité photosynthétiques (EP) et le taux de biomasse ($Y_{dw, E}$) d'après Janssen M, 2002.

Type de photobioréacteur	EP ou $Y_{dw, E}$ (% ou $dw \text{ mol}^{-1}$)	Microorganisme
Colonne à bulles	0.84 ($Y_{dw, E}$)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
Réacteur air –lift en colonne	0.82 ($Y_{dw, E}$)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
Réacteur à panneau plat <ul style="list-style-type: none"> • Incliné • vertical 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 – 20 (EP) • 1.84 ($Y_{dw, E}$) \approx 16 (EP) 	<i>Spirulina platensis</i>
Réacteur tubulaire <ul style="list-style-type: none"> • Diamètre 2.5 cm • Diamètre 5.3 cm 	0.60 ($Y_{dw, E}$) ; 6.5 (EP) <ul style="list-style-type: none"> • 0.48 -0.63 ($Y_{dw, E}$) • 0.68 – 0.95 ($Y_{dw, E}$) 	<i>Spirulina platensis</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i>

Tableau I.9 Efficacité de la conversion énergétique en biohydrogène de quelques espèces de microalgues (Melis *et al.*, 2000).

Microalgues	Lumière absorbée ($\mu\text{W cm}^{-2}$)	H_2 (nmol h^{-1})	Efficacité [RPA (%)]*
<i>Scenedesmus D₃</i>	5.1	126	16
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2.2	44	13
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (UTEX 90)	8.4	78	6
<i>Chlamydomonas moewusii</i>	9.1	337	24

* RPA : Radiation Photosynthétique Active

D'autres travaux ont permis d'évaluer l'efficacité de la conversion photochimique du substrat utilisé en termes de quantité d'hydrogène (Tableau I.10). Sous les conditions d'anoxie, elle varie entre 3 et 10 % chez les microalgues et atteint 3.5 % chez les cyanobactéries

Tableau I.10 Taux d'hydrogène et efficacité de la conversion du substrat chez *Rhodobacter capsulatus* cultivée dans un photobioréacteur en cuve agité de 3L (Deliang, 2005).

Microalgues	Taux d'hydrogène (L)	Efficacité de conversion du substrat (%)
<i>Rhodobacter capsulatus B10</i>	2.16	44.6
<i>Rhodobacter capsulatus IR1</i>	1.83	40.6
<i>Rhodobacter capsulatus IR3</i>	3.93	84.8
<i>Rhodobacter capsulatus IR4</i>	2.36	52.5
<i>Rhodobacter capsulatus JP91</i>	2.53	56.2

IV.2.6.2 Efficacité de conversion

L'efficacité de conversion d'un processus donné est définie par le rapport entre l'énergie produite (énergie sortante) et l'énergie consommée (énergie entrante).

$$\text{Efficacité de conversion} = \frac{\text{énergie sortante}}{\text{énergie entrante}}$$

Dans les procédés de production biologique de carburants, en particulier par les microalgues, l'efficacité de conversion de l'énergie solaire, est un facteur d'importance fondamentale. En théorie, la photosynthèse des microalgues en culture autotrophe atteint 10% de conversion pour la fixation du CO₂ ou la production d'H₂ (Bolton, 1996).

Pour augmenter ce taux, plusieurs solutions sont proposées, en plus de la sélection des espèces productrices, le type de photobioréacteur, la vitesse et la périodicité des mélanges. En effet, un mélange rapide des cultures de microalgues peut assurer une absorption maximale des photons (bref flash). Ce qui implique un investissement économique non négligeable pour la conception de photobioréacteur spécifique à la production d'hydrogène, tel que les photobioréacteurs à fibres optiques (Manley et Pelofsky, 1978 travaux non publiés in Richmond, 2004).



CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Chapitre II - MATERIELS ET METHODES

Les expérimentations ont été effectuées à la division de Bioénergie & Environnement du Centre de Développement des Energies Renouvelables (Bouzaréah, Algérie) et à l'Unité de Génie Biologique de l'Université Catholique de Louvain (Belgique).

Les expériences ont porté sur la détection et l'évaluation du potentiel de production biologique de l'hydrogène, suivant plusieurs approches, par des souches microalgales localement isolées. Les expériences réalisées à petite échelle sont destinées à mieux comprendre la réponse d'une culture pure d'algues face aux différentes conditions de culture et aux apports ou carences de nutriments. Ces approches ont nécessité l'utilisation de différents milieux de culture et différentes méthodes d'analyse.

I. Site de prélèvement et méthode d'échantillonnage

I.1 Description de la zone d'étude

L'étude a porté sur les Oasis de Tamantit et Sid Ahmed Timmi, situées dans la région du Touat dans la wilaya d'Adrar. C'est une zone située au Sud Ouest du Sahara Algérien entre la latitude 27°45' et la longitude 0° 15' NE (figure II.1) à une altitude entre 252 m et 282 m. Elle a été classée suivant la convention Ramsar comme zone humide depuis 2001 (Conservation des forêts d'Adrar, 2001) du fait de la biodiversité qu'elle renferme. Chaque oasis est surélevée par une forteresse ou Ksar qui constitue le village, une entité indissociable de l'oasis, la palmeraie elle, est située en contrebas. Le système d'irrigation qui est la Foggara est un ouvrage ancestral, constitué par une galerie souterraine, creusé en pente douce dans l'immense aquifère du continental intercalaire. La région du Touat est un exutoire naturel de la nappe à faible profondeur et permet de drainer l'eau par gravité jusqu' à l'air libre. L'ouvrage se compose d'une galerie de section variable et d'une succession de puits espacés de 10 à 20 m qui permettent de creuser la foggara et de l'entretenir ultérieurement.

I.2 Conditions climatologiques

Selon le climatogramme d'Emberger, le climat de la région du Touat est typiquement saharien. Il est caractérisé par des températures très élevées à fortes amplitudes journalières, par l'irrégularité et la faiblesse des précipitations, des étés très chauds et des nuits hivernales parfois glaciales, et par un rayonnement solaire et évaporation intense. Le mois le plus froid est janvier (-10 à 3°C), les mois les plus chauds sont juillet et août (45 à 56°C). Les précipitations moyennes mensuelles varient de 0 à 3.6 mm/an. La période sèche allant de juin à septembre présente un apport pluvial nul. Elle est par conséquent considérée comme une région à conditions rigoureuses à climat semi continental hyper aride. Au niveau de l'oasis règne un microclimat en raison de la présence de l'eau et de la végétation.

I.3 Valeurs hydrologiques

Malgré de très rares précipitations, le Sahara ne manque pas de ressources en eau. Le cycle de l'eau se déroule exclusivement dans le sous sol. Les eaux souterraines provenant de l'infiltration de l'affleurement des nappes profondes ou de la condensation nocturne à la surface des ergs, se trouvent dans les sédiments des oueds et sont conservés dans les strates poreuses et dans les sables.

Ces eaux remontent par capillarité dans les grandes dépressions des sebkhas ou dans les buttes calcaires et de grés pour i alimentent l'aquifère et la plus part des Foggara. Cet apport hydrique rend possible la création d'oasis, dans un contexte fondamentalement différent de celui dont elle tire ses ressources, ressources qu'elles concentrent et recyclent continuellement.

I.4 Caractéristiques écologiques de la zone de prélèvement

La végétation de l'oasis est généralement constituée par plusieurs strates, le palmier dattier dans la strate arborescente avec près de 25 variétés, des arbres fruitiers, de nombreuses cultures annuelles (céréales, légumineuses et tomates) et des espèces fourragères. Parmi la flore spontanée, on note la présence de nombreuses espèces d'intérêts médicinales tel que le *Zygophyllum*, la trigonelle, la nigelle, etc.

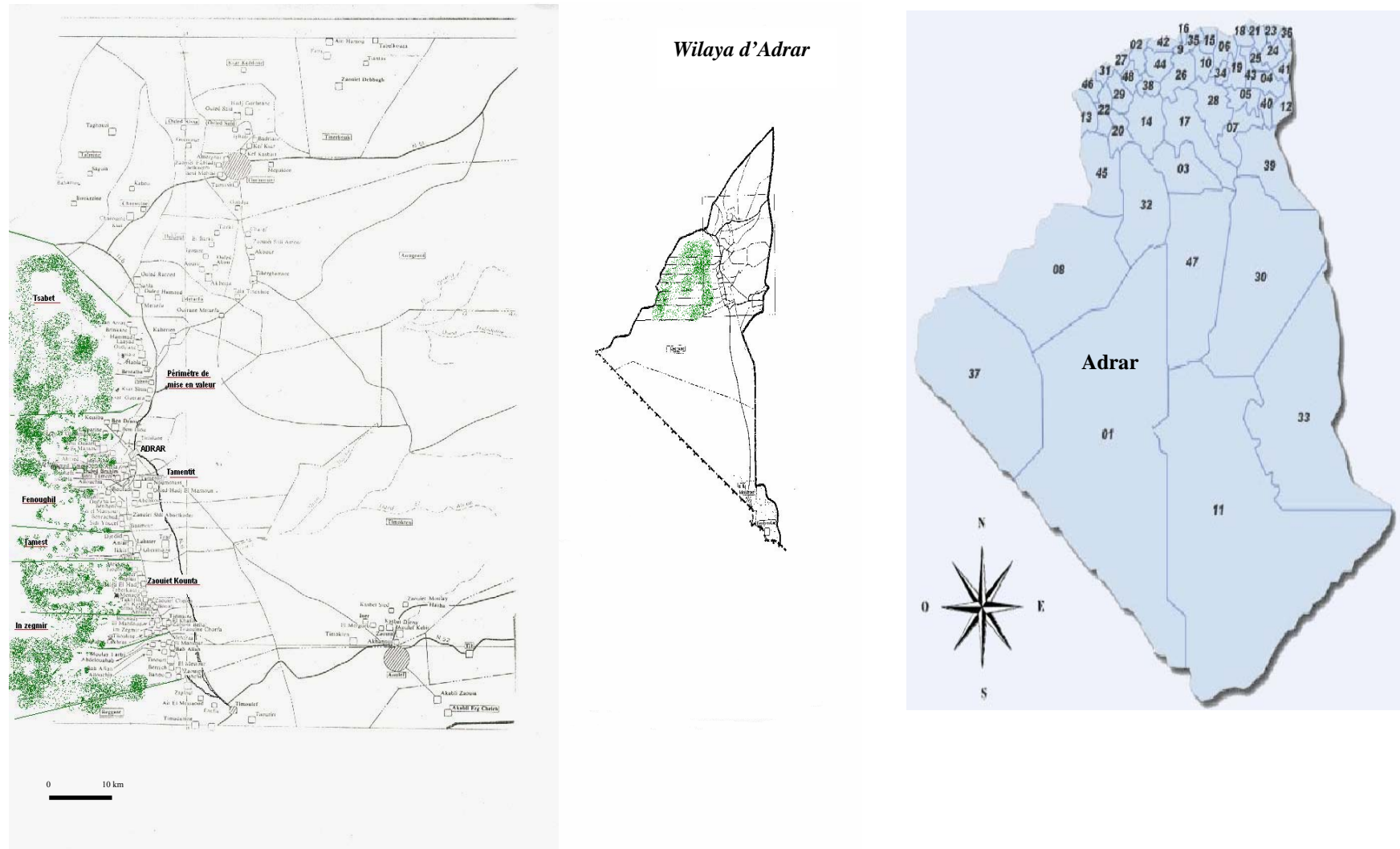


Figure II.1 Situation géographique et principales zones de prélèvement (en vert) prospectés dans la région du Touat dans la wilaya d'Adrar.

II. Prélèvement et méthode d'échantillonnage

II.1 Zones de prélèvement et récolte des microalgues

Avec la contribution du service agricole de la wilaya d'Adrar, nous avons exploré le site d'étude qui s'étend sur toute la région du Touat, là où est déterminé la zone humide. Le site a été subdivisé en 11 zones ou bassins phœnicicoles, réparties sur les 5 communes :

1. La commune de Tamantit et commune de Hammad, caractérisées par des palmeraies où sont cultivées tomates et légumineuses. Irriguées par le système très particulier de la région : les fougara.
2. La commune de Fenoughil : caractérisée par la présence de plusieurs bassins utilisés jadis comme bassins de décantation tapissé par un dépôt verdâtre rappelant la poudre d'algues et de la sebkha où subsistait une très faible quantité d'eau.
3. La commune de Tamest : la zone de prélèvement a concerné uniquement le système d'irrigation spécifique en amont des conduites primaires, ce que les agriculteurs appellent Sakia où l'eau est recouverte s'une épaisse couche de sable pour éviter l'évaporation et où prolifèrent là aussi des algues.
4. La commune In Zegmir : caractérisée par la présence en dehors de la palmeraie (ksar de Tiloulina) d'une sebkha avec plusieurs petites dépressions d'eau considérables.

Les prélèvements ont été effectués dans les principaux points : début de foggara, conduites secondaires, conduites tertiaires, les bassins d'irrigation (madjene), retenues spontanée d'eau et sakia (figure II.2). D'autres prélèvements ont été faits directement à partir d'échantillon de sol situé à proximité des oasis et des points d'eau.

II.2 Méthodes de prélèvement

Les prélèvements ont été effectués à des profondeurs de 0 à 20 cm. A chaque point de récolte, trois échantillons de 1 litre (pour analyses physicochimiques) et 3 échantillons de 200 ml (pour analyses biologiques) sont prélevés par zone selon les sites et selon la disponibilité de l'eau (profondeur). L'opération a été réalisée au mois de mars 2004, par temps ensoleillé et une température de l'air de $20^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ au matin.

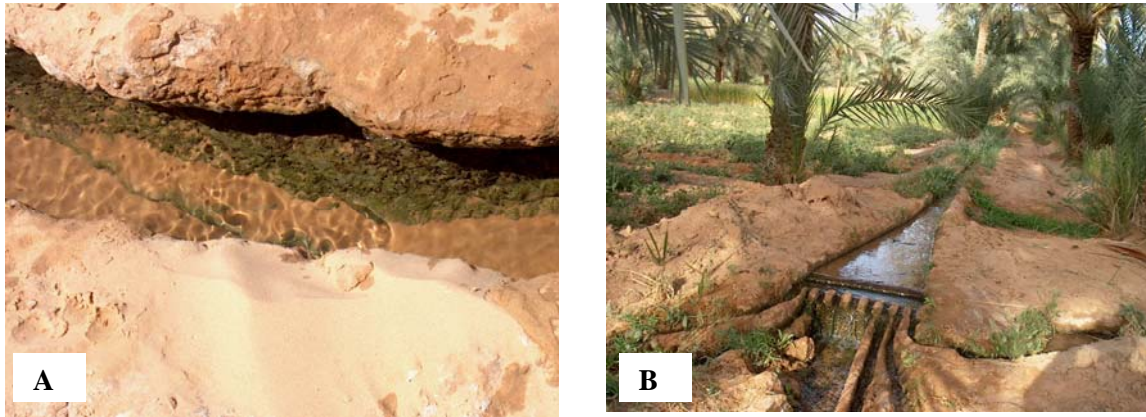


Figure II.2 Photos de quelques zones de prélèvement (Foggara à Tamantit).

- A.** La sakia «Conduite principale ».
- B.** Conduites secondaires (elkesri) et tertiaires au niveau des foggara.

Pour un des échantillons (3 sous échantillons), on ajoute un volume équivalent de Bouin Holland (voir composition en annexe 1), un fixateur qui facilitera la reconnaissance et l'identification des différents microalgues existants. Les deux autres échantillons sont conservés à 4°C et vont servir d'inoculum pour les différents isolements prévus. Pour l'analyse physicochimique, les trois échantillons subissent l'analyse sur le site même et le jour du prélèvement. A chaque flacon un numéro d'ordre est attribué avec la date, la nature et lieu de la récolte.

II.3 Analyses physicochimiques des eaux

La nature et la composition de l'eau conditionnent le développement et la répartition de la flore aquatique. La connaissance de cette composition donne une idée sur la nature chimique des eaux de chaque zone de prélèvement. Les analyses physicochimiques ont été effectuées sur terrain à l'aide des bandelettes indicatrices pour les différents sels dissous par analyse colorimétrique directe (bandelettes semi quantitative Quantofix[®]; kit d'analyse Visicolor).

Pour les analyses physiques, nous avons aussi réalisé les mesures en utilisant un multi paramètre de type WTW Multi 340i/SET équipé de sondes : pH - thermomètre, oxymètre et conductimètre.

III. Isolement, culture et identification

III.1 Milieux de culture utilisés

L'isolement des différentes espèces microalgues a été réalisé en essayant de simuler les conditions du milieu d'origine. Trois (03) milieux de culture ont été utilisés, BG11, MN et ASN III (composition chimique donnée en annexe 2). Le choix de ces milieux est justifié par leur efficacité, rapportée dans des travaux similaires réalisés pour l'isolement des microalgues du lac d'El goléa (Boubetra, 1998).

Les trois milieux sont à base de sels minéraux, aucune source de carbone ou d'azote organique n'est incorporée. Ils sont simples et conviennent à toutes les souches de microalgues et aux cyanobactéries également. En supposant l'existence, même en faible concentration, d'espèces particulières, ces milieux sont utilisés pour favoriser la prolifération du plus grand nombre d'espèces possible.

- Le milieu BG 11 favorise la croissance des algues du sol, des eaux douces, thermales et les eaux d'origine marine.
- Le milieu MN à base d'eau de mer artificielle fortement concentré en ions Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} et Ca^{2+} facilite l'isolement d'espèces marines.
- Le milieu ASN III faiblement composé de sels, permet la croissance de microalgues qui ne supportent pas les fortes concentrations.

III.2 Isolement et identification des microalgues

L'identification des souches isolées est basée sur l'observation des caractéristiques morphologiques à l'œil nu et cytomorphologiques (sous microscope). Une première identification est faite directement après prélèvement, puis renouvelée après les ensemencements et repiquages, effectués sur différents milieux d'isolement spécifiques. A chaque souche déterminée sera attribuée, en plus du nom de l'espèce, un code d'identification rappelant la zone de prélèvement.

III.2.1 Identification macroscopique

L'identification des colonies de microalgues à l'œil nu est basée sur les critères de forme, aspect, taille, contour, diamètre des colonies et couleur. La détermination des caractères macroscopiques a particulièrement concerné le chromatophore qui permet de séparer les différents groupes taxonomiques.

III.2.2 Identification microscopique

A l'aide d'un microscope photonique à épi fluorescence équipé du logiciel QWin (Leica DM/RXA), une identification plus poussée a permis de déterminer la forme des cellules leur contenu cytoplasmique, la forme des plastes, la présence ou non des pyrénoides (détecté par coloration au Lugol) et l'agencement des cellules entre elles lorsqu'il s'agit de filaments.

Les espèces ont été déterminées à l'aide des planches et clés de détermination de Bourrelly (1966, 1968 et 1970), Gayral (1975) et Cardinal (1979). Le pourcentage de chaque espèce a été calculé. Des numérations ont aussi été faites après une décantation de 24 heures, par comptage exhaustif des algues présentes dans un sous échantillon de volume connu.

III. 3 Purification des microalgues étudiées

De façon générale la purification des algues est basée sur l'orientation des espèces vers la lumière "mouvement phototactile", notamment pour les souches filamenteuses. Dans notre cas, on s'intéresse plus particulièrement aux souches microalgales unicellulaires, de ce fait, nous avons opté pour la méthode d'obtention de culture pure, basée sur le principe des suspensions dilutions et repiquages répétés sur boîtes de Petri (Derraz *et al.*, 1995 in Boubetra, 1998).

Par ailleurs, les éventuelles contaminations par les bactéries et les champignons sont évitées par l'utilisation d'un mélange d'antibiotiques (antibactériens et antifongiques) sans aucune incidence sur la croissance des microalgues. La composition du mélange d'antibiotiques est donnée en annexe (annexe 3).

III. 4 Conservation des souches et control de pureté

Les souches purifiées sont conservées sur milieu de culture gélosé dans des tubes inclinés à l'obscurité et à 4°C, elles peuvent se conserver ainsi pour de longues périodes (1 à 2 années). Néanmoins, des repiquages périodiques (chaque 6 à 8 mois) sont effectués pour s'assurer de la survie des souches et contrôler la pureté par observation microscopique.

IV. Recherche du potentiel de production d'hydrogène

La recherche du potentiel de production d'hydrogène a été inspirée essentiellement des travaux de Melis et ses collaborateurs (2000) qui préconisent l'induction de l'anoxie pour le déclenchement du mécanisme de production. Ces travaux ont porté sur une chlorophycée unicellulaire biflagellée ; *Chlamydomonas reinhardtii* (espèce modèle dans le domaine, elle est l'équivalent d'*Echerichia coli* en biologie moléculaire) reconnue pour ses performances pour la production d'hydrogène.

Pour réaliser notre étude, en plus de la sélection d'espèces performantes pour la production d'hydrogène, deux aspects sont pris en compte ; le type de photobioréacteur utilisé et la composition des milieux de culture.

IV. 1 Conception des photobioréacteurs

La conception du photobioréacteur doit être définie afin de fournir aux microalgues les conditions de culture adéquates, ce qui passe par une double approche liant la science du génie des procédés et celle de la biologie des algues. Il fallait donc envisager un dispositif qui assure l'exploitation de la lumière par les cellules photosynthétiques en tenant compte de la disponibilité des matériaux adéquats et de la souplesse des prises de mesure.

La géométrie choisie est celle constituée d'une cuve agitée en culture discontinue (batch, milieu non renouvelé). La cuve agitée assure un mélange efficace, sans zones mortes, ce qui est particulièrement intéressant pour des applications biologiques. Elle assure aussi un mélange homogène au niveau moléculaire et au niveau de la température du milieu avec un

volume constant. L'utilisation de ce modèle montre l'influence importante qu'ont les conditions hydrodynamiques sur l'accès à la lumière des microalgues dans les photobioréacteurs, et donc sur l'efficacité du procédé.

Le dispositif expérimental est constitué d'une série de 6 photobioréacteurs (prévus pour les répétitions), formé chacun d'un Erlenmeyer de 500 ml (disposé sur une plaque magnétique pour assurer une agitation en continue) raccordé à deux verres à pied de 250 ml par le biais de tube en U en verre pour permettre les échanges internes des gaz et des liquides (figure II.3). Pour s'assurer de l'étanchéité du système, les flacons sont scellés hermétiquement avec des bouchons en silicone. Pour la prise de mesure, deux sorties sont prévues, l'une à la surface du photobioréacteur, l'autre à la surface du verre à pied où les gaz sont condensés.

Un deuxième type de photobioréacteur a été utilisé pour valider les résultats expérimentaux obtenus dans la cuve agitée. Il s'agit d'un dispositif de quatre photobioréacteur toriques horizontaux (volume ≈ 700 ml chacun), disposés sur une table oscillante qui assure le brassage en vague des cultures.

Chaque réacteur est formé de deux tubes en verre cylindrique, reliés entre eux par des raccords en PVC (figure II.4). Les données sont recueillies par une acquisition qui enregistre le volume des gaz produits. Ce banc expérimental a été conçu par l'équipe du laboratoire photobiologique de l'université de Liège en Belgique (Franck et Mignolet, 2007, travaux non publiés).

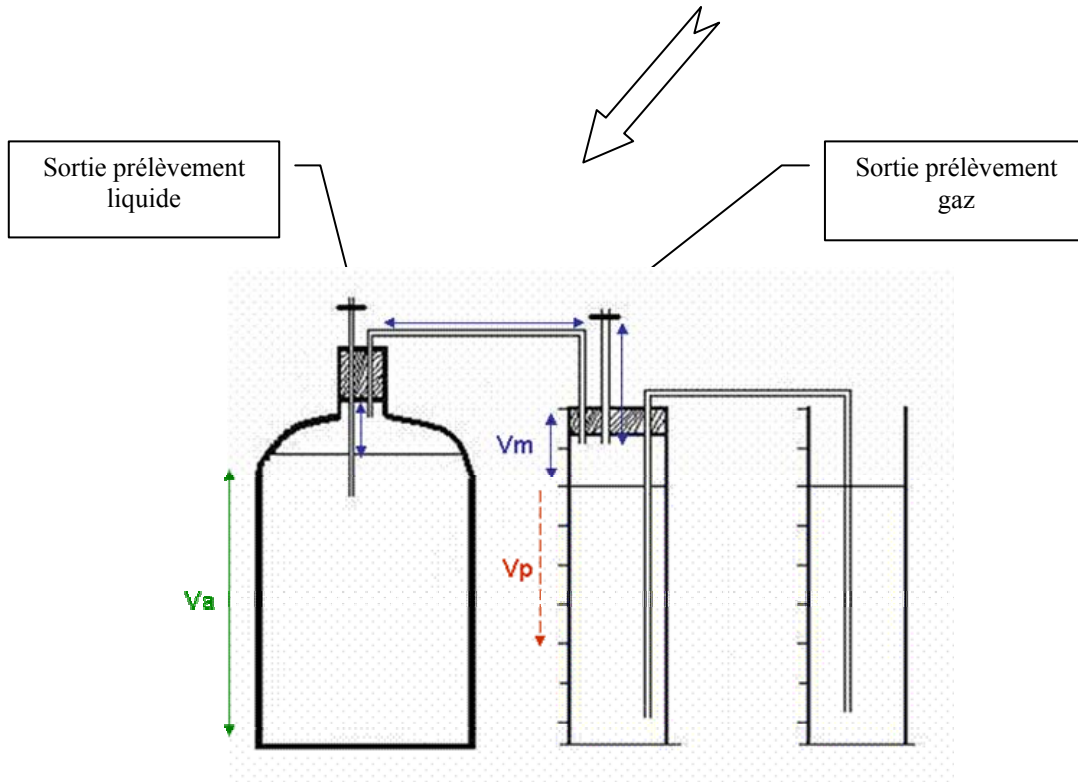


Figure II.3 Mise au point du dispositif pour la production d'hydrogène par les microalgues
 V_a = Volume culture d'algues (500 ml), V_p = volume gaz produit (mesuré par le déplacement du niveau d'eau dans le verre à pied). V_m = Volume d'air au dessus de la culture (~ 137 ml) et V_t (Volume total) = $V_m + V_p$.

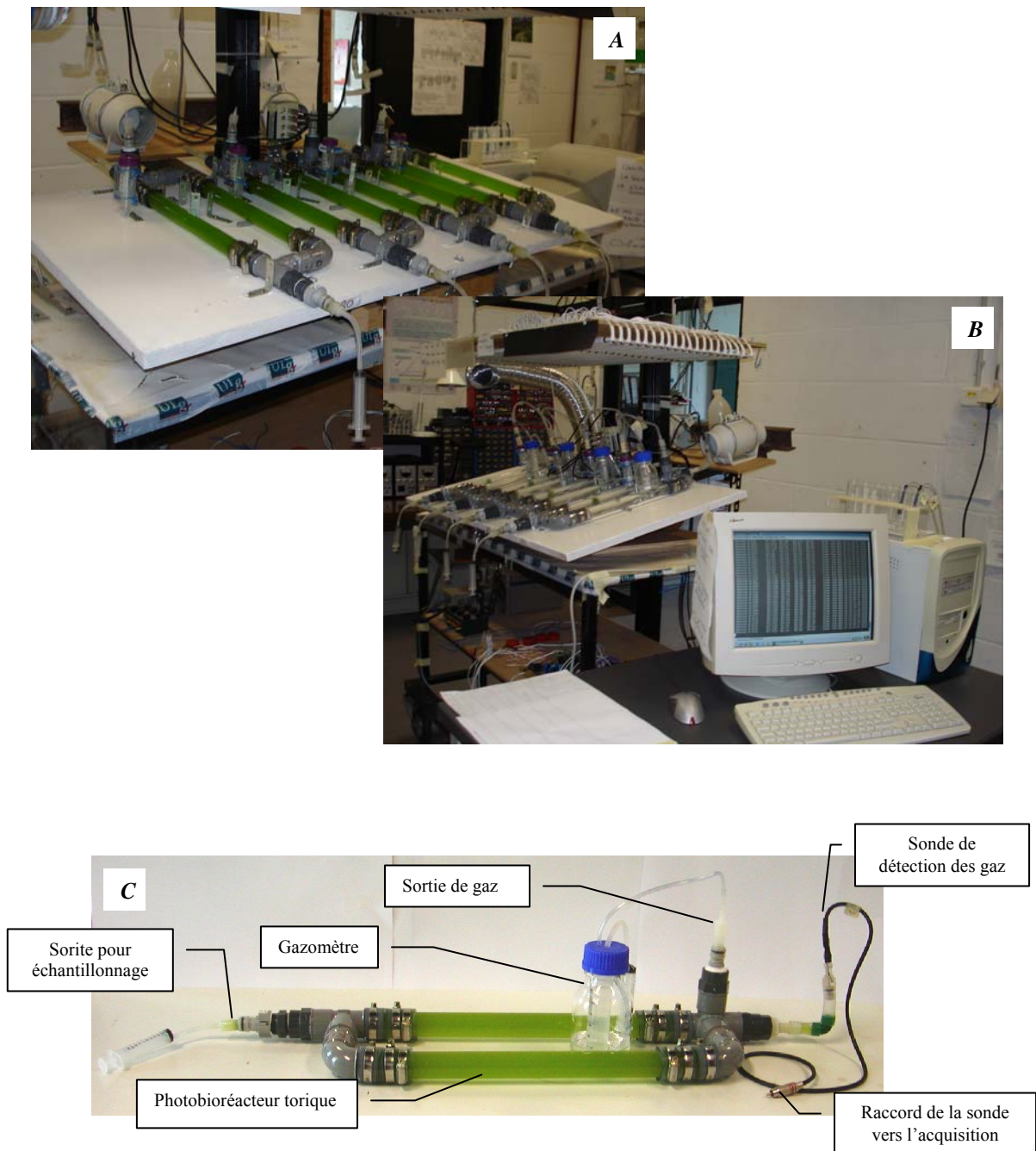


Figure II.4 Installation complète et dispositif expérimental des quatre photobioréacteurs toriques sur plan horizontal.

- A. Photobioréacteurs inoculés avec les cultures de microalgues disposés sur la table oscillante,
- B. Dispositif des quatre réacteurs connecté à l'acquisition de données,
- C. Détail de l'un des photobioréacteurs utilisés pour la validation.

IV. 2 Protocole expérimental de la production d'hydrogène

Afin de bien comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans la production d'hydrogène, un protocole définissant deux phases a été mis au point. Pendant la première phase, les conditions optimales de croissance permettront la synthèse des molécules essentielles à l'organisme et l'accumulation des réserves. La deuxième phase est la phase de production proprement dite et qui doit se dérouler en anaérobiose totale (condition sine qua non pour l'expression de l'hydrogénase du fait de la sensibilité de l'enzyme à l'oxygène). Cette anaérobiose est assurée par une carence en soufre. Par ailleurs, un dégazage à l'azote est quelques fois effectué pour accélérer le processus.

IV. 2.1 Production d'hydrogène sous conditions autotrophes

La phase de croissance et de formation de biomasse se fait sur milieu à base de sels minéraux ayant servi à l'isolement des souches microalgales étudiées, dans notre cas, sur milieu BG 11. Quant la phase de production elle se fera dans ce même milieu, dépourvu de soufre. La carence en soufre se fait par le remplacement des sels soufrés par des sels chlorés. Par exemple, utiliser dans le milieu de production des chlorures de magnésium ($Mg Cl_2$) au lieu des sulfates de magnésium ($Mg SO_4$).

IV. 2.2 Production d'hydrogène sous conditions hétérotrophes

La croissance des souches se fait sur milieu enrichi d'une source de carbone inorganique ce qui augmente le taux de réserves accumulés. Il s'agit du milieu Tris Acétate Phosphate TAP (composition donnée en annexe 43). La carence en soufre est assurée comme cité plus haut (voir paragraphe IV.2.1).

IV. 2.3 Protocole de mise en carence de soufre

Les microalgues âgées de 3 à 4 jours (phase exponentielle de croissance) cultivées sur milieu de croissance (BG 11 ou TAP selon l'expérience) sont centrifugées ($3000 \times g$ pendant 7 mn) puis lavées trois fois avec du BG 11 sans soufre ou TAP sans soufre pour enlever tout le soufre existant dans les cellules. Une fois lavées, la densité des cellules est estimée par comptage au microscope photonique sur cellule de Malassez. Une culture de $3-5 \cdot 10^6$ cellule/ml est ensuite préparée et inoculée dans du milieu sans soufre puis remise dans le photobioréacteur. Les conditions d'incubation sont données dans le paragraphe ci - après.

IV. 3 Conditions opératoires et incubation

Les essais de croissance et de production d'hydrogène ont été conduits sous les conditions suivantes :

a) Conditions opératoires pour le suivi de la cinétique de croissance :

- Milieu de culture liquide : Tris Acétate Phosphate (TAP) et BG 11,
- Température d'incubation : $25 \pm 1^\circ C$,
- Lumière (lampes Gro-lux/Aquastar fluorescent) : $33-50 \mu mol \text{ photons } /m^2/s$,
- Périodicité : lumière continue (24/24),
- Sous agitation : 137 t/min,
- Pression atmosphérique.

b) Conditions opératoires pour le suivi de la cinétique de production d'hydrogène

- Milieu de culture liquide : Tris Acétate Phosphate (TAP) sans soufre et BG 11 sans soufre,
- Température d'incubation : $25 \pm 1^\circ\text{C}$,
- Lumière (lampes Gro-lux/Aquastar) : $150\text{-}200 \mu\text{mol photons /m}^2/\text{s}$,
- Périodicité : lumière continue (24/24),
- Sous agitation : 137 t/min,
- Pression atmosphérique.

V. Méthodes d'analyse des gaz, mesure des paramètres biométriques et dosage biochimique

A l'aide de deux seringues perforées à travers les bouchons, deux sorties sont prévues pour effectuer des prélèvements journaliers, une pour l'analyse biochimique et la deuxième pour l'analyse chromatographique des gaz produits. Les seringues utilisées sont spécifiques aux gaz facilitant l'injection et évitant les pertes de gaz.

V.1 Analyse des gaz

V.1.1 Collecte et mesure des gaz produits

Le volume des gaz produits, collectés à la surface des cultures, est mesuré directement par le déplacement de l'eau dans le verre à pied gradué à température ambiante ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). Le volume exact d'hydrogène produit, est soustrait du volume total de l'atmosphère au sein du photobioréacteur, calculé après analyse chromatographique et détermination des pourcentages de chaque gaz (H_2 , O_2 , CO_2 et N_2).

V.1.2 Analyses chromatographiques des gaz

L'estimation qualitative et quantitative des gaz a été mesurée par chromatographie en phase gazeuse (GC Trace, Thermo Finnigan), équipée de deux colonnes remplies (Carbowax and Molecular sieve 5A "MS-5A, Supelco, Bellefonte, PA") et utilisant la détection de conductivité thermique (TCD). Pour séparer les différents gaz (H_2 , O_2 , CO_2 et N_2), l'argon est utilisé comme gaz vecteur sous une pression de 5 bar et un débit de 23.5 ml/min. Les conditions opératoires de l'analyse ont été ajustées à une température du four de 60°C , celle du détecteur (TCD) à 210°C et celle de l'injecteur à 30°C (figure II.5).

L'appareil est conditionné 24h avant le début des mesures en réalisant des courbes étalon avec des concentrations connues de mélange de gaz (le plus souvent de l'air mélangé avec 15 à 20% d'hydrogène pur). Les volumes totaux de l' H_2 et l' O_2 sont calculés sur la base des pourcentages mesurés par chromatographie rapportés au volume du gaz collecté à la surface des cultures dans les photobioréacteurs.

La détection des gaz produits dans le photobioréacteur torique se fait par l'induction d'une charge électrique moyennant une sonde polarisée spécifique au gaz opérant sur un switch électrique de +0.7 V pour H_2 et de -0.7 V pour O_2 (Franck et Mignolet, 2007, travaux non publiés).



Figure II.5 Chromatographe GC Trace, Thermo Finnigan équipé d'une boucle d'injection à pression atmosphérique et une vanne 6 voies, spécial gaz.

V.2 Estimation de la croissance et du comportement morphologique

V.2.1 Viabilité cellulaire

La viabilité des cellules a été déterminée par la méthode d'exclusion au bleu de Trypan (Sanchez Miron *et al.*, 2003). Ainsi, 0.2 ml de la suspension microalgale sont dilués dans 0.3 ml de Na Cl (9% v/v) puis mélangés à 0.5 ml de bleu de Trypan (0.4% v/v), le tout est maintenu pendant 5 – 15 min. les cellules non viables vont se colorer en bleu par rapport aux cellules vivantes colorées en vert. Le taux de viabilité cellulaire est estimé par le pourcentage des cellules mortes comptées par rapport aux cellules viables sur cellule de Malassez sous microscope photonique.

V.2.2 Estimation du poids sec

La mesure s'effectue quotidiennement, cela permet de suivre l'évolution de la biomasse dans les différents milieux. 25 ml de culture sont filtrés sur papier filtre en microfibrilles de verre (Whatman® GF/C, 47 mm de diamètre) et peser (balance de précision SARTORIUS avec une précision de $\pm 0,1$ mg) après dessiccation à 80°C pendant 24 h. Le poids sec est déterminé par soustraction du poids du papier filtre stabilisé par séchage (80°C pendant 24 h) de l'ensemble filtre- microalgues.

V.2.3 Concentration de la biomasse (C_b)

La biomasse microalgale a été estimée par spectrophotométrie (lecture de l'absorbance de la culture (DO) à 625 nm) (Sanchez Miron *et al.*, 2003). La courbe de calibration est établie en réalisant des lectures de densité optique à 625 nm de concentration connue de biomasse mesurée en nombre de cellules par millilitre de milieu.

V.3 Dosage biochimique

V.3.1 Dosage des carbohydrates totaux (Cg)

La méthode utilisée pour déterminer le taux des carbohydrates est inspirée de celle de la réaction acide sulfurique + anthrone adaptée à la biomasse algale (Osborne, 1985 *in* Sanchez Miron *et al.*, 2003). A 100 mg de biomasse sont ajoutés 8 ml d'acide perchlorique. Le mélange est agité fortement et laissé pour hydrolyse pendant 12 h. Cinq (5) ml du réactif à l'anthrone fraîchement préparé sont ajouté à 1 ml du filtrat précédemment obtenu puis chauffé à 100°C pendant 12 minutes. Une couleur verte se développe en raison de la formation d'un complexe sucre – anthrone, auquel on détermine la densité optique à 630 nm après refroidissement du mélange. Le blanc étant 5 ml du réactif additionné à 1 ml d'acide perchlorique.

Le réactif à l'anthrone est préparé par dissolution de 10 mg d'anthrone dans 100 ml d'acide sulfurique (72% w/w). Une courbe étalon est réalisée en préparant des concentrations connues de D⁺ glucose dissous dans de l'eau distillée. Densité optique et concentration en glucose (Cg; mg/ml) ont la relation suivante (Osborne, 1985 *in* Sanchez Miron *et al.*, 2003) :

$$Cg = 0.536 \times DO_{630} + 0.0028$$

V.3.2 Dosage des protéines

Les protéines ont été quantifiées par spectrométrie utilisant la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Un volume de 50ml de suspension algale est centrifugé à 3000 rpm pendant 2 à 3min. Les cellules (culot) sont lavées à l'eau distillée et centrifugées de nouveau. Une fois les chlorophylles écartées après extraction (voir paragraphe V.4.3.1), le culot est récupéré dans 1 ml d'eau distillée auquel on ajoute 1.5 ml de réactif Bradford, la densité optique à 595nm, est lue après un temps de réaction de 10 min. La courbe de calibration est réalisée en préparant des concentrations connues du sérum albumine bovine.

V.3.3 Analyse des pigments photosynthétiques

V.3.3.1 Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes

En fonction des souches étudiées, deux méthodes d'extraction ont été préconisées. En effet, la structure pariétale des cellules rend l'extraction des pigments plus ou moins difficile du fait de la dureté de la paroi des cellules et parfois même des membranes des plastes. Pour cela, nous avons essayer une extraction chimique (acétone 90%) et extraction mécanique par choc osmotique (méthanol 100%).

V.3.3.1.1 Extraction à l'acétone 90%

La quantité des chlorophylles est mesurée par spectrophotométrie. 5 mg de poids sec de microalgue sont centrifugés (800 x g pendant 2 min) puis mélangés à 8 ml d'acétone 90% (v/v) pour extraire tous les pigments (Hansmann, 1973). La suspension est agitée vigoureusement puis mise à l'obscurité à 4°C pendant 48 h. Un surnageant est obtenu après centrifugation (800 x g, 5 min). La densité optique de ce dernier est lue au spectrophotomètre (UV - Visible) à 665, 645 et 630 nm. La quantité des chlorophylles est calculée selon les équations suivantes :

$$[\text{ch}_a] = 11.6 \text{ DO}_{665} - 1.31 \text{ DO}_{645} - 0.14 \text{ DO}_{630}$$

$$[\text{ch}_b] = 20.7 \text{ DO}_{645} - 4.34 \text{ DO}_{665} - 4.42 \text{ DO}_{630}$$

$$[\text{ch}_c] = 55.0 \text{ DO}_{630} - 4.64 \text{ DO}_{665} - 16.3 \text{ DO}_{645}$$

Ch_a , Ch_b et Ch_c sont les concentrations des chlorophylles a, b et c en mg/l.

Les caroténoïdes sont extraits en ajoutant des parts de 1 ml d'éthyle éther jusqu'à obtention d'un extrait clair. Le solvant est ensuite évaporé, le culot obtenu est alors dissout dans 5 ml d'acétone 90% (v/v) puis lu par spectrophotométrie à 444 nm. La concentration en caroténoïdes (Ct en mg/l) est donnée par l'équation suivante :

$$\text{Ct} = 4,32 \times \text{DO}_{444} - 0.0439$$

V.3.3.1.2 Extraction au méthanol 100%

C'est une méthode utilisée pour les cellules dont la paroi est peu rigide et facilement détruite par choc osmotique. Les pigments sont extraits dans du méthanol 100 % après plusieurs centrifugations (2000 rpm, 1min) et lavages à l'eau distillée. A 1 ml de suspension microalgale on ajoute 5 ml de méthanol 100%. La densité optique de ce dernier est lue au spectrophotomètre (UV - Visible) à 470, 652.4 et 665.2 nm. La quantité des chlorophylles est calculée selon les équations suivantes (Formule de Lichtenthaler, 1987) :

$$[\text{ch}_a] = 16.72 \text{ DO}_{665.2} - 9.16 \text{ DO}_{652.4}$$

$$[\text{ch}_b] = 34.09 \text{ DO}_{652.4} - 15.28 \text{ DO}_{665.2}$$

$$[\text{ch}_{a+b}] = 1.44 \text{ DO}_{665.2} + 24.93 \text{ DO}_{652.4}$$

$$\text{Caroténoïdes} = 1000 \text{ DO}_{470} - 1.63 [\text{ch}_a] - 104.96 [\text{ch}_b] / 221$$

Ch_a , Ch_b sont les concentrations des chlorophylles a et b en $\mu\text{g/ml}$.

V.3.4 Mesure de la fluorescence et de l'efficacité photosynthétique

Lors de la phase claire de la photosynthèse, le transfert d'énergie au niveau des pigments ne se fait pas à 100%. En effet, une partie de l'énergie solaire absorbée sert à alimenter les réactions chimiques de la photosynthèse. Le reste est dissipé sous différentes formes dont les principales sont l'émission de chaleur et l'émission de fluorescence. Toutes ces voies de désexcitation sont interdépendantes. Ainsi, si un processus de désexcitation est rendu impossible ou est diminué pour quelque raison que ce soit, les deux autres seront augmentés.

Dès lors, une augmentation de l'émission de fluorescence indiquera une diminution plus ou moins marquée de la photochimie. Les caractéristiques de la fluorescence émise sont fondamentalement déterminées par les pigments absorbants de l'antenne pigmentaire du PSII (LHCII) (Hall *et al.*, 1994), le transfert d'énergie d'excitation et la nature et l'orientation des pigments. Cependant, la fluorescence est aussi affectée par le potentiel redox des centres réactionnels et des donneurs et accepteurs du photosystème II (Strasser *et al.*, 2000).

L'état de photosynthèse de la culture a été suivie par la mesure de la fluorescence (Ting, et Owens, 1994 *in* Sanchez Miron *et al.*, 2003) dans un fluorimètre (Hansatech Instruments Ltd., UK) équipé d'une électrode de Clark, pour mesurer l'oxygène dissout par polarographie (Figure II.6) . Une suspension de culture microalgale (2 ml) a été acclimatée à l'obscurité pendant 30 min puis introduite dans l'appareil de mesure et éclairée avec des pulsations de lumière rouge à différentes intensités (PFD) valeurs : 0. 10. 20. 35. 60.100.200.400.

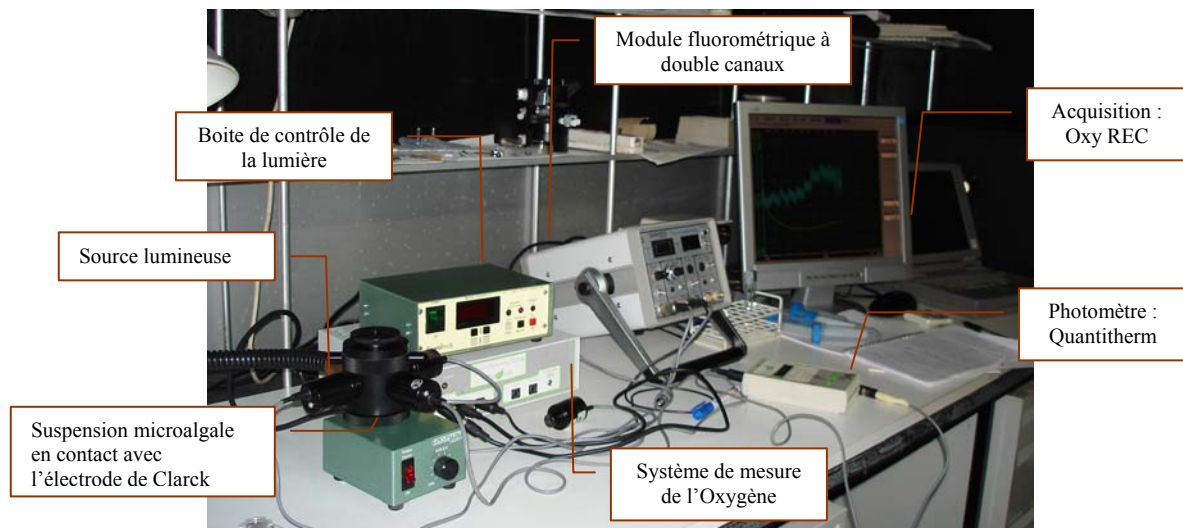


Figure II.6 Installation complète pour la mesure de la fluorescence et l'efficacité photosynthétique (Hansatech Instruments Ltd., UK).

Les paramètres mesurés sont à la base du calcul d'un certain nombre d'expressions biophysiques et phénoménologiques conduisant à la description dynamique d'un échantillon photosynthétique à un état physiologique donné (Strasser 1998 *in* Hermans 1999). Les indices sont exprimés sur la base d'unités arbitraires d'absorbance relative.

F_0	Fluorescence minimale, elle correspond à la valeur de fluorescence émise au début de l'illumination.
F_M	Valeur de fluorescence maximale. Cette valeur est atteinte quand la chaîne de transport d'électron est complètement saturée et que l'accepteur d'électrons Q_A est complètement réduit.
F_V	Fluorescence variable maximale. $F_V = F_M - F_0$.
F_V / F_M	Ce rapport est proportionnel au rendement quantique de photochimie, il montre un degré de corrélation élevé avec le rendement quantique de la photosynthèse nette.

V.4 Estimation des rendements de production

L'ensemble des taux et rendement de production d'hydrogène produits par les microorganismes, sont définis respectivement selon les équations (1) et (2) :

$$\text{Taux global d'hydrogène produit} = \frac{\text{Maximum cumulé de } H_2 \text{ produit (ml)}}{\text{Durée de production (h) x volume de culture (l)}} \quad (1)$$

$$\text{Rendement de production hydrogène} = \frac{\text{Quantité d'hydrogène produit (mol)}}{\text{Quantité de substrat utilisée (mol)}} \quad (2)$$



CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre III - RESULTATS OBTENUS

I. Répartitions et isolement des souches de microalgues

La répartition qualitative et quantitative des microalgues est fonction de la nature des eaux où elles prolifèrent.

I.1 Analyse physicochimique des eaux

Les tableaux III.1 et III.2 donnent les paramètres physicochimiques des eaux prélevées. Il ressort après analyse des données, que les eaux des zones étudiées sont douces avec absence totale d'ions polluants notamment les ions phosphates (PO_4^{3-} et NH_4) avec un pH neutre à légèrement alcalin. Ces eaux sont en effet, celles qui irriguent les palmeraies et les cultures dans une région où l'eau, est considérée comme une richesse ancestrale à conserver et à protéger, et donc, soigneusement épargnées par les agriculteurs locaux des aléas de l'environnement direct. Un control permanent est assuré pour éviter l'introduction de polluants quels qu'ils soient, ce qui explique ces propriétés.

Tableau III.1 Caractéristiques physiques des eaux de prélèvement r récoltées de la région du Touat.

Zone prospectée	Température (°C)	Conductivité (ms/cm)	pH	Oxygène dissous (mg/l)	Pourcentage d'oxygène (%)	Salinité (‰)
Zone 1,2 et 3 (Tamantit)	23.01	0.1558	8.24	6.36	77.2	0.6
Zone 4 (sebkha Tiloulina)	28	1830	7.48	2.79	36.5	OFL
Zone 5 (Tiloulina , sol)	23.4	1692	8.08	6.15	72	OFL
Zone 6 (Tililane 1)	25.8	0.1308	8.00	-	-	0.5
Zone 7 (Tililane 2)	23.3	2.30	7.83	-	-	1.0
Zone 8 (Hamed)	17.5	2.20	7.40	3.48	37	OFL
Zone 9 (Ksar sbaa)	18.0	1165	8.56	8.01	86.3	OFL
Zone 11 (El kseiba)	22.4	191.6	7.54	1.83	21.8	OFL

Tableau III.2 Caractéristiques chimiques des eaux de prélèvement de la région du Touat (concentrations des différents ions exprimées en mg/l).

Zone prospectée	Elément chimique mesuré (mg/l)											
	Nitrites NO ₂	Nitrates NO ₃	Sulfates	Sulfites	Dureté	Dureté carbonatée	Potassium	Calcium	Fer	Chlore libre	Chlore total	Chloride
Zone 1,2 et 3 (Tamantit)	25	0	< 200	0	23°	10 °	500	100	2	< 0.1	< 0.1	500
Zone 4 (sebkha Tiloulina)	250	20-40	> 1600	0	> 50°	20°	700	0	≈ 2	0.1	0.2	≥ 3000
Zone 5 (Tiloulina , sol)	500	10	> 1600	0	> 50°	10°-15°	700	0	≈ 5	0.1	0.1	≥ 3000
Zone 6 (Tililane 1)	25	0	> 800	0	42°	6°-10°	0	100	2	< 0.1	0.1	500
Zone 7 (Tililane 2)	25	0	< 200	0	> 50°	6°-10°	0	100	2	< 0.1	0.1	500
Zone 8 (Hamed)	250	40	> 1600	0	> 50°	0	1500	0	5-10	0.2	0.4	≥ 3000
Zone 9 (Ksar sbaa)	500	80	> 1600	0	> 50°	20°	700	100	2	1.2	2	≥ 3000
Zone 11 (El kseiba)	50-100	10-20	> 1600	0	> 50°	20°	1000	0	5-10	< 0.1	< 0.1	2000

I.2 Répartition et prolifération des microalgues :

A partir des échantillons de sol et d'eau (Figure III.1 et 2), l'utilisation des milieux de culture BG 11, MN et ASN III, a permis des isollements plus ou moins similaires en terme de taux de prolifération dans toutes les zones de prélèvement (Tableau III.3).

Toutefois, il est important de rappeler que l'obtention de culture microalgale sur ces milieux a nécessité une incubation plus ou moins longue au phytotron (6 à 10 jours). Ceci était indispensable, car les premiers essais ont échoué du fait du séchage rapide des cultures, le phytotron assurait un maintien d'humidité (65%) favorable à la croissance des microalgues.

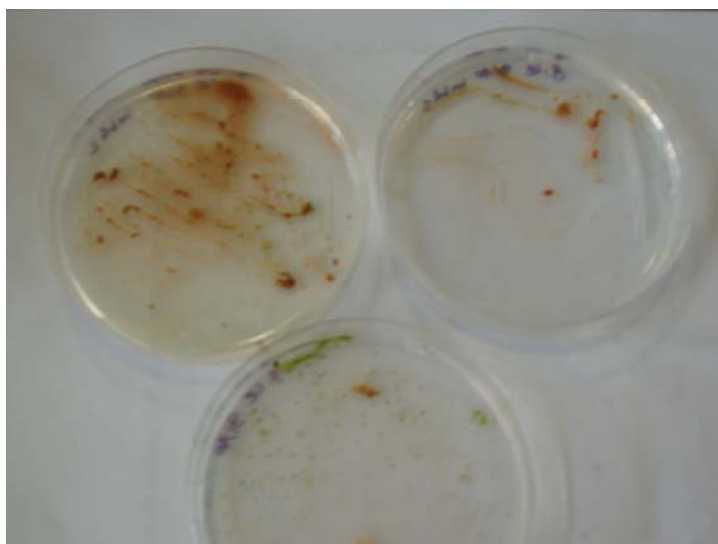
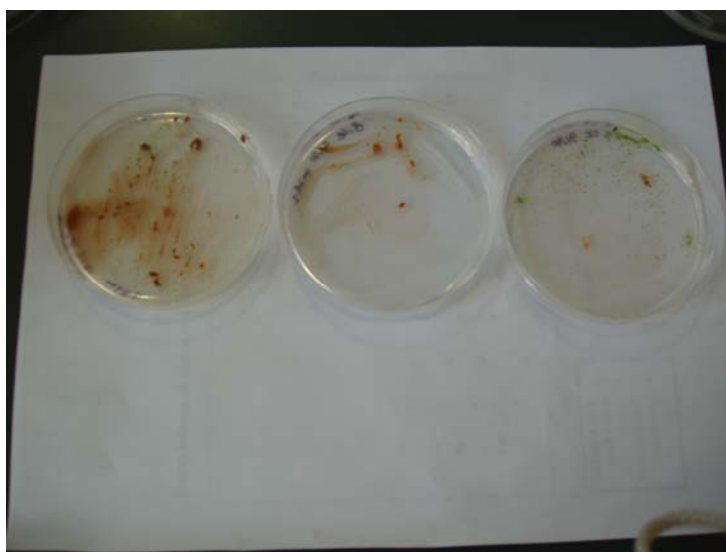


Figure III.1 Prolifération des microalgues dans les différents milieux de culture (BG 11, MN et ASN III) à partir des prélèvements de sol.

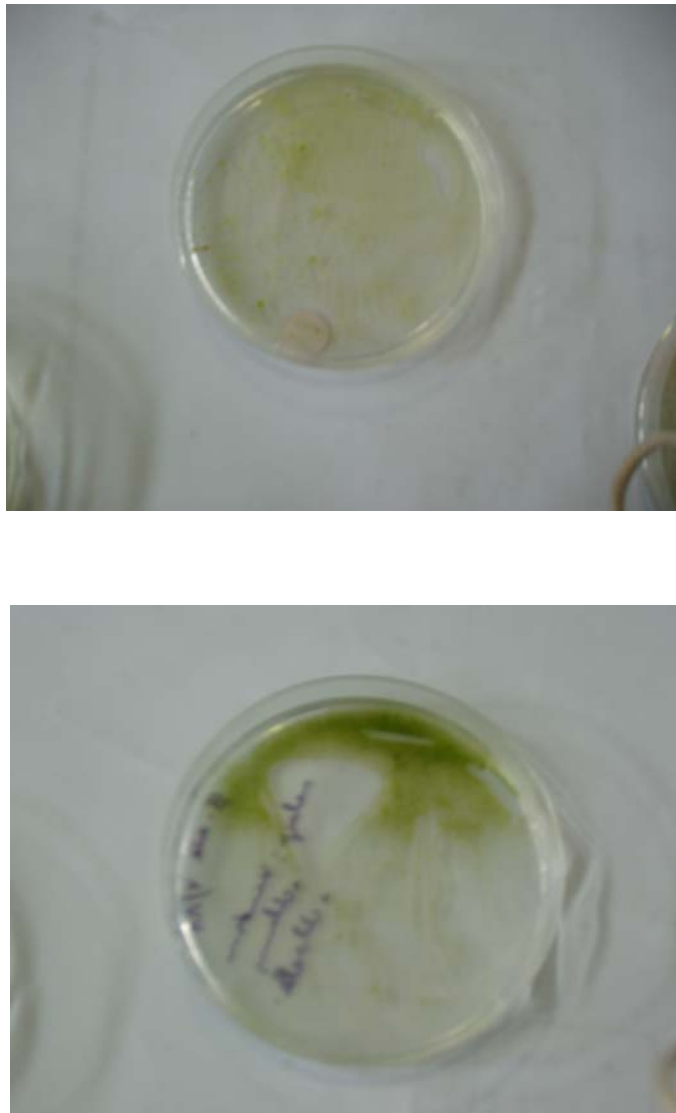


Figure III.2 Prolifération des microalgues dans les différents milieux de culture (BG 11, MN et ASN III) à partir des prélèvements liquides.

Tableau III.3 Apparition et prolifération des microalgues dans les différentes zones de prélèvement en fonction des milieux de culture.

Milieu de culture	Site de prélèvement			
	Tamentit	Tililane	Hamed	Ksar sbaa
BG 11pH 7.4	++++	+++	++	++
ASN III pH 7.5	-	-	+	-
MN pH 8.3	+++	-	-	++

++++ Prolifération maximale.

+ Prolifération minimale.

- Aucune prolifération.

En plus des microalgues, l'observation des cultures d'isolement rend compte de la prolifération de contamination bactérienne et fongique (Figure III.3) écartée par les repiquages répétitifs dans des milieux de culture additionnés du mélange d'antibiotique.

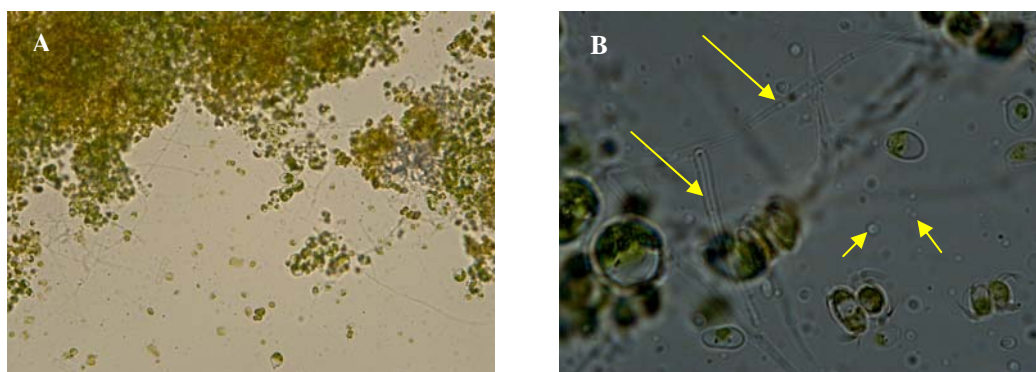


Figure III.3 Aspect des microalgues (cellules en vert) pendant la phase d'isolement observées au microscope photonique, avec apparition de contaminations, grossissement x10 (A), grossissement x40 (B). Les flèches indiquent les hyphes mycéliens et les bactéries.

II. Identification des souches isolées

II.1. Principales familles identifiées

L'observation microscopique a permis d'identifier différentes classes réparties de manière similaire dans toutes les zones. En effet, la diversité microflorale des zones prospectées est très restreinte. Elle se limite à quelques espèces de chlorophycées, quelques charophycées, très peu de cyanophytes et pratiquement pas de diatomée (Tableau III.4).

Dans nos échantillons et en se basant sur les clés de détermination utilisées (chapitre II, paragraphe III.2.2), on trouvera principalement des chlorophycophytes qui est sans conteste, le phylum le plus important, caractérisé par ses pigments : chlorophylles a et b, β -carotène et oxycarotènes ainsi que par le produit de réserve élaboré représenté par le pyrénoloïde intraplastidial entouré d'amidon. Au cours de notre étude, nous avons pu isoler dans les différentes zones de prélèvement, une dizaine de souches de microalgues appartenant à la classe des Chlorophycées.

Tableau III.4 Identification de quelques familles de microalgues en fonction de la zone de prélèvement et du milieu d'isolement utilisé.

Milieu de culture	Site de prélèvement			
	Tamantit	Tililane	Hamed	Ksar sbaa
BG 11 pH 7.4	<i>Chlorophycées</i> <i>Charophycées</i>	<i>Chlorophycées</i> <i>Cyanophycées</i>	<i>Chlorophycées</i>	<i>Chlorophycées</i>
ASN III pH 7.5	-	<i>Cyanophycées</i>	ND	-
MN pH 8.3	<i>Chlorophycées</i>	-	-	-

Après la période d'incubation, plusieurs colonies apparaissent d'aspect et de consistance différents. La purification est alors engagée par le prélèvement de chaque colonie à part et repiquage de nouveau en stries, sur le même milieu qui a servi à son isolement (figure III. 4).

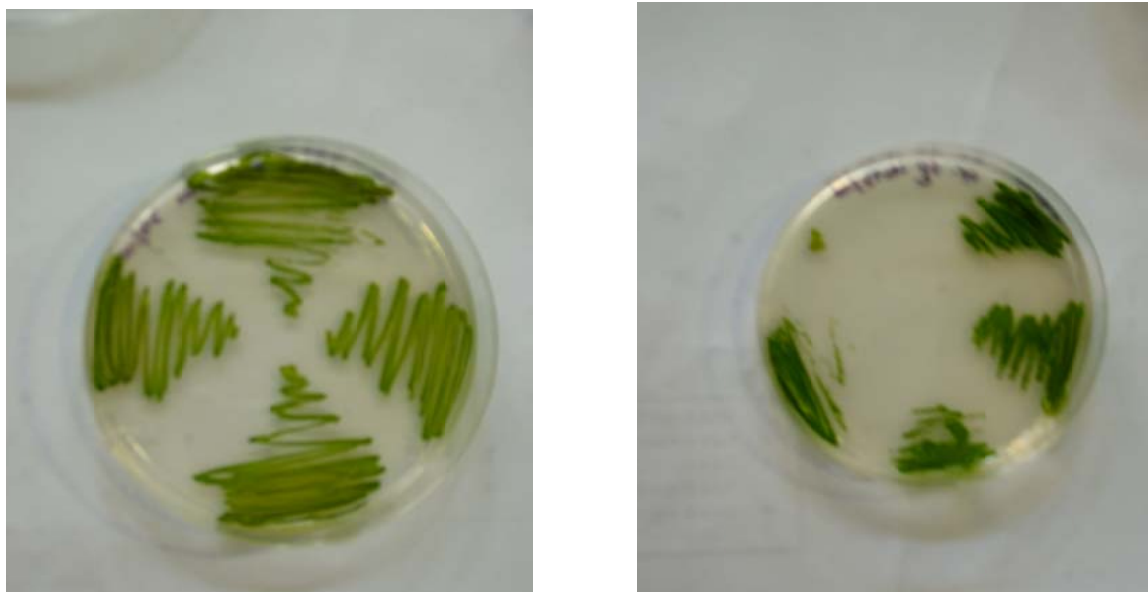


Figure III.4 photographies montrant des cultures de microalgues en phase de purification par méthode de repiquages répétitifs en stries.

II.1.1 Principales espèces de microalgues identifiées

L'identification des espèces se fera par des observations plus approfondies au microscope photonique équipé du logiciel QWin pour l'analyse et le traitement numérique des données biométriques (Digital Image Processing and Analysis Soft Ware for Professional Microscopy Leica Systems) (Figure III. 5). Pour compléter l'identification. Chaque colonie ainsi prélevée sera apparentée à l'espèce correspondante et lui sera attribuée un code qui rappelle la zone où elle a été prélevée. Par exemple *Chlorella salina* souche mt, mt : étant Tamantit.

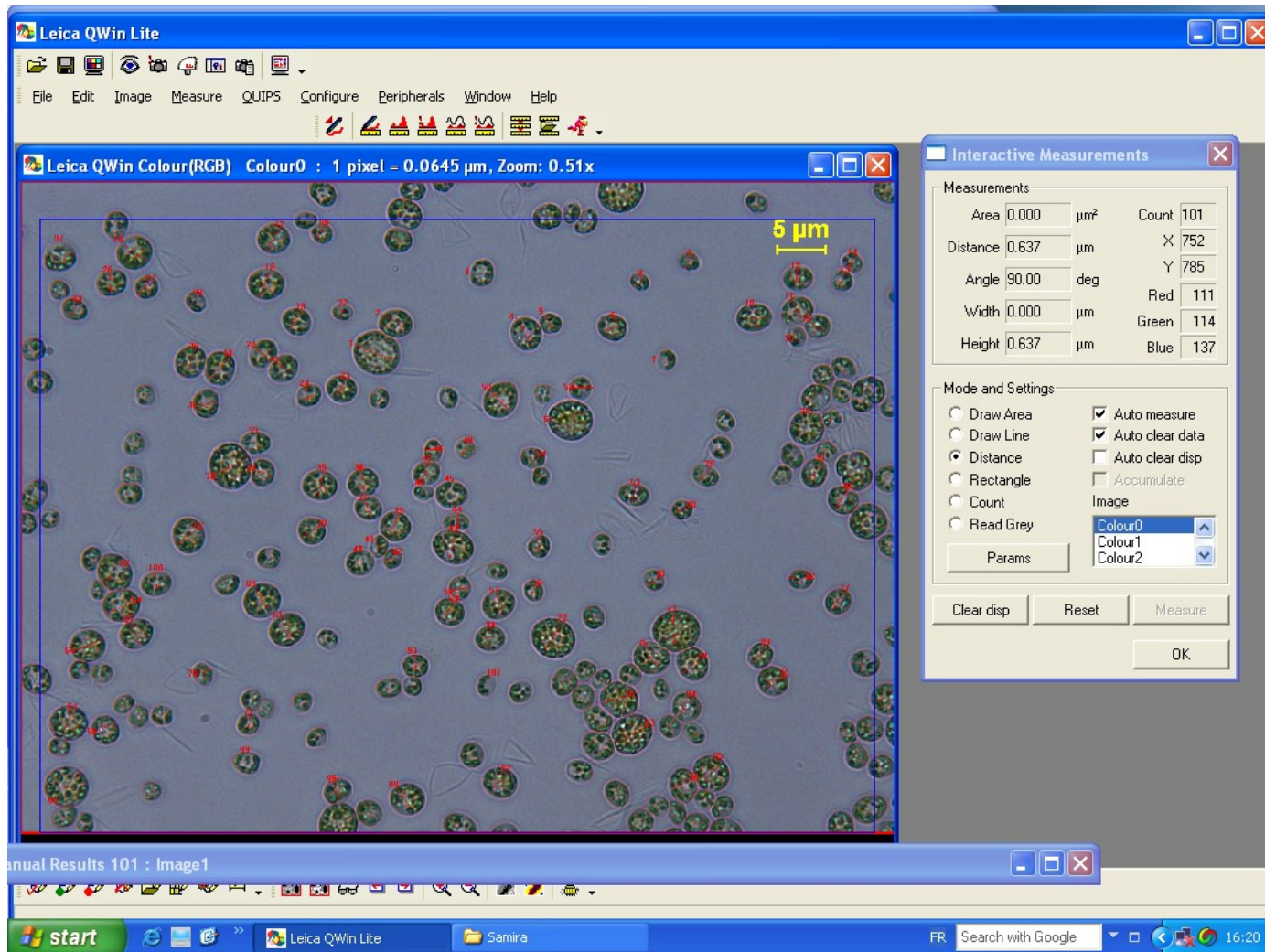


Figure III. 5 Fenêtre de mesure du logiciel Leica Qwin lite (Digital Image Processing and Analysis Soft Ware for Professional Microscopy Leica Systems).

Les isolats majoritaires identifiés sont apparentés à l'ordre des Chlorococcales, et aux genres *Chlorella* et *Scenedesmus*. La répartition des genres est différente d'une zone à une autre et d'un milieu à un autre (Tableau III.5).

Tableau III.5 Identification de quelques genres de microalgues en fonction de la zone de prélèvement et du milieu d'isolement utilisé.

Milieu de culture	Site de prélèvement			
	Tamantit (code mt)	Tililane (code Ce)	Hamed (code Pt)	Ksar sbaa (Ks)
BG 11 pH 7.4	<i>Chlorella</i> <i>Scenedesmus</i>	<i>Chlorella</i> <i>Oscillatoria</i>	<i>Chlorella</i> <i>Scenedesmus</i>	<i>Chlorella</i> <i>Scenedesmus</i>
ASN III pH 7.5	-	<i>Oscillatoria</i> <i>Nostoc</i>	ND	-
MN pH 8.3	<i>Chlorella</i> <i>Scenedesmus</i>	-	-	-

II.1.1.1 Espèces apparentées au genre *Chlorella*

Toutes les espèces sont unicellulaires, sphériques, certaines plus ou moins allongées, d'un diamètre variant entre 3 et 6 μm , avec absence totale de flagelle. Chaque cellule est constituée d'une paroi fine qui entoure un plaste en forme de coupe généralement pariétal, constitué de pigments chlorophylliens (Figure III.6).

La coloration au lugol fait apparaître un pyrénoloïde (corps protéique avec réserves amylacées) intraplastidial typique entouré d'une coque d'amidon. La reproduction est exclusivement asexuée avec formation d'autospores à l'intérieur de la cellule par division en deux, quatre ou plus (Figure III.7).

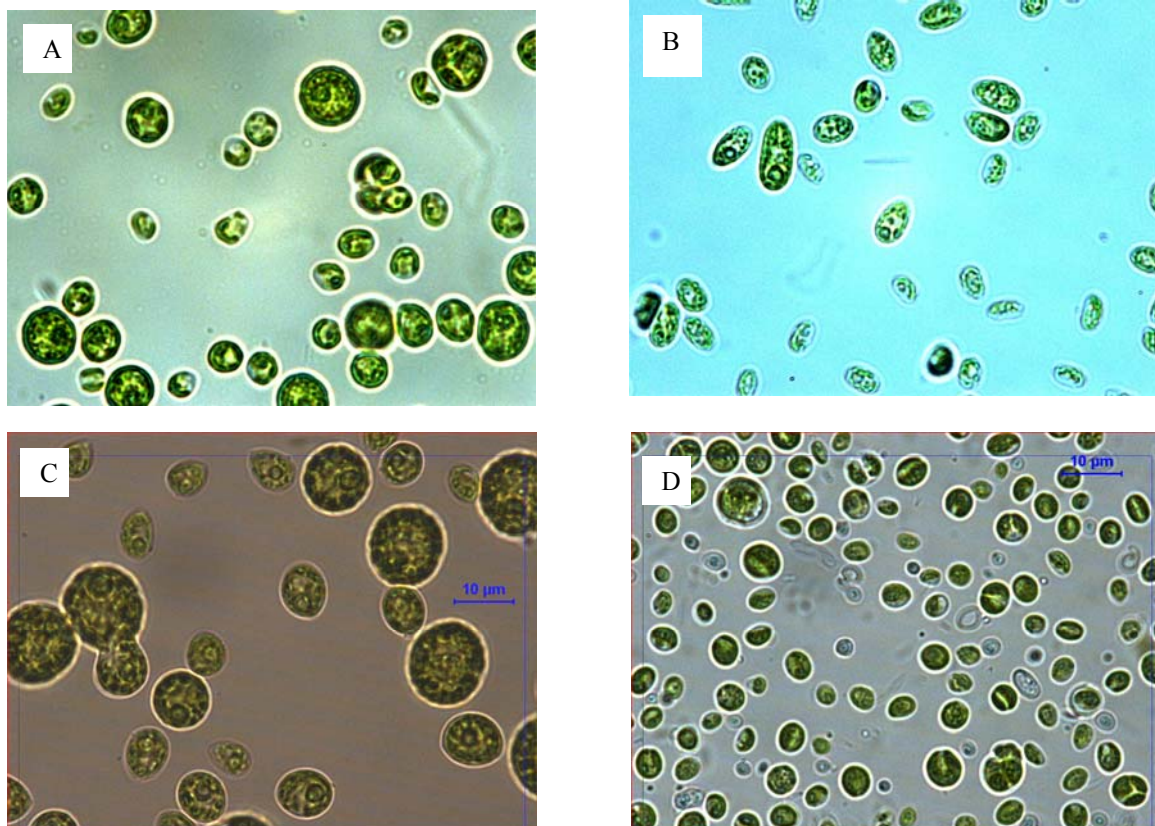


Figure III.6 Souches de microalgues appartenant au genre *Chlorella* observées au microscope photonique (grossissement x 40).

- A. *Chlorella salina* souche Mt (isolée sur BG 11).
- B. *Chlorella sp* souche Pt 1 (isolée sur BG 11).
- C. *Chlorella salina* souche Mt (isolée sur MN).
- D. *Chlorella sorokiniana* souche Ce (isolée sur BG 11).

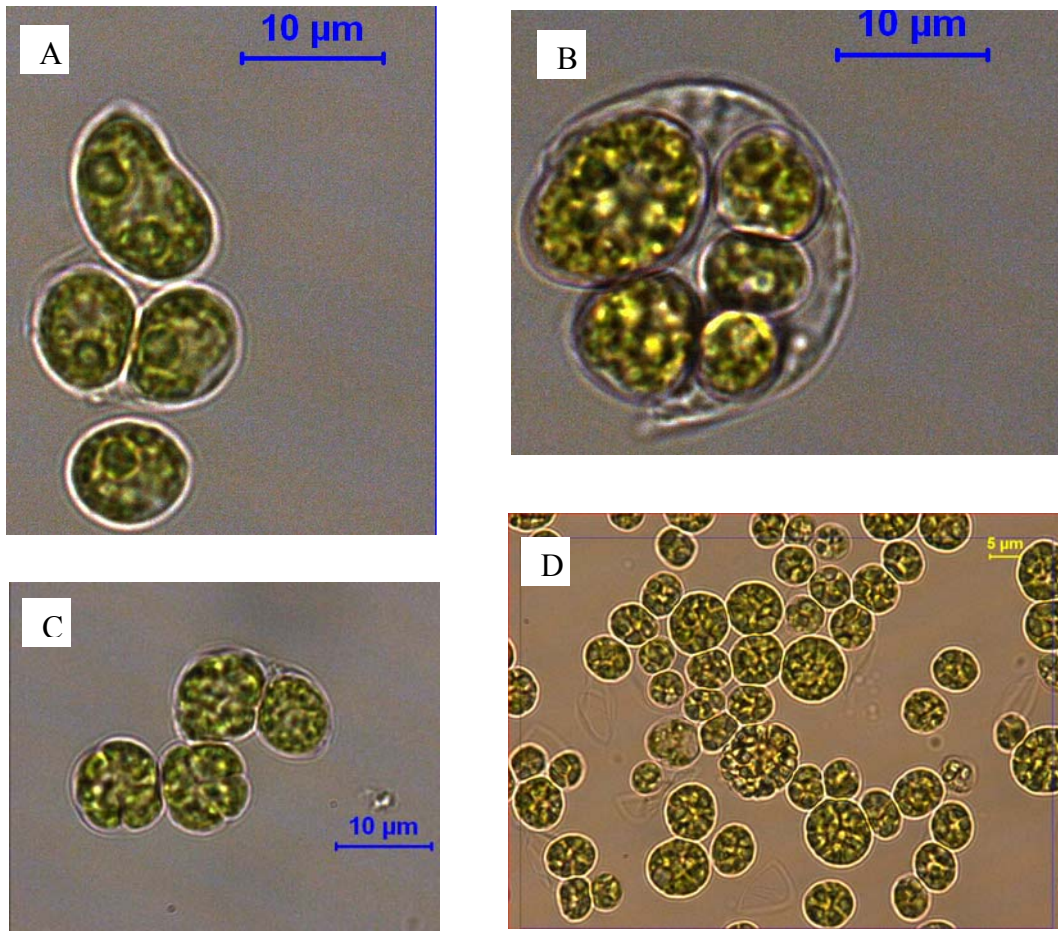


Figure III.7 Quelques photographies montrant les différents stades de reproduction asexuée (formation des autospores) des souches de chlorelle isolées (grossissement x 40).

- A. *Chlorella salina* souche Mt4 (isolée sur MN).
- B. *Chlorella salina* souche Mt (isolée sur MN).
- C. *Chlorella salina* souche Mt3 (isolée sur MN).
- D. *Chlorella sp* souche Pt (isolée sur BG 11).

II.1.1.2 Espèces apparentées au genre *Scenedesmus*

Les espèces de *Scenedesmus* isolées des différentes zones présentent une structure cellulaire variée. C'est un genre d'[algue verte](#) très répandu en eaux douces, elles possèdent les [chlorophylles](#) de type *a* et *b* et des [caroténoïdes](#). Ces espèces sont non flagellées, mesurent environ 5 à 30 micromètres de longueur et 8 à 10 micromètres de diamètre.

En général, quatre *Scenedesmus* se regroupent en [cénobes](#) (quelques fois unies par 2, 8 ou plus), une gelée formant des épines ou aiguillons entoure les cénobes. Dans ces cellules on trouve un [chloroplaste](#) imposant avec un [pyrénoïde](#) intraplastidial qui baigne dans le [cytoplasme](#) avec une vacuole plus ou moins grande selon les espèces. Comme précisé précédemment, La répartition des souches est plutôt uniforme quelque soit la zone et le milieu de culture (Figure III.8).

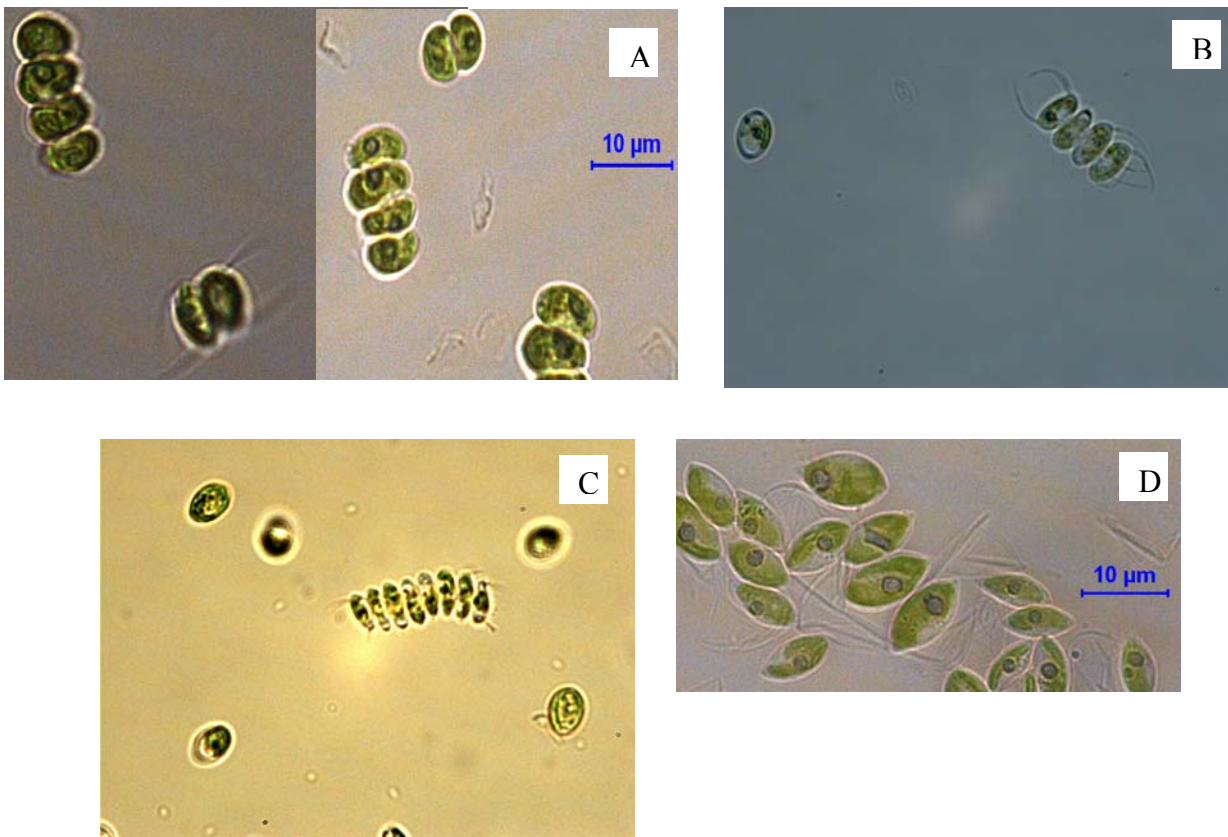


Figure III.8 Souches de microalgues appartenant au genre *Scenedesmus* observées au microscope photonique (grossissement x 40).

- A. *Scenedesmus quadricauda* souche Mt1 (isolée sur BG 11).
- B. *Scenedesmus sp* souche Mt1 (isolée sur MN).
- C. *Scenedesmus opoliensis* souche Mt3 (isolée sur MN).
- D. *Scenedesmus sp* souche Pt (isolée sur BG 11).

Conclusion sur l'isolement des souches de microalgues

En raison de la pureté des eaux prélevées, la diversité microflorale est plus ou moins réduite. Il est généralement admis que, les conditions physico chimiques du milieu ont une influence directe sur la diversité et la répartition de la microflore aquatique. Dans notre cas, les eaux des foggara, douces et souvent couvertes, ce qui limite leur enrichissement en minéraux. Les concentrations faibles d'ions, favorisent la croissance de quelques espèces microalgales cosmopolites. Les taxons majoritaires identifiés sont les chlorophycées, les cyanophycées, les charophycées et pas du tout de diatomées, leur répartition est plus ou moins similaire quelque soit la zone de prélèvement et quel que soit le milieu de culture utilisé.

Les espèces identifiées sont au nombre de douze (12), trois (03) souches apparentées au genre *Scenedesmus*, six (06) souches appartenant au genre *Chlorella*, une souche identifiée à *Chara sp*, une souche identifiée à *Nostoc sp* et enfin une souche apparenté au genre *Oscillatoria*.

III. Essais de production d'hydrogène par les souches isolées

Jusqu'à l'heure actuelle, la production d'hydrogène a été rapportée dans la plupart des travaux, chez une seule espèce, *Chlamydomonas reinhardtii*, une chlorophycée unicellulaire flagellée, facile à manipuler (Melis *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2002), elle est l'équivalent d'*Escherichia coli* en biologie moléculaire.

Les résultats de cette étude, présentent les potentialités de production, chez d'autres espèces, plus particulièrement, des souches isolées pour la première fois, à notre connaissance, à partir des eaux douces d'Adrar, Algérie. Pour cela, dans la suite de notre étude, on ne tiendra compte que des souches de chlorophycées chez qui, le processus de production d'hydrogène serait le plus probable et aussi pour faire des comparaisons plus adéquates avec la souche de référence *Chlamydomonas reinhardtii*.

Avant d'exposer les résultats obtenus, un bref aperçu est donné pour expliquer la démarche expérimentale adoptée pour la recherche et l'étude des performances de production d'hydrogène par les souches isolées.

Dans le processus de photosynthèse, l'énergie lumineuse est captée sous forme de photons qui induisent la photolyse de l'eau, il y a alors dégagement d'oxygène et libération de protons et d'électrons, le pouvoir réducteur ainsi produit est véhiculé à travers la chaîne enzymatique des thylakoides (membrane constituant le chloroplaste).

Les photons captés par les antennes (LHC) des photosystèmes (PSII et PSI), lors de la photosynthèse, activent les centres réactionnels P680 et P700 aboutissant à une séparation de charges. Au niveau du PSII la charge négative réduit simultanément le composé P680 et la plastoquinone (Figure III.9.a).

Ces réactions photochimiques conduisent à la photodissociation de la molécule d'eau et à la libération d'oxygène moléculaire. Au même moment, d'autres enzymes membranaires se retrouvent à leurs tours réduites et vont alors servir de donneurs d'électrons, ce qui conduira à la formation de deux complexes énergétiques le NADPH et l'ATP. Ces derniers sont utilisés pour la réduction du gaz carbonique (CO₂) au cours du cycle de synthèse des hydrates de carbonés (cycle de Calvin).

Matrice intrachloroplastique

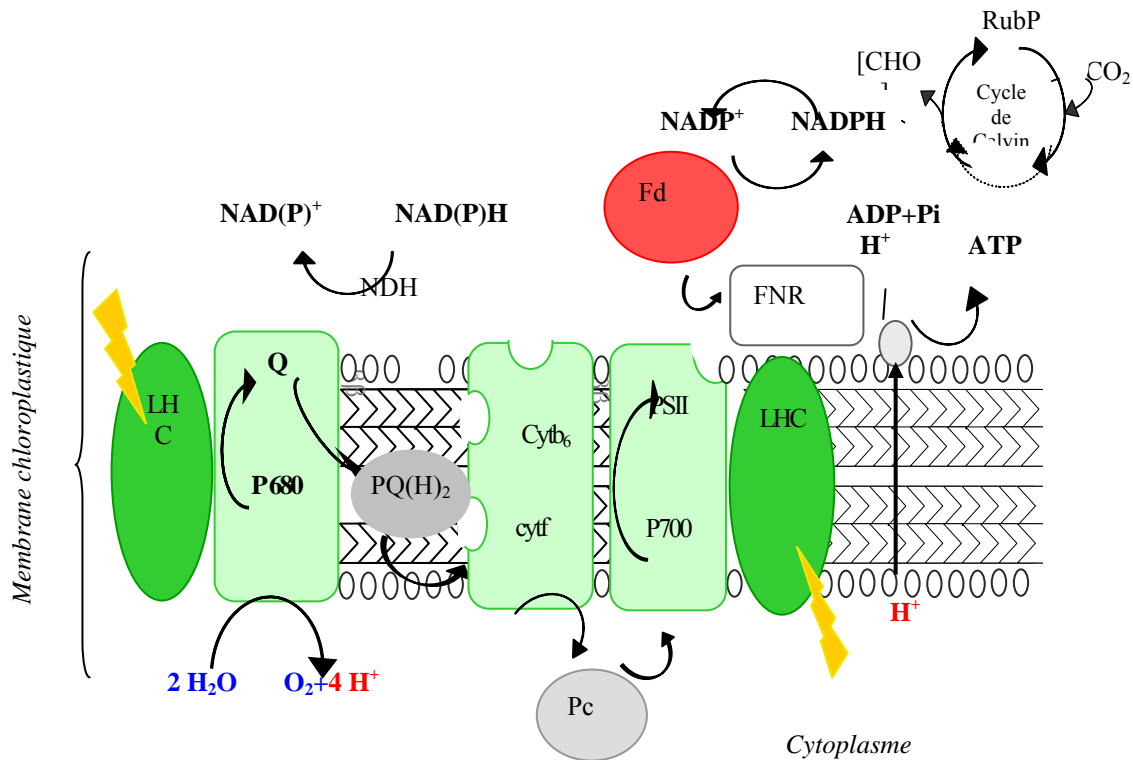
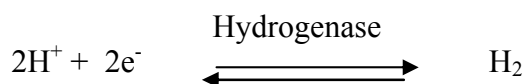


Figure III.9.a Principales enzymes impliquées dans la photosynthèse localisées dans la membrane chloroplastique.

La synthèse d'hydrogène s'effectue grâce à une Fe-hydrogénase, enzyme réversible couplée à la chaîne photosynthétique, qui combine protons et électrons pour générer l'hydrogène, selon la réaction simplifiée suivante :



Cependant, l'oxygène libéré lors de la photosynthèse, est un puissant inhibiteur de l'hydrogénase, l'expression et l'activation de cette enzyme se fait uniquement en anaérobie (Figure III.9.b). De ce fait, pour enclencher le processus de production d'hydrogène il faudra provoquer l'anaérobiose du milieu. En d'autres termes augmenter le taux de respiration par rapport au taux de photosynthèse et ce en inhibant le photosystème II (PSII), premier responsable du dégagement d'oxygène. C'est la seule solution aujourd'hui préconisée pour enclencher le processus de production d'hydrogène (Melis *et al.*, 2000).

Inactivation réversible du PSII

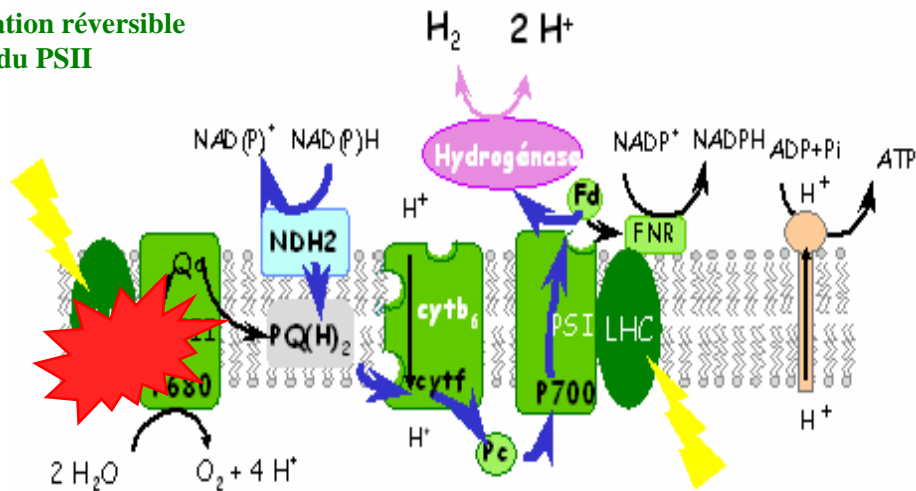


Figure III.9.b Induction de l'activité de l'hydrogénase par l'inactivation du PSII et principales enzymes impliquées dans la production d'hydrogène.

III.1 Production dans les milieux BG 11 et TAP

Deux conditions opératoires ont été tentées pour rechercher le potentiel de production. La première s'opère en autotrophie utilisant le milieu BG 11 (ayant servi à l'isolement des souches sélectionnées). La deuxième, en milieu hétérotrophe utilisant le milieu Tris acétate Phosphate (TAP) où une source de carbone a été ajoutée pour favoriser la phase d'accumulation des réserves.

L'étude a porté sur quatre (04) souches sélectionnées parmi celles isolées et identifiées précédemment. Il s'agit des souches :

1. *Chlorella sorokiniana* souche Ce,
2. *Chlorella salina* souche Mt,
3. *Chlorella sp* Pt6,
4. *Scenedesmus sp*

Le tableau III. 6 reprend brièvement le comportement des souches étudiées en rapport avec le dégagement d'hydrogène. Les nombreuses tentatives de production d'hydrogène dans différents milieux ont permis de conclure que seul le milieu TAP (Tris Acétate Phosphate) carencé en soufre est favorable pour la production d'hydrogène.

Tableau III.6 Réponse différentielle des souches sélectionnées en rapport avec la production d'hydrogène dans les différentes conditions.

Conditions de culture	Milieu utilisé	Souche utilisée	Résultat
Autotrophes	BG11	<i>Chlorella sorokiniana</i> souche Ce,	-
		<i>Scenedesmus</i> sp	-
	BG11 sans soufre	<i>Chlorella sorokiniana</i> souche Ce,	-
		<i>Scenedesmus</i> sp	-
Hétérotrophes	TAP avec soufre	<i>Chlorella sorokiniana</i> souche Ce,	-
		<i>Chlorella salina</i> souche Mt,	-
		<i>Chlorella</i> sp Pt6,	-
	TAP sans soufre	<i>Scenedesmus</i> sp	-
		<i>Chlorella sorokiniana</i> souche Ce,	+
		<i>Chlorella salina</i> souche Mt,	+
		<i>Chlorella</i> sp Pt6,	+
		<i>Scenedesmus</i> sp	-

(+) production d'H₂

(-) pas de production

III.2 Influence de la carence en soufre sur la Production d'H₂

Le soufre est l'élément essentiel de la cystéine et Méthionine, deux acides aminés entrant dans la biosynthèse des protéines impliquées dans la synthèse de novo des pigments chlorophylliens (en particulier le photosystème II). Son absence dans le milieu de culture bloque tout le mécanisme de synthèse (Wykoff *et al.*, 1998). La réduction des PSII bloque la photolyse de l'eau et ralentie le dégagement d'oxygène jusqu'à arrêt total (Zhang *et al.*, 2002).

La photo respiration prend alors le relais, le taux d'oxygène accumulé jusque là, sera absorbé par les cellules qui rentrent rapidement en anoxie. Cette anaérobiose active l'expression de l'hydrogénase qui entre action pour réduire les protons en hydrogène en utilisant le pouvoir réducteur des cellules.

Afin de bien comprendre le mécanisme exact de la production d'hydrogène par les souches microalgales sectionnées, un protocole à deux phases a été suivi inspiré de la méthode préconisée par Melis *et al.*, (2000).

Lors de la première phase, les souches sont cultivées dans des conditions optimales (milieu TAP) qui favorisent la formation des composés carbonés, servant à la synthèse des molécules essentielles pour l'organisme, à la production d'énergie via la voie respiratoire et à l'accumulation

des réserves. La seconde phase doit se dérouler en anaérobiose, réalisée par l'incubation des cultures en milieu carencé en soufre, qui réduit l'activité des PSII et donc le dégagement d'O₂.

Cependant, aucune certitude n'est établie quand au chemin emprunté par les électrons et conduisant à la production d'hydrogène. Deux voies simultanées semblent être impliquées. La première dépendante du PSII, fournit après photolyse de l'eau, des électrons à l'hydrogénase par le biais de la chaîne photosynthétique (plastoquinines PQ, cytochromes Cyt b₆ et f, PSI, fd). C'est qu niveau de la Fd, que les électrons sont déviés vers l'enzyme pour être combinées avec des protons et former l'hydrogène. L'hydrogénase étant extrêmement sensible à l'oxygène, le métabolisme de production d'hydrogène chez *Chlamydomonas reinhardtii* peut être observée uniquement en conditions d'anaérobiose (Melis *et al.*, 2000).

La seconde voie est indépendante du PSII. Les électrons fournis à la chaîne photosynthétique seraient issus de la dégradation de substrat carboné tels que l'amidon ou les protéines cellulaires.

Au vue de la complexité du mécanisme de production d'hydrogène, il demeure intéressant de développer des procédés d'optimisation du processus, pour cela, la connaissance des paramètres influant est plus qu'indispensable.

III.3 Analyse chromatographique des gaz produits

La cinétique de production d'hydrogène a été suivie sur une durée de 5 jours par des mesures chromatographiques des gaz prélevées dans la phase gazeuse des photobioréacteurs. Les essais ont porté sur les souches ayant donné une réponse positive à la production d'hydrogène (Tableau III.6), c'est-à-dire, les chlorophycées : *Chlorella sorokiniana* souche Ce ; *Chlorella salina* souche Mt et *Chlorella sp* souche Pt6.

Afin d'interpréter correctement les résultats, il est indispensable de décrire les pics des chromatogrammes obtenus. Comme exposé dans le chapitre II, paragraphe V.1.2, deux colonnes ont été utilisées, une pour les gaz, H₂, O₂ et N₂ (Molecular sieve 5A "MS-5A) et une deuxième pour le CO₂ (Carbowax), ceci pour augmenter la durée de vie des colonnes puisque le passage répétitif dans une même colonne peut l'endommager rapidement. Le chromatogramme sera donc constitué de quatre pics (pic des gaz) et de deux switch ou phases de changement de colonne (Figure III.10). Après l'injection du gaz à analyser, véhiculé par le gaz vecteur, l'argon dans notre cas, passe dans la première colonne pour entraîner et détecter le gaz le plus léger c'est-à-dire l'hydrogène (H₂), puis se coupe (1^{er} switch), pour passer dans la deuxième colonne pour détecter le CO₂ et se coupe de nouveau (2^{ème} switch) pour revenir à la première colonne pour détecter les gaz restants (O₂ et N₂).

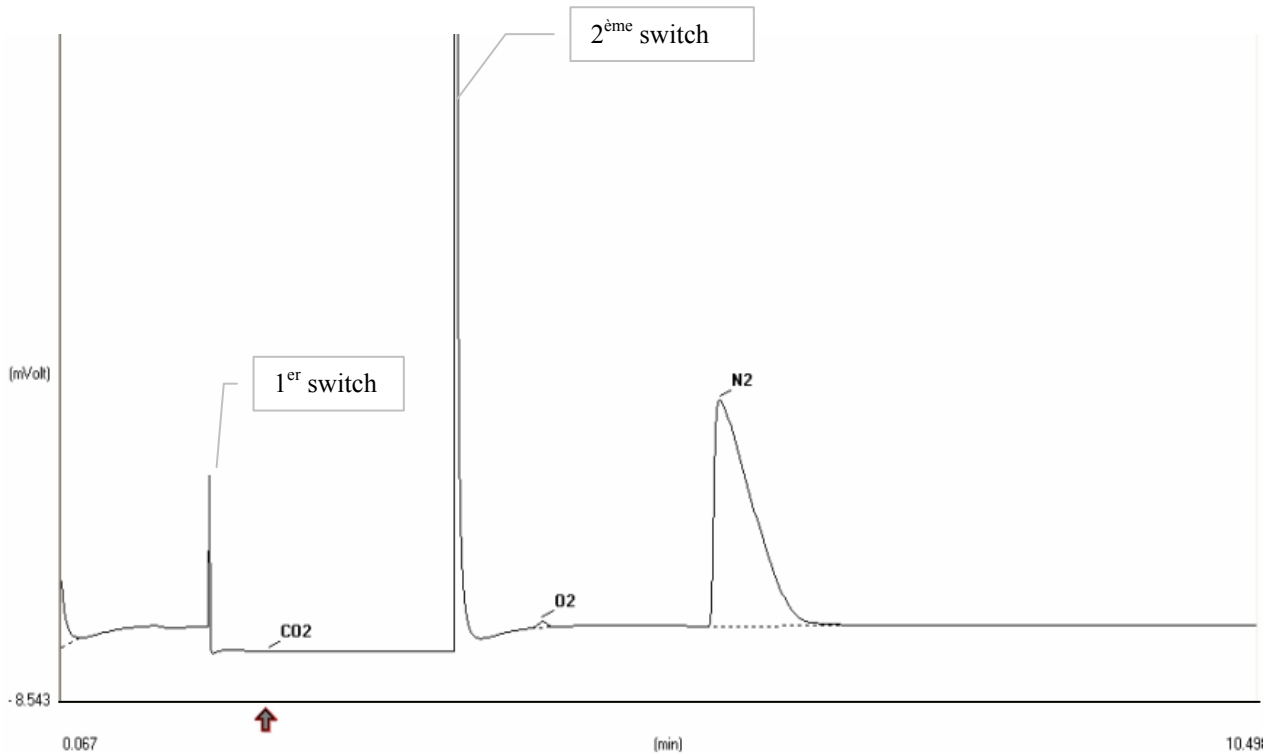


Figure III.10 Type de chromatogramme (Chroma-Card) obtenu lors des analyses de gaz (ici analyse de l'air).

III.3.1 Cinétique de production d'hydrogène par *Chlorella sorokiniana* Ce

La cinétique de production a été suivie par la mesure journalière de l'hydrogène produit dans les conditions hétérotrophes de carence en soufre (TAP-S). Les volumes de gaz ont été calculés par l'intégration des pics obtenus lors des analyses chromatographiques. La Figure III.11.a donne les quantités de gaz obtenues (cumulées) au début et à la fin de la carence en soufre. Chaque gaz est estimé par rapport au pourcentage global des gaz présents dans l'atmosphère des photobioréacteurs (au dessus des cultures).

Les résultats obtenus montrent que la production d'hydrogène par *Chlorella sorokiniana* souche Ce, démarre juste au début des premières 24 h de carence en soufre, qui coïncide avec la consommation de l'oxygène du milieu, et continue à augmenter progressivement jusqu'à s'arrêter après plus de 7 jours d'incubation (Figure III.11.b). Ces mêmes observations ont été rapportés chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Melis *et al.*, 2000) qui produit dans les mêmes conditions près de 140 ml d'hydrogène. Le volume total d'hydrogène produit par *Chlorella sorokiniana* Ce en culture optimisée peut atteindre jusqu'à 210 ml, ce qui correspond à 88mM d' H_2 /h/l culture, avec une pression partielle d'oxygène variant entre 1.34 – 1.92 (Chader *et al.*, 2007).

590.235

A

Figure III.11.a Chromatogramme des gaz collectés dans la culture de *Chlorella sorokiniana* Ce. (A) Au début de la carence en soufre. (B) 120 h après la période de carence en soufre.

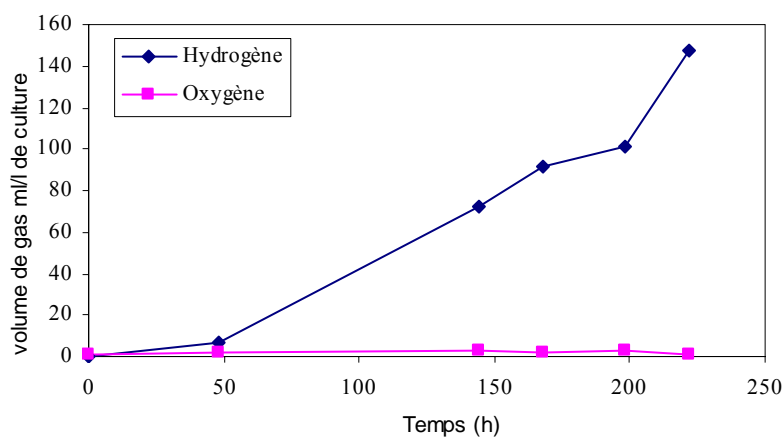


Figure III.11. b Cinétique de la production d'hydrogène et d'oxygène chez *Chlorella sorokiniana* strain Ce pendant la carence en soufre.

III.3.2 Cinétique de production d'hydrogène par *Chlorella salina* Mt

La production de l'hydrogène par *Chlorella salina* souche Mt n'a pas suivie la même évolution que chez *Chlorella sorokiniana* souche Ce.

En effet, après quelques heures seulement d'entrée en carence de soufre (Figure III.12.a), on note un dégagement d'hydrogène malgré l'aérobiose obtenu par la photolyse de l'eau (photosynthèse encore opérationnelle), où le taux d'oxygène dans le photobioréacteur est estimé entre 11.5- 13.02 % (Figure III.12.b). La production d'hydrogène reste plus ou moins stable au cours des 5 jours d'incubation en carence de soufre. Aussi, les quantités d'hydrogène produit restent faibles et ne dépassent pas un volume total de 40 ml d'H₂ après 5 jours d'incubation.

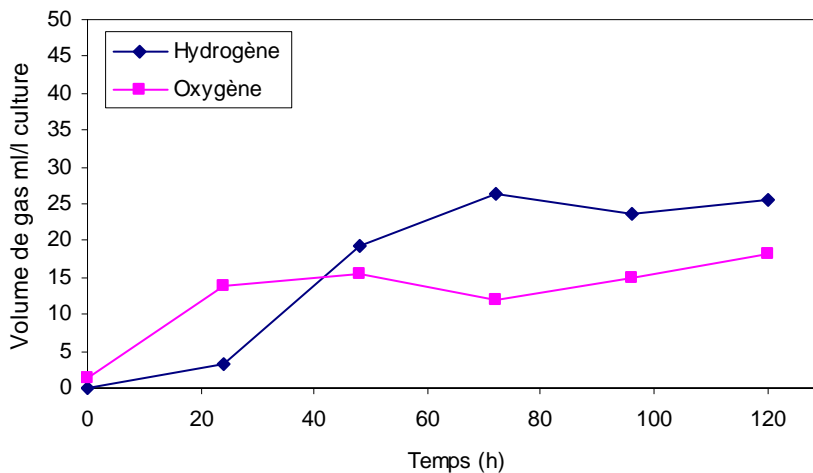


Figure III.12.a Cinétique de la production d'hydrogène et d'oxygène chez *Chlorella salina* souche Mt pendant la carence en soufre.

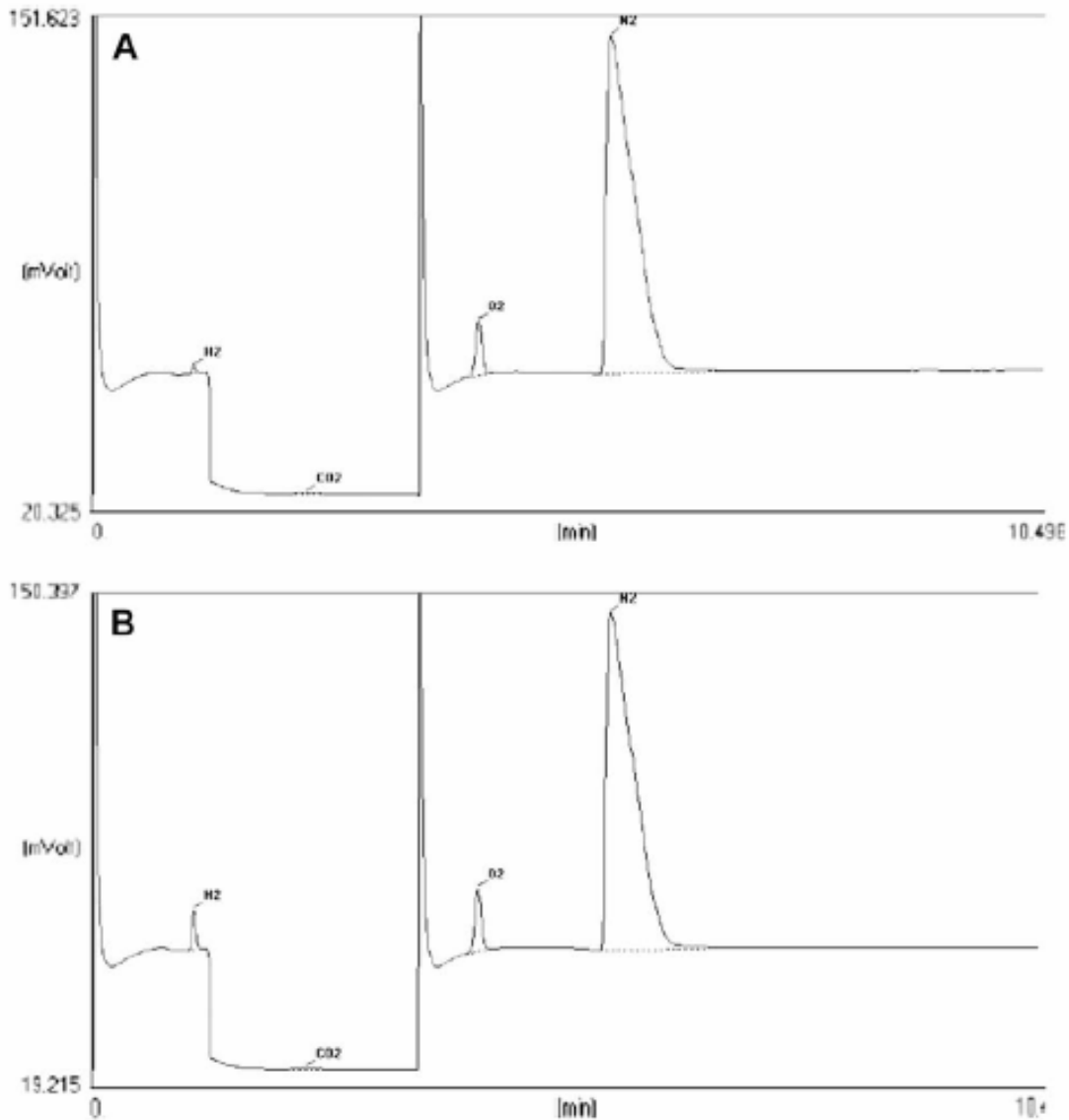


Figure III.12.b Chromatogramme des gaz collectés dans la culture de *Chlorella salina* Mt (A) Au début de la carence en soufre. (B) 24 h après la période de carence en soufre.

III.3.3 Cinétique de production d'hydrogène chez *Chlorella sp Pt6*

Les mêmes remarques ont été soulignées en ce qui concerne l'évolution du taux de production d'hydrogène par *Chlorella sp* souche Pt6. La figure III.13.a, montre que le processus de production d'hydrogène se déclenche de façon précoce par rapport à l'installation de l'anaérobiose. Seulement les volumes produits restent faibles, environ 60 ml pour une période totale de 6 jours d'incubation. Là aussi, la production se stabilise après 48 h de carence en soufre, sous une pression partielle d'oxygène de plus de 15% (Figure III.13.b).

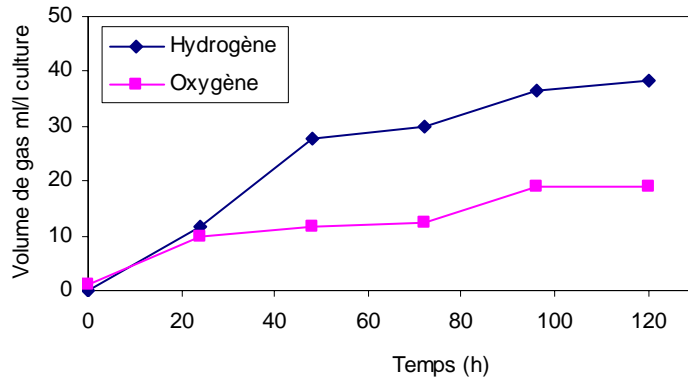


Figure III.13.a Cinétique de la production d'hydrogène et d'oxygène chez *Chlorella sp* souche Pt6 pendant la carence en soufre.

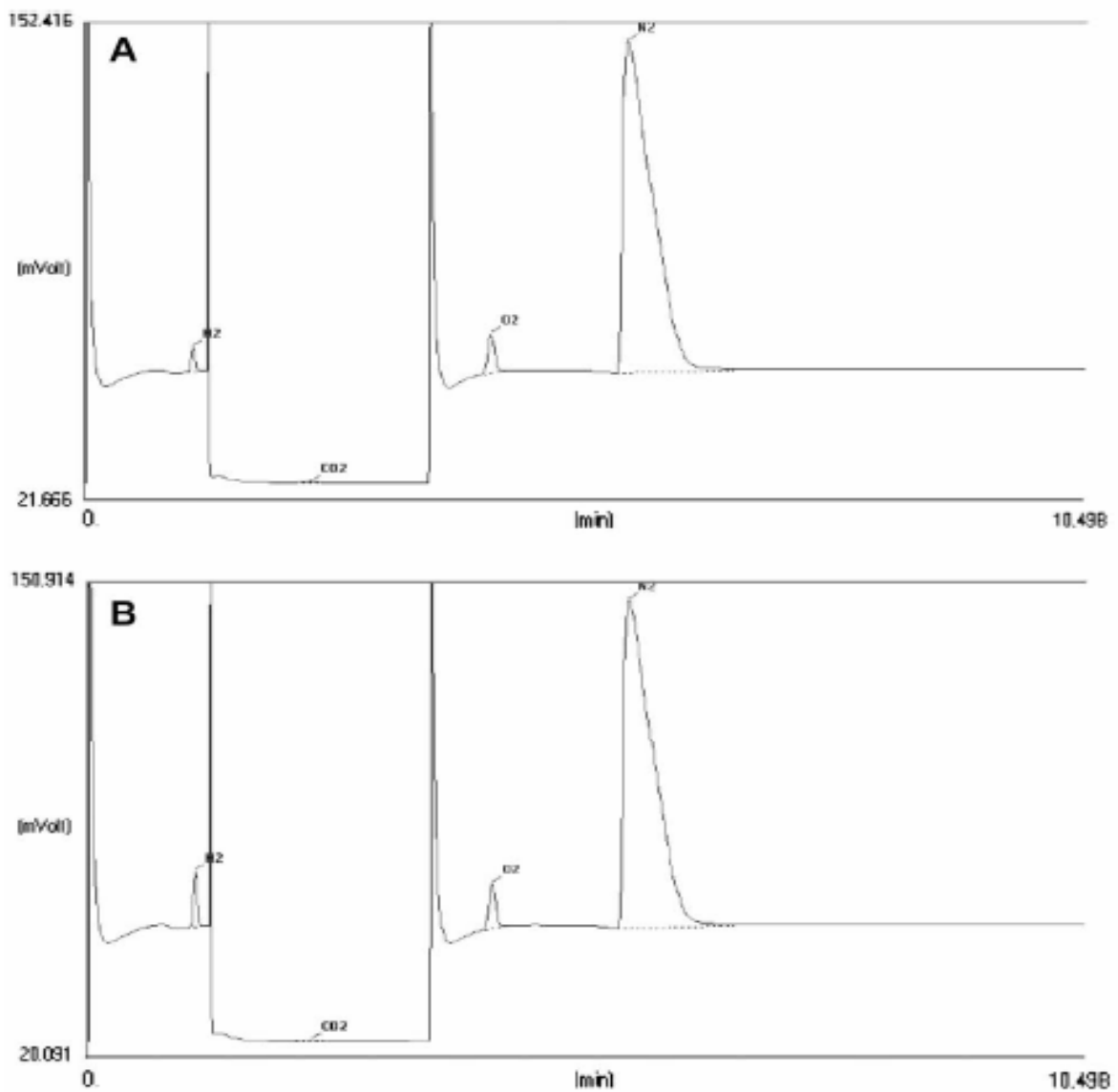


Figure III.13.b Chromatogramme des gaz collectés dans la culture de *Chlorella sp* Pt6 (A) Au début de la carence en soufre. (B) 120 h après la période de carence en soufre.

Des résultats exposés plus haut, il ressort que les trois souches sélectionnées présentent des potentialités intéressantes pour la production d'hydrogène, enclenchée par l'activation des hydrogénases. Cependant, les volumes produits restent différents d'une souche à une autre, ceci pourrait être du à l'accumulation différentielle de l'oxygène à l'intérieur des photobioréacteurs (Figure III.14), plus le pourcentage d'oxygène est faible et plus est, important le taux d'hydrogène libéré, ce qui confirme la sensibilité des hydrogénases des souches sélectionnées de chlorelles vis-à-vis de l'oxygène. Seulement, cette sensibilité est moins forte par rapport à *Chlamydomonas reinhardtii* où l'activité de l'hydrogénase est complètement inhibée à des pressions partielles d'oxygène > 2% (Ghirardi *et al.*, 1997).

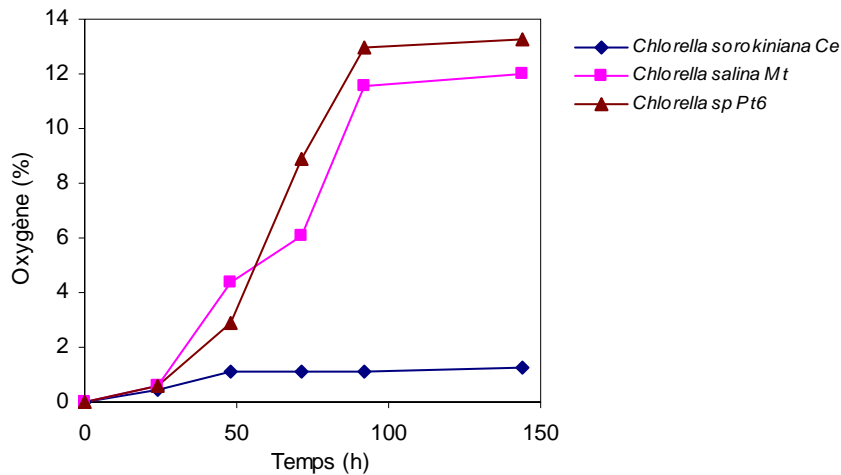


Figure III.14 Evolution du Pourcentage d'oxygène dans les différentes cultures pendant la carence en soufre (étape de production d'hydrogène).

En effet, le haut niveau d'oxygène mesuré dans les cultures de *Chlorella salina* Mt et *Chlorella sp* Pt6, n'empêchent pas l'activité des hydrogénases, au contraire, elle semble être soutenue pendant 2 ou 3 jours d'incubation en carence de soufre (Chader *et al.*, 2009). Les deux souches seraient probablement résistantes à une haute pression d'O₂. Le tableau III.7 donne la pression partielle d'oxygène inhibitrice pour chaque espèce, comparée à la souche de référence ; *Chlamydomonas reinhardtii* (Zhang *et al.*, 2002).

Tableau III.7 Comparaison du taux d' H₂ produit et la pression partielle d'O₂ inhibitrice chez différentes espèces de microalgues (Chader *et al.*, 2009).

Souche de microalgue	Taux d' H ₂ (ml l ⁻¹ of culture h ⁻¹)	pression partielle d'O ₂ inhibitrice (%)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	≥ 0.2
<i>Chlorella sorokiniana Ce</i>	1.35	1.34 – 1.92
<i>Chlorella salina Mt</i>	0.5	11.5 - 13.02
<i>Chlorella sp Pt6</i>	0.8	≥ 15.4

III.4 Influence des paramètres physiques sur la production d'H₂

Pour les essais de production d'hydrogène par les souches de microalgues sélectionnées, après différents tests, nous avons opté pour les mêmes conditions physiques dans lesquelles *Chlamydomonas reinhardtii* a été cultivée et a permis l'obtention d'un rendement de production satisfaisant. A savoir une température variant entre 20 et 25°, un pH entre 7 – 7.3 (Tsygankov *et al.*, 2006) et une intensité lumineuse de 150 – 200 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ (Melis *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2006). En effet, la variation du pH est très faible presque nulle pendant le processus de production. Quant à l'intensité lumineuse, il était essentiel d'éviter les fortes lumières qui déclencheraient la photoinhibition des photosystèmes par saturation.

IV. Mesure des paramètres biochimiques

La production d'hydrogène est accompagnée d'un certain nombre de changement physiologique et biochimique au niveau des cultures. Ces dernières se retrouvent dans des conditions particulières (carence de soufre et anaérobiose provoquée) qu'on pourrait qualifier de stress biochimique. Dans ce qui suit, nous exposons les résultats obtenus concernant la mesure des différents paramètres pendant la période de production d'hydrogène.

IV. 1 Viabilité cellulaire et comportement physiologique

Les signes d'une croissance satisfaisante en terme de biomasse, de chlorophylle et de viabilité sont nettement apparents. En effet, dès les premiers jours, on assiste à des divisions régulières et une viabilité cellulaire atteignant les 100 %. Le comportement des souches au sein des photobioréacteurs est satisfaisant, il est traduit par une forme cellulaire régulière tel que décrite pendant les isolements. Ceci confirme le choix approprié de la géométrie des bioréacteurs (cuve agitée et torique) en terme de mélange et accès à la lumière.

La réponse physiologique des souches pendant la phase de production d'hydrogène est observée 4 à 5 jours après l'incubation en carence de soufre. Elle se traduit par le changement de la taille et la forme des cellules qui étaient au départ, ellipsoïdes ou sphériques, deviennent plus grosses et plus arrondies (Figure III.15). Ceci serait probablement du aux activités intenses du métabolisme lié à la dégradation des réserves endogènes et des carbohydrates (i.e. respiration oxydative) associée à une production de molécules d'eau accompagné d'un jaunissement plus ou moins accentué selon les souches. Cet état est confirmé lors du dosage des chlorophylles totales. Ces mêmes changements morphologiques ont été rapportés par Zhang *et al.*, (2002).

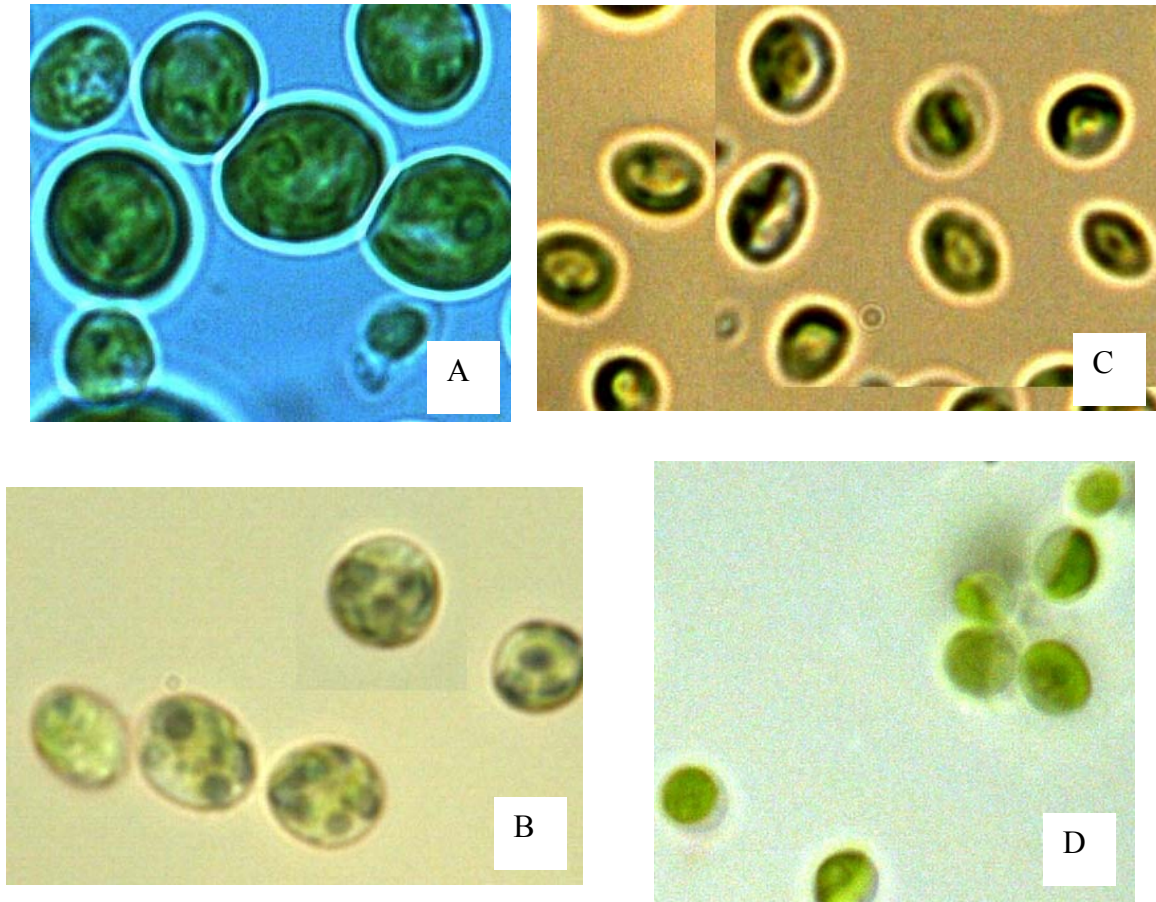


Figure III.15 Morphologie des Chlorelles en phase ou non de la production d'hydrogène observées au microscope photonique (grossissement x 40).

- A. *Chlorella salina* Mt sur milieu TAP,
- B. *Chlorella salina* Mt sur milieu TAP carencé en soufre (pendant la production d'H₂),
- C. *Chlorella sorokiniana* Ce sur milieu TAP,
- D. *Chlorella sorokiniana* Ce sur milieu TAP carencé en soufre (pendant la production d'H₂).

Pour le reste des paramètres et en raison de la difficulté rencontrée lors des prélèvements pendant la phase de production d'hydrogène, seules les mesures au début et à la fin du processus sont effectuées.

IV. 2 Mesure de la croissance cellulaire et du poids sec

La courbe de croissance des souches sélectionnées, obéit au schéma standard de la croissance d'une population microbienne en milieu non renouvelé avec les phases conventionnelle ; une phase initiale stationnaire ou phase de latence, phase de croissance exponentielle et la phase stationnaire. Pour les trois souches étudiées (Figure III. 16), on note une croissance nettement favorisée dans les conditions d'hétérotrophie (Tris Acétate Phosphate, TAP) par rapport aux conditions autotrophes (sur BG 11).

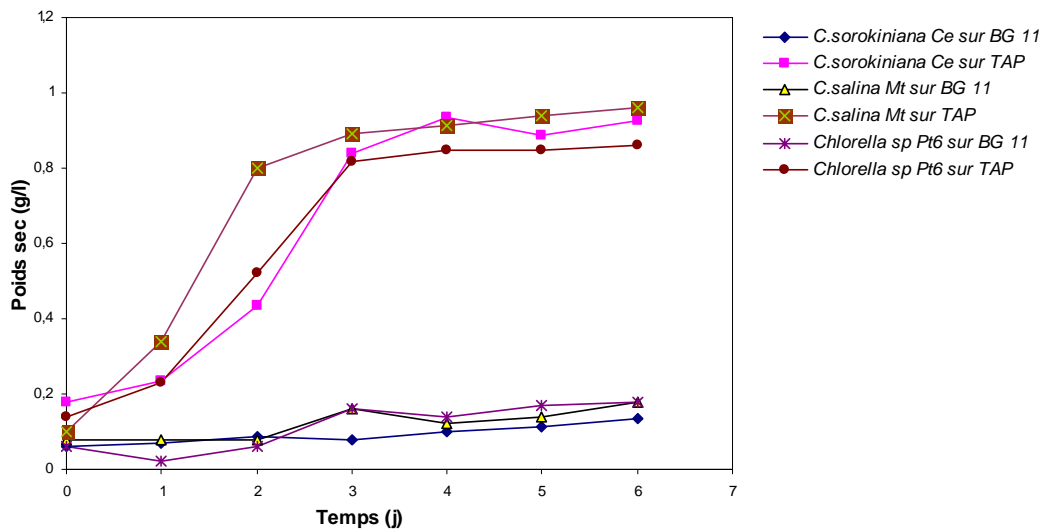


Figure III.16 Evolution de la croissance des souches étudiées exprimée en poids sec (g/l), incubées dans les conditions autotrophiques (BG 11) et hétérotrophiques (Tris Acétate Phosphate, TAP).

L'accumulation de la biomasse et par conséquent les produits de réserves et les protéines, ont permis de confirmer le choix du TAP pour induire le mécanisme de production biologique de l'hydrogène par les souches étudiées. En effet, les résultats obtenus ont montré une implication directe de ces composés dans le processus.

Pendant la phase de production d'hydrogène, les cellules se divisent durant les premières 48 h de carence en soufre, leur concentration double pratiquement pour passer de 3.6×10^6 cellules /ml à 6.5×10^6 cellules /ml. C'est une constatation similaire chez les trois souches.

IV. 3 Dosage des carbohydrates et des protéines

En revanche l'évolution de la quantité des carbohydrates et des protéines est différente pendant la phase de carence en soufre. Les résultats obtenus montrent une augmentation de la quantité de réserves en carbohydrates six fois plus importante au début puis une diminution de près de 54%. Cette même évolution a été rapportée par de nombreux travaux qui suggèrent que la mobilisation de ces réserves génère le pouvoir réducteur des électrons à travers la membrane des thlakoïdes via la NADPH chloroplastique (Gfeller et Gibbs, 1984 ; Bennoun, 1998).

Pour la quantification des protéines, on note dans toutes les cultures de chlorelles testées, une diminution du taux de protéines qui passe de 170 mg/l de culture à 65 mg/l, ce résultat concorde avec les données de la littérature (Melis *et al.*, 2000). En effet, en absence de soufre, c'est surtout les protéines constituant les photosystèmes qui dégénèrent et ne sont pas remplacées.

IV. 2 Dosage des chlorophylles

Le taux des pigments est exprimé en quantité de chlorophylles par cellule (mol Chl / Cellule). Dans les cultures des chlorelles, le contenu en chlorophylle passe de 3.5×10^{16} mol Chl /Cellule au début de la carence en soufre à 1.8×10^{16} mol Chl /Cellule après 6 jours d'incubation. Par ailleurs, le taux de Chl a /Chl b augmente d'environ 15 % ce qui explique le jaunissement observée des cultures. Ceci est du, comme expliqué plus haut (paragraphe III.2) au fait que la synthèse de novo des pigments chlorophylliens est bloquée à cause de l'absence du soufre essentiel à la biosynthèse des protéines impliquées dans le processus.

Conclusion sur la production d'hydrogène par les souches sélectionnées

En conclusion, la production d'hydrogène est induite par une dégradation des réserves glucidiques. C'est la photo respiration qui est enclenchée permettant une diminution du taux d'oxygène, libéré par la photolyse de l'eau ce qui active l'hydrogénase. La sensibilité de cette enzyme semble être différente d'une souche à l'autre.

La production d'hydrogène est maintenue pendant 4 jours après fermeture des photobioréacteurs, au-delà de cette période elle s'arrête probablement à cause de la diminution des réserves (carbohydrates et protéines). Il sera donc nécessaire de transférer les souches dans un milieu enrichi. La production d'hydrogène par les microalgues est un processus cyclique qui se déclenche après la période d'accumulation des réserves particulièrement les carbohydrates, une autre hypothèse qu'il faut vérifier en effectuant une série de plusieurs cycles successifs en palliant temporairement la carence en soufre et/ou d'autres éléments nutritifs.

De ce qui précède, on peut conclure que jusqu'à l'heure la production d'hydrogène par les microalgues ne peut s'effectuer qu'à travers deux cycles simultanés : une période de croissance pour l'accumulation de réserves (en aérobie) et une période de dégradation de ces réserves (en anaérobie) conduisant à la production d'hydrogène.

V. Mesure de la fluorescence et l'efficacité photosynthétique

L'analyse de la fluorescence renseigne sur les activités photochimiques des pigments chlorophylliens, c'est ce qui permet d'optimiser les réactions photochimiques. Les mesures ont été effectuées sur la fluorescence de base (F_0 ou nulle), la fluorescence maximale (F_m), sous l'impulsion de saturation pour une intensité donnée, l'état stable fluorescence (F_s ou steady state), à rayonnement actinique ($300 \text{ mmol photon /m}^2/\text{s}$) et un maximum de fluorescence avec les centres de réaction partiellement clos (F_m') (Figure III. 17).

À partir de ces paramètres, F_v / F_m (variable à fluorescence maximale, ce qui représente le maximum d'efficacité photochimique du PSII), $\phi(PSII)$ (rendement quantique du transport d'électrons PSII), PQ (quenching photochimique coefficient) et NPQ (non-photochimique trempe coefficient) ont été calculées en fonction de la formule :

$$\phi(PSII) = \frac{F_m - F_s}{F_s}$$

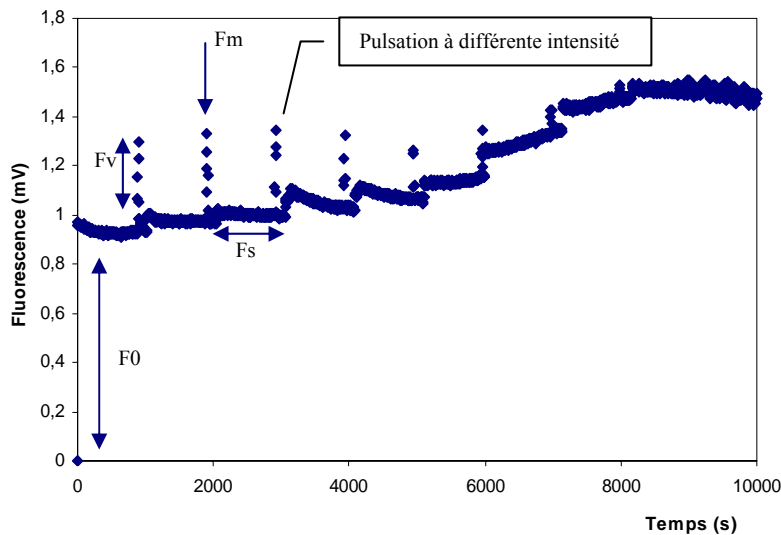


Figure III.17 Graphe typique de la fluorescence de *Chlorella sorokiniana* Ce.

Les résultats obtenus montrent que l'efficacité photosynthétique de *Chlorella sorokiniana* Ce atteint un pourcentage = 70 – 80 % pour les intensités utilisées.

VI. Modèle mathématique et validation numérique des résultats obtenus

Une tentative de validation des résultats obtenus, est encore en cours. L'étude mathématique, utilise les équations différentielles dépendantes des variations des paramètres cinétiques sur un grand nombre de variables d'état (Orlando *et al.*, 2008). Le modèle est formulé dans les lignes directrices de la théorie des systèmes biochimiques et mis en œuvre dans le programme numérique PLAS[®].

Les modèles mathématiques basés sur le S-système ont été utilisés pour décrire le processus de production d'hydrogène par les microalgues (Horner J, Wolinsky, 2002 ; Park et Moon 2007). Plusieurs éléments sont pris en compte, selon les équations ci-après. Chaque métabolite a au plus une entrée (qui est composé de tous les flux) et une sortie (qui est composé de tous les flux sortants) et chacun des deux est représenté comme un produit de la puissance des fonctions de droite décrit selon l'équation suivante :

$$\dot{X}_i = \alpha_i \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{g_{ij}} - \beta_i \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{h_{ij}}$$

$$X_1 = \alpha_1 \cdot X_{21}^{g_{1,21}} \cdot X_{16}^{g_{1,16}} \cdot X_{18}^{g_{1,18}} - \beta_1 \cdot X_1^{h_{1,1}} \cdot X_{25}^{h_{1,25}} \cdot X_{18}^{h_{1,18}}$$

(protons from PSII),

$$X_2 = \alpha_2 \cdot X_{21}^{g_{2,21}} \cdot X_{16}^{g_{2,16}} \cdot X_{18}^{g_{2,18}} - \beta_2 \cdot X_2^{h_{2,22}} \cdot X_{29}^{h_{2,29}} \cdot X_{18}^{h_{2,18}}$$

(oxygen),

$$X_3 = \alpha_3 \cdot X_{21}^{g_{3,21}} \cdot X_{16}^{g_{3,16}} \cdot X_{18}^{g_{3,18}} - \beta_3 \cdot X_3^{h_{3,3}} \cdot X_{23}^{h_{3,23}}$$

(electrons from PSII),

$$X_4 = \alpha_4 \cdot X_3^{g_{4,3}} \cdot X_5^{g_{4,5}} \cdot X_{19}^{g_{4,19}} - \beta_4 \cdot X_4^{h_{4,4}} \cdot X_{25}^{h_{4,25}}$$

(protons from PQ),

$$X_5 = \alpha_5 \cdot X_9^{g_{5,9}} \cdot X_{12}^{g_{5,12}} \cdot X_{30}^{g_{5,30}} - \beta_5 \cdot X_5^{h_{5,5}} \cdot X_2^{h_{5,2}}$$

$$X_6 = \alpha_6 \cdot X_5^{g_{6,5}} \cdot X_2^{g_{6,2}} - \beta_6 \cdot X_6^{h_{6,6}} \cdot X_{23}^{h_{6,23}}$$

(electrons from starch),

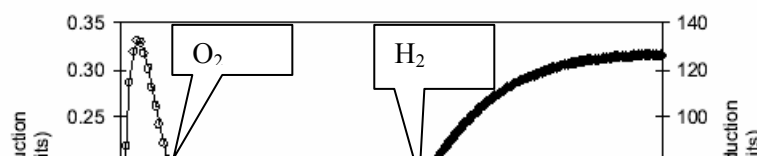
$$X_{10} = \alpha_{10} \cdot X_{17}^{g_{10,17}} \cdot X_2^{g_{10,2}} - \beta_{10} \cdot X_{10}^{h_{10,10}}$$

(hydrogenase),

$$X_{11} = \alpha_{11} \cdot X_{10}^{g_{11,10}} \cdot X_{19}^{g_{11,19}} \cdot X_8^{g_{11,8}} \cdot X_2^{g_{11,2}} - \beta_{11} \cdot X_{11}^{h_{11,11}}$$

(hydrogen),

Dans les conditions opératoires, la comparaison numérique réalisée par le programme PLAS[®] a montré que les résultats obtenus sont similaires aux résultats attendus avec un calcul d'erreur $\leq 0,09$. Ce qui confirme la validité des potentialités de production des espèces sélectionnées, en particulier celle de la souche *Chlorella sorokiniana* Ce (Figure III. 18).



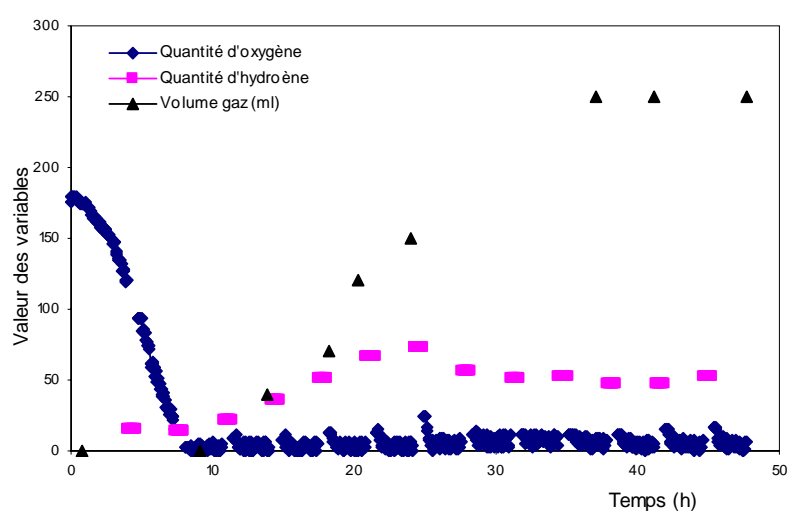
(Orlando *et al.*, 2008)

Figure III. 19 Graphe expérimental montrant les variations des gaz dans la culture carencée en soufre de *Chlorella sorokiniana* Ce (noter l'allure des courbes en comparaison avec le graphe théorique).

Les résultats indiquent la même tendance décrite dans la littérature (Orlando *et al.*, 2008), on note une augmentation transitoire dans les niveaux d'oxygène au début du processus, suivie par la consommation d'O₂ à des niveaux suffisamment bas pour générer l'anaérobiose dans le milieu de culture. Cela permet aux cellules de démarrer la production d'hydrogène. Les résultats obtenus ont permis de valider le modèle de prédiction dans le temps et les changements dans les niveaux d'O₂ et d'H₂ extracellulaires au cours de la période de carence en soufre.

DISCUSSION

L'approvisionnement en éléments nutritifs, l'intensité lumineuse, la température et le pH sont les principaux facteurs abiotiques régissant l'état physiologique et métabolique des microorganismes photosynthétiques.

Une combinaison optimale de différents facteurs, pourrait modifier sensiblement la composition des métabolites produits et favoriser l'induction de certaines enzymes, tel que l'hydrogénase. Cette dernière stimulée par l'anaérobiose (provoquée par l'inactivation du photosystème II), produit de l'hydrogène gazeux (Antal et Linbald, 2005). En effet, lorsque les algues vertes sont cultivées dans un milieu carencé en soufre inorganique, l'exposition continue de ces cultures à la lumière augmente le taux de photo respiration et diminue l'activité photosynthétique. L'évolution du taux de CO₂ fixé baisse de manière significative dans les 24h sans perte du pouvoir réducteur des transport d'électrons (Davies *et al.*, 1994 ; Yildiz *et al.*, 1994). Ce dernier est utilisé pour la réduction des protons par l'hydrogénase via une ferredoxine. Dans ces conditions, la croissance est limitée et la Fe-hydrogénase est activée, ce qui induit la production d'hydrogène (Melis *et al.*, 2000).

Les résultats obtenus montrent que les souches sélectionnées présentent des potentialités intéressantes pour la production d'hydrogène. Toutefois, cette production chez *Chlorella salina* souche Mt et *Chlorella sp* souche PT6, commence plus tôt, dès les premières heures de carence en soufre malgré la présence d'oxygène, seulement le taux de l'hydrogène produit reste faible. Contrairement à *Chlorella sorokiniana* souche Ce, le volume produit (1.35 ml l⁻¹ de culture h⁻¹) est proche de celui rapporté par la littérature utilisant *Chlamydomonas reinhardtii* (Melis *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2002). La production d'hydrogène observée dans les trois cultures de *Chlorella* augmente progressivement jusqu'à 72h de privation de soufre et il se stabilise avant de s'arrêter complètement à cause de l'appauvrissement du milieu de culture et l'utilisation des composés carbonés précédemment accumulés.

Le temps de réponse des souches étudiées face aux conditions du milieu est différent d'une souche à une autre. Il est probablement dû aux particularités intrinsèques de chaque espèce liées à la photorespiration et à l'efficacité photosynthétique. En effet, chez *C.sorokiniana* .Ce, l'anaérobiose est atteinte plus vite que chez les deux autres souches ce qui expliquerait la rapide chute du niveau d'oxygène.

Par ailleurs, nous avons estimé que dans la souche *C. salina* Mt et la souche Pt6, la Fe-hydrogénase est probablement résistante à une haute pression d'O₂. Son activité n'est pas complètement inhibée et l'accumulation d'H₂ n'est pas arrêtée pour autant. Contrairement à la souche de référence *Chlamydomonas reinhardtii* chez laquelle la photo production d'H₂ est inhibée à de faible concentration d'oxygène (Melis *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2002).

D'autre part, nous avons observé, chez les trois cultures de *Chlorella*, des changements transitoires dans l'évolution de la croissance, l'accumulation de l'amidon et la quantité de chlorophylle pendant la carence en soufre. Les résultats obtenus sont comparables à ceux rapportés dans la littérature (Gfeller et Gibbs, 1984; Bennoun, 1998).



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'importance de l'hydrogène en tant que vecteur énergétique a été suffisamment démontrée au vue des nombreuses utilisations actuelles, en particulier via la pile à combustible. L'économie de l'hydrogène est considérée aujourd'hui comme la seule alternative durable face aux problèmes environnementaux que connaît notre planète. Pour cela, toutes les voies renouvelables et durables pour sa production sont exploitées.

L'état de l'art établi, nous a permis de conclure que la voie de production biologique est comptée parmi celles qui sont les plus étudiées et les plus envisagées compte tenu de leur durabilité et leur propreté. L'objectif du travail est de déterminer les conditions opératoires pour soutenir une production d'hydrogène à partir des souches microalgales localement isolées.

Les expériences menées ont permis de sélectionner parmi une dizaine de souches de *Chlorella* isolées dans les eaux du sud algérien, trois espèces dont les potentialités de production d'hydrogène sont appréciables. Notre contribution présente les premiers résultats obtenus dans le domaine de la production biologique de l'hydrogène à partir des microalgues.

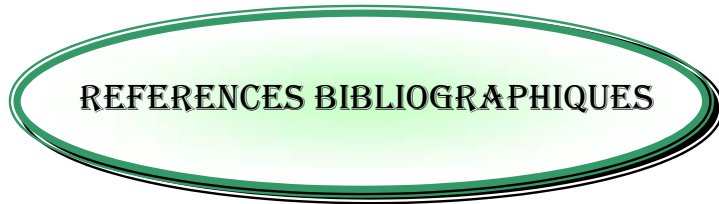
Nous avons sélectionné trois nouvelles souches de *Chlorella* (*sorokiniana* souche Ce, *salina* souche Mt et la souche Pt6 non identifiée) ayant une potentialité appréciable pour la production d'hydrogène. De plus, comparées aux résultats de la littérature, nous avons montré que ces souches sont différentes du point de vue activité enzymatique. En effet, il apparaît que les souches sélectionnées possèdent des hydrogénases dont l'activité est résistante à des hautes pressions d'oxygène ce qui n'est pas le cas pour la souche de référence.

Cependant, le taux d'hydrogène produit par les trois souches est significativement différent. Il serait intéressant dans les travaux à venir d'étudier la spécificité biomoléculaire des hydrogénases de chaque souche afin de déterminer leur limite fonctionnelle.

Le temps de réponse des souches étudiées face aux conditions du milieu est différent d'une souche à une autre. Il est probablement du aux particularités intrinsèques de chaque qu'il sera intéressant d'étudier.

Par ailleurs, une étude sur l'utilisation de l'hydrogène produit par ces souches est en cours. L'objectif escompté est de mesurer le courant électrique généré par une pile à combustible PEMFC (Polymer Electrolyte Membrane Fuel Cell) connecté directement au photobioréacteur.

Enfin, il serait tout aussi judicieux de s'intéresser à la valorisation des autres métabolites produits par ces microalgues tel que les acides gras en vue de produire des biocarburants ou biodiesel qui pourraient être les substituants renouvelables des carburants fossiles.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Aceves Lara, C.A (2007). Modélisation, estimation et commande de procédés de digestion anaérobie en vue de l'optimisation de la production de biohydrogène. Thèse de Doctorat. Université Montpellier II. Sciences et techniques du Languedoc. France.
- Aceves Lara, C.A, Latrille. E, Conte. T, Bernet. N, Buffière. P, Steyer. J.P (2006). Optimization of Hydrogen Production in Anaerobic Digestion Processes. 16 th World Hydrogen Energy Conference: 6 cd pages.
- Akkerman, I, Janssen. M, Rocha. J, Wijffels, R.H (2002). Photobiological Hydrogen Production: Photochemical Efficiency And Bioreactor Design. *International Journal of Hydrogen Energy* 27: 1195-1208.
- Amirouche N, Bouguedoura N, Hadj-Arab H (2009). Botanique. Algues Champignons Lichens. Ed. Houma.Alger. ISBN: 978-9961-65-159-9.
- Antal TK, Lindblad P (2005). Production of H₂ 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. *J. Appl. Microbiol* 98:114–120.
- Aoyama K, Uemura I, Miyake J and Asada Y (1997). Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a Cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *J Ferment Bioenerg* 83: 17-20.
- Appel J, Schulz R. (1998) Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis: hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poisoning? *J Photochem photobiol*; 47:1-11.
- Archer, D. B., M. G. Hilton, P. Adams and H. Wiecko (1986). Hydrogen as a process control in a pilot scale anaerobic digester, *Biotechnology Letters* 8 (3): 197-202.
- Asada, Y. and J. Miyake (1999). Photobiological hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(1): 1-6.
- Bagai R, Madamwar D. (1999). Long-term photo-evolution of hydrogen in a packed bed reactor containing a combination of *Phormidium valderianum*, *Halobacterium halobium* and *Escherichia coli* immobilized in polyvinyl alcohol. *International Journal of Hydrogen Energy* 24:311- 317.
- Bagai R, Madamwar D. (1998). Prolonged evolution of photohydrogen by intermittent supply of nitrogen using a combined system of *Phormidium valderianum*, *Halobacterium halobium* and *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy* 23 : 545-550.
- Banerjee M, Kumar A, Kumar HD(1989). Factors regulating nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Azolla - Anabaena symbiosis*. *International Journal of Hydrogen Energy* 12: 871- 879.
- Basak,N. and D. Das (2007). The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: The present state of the art. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 23(1): 31-42.
- Barbarossa, V., S. Brutti, M. Diamanti, S. Sau and G. De Maria (2006). Catalytic thermal decomposition of sulphuric acid in sulphur-iodine cycle for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 31(7): 883-890.

- Batstone, D. J., J. Keller, I. Angelidaki, S. V. Kalyuzhnyi, S. G. Pavlostathis, A. Rozzi, W. T. M. Sanders, H. Siegrist and V. A. Vavilin (2002). The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Science and Technology* 45(10): 65–73.
- Belkin S, Padan E. (1978). Hydrogen metabolism in the facultative anoxygenic cyanobacterial blue green algae, *Oscillatoria limnetica* and *Aphanothece halophytica* *Arch Microbiol* 116:109-111.
- Benemann JR, Berenson JA, Kaplan NO, Kauren MD. (1973). Hydrogen evolution by a chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 2317-2320.
- Benemann JR, Miyamoto K, Hallenbeck PC. (1980). Bioengineering aspects of biophotolysis. *Enzyme Microbial Technol* 2:103-111.
- Benemann, J.R. & Weare, N.M. (1974). Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrical* cultures. *Science* 184 : 1917–75.
- Benemann, J.R. (1997). CO₂ mitigation with microalgae systems. *Energy Convers. Mgmt.*, 38, Suppl., S475–79.
- Benemann, J.R. (1998). The technology of biohydrogen. In: Biohydrogen (ed. O. Zaborsky), pp. 19–30. Plenum Press, New York.
- Bennoun P (1998). Chlororespiration sixteen years later. In: rochaix JD, Goldsmith-Clermont M, Merchant S (eds) *The Molecular Biology of Chloroplast and Mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands pp 675-683.
- Bernard, O. and G. Bastin (2004). Identification of reaction networks for bioprocesses: determination of a partially unknown pseudo-stoichiometric matrix. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 27(5) : 293-301.
- Bernard, O. and G. Bastin (2005). On the estimation of the pseudo-stoichiometric matrix for macroscopic mass balance modelling of biotechnological processes. *Mathematical Biosciences* 193(1): 51-77.
- Berry, G. D. and S. M. Aceves (2005). The Case for Hydrogen in a Carbon Constrained World. *Journal of Energy Resources Technology* Copyright 127: 189-194.
- Billings RE. (1991) *The hydrogen world view*, 1 st ed; American Academy of Science.
- Bjørnar, K., G. Søndre and B. Cato (2002). *Bellona rapport nr. 6 - 2002, Hydrogen Status og muligheter*. The Bellona Foundation.
- Björnsson, L., M. Murto, T. G. Jantsch and B. Mattiasson (2001). Evaluation of new methods for the monitoring of alkalinity, dissolved hydrogen and the microbial community in anaerobic digestion. *Water Research* 35(12): 2833-2840.
- Boichenko VA, Satina LY, Litvin FF. (1989). Efficiency of hydrogen photoproduction in algae and cyanobacteria. *Fiziol Rast*; 36 : 239–47.
- BoichenkoVA, Hoffmann P. (1994). Photosynthetic hydrogen production in prokaryotes and eukaryotes: occurrence, mechanism, and functions. *Photosynthetica* 30:527–552.
- Bothe H, Kentemiej T. (1990). Potentialities of H₂-production by cyanobacteria for solar energy conversion program In : Veziroglu TN, Takashashi PK. *Hydrogen energy progress VIII. Proceedings of the Eighth WHEC, Hawaii*. New York : Pergamon Press., p. 729-734.

- Boubetra D. (1998). Contribution à l'étude de la flore algale du lac El Menea: isolement, identification et culture d'une souche de cyanobactérie sur les eaux usées. Thèse de magister. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. 154 p.
- Boucher, S. (2006). La révolution de l'hydrogène vers une énergie propre et performante. Editions du félin Paris.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyes binding. *Analytical Chemistry* 72 :248-254.
- Brosseau JD, Zajic JE. (1982). Continuous microbial production of hydrogen gas. *International Journal of Hydrogen Energy* 7:623-688.
- Casper MS. (1978) Hydrogen manufacture by electrolysis, thermal decomposition and unusual techniques. Park Ridge, NJ: Naves Data Corp.
- Chader S, Hacene H, Agathos S.N (2009). Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara. *International Journal of Hydrogen Energy* 34: 4941-4946.
- Chader S, Hacene H, Belhamel M et Agathos S. (2007). Etudes des procédés de production biologique de l'hydrogène. *Revue des Energies Renouvelables* 10 (4) : 497 – 505.
- Cherigui A.N, Mahmah B, Harouadi F, Belhamel M, Chader S, M'Raoui A, Etievant C. (2009). Solar Hydrogen Energy: The European-Maghreb Connection A New Way of Excellence for a Sustainable Energy Development. *International Journal of Hydrogen Energy* 34: 4934-4940.
- Costa, C. B. B., A. C. da Costa and R. M. Filho (2005). Mathematical modelling and optimal control strategy development for an adipic acid crystallization process. *Chemical Engineering and Processing* 44 (7): 737-753.
- Damen, K., M. van Troost, A. Faaij and W. Turkenburg (2006). A comparison of electricity and hydrogen production systems with CO₂ capture and storage. Part A: Review and selection of promising conversion and capture technologies. *Progress in Energy and Combustion Science* 32 (2): 215-246.
- Das, D. and T. N. Veziroglu (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy* 26 (1): 13-28.
- Davies JD, Grossman AR. (1998). Responses to deficiencies in macronutrients. In *The Molecular Biology of Chlamydomonas* ed. Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M. and Merchant. Dordrecht: Kluwer Publishers 613–635.
- Davies JP, Yildiz F, Gossman AR. (1994). Mutants of *Chlamydomonas* with aberrant responses to sulphur deprivation. *Plant Cell* 6:53-63.
- Deliang He. (2005). Hydrogen photosynthesis by *Rhodobacter capsulatus* and its coupling to PEM fuel cell. *J of Power Sources* 141 19-23.
- Demirbas, A. (2007). Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science* 33(1): 1-18.
- De Reviere B (2002). Biologie et phylogénie des algues. Tome 1 et 2. Ed. Belin.
- Derraz M, Dauta A, Capblanca J, Abassi M (1995). Influence de la lumière et la température sur le taux de croissance et de photosynthèse de *Scenedesmus crassus* chodat, isolée de la retenue eutrophe, El Kansera (Maroc). *Annls limmol* 31 (1) pp 65-74.

- Desai, R. P., Nielsen L. K. and Papoutsakis E. T. (1999). Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. *Journal of Biotechnology* 71(1-3) : 191-205.
- Dowaki, K., T. Ohta, Y. Kasahara, M. Kameyama, K. Sakawaki and S. Mori (2007). An economic and energy analysis on bio-hydrogen fuel using a gasification process. *Renewable Energy* 32(1): 80-94.
- Fascetti E, D'addario E, Todini O, Robertiello A. (1998). Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. *International Journal of Hydrogen Energy* 23:753-7560.
- Ferriere A. et Flamant G. (2004). Captation, Transformation et Conversion de l'Energie Solaire par les Technologies à Concentration. IMP-CNRS, Centre du Four Solaire.
- Floquet, T. and J.-P. Barbot (2006). State and unknown input estimation for linear discretetime systems. *Automatica* 42(11) : 1883-1889.
- Fuel Cell Handbook (2000). Department of Energy, U.S. Parsons, Inc.
- Gaffron H (1940) Carbon dioxide reduction with molecular hydrogen in green algae. *Ann J Bot* 27 : 273 – 283.
- Gaffron H, Rubin J (1942). Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J Gen Physiol* 26 : 219-240.
- Gayral P (1975). Les algues. Morphologie, cytologie, reproduction, écologie. Ed. Doin. Paris.
- Gfeller RP, Gibbs M (1984) Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of fermentative products from starch in dark and light. *Plant Physiol* 77 :509-511.
- Giaconia, A., R. Grena, M. Lanchi, R. Liberatore and P. Tarquini (2007). Hydrogen/methanol production by sulfur-iodine thermochemical cycle powered by combined solar/fossil energy. *International Journal of Hydrogen Energy. Path Forward to a Hydrogen Economy* 32(4): 469-481.
- Gondal, M. A., A. Hameed, Z. H. Yamani and A. Suwaiyan (2004). Production of hydrogen and oxygen by water splitting using laser induced photo-catalysis over Fe₂O₃. *Applied Catalysis General* 268 (1-2): 159-167.
- Gorenflot R (1975). Précis de botanique. Procaryotes et thallophytes eucaryotes. Ed. Doin. Paris.
- Greenbaum E. (1988). Energetic efficiency of hydrogen photo evolution by algal water splitting. *Biophysic Journal* 365-368.
- Greenbaum E. (1990). Hydrogen production by photosynthetic water splitting. In : Veziroglu TN, Takashashi PK, editors. Hydrogen energy progress VIII. Proceedings 8th WHEC, Hawaii. New York: Pergamon Press : 743-754.
- Greenbaum E. (1982). Photosynthetic hydrogen and oxygen production: kinetic studies. *Science* 196 :879-880.
- Guwy, A. J., F. R. Hawkes, D. L. Hawkes and A. G. Rozzi (1997). Hydrogen production in a high rate fluidised bed anaerobic digester. *Water Research* 31(6) : 1291-1298.
- Ha, Q. P. and H. Trinh (2004). State and input simultaneous estimation for a class of nonlinear systems. *Automatica* 40(10): 1779-1785.

- Hall D.O., Rao K.K., (1994). Photosynthesis. Fifth edition. University Press, Cambridge (Great Britain).
- Hansmann, E. 'Pigment Analysis', In: J.R. Stein (Ed.), Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth.
- Hao, X. H., L. J. Guo, X. Mao, X. M. Zhang and X. J. Chen (2003). Hydrogen production from glucose used as a model compound of biomass gasified in supercritical water. *International Journal of Hydrogen Energy* 28: 55 – 64.
- Happe T, Naber JD. (1993) Isolation, characterisation and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eu J Biochem* 214 :475-481.
- Harouadi F, Mahmah B, Belhamel M, Chader S, M'Raoui A et Etievant C. (2007). Les potentialités d'exploitation d'hydrogène solaire en Algérie dans un cadre euro – maghrébin Partie I : Phase d'étude d'opportunité et de faisabilité. *Revue des Energies Renouvelables* 10 (2) : 181 – 190.
- Hawkes, F., R. Dinsdale, D. Hawkes and I. Hussy (2002). Sustainable fermentative hydrogen production : challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy* 27(11-12): 1339-1347.
- Healey FP. (1970). Hydrogen evolution by several algae. *Planta* 91 : 220.
- Hillmer P, Gest H. (1977). H₂ metabolism in photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H₂ production by growing culture. *J Bacteriol* 129:724-728.
- Horner J, Wolinsky M. (2002). A power-law sensitivity analysis of the hydrogen-producing metabolic pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy* 27 :1251–5.
- Hussy I, Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL. (2003). Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora. *Biotech Bioeng*; 84(6):619–26.
- Hussy, I., F. R. Hawkes, R. Dinsdale and D. L. Hawkes (2005). Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *International Journal of Hydrogen Energy* 30 (5) : 471-483.
- Jackson, D.D. & Ellms, J.W. (1896) On Odors and Tastes of Surface Waters With Special Reference to Anabaena, A Microscopical Organism Found in Certain Water Supplies of Massachusetts, Rep. Mass. State Board Health, 1986, 410–420.
- Janssen M. (2002). Cultivation of microalgae: effect of light/dark cycles on biomass yield. Thesis, Wageningen University, the Netherlands.
- Jun Pyo Kim, Chang Duk Kang, Tai Hyun Park, Mi Sun Kim, Sang Jun Sim, (2006). Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture. *International Journal of Hydrogen Energy* 31(11): 1585-1590.
- Kameswaran, S. and L. T. Biegler (2006). Simultaneous dynamic optimization strategies: Recent advances and challenges. *Computers & Chemical Engineering. Papers from Chemical Process Control VII - CPC VII* 30(10-12): 1560-1575.
- Karube I, Matsunaga, Tsuni S, Suzuki S. (1976). Continuous hydrogen production by immobilized whole cell of *Clostridium butyricum*. *Biochem Biophys Acta*; 44: 338-345.
- Kataoka N, Miya A, Kiriya K. (1997). Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen producing anaerobic bacteria. *Water Sci Technol* 36:41–47.

- Kessler E. (1974). Hydrogenase, photoreduction and anaerobic growth of algae. In *algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell, Oxford, pp 454-473.
- Khan MMT, Bhatt J. (1991). Polyethylene glycol mediated fusion of *Halobacterium halobium* MMT22 and *Escherichia coli* for enhancement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 16:683-685.
- Kim JS, Ito K, Takahashi H. (1981). Production of molecular hydrogen by *Rhodospseudomonas sp.* *J Ferment Technol*; 59 : 185-190.
- Koriche, N., A. Bouguelia and M. Trari (2006). Photocatalytic hydrogen production over new oxide CuLaO_{2.62}. *International Journal of Hydrogen Energy* 31(9): 1196-1203.
- Koroneos, C., A. Dompros, G. Roumbas and N. Moussiopoulos (2004). Life cycle assessment of hydrogen fuel production processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 29: 1443 – 1450.
- Kraemer, J. T. (2004). Effects of Methanogenic Effluent Recycle on Fermentative Hydrogen Production. University of Toronto.
- Kumar D, Kumar HD. (1991). Effect of monochromatic lights on nitrogen fixation and hydrogen evolution in the isolated hetrocysts of *Anabaena sp.* strain CA. *International Journal of Hydrogen Energy* 16:397- 401.
- Kumar N, Das D. (2000). Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT- BT 08. *Process Biochem* 35 :589–593.
- Kumazawa S, Mitsui A. (1992). Characterization and optimization of hydrogen photoproduction by saltwater blue-green algae, *Oscillatoria Sp.* Miami BG7 : I. Enhancement through limiting cyanobacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* 17 : 695-698.
- Lay J-J. (2000). Modelling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotech Bioeng* 68(3) : 269–78.
- Leclercq. L et Maquet. B (2001). Les bases de l'étude hydrobiologique. Rapport de la Station scientifique des Hautes-Fagnes. Université de Liège. Belgique. www.ulg.ac.be.
- Lecointre. G et Le Guyader. H (2001). Classification phylogénétique du vivant. Ed. Belin.
- Lessing, P. A. (2007). Materials for hydrogen generation via water electrolysis. *Journal of Materials Science* 42(10): 3477-3487.
- Levin DB, Pitt L, Love M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy* 29: 173–85.
- Li, C. and H. H. P. Fang (2007). Fermentative Hydrogen Production from Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 37(1): 1-39.
- Lichtenthaler H.K., (1987). Chlorophylls and Carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148 :350-382.
- Lin C-Y, Chang R-C. (1999). Hydrogen production during anaerobic acidogenic conversion of glucose. *J Chem Tech Biotech* 74(6):496–500.
- Maddy, J., S. Cherryman, F. R. Hawkes, D. L. Hawkes, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, G. C. Premier and S. Cole (2003). HYDROGEN 2003 Report Number 1 ERDF part-funded project entitled: A Sustainable Energy Supply for Wales: Towards the Hydrogen Economy. University of Glamorgan.

- Mahyudin AR, Furutani Y, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N. (1997). Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. *J Ferment Bioeng* 83(4): 358–363.
- Melis A, Hang L, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M. (2000). Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 122(1):127-135.
- Melis A, Happe T. (2001). Hydrogen production: green algae as a source of energy. *Plant Physiol* 127(3):740-748.
- Midilli, A., M. Dogru, G. Akay and C. R. Howarth (2002). Hydrogen production from sewage sludge via a fixed bed gasifier product gas. *International Journal of Hydrogen Energy* 27: 1035 – 1041.
- Miri, R. and A Mraoui (2007) Electrolyte process of hydrogen production by solar energy. *Desalination* 206(1-3): 69-77.
- Miyake J. (1990) Application of photosynthetic systems for energy conversion. In: Veziroglu TN, Takashashi PK, editors. Hydrogen energy progress VIII. Proceedings 8th WHEC, Hawaii. New York : Pergamon Press. P: 755-764.
- Mizuno O, Dinsdale R, Hawkes FR, Hawkes DL, Noike T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technol* 73:59–65.
- Nada, A. A., M. H. Barakat, H. A. Hamed, N. R. Mohamed and T. N. Veziroglu (2005). Studies on the photocatalytic hydrogen production using suspended modified TiO₂ photocatalysts. *International Journal of Hydrogen Energy* 30(7): 687-691.
- Najafpour, G. D. and C. Poi Shan (2003). Enzymatic hydrolysis of molasses. *Bioresource Technology* 86(1): 91-94.
- Nicolet Y., C. Cavazza and J. C. Fontecilla-Camps (2002). Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution. *Journal of Inorganic Biochemistry. Contributions from the 10th International Conference on Bioinorganic Chemistry* 91(1): 1-8
- Nordberg, T. P. and I. Gustafsson (2006). Dynamic regularization of input estimation problems by explicit block inversion. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering* 195(44-47) : 5877-5890.
- Ohta Y, Frank J, Mitsui A. (1981). Hydrogen production by marine photosynthetic bacteria: effect of environmental factors and substrate specificity of the growth of hydrogen producing marine photosynthetic bacterium sp. Miami PBS 1071. *International Journal of Hydrogen Energy* 6 :451-460.
- Orecchini, F. (2006). The era of energy vectors. *International Journal of Hydrogen Energy* 31(14): 1951-1954.
- Orlando Jorqueraa, Asher Kiperstoka, Emerson A. Salesb, Marcelo Embirucuc, Maria L. Ghirardid. (2008). S-systems sensitivity analysis of the factors that may influence hydrogen production by sulfur deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy* 33 2167–2177.
- Park W, Moon IL. (2007). A discrete multi state model for the biological production of hydrogen by phototrophic microalga. *Biochem Eng J* 36:19–27.
- Pauss, A., C. Beauchemin, R. Samson and S. R. Guiot (1990). Continuous measurement of dissolved H₂ in an anaerobic reactor using a new hydrogen/air fuel cell detector. *Biotechnology and Bioengineering* 35: 492-501.

- Piera, M., J. M. Martinez-Vaj and M. J. Montes (2006). Safety issues of nuclear production of hydrogen. *Energy Conversion and Management* 47(17): 2732-2739.
- Philips EJ, Mitsui A. (1983). Role of light intensity and temperature in the regulation of hydrogen photoproduction by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Miami BG7. *Appl. Environ Microbiol* 45:1212-1220.
- Rao KK, Hall DO. (1996). Hydrogen production by cyanobacteria: potentials, problems and prospects. *J Mar biotechnolo* 4:10-15.
- Reddy KJ, Mitsui A. (1984). Simultaneous production of hydrogen and oxygen as affected by light intensity in unicellular aerobic nitrogen fixing blue-green alga *Synchococcus* sp. Miami BG 043511. In: Sybesmaic C, editors. *Advances in photosynthetic research* vol. II. Hague: Martinus Nijho_ Junk, p. 785-788.
- Richmond A (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd Blackwell Publishing company.
- Roberto C. Dante (2005). Hypotheses for direct PEM fuel cells applications of photobioproduced hydrogen by *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy* 26 421-424.
- Rosen MA, Scott DS. (1998). Comparative efficiency assessments for a range of hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 23:653-659.
- Sanchez Miron A, Ceron Garcia MC, Contreras Gomez A, Garcia Camacho F, Molina Grima E, Chisti Y. (2003). Shear stress tolerance and biochemical characterisation of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem Eng J* 16:287-297.
- Sarker S, Pandey KD, Kashyap AK. , (1992). Hydrogen photoproduction by filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Plectonema boryanna* and simultaneous release of ammonia. *International Journal of Hydrogen Energy* 17 : 689-694.
- Sasikala CH, Ramana ChV, Rao PR. (1995). Regulation of simultaneous hydrogen photoproduction during growth by pH and glutamate in *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy* 20:123-126.
- Sasikala K, Ramana Ch V, Raghuvver PR. (1992). Photoproduction of hydrogen from the waste water of a distillery by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *International Journal of Hydrogen Energy* 17 :23-27.
- Sasikala K, Ramana Ch V, Subrahmanyam M. (1991). Photo-production of hydrogen from wastewater of a lactic acid fermentation plant by a purple non-sulfur photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 *Indian J Exp Biol* 29 :745.
- Schnackenberg J, Schulz R and Senger H (1993). Characterization and purification of hydrogenase from the eukaryotic green algae *Scenedesmus obliquus*. *FEBS Lett* 327: 21-24.
- Shayegan, S., D. Hart, P. Pearson and D. Joffe (2006). Analysis of the cost of hydrogen infrastructure for buses in London. *Journal of Power Sources* 157(2): 862-874.
- Shi DJ, Brouers M, Hall DO, Rubin RJ (1987). The effects of immobilization on the biochemical, physiological and morphological features of *Anabaena azollae*. *Planta* 172:298

- Shireen Meher Kotay, Debabrata Das (2008). Biohydrogen as a renewable energy resource—Prospects and potentials *International Journal of Hydrogen Energy* 33: 258 – 263
- Singh SP, Srivastava SC. (1991). Isolation of non-sulfur photosynthetic bacteria strains efficient in hydrogen production at elevated temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy* 16: 404-05.
- Smets, I. Y., J. E. Claes, E. J. November, G. P. Bastin and J. F. Van Impe (2004). Optimal adaptive control of (bio)chemical reactors: past, present and future. *Journal of Process Control. Dynamics, Monitoring, Control and Optimization of Biological Systems* 14(7): 795-805.
- Smith GD, Ewart GD, Tucker W. (1992). Hydrogen production by cyanobacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* 17 : 695-698,
- Spiller H, Ernst E, Kerkin W, Boyer P. (1978). Increase and stabilization of photoproduction of hydrogen in *Nostoc micorum* by photosynthetic electron transport inhibitors. *Z Naturforsch* 33 :541-547.
- Stewart WDP, Rowell P. (1975) Effects of L-methionine D,L- sulfoximine on the newly fixed NH₃, acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica*. *Biochem Biophys Res Commun* 65 :846-856.
- Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M. (2000). The fluorescent transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In Probing photosynthesis, pp. 445-483, Taylor & Francis ed., London.
- Tanisho S, Kuromoto M, Kadokura N. (1998). Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 23 :559–63.
- Tanisho S, Suzuki Y, Wakoo N. (1987). Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E.82005. *International Journal of Hydrogen Energy* 12:623-627.
- Tanisho S, Wakao N, Kokako Y. (1983). Biological hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *J Chem Eng* 16:529-530.
- Tanisho S. (1996). Feasibility study of biological hydrogen production from sugar cane by fermentation. In: Veziroglu TN, Winter C-J, Basselt JP, Kreysa G, editors. Hydrogen energy progress XI. Proceedings of 11th WHEC, Stuttgart 3:2601-2606.
- Tanisho, S. and Y. Ishiwata (1995). Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using methane foam as a support of floccs. *International Journal of Hydrogen Energy* 20(7) : 541-545.
- Tsygankov AA, Kosourova SN., Tolstygina IV., Ghirardi ML., Seibert M. (2006). Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* 31(11) :1574-1584.
- Tsygankov AS, Serebryakova LT, Sueshnikov DA, Rao KK, Gogotov IN, Hall DO. (1997). Hydrogen photoproduction by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and dependence on pH. *International Journal of Hydrogen Energy* 22: 859-867.
- Van Ginkel, S. W. and B. Logan (2005). Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research* 39(16): 3819-3826.

- Van Impe, J. F. and G. Bastin (1995). Optimal adaptive control of fed-batch fermentation processes. *Control Engineering Practice* 3(7) : 939-954.
- Vincezini M, Materassi R, Tredici MR, Florenzano G. (1982) Hydrogen production by immobilized cell-I. light dependent dissimilation of organic substances by *Rhodospseudomonas palustris*. *International Journal of Hydrogen Energy* 7 :231-236.
- Vrati S, Verma J. (1983) Production of molecular hydrogen and single cell protein by *Pseudomonas capsulata* from cow dung. *J Ferment Technol* 61 :157- 162.
- Vyas D, Kumar HD. (1995). Nitrogen fixation and hydrogen uptake in four cyanobacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* 22 :163- 168.
- Wei, L. G., S. P. Xu, L. Zhang, C. H. Liu, H. Zhu and S. Q. Liu (2007). Steam gasification of biomass for hydrogen-rich gas in a free-fall reactor. *International Journal of Hydrogen Energy* 32(1): 24-31.
- Weissmen JC, Bonemann JR. (1977). Hydrogen production by nitrogen starved culture of *Anabaena cylindrica*. *Appl Environ Microbiol* 33:123-129.
- Woodward, J., K. A. Cordray, R. J. Edmonston, M. Blanco-Rivera, S. M. Mattingly and B. R. Evans (2000). Enzymatic hydrogen production: Conversion of renewable resources for energy production. *Energy & Fuels* 14(1) : 197-201.
- Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossmann AR (1998). The regulation of photosynthetic electron-transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 117 :129-139.
- Yildiz F, Davies JP, Gossman AR. (1994). Characterisation of sulphate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfur-sufficient growth. *Plant Physiol* 104 :981-987.
- Zedtwitz, P. V., J. Petrasch, D. Trommer and A. Steinfeld (2006). Hydrogen production via the solar thermal decarbonization of fossil fuels. *Solar Energy* 80(10): 1333-1337.
- Z'Graggen, A., P. Haueter, D. Trommer, M. Romero, J. C. de Jesus and A. Steinfeld (2006). Hydrogen production by steam-gasification of petroleum coke using concentrated solar power - II - Reactor design, testing, and modeling. *International Journal of Hydrogen Energy* 31(6): 797-811.
- Zhang L, Happe T and Melis A (2002). Biochemical and morphological characterisation of sulfur-deprived and H₂- producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green algae). *Planta Physiology* 214: 552 - 561.
- Zurrer H, Bachofen R. (1982). Aspects of growth and hydrogen production of the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* in continuous cultures. *Biomass* 2: 165.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS LIEES A LA THESE

Publication dans des revues internationales

1. **Chader S**, Hacene H, Agathos S.N. Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 4941-4946, 2009.
2. Mahmah B, Harouadi F, **Chader S**, Belhamel M, M’Raoui A, Abdeladim K, Cherigui A.N and Etievant C. MedHySol: Future federator project of massive production of solar hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 4922-4933, 2009.
3. Cherigui A.N, Mahmah B, Harouadi F, Belhamel M, **Chader S**, M’Raoui A, Etievant C. Solar Hydrogen Energy: The European-Maghreb Connection A New Way of Excellence for a Sustainable Energy Development. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 4934-4940, 2009.
4. Mahmah B, Harouadi F, **Chader S**, Belhamel M, M’Raoui A, Cherigui A.N. and Etievant C. *Journal of Oil and Arab Cooperation - Vol 34, Issue 125, (161-178), 2008.*

Publication dans des revues nationales

1. **Chader S**, Hacene H, Belhamel M et Agathos S. Etudes des procédés de production biologique de l’hydrogène. *Rev Energ Ren Vol, 10 N°4 497 – 505, 2007.*
2. **Chader S**. Bio hydrogène : efficacité de conversion et rendement énergétique. *Bull Energ Ren. N°12, Dec 2007.*
3. Cherigui A, Mahmah B, Belhamel M, **Chader S**, Harouadi F, M’Raoui A and Etievant C. Solar hydrogen energy : the European/Maghreb connection a new way of excellence for a sustainable energy development. *Rev Energ Ren Vol, 10 N°4 589 – 596, 2007*
4. Harouadi F, Mahmah B, Belhamel M, **Chader S**, M’Raoui A et Etievant C. Les potentialités d’exploitation d’hydrogène solaire en Algérie dans un cadre euro – maghrébin Partie I: Phase d’étude d’opportunité et de faisabilité, *Rev Energ Ren Vol, 10 N°2 181 – 190, 2007.*
5. **Chader S** et Dib T. L’Algérie : Gisement Inépuisable d’Hydrogène Solaire. *Bull Energ Ren. N°9 Juin 2006.*
6. **Chader, S**. Hydrogène : Nouvelle Génération ; Une Production Biologique Durable. *Bull Energ Ren. N°7 Juin 2005.*
7. **Chader, S**. Le génie des microalgues : de l'aliment au carburant. *Bull Energ Ren. N°4 Décembre 2003.*
8. **Chader S** et Touzi A. Biomasse Algale : Source énergétique et Alimentaire *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse .47 - 50, 2001.*

Communications Internationales:

9. Mahmah B., Harouadi F., Achache S., **Chader S.**, Belhamel M., M'Raoui A., Abdeladim K, Cherigui AN. and Etievant C. *تأملات علمية في آية المشكاة من سورة النور، الهيدروجين الطاقوي : محاولة فهم جديد*. ندوة الجزائر الدولية حول لمعان من الإعجاز القرآن «. الندوة التاسعة للهيئة العالمية للإعجاز العلمي في القرآن والسنة. ندوة الجزائر الدولية حول الإعجاز العلمي في القرآن والسنة. Université Ferhat Abess (Sétif) du 10 au 12 Mars 2008 (communication orale).
10. **Chader S.**, Hacene H et Agathos S. Etude de la production d'hydrogène par trois espèces de microalgues isolées dans le sud algérien. *Conférence Internationale sur les Energies Renouvelables*. Bejaia 25 – 27 novembre 2007 (communication orale).
11. **Chader S.**, Hacene H, Belhamel M et Agathos S. Procédés biologiques de production de l'hydrogène : aperçu et perspectives. 2^{ème} *Workshop International de l'Hydrogène*. Ghardaïa 27 – 29 octobre 2007 (communication orale).
12. **Chader S.**, P, Gerin et Agathos S. Des microorganismes au service de la biotechnologie environnementale et énergétique. *Journée de Rencontre Étudiants – Chercheurs, organisée par l'ACFA (Association des Chercheurs de la Faculté d'Ingénierie Biologique, Agronomique et Environnementale)*. Université Catholique de Louvain. Belgique. 7 Février 2007 (communication orale).
13. **Chader S.**, Hacene et Agathos S. Physiological and biochemical characterisation of *Spirulina* sp hydrogen strain's production *World Renewable Energy Congress Florence, August 19/25, 2006* (communication orale).
14. **Chader S.**, Hacene H et Belhamel M. Physiological and biochemical characterisation of *Chlamydomonas* sp hydrogen strain's production. 16^{ème} *conférence Mondiale sur l'Hydrogène*, Lyon. France 12 au 16 juin 2006 (communication par affiche).
15. **Chader S.**, Hacene H, Rihani R, Kaidi F et Belhamel M. Caractérisation physiologique et biochimique d'une souche de *Chlamydomonas* sp. productrice d'hydrogène. 1^{er} *Workshop International sur l'hydrogène : vecteur énergétique d'origine renouvelable*. 21 – 23 juin 2005. Alger. Algérie (communication orale).
16. Rihani R, Bensmaili A **Chader S** et Kaidi F. Caractérisation du photobioréacteur torique en pyrex en vue de la production biologique de l'hydrogène à partir de *Chlamydomonas* sp. 1^{er} *Workshop International sur l'hydrogène : vecteur énergétique d'origine renouvelable*. 21 – 23 juin 2005. Alger. Algérie (communication orale).
17. **Chader S.**, Hacene H, Rihani R, Kaidi F et Belhamel M. Hydrogen Gas Production by Microalgae Strains Locally Isolated. *2nd World conference and Tecnology Exhibition on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection*. 10 - 14 mai 2004 Rome Italie (communication par affiche).
18. **Chader S.** et Touzi A. Contribution à l'étude de la biodiversité algale en Algérie. "*International Workshop on The Marine Biodiversity in The Islamic Countries*" Alger. October 2001 (communication orale).

Communications nationales

19. **Chader S**, Madani.K, Boubetra.D et Hacene.H. Biodiversité microalgale des régions d'Adrar et d'El Goléa (Sahara Algérien) : variation taxonomique. *Journée scientifique du Centre National de Documentation Pêche et Aquaculture*. Janvier 2008 (communication par affiche).
20. **Chader S** et Chibane.N. Contribution à l'étude des microalgues isolées dans la région de Tamanrasset (gueltats du Hoggar). *Journée scientifique du Centre National de Documentation Pêche et Aquaculture*. Janvier 2008 (communication par affiche).
21. **Chader S**, Hacene H et Belhamel M. Implication de la biomasse algale dans le développement de l'agriculture saharienne. *Semaine Mondiale de l'Environnement*. Ecole Nationale Polytechniques 31 mai /6juin 2006. Alger. Algérie (Communication orale).
22. **Chader S**, Bessah H et Igoud S. La bioénergie : Technologies et applications. *Journée d'étude sur les énergies renouvelables* 2 mai 2006. Université Mouloud. Mameri. Tizi Ouzou (Communication orale).
23. **Chader S**, M'Raoui A et Belhamel M. Production photobiologique de l'hydrogène à partir des microalgues. *Journée de Yaoum El Elm*. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene 16 avril 2006 (Communication orale).
24. **Chader S**. Bio procédés de la production photo biologique de l'hydrogène à partir des microalgues. *Journées thématiques sur les énergies renouvelables et l'économie de l'énergie*. Ecole Technique de Blida. Algérie. Septembre 2004(Communication orale).
25. **Chader S**. La spiruline : un apport protéique sûr. *Journée mondiale de l'alimentation*. Institut National d'Agronomie (El Harrach. Alger) octobre 2002. (Communication orale).
26. **Chader S** et Touzi A. Biomasse algale : Source énergétique et alimentaire. *Séminaire National Biomasse, production et valorisation*. Alger juin 2001. (Communication orale).



Annexe 1

Composition chimique du Bouin Holland (fixateur de la couleur et de la forme du chromatophore) :

- Acétate neutre de cuivre : 2.5g
- Acide picrique : 4g
- Formol 40% : 10 ml
- Acide acétique cristallisable : 1.5ml
- Eau distillée : 100 ml

Annexe 2

Milieu ASN-III (g l⁻¹) ou (mM) NaCl 25.0, 427 MgCl₂.6H₂O, 2.0 9.8 KCl, 0.5 6.7 NaNO₃, 0.75 8.8 K₂HPO₄.3H₂O, 0.02 0.09 MgSO₄.7H₂O, 3.5 14.2 CaCl₂.2H₂O, 0.5 3.4 acide Citrique, 0.003 0.015 citrate ammoniac Ferric 0.003 0.015 EDTA 0.0005 0.0015 Na₂CO₃ 0.02 0.19 Trace metal mix A5+Co 1 ml, eau distillée 1 L , le pH est ajusté après autoclavage à 7.5.

Milieu MN (g l⁻¹) ou (mM) NaNO₃ 0.75 8.82 K₂HPO₄.3H₂O 0.02 0.09 MgSO₄.7H₂O 0.038 0.15 CaCl₂.2H₂O 0.018 0.125 acide Citrique 0.003 0.015 citrate ammoniac Ferric 0.003 0.015 EDTA 0.0005 0.0015 Na₂CO₃ 0.02 0.19 Trace metal mix A5+Co 1 ml eau de mer 750 ml, compléter à 1 L avec eau distillée le pH ajusté après autoclavage à 8.3

Milieu BG 11 (g l⁻¹) ou (mM) NaNO₃ 1.5 17.65 K₂HPO₄.3H₂O 0.04 0.18 MgSO₄.7H₂O 0.075 0.30 CaCl₂.2H₂O 0.036 0.25 acide Citrique 0.006 0.03 citrate ammoniac Ferric 0.006 0.03 EDTA 0.001 0.003 Na₂CO₃ 0.02 0.19 Trace metal mix A5+Co 1 ml, eau distillée 1 L le pH ajusté après autoclavage à 7.4

Composition de la « solution A5 », en g/l: H₃BO₃ = 2,86; MnCl₂, 4 H₂O = 1,81; ZnSO₄, 7 H₂O = 0,222; CuSO₄, 5 H₂O = 0,079; MoO₃ = 0,015.

Annexe 3

Milieu Tris - Acetate - Phosphate (TAP)

Pour 1 L de milieu

Solution 2X Filner's Beijernicks	25ml
1M Potassium Phosphate	1ml
Trace mineral solution or	5ml
P IV solution 2X	3ml
Tris-Base	2.42g
Acide Acétique Glacial (17.4 mM acetate)	1ml
(pH doit être de 7.2	

2X Filner's Beijernicks Solution (500 ml)

NH ₄ Cl	8g
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	2g

Adjuster avec l'eau distillée 500ml et stocher à 4°C après autoclavage.

Trace Mineral Solution (500 ml)

5 g disodium EDTA – dissout dans 400 ml d'eau avec chauffage sous agitation.

Neutraliser à pH 6.5 avec du NaoH 5N

Puis ajouter les sels suivants un à un, une fois le sel complètement dissout.

0.5 g	FeSO ₄ *7H ₂ O
2.2 g	ZnSO ₄ *7H ₂ O
1.14 g	H ₃ BO ₃
0.51 g	MnCl ₂ *4H ₂ O
0.016 g	CuSO ₄ *5H ₂ O
0.073 g	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O
0.016 g	CoCl ₂ *6H ₂ O

Compléter à 500 ml puis autoclaver (la solution est vert pale puis deviant de couleur pourpre).

1M Potassium Phosphate Stock (50 ml)

20 ml 1M stock KH₂PO₄ (1M stock : 6.8g/50ml)

30 ml 1M stock K₂HPO₄ (1M stock: 8.7g/50ml)

pH 7.2

Pour les cultures solides 13 g d'agar sont ajoutés à 1 litre de milieu avant autoclavage.

Pour la carence en soufre, tous les sels à base de soufre sont remplacés les sels chlorés correspondant.

Annexe 4Mélange d'antibiotiques (solution a + solution b) (mg/ml) :

Solution a		Solution b	
Pénicilline G	100	Chloramphénicol	10
Streptomycine sulfate	50	Ethanol 95%	1
Eau distillée	100	Benomyl	10

		()			
()					
	Chlorella		.Scenedesmus	Chlorella	
	hydrogenase	/	/(H ₂)	1,35	Chlorella sorokiniana
PT6	Chlorella sp	Mt	Chlorella salina	.() %0,2
	(%15-11)		hydrogenase		
	Hydrogenase		Chlorella		:

RESUME

La recherche entreprise dans cette thèse est une contribution au développement des énergies renouvelables à travers la valorisation de la biomasse microalgale. Une des nombreuses voies de production propre, durable et sans danger pour l'environnement est explorée. Il s'agit de la production d'hydrogène : le vecteur énergétique de demain. Au cours de notre travail, une étude bibliographique a été effectuée sur la problématique de la production biologique de l'hydrogène à partir des microorganismes en général et des microalgues en particulier. Un état de l'art explicite a été donné sur les procédés de production d'hydrogène par les microorganismes photosynthétiques.

Par ailleurs, un screening non exhaustif des souches autochtones de microalgues, prélevées dans les eaux des foggara de Tamentit (Adrar, Algérie), a permis d'isoler une dizaine d'espèces appartenant aux genres Chlorella et Scenedesmus. Parmi les Chlorella isolées, trois souches ont montré des potentialités de production très proches des valeurs citées dans la bibliographie. Les cinétiques de production ont été suivies en culture batch. La souche Ce apparentée à *Chlorella sorokiniana* possède un taux de production de 1.35 mld³H₂/l culture/h, un taux comparable à celui de la souche référence *Chlamydomonas reinhardtii* (2 ml H₂/l culture/h). Cependant, l'activité enzymatique de l'hydrogénase de cette dernière est totalement inhibée à 0.2% d'oxygène (principal inhibiteur de la production d'hydrogène). Contrairement à *Chlorella salina* souche Mt et *Chlorella sp* souche Pt6, qui ont montré une stimulation précoce de la production et une plus grande résistance puisque l'activité de l'hydrogénase semble résister à de fortes concentrations d'oxygène (11 – 15 %).

Mots clés : renouvelable, production biologique, hydrogène; *Chlorella*, Sahara Algérien, hydrogénase, photobioréacteur.

ABSTRACT

The research undertaken in this work is a contribution to the development of renewable energies through the valorisation of the microalgae biomass. One of the many clean and sustainable production ways is explored. It is about the hydrogen production: Hydrogen energy is a critical resource to sustainable energy development. During this study, a bibliographic review on hydrogen production has been performed especially the problems of the biological production of hydrogen starting from the micro-organisms in general and the microalgae in particular.

In addition, a non exhaustive screening of the stocks of microalgues isolated from foggaras' water in Tamentit (Adrar, Algérie), allowed to isolate ten species belonging to the kinds Chlorella and Scenedesmus. Among the isolated stocks of Chlorella, three showed very close production potentialities as it's reported in the bibliography. The kinetics of hydrogen production were followed in batch culture. *Chlorella sorokiniana* strain Ce has a rate production value of 1.35 ml d³ H₂/l culture/h, comparable with *Chlamydomonas reinhardtii* (2 ml H₂/l culture/h). However, their enzymatic activity of the hydrogenase is completely inhibited at 0.2% of oxygen (principal inhibitor of hydrogen production). Contrary to *Chlorella salina* MT and *Chlorella sp* Pt6, which showed an early stimulation of the production and a high resistance since the activity of the hydrogenase seems to resist strong oxygen concentrations (11 - 15%).

Keywords: renewable, biological production, hydrogen, Algerian Sahara, hydrogenase, photobioreactor.

